

MABEL SILVA VIEIRA

**REGULAÇÃO DA SÍNTESE DA NITRATO REDUTASE EM**  
***Azospirillum brasilense***

Tese de Mestrado apresentada ao  
Departamento de Bioquímica da  
Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA  
1981

Aos meus pais

Tese orientada pelo  
Dr. FÁBIO DE OLIVEIRA PEDROSA

Ao Prof. Osvaldo de Oliveira Maciel  
pela boa vontade, cooperação e fle-  
xibilidade, que tornaram possível a  
conclusão deste trabalho, meu

AGRADECIMENTO ESPECIAL.

## MEUS AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa pela confiança e orientação constante no desenrolar deste trabalho.
- À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro concedido.
- Ao Plano Institucional de Capacitação Docente (PICD-CAPES) pela concessão da bolsa.
- Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Bioquímica que de uma forma ou outra contribuíram para a execução deste trabalho.
- À Sra. Maria Helena B. Ymayuki pela revisão das referências bibliográficas.
- Ao amigo Sergio Paulo Diniz pela datilografia prévia.
- Aos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, pela compreensão e apoio, especialmente durante 1981.

## SUMÁRIO

Lista de Figuras .....	<i>vii</i>
Lista de Quadros .....	<i>viii</i>
I - RESUMO .....	01
II - INTRODUÇÃO .....	03
III - MATERIAIS E MÉTODOS .....	08
IV - RESULTADOS .....	15
V - DISCUSSÃO .....	42
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Crescimento de <i>A. brasilense</i> (Sp7) em Amônia .....	23
2. Crescimento de <i>A. brasilense</i> (Sp7) em Nitrato .....	24
3. Crescimento de <i>A. brasilense</i> (Sp7) em Nitrato mais <u>A</u> mônia .....	25
4. Crescimento de <i>A. brasilense</i> (Sp7) em Nitrato .....	26
5. Crescimento de <i>A. brasilense</i> (Sp7) em Nitrato .....	27
6. Crescimento de <i>A. brasilense</i> (Sp7) em Nitrato .....	28
7. Crescimento de <i>A. brasilense</i> (Sp7) em Nitrato .....	29
8. Excreção máxima de Amônia e Nitrito em função da con- centração inicial de Nitrato .....	30
9. Efeito da pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ ) na expres- são da atividade da Nitrato Redutase em <i>A. brasilense</i> (Sp7) na presença de Nitrato .....	31
10. Efeito da pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ ) na expres- são da atividade da Nitrato Redutase em <i>A. brasilense</i> (Sp7) na presença de Nitrato mais Amônia .....	32
11. Efeito da pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ ) na expres- são das Nitrato Redutase em <i>A. brasilense</i> (Sp7) ....	33
12. Efeito da pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ ) na expres- são das Nitrato Redutases e da Nitrogenase em <i>A. bra- silense</i> (Sp7) na ausência de N fixado .....	34
13. Efeito da pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ ) na expres- são da Nitrato Redutase e da Nitrogenase em <i>A. brasi- lense</i> (Sp7) na presença de Nitrato .....	35
14. Formação de Nitrito e Amônia durante a expressão da <u>a</u> tividade da Nitrato Redutase .....	36
15. Efeito da pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ ) na expres- são da Nitrato Redutase e da Nitrogenase em <i>A. brasi- lense</i> (Sp7) na presença de Nitrato .....	37

## LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
I. Efeito da fonte nitrogenada no Crescimento e consumo de Nitrato por <i>A. brasilense</i> (Sp7) .....	38
II. Efeito da concentração de Nitrato no Crescimento, Consumo de Nitrato e na excreção de Nitrito e Amônia por <i>A. brasilense</i> ..	39
III. Efeito da concentração de Nitrato no Crescimento e na excreção de Nitrito e Amônia por <i>A. brasilense</i> (Sp7).	40
IV. Distribuição intracelular da Nitrato Redutase de <i>A. brasilense</i> (Sp7) .....	41



## RESUMO

*Azospirillum brasilense* é um organismo fixador de nitrogênio, capaz de reduzir assimilatoriamente o nitrato e de desnitrificar. Estudamos o efeito de fontes de nitrogênio e do oxigênio na regulação da síntese das nitrato redutases assimilatória (NRA) e dissimilatória (NaR). No crescimento aeróbico com  $\text{NO}_3^-$  sozinho o consumo de nitrato foi bifásico, apresentando uma fase inicial de consumo lento seguido de uma fase de consumo intenso acompanhado de excreção de nitrito, sugerindo uma dupla utilização do  $\text{NO}_3^-$ , assimilação e dissimilação. Na presença de  $\text{NO}_3^-$  mais  $\text{NH}_4^+$ , o nitrato não foi consumido na primeira fase de crescimento, demonstrando o caráter de utilização preferencial da amônia em relação ao nitrato e a repressão da via de redução assimilatória por amônia; na fase seguinte o consumo de  $\text{NO}_3^-$  foi praticamente estequiométrico com o nitrito excretado, indicando sua utilização exclusivamente dissimilatória servindo o  $\text{NH}_4^+$  como fonte de nitrogênio. Em culturas agitadas sob ar, níveis equivalentes de nitrito e amônia foram excretados, mas que variaram em função da concentração de  $\text{NO}_3^-$  utilizada.

Determinamos o efeito do  $p\text{O}_2$  durante a indução da nitrato redutase na presença de  $\text{NO}_3^-$  e de  $\text{NO}_3^-$  mais  $\text{NH}_4^+$ , na excreção de nitrito, sob condições anaeróbicas. Foram utilizados organismos previamente crescidos em  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e livres de atividade de nitrato redutase. Na presença de  $\text{NO}_3^-$  não houve crescimento bacteriano e a faixa de  $p\text{O}_2$  ótimo para a indução da nitrato redutase foi de 1 a 2% de  $\text{O}_2$  na fase gasosa. Na presença de  $\text{NO}_3^-$  mais  $\text{NH}_4^+$  o  $p\text{O}_2$  ótimo para excreção de nitrito foi o mesmo, ocorrendo, porém alargamento da faixa de  $p\text{O}_2$  de excreção. Cloranfenicol (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) aplicado durante a fase de indução reprimiu completamente a excreção de nitrito. A atividade específica da nitrato redutase, calculada pelo nitrito excretado em função da proteína celular na presença de  $\text{NO}_3^-$  mais  $\text{NH}_4^+$ , foi ligeiramente inferior àquela na presença de  $\text{NO}_3^-$  sozinho. A excreção de  $\text{NO}_2^-$  e a não repressão pela  $\text{NH}_4^+$  sugere a atuação da nitrato redutase dissimilatória. Na ausência de nitrogênio fixado observamos dois picos de atividade da nitrato redutase com ótimos em 1 a 2% de  $\text{O}_2$  e 4% de  $\text{O}_2$  que indicam

a presença de duas enzimas dissimilatórias. Concluímos que o simples abaixamento da tensão de oxigênio permitiu a expressão desta enzima. Cloranfenicol (50  $\mu\text{g/ml}$ ) não interferiu com a atividade anaeróbica da nitrato redutase. A atividade específica máxima em 1 e 2% de  $\text{O}_2$  foi 52% menor que a atividade em 4% de  $\text{O}_2$ . O oxigênio em baixas concentrações foi necessário para a síntese da nitrato redutase e atuou como agente repressor em concentrações elevadas. A atividade da nitrogenase, que se expressou durante este experimento, apresentou um  $p\text{O}_2$  ótimo ligeiramente superior ao do 2º pico de atividade da nitrato redutase. Por outro lado, na presença de  $\text{NO}_3^-$  a atividade da nitrato redutase apresentou um ótimo em 1 a 2% de  $\text{O}_2$  e um "ombro" que se estendeu até 10% de  $\text{O}_2$ , havendo um aumento no nível da atividade das nitrato redutases de cerca de 10 e 5x em relação ao experimento sem  $\text{NO}_3^-$ . A expressão da atividade da nitrogenase na presença de  $\text{NO}_3^-$  foi reduzida em cerca de 10 vezes. Ocorreu formação e excreção de  $\text{NO}_2^-$  mais  $\text{NH}_4^+$  em função do  $p\text{O}_2$  durante a indução em  $\text{NO}_3^-$ . A excreção de amônia apresentou um ótimo em 5% de  $\text{O}_2$ , mesma região de  $p\text{O}_2$  onde ocorreu a expressão da nitrogenase. Na presença de  $\text{NH}_4^+$  sozinho observou-se também dois picos de atividade da nitrato redutase, o primeiro em 2% e o segundo entre 5 e 20% de  $\text{O}_2$ . Amônia teve um efeito estimulador marcante na expressão desta atividade.

Tomados em conjunto os dados apresentados neste trabalho indicam: (a) a presença de uma via assimilatória de nitrato com ambas, nitrato e nitrito redutases, cuja síntese é regulada por repressão por amônia; (b) a expressão das nitrato redutases dissimilatórias requer oxigênio e é reprimida por oxigênio, mas não o é por amônia; o nitrato não é requerido como indutor, apesar deste estimular a expressão da enzima, amônia não reprime, pelo contrário, permite uma alta expressão; (c) tomando a expressão da nitrogenase como marcador de baixa tensão de oxigênio dissolvido, concluímos que a amônia excretada nos experimentos de indução ocorreu via nitrito redutase dissimilatória, sugerindo a presença da via dissimilatória com formação de amônia, requerendo  $\text{O}_2$  para expressão e sendo reprimida por este último em altas concentrações.

## INTRODUÇÃO

O potencial de fixação biológica de nitrogênio pelas associações entre gramíneas e bactérias fixadoras teve a sua importância substancialmente aumentada quando DOBEREINER e seus colaboradores demonstraram a presença de bactérias fixadoras de nitrogênio em raízes de gramíneas de importâncias agrícolas (DOBEREINER, & DAY, 1974; BULOW & DOBEREINER, 1975; DAY & DOBEREINER, 1976).

Estes autores isolaram destas gramíneas um organismo fixador de nitrogênio que foi inicialmente classificado como *Spirillum lipoferum* (DAY & DOBEREINER, 1974). O isolamento de centenas de estirpes de *Spirillum lipoferum* de várias regiões do mundo (DOBEREINER et al., 1976) em associação com diferentes gramíneas economicamente importantes como sorgo, trigo, milho, digitaria, estimulou grandemente o estudo deste organismo.

Estudos de taxonomia envolvendo hibridização de DNA em 61 estirpes deste organismo e outras características bioquímicas levaram KRIEG e colaboradores a sugerir a criação de um novo gênero: *Azospirillum*, contendo duas espécies, *Azospirillum brasilense* e *Azospirillum lipoferum* (KRIEG & TARRAND, 1978; TARRAND et al., 1978).

O gênero *Azospirillum* compreende organismos gram negativos, móveis, de forma espiralada, aeróbicos, capazes de fixar nitrogênio em condições de baixas tensões de oxigênio e de desnitrificar (DOBEREINER & DAY, 1974; DAY & DOBEREINER, 1976; OKON et al., 1976a, 1977b; NEYRA et al., 1977; KRIEG & TARRAND, 1978; TARRAND et al., 1978).

O crescimento de *Azospirillum* spp dependente de nitrato em condições aeróbicas, portanto redução assimilatória de nitrato foi demonstrado por NEYRA & VAN BERKUN (1977). *Azospirillum* spp como bacteroides de *Rhizobium japonicum* (RIGAUD et al., 1973) é capaz de reduzir o acetileno a etileno anaerobicamente utilizando nitrato como aceitador terminal de elétrons (NEYRA & VAN BERKUN, 1977; SCOTT & SCOTT, 1978; SCOTT et al., 1979). Este fato foi ques-

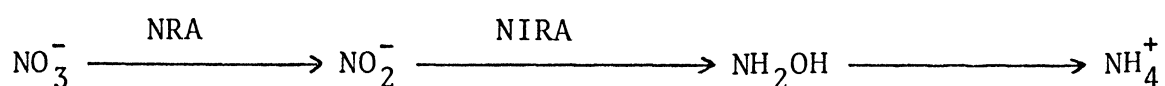
tionado por NELSON & KNOWLES (1978), que foram incapazes de confirmá-lo. Recentemente BOTHE et al., (1981) conseguiram evidências confirmando crescimento anaeróbico e redução de acetileno de pendente da redução de nitrato.

Os primeiros estudos de desnitrificação por *Azospirillum* foram realizados por NEYRA et al. (1977), ESKEW et al. (1977), e NEYRA & VAN BERKUN (1977), que demonstraram pela primeira vez desnitrificação até óxidos gasosos de nitrogênio por um organismo fixador de nitrogênio. Estudando o processo de desnitrificação por *Spirillum lipoferum*, NEYRA et al. (1977) foram capazes de classificar as diferentes estirpes em tres grupos, de acordo com a extensão deste processo: grupo I, elevada produção de gás em meio de nitrato e completo desaparecimento de nitrito; grupo III, acúmulo de nitrito e ausência de produção de gás, e grupo II com níveis intermediários de nitrito e requerimento por todas as estirpes de extrato de levedura para o crescimento. Posteriormente, TARRAND et al. (1978) demonstraram que os grupos I e III constituem a espécie *Azospirillum brasilense* e o grupo II a espécie *Azospirillum lipoferum*. As espécies do gênero *Azospirillum* portanto, apresentam todas as reações de transformação biológica do nitrogênio, exceto a via de nitrificação ainda não demonstrada.

O fato do *Azospirillum* desnitrificar é de extrema importância econômica e é indesejável, uma vez que poderá contribuir para a remoção do nitrato disponível às plantas presente nos solos.

Tres vias de transformação metabólica no nitrato tem sido propostas: (a) redução assimilatória do nitrato à amônia, (b) desnitrificação ou redução dissimilatória do nitrato a óxidos gasosos e (c) redução dissimilatória do nitrato à amônia.

A redução assimilatória consiste na redução do nitrato à amônia de acordo com a sequência de reações abaixo, catalizadas pela nitrato redutase (NRA), e pela nitrito redutase (NIRA) assimilatórias.

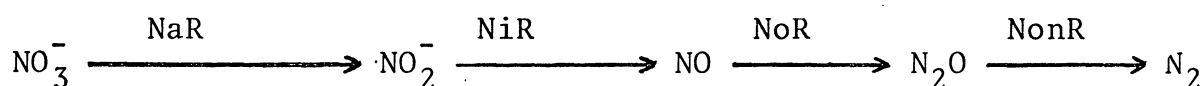


Esta via ocorre em bactérias, algas verdes e cianofíceas, fungos, leveduras e vegetais superiores (PAYNE, 1973; PICHINOTY, 1973; HEWITT, 1975; SOLOMONSON et al., 1975). A redução assimilatória do nitrato é catalizada pela nitrato redutase assimilatória (NAD(P)H: nitrato óxido redutase) é uma molibdoflavoproteína multimérica apresentando peso molecular de 350.000 a 500.000. A reação catalizada pode ser decomposta em duas atividades parciais: uma atividade de NAD(P)H desidrogenase (FAD dependente NAD(P)H diaforase), em que vários aceitadores artificiais de elétrons como citocromo c, diclorofenol-indofenol ou ferricianeto podem substituir o nitrato; a segunda atividade parcial é a de redução do nitrato propriamente dita, onde vários doadores artificiais de elétrons, como metil e benzil viologens, FMNH<sub>2</sub>, FADH<sub>2</sub> e eventualmente ferredoxina (HEWITT, 1975) podem substituir o NAD(P)H.

A redução assimilatória do nitrito à amônia é catalizada pela nitrito redutase assimilatória. Nas algas e plantas verdes é uma ferredoxina reduzida: nitrito óxido redutase que apresenta peso molecular de 63.000 (HEWITT, 1975), contendo siroheme (MURPHY et al., 1974) e centros de ferro-enxofre (APARÍCIO et al., 1975). Em fungos, especialmente em *Neurospora crassa*, a nitrito redutase apresenta peso molecular em torno de 290.000 e requer piridinonucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (LAFFERTY & GARRETT, 1974). Em organismos procarióticos como o *Azotobacter chroococcum* a nitrito redutase assimilatória é uma FAD dependente metaloproteína de peso molecular 67.000, utilizando NADH como doador de elétrons (VEGA et al., 1973). A regulação da síntese das enzimas de assimilação do nitrato é bastante complexa e varia de acordo com a espécie (PAYNE, 1973; PICHINOTY, 1973; STOUTHAMER, 1976). Em geral, as enzimas da via de assimilação são solúveis, não estando portanto associadas a membrana citoplasmática (BROWN et al., 1974; VAN'T RIET et al., 1968). A regulação da síntese da nitrato e nitrito redutases assimilatórias é feita, via de regra, através da repressão por amônia, como no caso da nitrato redutase de *Pseudomonas denitrificans* (STOUTHAMER, 1976) e indução por nitrato e nitrito (VAN'T RIET et al., 1968; GUERRERO et al., 1973; BROWN et al. 1974; YORDY & DELWICHE, 1979). O oxigênio não exerce qualquer função repressora (PAYNE, 1973; PICHINOTY, 1973; STOUTHAMER, 1973).

Desnitrificação é o processo através do qual o nitrato é reduzido a outros óxidos de nitrogênio e finalmente em nitrogênio molecular. A partir de dados de balanço nitrogenado, calcula-se uma perda anual através deste processo de cerca de  $40 \times 10^6$  ton de N pelos oceanos e de  $43 \times 10^6$  ton de N pela superfície terrestre (QUISPEL, 1974), demonstrando claramente sua importância. A desnitrificação contribui efetivamente para a remoção do nitrogênio do solo disponível para as plantas, em prejuízo da produção agrícola (DELWICHE & BRYAN, 1976) e, mais recentemente destacou-se a influência que o processo pode ter na composição da atmosfera, onde o aumento dos níveis de óxido nítrico ( $N_2O$ ) levaria à destruição da camada de ozônio protetora da biosfera (PAYNE, 1976). Estes dados justificam plenamente o estudo da desnitrificação objetivando minimizar seus efeitos.

Desnitrificação ou respiração do nitrato ocorre exclusivamente em bactérias (PAYNE, 1973; PICHINOTY, 1973; PAYNE, 1976), e a sequência de reações mais aceita para este processo (PICHINOTY, 1973; PAYNE, 1973 e 1976; PAYNE & BALDERSTON, 1978) foi proposta por MATSUBARA (1970) e está apresentada a seguir:



Cada etapa é catalizada por uma enzima específica: nitrato redutase (NaR), nitrito redutase (NiR), óxido nítrico redutase (NoR), e óxido nitroso redutase (NonR) (PAYNE & RILEY, 1969; MATSUBARA, 1970). A nitrito redutase, e possivelmente a óxido nítrico redutase são enzimas solúveis, enquanto que a nitrato e a óxido nitroso redutases estão associadas à membrana (PAYNE, 1976; PAYNE & BALDERSTON, 1978). Em *Paracoccus denitrificans* (STOUTHAMER, 1980) e na maioria dos desnitrificadores (PAYNE, 1976) os doadores de elétrons para estas redutases são citocromos: b para a nitrato redutase, citocromo c ou cd para a nitrito redutase e citocromo c para as redutases dos óxidos nítrico e nitroso. Fosforilação oxidativa acoplada a estas atividades ocorre permitindo crescimento na ausência de oxigênio (PAYNE, 1973; PICHINOTY, 1973; KOIKE & HATTORI, 1975; STOUTHAMER, 1976 e 1980).

O oxigênio influencia a desnitrificação de duas maneiras: a) altas tensões reprimem a síntese e inibem as atividades das redutases envolvidas (PICHINOTY & D'ORNANO, 1961; SHOW & DeMOSS, 1968; PAYNE et al., 1971); b) baixas tensões de oxigênio desreprimem simultaneamente a síntese de todas as enzimas da via, mesmo na ausência dos óxidos de nitrogênio (PAYNE et al., 1971). Nitrato e nitrito inibem a atividade da óxido nítrico redutase (PAYNE & RILEY, 1969).

Uma terceira via de redução do nitrato tem se tornado evidente ultimamente (DUNN et al., 1979). Nesta via o nitrato é reduzido à amônia por uma via semelhante à assimilatória, porém apresentando regulação semelhante à via dissimilatória: (a) o produto da redução do nitrito é amônia (HADJIPETROU & STOUTHAMER, 1975; DUNN et al. 1979); (b) a síntese das enzimas não sofre repressão por amônia (KEMP & ATINKSON, 1960) e (c) a síntese das enzimas é reprimida pelo oxigênio (PRAKASH & SADANA, 1973; DUNN et al., 1979; CASKEY & TIEDJE, 1980).

O presente trabalho de tese com *A. brasilense* teve por objetivos: (A) Ampliar os estudos do efeito do oxigênio e natureza das fontes nitrogenadas na excreção de nitrito e amônia, assim como na regulação da síntese da nitrato e nitrito redutases; (B) Estudar a localização celular das nitrato redutases.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. ORGANISMO

O organismo utilizado foi o *Azospirillum brasilense*, estirpe Sp7 (ATCC 29145), isolado de raízes de *Digitaria decumbens* e gentilmente cedida pela Dra. Johanna Dobereiner da EMBRAPA, Seropédica, RJ.

### 2.2. MEIOS DE CULTURA, CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO E CRESCIMENTO

Nas etapas de manutenção e crescimento do organismo foi utilizado o meio descrito por OKON et al., (1977a) modificado pela substituição do  $\text{FeCl}_3$  por um quelato de  $\text{FeSO}_4$  - nitrilo triacetato de sódio (NTA) e pela adição de biotina. O meio modificado tinha a seguinte composição (g/l):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (6,0);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (4,0);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2);  $\text{NaCl}$  (0,1),  $\text{CaCl}_2$  (0,02);  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,002); biotina (0,0001); ácido málico (5,0);  $\text{NaOH}$  (3,0);  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,02) e NTA (0,056); pH 6,8 - 7,0. O meio foi esterilizado a  $125^\circ\text{C}$ , 1 atmosfera por 30 minutos. A mistura de fosfatos, em um décimo do volume final, foi esterilizada separadamente e adicionada fria ao restante do meio. De acordo com o experimento este meio foi suplementado com  $\text{KNO}_3$  (2,5 - 20 mM),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 - 20 mM),  $\text{KNO}_3$  mais  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 - 20 mM de cada). Os meios semi-sólido e sólido foram obtidos pela adição de Agar Oxoid nº 1, 1,5 e 15 g/l, respectivamente. Onde especificado, o ácido málico foi substituído por ácido láctico (5 g/l).

#### 2.2.1. REISOLAMENTO DO *Azospirillum brasilense*, Sp7

O organismo recebido da EMBRAPA foi inoculado inicialmente em meio de cultura semi-sólido, incubado a  $37^\circ\text{C}$  por 24 a 48 horas até o aparecimento de película indicativa de crescimento dependente de  $\text{N}_2$ . O organismo foi então riscado em placas de Petri, contendo o meio de batata e incubado a  $37^\circ\text{C}$  por 96 horas. Colônias isoladas e características foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio sólido inclinado e incubados a  $37^\circ\text{C}$  até obter um bom crescimento. Estes tubos, estoque e de uso, foram man



tidos a 4°C.

A pureza das culturas foi comprovada pela observação das placas e por microscopia ótica.

### 2.2.2. ESTUDOS DO CRESCIMENTO EM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO

O organismo foi crescido em 400 ml de meio líquido em frascos de erlenmeyer de 2 litros, contendo  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ou mistura de ambos a 37°C e agitação constante de 160 rpm num agitador rotatório.

O inóculo foi crescido nas mesmas condições em  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (3mM) até o final da fase logarítmica (Densidade Ótica em 560nm igual a 1,4), quando praticamente todo  $\text{NH}_4^+$  tinha sido consumido. Alternativamente, o pré-inóculo foi crescido em  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mM), centrifugado, lavado assepticamente, ressuspenso em meio estéril sem fonte de nitrogênio e empregado como inóculo.

O tempo de duplicação (td) e a taxa de crescimento específico ( $\mu$ ) do *A. brasilense* foi determinado usando as seguintes equações (TEMPEST, 1970):

$$\mu = 2,3 \frac{\log DO_2 - \log DO_1}{t_2 - t_1} \quad td = \frac{0.63}{\mu}$$

onde  $DO_1$  e  $DO_2$  correspondem às densidades óticas nos tempos  $t_1$  e  $t_2$  respectivamente, sendo  $t_1$  e  $t_2$  expressos em horas.

### 2.2.3. CRESCIMENTO EM LARGA ESCALA

O crescimento foi realizado num fermentador de vidro com capacidade para 20 litros, contendo 15 litros de meio líquido suplementado com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1g/l) e lactado de sódio (6,3g/l). O inóculo foi crescido no mesmo meio a 37°C e 160 rpm até o final da fase logarítmica e empregado na proporção de 5% do volume. A cultura foi mantida a 37°C com agitação constante e borbulhada com ar a um fluxo de 1,5 a 2,0 l/min. As células foram colhidas por centrifugação (7.000 x g por 30 minutos) quando a cultura atingiu D.O.

560nm de 1,50. A pasta de células obtida foi lavada uma vez com igual volume de meio de cultura sem carbono e sem nitrogênio, centrifugada, suspensa em igual volume de meio e finalmente guardada em nitrogênio líquido. Estas células foram utilizadas nos experimentos de "indução" em todas as fases do trabalho.

### 2.3. DETERMINAÇÕES

Durante o crescimento amostras foram colhidas periodicamente, transferidas para frascos de penicilina, estocadas no congelador para posteriores determinações de nitrato, nitrito e amônia no sobrenadante; proteína e pH na suspensão de células. A determinação do crescimento foi feita no momento da retirada das amostras.

O sobrenadante das culturas foi obtido por centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C.

#### 2.3.1. CRESCIMENTO DO *Azospirillum brasilense*

O crescimento do organismo foi determinado por turbidimetria a 560nm, usando um espectrofotômetro Bausch & Lomb. As medidas de densidade ótica foram feitas contra água destilada, como branco, em tubo tipo Klett.

#### 2.3.2. PROTEÍNA CELULAR

O conteúdo de proteína das células foi determinado segundo o método de LOWRY et al., (1951), usando albumina sérica bovina como padrão. As células foram submetidas a uma digestão prévia com NaOH 0,25N por 30 minutos à temperatura ambiente antes da determinação de proteína.

#### 2.3.3. NITRATO

A concentração de nitrato no sobrenadante da cultura foi determinado colorimetricamente segundo método de CATALDO et al. (1975). Alíquotas de 0,1 ml foram adicionadas de 0,4 ml de ácido salicílico a 5% em ácido sulfúrico concentrado. As misturas foram

incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, sendo então alcalinizadas com 9,5 ml de NaOH 2N. A intensidade do cromóforo foi determinada em 410nm e a concentração de nitrato foi obtida usando  $\text{KNO}_3$  como padrão. Amônia e nitrito não interferem neste método.

#### 2.3.4. AMÔNIA

O conteúdo de amônia do sobrenadante das culturas foi determinado colorimetricamente pela reação do indofenol, segundo o método de CHAYKIN (1969). Alíquotas de 0,15 ml foram adicionadas de 3,75 ml de solução de fenol 0,14 M e 0,10 ml de nitroprusiato de sódio 0,25 M. A mistura foi homogeneizada em "vortex" e imediatamente adicionada de hipoclorito de sódio 0,12 N em NaOH 0,75 N. Novamente homogeneizada no "vortex" e após 20 minutos a intensidade do cromóforo formado foi determinada e a concentração de amônio foi obtida usando sulfato de amônio como padrão. Nitrato e nitrito não interferem neste método.

#### 2.3.5. NITRITO

A concentração de nitrito no sobrenadante das amostras foi determinada colorimetricamente como descrito por NEYRA et al., (1977). Alíquotas de 0,2 ml foram adicionadas a 2,0 ml de uma solução 1:1 (v/v) de N-1-naftil-etilenodiamino dicloreto 0,02% e sulfanilamida a 1% em HCl 3N, misturados no momento de uso. O cromóforo formado, um corante azo vermelho, foi lido em 540nm, e a concentração de nitrito foi determinada usando  $\text{KNO}_2$  como padrão. Amônia e nitrato não interferem neste método.

### 2.4. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

#### 2.4.1. NITRATO REDUTASE

A atividade da nitrato redutase tanto em células intactas como nas diferentes frações celulares foi determinada em função do nitrito formado.

##### 2.4.1.1. ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE EM CÉLULAS INTACTAS

A atividade da nitrato redutase de células intactas foi

determinada em um sistema contendo 2 ml de suspensão de células (D.O.<sub>560nm</sub> igual a 1.0) em meio de cultura contendo lactato de sódio (5g/l) e adicionada de 0,5 ml de KNO<sub>3</sub> (100 mM).

Os ensaios foram realizados sob atmosfera de N<sub>2</sub> em banho-maria com agitação a 30°C. Alíquotas de 0,2 ml foram removidas em diferentes tempos e ensaiadas diretamente para nitrito.

#### 2.4.1.2. ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE NO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES CELULARES OBTIDAS POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO

##### 2.4.1.2.1. PREPARO DO EXTRATO BRUTO

Suspensão de células de *A. brasilense*, estirpe Sp7 (3,0 ml) cultivadas em 10 mM de KNO<sub>3</sub> até D.O.<sub>560 m</sub> igual a 1,55, e estocadas em nitrogênio líquido em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, foram descongeladas sob N<sub>2</sub>, adicionadas de 3,0 ml do mesmo tampão contendo 2 mM de Na<sub>2</sub>EDTA e rompidas num sonicador Brownwill, a 70 de força com intermitência de 30 segundos. A sonicação foi realizada sobre banho de gelo-sal. Em seguida o sonicação foi submetido a centrifugação por 15 minutos a 10.000 x g numa centrífuga a 4°C, usando tubos plásticos arrolhados contendo atmosfera de N<sub>2</sub>. Todas as operações foram feitas sob atmosfera de N<sub>2</sub>.

##### 2.4.1.2.2. OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO

O sobrenadante obtido foi diluído com 11 ml de tampão fosfato 100 mM, pH 7,5, contendo 1 mM de EDTA. Alíquota do sobrenadante (12 ml) foi submetido à ultracentrifugação, numa centrífuga Beckman, modelo L, rotor 40, por 2 horas a 40.000 rpm (aceleração média de 150.000 x g). Foram obtidas assim duas frações: o sobrenadante, fração solúvel; e o precipitado, fração particulada, que foi ressuspendida em 12 ml de tampão fosfato 100 mM, pH 7,5. Todas as soluções foram borbulhadas e mantidas sob atmosfera de N<sub>2</sub>.

##### 2.4.1.2.3. ENSAIO DA ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE EM EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS

A determinação da atividade da nitrato redutase no extra

to bruto e frações foi feita segundo o método descrito por RIGANO & ALIOTTA (1975), acrescido de algumas modificações. O sistema de reação continha tampão fosfato 35 mM, pH 7,5, EDTA 1,4 mM,  $\text{KNO}_3$  10 mM e extrato. O sistema foi pré-incubado a  $30^\circ\text{C}$  por 5 minutos, num banho-maria. Após este tempo foi adicionado flavina mononucleotídeo numa concentração final de 0,5 mM. A reação foi iniciada por adição de dititionita de sódio (25 mg/ml em  $\text{NaHCO}_3$  0,29 M). Todas as soluções usadas no ensaio enzimático foram borbulhadas com  $\text{N}_2$  para garantir o ensaio em condições anaeróbicas. Nos tempos especificados foram retiradas alíquotas de 1,0 ml e adicionadas a 0,5 ml de acetato de bário e 2,0 ml de etanol. A mistura foi centrifugada a  $10.000 \times g$  por 10 minutos (centrífuga Janetzki K-24). Com este tratamento as proteínas e flavina mononucleotídeo (FMN) são precipitadas, eliminando assim a interferência da coloração amarela do FMN com o cromóforo formado no teste do nitrito. Na última etapa do ensaio, o nitrito formado foi determinado em alíquotas de 1,0 ml do sobrenadante, obtido na operação anterior, pela adição de 2,0 ml do reagente de nitrito, incubação por 15 minutos à temperatura ambiente, volume completado para 4 ml com água destilada e leitura do cromóforo em 540 nm. Foi considerado uma unidade de nitrato redutase a atividade da enzima capaz de produzir 1 nmol de nitrito por minuto. A atividade específica foi definida como o número de unidades por mg de proteína.

#### 2.4.2. ATIVIDADE DA NITROGENASE

A atividade da nitrogenase "in vivo" foi determinada utilizando acetileno ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ) como substrato e detectando o produto formado por cromatografia gasosa (DART et al., 1972). O sistema de reação continha 1,0 ml de suspensão de células a 9,0 ml de fase gasosa ajustada para diferentes  $p\text{O}_2$  e contendo 10% de acetileno. O sistema foi incubado sob agitação rotatória (160 rpm) por 1 hora, a  $37^\circ\text{C}$ . Alíquotas (0,5 ml) da fase gasosa foram utilizadas para determinar o etileno formado por cromatografia gasosa. Para cada ensaio da atividade da nitrogenase foi necessário determinar a curva em função da pressão parcial de oxigênio ( $p\text{O}_2$ ), uma vez que o organismo em estudo é aeróbico dependendo, portanto, do oxigênio para a produção de ATP e também porque a nitrogenase é inativada pelo oxigênio. A atividade máxima da nitrogenase é pois obti

da naquele  $pO_2$  onde ocorre máxima produção de ATP, sem que haja inativação da enzima e/ou autoxidação dos carreadores de elétrons de baixo potencial de oxido redução. A atividade específica da nitrogenase foi definida como o número de  $\eta$ moles de  $C_2H_4$  produzidos por hora por mg de proteína.

#### 2.4.3. AJUSTE DA PRESSÃO PARCIAL DE OXIGÊNIO ( $pO_2$ ) NA FASE GASOSA

O ajuste dos diferentes  $pO_2$  na fase gasosa foi feito substituindo a fase gasosa por  $N_2$  e injetando volumes calculados de oxigênio.

As pressões parciais de oxigênio foram determinadas por cromatografia gasosa empregando um cromatógrafo Varian 1420 e coluna de molecular sieve 5A e detector de condutividade térmica.

#### 2.4.4. TAXA DE CONSUMO RELATIVO DE NITRATO

A taxa de consumo relativo de nitrato ( $tcr NO_3^-$ ) corresponde ao nitrato consumido entre duas amostragens sucessivas dividido pela diferença entre os logarítmos das densidades óticas das amostras.

$$tcr = \frac{\Delta NO_3^- (\mu mol)}{\log D.O._2 - \log D.O._1}$$

#### 2.5. REAGENTES

Cloranfenicol, flavina mononucleotídeo, albumina de soro bovino, foram obtidos da Sigma Chemical Co. Todos os outros reagentes eram quimicamente puros. Os gases foram fornecidos pela S.A. White Martins.

## RESULTADOS

### I. EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO E EXCREÇÃO DE NITRITO POR *A. brasilense*

O *A. brasilense*, estirpe Sp7, foi crescido a 37°C sob agitação constante e simultaneamente, na presença de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Fig.1),  $\text{KNO}_3$  (Fig. 2) e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  mais  $\text{KNO}_3$  (Fig. 3). Os tempos de duplicação (td) e as taxas de consumo relativo de nitrato (tcr  $\text{NO}_3^-$ ) são apresentados no Quadro I. Os tempos médios de duplicação, calculados na fase logarítmica de crescimento em função de proteína, em  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_3^-$  mais  $\text{NH}_4^+$  foram 1,75; 2,20 e 1,45 horas, respectivamente. Em função da D.O.<sub>560nm</sub> os td foram 1,50; 2,06 e 1,58 horas, respectivamente. O crescimento em  $\text{NO}_3^-$  apresentou uma fase de lag inicial maior que com  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  mais  $\text{NH}_4^+$  (Figs. 1,2,3 e Quadro I). A D.O. máxima atingida foi maior com  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  mais  $\text{NH}_4^+$  (D.O.<sub>560nm</sub> 1,85 a 1,90; respectivamente) que com  $\text{NO}_3^-$  sozinho (D.O.<sub>560nm</sub> 1,35). As concentrações máximas de proteína total (mg/ml) das culturas em  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_3^-$  mais  $\text{NH}_4^+$  foram 0,75; 0,53 e 0,67; respectivamente.

A taxa de consumo de  $\text{NO}_3^-$  (tcr  $\text{NO}_3^-$ ) foi diferente nas culturas crescidas em  $\text{NO}_3^-$  sozinho e  $\text{NO}_3^-$  mais  $\text{NH}_4^+$  (Figs. 2 e 3 Quadro I). No crescimento com  $\text{NO}_3^-$  sozinho o consumo de  $\text{NO}_3^-$  apresentou duas fases: uma fase inicial de consumo mais lento (tcr  $\text{NO}_3^-$  médio de 7,8) seguida de uma fase de consumo mais intenso (tcr  $\text{NO}_3^-$  médio 32,2). No crescimento com  $\text{NO}_3^-$  mais  $\text{NH}_4^+$  não houve consumo de  $\text{NO}_3^-$  (tcr  $\text{NO}_3^-$  zero) até D.O.<sub>560nm</sub> de aproximadamente 1,10; seguido de uma fase de consumo intenso de  $\text{NO}_3^-$  (tcr  $\text{NO}_3^-$  de 53 a 68) correspondente à segunda fase do crescimento  $\text{NO}_3^-$  sozinho. Em ambas as culturas a fase de consumo intenso de  $\text{NO}_3^-$  começou quando a D.O.<sub>560nm</sub> da cultura atingiu 0,85 para  $\text{NO}_3^-$  e 1,10 para  $\text{NO}_3^-$  mais  $\text{NH}_4^+$ .

Foi observada a presença de nitrito no sobrenadante das culturas em  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_3^-$  mais  $\text{NH}_4^+$  (Figs. 2 e 3). A excreção de nitrito começou quando as culturas atingiram D.O.<sub>560nm</sub> 0,85 e 1,1 para

$\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_3^-$  mais  $\text{NH}_4^+$ , respectivamente. A excreção de nitrito continuou até o final da fase logarítmica em ambas as culturas,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_3^-$  mais  $\text{NH}_4^+$ , sendo consumido durante a fase estacionária. Os níveis máximos de nitrito excretado foram 2,2 e 10,8 mM para  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_3^-$  mais  $\text{NH}_4^+$ , respectivamente. Não houve formação de nitrito na cultura com  $\text{NH}_4^+$ . O nitrito máximo excretado (10,8 mM) no tratamento  $\text{NO}_3^-$  mais  $\text{NH}_4^+$  foi praticamente estequiométrico com o nitrato consumido (9,5 mM) no mesmo período (Fig. 3).

## II. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE $\text{KNO}_3$ NO CRESCIMENTO E EXCREÇÃO DE NITRITO E AMÔNIA POR *A. brasilense*

O *A. brasilense*, estirpe Sp7, foi crescido sob agitação constante na presença de  $\text{KNO}_3$  em diversas concentrações (Figs. 4, 5, 6 e 7). Os tempos de duplicação na fase logarítmica (entre 4 e 8 horas) para o crescimento em 2,5; 4,7; 11,1 e 19,7 mM de  $\text{KNO}_3$  foram semelhantes quando calculados pela variação de  $\text{D.O.}_{560\text{nm}}$ : 2,29; 2,29; 2,07 e 2,21; ou ligeiramente diferentes quando calculados pela variação de proteína: 3,02; 2,2; 1,94 e 1,99; respectivamente; exceto o tratamento com 2,5 mM de  $\text{NO}_3^-$ .

A fase inicial de crescimento foi uniforme para as diversas concentrações de  $\text{KNO}_3$  utilizadas. A D.O. máxima foi maior em 11,1 mM  $\text{KNO}_3$  ( $\text{D.O.}_{560\text{nm}}$  1,8), com as concentrações máximas de proteína total das culturas em 2,5; 4,7; 11,1 e 19,7 mM de  $\text{KNO}_3$  atingindo 0,354; 0,644; 0,869 e 0,821 (mg/ml de cultura) respectivamente.

Em todas as concentrações o consumo de  $\text{NO}_3^-$  nas duas primeiras horas foi praticamente nulo e o crescimento observado foi devido à pequena quantidade de amônia residual transferida com o inóculo.

Com 2,5 mM de  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 4) uma fase de consumo acentuado entre 2 e 8 horas foi observada. Não houve excreção de amônia e de nitrito.

Com 4,7 mM de  $\text{NO}_3^-$  o consumo foi acentuado a partir de 0,235 de  $\text{D.O.}_{560\text{nm}}$  (Fig. 5) até a cultura atingir 1,2 de  $\text{D.O.}_{560\text{nm}}$ .



Não foi detectado nitrito no sobrenadante da cultura e amônia foi excretada na concentração de 0,4 mM, quando o crescimento bacteriano atingiu 1,0 de D.O.<sub>560nm</sub>, sendo posteriormente consumida.

Com 11,1 mM de  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 6) a curva de consumo de  $\text{NO}_3^-$  apresentou tres fases: uma primeira fase de consumo lento entre 2 e 6 horas; uma segunda fase de consumo intenso entre 6 e 10 horas e uma terceira fase de consumo lento nas últimas 5 horas de cultura. Excreção de amônia e nitrito para o sobrenadante iniciaram-se simultaneamente quando a D.O.<sub>560nm</sub> alcançou 0,49 e seguiram paralelas até D.O.<sub>560nm</sub> 1,25; a partir daí a excreção de nitrito variou antes de cessar, enquanto que a de amônia continuou aumentando até alcançar o máximo de 2,0 mM (D.O.<sub>560nm</sub> 1,35), sendo a amônia então gradativamente consumida.

Com 19,7 mM de  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 7) a curva de consumo de nitrato foi similar a do crescimento em 11,1 mM (Fig. 6) até às 9 horas de cultura. Daí em diante a curva de consumo de  $\text{NO}_3^-$  diferenciou-se da anterior (Fig. 6), notando-se estabilização no consumo nas 4 horas seguintes de crescimento, entre as D.O.<sub>560nm</sub> 1,25 e 1,45; seguindo-se um período de consumo intenso correspondente às duas horas finais de crescimento (D.O.<sub>560nm</sub> 1,5 - 1,7). Excreção de nitrito e amônia iniciaram-se simultaneamente (D.O.<sub>560nm</sub> 0,49) e seguiram paralelas até o crescimento atingir D.O.<sub>560nm</sub> 1,3; daí em diante a excreção de nitrito continuou aumentando até alcançar o máximo de excreção 7,23 mM no final do crescimento (D.O.<sub>560nm</sub> 1,7). A excreção de amônia alcançou o máximo 2,19 mM (D.O.<sub>560nm</sub> 1,3) e posteriormente foi consumida de maneira uniforme até o final do crescimento (Figs. 6 e 7). Os níveis máximos de nitrito e amônia excretados em função da concentração de  $\text{NO}_3^-$  estão apresentados nas Fig. 8. Excreção de amônia foi observada em concentrações de  $\text{NO}_3^-$  inferiores àquela necessária para que ocorresse excreção de nitrito (Fig. 8). Por outro lado enquanto a excreção de amônia foi praticamente a mesma entre 11,1 e 19,7 mM de  $\text{NO}_3^-$ , a excreção de nitrito continuou aumentando.

O balanço do consumo de  $\text{NO}_3^-$  e os vários parâmetros de crescimento destas culturas são apresentados nas Quadros II e III. O  $\text{NO}_3^-$  assimilado foi calculado pela diferença entre  $\text{NO}_3^-$  consumido e amônia mais nitrito excretado ou pela proteína, assumindo 15%

de nitrogênio. O parâmetro  $\text{NO}_3^-$  assimilado, calculado por diferença foi de fato assimilado, uma vez que é semelhante ao calculado em função da concentração proteica. Desta maneira todo o  $\text{NO}_3^-$  consumido pode ser computado, significando que até a fase final de crescimento nenhum  $\text{NO}_3^-$  foi dissimilado a óxidos gasosos.

### III. EFEITO DO $p\text{O}_2$ NA EXCREÇÃO DE NITRITO DURANTE A INDUÇÃO DA NITRATO REDUTASE POR *A. brasiliense*

Células de *A. brasiliense*, estirpe Sp7, previamente crescidas em  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , lavadas em meio de cultura sem fonte de nitrogênio fixado, foram suspensas no mesmo meio, borbulhadas com  $\text{N}_2$  para remover o oxigênio e injetadas (20 ml) em frascos tipo penicilina (230 ml) contendo diferentes  $p\text{O}_2$ . O experimento foi realizado em duas séries paralelas; uma na presença de  $\text{NO}_3^-$  e outra na presença de  $\text{NO}_3^-$  mais  $\text{NH}_4^+$ . O experimento foi iniciado pela adição de  $\text{KNO}_3$  (concentração final de 20 mM) seguido da incubação a  $37^\circ\text{C}$  e 160 rpm por 3 horas. Em intervalos de 1; 2 e 3 horas foram colhidas amostras de 5,0 ml; centrifugadas e o nitrito determinado no sobrenadante. Na presença de  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 9) não houve crescimento bacteriano em nenhum dos  $p\text{O}_2$ , como demonstrado pelo mesmo conteúdo protéico das amostras. A excreção de nitrito foi praticamente linear a partir da primeira hora, com um  $p\text{O}_2$  ótimo entre 1 e 2% de  $\text{O}_2$ . Na segunda e terceira horas de experimento o  $p\text{O}_2$  ótimo de excreção de nitrito sofreu uma redução, ficando em torno de 1,1% de  $\text{O}_2$ . Em  $p\text{O}_2$  acima de 1,1 até 5% a atividade da nitrato reductase cai acentuadamente e torna-se nula em  $p\text{O}_2$  acima de 5% na primeira hora. Uma pequena excreção de nitrito foi observada neste  $p\text{O}_2$  na segunda e terceira hora.

Na presença de  $\text{NO}_3^-$  mais  $\text{NH}_4^+$  o  $p\text{O}_2$  ótimo de excreção de nitrito também ficou entre 1 e 2% de  $\text{O}_2$ . Houve crescimento bacteriano em  $p\text{O}_2$  superiores a 4% como sugerido pela variação do conteúdo protéico de 0,36 a 0,42 mg/ml de suspensão de células. A  $\text{NH}_4^+$  adicionada não inibiu a excreção de nitrito, porém causou alargamento da faixa ótima de  $p\text{O}_2$  (Fig. 10).

A adição de cloranfenicol (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a um experimento como

descrito na Fig. 9, bloqueou completamente a excreção de nitrito nas 3 horas de experimento. Convém ressaltar que cloranfenicol na mesma concentração não interfere com a atividade da nitrato redutase. Extrapolando os valores de nitrito excretado para zero, um tempo de médio de 35 a 45 minutos foi encontrado para o início da excreção linear de nitrito, nos diferentes  $pO_2$ .

As atividades específicas da nitrato redutase foram calculadas a partir do nitrito excretado entre a primeira e segunda hora (Fig. 11) e representam a soma da concentração da enzima e sua atividade nos  $pO_2$  iniciais de "indução". Na presença de  $NO_3^-$  mais  $NH_4^+$  esta atividade foi aproximadamente 11% menor do que na presença de  $NO_3^-$  sozinho, nos respectivos  $pO_2$  ótimos. Na presença de  $NO_3^-$  mais  $NH_4^+$ , entretanto, o pico de atividade sofreu um alargamento considerável, ficando entre 1,1 e 4,1% de  $O_2$ . Em ambos os casos a partir de 2% de  $O_2$  ocorreu alargamento dos picos, levando ao aparecimento de "ombros". Com  $NO_3^-$  mais  $NH_4^+$  estes fatos ocorreram em  $pO_2$  superiores a 9%. Deve-se ter em mente que os  $pO_2$  nas fases gasosas não correspondem ao oxigênio dissolvido devido ao consumo deste pela respiração. Portanto, os valores de  $pO_2$  apresentados são os iniciais e os  $pO_2$  onde a nitrato redutase é expressa são reprodutíveis, se mantidas as mesmas condições experimentais.

#### IV. EFEITO DO $pO_2$ E DA FONTE DE NITROGÊNIO DURANTE O PERÍODO DE INDUÇÃO NA EXPRESSÃO DA ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE

##### A - EXPRESSÃO DA ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE EM FUNÇÃO DO $pO_2$ NA AUSÊNCIA DE NITROGÊNIO FIXADO

Visando determinar se a presença de  $NO_3^-$  era requerida como indutor da nitrato redutase e tentando eliminar o possível efeito inibidor do oxigênio na sua atividade, vários experimentos foram realizados.

Células de *A. brasilense*, estirpe Sp7, isentas de atividade de nitrato redutase foram submetidas a diferentes  $pO_2$  por 3 horas e ensaiadas para as atividades de nitrato redutase, anaerobicamente, e de nitrogenase, em função de  $pO_2$ . Na ausência de  $NO_3^-$

(Fig. 12) um segundo pico de atividade de nitrato redutase apareceu em torno de 4% de  $O_2$ , além do já observado anteriormente em 1 a 2% de  $O_2$ . A atividade específica máxima em 1 a 2% de  $O_2$  foi 52% menor que a atividade em 4% de  $O_2$ . A presença destes dois picos de atividade foi confirmada em um outro experimento nas mesmas condições.

A atividade da nitrogenase apresentou um ótimo de  $pO_2$  ligeiramente superior ao segundo pico de atividade da nitrato redutase. Como nos experimentos com  $NO_3^-$  sozinho o crescimento bacteriano foi praticamente nulo.

O ensaio anaeróbico das nitratos redutases foi linear por no mínimo 60 minutos e não apresentou fase de lag. Cloranfenicol (50  $\mu g/ml$ ) foi incluído no ensaio para evitar uma possível "indução" anaeróbica da nitrato redutase na presença de nitrato. Os ensaios com e sem cloranfenicol deram os mesmos resultados.

#### B - EXPRESSÃO DA ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE EM FUNÇÃO DO $pO_2$ NA PRESENÇA DE NITRATO

Este experimento foi conduzido como o anterior (Fig.12), exceto que na presença de  $NO_3^-$ . As atividades de nitrato redutase e nitrogenase em função de  $pO_2$  de indução após centrifugação e lavagem anaeróbica das células, estão apresentadas na Fig. 13. A atividade específica da nitrato redutase calculada em função do nitrato total ou nitrito presente no sobrenadante foi praticamente a mesma, em todos os  $pO_2$  de indução (Fig. 13), demonstrando que todo nitrito formado anaerobicamente foi excretado. A atividade da nitrato redutase apresenta um ótimo em 1 - 2% de  $O_2$  e um "ombro" que se estende até 10% de  $O_2$ , sugerindo a presença de uma outra enzima como anteriormente (Fig. 12). A presença de  $NO_3^-$  aumentou o nível de atividade das nitrato redutases em cerca de 10 e 5 vezes, aproximadamente, nas faixas de 1 - 2% e 4% de  $O_2$ , respectivamente.

A atividade da nitrogenase determinada em função do  $O_2$  localizou-se na mesma faixa de  $pO_2$  do "ombro" de atividade da nitrato redutase (4 - 10%; Fig. 13), porém foi cerca de 10 vezes in

ferior ao observado na ausência de  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 12). Esta atividade só foi detectada após a eliminação do nitrito que se forma durante o período de "indução" da nitrato redutase (Fig. 14).

A adição de  $\text{NH}_4^+$  aos tratamentos contendo 2 e 10% de  $\text{O}_2$ , ambos contendo  $\text{NO}_3^-$ , não inibiu a expressão da nitrato redutase. Estas atividades foram 33,2 e 19,7  $\eta\text{moles de NO}_2^-/\text{min/mg}$  de proteína para 2 e 10% de  $\text{O}_2$ , respectivamente.

Durante a indução da nitrato redutase por  $\text{NO}_3^-$  ocorreram formação e excreção de nitrito e amônia em função de  $p\text{O}_2$  (Fig. 14). O padrão de excreção de nitrito foi semelhante à curva de atividade da nitrato redutase (Fig. 13) e àquela de excreção de nitrito reportada anteriormente (Fig. 9). A atividade específica máxima da nitrato redutase em 1% de  $\text{O}_2$  foi igual a 45,5  $\eta\text{moles de NO}_2^-/\text{min/mg}$  de proteína. Considerando-se que o tempo necessário para síntese máxima desta enzima é de aproximadamente 1 hora, este valor é próximo ao determinado pelo ensaio anaeróbico (Fig. 13). A excreção de amônia no mesmo período apresentou um ótimo em cerca de 5% de  $\text{O}_2$  e um padrão geral em forma de sino (Fig. 14) na mesma região de  $p\text{O}_2$  onde ocorre o "ombro" da nitrato redutase e a atividade da nitrogenase. Assumindo também, como de 1 hora o tempo para iniciar a excreção de amônia com velocidade constante, a atividade específica da enzima responsável foi calculada como sendo cerca de 5 vezes maior que a atividade da nitrogenase (115  $\eta\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{hr/mg}$  de proteína) em 5% de  $\text{O}_2$  (Figs. 13 e 15).

Na expectativa de detectar atividades adicionais de nitrato e nitrito redutases, foi realizado um experimento semelhante, na presença de  $\text{NO}_3^-$ , em que a tensão de  $\text{O}_2$  foi variada de zero a 100%. O mesmo padrão de excreção de nitrito e amônia dos experimentos anteriores foi observado com ótimo em 1 e 4% de  $\text{O}_2$ , respectivamente. Nenhuma excreção de nitrito ou amônia foi detectado em  $p\text{O}_2$  entre 10 e 100%. Não houve crescimento em qualquer dos  $p\text{O}_2$  e observamos morte bacteriana em  $p\text{O}_2$  acima de 20%.

#### C - EXPRESSÃO DA ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE EM FUNÇÃO DO $p\text{O}_2$ NA PRESENÇA DE $\text{NH}_4^+$

Dois picos de atividade de nitrato redutase são também

observados quando se estuda o efeito do  $pO_2$ , na expressão desta enzima na presença de amônia sozinha (Fig. 15). O primeiro pico de atividade ocorreu em torno de 2% de  $O_2$ , e o segundo apresentou-se expandido entre 5 e 20% de  $O_2$ . Amônia teve um efeito marcante na expressão desta atividade, mesmo na ausência de nitrato, e provocou o crescimento bacteriano em termos de proteína total de 0,40 a 0,66 mg/ml de suspensão entre zero e 20% de  $O_2$ , respectivamente. A presença deste dois picos de atividade foi confirmada num segundo experimento nas mesmas condições. O ponto mínimo entre os picos de atividade ocorreu de maneira reproduzível em torno de 3% de  $O_2$ . Nenhuma atividade de nitrogenase foi detectada na presença de amônia.

#### V - LOCALIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE EM *A. brasilense* (Sp7)

Visando determinar a presença de nitrato redutase na fração solúvel e ligado à membrana, estudamos a distribuição desta enzima nas diferentes frações celulares, obtidas por ultracentrifugação. Células de *A. brasilense* cultivadas em  $NO_3^-$  até a fase final de crescimento (D.O.<sub>560nm</sub> aproximadamente de 1,5; Fig. 2), constituíram o material de partida. Os dados da distribuição da atividade da nitrato redutase estão apresentados no Quadro IV. A atividade específica no extrato bruto foi de 34,9  $\eta$ moles de  $NO_2^-$ /min / mg de proteína, sendo da mesma ordem de grandeza das atividades determinadas em células intactas, após indução em 1% de  $O_2$  (Fig.13). A atividade de nitrato redutase estava presente na fração solúvel e no precipitado de 105.000 x g, sugerindo a presença de isoenzimas. A recuperação da atividade da nitrato redutase nas frações obtidas por ultracentrifugação foi de 50,7%, indicando a ocorrência de um processo de inativação, devido provavelmente, ao oxigênio. As frações extrato bruto, sobrenadante, e precipitado de 105.000 x g foram estocadas a 4°C por 24 horas sob atmosfera de  $N_2$ , após o que apresentaram as seguintes atividades específicas : 12,2; 1,4; e 10,1  $\eta$ moles de  $NO_2^-$ /min/mg de proteína, respectivamente. Enquanto as atividades do extrato bruto e do precipitado foram inativadas em 65 e 56%, respectivamente, a atividade do sobrenadante sofreu uma inativação de 90,6%, em relação às atividades iniciais. Não houve qualquer recuperação da atividade quando as frações sobrenadante e precipitado foram ensaiadas em mistura.

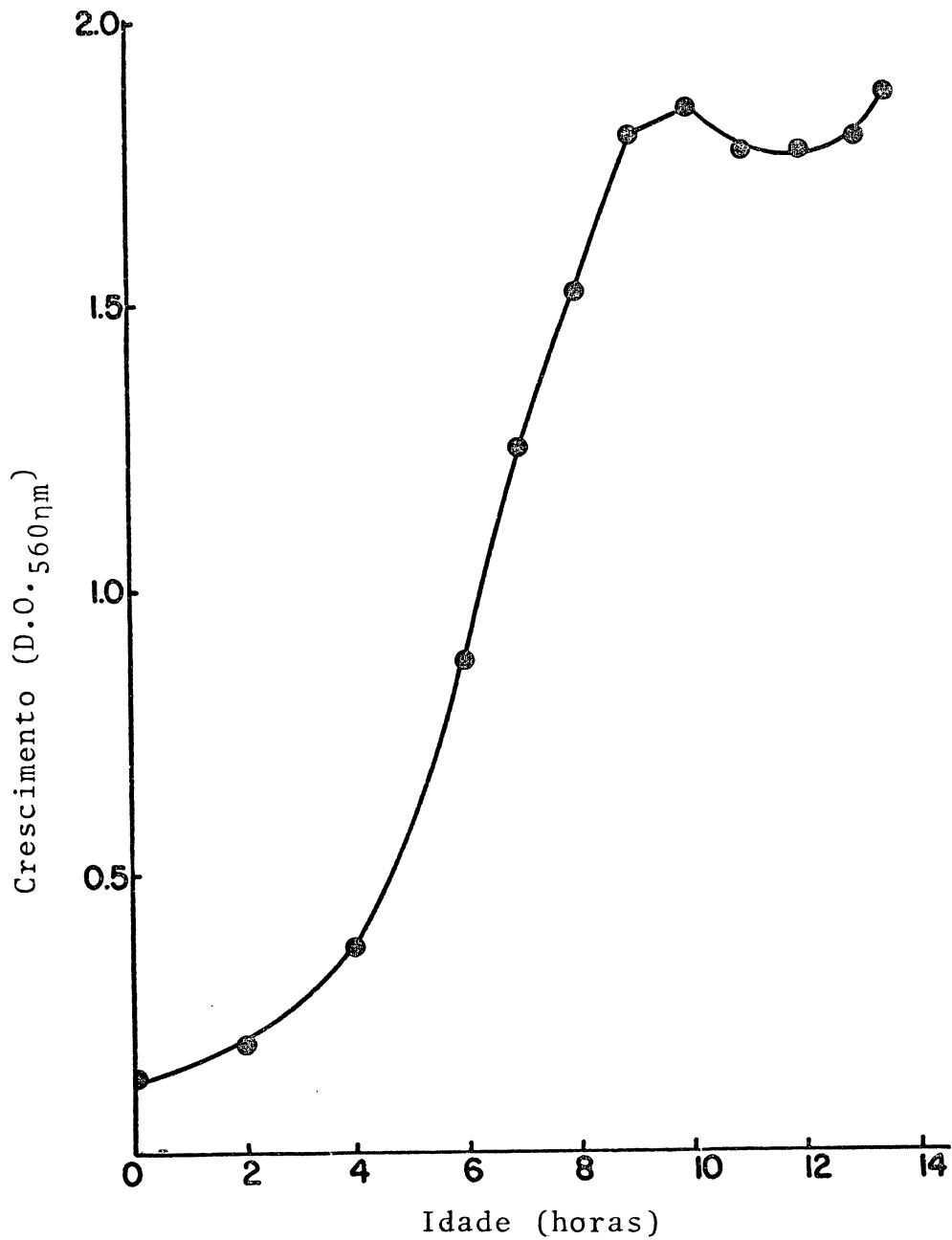


Figura 1 - CRESCIMENTO DE *A. brasilense* (Sp7) EM AMÔNIA.

*A. brasilense* (Sp7) foi crescido em meio Okon contendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mM), a  $37^\circ\text{C}$  sob agitação constante (160 rpm). Amostras colhidas nos tempos especificados foram utilizadas na determinação do crescimento ( $A_{560}$ ).

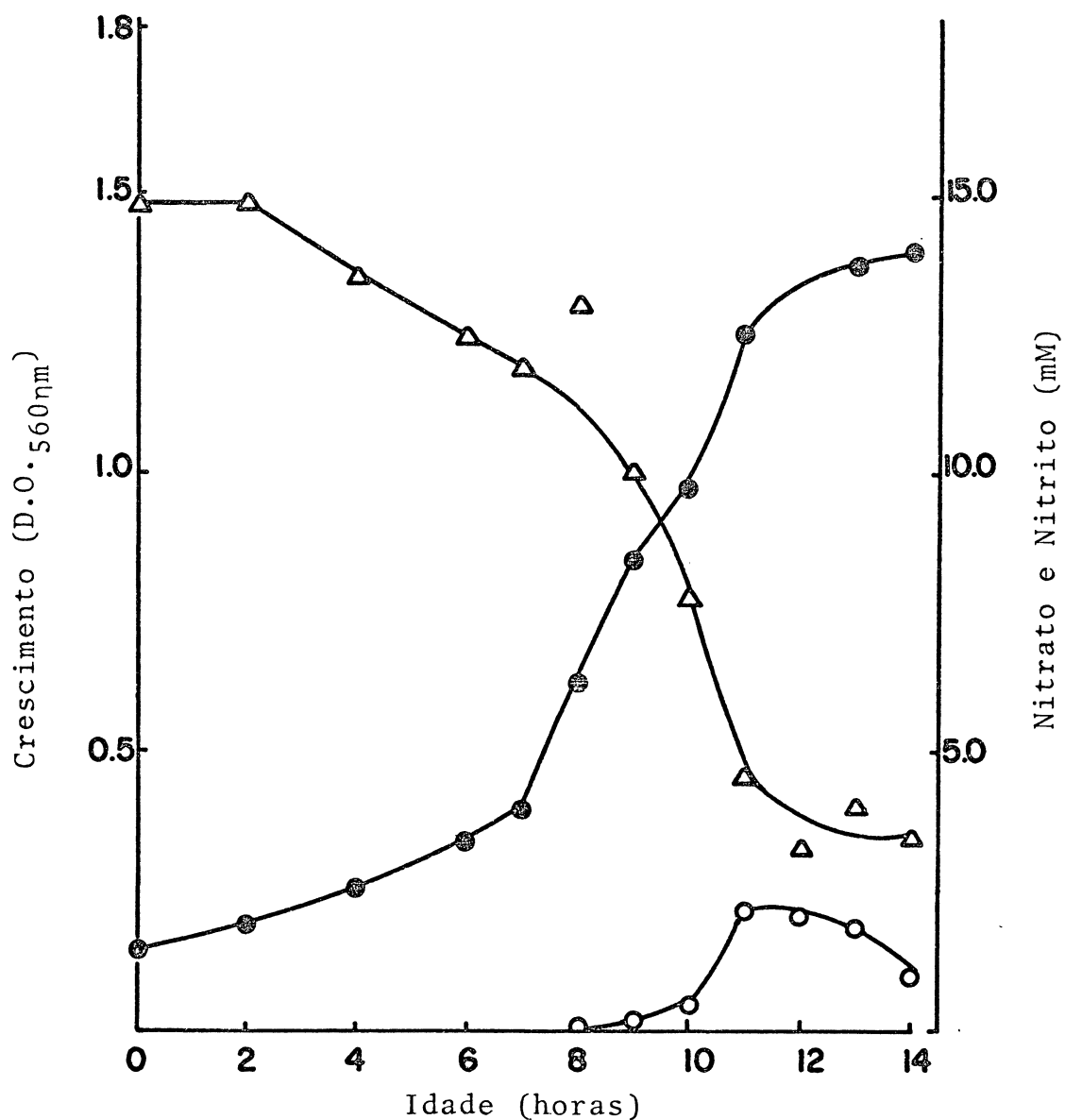


Figura 2 - CRESCIMENTO DE *A. brasilense* (Sp7) EM NITRATO.

*A. brasilense* (Sp7) foi crescido em meio Okon contendo  $\text{KNO}_3$  (15 mM), a  $37^\circ\text{C}$  sob agitação constante (160 rpm). Amostras colhidas nos tempos especificados foram utilizadas na determinação do crescimento ( $A_{560}$  ●), Nitrato ( $\Delta$ ) e Nitrito (o). Nitrato e nitrito foram determinados no sobrenadante.



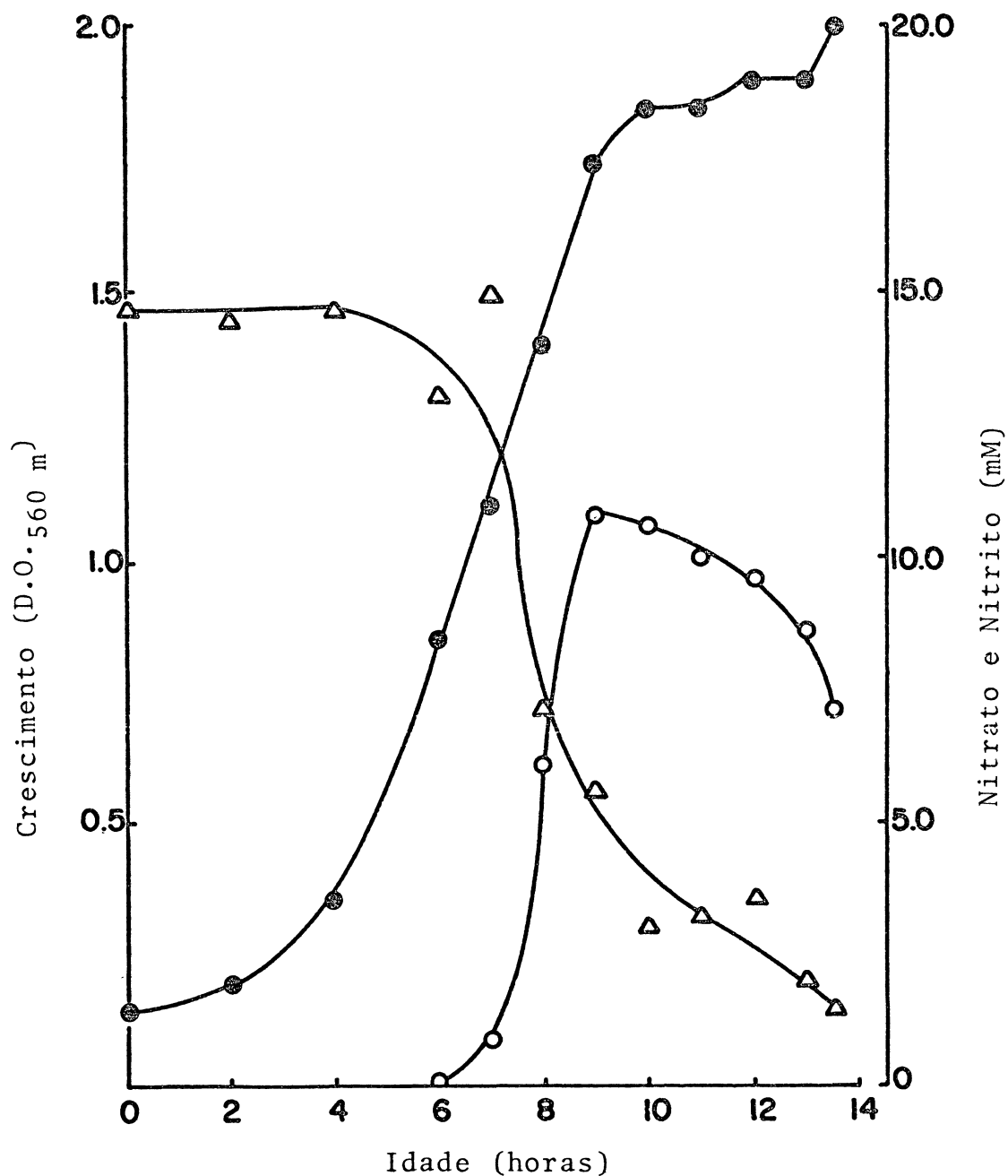


Figura 3 - CRESCIMENTO DE *A. brasilense* (Sp7) EM NITRATO MAIS AMÔNIA.

Experimento realizado como descrito na Fig. 2, exceto que na presença de  $\text{KNO}_3$  (15 mM) e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mM). Símbolos: (●) Crescimento ( $A_{560}$ ); (Δ) Nitrato; (○) Nitrito.

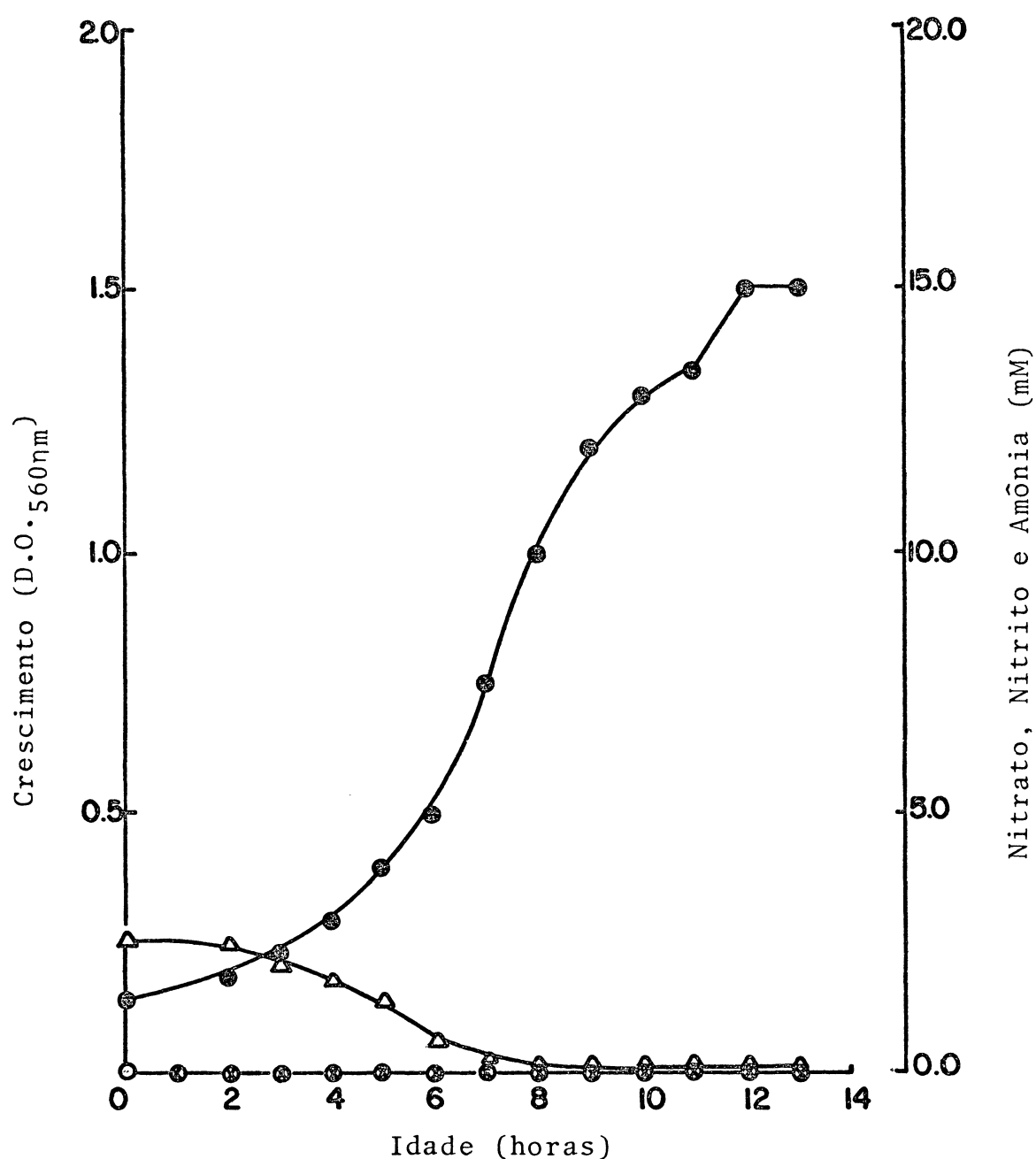


Figura 4 - CRESCIMENTO DE *A. brasilense* (Sp7) EM NITRATO.

*A. brasilense* (Sp7) foi crescido em meio Okon contendo  $\text{KNO}_3$  (2,5 mM), a  $37^\circ\text{C}$  sob agitação constante (160 rpm). Amostras colhidas nos tempos especificados foram utilizadas na determinação do Crescimento ( $A_{560}$  ●), Nitratado ( $\Delta$ ), Nitrito (○) e Amônia (x). Nitratado, nitrito e a mônia foram determinados no sobrenadante.

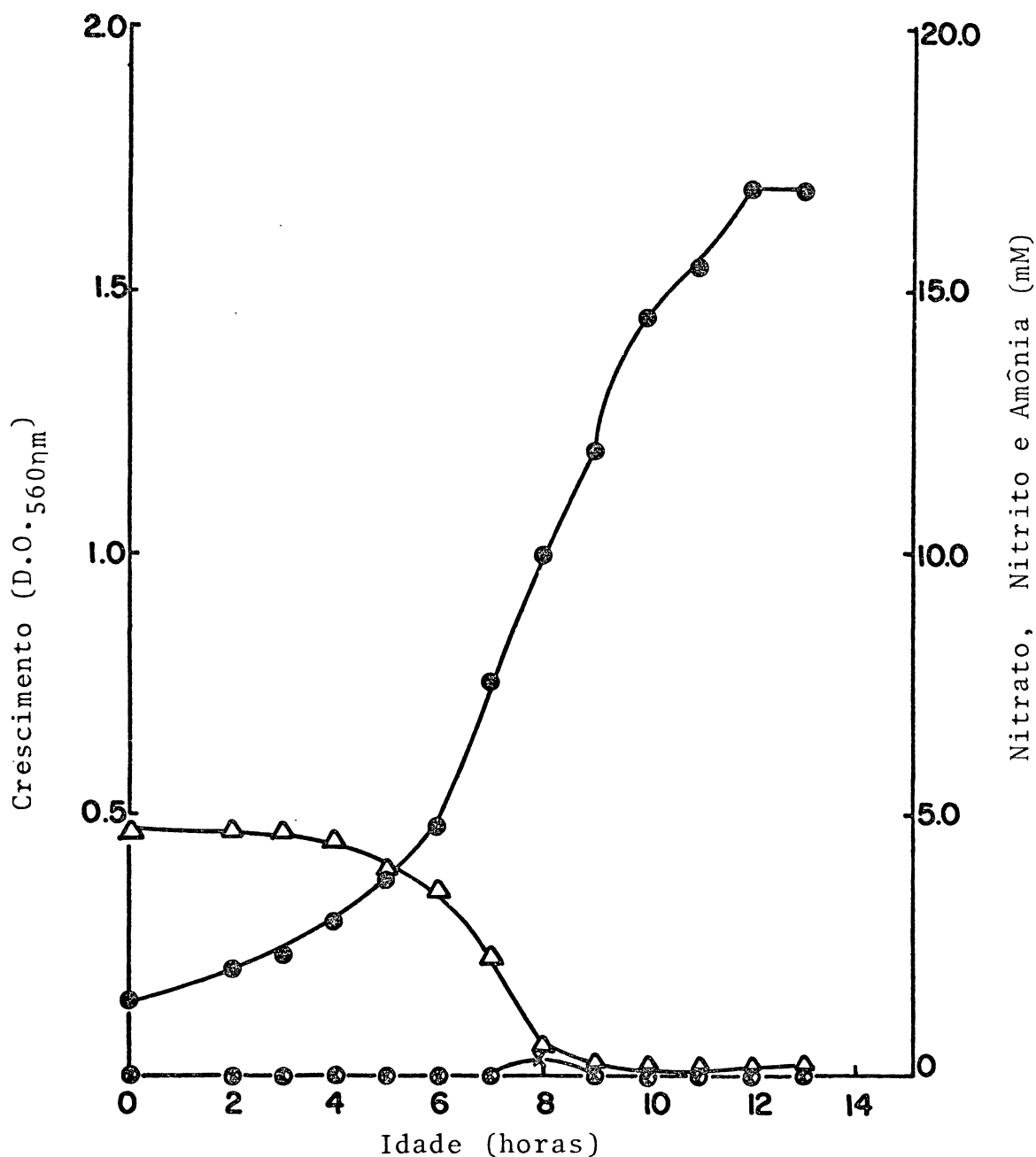


Figura 5 - CRESCIMENTO DE *A. brasilense* (Sp7) EM NITRATO.

Experimento realizado como descrito na Fig. 4, exceto que na presença de  $\text{KNO}_3$  (4,7 mM). Símbolos: (●) Crescimento, (Δ) Nitrato, (○) Nitrito e (x) Amônia.

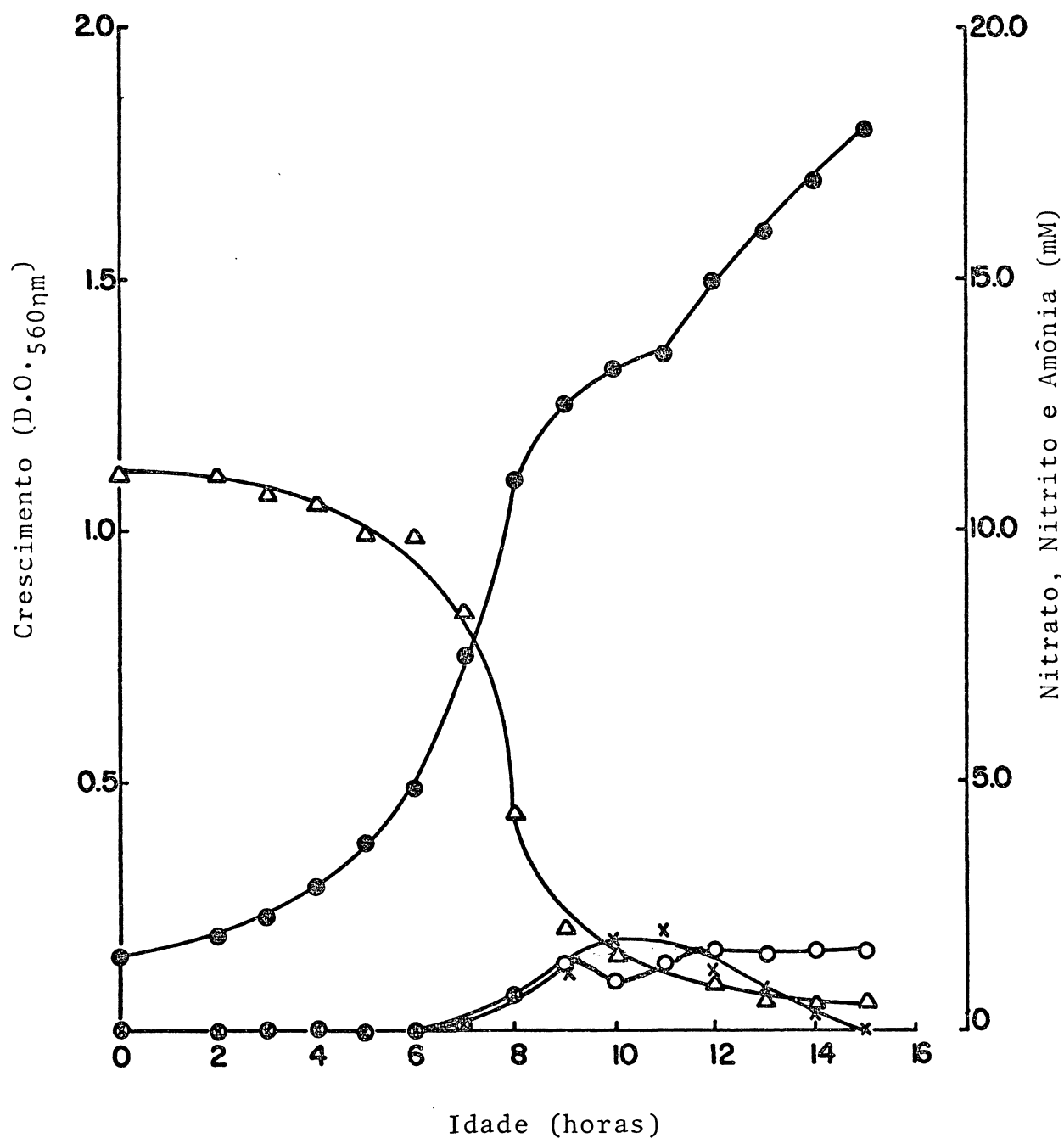


Figura 6 - CRESCIMENTO DE *A. brasilense* EM NITRATO.

Experimento realizado como descrito na Fig. 4, exceto que na presença de  $\text{KNO}_3$  (11,1 mM). Símbolos: (●) Crescimento, (○) Nitrito, (x) Amônia, (Δ) Nitrato.

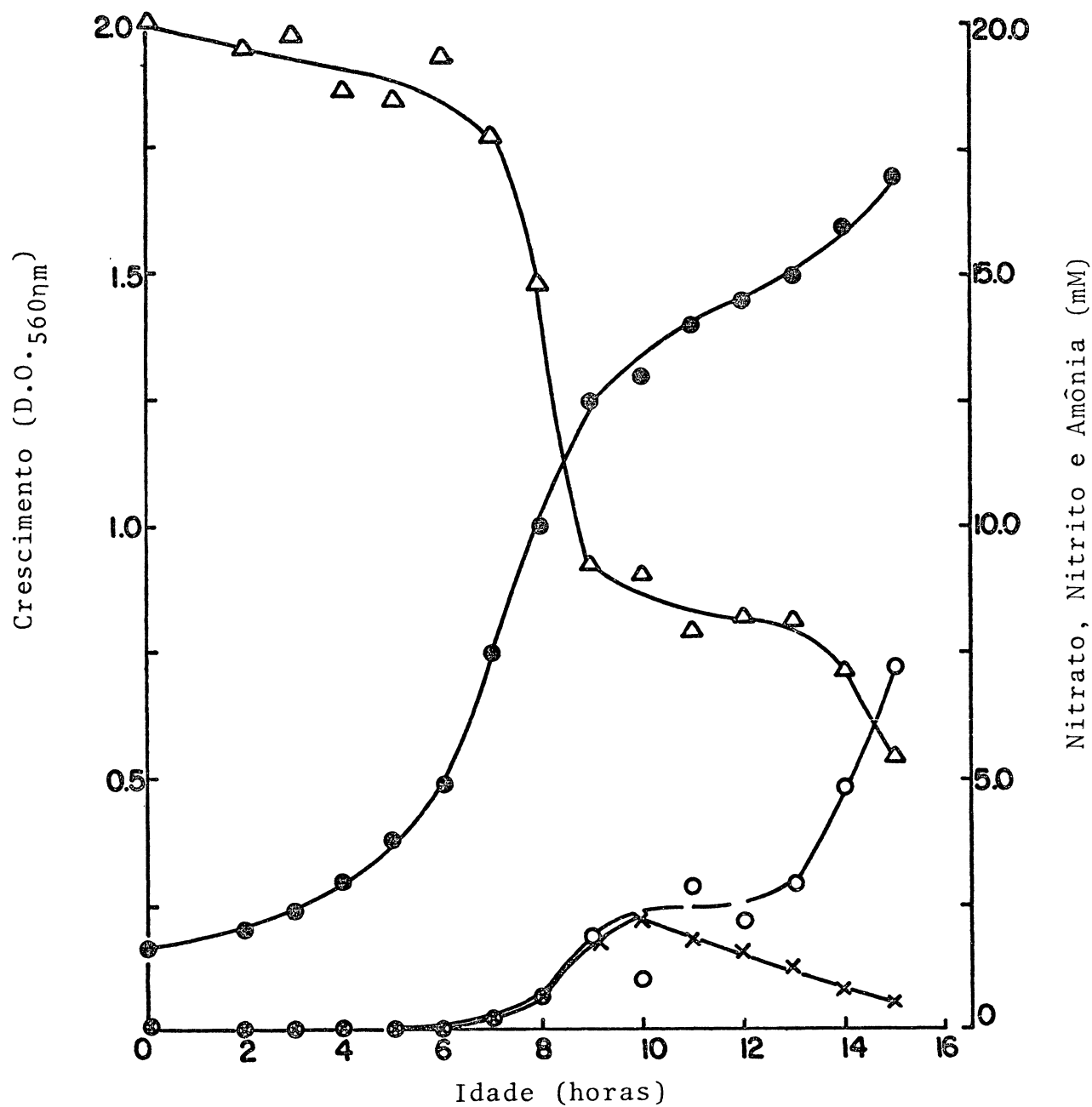


Figura 7 - CRESCIMENTO DE *A. brasilense* EM NITRATO.

Experimento realizado como descrito na Fig. 4, exceto que na presença de  $\text{KNO}_3$  (19,7 mM). Símbolos: (●) Crescimento, (Δ) Nitratado, (○) Nitrito, (x) Amônia.

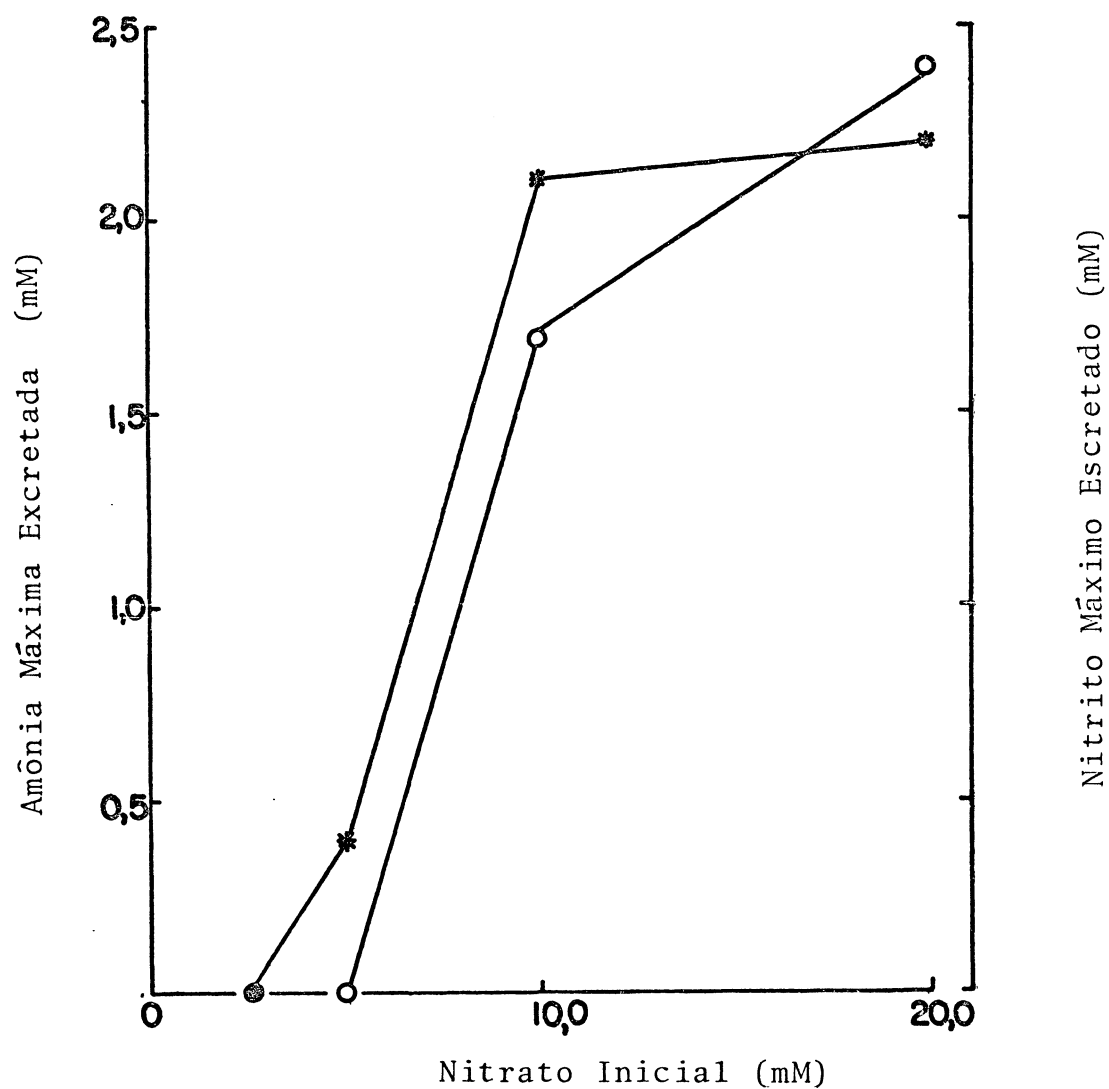


Figura 8 - EXCREÇÃO MÁXIMA DE AMÔNIA E NITRITO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE NITRATO.

Dados obtidos dos experimentos descritos nas Figs. 4, 5, 6 e 7. Símbolos: (●) Amônia, (○) Nitrito.

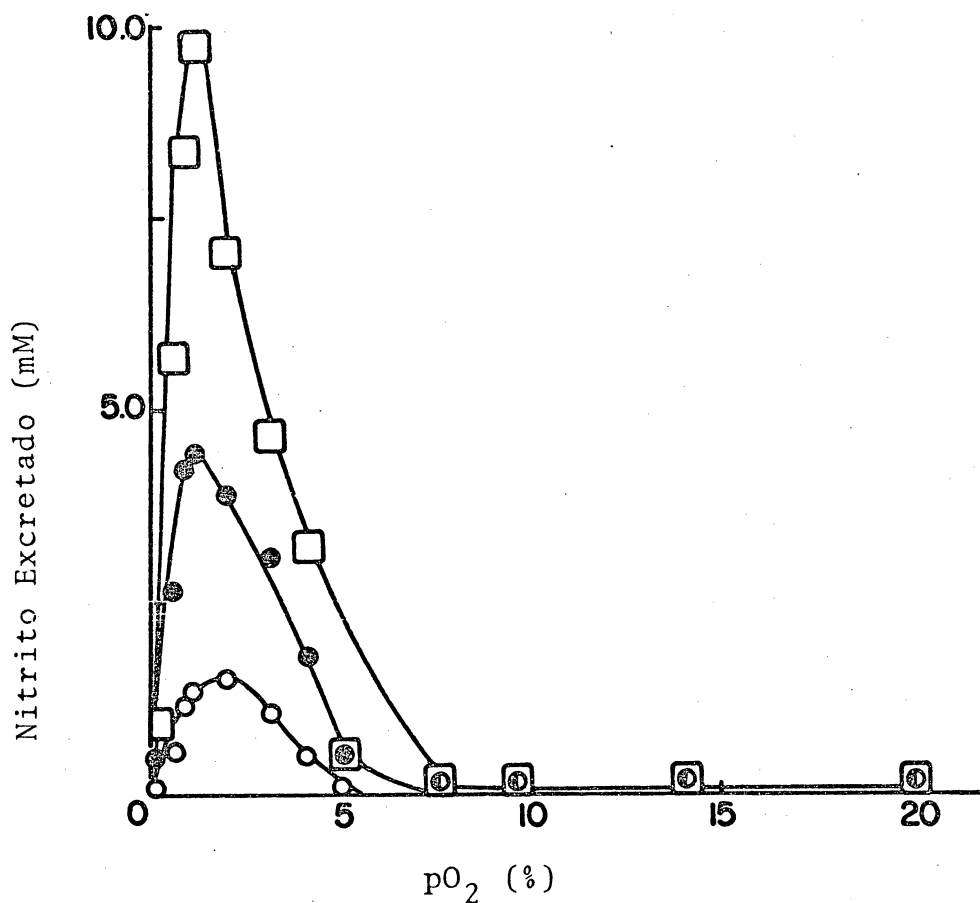


Figura 9 - EFEITO DA PRESSÃO PARCIAL DE OXIGÊNIO ( $pO_2$ ) NA EXPRESSÃO DA ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE EM *A. brasilense* NA PRESENÇA DE NITRATO.

Células de *A. brasilense* (Sp7) previamente crescidas em  $NH_4Cl$ , lavadas em meio de cultura sem fonte de nitrogênio fixado, foram suspensas no mesmo meio e injetadas (20 ml) em frascos tipo "penicilina" (230 ml) contendo diferentes  $pO_2$ . O experimento foi iniciado pela adição de  $KNO_3$  (20 mM) seguido de incubação a  $37^\circ C$  e 160 rpm. Amostras de 5 ml foram coletadas nos tempos indicados, centrifugadas e o nitrito excretado determinado no sobrenadante. Símbolos: (○) Nitrito excretado em 1 hora, (●) Nitrito excretado em 2 horas, (□) Nitrito excretado em 3 horas.

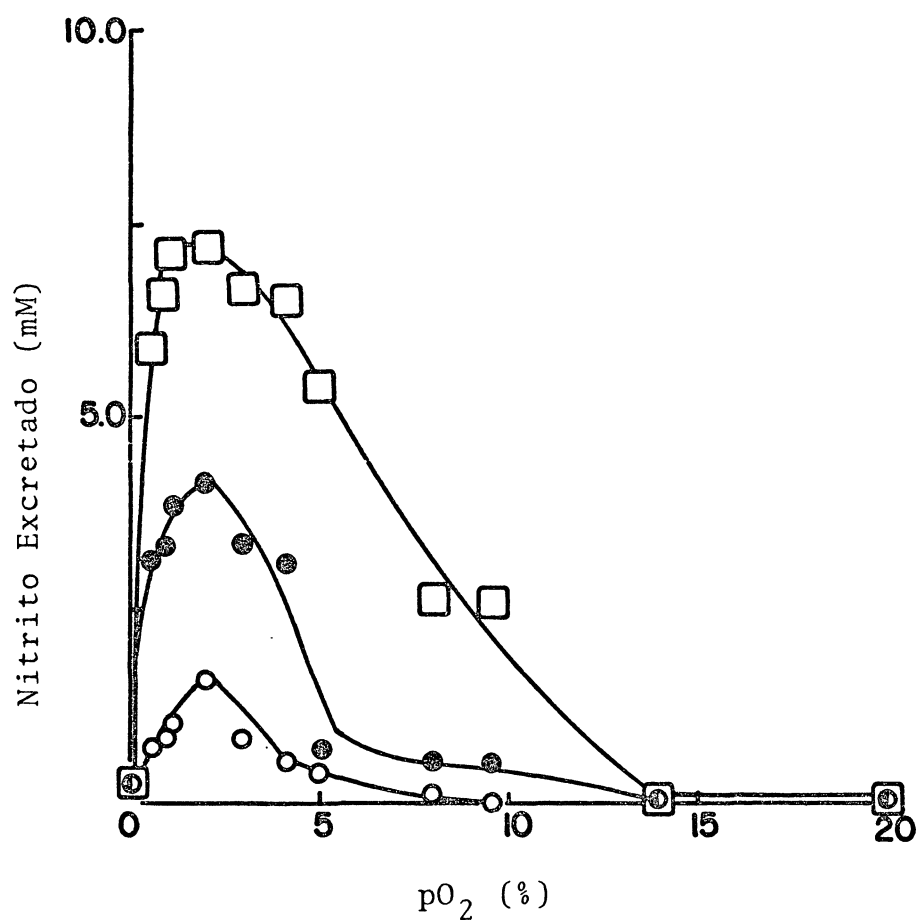


Figura 10 - EFEITO DA PRESSÃO PARCIAL DE OXIGÊNIO ( $pO_2$ ) NA EXPRESSÃO DA ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE EM *A. brasilense* NA PRESENÇA DE NITRATO MAIS AMÔNIA.

Experimento realizado como descrito na Fig. 9, exceto que na presença de  $KNO_3$  (20 mM) mais  $NH_4Cl$  (20mM). Símbolos: (○) Nitrito excretado em 1 hora, (●) Nitrito excretado em 2 horas, (□) Nitrito excretado em 3 horas.



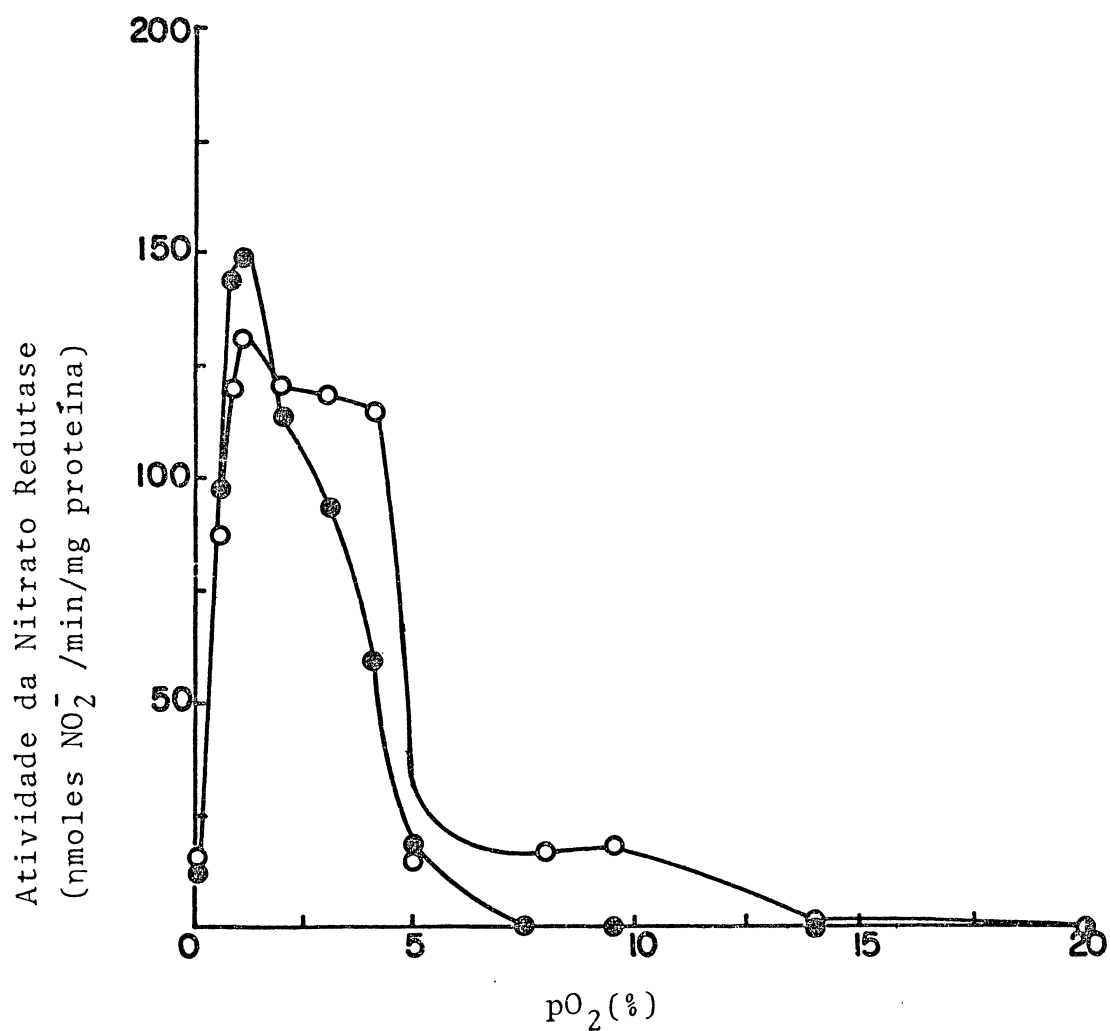


Figura 11 - EFEITO DA PRESSÃO PARCIAL DE OXIGÊNIO (pO<sub>2</sub>) NA EXPRESSÃO DAS NITRATO REDUTASES EM *A. brasilense*.

Dados obtidos a partir das Figs. 9 e 10. A atividade específica da Nitrito Redutase foi calculada a partir do nitrito excretado entre a 1a. e 2a. hora, nos tratamentos: (●) KNO<sub>3</sub> - 20 mM; (○) KNO<sub>3</sub> - 20 mM mais NH<sub>4</sub>Cl - 20 mM.

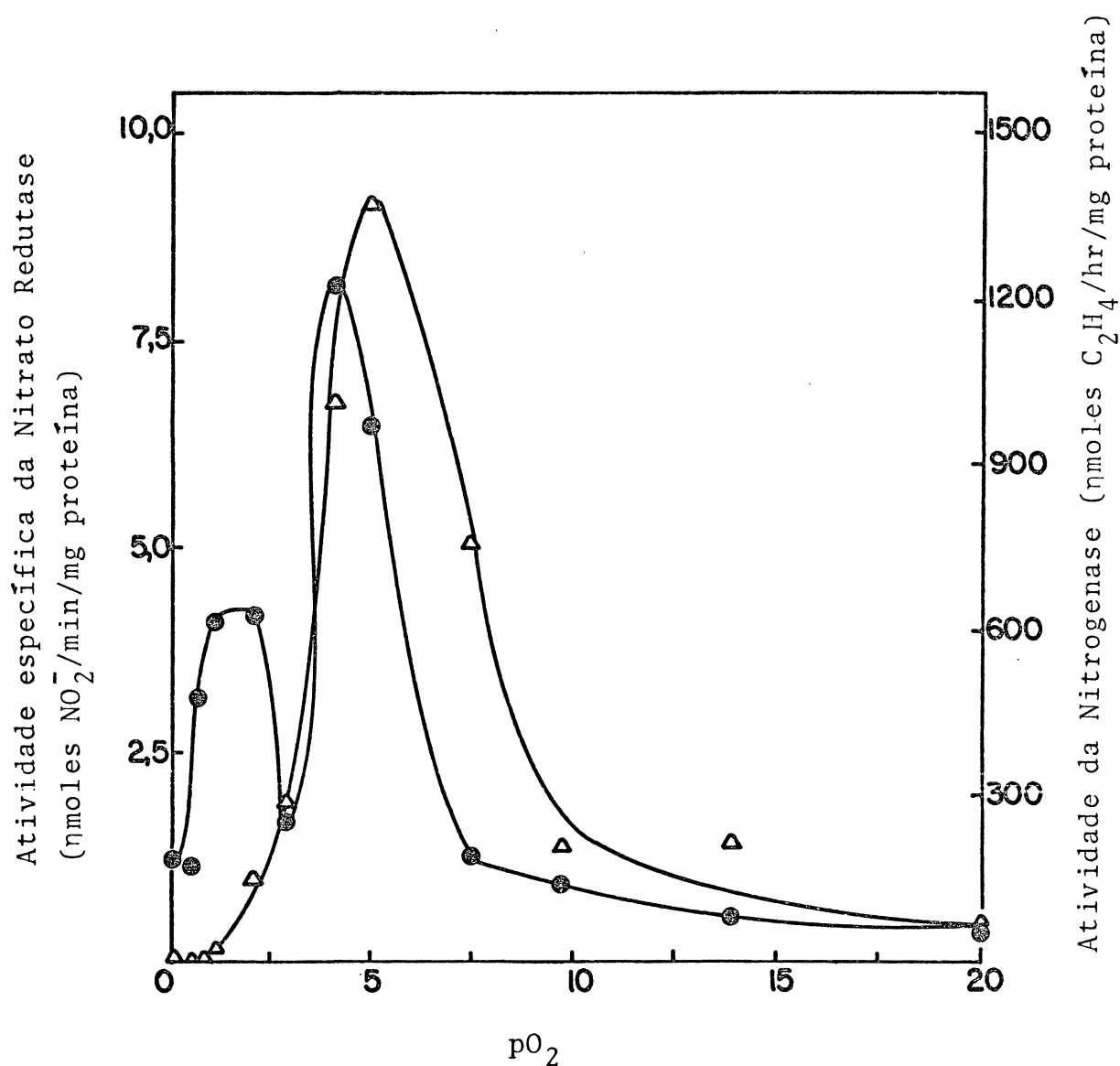


Figura 12 - EFEITO DA PRESSÃO PARCIAL DE OXIGÊNIO ( $pO_2$ ) NA EXPRESSÃO DAS NITRATO REDUTASES E DA NITROGENASE EM *A. brasilense* NA AUSÊNCIA DE NITROGÊNIO FIXADO.

Células de *A. brasilense* (Sp7) previamente crescidas em  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , lavadas em meio de cultura sem fonte de nitrogênio fixado, foram suspensas no mesmo meio (D.O.  $560\text{nm}$  1,2), injetadas (20 ml) em frascos tipo "penicilina" (230 ml) contendo diferentes  $pO_2$  e incubados por 3 horas a  $37^\circ\text{C}$  e 160 rpm. Após este período a fase gasosa foi trocada por  $\text{N}_2$  e ensaiadas as atividades de Nitrato redutase (anaerobicamente) e Nitrogenase (em função do  $pO_2$ ) como descrito em Materiais e Métodos. Símbolos: ( $\bullet$ ) Atividade da Nitrato Redutase e ( $\Delta$ ) Nitrogenase.

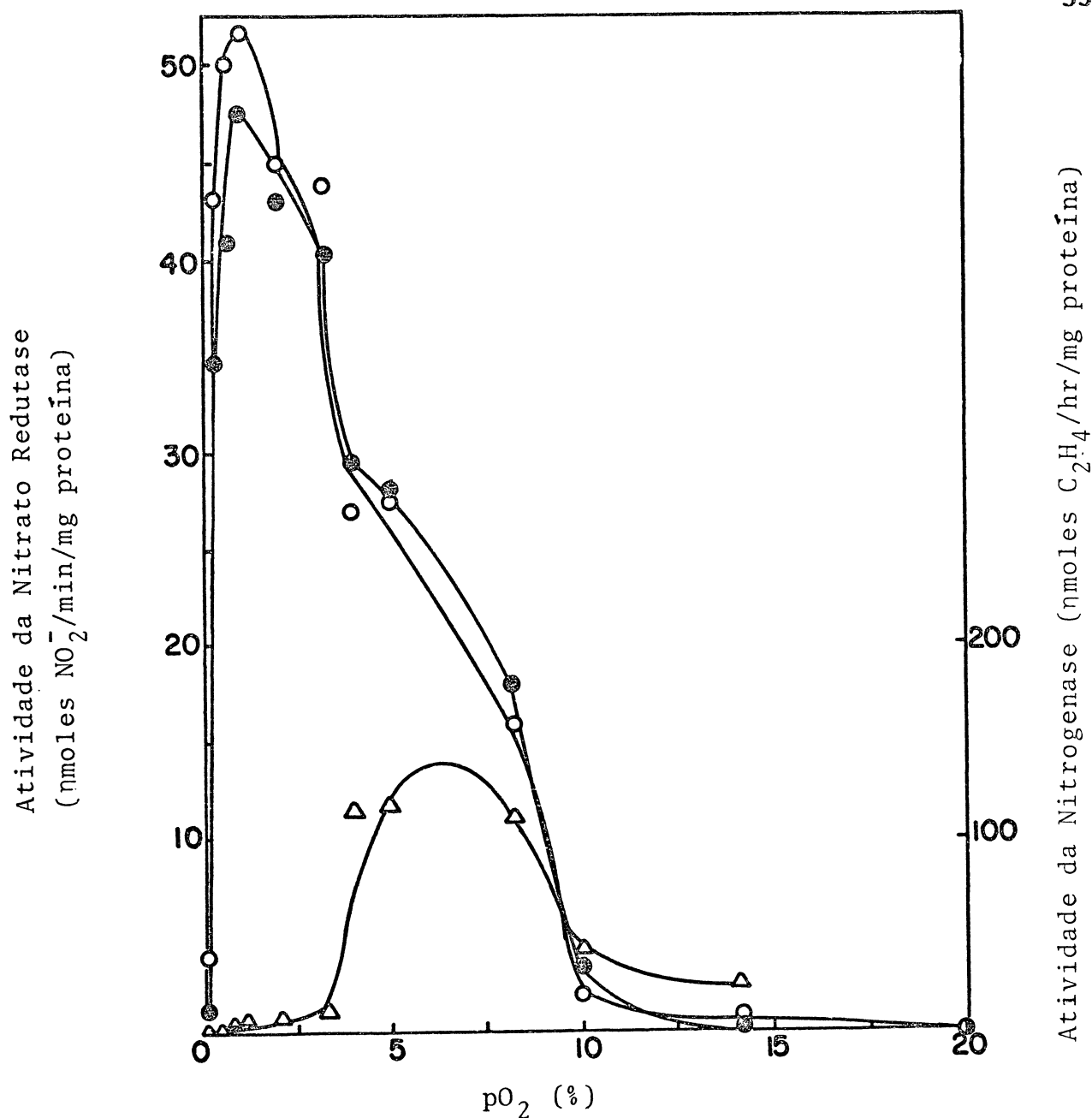


Figura 13 - EFEITO DA PRESSÃO PARCIAL DE OXIGÊNIO ( $pO_2$ ) NA EXPRESSÃO DA NITRATO REDUTASE E DA NITROGENASE EM *A. brasilense* NA PRESENÇA DE NITRATO.

Experimento realizado como descrito na Fig. 12, exceto que na presença de  $KNO_3$  (20 mM). A atividade da Nitrato redutase foi ensaiada em células lavadas (1x) em meio livre de nitrogênio fixado, anaerobicamente. O conteúdo protéico após o experimento variou de 0,24 - 0,29 mg de proteína/ml. Símbolos: Atividade da Nitrato Redutase - (●) determinada pelo nitrito total; (○) determinada pelo nitrito excretado, ambos após 60 min de incubação. Atividade da nitrogenase (Δ).

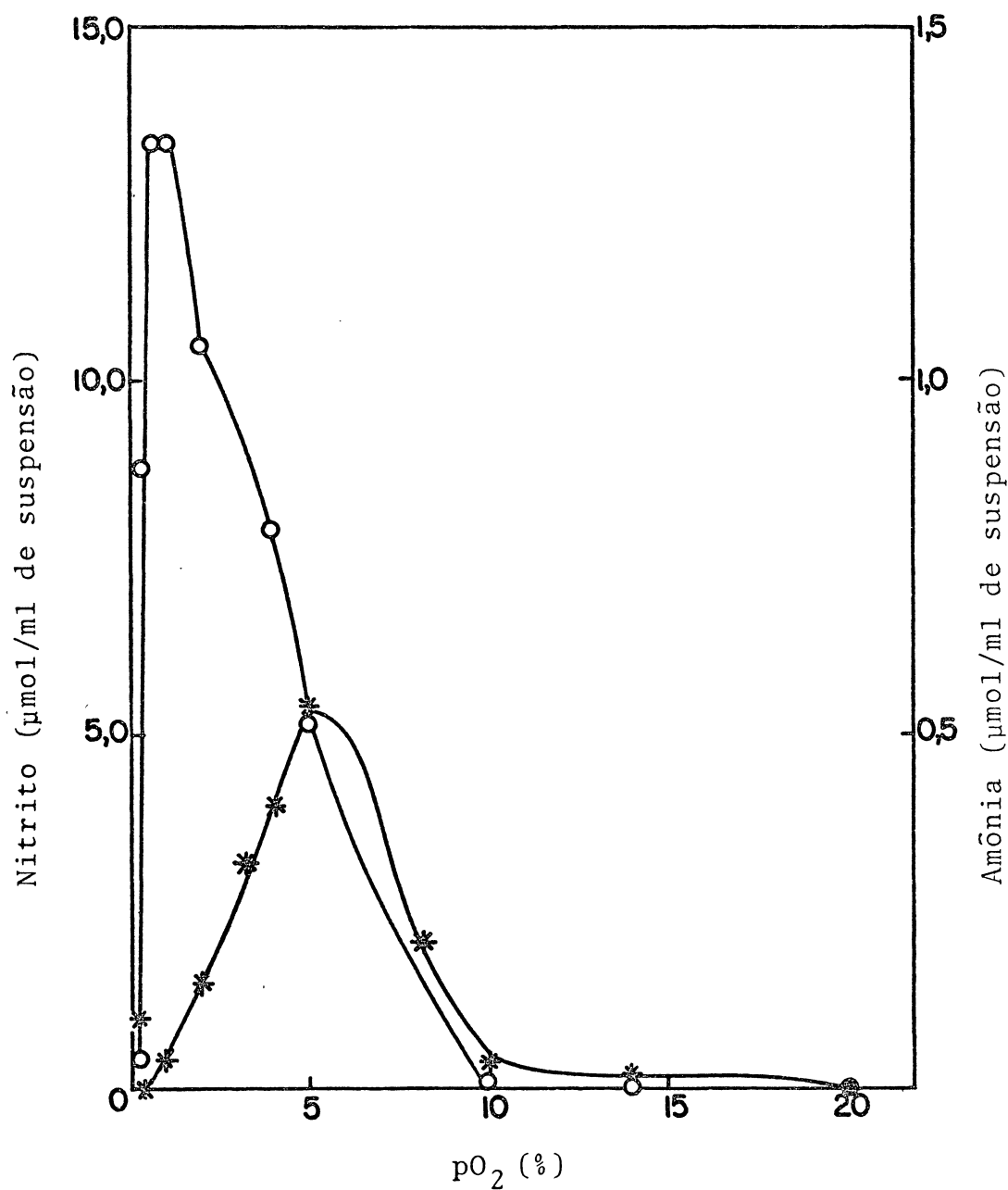


Figura 14 - FORMAÇÃO DE NITRITO E AMÔNIA DURANTE A EXPRESSÃO DA ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE.

Dados determinados nos sobrenadantes das suspensões celulares após 3 horas de "indução" na presença de  $KNO_3$  do experimento ilustrado na Fig. 13. Símbolos: (o) Nitrito e (\*) Amônia.

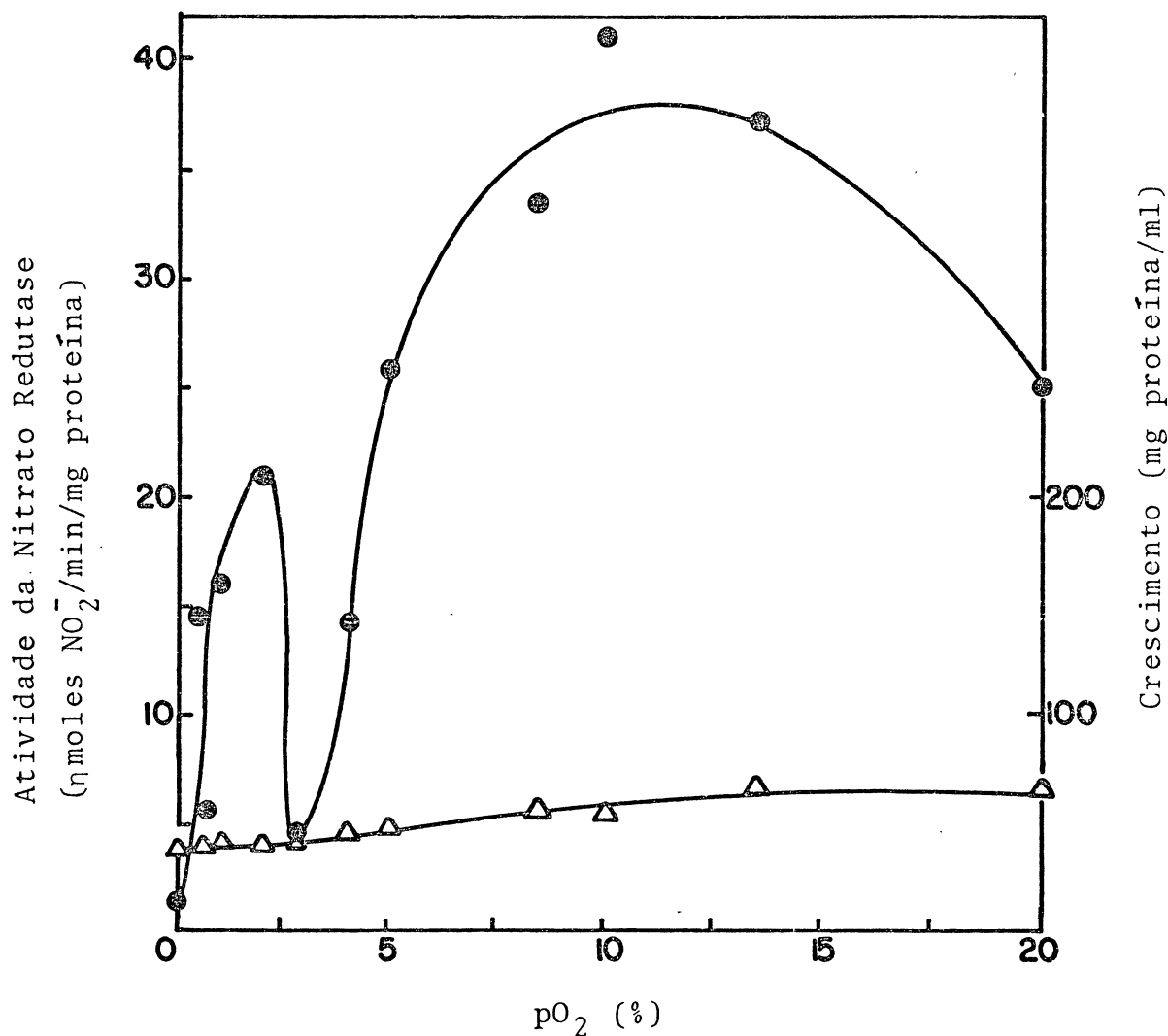


Figura 15 - EFEITO DA PRESSÃO PARCIAL DE OXIGÊNIO ( $pO_2$ ) NA EXPRESSÃO DA NITRATO REDUTASE EM *A. brasilense* NA PRESENÇA DE AMÔNIA.

Experimento realizado como descrito na Fig. 12, exceto que na presença de  $NH_4Cl$  (20 mM). Atividade da nitrato redutase (anaerobicamente) ensaiada como descrito em Materiais e Métodos. Crescimento após 3 horas de experimento. Símbolos: ( $\Delta$ ) Crescimento (proteína) após o período de indução, ( $\bullet$ ) Atividade da Nitrato Redutase.

Quadro I - EFEITO DA FONTE NITROGENADA NO CRESCIMENTO E CONSUMO DE NITRATO POR *A. brasilense* (Sp7).

IDADE DA CULTURA (Horas)	$\text{NH}_4^+$ td <sub>proteína</sub>	$\text{NO}_3^-$ td <sub>proteína</sub>	$\text{NO}_3^-$ *tcr <sub><math>\text{NO}_3^-</math></sub>	$\text{NO}_3^-$ + td <sub>proteína</sub>	$\text{NH}_4^+$ *tcr <sub><math>\text{NO}_3^-</math></sub>
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	2,6	9,2	0	4,1	0
4	3,0	4,6	10,3	2,6	0
6	1,6	5,4	9,6	1,5	0
7	1,9	3,8	7,0	3,5	0
8	2,6	1,7	4,5	2,5	68,2
9	1,9	1,2	23,7	4,5	16,7
10	1,0	2,5	36,7	7,7	53,3
11	9,1	2,1	29,6	0,0	∞
12	18,8	2,7	39,0	8,1	60,0
13	37,5	15,0	30,0	17,7	∞

\*Taxa de consumo relativo de nitrato.

Quadro II - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO NO CRESCIMENTO, CONSUMO DE NITRATO E NA EXCREÇÃO DE NITRATO E AMÔNIA POR *A. brasilense* (Sp7).

Inicial	NITRATO (mM)		NITRITO (mM)	AMÔNIA (mM)	NITRATO (mM)		Idade (hr)	CRESCIMENTO		
	Residual	Consumido	Excretado	Excretada	Assimilado (1)	(2)		D.O. <sub>560</sub>	Proteína (mg/ml)	pH
2,5	0,1	2,4	0	0	2,4	2,5	8	1,00	0,232	7,9
4,7	0,6	4,1	0	0,4	3,7	3,3	8	1,00	0,306	8,2
11,1	1,5	9,6	1,6	1,9	6,1	5,9	10	1,32	0,547	8,8
19,7	9,0	10,7	2,4	2,2	6,1	5,7	10	1,30	0,531	8,8

Dados calculados a partir das Figs. 4, 5, 6 e 7 nos tempos onde a maior parcela do nitrato já havia sido consumida (Fig. 4) e onde a excreção de amônia havia atingido o máximo (Figs. 5, 6 e 7).

(1) -  $\text{NO}_3^-$  assimilado =  $\text{NO}_3^-$  consumido - ( $\text{NO}_2^-$  +  $\text{NH}_4^+$  excretados).

(2) -  $\text{NO}_3^-$  assimilado calculando pela concentração de proteína, assumindo em 15% o conteúdo de nitrogênio das proteínas.

Quadro III - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO NO CRESCIMENTO E NA EXCREÇÃO DE NITRITO E AMÔNIA POR *A. brasilense* (Sp7).

Inicial	NITRATO (mM)		NITRITO (mM) Excretado	AMÔNIA (mM) Excretada	NITRATO (mM)		Idade (hr)	CRESCIMENTO		
	Residual	Consumido			Assimilado (1)	(2)		D.O. <sub>560</sub>	Proteína (mg/ml)	pH
2,5	0,1	2,4	0	0	2,4	3,3	13	1,5	0,354	8,8
4,7	0,2	4,5	0	0	4,5	6,4	13	1,7	0,644	9,1
11,1	0,6	10,5	1,6	0,9	8,0	7,4	13	1,6	0,740	9,0
19,7	8,4	11,3	3,0	1,2	7,1	7,3	13	1,5	0,724	9,2

Dados calculados a partir das Figs. 4, 5, 6 e 7 após 13 horas de crescimento.

(1) e (2) - Calculados conforme Quadro II.



Quadro IV - DISTRIBUIÇÃO INTRACELULAR DA NITRATO REDUTASE EM *A. brasilense* (Sp7).

FRAÇÃO	PROTEÍNA TOTAL (mg)	NITRATO REDUTASE		ATIVIDADE (%)
		U.T.	A.E.	
Extrato bruto	109,2	3811	34,9	100,0
Sobrenadante (105.000 x g)	77,4	1153	14,9	30,3
Precipitado (105.000 x g)	34,2	776	22,7	20,4

## DISCUSSÃO

O *Azospirillum brasilense*, estirpe Sp7, foi capaz de crescer aerobicamente em nitrato (Fig. 2) como fonte única de nitrogênio, confirmando os resultados anteriores (NEYRA et al., 1977; NEYRA & VAN BERKUN, 1977; ESKEW et al., 1977; TARRAND et al., 1978; MAGALHÃES et al., 1978).

As curvas de crescimento com nitrato mais amônia e amônia foram semelhantes, praticamente com a mesma taxa de crescimento (Quadro I) e lag (Figs. 2 e 3). A fase de maior lag que ocorre no tratamento com nitrato sozinho pode ser explicada pela necessidade de adaptação do organismo ao consumo de nitrato; uma vez que o inóculo foi previamente crescido em amônia.

Durante os crescimentos em aerobiose na presença de nitrato e nitrato mais amônia ocorreu excreção de nitrito e amônia. No tratamento com nitrato sozinho (Fig. 2 e Quadro I) pode-se constatar que a taxa de consumo relativo de nitrato no início do crescimento (tcr 7,8) foi menor que na fase logarítmica (tcr 32,2), indicando que o nitrato foi utilizado com duas finalidades: (a) promover o crescimento bacteriano via assimilação; e (b) além de assimilado servir como aceitador final de elétrons, substituindo o oxigênio - dissimilação ou respiração do nitrato. Já no crescimento em nitrato mais amônia os valores de tcr (Quadro I) mostram que não houve consumo de nitrato até D.O.<sub>560nm</sub> 1,1; portanto, nesta fase o consumo de nitrato foi suprimido por amônia (Fig. 3), sugerindo o caráter preferencial de utilização da amônia em relação ao nitrato e a repressão da via de redução assimilatória de nitrato por amônia. Esta é a primeira evidência concreta de repressão desta via por amônia em *A. brasilense*. As nitrato redutases assimilatórias solúveis de *Klebsiella pneumoniae* (VAN'T RIET et al., 1968), *Azotobacter chroococcum* (GUERRERO et al., 1973) e de *Pseudomonas* sp (BROWN et al., 1975) são todas reprimidas por amônia. Entretanto, convém lembrar que NEYRA & VAN BERKUN (1977) observaram repressão parcial por amônia da excreção anaeróbica do nitri-

to em *A. brasilense* (Sp7), fato que sugere a participação da nitrato redutase assimilatória na excreção do nitrito.

O consumo de nitrato na fase seguinte foi praticamente estequiométrico com o nitrito excretado, indicando sua utilização exclusivamente dissimilatória (Fig. 3). NEYRA & VAN BERKUN (1977) registraram excreção e acúmulo de nitrito imediata e linear quando transferiram a cultura de *A. brasilense* de aero para anaerobiose, substituindo o borbulhamento de ar por  $N_2$ . Logo, é provável que no ponto onde começa a excreção de nitrito (Figs. 2, 3, 6 e 7), a tensão de oxigênio dissolvido fosse bastante baixa, permitindo a expressão da via dissimilatória do nitrato. Excreção anaeróbica de nitrito por *Azospirillum* spp foi observada anteriormente (NEYRA et al., 1977; NEYRA & VAN BERKUN, 1977; BOTHE, 1981). Excreção de nitrito durante o crescimento de *A. brasilense* em condições de baixo oxigênio dissolvido foi também anteriormente observado (NELSON & KNOWLES, 1978), o mesmo ocorrendo em meio semi-sólido (SAMPAIO et al., 1976, MAGALHÃES et al., 1979). Convém ressaltar que o início da excreção de amônia e nitrito ocorreu quando a D.O.<sub>560nm</sub> atingiu 0,85; quando provavelmente, a tensão de oxigênio dissolvido era baixa, mas ainda suficiente para garantir crescimento na presença de amônia sozinha, até uma D.O.<sub>560nm</sub> 1,85 (Fig. 1). Portanto confirmando que a excreção de amônia e nitrito ocorreram em culturas agitadas sob ar (Figs. 2 e 3).

Excreção de amônia em anaerobiose foi verificada por SCOTT et al., (1979), após 3 horas de indução anaeróbica com nitrato, uma condição bastante diversa daquela em que este experimento foi conduzido - crescimento aeróbico sob agitação rotatória. Nos experimentos de SCOTT et al. (1979) a amônia só começou a ser excretada quando praticamente todo o nitrato já havia sido transformado em nitrito, e a excreção de amônia alcançou um valor máximo de 0,35 mM; enquanto a de nitrito 10 mM. Portanto, apenas 3,5% do nitrito formado foi reduzido e excretado na forma de amônia. No presente trabalho (Figs. 5, 6 e 7 e Quadros II e III) níveis equivalentes de nitrito e amônia foram excretados.

Redução anaeróbica de nitrato à amônia também foi observada em *Klebsiella* spp (HADJIPETROU & STOUTHAMER, 1965; KLEINER,

1976), organismo incapaz de dissimilar nitrato a óxidos gasosos. DUNN et al. (1978) observaram dissimilação de nitrato à amônia quando cresceram *Klebsiella* spp em cultura contínua em condições de limitação de nitrato e oxigênio, entretanto estas vias são dissimilatórias já que estão sob regulação do  $O_2$ , e não da amônia.

Apesar destas evidências e as de NEYRA & VAN BERKUN (1977), sugerindo a presença de duas enzimas distintas-uma nitrato redutase assimilatória com função nutritiva, reprimida por amônia (Fig. 3) e outra nitrato redutase dissimilatória envolvida na respiração do nitrato, todos os mutantes nitrato redutase negativos de *Azospirillum* isolados por MAGALHÃES et al. (1978) perderam simultaneamente a capacidade de crescer e de respirar nitrato, sugerindo a presença de uma única nitrato redutase, ou mutação num componente comum às nitrato redutases assimilatória e dissimilatória.

O nitrito excretado no tratamento nitrato mais amônia foi estequiométrico com o nitrato consumido (Fig. 3), enquanto que no tratamento nitrato sozinho (Fig. 2) o nitrito excretado foi apenas 22% do nitrato consumido. Estes dados indicam que a amônia reprimiu também a expressão da nitrito redutase assimilatória, porém não reprimiu a nitrato redutase dissimilatória, considerada a única responsável pela excreção de nitrito (NEYRA et al., 1977; NEYRA & VAN BERKUN, 1977; MAGALHÃES et al., 1978; RIGAUD et al., 1973). Crescimento em nitrato e o menor acúmulo de nitrito no tratamento com nitrato sozinho atesta a presença de ambas, nitrato e nitrito redutases assimilatórias.

A síntese da nitrito redutase assimilatória é reprimida por amônia em fungos (GARRETT, 1978), plantas (HEWITT, 1975) e em algumas espécies de bactérias tais como *Veillonella alcalescens* (YORDY & DELWICHE, 1979).

Por outro lado as nitrito redutases capazes de reduzir nitrito à amônia de *E. coli* (KEMP & ATKINSON, 1966; COLEMAN et al., 1978), de *Ackromobacter fischeri* (PRAKASH & SADANA, 1972), de *Klebsiella* spp (DUNN et al., 1979) são reguladas por repressão pelo oxigênio em vez de repressão por amônia.

A excreção de amônia, em culturas agitadas sob ar, foi inesperada. Decidimos em vista desses resultados estudar o efeito da concentração de nitrato na excreção de nitrito e amônia durante o crescimento aeróbico de *A. brasilense* (Sp7). Embora excretados simultaneamente na mesma cultura, a excreção de amônia precedeu ligeiramente a de nitrito, quando tomada em função da concentração de nitrato (Fig. 8). A excreção de amônia atingiu valores máximos com 10 mM de nitrato, sugerindo saturação da nitrito redutase assimilatória por nitrito. O excesso de nitrito foi então excretado, acumulando na cultura.

O balanço nitrogenado (Quadro II) demonstra que todo o nitrato consumido, até D.O.<sub>560nm</sub> 1,0 - 1,35; pode ser computado sendo constituído de amônia excretada, nitrito excretado, e nitrato assimilado.

O nitrato assimilado calculado a partir do conteúdo nitrogenado das proteínas totais (assumindo 15% N) foi praticamente igual ao calculado pela diferença entre o nitrato consumido e a amônia mais nitrito excretados, demonstrando que nestas condições aeróbicas, não ocorreu desnitrificação dissimilatória com formação de óxidos apesar da excreção de nitrito por *Azospirillum* spp ser geralmente assumida como indicativa de dissimilação anaeróbica, como mencionado anteriormente.

O balanço nitrogenado calculado na décima terceira hora de crescimento (D.O.<sub>560nm</sub> 1,5 - 1,7; Quadro III) mostra um aumento de 38 - 42% no nitrato assimilado, calculado a partir da concentração protéica, em relação ao calculado por diferença, nas culturas com 2,5 e 4,7 mM de nitrato. Estes dados sugerem crescimento dependente de uma outra fonte de nitrogênio distinta do nitrato, nitrito e amônia, talvez fixação de nitrogênio. Com 11,1 e 19,7 mM de nitrato todo o nitrogênio assimilado foi derivado do nitrato presente no meio, como demonstra os dados das Quadro II e III, e também todo o nitrato consumido foi computado como anteriormente.

De posse dos conhecimentos acima resolvemos estudar o efeito da tensão de oxigênio e da fonte de nitrogênio na expressão

da nitrato redutase, determinada pelo nitrito excretado, visando caracterizar duas atividades distintas de acordo com o padrão de regulação.

A expressão da nitrato redutase de *A. brasilense* (Sp7) requereu a presença de oxigênio em todas as condições estudadas, mesmo na presença de nitrato. A expressão desta atividade em condições de oxigênio limitante ( $pO_2$  igual ou menor que 0,1%) foi inferior a 10% da atividade máxima ( $pO_2$  aproximadamente de 1 - 2%). Concentrações de oxigênio superiores ao ótimo reprimiram sua síntese.

A necessidade de oxigênio pode ser explicada por sua participação na biossíntese de ATP na célula, uma vez que a nitrato redutase dissimilatória, que desempenharia esta função, estava ausente nas células utilizadas nos experimentos de "indução". Convém lembrar que o organismo foi crescido e induzido em lactato, cujo metabolismo é tipicamente oxidativo.

As condições experimentais utilizadas por NEYRA & VAN BERKUN (1977) para obtenção de condições anaeróbicas, borbulhamento com  $N_2$  é insuficiente, uma vez que nenhum tratamento especial foi feito para remover o oxigênio contaminante do nitrogênio ( $pO_2$  igual ou menor que 0,05%), continuamente fornecido a cultura. Além disto, nenhum dado de proteína é fornecido dificultando a comparação com os nossos resultados em termos de atividade específica, o mesmo ocorrendo com os dados de SCOTT et al., (1979).

Amônia não reprimiu a excreção de nitrito, causando porém um deslocamento do ótimo de oxigênio para valores superiores (Fig. 10). Este deslocamento foi devido as melhores condições fisiológicas do organismo na presença de amônia, como refletido no crescimento observado com nitrato mais amônia em  $pO_2$  superiores a 4%. Nenhum crescimento ocorreu com nitrato sozinho, em qualquer dos  $pO_2$  estudados.

As atividades das nitrato redutases, determinadas na presença de oxigênio foram praticamente as mesmas na presença ou ausência de amônia (Fig. 11), sugerindo a presença de uma enzima

cuja regulação não é dependente de amônia, mas dependente do oxigênio, portanto dissimilatória.

Semelhante ao grupo de experimentos discutidos anteriormente, o grupo seguinte caracteriza a expressão do sistema enzimático da nitrato redutase, também em função de  $pO_2$  e da fonte de nitrogênio, sendo a atividade da nitrato redutase determinada anaerobicamente (Figs. 13, 14 e 15) após 3 horas de "indução" em diferentes  $pO_2$ . O fato novo surgido, em relação ao que havia sido observado, foi a expressão da atividade da nitrato redutase na ausência de nitrogênio fixado, apresentando dois picos de atividade em 1 - 2% e 4% de oxigênio.

Nas condições existentes no presente trabalho a nitrato redutase necessitou de oxigênio para a sua síntese, assim como  $pO_2$  superiores a 10% e reprimiram parcial ( $N_2$ ) ou totalmente ( $KNO_3$ ). A atividade da nitrato redutase não foi reprimida por amônia e o nitrato não foi requerido como indutor exclusivo. Com base nestas características de regulação, no ponto passível de crítica de NEYRA & VAN BERKUN (1977), e na afirmativa de PAYNE (1976), que o simples abaixamento da tensão de oxigênio é suficiente para induzir a nitrato redutase dissimilatória, poderíamos sugerir que se trata da enzima dissimilatória em *A. brasiliense* (Sp7).

Contrariando NEYRA & VAN BERKUN (1977) e SCOTT et al., 1979; a síntese e atividade da nitrogenase não foi estimulada por nitrato, mais sim causou uma repressão bastante acentuada, em torno de 90%. NELSON & KNOWLES (1978) verificaram também uma redução efetiva da atividade da nitrogenase na presença de nitrato, chegando a desaparecer quando em condições anaeróbicas e na presença de 7 mM de nitrato.

Em todos os experimentos onde a nitrato redutase foi "induzida" por nitrato na presença de diferentes níveis de oxigênio observamos um pico e um "ombro" de atividade, sugerindo a presença de duas nitrato redutases (Figs. 11 e 13). Amônia foi incapaz de suprimir uma das atividades, sugerindo a ausência da nitrato redutase assimilatória ou que sua atividade não pode ser detecta-

da pelo nitrito excretado. Tentativas para observação de uma atividade da nitrato redutase assimilatória, pelo nitrito excretado, em  $pO_2$  superiores a 20% falharam. O fato do "ombro" de atividade de nitrato redutase coincidir com a pressão parcial de oxigênio ótima para a desrepressão da nitrogenase (Figs. 12 e 13) e considerando que esta corresponde a uma tensão de oxigênio dissolvido de 0,5 - 0,75% de  $O_2$  (OKON et al., 1977; NELSON & KNOWLES, 1978) e que *Azospirillum* é incapaz de crescer fixando nitrogênio em altas tensões de oxigênio (como as utilizadas no crescimento com nitrato), concluímos que nenhuma destas atividades de nitrato redutase tem função assimilatória. Em outras palavras, se estas atividades de nitrato redutase tivessem função na assimilação do nitrato, o *A. brasilense* (Sp7) só cresceria em nitrato em baixas tensões de oxigênio, como por exemplo em meio semi-sólido.

Duas atividades de nitrato redutase também se expressaram na ausência de qualquer fonte de nitrogênio fixado (Fig. 12), ou mesmo na presença de amônia (Fig. 15). Estes fatos reforçam a idéia da presença de duas atividades de nitrato redutase induzíveis na ausência de nitrato, pelo abaixamento de tensão de oxigênio e que ambas tenham função dissimilatória.

É importante ressaltar os níveis de nitrato redutase alcançados na presença de amônia, mesmo na ausência de nitrato (Fig. 15), reforçando o caráter não repressor da amônia e o não requerimento do nitrato para a indução destas enzimas.

Durante o período de indução da nitrato redutase na presença de nitrato ocorreu excreção de nitrito e amônia (Fig. 14). A excreção de amônia corresponderia teoricamente à atividade da nitrito redutase assimilatória e ocorreu na mesma faixa de  $pO_2$  de desrepressão da nitrogenase. Este fato sugere também, como argumentado anteriormente para as nitrato redutases, que esta nitrato redutase tenha função dissimilatória. A observação da ausência de crescimento na presença de nitrato nestas condições, reforça este fato.

O estudo da distribuição intracelular das nitrato redutases de *A. brasilense* (Quadro IV) demonstra a presença de duas ni-



trato redutases.

Tomados em conjunto os dados apresentados neste trabalho indicam: (a) presença de uma via assimilatória de nitrato com ambas, nitrato e nitrito redutases, cuja síntese é regulada por repressão por amônia; (b) a expressão das nitrato redutases dissimilatórias requer oxigênio e é reprimida por oxigênio, mas não o é por amônia; o nitrato não é requerido como indutor, apesar deste estimular a expressão da enzima; amônia não reprime, pelo contrário permite uma alta expressão; (d) tomando a expressão da nitrogenase como marcador de baixa tensão de oxigênio dissolvido, concluímos que a amônia excretada nos experimentos de indução ocorreu via nitrito redutase dissimilatória, sugerindo a presença da via dissimilatória com formação de amônia, requerendo  $O_2$  para expressão e sendo reprimida por este último em altas concentrações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APARÍCIO, P.J.; KNAFF, D.B.; MALKIN, R. The role of an iron-sulfur center and siroheme in spinach nitrite reductase. Arch. Biochem. Biophys., 169: 102-107, 1975.
2. BOTHE, H.; KLEIN, B.; STEPHAN, M.P.; DOBEREINER, J. Transformations of inorganic nitrogen by *Azospirillum* spp. Arch. Microbiol., 1981, no prelo.
3. BROWN, C.M.; MACDONALD BROWN, D.S.; MEERS, J.L. Physiological aspects of microbial inorganic nitrogen metabolism. Adv. Microb. Physiol., 11: 1-52, 1974.
4. BULOW, J.F.W. von & DOBEREINER, J. Potencial for nitrogen fixation in maize genotypes in Brasil. Proc. Natl. Acad. Sci., 72: 2389-2393, 1975.
5. CHAYKIN, S. Assay of nicotinamide deamidase. Determination of ammonia by the indophenol reaction. Anal. Biochem., 31 : 375-382, 1969.
6. CASKEY, W.H. & TIEDJE, J.M. The reduction of nitrate to ammonium by a *Clostridium* spp isolated from soil. J. Gen. Microbiol., 119: 217-223, 1980.
7. CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHADER, L.E. & YOUNG, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Commun. Soil Sci. Plant Anal., 6: 71-80. 1975.
8. COLEMAN, K.J.; NEWMAN, B.M.; CORNISH-BOWDEN, A.J.; COLE, J.A. Nitrite reduction by bacteria. In: SCHLESSINGER, D. ed. Microbiology. Washington, ASM Publications, 1978 p. 334 - 338.
9. DAY, J. & DOBEREINER, J. Physiological aspects of N<sub>2</sub> - fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. Soil Biol. Biochem. 8: 45-50, 1976.
10. DART, P.J.; DAY, J.M.; HARRIS, D. Assay of nitrogenase activity by acetylene reduction. In: Use of isotopes for study of fertilizer utilization by legume crops. I.A.E.A., Tech. Rep., 149: 85-100, 1972.

11. DELWICHE, C.C. & BRYAN, B.A. Denitrification. Ann. Rev. Microbiol., 30: 241-262, 1976.
12. DOBEREINER, J. & DAY, J.M. Associative symbioses and free-living systems. In. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION, 1, Pullman, 1976. Proceedings. Pullman, Washington State University, 1974. p. 518-538.
13. DOBEREINER, J.; MARRIEL, J.E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Can. J. Microbiol., 22: 1464-1473, 1976.
14. DUNN, G.M.; HERBERT, R.A.; BROWN, C.M. Influence of oxygen tension on nitrate reduction by a *Klebsiella* sp growing in chemostat culture. J. Gen. Microbiol., 112: 379-383, 1979.
15. ESKEW, D.L.; FOCHT, D.D.; TING, I.P. Nitrogen fixation denitrification and pleomorphic growth in a highly pigmented *Spirillum lipoferum*. App. Environ. Microbiol., 34: 582-585, 1977.
16. GARRETT, R.H. Nitrite reduction in fungi. In: SCHLESSINGER, D. (ed.) Microbiology. Washington, ASM Publications, 1978. p. 324-329.
17. GUERRERO, M.G.; VEGA, J.M.; LEADBETTER, E.; LOSADA, M. Preparation and characterization of a soluble nitrate reductase from *Azotobacter chroococcum*. Archiv fur Microbiologie, 91: 287-304, 1973.
18. HADJIPETROU, L.P. & STOUTHMAER, A.H. Energy production during nitrate preparation by *Aerobacter aerogenes*. J. Gen. Microbiol., 38: 35-38, 1965.
19. HEWITT, E.J. Assimilatory nitrate-nitrite reduction. Ann. Rev. Plant. Physiol., 26: 73-100, 1975.
20. KEMP, J.D. & ATKINSON, D.E. Nitrite reductase of *Escherichia coli* specific for reduced nicotinamide adenine dinucleotide. J. Bacteriol., 92: 628-634, 1966.
21. KLEINER, D. Ammonium uptake and metabolism by nitrogen fixing bacteria. II. *Klebsiella pneumoniae*. Arch. Microbiol. 111: 85-91, 1976.

22. KOIKE, I. & HATTORI, A. Energy yield of denitrification: An estimate from growth yield in continuous cultures of *Pseudomonas denitrificans* under nitrate, nitrite and nitrous oxide-limited conditions. J. Gen. Microbiol., 88: 11-19, 1975.
23. KRIEG, N.R. & TARRANT, J.J. Taxonomy of the root-associated nitrogen fixing bacterium *Spirillum lipoferum*, In: INTERNATIONAL LATIN AMERICAN SYMPOSIUM 15, Brasília, 1977. Limitations and Potentials of Biological Nitrogen Fixation in Tropics. New York, Plenum, 1978, p. 317-333.
24. LAFFERTY, M.A. & GARRETT, R.H. Purification and properties of the *Neurospora crassa* assimilatory nitrite reductase. J. Biol. Chem., 249: 7555-7567, 1974.
25. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
26. MAGALHÃES, L.M.S.; NEYRA, C.A.; DOBEREINER, J. Nitrate and nitrite reductase negative mutants of  $N_2$ -fixing *Azospirillum* spp. Arch. Microbiol., 117: 247-252, 1978.
27. MATSUBARA, T. Studies on denitrification. J. Biochem., 67: 229-235, 1970.
28. MURPHY, M.J.; SIEGEL, L.M.; TOVE, S.R.; KAMIN, H. Siroheme: a new prosthetic group participating in six-electron reduction reactions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 71: 612-616, 1974.
29. NELSON, L.M. & KNOWLES, R. Effect of oxygen and nitrate on nitrogen fixation and denitrification by *A. brasilense* grown in continuous culture. Can. J. Microbiol., 24: 1395-1403, 1978.
30. NEYRA, C.A. & VAN BERKUN, P. Nitrate reduction and nitrogenase activity in *Spirillum lipoferum*. Can. J. Microbiol., 23: 306-310, 1977.
31. NEYRA, C.A.; DOBEREINER, J.; LALANDE, R.; KNOWLES, R. Denitrification by a *Spirillum lipoferum*. Can. J. Microbiol., 23: 300-305, 1977.

32. OKON, Y.; ALBRECHT, S.L.; BURRIS, R.H. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. J. Bacteriol., 127: 1248-1254, 1976a.
33. OKON, Y.; ALBRECHT, S.L.; BURRIS, R.H. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. App. Environ. Microbiol., 33: 85-88, 1977a.
34. OKON, Y.; HOUCHINS, J.P.; ALBRECHT, S.L.; BURRIS, R.H. Growth of *Spirillum lipoferum* at constant partial pressures of oxygen, and the properties of its nitrogenase in cell-free extracts. J. Gen. Microbiol., 98: 87-93, 1977 b.
35. PAYNE, W.J. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. Bacteriol. Rev., 37: 409-452, 1973.
36. PAYNE, W.J. Denitrification. Trends Biochem. Sci., 1: 220-222, 1976.
37. PAYNE, W.J. & BALDERSTON, W.L. Denitrification. In: SCHLESSINGER, D. ed. Microbiology. Washington, ASM Publications, 1978. p. 339-342.
38. PAYNE, W.J. & RILEY, P.S. Suppression by nitrate enzymatic reduction of nitrite oxide. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 132: 258-260, 1969.
39. PAYNE, W.J.; RILEY, P.S.; COX Jr., C.D. Separate nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide reducing fractions from *Pseudomonas perfectomarinus*. J. Bacteriol., 106: 356-361, 1971.
40. PICHINOTY, F. & D'ORMANO, L. Inhibition by oxygen of biosynthesis and activity of nitrate-reductase in *Aerobacter aerogenes*. Nature, 191: 879-881, 1961.
41. PICHINOTY, F. La reduction bactérienne des composés oxigénés minéraux de l'azote. Bull. Inst. Pasteur, 71: 317-395, 1973.
42. PRAKASH, O. & SADANA, J.C. Metabolism of nitrate in *Achromobacter fischeri*. Can. J. Microbiol. 19: 1525-1533, 1973.
43. QUISPÉL, A. General Introduction. In: \_\_\_\_\_. The biology of nitrogen fixation. Amsterdam, North-Holland, 1974 p. 1-8.
44. RIGANO, C. & ALIOTTA, G. Electron donors and inhibitors of nitrate reductase from *Cyanidium caldarium*. Biochem. Biophys. Acta, 384: 37-45, 1975.

45. RIGAUD, J.; BERGENSEN, F.J.; TURNER, G.L.; DANIEL, R.M. Nitrate dependent anaerobic acetylene-reduction and nitrogen-fixation by soybean bacteroids. J. Gen. Microbiol., 17: 137-144, 1973.
46. SAMPAIO, M.J.A.; VASCONCELLOS, L.; DOBEREINER, J. Identification of three groups within *Spirillum lipoferum*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM. Uppsala, 1976. Environmental Role of Nitrogen-fixing Blue-green Algae and Asymbiotic Bacteria.
47. SCOTT, B. & SCOTT, C.A. Nitrate-dependent nitrogenase activity in *Azospirillum* spp. Under low oxygen tensions, In: INTERNATIONAL LATIN AMERICAN SYMPOSIUM, 15, Brasília, 1977. Limitations and Potentials of Biological Nitrogen Fixation in the tropics. New York, Plenum, 1978, p. 350-351.
48. SCOTT, B.; SCOTT, C.A.; DOBEREINER, J. Nitrogenase activity and nitrate respiration in *Azospirillum* spp. Arch. Microbiol., 121: 141-145, 1979.
49. SHOWE, M.K. & De MOSS, J.A. Localization and regulation of synthesis of nitrate reductase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 95: 1305-1313, 1968.
50. SOLOMONSON, L.P.; LORIMER, G.H.; HALL, R.L.; BORCHERS, R.; BACKLEY, J.L. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-nitrate reductase of *Chlorella vulgaris*. J. Biol. Chem., 250: 4120-4127, 1975.
51. STOUTHAMER, A.H. Biochemistry and genetics of nitrate reductase in bacteria. Adv. Microb. Physiol., 14: 315-375, 1976.
52. STOUTHAMER, A.H. Bionergetic studies on *Paracoccus denitrificans*. Trends Biochem. Sci., 5: 164-166, 1980.
53. TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DOBEREINER, J. A taxonomic study of *Spirillum lipoferum* group. with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasiliense* sp. nov. Can. J. Microbiol., 24: 967-980. 1978.
54. TEMPEST, D.W. The continuous cultivations of micro-organisms. I. Theory of the chemostat, In: NORRIS, J.R. & RIBBONS, D. W. ed. Methods in Microbiology. New York, Academic, 1970. v. 2, p. 259-276.

55. VAN'T RIET, J.; STOUTHAMER, A.H.; PLANTA, R.J. Regulation of nitrate assimilation and nitrate respiration in *Aerobacter aerogenes*. J. Bacteriol., 96: 1455-1464, 1968.
56. VEGA, J.M.; GÜRRERO, M.G.; LEADBETTER, E.; LOSADA, M. Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide nitrite reductase from *Azotobacter chroococcum*. Biochem. J., 133: 701 - 708, 1973.
57. YORDY, D.M. & DELWICHE, E.A. Nitrite reduction in *Veillonella alcalescens*. J. Bacteriol., 137: 905-911, 1979.