ASPECTOS GENÉTICOS DA FIXAÇÃO ASSIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO EM BACTÉRIAS DO SOLO

GISLENE GARCIA FRANCO DO NASCIMENTO

Orientador : FLÁVIO CESAR ALMEIDA TAVARES

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro - 1985

Ao meu esposo

Virgilio

e aos meus filhos

Mauricio e Alexandre

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. *Flávio Cesar Almeida Tavares* pela confiança e orientação recebida.
- Ao colega *Sergio Echeverrigaray Laguna* pela amizade e sugestões durante a realização do trabalho.
- Ao *Departamento de Genética* que possibilitou a participação no curso de pós-graduação e realização deste trabalho.
- Ao Dr. *Diógenes S. Santos* e Dr. *Caio Cardoso* pela doação de amostras bacterianas.
- À Dra. *Maria Heloisa Affonso* pelas sugestões na elaboração de análises eletroforéticas.
- À Dra. *Siu Mui Tsai Saito* pela colaboração nas análises de redução de acetileno.
- À *CAPES* pela bolsa concedida e à *FINEP* pelos recursos concedidos para a realização deste trabalho.
- Aos *técnicos de laboratório* do Setor de Genética de Microorganismos.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Considerações gerais sobre a fixação de ni- trogênio em organismos de vida livre	3
2.2. Aspectos genéticos da fixação de nitrogênio no gênero <i>Azotobacter</i>	7
2.3. Ocorrência de plasmídios em bactérias fixa- doras de nitrogênio	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. Amostras bacterianas utilizadas	35
3.2. Meios de cultura e soluções	38
3.3. Isolamento de bactérias assimbióticas do so- lo fixadoras de nitrogênio	47
3.4. Verificação da ocorrência de plasmídios das bactérias fixadoras de nitrogênio	48
3.5. Amplificação de plasmídios	50
3.6. Estimativa dos pesos moleculares dos plasmí- dios de linhagens fixadoras de N ₂	50
3.7. Eliminação de plasmídios das linhagens fixa- doras de N ₂	51

Página

3.8. Identificação taxonômica do isolado bacteriano 9	53
3.9. Determinação do nível de resistência do isolado 9 a antibióticos	53
3.10. Curva de sobrevivência do isolado 9 à radiação ultra-violeta	54
3.11. Curva de sobrevivência do isolado 9 ao tratamento com ácido nitroso	54
3.12. Obtenção de mutantes <i>nif</i> ⁻ no isolado 9 através da irradiação com luz ultra-violeta e tratamento com ácido nitroso	55
3.13. Auxanografia dos mutantes <i>nif</i> ⁻	55
3.14. Isolamento de mutantes resistentes a antibióticos	56
3.15. Extração de DNA total do isolado 9 e mutantes <i>nif</i> ⁻	57
3.16. Experimentos de transformação utilizando o DNA do isolado 9 e dos mutantes <i>nif</i> ⁻	58
3.17. Atividade da nitrogenase	62
3.18. Comparação do crescimento entre transformantes <i>nif</i> ⁺ de <i>E. coli</i> e isolado 9	63
3.19. Experimentos de conjugação	63
4. RESULTADOS	67
4.1. Isolamento de bactérias fixadoras de N ₂	67

Página

4.2. Ocorrência de plasmídios em bactérias fixadoras de N ₂	68
4.3. Eliminação de plasmídios em linhagens fixadoras de N ₂	71
4.4. Nível de resistência a drogas no isolado 9 ...	76
4.5. Curva de sobrevivência e obtenção de mutantes <i>nif</i> ⁻ à irradiação ultra-violeta e tratamento com ácido nitroso	77
4.6. Experimentos de transformação	81
4.7. Atividade da nitrogenase e crescimento dos transformantes de <i>E. coli</i>	87
4.8. Experimentos de conjugação	93
5. DISCUSSÃO	98
5.1. Ocorrência de plasmídios	98
5.2. Estudos genéticos no isolado 9 (<i>Azotobacter paspali</i>)	102
6. CONCLUSÕES	123
7. LITERATURA CITADA	126

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>		<u>Página</u>
1	Características e procedências das linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho	36
2	- Porcentagem de eliminação de plasmídios através do tratamento com agentes de "cura" em linhagens fixadoras de N_2	71
3	Nível de resistência do isolado 9 a antibióticos	76
4	Sobrevivência do isolado 9 à irradiação ultra-violeta	77
5	Sobrevivência do isolado 9 ao tratamento com ácido nitroso	78
6	- Porcentagem de recombinantes nif^+ da transformação entre mutantes nif^- e DNA do isolado 9	82
7	- Porcentagem de transformantes nif^+ obtidos de cruzamentos entre mutantes nif^- e DNA dessas mesmas linhagens	84
8	- Transformação de linhagens de <i>E. coli</i> e levedura <i>S. cerevisiae</i> com DNA do isolado 9	86
9	- Atividade da nitrogenase nos transformantes de <i>E. coli</i> e isolado 9 medida pela redução do acetileno	87

Tabela

Página

10	Crescimento dos transformantes <i>nif</i> ⁺ e linhagem HB101 de <i>E. coli</i> e isolado 9 em meio com nitrogênio incorporado	88
11	- Crescimento dos transformantes <i>nif</i> ⁺ e linhagem HB101 de <i>E. coli</i> e isolado 9 em meio sem nitrogênio incorporado	89
12	- Porcentagem de conjugação entre transformantes 101(9) e linhagens de <i>E. coli</i> portadoras de plasmídio	94
13	- Conjugação entre transformantes <i>nif</i> ⁺ de <i>E. coli</i>	95
14	Porcentagem de recombinantes na conjugação entre <i>E. coli</i> portadora de plasmídio com transposon e linhagens 101(9)1 e 9 ..	97

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1	Modelo simplificado para o controle posi tivo da nitrogenase em <i>A. vinelandii</i> ...	26
2	Eletroforese em gel de agarose de isola dos bacterianos fixadores assimbióticos de N ₂	69
3	- Reta de calibração para estimativa dos pesos moleculares de plasmídios a partir de linhagens padrões	70
4	- Cultura de 2 e 4 dias do isolado 9, em meio sem nitrogênio incorporado	74
5	- Cultura de 7 e 10 dias do isolado 9, em meio sem nitrogênio incorporado	75
6	- Curva de sobrevivência do isolado 9 à ir- radiação ultra-violeta e tratamento com ácido nitroso	79
7	- Ordem das mutações afetando a fixação de N ₂	84
8	- Curvas de crescimento dos transformantes, linhagem HB101 de <i>E. coli</i> e isolado 9 em meio com nitrogênio incorporado	90
9	Curvas de crescimento dos transforman- tes de <i>E. coli</i> e isolado 9 em meio sem	

Figura

Página

	nitrogênio incorporado	91
10	- Cultura de três dias das linhagens HB101, 9 e transformantes 101(9)2 em meio com e sem nitrogênio	92

ASPECTOS GENÉTICOS DA FIXAÇÃO ASSIMBIÓTICA
DE NITROGÊNIO EM BACTÉRIAS DO SOLO

Gislene Garcia Franco do Nascimento

Flávio Cesar Almeida Tavares
Orientador

RESUMO

Foi feito um estudo dos genes envolvidos com o processo de fixação assimbiótica de N_2 , em populações bacterianas selvagens do solo, com o intuito de se verificar a ocorrência de genes *nif* plasmidiais, ou mesmo cromossomais, que pudessem ser transferidos para outros sistemas não fixadores. Foi observada a presença de plasmídios nos isolados naturais 2-2II, 5-3 e 40-1 com pesos moleculares de 64, 40 e 92 Md, respectivamente, revelados por eletroforese em gel de agarose. Em nenhuma destas linhagens se detectou a presença de genes plasmidiais envolvidos com o processo de fixação de N_2 , uma vez que após a eliminação dos plasmídios com agentes de "cura", estas continuaram seu desenvolvimento normal em meio isento de nitrogênio incorporado. A maior

porcentagem de eliminação de plasmídios foi conseguida através do tratamento com temperatura de 44°C (2 a 10%), seguida do tratamento com brometo de etídio (1 a 5%), sendo menores as obtidas com acriflavina (0,5 a 1%) e acridina laranja (0,2 a 0,8%). Pode-se verificar que a presença, assim como o tamanho dos plasmídios presentes, não foi uma constante, pois variaram com a espécie, mostrando a grande variabilidade genética deste material. O isolado selvagem 9, não portador de plasmídio, classificado como *Azotobacter paspali*, foi estudado sob vários aspectos genéticos. Teve-se como objetivo, a localização dos genes *nif* nesta bactéria, procurando-se ainda uma similaridade com outras espécies do mesmo gênero, bem estudadas geneticamente. Neste sentido, inicialmente foram isolados alguns mutantes auxotróficos e *nif*⁻ (incapazes de fixar N₂), a partir da indução com luz ultra-violeta e tratamento com ácido nitroso. A localização de algumas mutações *nif* foi possível através da transformação destes mutantes *nif*⁻ com DNA de *A. paspali* selvagem e mutante, verificando-se que os genes estavam ligados na maioria dos casos. Também foram obtidos transformantes *nif*⁺ de *Escherichia coli*, utilizando-se DNA de *A. paspali*, os quais apresentaram reduzida atividade de nitrogenase, avaliada pela redução do acetileno. Estes transformantes *nif*⁺ foram ensaiados posteriormente, em vários processos de conjugação, com linhagens de *E. coli*. A partir destes experimentos, pode-se verificar que o sistema estudado apresenta algumas si

milaridades com outras espécies de *Azotobacter*, no que diz respeito à localização dos genes *nif* no genoma bacteriano. No entanto, a ocorrência de transformantes *nif*⁺ de *E. coli*, sugere que a maioria dos genes *nif* funcionais estão em um grupo passível de ser transferido por um único segmento de DNA.

GENETIC ASPECTS OF NON SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION
IN SOIL BACTERIA

Gislene Garcia Franco do Nascimento

Flávio Cesar Almeida Tavares
Adviser

SUMMARY

In soil bacteria plasmidial and chromosomal genes related to N_2 fixation were screened and selected for genetic studies and also to evaluate their transfer potential to other biological systems. The presence of plasmids were detected in the natural isolates 2-2II, 5-3 and 40-1 with molecular weight 64, 40 and 92 Md respectively, determined by agarose gel electrophoresis. None of these strains had plasmidial fixation genes since after plasmidial elimination ("cure") growth remained normal in media without nitrogen. Best plasmid "cure" was obtained after 44°C temperature treatment (2 - 10%) followed by ethidium bromide (1 - 5%) and the lowest elimination was obtained by acriflavin (0,5 - 1%)

and acridine orange (0,2 - 0,8%). Variability was observed for the presence and plasmid size. One of the isolates (number 9), classified as *Azotobacter paspali* and a nitrogen fixer strain with no plasmid detected was studied genetically with the objective of *nif* genes location. Auxotrophic and non fixing mutants (*nif*⁻) were isolated after treatment by UV light and nitrous acid. Complementation analysis after genetic transformation of *nif*⁻ mutants in all possible combinations permitted to detect linkage for the markers under analysis. By genetic transformation it was possible to transfer the fixation ability of *A. paspali* to *Escherichia coli*, although with reduced nitrogenase activity as evaluated by acetilene reduction. *E. coli* transformants were evaluated after conjugation experiments with different *E. coli* strains. Regarding to *nif* genes location on the bacterial genome the studies revealed similarities with other *Azotobacter* species. However taking in account the transformation of *E. coli* for *nif*⁺ suggests the possibility that most functional *nif* genes are clustered able to be transfered by a single DNA segment.

1. INTRODUÇÃO

A genética dos organismos fixadores de nitrogênio atmosférico, apesar de ser um estudo relativamente recente, vem fornecendo notável contribuição para o acervo de conhecimentos sobre a fixação. De grande destaque são os aspectos moleculares determinantes deste processo onde em alguns casos tem sido possível elucidar o arranjo dos genes para a fixação (*nif*) e sua regulação.

Neste sentido, destacam-se os estudos com a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, onde se tornou evidente que a maioria dos genes *nif* são ligados e portanto contidos num único segmento, que pode ser clonado em plasmídios e assim obtido em muitas cópias. No entanto, esta bactéria não pode ser utilizada diretamente na agricultura, por não ser típica de solo.

Outra bactéria fixadora assimbiótica de nitrogênio, ocupando um lugar de destaque, é a *Azotobacter vinelandii*,

esta típica de solo. Embora não tenha sido definida a posição dos genes *nif* neste microrganismo, há indicações de que não estejam todos num único grupo de ligação, dificultando a transferência conjunta ou mesmo amplificação em plasmídios.

Além destas bactérias são também importantes as do gênero *Rhizobium*, que desenvolvem uma simbiose com leguminosas realizando uma suplementação de nitrogênio direta aos vegetais. Apesar da importância do processo desenvolvido por esta bactéria, deve ser considerado que a maioria das modificações genéticas obtidas só podem ser realmente avaliadas após experimentos em simbiose com as plantas hospedeiras.

Como pode ser observado, os sistemas de fixação de nitrogênio até então disponíveis, apresentam certas dificuldades, seja pela complexidade da simbiose (requerendo a interação dos genomas bactéria e hospedeiro), seja pelo fato dos genes fixadores estarem dispersos no genoma de bactérias assimbióticas. Em vista destes fatos, o objetivo do trabalho foi o de isolar um sistema de fixação de N_2 assimbiótico mais favorável para estudos genéticos a partir de diferentes amostras de solos. Procurou-se nestes isolados, bactérias que permitissem uma fácil manipulação em laboratório, além de possuir genes *nif* capazes de serem transferidos para outros sistemas não fixadores, através de plasmídios ou mesmo segmentos de DNA cromossomais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Em vista dos objetivos deste trabalho, foi feita uma revisão sobre a genética do genero *Azotobacter*, onde uma introdução se fez necessária, para melhor compreensão das reações básicas do processo de fixação de N_2 . Ainda foi revisada a ocorrência de plasmídios, bem como suas implicações em bactérias fixadoras de N_2 .

2.1. Considerações gerais sobre a fixação de nitrogênio em organismos de vida livre

O nitrogênio é um constituinte essencial das proteínas e portanto indispensável para todas as formas de vida. Representa um fator limitante para o crescimento de plantas e animais e um suprimento inadequado na agricultura pode ser considerado como uma das causas da escassez de alimentos no mundo.

Cerca de 78% da atmosfera é constituída de nitrogênio molecular e no entanto, plantas, animais e eucariotos em geral não podem converter esse gás diretamente em uma forma biologicamente utilizável. Na natureza, o N_2 pode ser fixado por alguns microrganismos que o convertem para a forma de amônia, a qual pode posteriormente ser aproveitada pelos vegetais. Nenhum organismo superior tem esta capacidade, embora muitos deles participem indiretamente formando associações simbióticas capazes de fixar nitrogênio.

Desta forma, justifica-se o grande interesse despertado na última década em se melhor elucidar o processo de fixação biológica do nitrogênio. Trata-se de uma importante alternativa agrícola, principalmente quando se consideram os gastos necessários para produzir a mesma quantidade de nitrogênio na forma de fertilizantes. Deve-se ainda considerar que a utilização em grande escala desses fertilizantes concorre para o aumento da poluição de águas naturais (QUISPEL, 1974).

Dentre os organismos fixadores de nitrogênio de vida livre, destacam-se os gêneros *Klebsiella*, *Azotobacter* e *Azospirillum*. Outras espécies de bactérias, certos actinomicetos e algas verde-azuladas também possuem característica, mas pouca menção é feita na literatura a respeito da genética destes microrganismos.

Em todos os organismos fixadores, as reações básicas parecem ser as mesmas, isto é, a redução do nitrogênio para amônia através da complexa enzima nitrogenase (BRILL, 1981). A atividade da nitrogenase em *A. vinelandii* (BULEN *et alii*, 1964; BULEN e LE COMTE, 1966; SHAL e BRILL, 1973), como também de outros organismos fixadores, requer duas proteínas solúveis, designadas como componentes I e II (MORTENSON *et alii*, 1967; EADY e POSTGATE, 1974; EMERICH e BURRIS, 1978).

O componente I também chamado de Fe-Mo-proteína já foi cristalizado (BURNS *et alii*, 1970), sendo um tetramero de 245 kd, contendo dois átomos de molibdênio por molécula e duas subunidades, $\alpha_2\beta_2$ (SWISHER *et alii*, 1977; SHAL e BRILL, 1977; KENNEDY *et alii*, 1976). A análise de aminoácidos demonstrou que há similaridade entre as subunidades. Apesar da carboxila dos aminoácidos terminais das duas subunidades de *A. vinelandii* do componente I serem diferentes, parece possível que estas resultem de modificações de um simples polipeptídeo (LUNDELL e HOWARD, 1978). Cada subunidade requer a outra para sua estabilidade. Quando uma mutação em um gene origina um produto instável, o produto do outro gene é rapidamente degradado (ROBERTS *et alii*, 1978).

O componente II, também designado como Fe - proteína ou nitrato redutase, é um dímero formado de duas subunidades idênticas de 31 kd, contendo 289 aminoácidos (HA-

GEMAN e BURRIS, 1978; HAUSINGER e HOWARD, 1980), cuja sequência já foi determinada por TANAKA *et alii* (1977a,b) e ROBERTS *et alii* (1978). Entre os diferentes organismos, há similaridade na nitrogenase (CHEN *et alii*, 1973; EADY e POSTGATE, 1974). Desta forma, o componente I de um gênero pode interagir com o componente II de outro, para produzir uma enzima ativa (BENSON *et alii*, 1971; BIGGINS *et alii*, 1971; DETROY *et alii*, 1968; KELLY, 1969b; THORNELEY *et alii*, 1975; TSAI e MORTENSON, 1978). O antissoro preparado a partir de um componente de um determinado organismo pode reagir com componentes isolados de bactérias de diferentes gêneros (MAIER e BRILL, 1976).

A fixação de nitrogênio só ocorre quando as bactérias são incapazes de obter nitrogênio de outras fontes. Deste modo, NH_4^+ inibe completamente a formação de nitrogenase e compostos como aspartato, glutamato reprimem parcialmente. Quando uma cultura de célula cresce em meio isento de nitrogênio incorporado, é induzida a produção de nitrogenase, e o NH_4^+ produzido é convertido pelas enzimas glutamina sintetase e glutamato sintetase a glutamato, que é usado nas biossínteses celulares (NAGATANI *et alii*, 1971; SHANMUGAM e MORANDI, 1976).

Em relação à presença de oxigênio, pode-se dizer que a enzima nitrogenase é extremamente sensível a este gás, sendo que ambos os componentes são irreversivelmente i-

nativados quando expostos ao ar (ROBSON e POSTGATE, 1980). Desta forma, a fixação de nitrogênio é mais comum entre bactérias anaeróbias do que aeróbias. Anaeróbios obrigatórios, tais como espécies de *Clostridium pasteurianum*, *Chromatium*, *Chlorobium*, *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum* podem fixar N_2 . (YATES e JONES, 1974). Alguns anaeróbios facultativos, também fixam N_2 sob condições de anaerobiose, tais como *Bacillus polymixa*, *B. macerans*, *Klebsiella pneumoniae* e ainda algumas espécies de bactérias fotossintéticas como *Rhodospirillum*, *Rhodomicrobium* e *Rhodopseudomonas*.

A fixação de N_2 entre espécies aeróbias está restrita à família *Azotobacteriaceae*, que inclui espécies de *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia* e *Derrxia*, além de algumas espécies de *Mycobacterium* (SPRENT, 1979). Há espécies que fixam N_2 em ambiente com baixa tensão de O_2 (microaerófilas), como é o caso da bactéria *Azospirillum* (BRILL, 1977).

2.2. Aspectos genéticos da fixação de nitrogênio no gênero *Azotobacter*

Para o estudo genético de bactérias fixadoras de N_2 , deve se dispor de mutantes, bem como de técnicas adequadas para sua análise. Além disto, deve-se contar com sistemas de transferência de material genético de células doadoras para receptoras, com a finalidade de mapear tais muta-

ções, como conjugação, transformação e transdução. Assim, a genética tem contribuído muito na elucidação do processo de fixação de N_2 , principalmente considerando-se os recentes avanços da técnica do DNA recombinante, que abriu novas perspectivas no sentido de transferir os genes *nif* para organismos não fixadores.

Embora a genética da fixação de nitrogênio tenha se iniciado em *Azotobacter* (FISHER e BRILL, 1969; SORGER e TROFIMENKOFF, 1970), um maior conhecimento a respeito dos genes *nif* envolvidos nesse processo, foi possível a partir de estudos em *K. pneumoniae*. Nesta espécie, a existência de um sistema eficiente de transdução (KENNEDY, 1977) e o isolamento do plasmídeo pRD1 (DIXON *et alii*, 1976) contendo o grupo de genes *nif*, foi muito útil na compreensão do processo de fixação de N_2 (BRILL, 1980). Nestes estudos, foi verificado que a maioria dos genes *nif* são ligados e estão próximos ao operon *his* (DIXON *et alii*, 1972), sendo identificados 17 genes *nif* em 7 unidades de transcrição (SIBOLD, 1982); *nif* HDK são genes estruturais para a nitrogenase; *nif* H codifica para a subunidade simples do componente II e *nif* DK para as duas subunidades do componente I, sendo os três genes e o *nif* Y transcritos na ordem *nif* HDKY.

O gênero *Azotobacter* foi classificado por Beijerinck em 1901 e os primeiros estudos genéticos e bioquímicos a respeito da fixação de N_2 foram realizados com *A. vi*

nelandii e *A. chroococcum* (STUMBO e GAYNEY, 1938; WYSS e WYSS, 1950; GREEN *et alii*, 1953). No entanto, vários fatores como perda dos mutantes ou instabilidade associados com técnicas impróprias, resultaram em um lento avanço na genética dessas bactérias.

As linhagens mais utilizadas são: *A. vinelandii* OP (ATCC 13705; ATCC 478; ATCC 12837), OP também chamada UW, que é um mutante não capsulado obtido da linhagem O (ATCC 12518), e *A. chroococcum* (NCIB 8003).

STUMBO e GAINNEY (1938) isolaram mutantes de *A. chroococcum* incapazes de fixar N_2 (nif^-) através do crescimento da cultura por vários meses em meio contendo altas concentrações de NO_3^- (4000 ppm) como única fonte de nitrogênio. Estes mutantes não apresentaram deleção, pois foram capazes de fixar N_2 após várias passagens em meio sem nitrato. Segundo estes autores, o crescimento sob estas condições pode ter originado ácido nitroso intracelular, que atuou como mutagênico.

Após irradiação com luz ultra-violeta, WYSS e WYSS (1950), obtiveram mutantes nif^- em *A. vinelandii*, tendo sido observadas algumas características alteradas, tais como morfologia, produção de pigmentos e habilidade para reversão. GREEN *et alii* (1953) obtiveram do mesmo modo mutantes nif^- de *A. vinelandii*, com posterior seleção em penicilina. Os mutan

tes *nif*⁻ obtidos por MUMFORD *et alii* (1959) não apresentaram mutação no gene envolvendo a síntese de nitrogenase, pois a adição de vários precursores do piruvato ou lactato, suprimiram esta condição.

BUSH e WILSON (1959) isolaram mutantes de *A. vinelandii* linhagem O, que não formaram colônias mucosas. Estes foram designados como OP, sendo muito utilizados em experimentos posteriores com a nitrogenase devido à facilidade de sua manipulação. Mutantes desreprimidos para a síntese de nitrogenase em *A. vinelandii*, foram selecionados por SORGER (1968), através da resistência a inibidores como metilalanina ou metilamina, compostos tidos como correpressores. Entretanto, ST JOHN e BRILL (1972) não observaram inibição ou desrepressão da nitrogenase em mutantes resistentes a estes compostos. Evidências deste fato também foram dadas por GORDON e BRILL (1972), que obtiveram mutantes desreprimidos para a síntese de nitrogenase, mas que ainda foram sensíveis ao efeito inibidor da metilamina.

A seleção de mutantes *nif*⁻ temperatura-sensíveis foi feito por BENEMAN *et alii* (1971), tratando as células com nitrosoguanidina e depois incubadas a 39°C. Verificaram que nenhum dos mutantes *nif*⁻ isolados foram temperatura-sensíveis para qualquer um dos componentes da nitrogenase.

Mutantes *nif*⁻ isolados da linhagem de *A. vine*

landii UW (SHAH *et alii*, 1973) foram analisados bioquimicamente para: atividade dos componentes da nitrogenase por complementação com componentes I e II puros; produção de antissoro para cada componente da nitrogenase (DAVIS *et alii*, 1972); sinais de ressonância eletrônica paramagnética (EPR) proporcionando uma estimativa da quantidade de componente II funcional (NAGATANI *et alii*, 1974) e coloração de ferro após a migração de extratos celulares em géis não desnaturados (BRILL *et alii*, 1974).

De acordo com as características bioquímicas, os mutantes *nif⁻* puderam ser distribuídos em seis grupos:

(a) mutantes regulatórios, tais como UW1 (FISHER e BRILL, 1969) e UW2 (SHAH *et alii*, 1973), que perderam a atividade para ambas as nitrogenases, comprovados por coloração de ferro e teste com antissoro (CRM) (BRILL *et alii*, 1974).

(b) mutantes como UW10 com genes estruturais deficientes para o componente I (subunidade α ou β), que não foi ativado pelo complexo Fe-Mo-Co, mas que produziu componente II ativo (SHAH e BRILL, 1977).

(c) mutantes deficientes no componente I, como UW45, que ao contrário de UW10, pode ser reativado por Fe-Mo-Co (NAGATANI *et alii*, 1974; PIENKOS *et alii*, 1981).

(d) mutantes para o gene estrutural do componente I como o tipo selvagem e uma Fe-proteína inativa (SHAH *et alii*, 1973).

(e) mutantes como o UW38, que superproduziu o componente I e ainda apresentou componente II ativo (SHAH *et alii*, 1974); esta mutação foi mapeada muito próxima da mutação UW6 (BISHOP e BRILL, 1977b), que apresentou o mesmo fenótipo, mas não produziu o componente II. A mesma mutação foi responsável pela superprodução do componente II e ausência do I, o que foi explicado como sendo revertentes espontâneos *nif*⁺ da linhagem UW38.

(f) mutantes que não produziram o componente II e apresentaram baixa atividade do I, como a linhagem UW3.

Mutantes resistentes à rifampicina (PAGE e SADOFF, 1976b), tetraciclina e ácido nalidíxico (CANNON e POSTGATE, 1976) foram obtidos em *A. vinelandii*. No entanto, mutantes auxotróficos têm sido muito difíceis de serem isolados (MISHRA e WYSS, 1969; SADOFF *et alii*, 1971). PAGE e SADOFF (1976b), após tratamento com nitrosoguanidina, isolaram mutantes auxotróficos para hipoxantina, adenina e uracila, porém nenhum para aminoácidos.

De acordo com SADOFF *et alii* (1979), é possível que os aminoácidos não sejam metabolizados em *Azotobacter*, pois estes foram incapazes de crescer em meio contendo

aminoácidos como fonte de nitrogênio. Entretanto, muitos análogos de aminoácidos foram capazes de inibir o crescimento de *A. vinelandii*. Outra possível explicação para a dificuldade em obter auxotróficos para aminoácidos é que esta bactéria pode ter no mínimo 40 cópias de cromossomos por célula. Se isto realmente acontecer, as enzimas necessárias para a biossíntese de aminoácidos são codificadas por genes, tendo muitas cópias por célula, enquanto genes *nif* e os que codificam purinas e pirimidinas têm poucas cópias por célula.

Na fase exponencial de crescimento, cada célula contém quatro corpúsculos nucleares de acordo com observações feitas por WISS e WISS (1950) e SADOFF *et alii* (1971). Entretanto, foi encontrado apenas um corpúsculo nuclear no cisto, o que está de acordo com a segregação nuclear observada no final da fase exponencial de crescimento. Segundo SADOFF *et alii* (1971), estudos de renaturação de DNA, mostraram que o comprimento médio do cromossoma de *Azotobacter* foi similar ao de *E. coli*. No entanto, medidas da quantidade de DNA por célula deram um valor de $3,4 \times 10^{-14}$ gramas por corpúsculo nuclear, isto é, dez vezes mais DNA do que de *E. coli* (SADOFF *et alii*, 1971).

TERZAGHI (1980b), examinando a taxa de sobrevivência de *A. vinelandii* após irradiação com ultra-violeta, observou que esta foi semelhante a de *E. coli*, o que discorda dos dados de que *Azotobacter* possui dez vezes mais DNA por

célula. De acordo com este autor, a maioria das cópias dos cromossomas não são biologicamente funcionais.

Organismos que fixam N_2 em aerobiose, como *Azotobacter*, devem ter um sistema muito eficiente de proteção de sua nitrogenase. BULEN *et alii* (1964) e KELLY (1969a) com provaram que extratos de células de *Azotobacter* são relativa mente estáveis em presença de oxigênio. Foi inicialmente su gerido que a tolerância a este gás foi devido a um particular estado da enzima, mas recentemente, experimentos sugerem a existência de um mecanismo alternativo. OPPENHEIN *et alii* (1970) e OPPENHEIN e MARCUS (1970) propuseram a hipótese de que a proteção contra oxigênio foi devida a uma membrana citoplasmática extra que aparece em organismos crescendo em meios isentos de fontes de nitrogênio.

HAAKER e VEEGER (1977) demonstraram a presença de um fator proteico que forma um complexo estável entre o oxigênio e componentes da nitrogenase. Este fator foi purificado e mostrou ser uma proteína contendo ferro e enxôfre com peso molecular de 24 kd (SHEERINGS *et alii*, 1977). Uma proteína com função semelhante de 14 kd foi purificada de *A. chroococcum* (ROBSON, 1979).

Assim, *Azotobacter* fixa nitrogênio em presença de ar, embora aeração excessiva iniba a atividade da nitrogenase (DALTON e POSTGATE, 1969; LEES e POSTGATE, 1973).

Sensibilidade ao oxigênio foi atribuída a uma adaptação da a tividade respiratória das células ou seja, uma alta atividade respiratória rapidamente reduz O_2 (SMITH *et alii*, 1976), resultando numa baixa concentração interna deste gás. Para manter a alta atividade respiratória, uma fonte de carbono adequada deve ser fornecida. Se o fluxo de elétrons é limitado, há proteção de sua nitrogenase, através da combinação dos componentes I e II com outra proteína Fe-S. A observação de que *A. vinelandii* em excesso de O_2 , consome mais carbono do que o necessário para satisfazer suas necessidades de crescimento, levou PHILLIPS e JOHNSON (1961), citados por ROBSON e POSTGATE (1980), a propor um sistema de respiração com resíduo de O_2 .

Dois mecanismos de proteção da nitrogenase foram propostos de acordo com estas observações: proteção da respiração e uma mudança na conformação da estrutura da nitrogenase (DROZD e POSTGATE, 1970), sendo este último mecanismo devido a um fator estabilizante do oxigênio (ROBSON e POSTGATE, 1980). Além disto, foi demonstrado que a biossíntese da nitrogenase em *A. chroococcum* é reprimida por oxigênio, como em *K. pneumoniae* (ROBSON, 1979, citados por ELME RICH, 1984 e HILL *et alii*, 1981).

Outras características além da aeração, devem ser observadas tais como fonte de nitrogênio e molibdênio. O nitrogênio molecular não é um indutor da biossíntese da ni-

trogenase e amônia parece ser um repressor (DALTON e POSTGATE, 1969). Entretanto, a amônia não é um repressor direto e necessita ser metabolizada, uma vez que a repressão é dada pela metionina sulfoximina, um inibidor da assimilação da amônia (GORDON e BRILL, 1974), estando bem elucidada em inúmeros trabalhos (DALTON e POSTGATE, 1969; DIXON, 1972; RIVERA-ORTEZ e BURRIS, 1975; BERNDT *et alii*, 1976). Assim, a nitrogenase não foi sintetizada quando amônia ou outra fonte de nitrogênio assimilável foi acrescentada ao meio em qualquer das citações.

Quando amônia foi acrescentada em baixas concentrações, houve inibição parcial da atividade da nitrogenase (DROZD *et alii*, 1972; GORDON *et alii*, 1981), o que foi explicada por LAANE *et alii* (1980) como sendo devida a alterações nas propriedades elétricas da membrana. Em bactérias fotossintéticas, esta inibição não foi resultado da modificação covalente no componente II da enzima (ZUMFT *et alii*, 1981, citados por ELMERICH, 1984), ocorrendo modificações deste tipo em *Azospirillum*. Isto foi demonstrado pela necessidade de um fator de ativação em extratos crus de células e ainda a inativação "in vivo" da atividade da nitrogenase após adição de 50 μ M de amônia (LUDDEN *et alii*, 1978).

Em relação ao molibdênio, pode-se dizer que já se reconhece há muito tempo, a sua essencialidade para a fixação de nitrogênio (EADY *et alii*, 1978; NAGATANI e BRILL,

1974). Quando *A. vinelandii* foi crescida em meio deficiente de molibdênio, mas contendo tugstato, esta produziu um componente I inativo, o qual pode ser reativado "in vivo" pela adição de Fe-Mo ao meio de cultura (NAGATANI *et alii*, 1974). Reativação por molibdato também foi conseguida e neste caso, ATP e um fator adicional de baixo peso molecular (entre 2000 e 4000) foi necessário para a reativação (PIENKOS *et alii*, 1981).

Uma proteína contendo molibdênio foi detectada por PIENKOS e BRILL, (1981), tanto em meio de crescimento com ou isento de nitrogênio incorporado. Esta proteína continha dois tipos de subunidades de 21 e 24 kd, com uma organização tetramérica com capacidade de ligação com pelo menos 14 átomos de molibdênio por molécula.

Em trabalhos mais recentes, foi proposto um sistema alternativo de fixação de N_2 . BISHOP *et alii* (1980) obtiveram pseudorevertentes *nif*⁺ a partir das linhagens *nif*⁻ UW6 e UW10 (SHAL *et alii*, 1973), que mantiveram as mutações originais *nif* 6 e *nif* 10 das linhagens parentais. Estes pseudorevertentes apresentaram crescimento em meio isento de nitrogênio incorporado, em taxa menor do que o tipo selvagem e reduziram acetileno 3 a 4% em relação ao controle *nif*⁺. Foram produzidas quatro proteínas amônia-repressoras detectadas por eletroforese. Além disto, foi observada reversão fenotípica para *nif*⁺ de uma série de mutantes *nif*⁻ quando cres-

cido em meio sem molibdênio, mas contendo tungstênio e vanádio (BISHOP *et alii*, 1982). Sob estas condições, os mutantes reduziram acetileno numa baixa taxa, não apresentando porém os sinais típicos de EPR do componente II. Essas observações levaram os autores a propor a existência de um metabolismo alternativo de fixação de nitrogênio em *A. vinelandii* que funciona independentemente da presença de molibdênio da seguinte forma:

1) O sistema alternativo de fixação de N_2 é codificado pelo mesmo grupo de genes *nif* usado para o sistema convencional da nitrogenase e quatro proteínas diferentes se originam após a tradução do conjunto de proteínas, no último sistema.

2) Os genes *nif* para o sistema alternativo são distintos daqueles que codificam para a nitrogenase no sistema convencional.

3) Há possibilidades de que alguns dos genes *nif* estão distribuídos entre ambos os sistemas, enquanto que há outros genes específicos para o sistema alternativo.

O primeiro processo de transformação em *Azotobacter* foi descrito por SEN e SEN (1965), que realizaram transformação interespecífica entre *A. vinelandii* e *A. chroococcum* para produção de pigmento. A partir disto, foram desenvolvidas melhores condições de transformação em *A. vinelandii* uti

lizando marcas genéticas.

PAGE e SADOFF (1976a) desenvolveram um método de transformação em placas de Petri, onde preparações crus de DNA (lisados de células) foram espalhadas diretamente sobre as bactérias receptoras. Deste modo, bactérias não competentes ficaram em contato com o DNA até o estágio de competência ser obtido. Foi conseguida a transformação para prototrofia de inúmeras mutações auxotróficas (uracila, adenina, hipoxantina), *nif*⁻ e rifampicina, estabelecendo-se a ligação gênica entre estas marcas (BISHOP e BRILL, 1977). Verificaram que havia ligação nos genes das linhagens mutantes que perderam simultaneamente os componentes I e II, com o de vários mutantes incapazes de sintetizar o componente I. Pelos resultados, os autores sugerem que os genes *nif* não estão todos no mesmo grupo em *A. vinelandii*, mas não estabeleceram posições mais definidas destes genes, no genoma da bactéria.

Este método em placas, também foi usado para transformar *Azotobacter* com DNA de *Rhizobium*. Neste processo de transformação intergenérico, 10% dos transformantes *nif*⁺ também continham o sítio de ligação a lectina, que especifica a relação entre *Rhizobium* e a planta hospedeira, quando se utilizou a espécie *R. trifolii* (MAIER e BRILL, 1976). No entanto, nenhum transformante foi capaz de nodular com raízes de trevo (MAIER *et alii*, 1978).

Foram também examinados os fatores que influenciam a competência, utilizando o mesmo método da placa, mas o tempo de exposição ao DNA foi controlado pela adição de DNA se (PAGE e SADOFF, 1976b; PAGE e von TIGERSTROM, 1978). Além disto, um meio de crescimento sem adição de ferro foi utilizado para se obter o máximo de competência. Segundo CORBIN e BULEN (1969), a utilização de um meio deficiente em ferro originou o aparecimento de um pigmento fluorescente característico de *A. vinelandii*. Entretanto, produção de pigmento nem sempre esteve associada com competência (PAGE e von TIGERSTROM, 1978). O máximo de competência foi observada em meio isento de ferro quando pelo menos 0,5 mM de cálcio foi adicionado (PAGE e DORAN, 1981). Verificaram também, que a glicose pode ser substituída por outras fontes de carbono, tais como manitol, glicerol ou sacarose.

PAGE e von TIGERSTROM (1979) desenvolveram técnicas especiais para o processo de transformação em *Azotobacter*, onde o meio de incubação requeria pelo menos 8 mM de magnésio, que não pode ser substituído por cálcio. A frequência de transformação em placas ocorreu em torno de $10^{-4}\%$ e em meio líquido variou de 10^{-2} a $10^{-3}\%$. Em relação ao processo de transformação em si, nenhuma característica foi considerada. As proteínas envolvidas na competência foram isoladas a partir de sobrenadantes de culturas de células, onde foi induzida competência em meio isento de ferro (PAGE e DO-

RAN, 1981). Foi isolada uma glicoproteína de 60 kd, correspondente a um envoltório proteico de *A. vinelandii* (SCHENK *et alii*, 1977) e também uma outra proteína essencial na competência, obtida em cultura isenta de cálcio e ferro.

DAVID *et alii* (1981) desenvolveram um método de transformação com plasmídeos, adaptado da técnica de tratamento com CaCl_2 usada para *E. coli* (COHEN *et alii*, 1972). Plasmídeos RP4 (grupo Inc P1) (DATTA e HEDGES, 1971), RS1010 (grupo Inc) (GUERRY *et alii*, 1974) e seus derivados, foram transferidos para *A. vinelandii*. Os transformantes foram estáveis e todas as marcas conferindo resistência a drogas se expressaram. O máximo de frequência de transformação foi $10^{-5}\%$ quando as células receptoras foram tratadas com 0,2M de CaCl_2 .

Além do processo de transformação, vários trabalhos são descritos com relação à transdução. Os azotofagos (fagos de *Azotobacter*) estão distribuídos em cinco grupos sorológicos não relacionados: 4 deles foram identificados por DUFF e WYSS (1961) e o outro por CHUML *et alii* (1960). Todos os fagos isolados formaram placas de lise claras com halos turvos, apresentando diâmetros variados entre eles. Um fago representativo de cada grupo sorológico foi estudado: A14 (Grupo I), A21 (Grupo II), A31 (Grupo III), A41 (Grupo IV) e PAV-1 (Grupo V). Todos os fagos da série A foram isolados da linhagem de *A. vinelandii* O (DUFF e WYSS, 1961; MON

SOUR *et alii*, 1955). Estes fagos se limitaram a infectar *A. vinelandii* e *A. chroococcum* e não formaram placas de lise nos gêneros *Azomonas* e *Beijerinckia*. Porém, esta série de fagos não formou placas de lise em linhagens não capsuladas, tal como a OP. Entretanto, SORGER e TROFIMENKOFF (1970) e BISHOP *et alii* (1977b) isolaram fagos característicos da linhagem OP, e entre estes, o fago PAV-1 que infectou tanto a linhagem O como OP.

Todos os 5 grupos de fagos eram constituídos por DNA de fita dupla com peso molecular de 160 Md para A14 (THOMPSON *et alii*, 1973); 42 Md para A21; 47 Md para A31 (DOMINGO *et alii*, 1972) e 29 Md para PAV-1, e pertenciam a três tipos morfológicos descritos por BRADLEY (1967). Todos os grupos tinham cabeças poliédricas, tipo icosaédricas, e os fagos A21, A41 e PAV-1 tinham pequena cauda não contrátil (KNOVIKA *et alii*, 1972). Os fagos A31 e A14 tinham longa cauda contrátil. Os outros fagos mencionados por FISHER e BRILL (1969) e BISHOP *et alii* (1977b) não foram caracterizados.

Os cinco grupos de fagos não apresentaram lisogenia estável, mas foram responsáveis pela conversão pseudolisogênica de seus hospedeiros (THOMPSON *et alii*, 1980a,b). Foi observado que após a infecção da linhagem de *A. vinelandii* O e posterior plaqueamento dos sobreviventes, houve aparecimento de grande quantidade de colônias rugosas amarelas e

não mucosas, sendo que as células perderam seu revestimento de polissacarídeo, tornando-se flageladas e móveis. As células recombinantes foram semelhantes aos mutantes OP não capsulados (BUSH e WILSON, 1959), os quais foram imunes a outras infecções fágicas, exceto para o fago PAV-1. Segundo THOMPSON *et alii* (1980a), quando essas células cresceram em presença do antissoro fágico, três tipos de resultados foram obtidos: (a) células hospedeiras, capsuladas e ainda sensíveis aos 5 grupos de fagos; (b) "Pseudolisôgenos", fenotipicamente recombinados, produzindo fagos e capazes de segregar com células capsuladas do tipo selvagem; e (c) células recombinantes estáveis, que foram resistentes ao fago A, mas ainda sensíveis ao PAV-1, incapazes de produzir fagos e de segregar células capsuladas do tipo selvagem. Sensibilidade ao fago PAV-1 não foi surpreendente, uma vez que o fago pode infectar tanto células capsuladas como não capsuladas.

A necessidade da cápsula para infecção de fagos do grupo A foi posteriormente confirmada, através da digestão desta, por uma depolimerase, quando então, nenhuma adsorção do fago A21 pode ser detectada. Foram observadas 4 cópias do fago em pseudolisôgenos e menos do que 0,2 cópias em células recombinantes estáveis, o que não pode ser explicado (THOMPSON *et alii*, 1980b).

Transdução com azotofagos foi mencionado inicialmente por WYSS e NIMECK (1962), citados por ELMERICH

(1984), mas nenhuma confirmação foi publicada. Entretanto, BISHOP *et alii* (1977b) isolaram 21 fagos que formaram placas de lise em *A. vinelandii* OP e 8 da linhagem ATCC 12877, mas não observaram transdução entre eles.

Através do estudo de mutantes regulatórios, GORDON e BRILL (1972) sugeriram a existência de um gene regulatório comum que controla a expressão dos genes estruturais da nitrogenase. Isto foi proposto em vista da observação de que entre revertentes da linhagem UW2 (incapaz de sintetizar os componentes da nitrogenase), alguns mostraram ser parcialmente constitutivos.

Para explicar as propriedades da linhagem UW38 (superprodutora do componente II, mas sem o I), SHAH *et alii* (1974) propuseram um gene regulador comum, ao observarem que esse mutante quando desreprimido por oito horas, produziu cerca de cinco vezes mais componentes II. Provavelmente a linhagem UW38 apresentou duas mutações: uma causando super produção do componente II e a outra, incapacidade para sintetizar o componente I. Para testar esta hipótese, foram isolados revertentes espontâneos deste mutante que fixavam nitrogênio, mas apresentando baixas quantidades dos componentes I e II. Isto indicou que uma simples mutação causou o fenótipo da linhagem UW38. Desta forma, segundo os autores, é possível que estes componentes sejam codificados por mais de um operon, tendo operadores que respondem a um simples ativa

dor. Este ativador poderia ser modificado por mutação, de modo que ele não poderia se ligar a um operador do gene especificando o componente I, mas que este mesmo ativador poderia ser mais eficiente na ativação da transcrição do componente II.

Um modelo simplificado desta teoria (Figura 1) foi proposto por BRILL (1976). Neste modelo, há pelo menos dois operons codificando para componentes I e II, havendo possibilidade de que um operon seja necessário para ativar a síntese de cada uma das subunidades do componente I.

O gene *nifC* produz constitutivamente uma proteína ativadora A, que pode existir em duas formas estruturais A' e A''. A forma A' se ligaria ao operador para componente I, mas não para II, podendo haver reversão para A''. Para ocorrer transcrição do gene, o ativador deveria se ligar a um operador. Acúmulo do efetor (por exemplo, NH_4^+) no citoplasma, inativaria a proteína ativadora através de uma mudança na sua conformação para A*, impossibilitando sua interação com o operador, não ocorrendo portanto, síntese de qualquer componente. Este modelo mostra que as mutações UW2 e UW38 estão ligadas no mesmo gene *nifC*.

Em *K. pneumoniae*, onde o processo de regulação dos genes *nif* está bem estudado, dois mecanismos regulatórios foram identificados: um mecanismo específico, que en-

FIGURA 1 - Modelo simplificado para o controle positivo da nifrogenase em *A. vinelandii* - *nifC*, gene controlador; O, operador; I, gene para componente I; II, gene para componente II; A' e A'', proteínas ativadoras; A*, proteína ativadora inativa.

envolve o produto da unidade de transcrição do *nif* LA (o produto do gene A sendo um ativador e o produto do gene *nif* L, um repressor) e o outro é não específico, envolvendo genes *gln* (BUCHANAN-WOLASTON *et alii*, 1980; VOLPON *et alii*, 1981; MERRICK, 1982). ESPIN *et alii* (1982), ainda consideram um possível envolvimento e identificação dos genes análogos a *glnF*, *glnG* e *glnL*, também designados *ntr A*, *ntr B* e *ntr C* em *Azotobacter*.

DIXON *et alii* (1976) estudaram a possibilidade

de de complementação intergenérica usando plasmídios carregando genes *nif* de *K. pneumoniae* introduzidos por conjugação em *Azotobacter*. CANNON e POSTGATE (1976), utilizando o plasmídio pRD1, observou complementação deste com alguns mutantes *nif*⁻ de *A. vinelandii*. A habilidade de *Azotobacter* em transcrever e traduzir genes *nif* de *Klebsiella* fez os autores proporem que o sistema regulatório da síntese de nitrôgeno é comum às duas bactérias, mesmo ao nível molecular. Além disto, genes *nif* de *Klebsiella* normalmente só atuam em ambiente anaeróbico e sua transferência para *Azotobacter* permite expressão em presença de O₂.

A obtenção do plasmídio pCK1 carregando o gene *nifA* de *K. pneumoniae* foi conseguida por KENNEDY e ROBSON (1983) e quando introduzido em *A. vinelandii* ou *A. chroococcum* selvagem, conferiu a capacidade de fixar nitrogênio em presença de amônia. Assim, o papel do efetor positivo do gene *nifA* demonstrado em *K. pneumoniae*, pode ser expresso em *Azotobacter*. Entretanto, mutantes regulatórios *nif*⁻ de *A. vinelandii* e *A. chroococcum*, tal como UW1, também fixaram nitrogênio em presença de amônia, quando receberam o pCK1. Foi ainda proposta a existência de um gene regulatório em *Azotobacter*, análogo ao *nifA* de *K. pneumoniae*; e como *nifA* também apareceu como sendo um ativador da fusão *nifH-lac* de *R. meliloti* em *E. coli*, SUNDARESAN *et alii* (1983) sugeriram que a atividade do gene A deve ser comum entre os fixadores de nitrogênio.

O estudo de outras espécies de *Azotobacter*, tal como *A. beijerincki* e *A. paspali* ainda é inicial. Alguns trabalhos sobre *A. paspali* devem ser mencionados, principalmente considerando a associação desta com a rizosfera de *Paspalum notatum* (grama batatais). Esta associação, segundo DOBEREINER (1977), é estimulada pela excreção de carboidratos pela planta e amônia por *Azotobacter*.

A primeira citação a respeito de *A. paspali* foi feita por DOBEREINER (1966), quando esta espécie foi descrita e classificada. Neste trabalho, foi encontrada a bactéria em 75 amostras de solo da rizosfera de *P. notatum*. MACHADO e DOBEREINER (1969) fizeram vários experimentos para elucidar melhor a especificidade do efeito de *P. notatum* sobre o desenvolvimento de *A. paspali*, além de estudar outras características como efeito do pH e a natureza química do exsudato liberado pelas raízes da grama.

Vários trabalhos com *A. paspali* são citados na literatura, visando maior esclarecimento sobre a associação entre grama-batatais - *A. paspali* (DOBEREINER *et alii*, 1972, 1973; DOBEREINER, 1973; NEYRA e DOBEREINER, 1977; EVANS e BARBER, 1977; FRANCO *et alii*, 1978; WEIR, 1980; BODDEY *et alii*, 1983).

BAREA e BROWN (1975) e BROWN (1976) mostraram que em solução nutritiva, o tratamento de raízes de plântu-

las com cultura de *A. paspali*, apresentaram um melhor crescimento e aumento de peso foliar do que o controle sem inoculação. Este efeito foi causado por reguladores de crescimento tais como ácido indol-acético, giberelinas e citoquininas, encontrados no sobrenadante. A atividade da nitrogenase não foi detectada na rizosfera de plantas jovens e sua ocorrência em plantas velhas não foi associada necessariamente com a presença de *A. paspali*. Além disto, foi maior na rizosfera de plantas-controle do que em plantas inoculadas.

Em todos estes trabalhos, nenhuma menção foi feita a respeito da genética da fixação de nitrogênio por *A. paspali*.

2.3. Ocorrência de plasmídios em bactérias fixadoras de nitrogênio

A ocorrência de plasmídios tem sido descrita em várias espécies de bactérias fixadoras de N_2 , tanto simbióticas (*Rhizobium*) quanto em assimbióticas (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*).

FRANCHE *et alii* (1981) e FRANCHE e ELMERICH (1981) observaram a presença de 1 a 5 plasmídios em várias linhagens de *Azospirillum* com peso molecular variando de 3,5 a 300 Md. Nestes casos, nenhuma relação entre os plasmídios

e as propriedades fenotípicas, em especial a fixação de N_2 , foi estabelecida. Em alguns casos, estes plasmídios foram purificados em gradiente de césio e foi feita a análise de restrição. Os dois grupos taxonômicos *A. brasilense* e *A. lipoferum* não apresentaram diferenças com relação à quantidade de plasmídios. Foi observada a perda de alguns plasmídios de modo espontâneo e também através de tratamento com agentes de "cura" como temperatura de $44^{\circ}C$ e acridina laranja. Alterações fenotípicas, tais como utilização de glicose, resistência a metais pesados ou perda da capacidade de fixação de N_2 , foram observadas após a perda de alguns plasmídios (LE-MOS, 1980 e WOOD *et alii*, 1982, citados por ELMERICH, 1984).

Em *Rhizobium*, alguns genes envolvidos na nitrógenase bem como na simbiose, têm sido detectados em grandes plasmídios com peso molecular entre 70 a 200 Md (TSHITENGE *et alii*, 1975; NUTI *et alii*, 1977; BAFALVI *et alii*, 1981 e ROSEMBERG *et alii*, 1981). CASSE *et alii* (1979) isolaram 25 linhagens de *R. meliloti* de origens geográficas diferentes, das quais 22 carregavam pelo menos um grande plasmídio. Resultados similares foram encontrados por GROSS *et alii* (1979) onde classificaram várias espécies de *R. japonicum* em 4 grupos com base nas diferenças de número e tamanho dos plasmídios, contendo esses grupos de 2 a 4 plasmídios por célula, com pesos moleculares variando entre 40 a 120 Md.

BISHOP *et alii* (1977a) observaram que *R. tri-folii* tinha genes para fixação de N_2 num plasmídio, que também carregava genes para o polissacarídeo que se liga à lectina, mostrando assim, que genes importantes neste processo, estão relacionados com herança extracromossômica. Foi ainda demonstrado, que muitas funções simbióticas são codificadas por genes contidos em plasmídios e que a instabilidade de nodulação apresentada por muitas linhagens se deve à perda desses plasmídios (HIGASHI, 1967; JOHNSTON *et alii*, 1978; ZURKOWSKI e LORKIEWICZ, 1979; BEYNON *et alii*, 1980; BREWIN *et alii*, 1980; ZURKOWSKI, 1981).

Várias espécies de *Azotobacter*, como *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii* e *A. paspali*, foram avaliadas quanto à presença de plasmídios. A maioria delas continham plasmídios de 10 a 100 Md, exceto para *A. vinelandii* O e OP que não continham nenhum. Uma linhagem de *A. chroococcum*, não mucosa, continha 5 plasmídios com 7, 45, 50, 80 e 115 Md. Estas espécies não apresentaram resistência a metais ou antibióticos e não foi verificado antagonismo com outras espécies de *Azotobacter*, com relação à produção de bacteriocinas ou fagos. Algumas destas, perderam o plasmídio após tratamento com acriflavina e continuaram a fixar N_2 .

O plasmídio pSA30, isolado por CANNON *et alii* (1979), citado por AUSUBEL (1980), continha o fragmento de 6,2 kb obtido com a enzima de restrição Eco R1, composto pelos

genes *nif* HDKY e parte do *nif* E de *K. pneumoniae*. Usando este fragmento como uma prova de hibridação, foi detectada homologia com DNA total de um grande número de organismos fixadores de nitrogênio, inclusive *A. vinelandii* (RUVKUN e AUSUBEL, 1980; MAZUR *et alii*, 1980).

Em experimentos iniciais com *A. vinelandii*, 5 fragmentos de restrição EcoR1 com 12,5, 8,1, 3,5, 2,2 e 0,8 kb hibridizaram com o padrão *nif* descrito acima. Homologia foi limitada aos genes *nif* H e *nif* D de *K. pneumoniae* e não ficou esclarecido porque somente fragmentos EcoR1 hibridizaram com o padrão. Isto poderia ser explicado pela existência de pseudogenes, como descrito em *Anabaena* (RICE *et alii*, 1982), ou pela reiteração do gene *nif*, como em *Rhizobium phaseoli* (QUINTO *et alii*, 1982).

Outra hipótese também sugerida por BISHOP *et alii* (1980) seria a de um metabolismo alternativo para a fixação de nitrogênio, conforme já citado anteriormente. Entretanto, mais recentemente, BISHOP e BOTT (1983) detectaram somente três fragmentos de restrição EcoR1 de 1,4, 2,6 e 4,1 kb que hibridizaram com o padrão *nif* p5A30. O fragmento de 4,1 kb foi clonado no plasmídeo pBR325 para produzir plasmídios pBL1 e pBL3. O plasmídeo pBL1 apresentou homologia com genes *nif* K, e *nif* D e pBL3, com *nif* D e possivelmente *nif* H. Os dois fragmentos *nif* estavam adjacentes ao cromossoma e os resultados coincidiram com os obtidos por KROL *et alii* (1981).

Estes autores analisaram híbridos *nif* e propuseram a existência de um operon *nif* HDK em *A. vinelandii* como demonstrado para *K. pneumoniae*, utilizando as mesmas técnicas.

Grandes plasmídios isolados de linhagens de *R. leguminosarum*, *R. trifolii* e *R. phaseoli*, hibridizaram com parte dos genes *nif* de *K. pneumoniae*, ao contrário de *R. meliloti* que não hibridizou.

Com o intuito de se verificar a mobilização e expressão de plasmídios entre diferentes espécies de bactérias, vários sistemas de clonagem carregando genes *nif* foram construídos. Plasmídios Inc P-1 foram transferidos por conjugação para *Azotobacter* e *Azospirillum* e RP4 introduzido por transformação em *Azotobacter* (POLSINELLI *et alii*, 1980; DAVID *et alii*, 1981). Em um derivado do plasmídio RK2, designado como pRK290, apresentando resistência à tetraciclina e com um único sítio de restrição para EcoR1 e Bgl II, foi clonado um segmento *nif* de *Azospirillum*. Este plasmídio foi transferido para *Azospirillum*, onde se manteve estável (DITTA *et alii*, 1980).

O plasmídio RSF 1010 e seus derivados puderam ser mobilizados para *E. coli* e outras Gram negativas, incluindo *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Rhizobium* e *Azospirillum* (GUERRY *et alii*, 1974; DAVID *et alii*, 1981). Um derivado do RSF 1010, denominado pKT230, foi utilizado para clonar o gene *nifA*

de *Klebsiella*, o qual foi posteriormente transferido para *Azotobacter* (KENNEDY e ROBSON, 1983).

Plasmídios pRK290, pLAFR1, PKT230 e pSUP106 foram utilizados na construção de bancos de genes de *Azotobacter* e *Azospirillum* e armazenados em *E. coli* (FRIEDMAN *et alii*, 1982). Os clones obtidos puderam ser analisados por complementação após conjugação com uma série de mutantes de *Azotobacter* e *Azospirillum*.

Os plasmídios pLAFR1 e pSUP106 foram úteis na clonagem de genes de *R. meliloti* (FRIEDMAN *et alii*, 1982). No entanto, um procedimento alternativo foi desenvolvido por DAVID *et alii* (1981) que transferiram plasmídios de *Rhizobium* diretamente para *Azotobacter*. Para isto, se basearam em observações anteriores de PAGE (1977), onde DNA de *Rhizobium* transformou mutantes *nif*⁻ de *Azotobacter*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras bacterianas utilizadas

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho são de várias procedências (Escola Paulista de Medicina, Centro de Biotecnologia - RGS, Laboratório de Microbiologia do Solo/ESALQ-USP, Seção de Microbiologia/CENA-USP) e no decorrer dos experimentos foram isoladas algumas linhagens do solo.

A descrição destas linhagens e procedências são apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1 - Características e procedências das linhagens bacterianas utilizadas.

Linhagem	Característica	Procedência
<i>Escherichia coli</i> K12	portadora do plasmí- dio Rldrd19, com mar- cas de resistência para estreptomicina, ampicilina e cloran- fenicol.	Escola Paulista de Medicina
<i>Escherichia coli</i> K12	portadora do plasmí- dio Sa, com marcas de resistência para estre- ptomicina, cloranfeni- col e canamicina	Escola Paulista de Medicina
<i>Escherichia coli</i> K12 - HB101	leu ⁻ pro ⁻ , tendo re- vertido as marcas lac, B1 e provavel- mente recA. Sem me- canismos de restri- ção e modificação	Escola Paulista de Medicina
<i>Escherichia coli</i> K12 - 711	lac ⁻ his ⁻ trip ⁻ pro ⁻ fen ⁻ e resistente ao ácido nalidixico	Escola Paulista de Medicina
<i>Escherichia coli</i> K12 - C600	lac ⁻ tim ⁻ treo ⁻ leu ⁻ B ₁ . Sem mecanismo de restrição e modifi- cação	Escola Paulista de Medicina
<i>Escherichia coli</i> K12 - CA77	lac ⁻ , mutante Hfr (plasmídeo F inserido no cromossoma), tendo revertido a marca B ₁	Escola Paulista de Medicina
<i>Escherichia coli</i> K12 - pcBT01/HB101	portadora do plasmí- dio R621a contendo o Tn5, com marcas de re- sistência para tetra- ciclina e canamicina	Centro de Biotecnologia Universidade Federal - RGS
<i>Azospirillum brasi- lense</i> sp7	fixadora livre de N ₂	Centro de Biotecnologia Universidade Federal - RGS

continua

(continuação da Tabela 1)

Linhagem	Característica	Procedência
<i>Azotobacter vine-</i> <i>landii</i> ATCC 478	fixadoras livres de N ₂	Seção de Mi- crobiologia do Solo CENA/USP
<i>Azotobacter vine-</i> <i>landii</i> OP		
<i>Azotobacter chroo-</i> <i>coccum</i>		
isolados 80-IV 80-2 III 40-1 2-2 II 22-1 74-1 LAMS 40-1 IV	ficadoras livres de N ₂	Laboratório de Microbio- logia do So- lo - Depto. de Solos, Geo- logia e Fer- tilizantes ESALQ/USP
isolados 12B 13-2 20-AM 5-3 9 22	fixadoras livres de N ₂	este traba- lho

3.2. Meios de cultura e soluções

3.2.1. Caldo nutriente

extrato de carne: 3,0 g

peptona: 5,0 g

água destilada: 1000 ml

3.2.2. Nutriente Agar (NA)

Ao caldo nutriente, descrito no item anterior, foram acrescentados 15 g de agar por litro de meio.

3.2.3. Meio mínimo de *E. coli* (MMEC)

(SANTOS e AFFONSO, 1982)

KH_2PO_4 : 3,0 g

K_2HPO_4 : 7,0 g

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 1,0 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 2,0 g

citrato de sódio: 0,5 g

glicose: 5,0 g

agar: 15,0 g

água destilada: 1000 ml

O meio foi suplementado com aminoácidos e ácidos nucleicos (40 µg/ml) ou vitaminas (10 µg/ml) quando necessário, conforme as deficiências apresentadas pela linhagem utilizada.

3.2.4. Meio mínimo de *E. coli* sem nitrogênio (MMEC s/N)

Este meio foi preparado de modo idêntico ao meio mínimo de *E. coli* (item 3.2.3), mas não foi adicionada a fonte de nitrogênio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

3.2.5. Meio YEPD

peptona: 20,0 g

extrato de levedura: 10,0 g

sacarose: 20,0 g

agar: 15,0 g

água destilada: 1000 ml

3.2.6. Meio mínimo de levedura de WICKERHAM

KH_2PO_4 : 10,0 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 5,0 g

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 1,0 g

NaCl : 1,0 g

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 3,0 g

glicose: 20,0 g

agar: 15,0 g

água destilada: 1000 ml

3.2.7. Meio mínimo para regeneração de protoplastos de leveduras

Ao meio mínimo descrito no item 3.2.6, foi acrescentado sorbitol, na concentração final de 1M.

3.2.8. Agar manitol (NORRIS e RIBBONS, 1970)

K_2HPO_4 : 10,0 g

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,5 g

manitol: 10,0 g

Na_2MoO_4 : 0,002 g

$FeCl_3$: 0,02 g

agar: 15,0 g

água destilada: 1000 ml

pH: 7,4

3.2.9. Meio LG (BECKING, 1962)

K_2HPO_4 : 1,0 g

$CaCl_2$: 0,02 g

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,2 g

Na_2MoO_4 : 0,002 g

$FeCl_3$: 0,02 g

sacarose: 20,0 g

$CaCO_3$: 2,0 g

sol. alcoólica de bromotimol 0,5%: 2,5 ml

agar: 15,0 g

água destilada: 1000 ml

pH: 7,5

3.2.10. Meio LGN

Ao meio LG, descrito no item anterior, foi a acrescentado 1,0 g de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ por litro de meio.

3.2.11. Meio de Burk (STRANDBERG e WILSON, 1967)

K_2HPO_4 : 0,8 g

KH_2PO_4 : 0,2 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2 g

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,09 g

FeSO_4 : 0,03 g

Na_2MoO_4 : 0,02 g

glicose: 20,0 g

água destilada: 1000 ml

pH: 7,5

3.2.12. Meio para indução de competência (oFe + N)

(PAGE, 1982)

Ao meio Burk (item 3.2.11) foram adicionados 40 $\mu\text{g/ml}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e o sulfato ferroso (FeSO_4) e cloreto de cálcio não foram adicionados.

3.2.13. Meio para *Beijerinckia* (LGB) (BECKING, 1962)

K_2HPO_4 : 0,8 g
 KH_2PO_4 : 0,2 g
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,5 g
 $FeCl_3$: 0,025 g
 $MnSO_4$: 0,002 g
 $ZnSO_4$: 0,005 g
 $CuSO_4$: 0,004 g
glicose: 20,0 g
agar: 15,0 g
água destilada: 1000 ml
pH: 6,4

3.2.14. Meio mínimo de DAVIS modificado (LEMOS, 1980)

KH_2PO_4 : 0,3 g
 K_2HPO_4 : 0,7 g
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,01 g
citrato de sódio: 0,05 g
succinato de sódio: 0,1 g
agar: 15,0 g
água destilada: 1000 ml
pH: 7,0

3.2.15. Tampão TEB

tris-OH: 10,8 g

Na₂ EDTA: 0,93 g

H₃BO₃: 5,5 g

água desmineralizada: 1000 ml

pH: 8,2

3.2.16. Tampão E (tris-acetato)

tris-OH: 4,8 g

Na₂ EDTA: 0,75 g

água desmineralizada: 1000 ml

pH: 8,0

3.2.17. Tampão de amostra

azul de bromofenol: 0,05 g

Ficoll: 3,0 g

tampão tris-acetato (item 3.2.16): 20,0 ml

3.2.18. Tampão SSC

NaCl: 8,7 g

citrato de sódio: 0,015M

água desmineralizada: 1000 ml

3.2.19. Tampão sorbitol-fosfato (TSP)

solução A ($0,2\text{M Na}_2\text{HPO}_4$): 217,5 ml

solução B ($0,2\text{M NaH}_2\text{PO}_4$): 32,5 ml

sorbitol: 1M

água destilada: 500 ml

3.2.20. Tampão Burk

Ao meio Burk (item 3.2.11) sem sacarose, adicionou-se 1,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e o pH foi ajustado para 7,0, com solução de HCl 0,1N.

3.2.21. Mistura litica

Ficoll: 10,0 g

Na_2 EDTA: 0,19 g

lisozima: 25 mg

azul de bromofenol: 2,5 mg

sol. RNase (em tampão acetato de sódio): 50 μl

TEB (item 3.2.15): 50 ml

3.2.22. Solução de SDS - Ficoll 10%

SDS: 0,2 g

Ficoll: 10,0 g

TEB (item 3.2.15): 100 ml

3.2.23. Solução de SDS - Ficoll 5%

SDS: 0,2 g

Ficoll: 5,0 g

TEB (item 3.2.15): 100 ml

3.2.24. Solução detergente

SDS: 3,0 g

Na₂EDTA: 3,7 g

sol. Tris 40 mM: 100 ml

O pH foi ajustado para 12,6 com NaOH 8N e a so
lução filtrada em filtro Milipore (0,45 µm).

3.2.25. Solução tris-HCl 2M

tris: 4,8 g

água destilada: 200 ml

pH: 6,0, ajustado com HCl 1N

3.2.26. Solução tris-HCl 0,05M

tris: 3,0 g

água destilada: 500 ml

pH: 8,0, ajustado com HCl 0,1N

3.2.27. Solução acetato pH 4,4

solução A: 1,2 ml de ácido acético
100 ml de água destilada

solução B: 1,64 g de acetato de sódio
100 ml de água destilada

Na preparação de 25 ml de solução acetato foram misturados 12,75 ml da solução A com 12,25 ml da solução B.

3.2.28. Antibióticos

Foram utilizados os antibióticos ampicilina (Bayer), tetraciclina (Bristol), cloranfenicol (Carlo Erba) e canamicina (Bristol). As soluções, cujas concentrações variaram de acordo com o experimento, foram preparadas momentos antes do seu uso e adicionadas ao meio de cultura após a autoclavagem, quando o meio se encontrava a uma temperatura em torno de 45°C.

3.2.29. Solução de purinas e pirimidinas

Foram preparadas soluções individuais contendo bases nitrogenadas (adenina, citosina, timina, guanina e uracila) nas concentrações de 100 µg/ml.

3.2.30. Solução de vitaminas

Foram também preparadas soluções individuais de vitaminas (ácido fólico, biotina, pantotenato de cálcio, inositol, nicotinamida, ácido paraminobenzóico, piridoxina, tiamina e riboflavina) nas concentrações de 100 µg/ml.

3.2.31. Solução de aminoácidos

Soluções de cada um dos seguintes aminoácidos foram preparadas (prolina, arginina, lisina, triptofano, metionina, histidina, isoleucina, glutamina, homoserina, treonina, cistina) nas concentrações de 100 µg/ml.

3.3. Isolamento de bactérias assimbióticas do solo fixadoras de nitrogênio

Além das linhagens bacterianas fixadoras de nitrogênio cedidas por vários laboratórios (item 3.1), isolou-se outras a partir de amostras de solos. Para isto, foram utilizados solos de várias procedências (Piracicaba, Botucatu e São Carlos) com características físico-químicas diferentes. Nesta seleção, utilizou-se os métodos propostos por THOMAS (1960) e NORRIS e RIBBONS (1970), que consiste no enriquecimento do solo com meio de cultura líquido isento de ni-

trogênio incorporado (meios LG, Davis, Manitol e Burk); a mistura assim preparada, foi colocada diretamente em placa de Petri e as colônias bacterianas obtidas dessa forma, foram purificadas nos meios correspondentes, na forma sólida.

3.4. Verificação da ocorrência de plasmídios das bactérias fixadoras de nitrogênio

Dois métodos de eletroforese em gel de agarose foram utilizados para verificação da ocorrência de plasmídios em bactérias.

3.4.1. 1º método (SANTOS e AFFONSO, 1982)

As amostras bacterianas foram semeadas por 48 horas a 30°C em meios de cultura isentos de nitrogênio, de acordo com suas exigências. As linhagens de *E. coli* com plasmídios de peso molecular conhecido, que serviram como padrões foram crescidas em caldo nutriente por 24 horas a 37°C. A seguir, as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes em tampão TEB. Após terem sido ressuspensas em 100 µl de tampão TEB, foram acrescentados 30 µl da mistura litica; 50 µl foram transferidos para a canaleta do gel (agarose 0,8% em tampão TEB). A lise foi realizada na canaleta com a adição de 30 µl de solução SDS - Ficoll 10%; após a mistura das duas

camadas com um palito, foram acrescentados 100 µl de solução SDS - Ficoll 5%.

As canaletas das placas de gel foram seladas com agarose e o tampão TEB foi usado para preencher os compartimentos do aparelho para eletroforese vertical. Fez-se uma corrida inicial de 45 minutos com uma corrente elétrica de 2 mA e a seguir foi alterada para 45 mA. A corrida foi interrompida quando o corante chegou ao outro extremo da placa. Terminada a migração, fez-se a coloração do gel com brometo de etídio (1 µg/ml em TEB) por 30 minutos e a observação das bandas no gel foi feita em lâmpada ultra-violeta de ondas curtas.

3.4.2. 2º método (KADO e LIU, 1981, modificado)

O crescimento das células bacterianas foi feito de modo idêntico ao método anterior (3.4.1). Após a centrifugação e lavagem por duas vezes em tampão E, as células foram ressuspensas no mesmo tampão, acrescido de 15 µg/ml de RNase.

Foram transferidos 50 µl dessa mistura sobre 300 µl de solução detergente previamente colocada em um tubo. Após uma agitação suave, a mistura foi colocada a 60°C por 30 minutos e, em seguida, resfriada, sendo adicionados 20 µl de tris-HCl 0,05M e 0,5 ml de uma solução fenol-cloro-

fórmio 1:1. Em seguida, fez-se a centrifugação e coletou-se 50 μ l da fase aquosa, adicionando-se 10 μ l do tampão de amostra, sendo a mistura transferida para a canaleta do gel de agarose (0,8% em tampão E).

As câmaras da cuba de eletroforese foram preenchidas com tampão E e as etapas seguintes foram semelhantes às utilizadas no primeiro método citado.

3.5. Amplificação de plasmídios

Linhagens fixadoras de N_2 foram desenvolvidas em meio contendo nitrogênio incorporado, acrescido de 50 μ g de caseína hidrol. até o final da fase exponencial de crescimento. A incubação foi a 30°C por 72 horas; a seguir, foi acrescentada 0,5 ml de solução de cloranfenicol (50 mg/ml), deixando-se nesta condição por 20 horas. Após este tratamento, as células foram analisadas para ocorrência de plasmídios (item 3.4).

3.6. Estimativa dos pesos moleculares dos plasmídios de linhagens fixadoras de N_2

Na estimativa dos pesos moleculares dos plas-

mídios das amostras bacterianas, utilizou-se o método proposto por MEYERS *et alii* (1976). Este se baseia na comparação da migração em eletroforese em gel de agarose dos plasmídios em estudo, com a migração de plasmídios de pesos moleculares já conhecidos. As linhagens padrões utilizadas foram as de *E. coli* com os plasmídios Rldrd19, Sa e p307.

3.7. Eliminação de plasmídios das linhagens fixadoras de

N₂

As linhagens que comprovadamente mostraram a presença de plasmídios (através da técnica de eletroforese, item 3.4), foram submetidas aos tratamentos com agentes de "cura", com a finalidade de se eliminar esses plasmídios. Para isso, utilizou-se dos métodos descritos a seguir e a porcentagem de eliminação foi calculada como o número de colônias, que eliminaram o plasmídio, em relação ao total de colônias submetidas ao tratamento. Nos casos onde se conseguiu esse intento, as células foram posteriormente ensaiadas para a verificação de uma possível alteração no processo de fixação de N₂, pela verificação do seu crescimento em meio sem nitrogênio incorporado.

3.7.1. Tratamento com brometo de etidio, acridinalaranja e acriflavina

Culturas de linhagens portadoras de plasmídeo foram semeadas em frascos contendo meio líquido com concentrações variando de 2 a 50 µg/ml de brometo de etidio, acridina orange ou acriflavina. Após 24 horas de incubação sob agitação, foram selecionadas as culturas que se desenvolveram em concentrações sub inibitórias dos agentes citados. Estas foram diluídas convenientemente e semeadas em placas contendo o meio de cultura propício para cada linhagem, acrescido da fonte de nitrogênio, incubando-se a 30°C por 48 horas.

A seguir, as colônias foram ensaiadas para se verificar a possível presença de segregantes *nif⁻* (incapazes de fixar N₂) e para isso se utilizou da técnica da réplica em veludo (LEDERBERG e LEDERBERG, 1952) para meios com e sem nitrogênio incorporado. A comprovação da perda dos plasmídios foi feita através da eletroforese em gel de agarose.

3.7.2. Tratamento pelo calor

Neste procedimento, culturas de linhagens portadoras de plasmídeo, foram semeadas em meio líquido e incubadas a 42 - 44°C, sem agitação. Decorridas 24 horas, estas foram diluídas e semeadas em meio sólido, seguindo-se o mesmo roteiro já descrito no item 3.7.1 para a seleção de segre

gantes *nif⁻*.

3.8. Identificação taxonômica do isolado bacteriano 9

A fim de se proceder posteriormente um estudo genético do isolado 9 (item 3.3), uma bactéria fixadora de N_2 assimbiótica não portadora de plasmídeo, fez-se inicialmente a identificação quanto ao gênero e espécie. Para isto, foram seguidos os critérios de classificação citados por BECKING (1962), DOBEREINER (1966) e BREED *et alii* (1974).

3.9. Determinação do nível de resistência do isolado 9 a antibióticos

Foram preparadas placas de Petri contendo o meio LGN mais um dos antibióticos ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol ou canamicina em concentrações variando de 0 a 200 $\mu\text{g/ml}$. Em cada uma destas placas, foi semeada uma alíquota da cultura bacteriana do isolado 9, desenvolvida a 30°C por 24 horas em LGN líquido.

Após a incubação das placas por 72 horas a 30°C, foi observado o crescimento e considerou-se como nível de resistência a concentração da droga imediatamente inferior àquela que impedia o crescimento da cultura bacteriana. A

viabilidade das células foi observada inoculando-se no mesmo meio, isento da droga.

3.10. Curva de sobrevivência do isolado 9 à radiação ultra-violeta

Uma cultura de células desenvolvida a 30°C por 72 horas em 10 ml de LGN líquido foi centrifugada a 12000 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram suspensas em solução salina. A seguir, fez-se a irradiação com luz ultra-violeta durante 30, 60, 90, 150, 240 e 300 segundos e após cada tempo de exposição, semeou-se em placas contendo meio LGN, incubando-se por 72 horas a 30°C. Posteriormente, as colônias foram contadas e comparadas com o número de colônias não submetidas à irradiação (controle).

3.11. Curva de sobrevivência do isolado 9 ao tratamento com ácido nitroso

Uma cultura de células desenvolvida a 30°C por 72 horas em 10 ml de LGN, foi centrifugada a 12000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram suspensas em solução salina. A seguir, semeou-se 0,5 ml dessa suspensão de células em tubos contendo 0,33 ml de solução

nitrito de sódio 0,5M e 9,17 ml da solução acetato pH 4,4, seguindo-se a incubação a 30°C. Amostras de células destes tubos foram retiradas após 4, 8, 12, 16 e 20 minutos e semeadas em placas contendo LGN, incubando-se por 72 horas a 30°C. Posteriormente, as colônias foram contadas e comparadas com o número de células do controle, sem tratamento.

3.12. Obtenção de mutantes *nif*⁻ no isolado 9, através da irradiação com luz ultra-violeta e tratamento com ácido nitroso

Como no item anterior, uma suspensão de células foi centrifugada, o sobrenadante foi desprezado e a seguir, irradiada com luz ultra-violeta por 2 minutos ou tratada com ácido nitroso por 8 minutos. Após esse tempo de exposição, semeou-se alíquotas de células diluídas convenientemente, em placas contendo meio LGN.

As colônias que cresceram nestas condições foram replicadas para placas com LG e LGN. Após a confirmação da mutação, foram selecionadas células *nif*⁻.

3.13. Auxanografia dos mutantes *nif*⁻

Os mutantes *nif*⁻ obtidos no item 3.12, foram

ensaiados quando à ocorrência de uma mutação auxotrófica. Assim, estes foram inoculados em LGN líquido e semeados em placas contendo: LG + solução de aminoácidos, LG + solução de vitaminas e LG + solução de ácidos nucleicos.

Após a incubação a 30°C por 48 horas, observou-se o crescimento, comparando-se com o meio LG sem os requerimentos. Nos casos onde houve crescimento de colônias apenas no meio LG suplementado, estas foram confirmadas para auxotrofia para cada um dos componentes individualmente, da solução em questão.

3.14. Isolamento de mutantes resistentes a antibióticos

As linhagens mutantes *nif⁻* e o isolado 9 foram ensaiadas com o objetivo de se selecionar células resistentes a drogas, a serem utilizadas em experimentos posteriores. Para isto foram observados os dados obtidos do experimento descrito no item 3.9 sobre o nível de resistência do isolado 9, em relação a antibióticos.

Inicialmente foram desenvolvidas culturas bacterianas em meio LGN líquido por 48 horas a 30°C, das quais se transferiu uma alíquota para placas contendo LG ou LGN + 2 µg/ml de tetraciclina. O mesmo procedimento foi seguido para os outros antibióticos, excetuando-se as concentrações

empregadas que foram 5, 20 e 50 µg/ml de canamicina, cloranfenicol e ampicilina, respectivamente. Após a incubação de 72 horas a 30°C, isolou-se as colônias que se desenvolveram nessas condições.

3.15. Extração de DNA total do isolado 9 e mutantes *nif*⁻

Foram extraídos o DNA de culturas de células de mutantes *nif*⁻ e isolado 9 resistentes a ampicilina e isolado 9 selvagem. Desta forma, as amostras foram desenvolvidas em 100 ml de LGN e centrifugadas a 12000 g por 15 minutos. As células foram suspensas em 5 ml de tris-HCl 0,05M (pH 8,0), centrifugadas novamente, sendo ressuspensas em 8 ml de sacarose 25% (em tris-HCl 0,05M) contendo lisozima (10 mg/ml) e mais 2 ml de EDTA 0,5M pH 8,2 (em tris-HCl 0,05M).

Fez-se uma incubação por 10 minutos a 25°C e acrescentou-se 1 ml de SDS 10%, deixando-se durante 30 minutos a 60°C. A seguir, foi adicionada uma solução clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), em um volume igual ao volume total do tubo, agitando-se lentamente até a formação de emulsão homogênea. Centrifugou-se a 14000 g por 20 minutos e transferiu-se a fase aquosa superior para outro tubo, onde se adicionou 2 volumes de etanol gelado (≈ -5°C). Após a centrifugação (5000 rpm - 10 minutos), fez-se a secagem à vácuo do álcool remanescente e adicionou-se 1 ml de tampão SSC; se-

guindo-se a dissolução dos ácidos nucleicos, foi colocada solução de RNase até atingir a concentração de 50 µg/ml. A seguir, foram repetidos os passos descritos após a colocação da solução clorofórmio-isoamilico, finalizando-se com a dissolução do DNA em tampão SSC. A determinação da concentração de DNA obtida, foi feita em espectrofotômetro Beckman modelo DB, em 260 nm.

3.16. Experimentos de transformação utilizando o DNA do isolado 9 e dos mutantes *nif*⁻

Foram realizados quatro experimentos de transformação descritos a seguir, utilizando-se como linhagens receptoras os mutantes *nif*⁻ da linhagem 9, linhagens de *E. coli* (C600, HB101, 711, CA77, Sa) e levedura *Saccharomyces cerevi*siae (X 2180 - Yeast Stock Center - Universidade da Califórnia, Berkeley).

3.16.1. Transformação interespecífica entre mutantes *nif*⁻ e DNA do isolado 9 (PAGE, 1982, modificado)

Os mutantes *nif*⁻ foram crescidos em meio para indução de competência (OFe + N) por 24 horas a 30°C. Cerca de 50 µl de células competentes (2 x 10⁷ células/ml) foram colocadas em 0,3 ml de tampão Burk e acrescentou-se 2,0 µg de

DNA da linhagem 9. Após 2 horas de incubação a 30°C, a mistura foi semeada nos meios Burk e LGN com e sem o acréscimo de 50 µl/ml de ampicilina, incubando-se por 72 horas a 30°C.

A frequência de transformação foi calculada como o número de transformantes *nif*⁺ em relação ao número total de células receptoras utilizadas. O DNA foi ensaiado para se verificar a esterilidade em meio Burk e cada uma das linhagens mutantes *nif*⁻ também foi ensaiada a fim de se observar possível reversão.

3.16.2. Transformação entre mutantes *nif*⁻

Os mutantes *nif*⁻ 1 a *nif*⁻ 5 foram crescidos em meio para indução de competência por 24 horas a 30°C, e as células foram preparadas conforme descrito no item 3.16.1. Para cada uma das culturas *nif*⁻, foram feitos ensaios envolvendo sua transformação com o DNA isolado de cada um dos mutantes *nif*⁻ e resistentes a ampicilina. A seleção dos transformantes foi feita nos meios Burk e LGN com e sem acréscimo de 50 µg/ml de ampicilina. A frequência de transformação foi calculada em função do número de células receptoras utilizadas, conforme descrito no item 3.16.1.

3.16.3. Transformação intergenérica entre linhagens de *E. coli* e DNA do isolado 9

(MANDEL e HIGA, 1970, modificado)

As linhagens receptoras de *E. coli* C600, HB 101, 711, CA77 e Sa, foram crescidas em caldo nutriente por 20 horas a 37°C, com agitação. Cada uma das culturas foi diluída e alíquotas destas suspensões foram inoculadas em 40 ml do mesmo meio, seguindo-se incubação por 3 horas a 37°C sob agitação.

Para obtenção de competência, as células foram centrifugadas e lavadas com solução de CaCl₂ 50 mM; após isto, foram mantidas a 0°C por 25 minutos, sendo este procedimento repetido duas vezes. A 0,2 ml de cada uma das suspensões de células competentes (10⁷ células/ml), adicionou-se 3,0 µg de DNA da linhagem 9, sendo a mistura mantida a 0°C durante 40 minutos. Decorrido este tempo, colocou-se a 42°C por 10 minutos, adicionando-se em seguida igual volume de caldo nutriente, e a incubação foi por 20 minutos a 37°C sob agitação.

Os transformantes foram selecionados em meio mínimo de *E. coli* sem nitrogênio incorporado (MMEC s/N), mais os requerimentos exigidos para cada linhagem (30 µg/ml para aminoácidos e 10 µg/ml para vitaminas e ácidos nucleicos). A incubação foi a 37°C por 72 horas, na presença de O₂, bem co

mo em atmosfera livre de O_2 (adição de 0,8% agar em cobertura).

Como parte da detecção de transformantes, ainda foram realizados testes para verificação da atividade da nitrogenase e comparação do crescimento entre estes e a linhagem original doadora do DNA.

3.16.4. Transformação intergenérica entre *S. cerevisiae*
e DNA do isolado 9 (ECHEVERRIGARAY, 1983)

A linhagem de levedura Y2180 foi crescida por 12 horas a 30°C em 100 ml de meio YEPD, sendo a seguir submetida a um tratamento, a fim de se obter protoplastos. Neste tratamento, as células foram inicialmente centrifugadas e lavadas duas vezes com EDTA 10 mM. Após a adição de 2-mercaptoetanol até a concentração de 1%, fez-se a suspensão das células em TSP 1M. Adicionou-se 1 ml de solução de helicase 4% e manteve-se a 35°C, agitando-se em intervalos constantes durante uma hora. A obtenção dos protoplastos foi observada microscopicamente até atingir 90 - 100% das células e então a suspensão foi centrifugada e lavada três vezes em TSP.

Para a transformação, foi adicionado 10 µl de solução $CaCl_2$ 1,2M aos protoplastos e a seguir cerca de 50 µl de DNA do isolado 9 para 0,1 ml da suspensão de protoplastos. Após a incubação por 30 minutos a 30°C, foi adicionado 1 ml de PEG 60% (em TSP), mais solução de $CaCl_2$ até atingir a con-

centração de 10 mM. Agitou-se lentamente e manteve-se por 60 minutos a 30°C e a seguir por 5 minutos a 42°C. Após a lavagem dos protoplastos com tampão TSP, foi feita a semeadura em meio mínimo de levedura, isento de fonte de nitrogênio acrescido de sorbitol (1M). Adicionou-se uma camada de meio de cobertura contendo 0,8% de agar, como suporte físico para a regeneração dos protoplastos. O controle foi feito em meio YEPD com sorbitol (1M).

3.17. Atividade da nitrogenase

A atividade da nitrogenase foi avaliada pela sua capacidade de reduzir acetileno a etileno (DILWORTH, 1966), detectado em cromatógrafo a gás.

Este ensaio foi realizado para os transformantes de *E. coli* e linhagem original (isolado 9). Para isto, utilizou-se culturas de cada uma das amostras crescidas em LG semi-sólido (0,2% agar) por 48 horas a 30°C. Os frascos foram hermeticamente fechados com tampas de borracha, retirados 3 ml de ar e injetado o mesmo volume de acetileno. Após 2 e 24 horas de incubação a 37°C, retirou-se 0,5 ml do volume da mistura gasosa de cada frasco e fez-se a análise no cromatógrafo Beckman GC, modelo 65, do Laboratório de Microbiologia - CENA/USP.

Pela análise gráfica dos picos de etileno foi calculada a atividade da nitrogenase presente em cada amostra (SAITO, 1978).

3.18. Comparação do crescimento entre transformantes *nif*⁺ de *E. coli* e isolado 9

Foram comparados o crescimento dos transformantes de *E. coli* e isolado 9 em meio com e sem nitrogênio incorporado. Culturas de cada uma das amostras desenvolvidas por 24 horas em caldo nutriente ou Burk, foram diluídas convenientemente e inoculadas em uma série de tubos contendo meio Burk com e sem nitrogênio e nutriente líquido. A incubação foi a 37 e 30°C, respectivamente para as linhagens transformantes e 9.

As amostras foram retiradas periodicamente, feitas a leitura da densidade ótica em espectrofotômetro Beckman a 620 nm, e com esses dados foram construídas as curvas de crescimento.

3.19. Experimentos de conjugação

Foram realizados vários experimentos de conjugação entre os transformantes *nif*⁺ e linhagens doadoras de

E. coli.

3.19.1. Conjugação entre transformantes nif^+ com linhagens portadoras de plasmídeo e Hfr de *E. coli*

As linhagens doadoras (Sa, Rldrd19 e CA77 amp^R) e receptoras (transformantes nif^+ de *E. coli*) foram crescidas em caldo nutriente por 20 horas a 37°C. Após esta incubação, as culturas doadoras foram diluídas 100 vezes em caldo nutriente e incubadas por 4 horas a 37°C, sob agitação.

A seguir, fez-se a mistura na proporção de 3:1 da cultura doadora em fase exponencial e cultura receptora em fase estacionária, incubando-se por 3 horas a 37°C. Decorrido esse tempo, a mistura foi agitada vigorosamente, diluída e semeada nos meios: MMEC s/N + cloranfenicol e ampicilina, MMEC s/N + cloranfenicol e canamicina, MMEC s/N + ampicilina, para as misturas cujas doadoras foram respectivamente as linhagens Rldrd19, Sa e CA77. Os antibióticos foram acrescentados ao meio na concentração de 20 µg/ml. A incubação foi a 37°C durante 72 horas, quando então foram selecionadas colônias nif^+ e resistentes a drogas.

3.19.2. Conjugação entre transformantes portadores de plasmídio e linhagens receptoras de *E. coli*

Os recombinantes obtidos no item 3.19.1 foram conjugados com linhagens F^- de *E. coli* (C600 e 711), a fim de se verificar a possibilidade dos genes *nif* estarem nestes plasmídios. O procedimento de conjugação foi o mesmo descrito no item anterior.

Após a conjugação, a mistura de células foi diluída convenientemente e semeada em NA + cloranfenicol e ampicilina e MMEC mais estes mesmos antibióticos. A incubação foi feita por 48 horas a 37°C e selecionou-se as colônias que apresentaram as mesmas características das células receptoras e resistência aos antibióticos. Isto foi verificado pela comparação destes nos dois meios de cultura. Posteriormente estas colônias foram replicadas para MMEC s/N acrescido dos mesmos antibióticos, além dos requerimentos exigidos pela linhagem receptora. A incubação foi a 37°C por 72 horas, observando-se a ocorrência de células receptoras *nif*⁺ e resistentes a drogas, conferida por genes plasmidiais das células doadoras.

3.19.3. Conjugação entre linhagens transformantes de *E. coli*

O transformante CA77/101(9)2 isolado no item

3.19.1, foi utilizado como linhagem doadora em cruzamentos com outros transformantes de *E. coli* 101(9) (item 3.16.2). Este ensaio teve como objetivo verificar a ocorrência de maior atividade de fixação de N_2 , nestes novos recombinantes.

A metodologia seguida foi a mesma do item anterior. Após a conjugação, as células foram semeadas em MMEC + ampicilina, uma vez que a linhagem CA77 apresentava resistência a esta droga. A incubação foi por 72 horas a 37°C e selecionou-se as colônias de maior tamanho, procedendo-se em seguida, o teste da redução do acetileno para verificar a atividade da nitrogenase em comparação com cada uma das linhagens parentais.

3.19.4. Conjugação entre linhagens transformantes *nif*⁺ e isolado 9 com linhagens portadoras de plasmídios com transposon

Foi realizada a conjugação entre os transformantes *nif*⁺ e isolado 9 com a linhagem de *E. coli* portadora de plasmídio com transposon pcBT01/HB101. Após a conjugação, as células foram semeadas em três meios diferentes: MMEC s/N + canamicina e tetraciclina; MMEC s/N + canamicina e MMEC s/N + tetraciclina. A incubação foi por 72 horas a 37 e 30°C, dependendo das células receptoras utilizadas. Nos casos onde as células receptoras foram as do isolado 9, substituiu-se o MMEC s/N por LG, acrescido dos mesmos antibióticos.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento de bactérias fixadoras de N₂

Utilizando-se a metodologia descrita no item 3.3, obteve-se cerca de 50 isolados bacterianos, os quais foram purificados nos vários meios isentos de nitrogênio. Destes isolados bacterianos, apenas 6 apresentaram características morfofisiológicas diferentes (requerimentos nutricionais, aspecto da colônia, taxa de crescimento). Estes receberam a designação de 12B, 13-2, 20-AM, 5-3, 9 e 22 e, juntamente com as linhagens cedidas por outras instituições (Tabela 1), foram posteriormente submetidos a eletroforese em gel de agarose para verificação da presença de plasmídios.

4.2. Ocorrência de plasmídios em bactérias fixadoras de N₂

Após a adaptação da metodologia para eletroforese em gel de agarose (item 3.4), foi feito um estudo comparativo das várias amostras bacterianas fixadoras de N₂. A Figura 2 mostra o padrão de migração eletroforética das linhagens que apresentaram plasmídios. Nas demais amostras não foram observados plasmídios em nenhum dos métodos de eletroforese realizados.

Considerando a possibilidade de que algumas linhagens fixadoras de N₂ pudessem apresentar plasmídios não visíveis em eletroforese (devido ao pequeno número de cópias), fez-se o tratamento com cloranfenicol (item 3.5) numa tentativa de amplificar o número de cópias destes plasmídios. Verificou-se que após este tratamento, apenas a linhagem 40-1 mostrou a presença de um plasmídio, o que não havia ocorrido antes deste tratamento. Além disso, os isolados 74-1, 40-1 IV e LAMS, não foram submetidos à eletroforese, pois houve muita dificuldade em se retirar a espessa camada de muco que os envolvia, dificultando a ocorrência de lise celular. Foi feita uma tentativa de eliminação desse muco com solução de EDTA, o que não teve sucesso.

De acordo com a mobilidade eletroforética em comparação com a migração de plasmídios com pesos moleculares conhecidos, obteve-se a reta de padronização (Figura 3)

<u>Canaleta</u>	<u>Linhagem</u>	<u>Peso Molecular (Md)</u>
1	5-3	40*
2	2-2II	64*
3	Rldrd19	62
4	Sa	23
5	sp7	125 e 65
6	40-1	92*
7	p307	54

* valores estimados (Figura 3)

FIGURA 2 - Eletroforese em gel de agarose de isolados bacterianos fixadores assimbióticos de N_2 e linhagens portadoras de plasmídios, com pesos moleculares conhecidos (canaletas 3, 4, 5 e 7).

FIGURA 3 - Retra de calibração para estimativa dos pesos moleculares de plasmídios a partir de linhagens padrões.

e com isso foi possível estimar o peso molecular dos plasmídios das amostras 2-2-II, 5-3 e 40-1 como sendo 64, 40 e 92 Md, respectivamente.

4.3. Eliminação de plasmídios em linhagens fixadoras de N₂

Cerca de 1500 colônias foram ensaiadas quanto à capacidade de fixar nitrogênio após o tratamento com agentes de "cura" como brometo de etídio, acriflavina, acridina laranja e calor (44°C). Os dados referentes a estes experimentos estão da Tabela 2.

TABELA 2 - Porcentagem de eliminação de plasmídios através do tratamento com agentes de "cura" em linhagens fixadoras de N₂.

Amostras	Tratamento*			
	brometo de etídio	acriflavina	acridina laranja	calor
<i>A. brasilense</i>	1,08	0,42	0,43	2,03
40-1	3,52	0,43	0,25	10,30
5-3	5,51	1,03	0,23	6,65
2-2 II	4,60	1,52	0,83	

* 90 - 100 colônias em cada tratamento

Pode-se verificar que apenas na linhagem de *A. brasilense* houve alteração no processo de fixação de N_2 , após a eliminação dos plasmídios, enquanto que as demais continuaram apresentando crescimento em meio sem nitrogênio incorporado. A comprovação da perda dos plasmídios foi feita através da eletroforese em gel de agarose em um número significativo de colônias que apresentaram ou não crescimento em meio sem nitrogênio, uma vez que o caráter "fixação de N_2 " foi o único critério levado em consideração.

Como já mencionado, não foram isoladas bactérias cujos plasmídios tivessem genes relacionados ao proceso de fixação de nitrogênio. Desta forma, procurou-se entre os isolados bacterianos uma linhagem que pudesse ser utilizada em estudos genéticos envolvendo genes *nif* cromossomais. O isolado 9, não portador de plasmídio, foi utilizado neste sentido, uma vez que o mesmo apresentou boas características culturais, como crescimento rápido em vários meios isentos de nitrogênio incorporado (LG, LGB, Burk), fácil manipulação, além de ter colônias bem delimitadas, facilitando a "réplica em veludo" (LEDERBERG e LEDERBERG, 1952). Vários ensaios foram conduzidos com esta bactéria como obtenção de mutantes *nif*⁻, experimentos de transformação envolvendo mutantes *nif*⁻ e linhagens de *E. coli* como receptoras e experimentos de conjugação entre os transformantes obtidos com outras linhagens de *E. coli*.

O isolado 9 foi caracterizado como sendo do gênero *Azotobacter*, espécie *paspali* (Figuras 4 e 5), de acordo com os critérios citados no item 3.8. Esta bactéria tem como característica morfológica, um grande pleomorfismo, de modo que após 2 dias de crescimento, as células apresentam-se como filamentos, de comprimento variado, podendo atingir até 30 μ m. Após 4 dias, verifica-se uma mistura de filamentos longos e bastonetes de vários comprimentos. Tanto os bastonetes como os filamentos, movem-se ativamente em meio líquido e em culturas mais velhas aparecem células com forma semelhante a outras espécies de *Azotobacter*. Produzem cisto e cápsula, são Gram negativas e nos filamentos aparecem cadeias de grânulos que possivelmente darão origem aos cistos ou células mais curtas. Não se desenvolvem em caldo nutritivo, tendo bom crescimento em meio isento de nitrogênio (LG, Burk e LGB) contendo glicose e sacarose. Não utilizam, porém, o amido e manitol e forte produção de ácido é observada em meio contendo glicose e sacarose, o que pode ser também verificado pelo amarelecimento do agar com azul de bromotimol. A fixação de N_2 ocorre em presença de oxigênio, da mesma forma que em outras espécies de *Azotobacter*. Em relação à temperatura, verifica-se que o seu crescimento pode ocorrer tanto a 30 como a 37°C e numa faixa de pH variável entre 5 e 9. As colônias em meio sólido sem nitrogênio são redondas, úmidas e elevadas, mas em culturas mais velhas tornam-se secas e leitosas, frequentemente irregulares.

FIGURA 4 - Cultura do isolado 9 (*A. paspali*) em meio sem nitrogênio incorporado, coloração simples com azul de metileno (x1000).
Acima: cultura de 2 dias, apresentando filamentos longos;
Abaixo: cultura de 4 dias apresentando células de comprimento intermediário e raras formas alongadas.

FIGURA 5 - Cultura do isolado 9 (*A. paspali*) em meio sem nitrogênio incorporado, coloração simples com azul de metileno (x 1000).
Acima: cultura de 7 dias, com predominância de formas cocoides;
Abaixo: cultura de 10 dias onde aparecem cistos.

4.4. Nível de resistência a drogas no isolado 9

Os níveis de resistência do isolado 9 para quatro antibióticos, são mostrados na Tabela 3. Conforme pode ser observado, a linhagem já possui certa resistência natural à ampicilina demonstrado pelo seu crescimento imediato em meio contendo 20 µg/ml, o que não aconteceu com os outros antibióticos. Estes dados foram posteriormente utilizados no isolamento de mutantes resistentes.

TABELA 3 - Nível de resistência do isolado 9 a antibióticos.

concentração (µg / ml)	ampi- cilina	tetra- ciclina	cloran- fenicol	cana- micina
0	+	+	+	+
1	+	+	+	+
2	+	-	+	+
5	+	-	+	-
10	+	-	-	-
20	+	-	-	-
50	-	-	-	-
100	-	-	-	-
200	-	-	-	-

+ crescimento

- ausência de crescimento

4.5. Curva de sobrevivência e obtenção de mutantes *nif⁻* à irradiação ultra-violeta e tratamento com ácido nitroso

As curvas de sobrevivência aos tratamentos com luz ultra-violeta e ácido nitroso foram realizadas, a fim de se determinar as melhores condições para o isolamento de mutantes *nif⁻*. As Tabelas 4 e 5 mostram esses dados e a representação gráfica está na Figura 6.

TABELA 4 - Sobrevivência do isolado 9 à irradiação ultra-violeta ($93,6 \text{ J.m}^{-2}.\text{min}^{-1}$).

Tempo (minutos)	Nº de Sobreviventes (células / ml)	Porcentagem de Sobrevivência
0	$6,3 \times 10^8$	$1,00 \times 10^2$
0,5	$5,1 \times 10^8$	$8,09 \times 10^1$
1,0	$4,5 \times 10^7$	$7,14 \times 10^0$
1,5	$1,8 \times 10^7$	$2,85 \times 10^0$
2,0	$3,8 \times 10^5$	$6,03 \times 10^{-2}$
3,0	$4,3 \times 10^3$	$7,61 \times 10^{-4}$
4,0	$2,5 \times 10^2$	$3,96 \times 10^{-5}$

TABELA 5 - Sobrevivência do isolado 9 ao tratamento com ácido nitroso.

Tempo (minutos)	Nº de Sobreviventes (células / ml)	Porcentagem de Sobreviventes
0	$3,5 \times 10^8$	$1,00 \times 10^2$
4	$4,8 \times 10^7$	$1,37 \times 10^1$
8	$2,0 \times 10^6$	$5,71 \times 10^{-1}$
12	$1,6 \times 10^4$	$4,57 \times 10^{-3}$
16	$3,4 \times 10^2$	$9,71 \times 10^{-5}$
20	$1,2 \times 10^2$	$3,40 \times 10^{-7}$

Considerando os valores correspondentes às curvas de sobrevivência, escolheu-se 2 minutos como o tempo de irradiação para o tratamento com luz ultra-violeta e 8 minutos para o tratamento com ácido nitroso por causarem menos de 1% de sobrevivência e, portanto, considerado suficiente para induzir alta taxa de mutação.

Foram selecionadas 6 e 10 colônias mutantes *nif⁻* após tratamento com ultra-violeta e ácido nitroso, respectivamente. Estes mutantes foram em seguida submetidos a auxanografia, a fim de verificar se a sua incapacidade de crescimento em meio sem nitrogênio, era realmente por alteração na nitrogenase ou devida a alguma deficiência nu-

FIGURA 6 - Curva de sobrevivência do isolado 9 à irradiação ultra-violeta (UV) e tratamento com ácido nitroso (HNO_2).

tricional (auxotrofia) que os impedia de desenvolver em meio mínimo. Conforme já foi descrito no item 3.13, os mutantes foram semeados em meio isento de nitrogênio, acrescido de fontes de aminoácidos, ácidos nucleicos ou vitaminas. Convém salientar que em todos estes casos, a fonte de suplementação, em especial de aminoácidos, não atingiu a concentração de 300 µg/ml capaz de inibir o processo de fixação de nitrogênio nesta bactéria (avaliada pela redução do acetileno). Verificou-se que dos 16 mutantes *nif*⁻ obtidos inicialmente, apenas 5 mantiveram esta condição após suplementação com os diferentes requerimentos. Isto mostrou que realmente a sua incapacidade de crescimento em meio sem nitrogênio não estava relacionada com deficiência nutricional e sim especificamente com alterações da nitrogenase. Dos 11 mutantes restantes, 8 reverteram para *nif*⁺ após algumas subculturas e 3 mostraram ser auxotróficos, sendo 2 capazes de crescer em meio suplementado com vitaminas, mostrando deficiência para a vitamina B₁ e o outro apresentou crescimento em meio com ácido nucleico de leveduras, mostrando deficiência para timina.

Os 5 mutantes que comprovadamente mostraram ser *nif*⁻, juntamente com culturas do isolado 9, foram posteriormente utilizados na seleção de mutantes resistentes a drogas. Para isso observou-se os dados referentes aos níveis de resistência do isolado 9 aos antibióticos (Tabela 3).

A seleção de células resistentes foi necessária para que se pudesse dispor de linhagens doadoras de DNA, que atuassem como marcadores em experimentos de transformação. Desta forma, além da característica "fixação de N_2 ", pode-se utilizar a marca de resistência na seleção de transformantes. Foram obtidas 10 colônias do isolado 9 que cresceram em LG + 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina, 3 colônias em meio com 2 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina, 5 em 10 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol e 6 em 5 $\mu\text{g/ml}$ de canamicina. Também foram isoladas células resistentes a 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina a partir de cada uma das linhagens mutantes *nif* .

4.6. Experimentos de transformação

Após a extração do DNA do isolado 9 e mutantes *nif*⁻ (item 3.15), fez-se uma série de experimentos de transformações interespecíficas e intergenéricas, com o objetivo de estudar o comportamento de genes fixadores de N_2 , em populações selvagens de bactérias fixadoras de vida livre como é o caso do isolado 9 (*A. paspali*). Nestes ensaios procurou-se localizar os genes *nif*⁻ ao longo do genoma bacteriano, além de observar sua possível transferência para outros organismos não fixadores de N_2 .

4.6.1. Transformação interespecífica

Os mutantes nif^- obtidos a partir do isolado 9 (item 4.6) foram utilizados como células receptoras em experimentos de transformação onde o DNA doador foi proveniente de células desta mesma linhagem. A seleção dos transformantes foi em função da recuperação da capacidade de fixar N_2 (nif^+) por parte dos mutantes nif^- , o que pode ser verificado através do crescimento de colônias em meio sem nitrogênio incorporado.

A frequência de transformantes nif^+ foi calculada levando-se em consideração o número total de células receptoras utilizadas e os dados referentes a este experimento são mostrados na Tabela 6.

TABELA 6 - Porcentagem de recombinantes nif^+ da transformação entre mutantes nif^- e DNA do isolado 9.

Linhagens Receptoras*	Porcentagem de Transformantes nif^+
nif_1^-	$1,7 \times 10^{-2}$
nif_2^-	$8,5 \times 10^{-3}$
nif_3^-	$4,0 \times 10^{-2}$
nif_4^-	$1,1 \times 10^{-3}$
nif_5^-	$3,2 \times 10^{-3}$

* o número de células utilizadas foi de 10^7 - 10^8 cels/ml

Em cada experimento foi feito simultaneamente um controle dos mutantes nif^- a fim de se verificar a possível ocorrência de reversão. Observou-se desta forma, que apenas os mutantes nif_2^- e nif_5^- apresentaram uma reversão para nif^+ em torno de $3,10^{-7}\%$, o que foi considerado no cálculo da frequência de recombinação.

4.6.2. Transformação entre mutantes nif^-

Os mutantes nif^- descritos no item 4.6, foram transformados com DNA extraído destes mesmos mutantes em todas as combinações possíveis, onde as linhagens doadoras carregavam uma marca conferindo resistência a ampicilina. As porcentagens de recombinação nestas transformações são mostradas na Tabela 7 e a Figura 7 mostra a ordem das mutações afetando a fixação de nitrogênio.

O aparecimento de células nif^+ indicou uma recombinação do material genético correspondente às mutações das duas linhagens. Assim, recombinantes nif^+ só puderam ocorrer quando a mutação do doador não foi a mesma do genoma receptor. Nestas transformações, verificou-se que a marca para resistência a ampicilina apareceu em apenas 2 experimentos envolvendo nif_4^- ($nif_4^- \times nif_5^-$ e $nif_4^- \times nif_1^-$).

Em todos os casos foi feito um controle para se verificar uma possível reversão dos mutantes nif^- .

TABELA 7 - Porcentagem de transformantes nif^+ obtidos de cruzamentos entre mutantes nif^- e DNA destas mesmas linhagens.

Linhagens Receptoras*	Linhagens Doadoras				
	nif_1^-	nif_2^-	nif_3^-	nif_4^-	nif_5^-
nif_1^-	0	$5,4 \times 10^{-4}$	$7,2 \times 10^{-3}$	$3,5 \times 10^{-3}$	$8,7 \times 10^{-7}$
nif_2^-	$1,3 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-7}$	$4,5 \times 10^{-6}$	$1,9 \times 10^{-3}$	$8,1 \times 10^{-3}$
nif_3^-	$6,7 \times 10^{-3}$	$5,6 \times 10^{-5}$	0	$2,8 \times 10^{-3}$	$5,2 \times 10^{-3}$
nif_4^-	$7,0 \times 10^{-3}$	$2,6 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-7}$	$3,1 \times 10^{-3}$
nif_5^-	0	$1,5 \times 10^{-4}$	$7,3 \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-7}$

* o número de células receptoras utilizadas foi de 10^7 - 10^8 células/ml

FIGURA 7 - Ordem das mutações afetando a fixação de N_2 . As distâncias entre as mutações não são dadas em escalas.

4.6.3. Transformação intergenérica

Neste caso, o DNA do isolado 9 foi utilizado em processos de transformação onde as células receptoras foram da bactéria *E. coli* e levedura *S. cerevisiae*. Obteve-se transformantes apenas quando as células receptoras foram de *E. coli* HB101, C600, CA77 e R1drl9.

As colônias recombinantes obtidas inicialmente foram replicadas novamente para o mesmo meio isento de nitrogênio incorporado, para confirmação da condição de *nif*⁺. Nessas condições, poucas destas colônias mantiveram-se estáveis. Conforme pode ser observado na Tabela 8, apenas 6 colônias da linhagem HB101 e 2 da CA77 apresentaram as características da espécie e crescimento em meio isento de nitrogênio. Estas foram designadas de 101(9)1 a 6 e CA77(9)1 e 2.

TABELA 8 - Transformação de linhagens de *E. coli* e levedura *S. cerevisiae* com DNA do isolado 9.

Linhagens Receptoras *	Número Total de Transformantes <i>nif</i> ⁺	Número de Transformantes <i>nif</i> ⁺ Estáveis	Porcentagem de Transformação**
HB101	26	6	$4,0 \times 10^{-6}$
C600	15	0	$2,1 \times 10^{-6}$
711	0	0	0
CA77	8	2	$1,7 \times 10^{-6}$
Sa	0	0	0
Rldrd19	6	0	$5,2 \times 10^{-7}$
Levedura X ₂₁₈₀	0	0	0

* o número de células receptoras utilizadas foi de 10^7 - 10^8 células/ml

** número total de transformantes *nif*⁺ em relação ao número - de células receptoras utilizadas

4.7. Atividade da nitrogenase e crescimento dos transformantes de *E. coli*

Os dados de atividade da nitrogenase para os transformantes *nif*⁺ de *E. coli* e isolado 9 (doadora) são apresentados na Tabela 9. Nas Tabelas 10 e 11 estão os dados referentes ao crescimento destas mesmas linhagens e da *E. coli* HB101 (receptora) em meio com e sem nitrogênio incorporado, respectivamente e a representação gráfica nas Figuras 8 e 9. O aspecto destas culturas em Placas de Petri pode ser observado na Figura 10.

TABELA 9 - Atividade da nitrogenase nos transformantes de *E. coli* e isolado 9 medida pela redução do acetileno.

Produção de C ₂ H ₄ (nmoles/hora)			
Linhagem	Produção	Linhagem	Produção
Isolado 9	1,42 x 10 ³	101(9)1	26,0 x 10 ⁻³
101(9)2	30,9 x 10 ⁻³	101(9)3	8,1 x 10 ⁻³
101(9)4	16,3 x 10 ⁻³	101(9)5	17,9 x 10 ⁻³
101(9)6	21,1 x 10 ⁻³	CA77(9)1	1,6 x 10 ⁻³
CA77(9)2	6,3 x 10 ⁻³		

TABELA 10 - Crescimento dos transformantes *nif⁺* de *E. coli*, linhagem HB101 (receptora) e isolado 9 (doadora) em meio com nitrogênio incorporado.

Tempo (horas)	Linhagens Bacterianas Absorbância (620 nm)							
	9	101	101(9)1	101(9)2	101(9)3	101(9)4	101(9)5	101(9)6
6	0,01	0,05	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01
12	0,03	0,32	0,02	0,03	0,02	0,03	0,10	0,09
20	0,12	0,65	0,08	0,25	0,31	0,30	0,15	0,23
28	0,45	0,97	0,30	0,32	0,36	0,38	0,35	0,32
36	0,65	1,71	0,43	0,41	0,44	0,41	0,45	0,39
44	0,85	1,80	0,62	0,55	0,55	0,63	0,58	0,47
52	1,02	1,81	0,62	0,73	0,56	0,63	0,60	0,56
60	1,01	1,82	0,63	0,73	0,56	0,70	0,65	0,60
70	1,01	1,82	0,63	0,75	0,57	0,75	0,69	0,61

TABELA 11 - Crescimento dos transformantes *nif⁺* de *E. coli*, linhagem HB101 (receptora) e isolado 9 (doadora) em meio sem nitrogênio incorporado.

Tempo (horas)	Linhagens Bacterianas Absorbância (620 nm)							
	9	101	101(9)1	101(9)2	101(9)3	101(9)4	101(9)5	101(9)6
6	0,01	0	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,00
12	0,015	0	0,025	0,03	0,02	0,026	0,015	0,01
20	0,09	0	0,08	0,08	0,03	0,07	0,03	0,02
28	0,32	0	0,13	0,16	0,08	0,11	0,08	0,04
36	0,46	0	0,19	0,21	0,09	0,15	0,10	0,09
44	0,52	0	0,25	0,28	0,12	0,22	0,15	0,13
52	0,73	0	0,30	0,30	0,25	0,29	0,30	0,18
60	0,84	0	0,31	0,34	0,25	0,31	0,34	0,25
70	0,83	0	0,31	0,35	0,26	0,35	0,35	0,27

FIGURA 8 - Curvas de crescimento dos transformantes, linhagem HB101 de *E. coli* e isolado 9 em meio com nitrogênio incorporado.

FIGURA 9 - Curvas de crescimento dos transformantes de *E. coli* e isolado 9 em meio sem nitrogênio incorporado.

FIGURA 10 - Cultura de 3 dias das linhagens HB101, 9 e transformante 101(9)2 em meio com nitrogênio (acima) e sem nitrogênio (abaixo).

4.8. Experimentos de conjugação

Uma série de experimentos de conjugação foram realizados entre transformantes de *E. coli* e várias linhagens doadoras (Hfr ou portadoras de plasmídios) desta mesma bactéria, a fim de se verificar a possível mobilização dos genes *nif*.

4.8.1. Conjugação entre transformantes 101(9) e linhagens de *E. coli* portadoras de plasmídios

Com o objetivo de comprovar serem os transformantes realmente da linhagem *E. coli*, fez-se inicialmente conjugação com linhagens portadoras de plasmídios conjugativos.

Conforme mostram os dados da Tabela 12, a conjugação ocorreu em alguns casos, conseguindo-se isolar colônias resistentes a drogas e fixadoras de nitrogênio. A transferência do plasmídio só ocorreu quando a linhagem doadora foi Rldrd19, com exceção do cruzamento envolvendo 101(9)2 x Sa, onde também ocorreu conjugação.

As colônias resistentes a drogas e fixadoras de N₂ selecionadas, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, e apresentaram a banda correspondente ao plasmídio, da mesma forma que a linhagem doadora. Estas foram

designadas de R1/101(9)1, R1/101(9)2, R1/101(9)4 e R1/101(9)5 e os recombinantes selecionados no cruzamento entre CA77 (Hfr) e transformantes, foram designados de CA77/101(9)2.

TABELA 12 - Porcentagem de conjugação entre transformantes 101(9) e linhagens de *E. coli* portadoras de plasmídeo.

Linhagens Doadoras de <i>E. coli</i>	Linhagens Receptoras					
	101(9)1	101(9)2	101(9)3	101(9)4	101(9)5	101(9)6
Sa	0	$1,2 \times 10^{-4}$	0	0	0	0
Rldrd19	$3,7 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-3}$	0	$1,1 \times 10^{-3}$	$4,3 \times 10^{-3}$	0
CA77 (Amp ^R)	0	$5,0 \times 10^{-5}$	0	0	0	0

Os recombinantes obtidos neste experimento, foram conjugados com as linhagens receptoras de *E. coli* C600 e 711, para se verificar a possibilidade dos genes *nif*⁻ estarem no plasmídeo R. Desta forma, uma vez sendo transferido o plasmídeo, a bactéria receptora apresentaria resistência a drogas e capacidade de fixar N₂. Foram obtidas colônias receptoras resistentes a drogas, indicando que o plasmídeo foi transferido, mas essas continuaram incapazes de

fixar N_2 .

4.8.2. Conjugação entre linhagens transformantes de *E. coli*

Considerando que os transformantes de *E. coli* apresentavam diferentes segmentos de DNA, fez-se a conjugação entre a possível linhagem doadora CA77/101(9)2 (selecionada no item 4.8.1) com transformantes 101(9). Este experimento teve o objetivo de aumentar a eficiência de fixação de N_2 entre os transformantes, comprovadamente baixas.

Selecionou-se colônias recombinantes de maior tamanho (Tabela 13) e estas foram ensaiadas conjuntamente com as linhagens parentais quanto a atividade de nitrôgenase, pela técnica da redução do acetileno, não havendo diferença significativa nos valores encontrados.

TABELA 13 - Número de colônias de maior tamanho selecionadas a partir de conjugação entre os transformantes CA77/101(9)2 e 101(9).

Linhagem Doadora	Linhagens Receptoras			
	101(9)1	101(9)2	101(9)4	101(9)5
CA77/101(9)2	8	10	6	5

4.8.3. Conjugação dos transformantes nif^+ e isolado 9 com linhagens portadoras de plasmídios contendo transposon

Cruzamentos envolvendo linhagens de *E. coli* portadoras de plasmídio com transposon e as fixadoras de N_2 101(9) e isolado 9, foram realizados com o objetivo de se verificar a mobilização de marcas pelo transposon entre estas células. Os cruzamentos, bem como os dados obtidos estão na Tabela 14.

Somente foram selecionados recombinantes *nif* e resistentes simultaneamente aos antibióticos canamicina e tetraciclina, o que demonstrou a transferência do plasmídio integralmente para a célula receptora do isolado 9. Desta forma, não se verificou qualquer mobilidade do transposon, o que possibilitaria ocorrência de células resistentes apenas a canamicina, marca conferida pelo transposon. Nos demais experimentos, onde os receptores foram os transformantes 101(9), não se verificou a transferência dos plasmídios pois as células não apresentaram crescimento em nenhum dos meios contendo antibióticos.

TABELA 14 - Porcentagem de recombinantes obtidos na conjugação entre *E. coli* portadora de plasmídio com transposon e linhagens fixadoras de N₂, 101(9) e isolado 9.

Linhagem Doadora	Linhagens Receptoras		
	101(9)2	101(9)4	Isolado 9
<i>E. coli</i> pcBT01/HB101	0	0	4

5. DISCUSSÃO

Devido à diversidade de assuntos, a discussão dos resultados foi feita agrupando dois tópicos: (1) ocorrência de plasmídios em isolados de bactérias fixadoras de N_2 assimióticas e (2) estudos genéticos da fixação de N_2 incluindo experimentos de transformação e conjugação para um dos isolados obtidos.

5.1. Ocorrência de plasmídios

Tem sido verificada a presença de plasmídios em inúmeros gêneros de bactérias fixadoras de N_2 , mas segundo a literatura, o maior número encontrado se referem aos gêneros *Azospirillum* e *Rhizobium*. ROBSON (1981) observou plasmídios em linhagens de *A. chroococcum* e *A. paspali*, mas nenhum para *A. vinelandii*. Uma das linhagens observadas de *A. chroococcum* continha 5 plasmídios.

Levando-se em consideração os resultados obtidos através de eletroforeses realizadas nas amostras de bactérias fixadoras de N_2 (Figura 2), pode-se observar que poucas linhagens apresentaram plasmídios: a 2-2II, 5-3 e 40-1, com pesos moleculares de 64, 40 e 92 Md, respectivamente. Todas as amostras foram submetidas aos dois métodos de eletroforese descritos no item 3.4, sendo que o segundo (item 3.4.2) apresentou bandas plasmidiais mais nítidas devido a menor interferência do DNA cromossomal.

Os isolados selvagens do solo, com exceção do 9, não foram classificados, mas pelo tipo de nutriente em que se desenvolveram, sugere que pertencem aos gêneros *Azotobacter* e *Beijerinckia*. Alguns destes como 74-1, 40-1IV e LAMS, não foram submetidos à eletroforese devido a uma espessa camada de muco que os revestia, dificultando a lise celular e ainda sua manipulação genética por técnicas convencionais. Com relação ao isolado 40-1, o plasmídio somente foi evidenciado após a amplificação com cloranfenicol. Neste processo de amplificação, o plasmídio continua a replicar independente da replicação cromossômica, e desta forma, o número de cópias por célula aumenta, facilitando a visualização eletroforética (CLEWELL, 1972). O mesmo tipo de tratamento não funcionou nos casos dos outros isolados, onde nenhum plasmídio foi evidenciado.

Entre as linhagens que apresentaram plasmí-

dios, não se detectou a presença de genes plasmidiais envolvidos com o processo de fixação de N_2 . Isso foi comprovado pelo fato de que após a eliminação destes plasmídios com agentes de "cura", estas linhagens continuaram a ter desenvolvimento normal em meio isento de nitrogênio incorporado. Isso está de acordo com os dados obtidos por KENNEDY *et alii* (1981) e ROBSON (1981) que também não encontraram relação entre os plasmídios observados nas várias espécies de *Azotobacter* e *Beijerinckia*, com o processo de fixação de N_2 .

Uma exceção a estes casos foi observada com a linhagem de *A. brasilense* sp7 que teve alterada a sua capacidade de fixação de N_2 , ao perder seu dois plasmídios (125 e 65 Md), fato este também verificado anteriormente por LEMOS (1980).

Pode-se observar na Tabela 2 que para estas linhagens estudadas, a maior porcentagem de eliminação de plasmídios foi conseguida através do tratamento com calor (variação de 2,03 a 10,3%), seguida do tratamento com brometo de etídio (variação de 1,08 a 5,50%). Estes dados coincidem com os obtidos por SONTEIN e BALDWIN (1972) e RUBIN e ROSENBLUM (1975) na "cura" de plasmídios contendo genes conferindo resistência a drogas em *Staphylococcus aureus*. Os tratamentos com acriflavina e acridina laranja foram menos eficientes, resultando em perdas de plasmídios que variaram de 0,52 a 1,03 e 0,23 a 0,83%, respectivamente.

A perda de plasmídios pela ação do calor não está bem esclarecida, mas várias explicações têm sido propostas. De acordo com MAY *et alii* (1964), a perda de resistência a tetraciclina e penicilina conferida por genes plasmidiais em *S. aureus* foi devida a uma menor taxa de replicação dos plasmídios a 44°C do que a da própria célula; sob essas condições, o número destes plasmídeos se torna tão reduzido após algumas horas de crescimento, sendo inclusive herdadas de modo irregular, onde algumas células nem apresentam plasmídios. No entanto, para ASHESHOV (1966), o calor apenas refletiu um aumento na taxa normal de perda espontânea de plasmídios que ocorre em longos períodos de estocagens. ZURKOWSKY (1982), atribui a perda de plasmídios por calor em *R. trifolii* ao fato de que algumas funções replicativas codificadas por genes plasmidiais são temperatura-sensíveis. Deve ser ainda considerado que no caso de plasmídios multicópias que dependem da polimerase I para sua replicação, pode haver alteração dessa enzima pelo calor, sem prejuízo da replicação cromossômica que depende da polimerase III (BRODA, 1979).

O brometo de etídio como é sabido, se intercala entre pares de bases de DNA, interferindo na ação da DNA e RNA polimerase (JOHNSTON e RICHMOND, 1970).

5.2. Estudos genéticos no isolado 9 (*Azotobacter paspali*)

Com a finalidade de se proceder um estudo genético visando um melhor conhecimento dos genes envolvidos na fixação de N_2 em *A. paspali*, fez-se uma série de ensaios, uma vez que nenhum estudo neste sentido foi realizado com esta bactéria.

A proposta inicial foi o de se isolar mutantes *nif*⁻, já obtidos em outras espécies de *Azotobacter*. Para isto, as células foram submetidas à irradiação ultra-violeta e tratamento com ácido nitroso por 2 e 8 minutos, respectivamente, o que foi considerado eficiente para a indução de mutação, levando-se em conta os dados das curvas de sobrevivência.

Houve dificuldades no isolamento de maior número de mutantes nesta bactéria, o mesmo ocorrendo para vários autores em outras espécies de *Azotobacter*. SADOFF *et alii* (1979) justificam isto, como sendo devido ao fato de *Azotobacter* ter grande quantidade de DNA (dez vezes mais do que *E. coli*), inclusive sugerindo a existência de 40 cópias de cromossomas por célula. No entanto, TERZAGHI (1980a) considera que a maioria destes cromossomas não devem ser biologicamente funcionais. De acordo com PAGE e SADOFF (1976a), a dificuldade de obtenção de mutantes em *A. vinelandii* se deve à existência de um sistema de reparo pós-mutacional efi-

ciente. Neste trabalho, as dificuldades encontradas podem ser assim justificadas, além de se considerar a difícil manutenção dos mutantes obtidos, pois após algumas repicagens havia reversão do caráter.

Conforme mostram os resultados do item 4.5, foram obtidos 6 e 10 mutantes *nif*⁻, respectivamente para os tratamentos com ultra-violeta e ácido nitroso. Deste total, 3 eram mutantes auxotróficos para vitamina B₁ e timina, o que foi revelado pela auxanografia (item 3.13); 8 sofreram reversão para prototrofia e apenas 5 mantiveram sua condição *nif*⁻, ou seja, incapacidade de fixar nitrogênio. A frequência de aparecimento de mutantes *nif*⁻ foi baixa, principalmente considerando a necessidade dos experimentos posteriores de transformação a que se destinavam. Deve-se considerar ainda, a alta taxa de reversão (50%) encontrada nestas mutações. Para um melhor estudo a respeito destes mutantes *nif*⁻ haveria necessidade de testes mais precisos, como sugerido por BRILL (1976), que incluem ressonância paramagnética ou reação com antissoros específicos, para verificar se a sua deficiência se relacionou com os componentes I, II ou I e II da nitrogenase.

Posteriormente linhagens mutantes *nif*⁻ e isolado 9 foram ensaiadas para a seleção de células resistentes a drogas que pudessem servir como marcadores em experimentos de transformação. Para isto, utilizou-se dos dados

sobre o nível de resistência a drogas do isolado 9, previamente determinado (Tabela 3). Como esta bactéria já apresentava certa resistência natural à ampicilina, foi mais conveniente utilizar resistentes para uma maior concentração desta droga (50 µg/ml), apesar de terem sido obtidos mutantes resistentes à tetraciclina (2 µg/ml), cloranfenicol (10 µg/ml) e canamicina (5 µg/ml). Além disto, foram também selecionados mutantes *nif*⁻ resistentes a 50 µg/ml de ampicilina, os quais juntamente com células do isolado 9 resistentes, serviram como doadores de DNA em vários processos de transformação.

5.2.1. Experimentos de transformação

Uma série de processos de transformações interespecíficas e intergenéricas foram realizadas, utilizando-se o DNA extraído do isolado 9 ou de mutantes *nif*⁻ originados a partir dele. Estes experimentos tiveram como objetivo, estudar os genes *nif*⁻ de outras espécies de *Azotobacter* oriundas de populações selvagens do solo, como é o caso do isolado 9. Processos de transformação envolvendo DNA total só foram realizados anteriormente em casos onde tanto a linhagem doadora quanto a receptora eram fixadoras de N₂, o que facilitou bastante a ocorrência de recombinantes. Dos inúmeros casos descritos de transformações intergenéricas, envolvendo linhagens receptoras não fixadoras de N₂, foi rea

lizada a clonagem dos genes *nif* de *Klebsiella* em plasmídios amplificadores, os quais foram posteriormente transferidos para *E. coli* e *Salmonella typhimurium* (DIXON *et alii*, 1976; POSTGATE e KRISHNAPILLAI, 1971).

No primeiro processo de transformação realizado envolvendo mutantes *nif*⁻ e DNA do isolado 9 (Tabela 6), nota-se que a frequência de transformação foi relativamente alta ($2,7 \times 10^{-3}$ %) entre os mutantes *nif*⁻, podendo-se inferir que estes deveriam apresentar mutações simples, facilmente corrigidas pela incorporação de DNA exógeno.

Experimentos deste tipo também foram realizados por SEN e SEN (1965) ao transformarem *A. vinelandii* com DNA de *A. chroococcum* e vice-versa. Pode-se citar ainda PAGE e von TIGERSTROM (1979) e PAGE e SADOFF (1976a,b) que estudaram as melhores condições para ocorrência de transformação em mutantes auxotróficos de *A. vinelandii*. Nestes casos, a porcentagem de transformação variou de 10^{-4} a 10^{-6} %. Segundo estes autores, para induzir competência em *Azotobacter*, as células devem estar em fase exponencial, e utilizar o fosfato ao invés de cálcio no meio de transformação. A razão disto é que em células velhas, havendo presença de cálcio no meio, ocorre a formação de maior quantidade de polímeros capsulares, dificultando a penetração do DNA transformante. Melhores condições para eliminação de polímeros capsulares também foram avaliadas para a transformação de

Diplococcus pneumoniae e *Bacillus licheniformis* por LEONARD e MATTHEIS (1965) e RAVIN (1957), citado por PAGE e SADOFF (1976). YOUNG e SPIZIZEN (1963) também acrescentaram fosfato ao meio, para melhor absorção do DNA transformante em *B. subtilis*.

De acordo com WISE *et alii* (1973) e RICKENBERG (1974), a adição de 3,5 - adenosina cíclica monofosfato (cAMP), induziu competência em *A. vinelandii* ao nível de transcrição, sugerindo um controle de repressão catabólica inclusive entre mutantes *nif⁻*.

Ainda com relação ao processo de transformação, OPPHEIM e MARCUS (1970) e MARCUS e KANESHIRO (1972) propõem que as células devem crescer em meio contendo nitrogênio incorporado, pois isto provoca alterações na composição e estrutura da membrana celular, facilitando a penetração do DNA.

Em todos os experimentos de transformação descritos na literatura envolvendo *Azotobacter*, o DNA de células doadoras foi obtido de lisados celulares, sem que tivesse sido feito qualquer purificação, gerando inúmeras controvérsias nos resultados. Neste trabalho, fez-se uma modificação de todos estes procedimentos, utilizando-se DNA purificado, conforme descrito no item 3.15.

Numa tentativa de se localizar as mutações

nif^- (nif_1^- a nif_5^-) no genoma do isolado 9, fez-se o cruzamento dos diferentes mutantes com DNA extraído de linhagens nif^- , conforme mostram os dados da Tabela 7. Pela frequência de transformantes obtidos nos diferentes cruzamentos, pode-se observar que praticamente nenhum transformante foi detectado quando as mutações nif^- carregadas pela linhagem do adora e receptora foram as mesmas.

Como é sabido, a distância entre dois genes é diretamente proporcional à frequência de recombinação, ou seja, valores de recombinação altos em determinado cruzamento indicam que a distância entre os genes é relativamente grande (LACKS e HOTCHKISS, 1960; EPHRATI-ELIZUR *et alii*, 1961; BISHOP e BRILL, 1977). Pode-se notar pelos dados que os mutantes nif_1^- e nif_5^- provavelmente apresentam o mesmo tipo de mutação, pois não se detectou transformantes entre eles; mutantes nif_2^- e nif_3^- devem estar bem próximos, pois apresentaram uma frequência de recombinação muito baixa.

Foram obtidas diferentes frequências de transformação entre as linhagens mutantes, isto devido, em parte ao tamanho do segmento de DNA envolvido. No entanto, em qualquer frequência, esta variação entre as linhagens indicou que as mutações não foram idênticas, pelo menos na maioria dos casos.

Nota-se que a frequência de transformantes

nif⁺ obtidos com DNA mutante (Tabela 7) foi consideravelmente menor do que com o DNA da linhagem selvagem (Tabela 6). Os valores de recombinação dão uma estimativa da distância entre os genes *nif* e a partir desses dados, pode-se estabelecer a posição das mutações *nif* envolvendo *A. paspali* (Figura 7). Alguns valores discrepantes são observados entre os cruzamentos recíprocos, decorrentes da própria metodologia empregada, mas apesar disto, os dados sugerem que pelo menos três mutações diferentes estão relacionadas (*nif*⁻2, 3 e 5) e que *nif*⁻4 deve estar mais distante deste grupo.

A marca para resistência a ampicilina permaneceu em apenas dois cruzamentos envolvendo *nif*⁻4 (*nif*⁻4 x *nif*⁻5 e *nif*⁻4 x *nif*⁻1), conforme mencionado anteriormente, o que leva a pensar em ligação com *nif*⁻4. De acordo com LACKS e HOTCHKISS (1960), é conveniente o uso de uma marca de resistência em experimentos deste tipo, pois permite uma medida da frequência de transformação, independente de variações ocasionadas pelo uso de várias culturas receptoras, competência individual de cada uma delas ou uso de DNA em concentrações diferentes. No entanto, o aparecimento da marca de resistência em apenas dois cruzamentos, não permitiu que todas estas interferências citadas, fossem eliminadas.

Para melhor conhecimento a respeito da localização dos genes *nif* nesta bactéria, haveria necessidade

de se trabalhar com maior número de mutantes, cuja obtenção não foi possível. BISHOP e BRILL (1977) em experimento semelhante com *A. vinelandii*, não conseguiram estabelecer posições bem definidas para as mutações *nif*, apesar de utilizar maior número de mutantes.

Entretanto, deve-se ressaltar, que há certas dificuldades na utilização do método de transformação para se fazer mapeamento, pois o pedaço de DNA envolvido é pequeno e assim não é tão simples mostrar que dois genes são ligados, mesmo quando grande número de mutações são analisadas.

Foram obtidos resultados surpreendentes neste trabalho, quando se realizou a transformação intergenérica entre linhagens de *E. coli* com DNA de *A. paspali*. Como pode ser notado através dos dados da Tabela 8, obteve-se alguns transformantes, quando as linhagens receptoras foram HB101, C600 e R1drl19. No entanto, ao se confirmar o crescimento em meio isento de nitrogênio, apenas algumas colônias de HB101 e CA77 mantiveram a condição *nif*⁺. Nas demais a recombinação foi instável, não se mantendo nas gerações seguintes. Na literatura também há citações de transformações intergenéricas entre fixadores de N₂, onde DNA de espécies de *Rhizobium* foi transferido para linhagens de *A. vinelandii nif*⁻ (SEN *et alii*, 1969, citados por ELMERICH, 1984; MAIER *et alii*, 1978).

Convém salientar que a linhagem HB101, da mesma forma que a C600, é desprovida de mecanismos de restrição e modificação, mas devido a mutação perdeu a capacidade de recombinação ao nível cromossômico (rec^-). Há suspeitas de que esta linhagem perdeu a característica rec^- durante a estocagem, uma vez que utilizando-se esta mesma bactéria proveniente de outro laboratório, não se conseguiu os mesmos transformantes nif^+ . Além disto, também foram perdidas as marcas auxotróficas B_1 (incapacidade de produzir vitamina B_1) e lac^- (não utilização da lactose como fonte de carbono), confirmadas experimentalmente. No entanto, as demais marcas auxotróficas leucina e prolina, além das características culturais e morfológicas permaneceram inalteradas quando comparadas com a outra linhagem, o que afasta a possibilidade de ser um contaminante.

Estes fatos demonstram que há possibilidades reais de que tenha ocorrido recombinantes nif^+ de *E. coli* HB101, a partir da transformação com DNA total da bactéria fixadora. Por outro lado, não se obteve transformantes nif^+ estáveis da linhagem de *E. coli* C600, apesar das boas características apresentadas pelas células receptoras. Segundo OISHI e COSLOY (1974) e WACKERNAGEL (1973), a transformação de *E. coli* com DNA exógeno é possível com linhagens que perderam a enzima exonuclease, devido a mutação em rec B ou C , mas a capacidade de recombinação foi recuperada através

de uma supressão. Além disto, estes autores afirmam que a absorção de DNA é facilitada pelo tratamento das células receptoras em CaCl_2 . Deve ser ressaltado que a frequência de transformação de *E. coli* nos experimentos realizados, foi muito baixa, principalmente quando comparada com a obtida em cruzamentos interespecíficos (Tabela 6).

Os transformantes apresentaram capacidade de fixar N_2 na presença de oxigênio, da mesma forma que *Azotobacter*. Como já citado anteriormente, *Azotobacter* possui um eficiente sistema de proteção da nitrogenase, uma vez que fixa N_2 em presença de oxigênio, ao contrário de *Klebsiella* (anaerobiose) ou *Azospirillum* (microaerófilo) (BRILL, 1980). São perfeitamente compreensíveis os trabalhos descritos na literatura a respeito da transferência de genes *nif* para linhagens mutantes *nif*⁻, onde há expressão do caráter, mesmo em presença de oxigênio. Na maioria destes casos, as linhagens receptoras são *nif*⁻, mas possuem todo um sistema intacto de proteção da nitrogenase. No entanto, para que seja possível a expressão da condição *nif*⁺ em células receptoras originalmente não fixadoras de N_2 , é necessário que estas recebam por transformação, também os genes envolvidos com o sistema de proteção da nitrogenase. Entretanto, já foi constatado por CANNON (1976), a transferência do plasmídeo RP41 com parte dos genes *nif* de *Klebsiella* para *Azotobacter*, onde os genes *nif* também se expressaram, mesmo em aerobiose.

Através da análise dos resultados de transformação, várias considerações podem ser feitas. O fato de se ter conseguido transformantes *nif*⁺ de *E. coli* através do uso direto de DNA extraído de *A. paspali* leva a propor a hipótese de que os genes *nif*, nesta bactéria ou pelo menos parte deles, está em um único grupo, da mesma forma que em *Klebsiella* (ROBERTS e BRILL, 1981), possibilitando sua transferência através de um único segmento de DNA. Embora as posições dos genes *nif* em *Azotobacter* não estejam bem definidas, a análise de mutantes *nif*⁻ indicou que em *A. vinelandii*, estes não estão todos num mesmo grupo, sendo o mesmo constatado com *A. paspali* neste trabalho. Isso dificultaria a ocorrência de transformantes *nif*⁺ em bactérias receptoras não fixadoras, como é o caso de *E. coli*, uma vez que para a expressão do fenótipo em estudo, haveria necessidade da transferência de todo o grupo *nif*. Esta última observação não invalida a primeira hipótese pelos fatos já expostos nesta discussão, de que mesmo parte do segmento com genes *nif* de *Klebsiella* já se expressaram em *E. coli*. De acordo com STREICHER *et alii* (1972), há possibilidade de mais genes estarem relacionados com a fixação de N₂ em *Klebsiella*. Isto foi proposto pelo fato de que alguns mutantes não recombina-ram com a marca his, apesar de ter sido comprovado que o grupo *nif* nesta bactéria está próximo ao operon his.

Deve-se considerar também que KELLY e PRIT-

CHARD (1965) conseguiram a transferência de marcas distantes em *B. subtilis* ao utilizarem DNA de alto peso molecular. Assim, pode-se inferir que a ocorrência destes transformantes seriam resultado da transferência de marcas não muito próximas ou que apenas parte do grupo *nif* de *A. paspali* já foi suficiente para que o fenótipo *nif*⁺ se manifestasse. De qualquer forma, os resultados de transformação obtidos neste trabalho com a finalidade de mapear a região *nif*, não podem ser considerados conclusivos, visto que o número de mutantes analisados foi pequeno.

Apesar de *A. vinelandii* ser bem estudada, muitos detalhes necessitam ser conhecidos a respeito da posição dos genes *nif* no seu genoma, tendo sido demonstrado por BISHOP *et alii* (1980, 1982) a existência de um sistema alternativo de fixação de N₂ nestes organismos. Além disto, em trabalhos recentes, RUVKUN e AUSUBEL (1980) demonstraram que plasmídios contendo genes *nif* de *Klebsiella* hibridizaram com cinco diferentes fragmentos de DNA de *A. vinelandii*. Uma análise destes resultados leva a concluir que há mais do que uma região do cromossoma desta bactéria que contém homologia com *Klebsiella*. Provavelmente estas várias regiões de homologia correspondem a dois sistemas diferentes de fixação de N₂.

As Tabelas 10 e 11 mostram que apesar dos transformantes *nif*⁺ de *E. coli*, se desenvolverem em meio i-

sento de nitrogênio incorporado, a taxa de crescimento foi bem menor quando comparada com a linhagem original doadora. Em meio contendo nitrogênio incorporado, os transformantes também apresentaram menor crescimento que a própria linhagem HB101. Mas nenhuma diferença significativa foi observada na taxa de crescimento entre os transformantes, em qualquer dos meios considerados.

São várias as evidências indicando que os transformantes sejam realmente a bactéria *E. coli*, principalmente características morfológicas e fisiológicas. A dimensão das células bacterianas foi ligeiramente menor quando comparada com a linhagem original receptora. Esta alteração na dimensão celular não foi significativa em relação às diferenças encontradas por SEN e SEN (1965) ao fazerem transformações entre *A. vinelandii* e *A. chroococcum*. Observaram que quando *A. chroococcum* foi transformada com DNA de *A. vinelandii*, as colônias transformantes diferiram da linhagem original em cor, diâmetro e características bioquímicas. Alguns destes transformantes tinham ainda maior eficiência de fixação de N_2 do que a linhagem receptora. O mesmo foi observado quando a linhagem receptora foi *A. vinelandii* diferindo apenas no decréscimo da atividade de fixação de N_2 .

Dados coincidentes com a reduzida taxa de crescimento foram encontrados ao se avaliar a atividade da

nitrogenase nos transformantes, medida pela redução do acetileno. Observando-se os dados da Tabela 9, nota-se que a quantidade de nitrogenase nas amostras de transformantes foi muito pequena, em comparação com a linhagem do isolado 9 original. Foram testadas várias condições de crescimento das amostras, tais como incubação em ambiente com e sem oxigênio, tempo de incubação, etc, visando uma maior produção de nitrogenase. Os resultados apresentados na Tabela 9 foram os melhores conseguidos em todas as situações examinadas. Apos a colocação do gás acetileno, houve a necessidade de se incubar as amostras durante 24 horas, antes de se fazer a medida de etileno no cromatógrafo. Isto foi necessário por que a quantidade de nitrogenase presente nas amostras era muito pequena, ao nível do limite de sensibilidade do aparelho. Um estudo mais detalhado destes transformantes seria interessante futuramente, no sentido de se utilizar outras técnicas para detecção individual da atividade dos componentes I e II da nitrogenase.

Nenhum transformante foi obtido quando as células receptoras foram da levedura *S. cerevisiae*, o que já era esperado, pois não houve expressão nem mesmo quando os 17 genes *nif* de *Klebsiella* clonados em plasmídios foram introduzidos nessa levedura (ALADAR *et alii*, citados por BRILL, 1981). Segundo estes autores, embora não tenha ocorrido expressão da condição *nif*⁺, o experimento demonstrou que

pode haver transferência entre procariotos e eucariotos, res saltando ainda que o insucesso também foi devido à complexa transferência de características codificadas por vários genes, como é a fixação de N_2 . Neste caso, o DNA deveria ser primeiramente transcrito corretamente em RNA pelas leveduras, interpretando os sinais bacterianos para o início e final da transcrição. Em seguida, ser reconhecido pelos ribossomas como sendo mensageiro, para sua posterior tradução em proteína. Assim, para expressão da condição *nif*⁺, as 17 proteínas deveriam então atuar juntas no citoplasma estranho da célula de levedura, havendo provavelmente certas res trições para isto. Uma das hipóteses para esta dificuldade é que a molécula de nitrogenase exige em sua estrutura grande número de átomos de ferro, mas não é certeza que a levedura disponha deste requerimento, sem haver prejuízo da síntese de outras enzimas essenciais.

Recombinação entre levedura e bactéria também já foi realizada por BEGGS (1978), onde células de *S. cerevisiae* foram transformadas com o plasmídeo pMB9 (derivado de colE1 de *E. coli*), carregando o gene Leu 2 de levedura e resistência à tetraciclina conferida por gene bacteriano. Neste caso, foram obtidos com alta frequência transformantes de levedura leu⁺ e resistentes à tetraciclina, mostrando que leveduras podem ser transformadas por plasmídios híbridos. A análise de tétrades de transformantes obtidos

com pJDB219 e pJDB248, derivados de pMB9, mostraram que os plasmídios híbridos mantiveram-se extracromossomicamente na célula de levedura.

Diante do exposto, novas tentativas de transferência dos genes *nif* para leveduras devem ser feitas, pois estas são organismos facilmente propagáveis e sua semelhança bioquímica e fisiológica com bactérias permite o uso de técnicas desenvolvidas para sistemas bacterianos. Além disso, oferecem vantagens para estudos genéticos pela possibilidade de se apresentar nos estados haplóide e diplóide. Para os pesquisadores mais otimistas que julgam ser possível transferir no futuro os genes *nif* para plantas superiores, um dos passos intermediários seria uma melhor compreensão da recombinação entre genes de procariotos e eucariotos mais simples, como é o caso das leveduras.

5.2.2. Experimentos de conjugação

Os transformantes *nif* foram utilizados em vários experimentos de conjugação com linhagens de *E. coli*, a fim de se verificar uma possível transferência dos genes *nif* para estas bactérias. Inicialmente, os transformantes 101(9)1 a 6 serviram como células receptoras para os plasmídios carregados pelas linhagens Sa e Rldrd19, contendo marcas de resistência a drogas. A linhagem CA77 amp^R (Hfr) tam-

bém foi utilizada como doadora. Pode-se notar pelos dados da Tabela 12, que em alguns casos houve transferência do plasmídio para os transformantes, principalmente quando a linhagem doadora foi a Rldrd19. Desta forma, os transformantes continuaram a fixar N_2 , apresentando ainda resistência às drogas cloranfenicol e ampicilina, conferida pela aquisição do plasmídio da célula doadora. Apenas um caso de recombinação ocorreu quando a linhagem doadora foi a portadora do plasmídio Sa, onde foram selecionadas algumas colônias (Sa/101(9)2) que apresentaram crescimento em meio contendo cloranfenicol, sem adição de fontes de nitrogênio. Nos casos onde se constatou a transferência dos plasmídios pela aquisição de resistência a drogas, fez-se a confirmação através de eletroforese em gel de agarose. Desta forma, comprovou-se a presença dos plasmídios, pela banda eletroforética similar a encontrada nas linhagens doadoras.

O fato de ter ocorrido conjugação, não implica obrigatoriamente que doadoras e receptoras sejam da mesma espécie. Segundo BERINGER (1982), há possibilidade de conjugação entre diferentes espécies de bactérias Gram negativas. No entanto, os dados de conjugação obtidos reforçam os resultados de transformação entre *A. paspali* e *E. coli*.

Os transformantes *nif*⁺ e resistentes a drogas, foram posteriormente conjugados com linhagens F⁻ de *E. coli*, como C600 e 711, para se verificar a possibilidade dos

genes *nif* terem se incorporado aos plasmídios. Assim, poderia ter-se construído um plasmídio com genes para resistência e fixação de N_2 , facilmente transferível para outras linhagens receptoras. A linhagem HB101 não foi utilizada como receptora neste cruzamento, pois haveria dificuldade na comprovação da transferência do plasmídio, uma vez que as marcas auxotróficas carregadas pelas linhagens doadoras e receptoras seriam as mesmas. Conforme mostram os dados obtidos no item 4.8.1, os plasmídios foram transferidos para as linhagens receptoras, conferindo resistência a drogas antes não apresentada. Contudo, a incapacidade de fixar N_2 , permaneceu inalterada nas linhagens receptoras, onde se concluiu que os plasmídios não mobilizaram genes *nif* cromossômicos, na transferência para outras células. De acordo com BERINGER (1982), os plasmídios podem mobilizar fragmentos de DNA cromossômico durante a conjugação, fato que não ocorreu nestes experimentos.

Várias tentativas foram feitas no sentido de se obter uma linhagem transformante de *E. coli nif⁺* doadora, capaz de transferir estes genes para células receptoras. Os experimentos apresentados nos itens 4.6.3 e 4.8.1, onde respectivamente, a linhagem CA77 foi transformada com DNA do isolado 9 e a CA77 amp^R foi conjugada com cada um dos transformantes 101(9), são exemplos disto. Em ambos os casos, obteve-se alguns recombinantes em baixa frequência, mas foi

impossível a transferência dos genes *nif* através da conjugação com células receptoras. Isto leva a pensar que os genes *nif* não se incorporaram ao genoma da linhagem Hfr.

Os dados da Tabela 13 mostram a conjugação entre diferentes transformantes *nif*⁺ numa tentativa de melhorar a eficiência da nitrogenase. Partindo-se do princípio que cada transformante carregava diferentes segmentos *nif*, poderia haver complementação através do cruzamento entre eles. Assim, após o cruzamento, foram selecionadas as colônias de maior tamanho desenvolvidas em meio sem nitrogênio, o que de certa forma, demonstrou maior eficiência de fixação de N₂.

O fato de não ter havido aumento significativo na atividade da nitrogenase, conforme demonstram os dados da redução do acetileno, faz supor que os transformantes devem carregar o mesmo segmento *nif*, ou mais provavelmente, a linhagem CA77/101(9)2, não se comportou como doadora. Prova a favor desta última hipótese foi dada quando se tentou a conjugação desta provável doadora com outras linhagens F⁻ (C600, 711) e nada se conseguiu em termos de transferência dos genes *nif*.

Os cruzamentos envolvendo a linhagem de *E. coli* pcBT01/HB101, portadora do plasmídeo, com o transposon Tn5 (tc^R Amp^R), foram feitos para verificar a mobilização

destes nas linhagens receptoras. Conforme já citado na descrição das linhagens (Tabela 1), a resistência à tetraciclina e canamicina nesta bactéria, são conferidas respectivamente, por gene plasmidial e pelo Tn5 introduzido neste plasmídio. Os dados da Tabela 14 mostram que não se conseguiu a transferência do plasmídio nos casos onde as células receptoras foram os transformantes *nif*⁺, porém isto foi possível quando a receptora foi o próprio isolado 9. No entanto, após várias gerações, esta condição não foi mantida, possivelmente pela perda do plasmídio pois não houve crescimento dos recombinantes, nem em meio contendo apenas tetraciclina. Foram feitas várias combinações de meios de cultura acrescido dos antibióticos tetraciclina e canamicina (item 3.19.4), para se observar a mobilização de marcas pelo transposon.

BERG *et alii* (1975) e BERINGER *et alii* (1978) conseguiram a transferência de um plasmídio de *E. coli* contendo Tn5, resistente a canamicina, para *Rhizobium leguminosarum* (frequência de $10^{-6}\%$), onde este se inseriu no cromossoma da bactéria receptora.

A partir destas observações, nota-se que é possível a existência de um sistema diferente de fixação de N₂ no isolado 9 (*A. paspali*) em estudo, pois além da espécie não ter sido anteriormente estudada geneticamente, deve-se considerar que esta foi isolada diretamente do solo, podendo apresentar características próprias, ao contrário de ou-

tras culturas pertencentes a coleções e já bem caracterizadas. De qualquer forma, para resultados mais conclusivos há necessidade de outros experimentos genéticos e mesmo bioquímicos, pois todas estas especulações são apenas hipóteses. Em termos genéticos, o sistema aqui estudado merece destaque, pois abre novas perspectivas para experimentos futuros, onde estes genes *nif* poderão ser melhor mapeados com a utilização de maior número de mutantes, ou ainda com a utilização de transdução. Para isto, haveria necessidade de detecção de fagos específicos, fato que não foi verificado neste trabalho, mas comprovados para outras espécies de *Azotobacter*. Se realmente estas considerações forem válidas, tem-se aqui um sistema ideal para transferir genes *nif* para outras bactérias não fixadoras típicas de solo, seja por transformação ou mesmo através da clonagem em plasmídios amplificadores. De acordo com HELINSKI (1977), plasmídios de *E. coli* contendo genes *nif* de *Klebsiella* clonados podem ser transferidos para outras bactérias Gram negativas, mas não se mantêm estável quando as receptoras não são relacionadas filogeneticamente. Sendo assim, o uso destes plasmídios é limitado na agricultura para bactérias não relacionadas com a *E. coli*. Resultados práticos, visando o aumento da produtividade em gramíneas normalmente associadas com *A. paspali* em estudo, levam a pensar de imediato no aumento da capacidade de fixar N_2 atmosférico às custas de manipulação genética, devido a um incremento da produção de nitrogenase.

6. CONCLUSÕES

O estudo de genes envolvidos com o processo de fixação assimbiótica de N_2 , em populações selvagens do solo, forneceu resultados que permitem tirar as seguintes conclusões:

(1) Dentre os isolados bacterianos que apresentaram plasmídios, não se detectou a presença de genes plasmidiais relacionados com o processo de fixação de N_2 .

(2) Foi possível efetuar testes de complementação utilizando-se transformação com DNA total entre mutantes nif^- do isolado 9, verificando-se que alguns genes nif estão próximos ao longo do cromossoma bacteriano.

(3) A obtenção de transformantes nif^+ de *E. coli* capazes de fixar N_2 em aerobiose, mas produzindo baixa atividade de nitrogenase, demonstrou que a maioria dos genes

nif funcionais estão em um grupo capaz de ser transferido num único segmento de DNA. Isto permite considerar a hipótese de um sistema alternativo de fixação de N_2 em *Azotobacter*, como propõem alguns autores.

(4) Não se obteve transformantes *nif*⁺ quando a linhagem receptora foi a levedura *S. cerevisiae*, mostrando que ainda há grandes restrições na transferência de material genético entre procariotos e eucariotos.

(5) Devido a metodologia usada, reparo pós-mutacional ou instabilidade genética, não foi possível manter grande número de mutantes (*nif*⁻ ou auxotróficos) e transformantes *nif*⁺ a partir do isolado 9.

(6) A transferência de marcas de resistência de *E. coli* para os transformantes, demonstrou que não ocorreram barreiras para a transferência de material genético entre estas linhagens.

(7) Pode-se sugerir a hipótese da existência de sistemas fixadores de N_2 diferentes daqueles já verificados para outras bactérias do gênero *Azotobacter*.

(8) O isolado selvagem 9 de *A. paspali* abre novas perspectivas no sentido aplicado, pois através de sua manipulação genética pode ser conseguido um aumento da pro-

atividade em nitrogênio fixável para as gramíneas às quais estas bactérias estão frequentemente associadas.

(9) Pode ser possível a transferência do segmento *nif* por transformação, para outras bactérias não fixadoras típicas de solo, da mesma forma que foi possível para *E. coli*.

7. LITERATURA CITADA

ASHESHOV, E.H., 1966. Loss of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* resulting from growth at higher temperature. *Journal of General Microbiology*. London, 42: 403-410.

AUSUBEL, F.M., 1980. Application of recombinant DNA technology to the study of nitrogen fixation. In: SUBBA RAO, N.S., Ed. *Recent advances in biological nitrogen fixation*. Edward Arnold, London, p. 257-280.

BANFALVI, Z.; V. SAKANYAN; C. KONCZ; A. KISS; I. DUSHA e A. KONDOROSI, 1981. Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *Rhizobium meliloti*. *Molecular and General Genetics*. Berlin, 184: 318-325.

- BAREA, J.M. e M.E. BROWN, 1975. Effects on plant growth produced by *Azotobacter paspali* related to synthesis of plant growth regulating substances. *Journal Applied Bacteriology*. Reading, 37(4): 583-593.
- BECKING, J.H., 1962. Species differences in molybdenum and vanadium requirements and combined nitrogen utilization by *Azotobacteriaceae*. *Plant and Soil*. The Hague, 16: 171-201.
- BEGGS, J.D., 1978. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature*. London, 275: 104-109.
- BENEMANN, J.R. e R.C. VALENTINE, 1972. The pathways of nitrogen fixation. *Advances in Microbial Physiology*. London, 8: 59-98.
- BENSON, D.R.; D.J. ARP e R.H. BURRIS, 1979. Cell-free nitrogenase and hydrogenase from actinorhizal root nodules. *Science*. New York, 205: 688-689,
- BERG, D.E.; J. DAVIES; B. ALLET e J.D. ROCHAIX, 1975. Transposition of R factor genes to bacteriophage λ . *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Washington, 72: 3628-3632.

BERINGER, J.; J.L. BEYNON; A.V. BUCHANAN-VOLLASTON e A.W.B. JOHNSTON, 1978. Transfer of the drug-resistance transposon Tn5 to *Rhizobium*. *Nature*. London, 275: 633-634.

BERNDT, H.; K.P. OSTWAL; J. LALUCAT; C. SCHUMANN; F. MAYER e H.G. SCHLEGEL, 1976. Identification and physiological characterization of the nitrogen fixing bacterium *Corynebacterium autotrophicum*. *Archive of Microbiology*. Berlin, 108: 17-26.

BEYNON, J.L.; J.E. BERINGER e A.W.B. JOHNSTON, 1980. Plasmids and host range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli*. *Journal of General Microbiology*. London, 120: 421-429.

BIGGINS, D.R.; M. KELLY e J.R. POSTGATE, 1971. Resolution of nitrogenase of *Mycobacterium flavum* 301 into two components and cross reaction with nitrogenase components from other bacteria. *European Journal Biochemistry*. Berlin, 20: 140-143.

BISHOP, P.E. e W.J. BRILL, 1977. Genetic analysis of *Azotobacter vinelandii* mutants strains unable to fix nitrogen. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 130: 954-956.

- BISHOP, P.E.; F.B. DAZZO; E.R. APPELBAUM; R.J. MAIER e W.J. BRILL, 1977a. Intergeneric transfer of genes involved in the *Rhizobium* legumes symbiosis. *Science*. New York, 198: 938-940.
- BISHOP, P.E.; D.M.L. JARLENSKI e D.R. HETHERINGTON, 1980. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Washington, 77: 7342-7346.
- BISHOP, P.E.; D.M.L. JARLENSKI e D.R. HETHERINGTON, 1982. Expression of an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. USA, 150: 1244-1251.
- BISHOP, P.E.; M.A. SUPIANO e W.J. BRILL, 1977b. Technique for isolating phage for *Azotobacter vinelandii*. *Applied Environmental Microbiology*. Washington, 23: 1007-1008.
- BODDEY, R.M.; P.M. CHALK; R.L. VICTORIA; E. MATSUI e J. DOBEREINER, 1983. The use of the ^{15}N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum*. *Canadian Journal Microbiology*. Ottawa, 29: 1036-1045.

BOVANCHAUD, D.H.; M.R. SCAVIZZI e Y.A. CHABBERT, 1969.

Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in enterobacteria and staphylococci. *Journal of General Microbiology*. London, 54: 417-425.

BRADLEY, D.E., 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriological Reviews*, 31: 230-314.

BREED, R.S.; E.G.D. MURRAY e N. SMITH, 1974. - Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams e Wilkins Company, Baltimore.

BREWIN, N.J.; J.E. BERINGER; A.V. BUCHANAN-WOLLASTON; A.W.B. JOHNSTON e P.R. HIRSCH, 1980. Transfer of symbiotic genes with bacteriocinogenic plasmids in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*. London, 116: 261-270.

BRILL, W.J., 1976. Control of nitrogenase synthesis in *Azotobacter vinelandii*. In: NUTMAN, P.S., Ed., *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Cambridge University Press. p. 39-47.

BRILL, W.J., 1977. Biological nitrogen fixation. *Scientific American*. New York, 236: 68-81.

- BRILL, W.J., 1980. Biochemical genetics of nitrogen fixation. *Microbiological Reviews*. New York, 44: 449-467.
- BRILL, W.J., 1981. Agricultural microbiology. *Scientific American*. New York, 245: 199-215.
- BRILL, W.J.; J. WESTPHAL; M. STIEGHORST; L.C. DAVIS e V.K. SHAH, 1974. Detection of nitrogenase components and other nonheme iron proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. New York, 60: 237-241.
- BRODA, P., 1979. *Plasmids*. W.H. Freeman and Company. Oxford. 188 p.
- BROWN, M.E., 1976. Role of *Azotobacter paspali* in association with *Paspalum notatum*. *Journal Applied Bacteriology*. England, 40: 341-348.
- BUCHANAN-WOLLASTON, V.; M.C. CANNON; J.L. BEYNON e F.C. CANNON, 1980. Role of *nif A* gene product in the regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*. London, 294: 776-778.
- BULEN, W.A.; R.C. BURNS e J.R. LeCOMTE, 1964. Nitrogen fixation: cell-free system with extracts of *Azotobacter*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.

New York, 17: 265-271.

BULEN, W.A. e J.R. LECOMTE, 1962. Isolation and properties of a yellow green fluorescent peptide from *Azotobacter* medium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. New York, 9: 523-528.

BULEN, W.A. e J.R. LECOMTE, 1966. The nitrogenase system from *Azotobacter*: two enzyme requirement for N_2 reduction, ATP dependent H_2 evolution, and ATP hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Science*. Washington, 56: 979-986.

BUNS, R.C.; R.D. HOLSTEN e R.W.F. HARDY, 1970. Isolation and cristallization of the MoFe protein of *Azotobacter* nitrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. New York, 39: 90-99.

BUSH, J.A. e P.W. WILSON, 1959. A non-gummy chromogenic strain of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 184: 381.

CANNON, F.C. e J.R. POSTGATE, 1976. Expression of *Klebsiella* nitrogen fixation genes (*nif*) in *Azotobacter*. *Nature*. London, 260: 271-272.

- CANNON, F.C.; G.E. RIEDEL e F.M. AUSUBEL, 1977. Recombinant plasmid that carries part of the nitrogen fixation (*nif*) gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA, 74: 2963-2967.
- CASSE, F.; C. BOUCHER; J.S. JULLIOT; M. MICHEL e J. DÉNARIÉ, 1979. Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *Journal of General Microbiology*. Great Britain, 113: 229-242.
- CHEN, J.S.; J.S. MULTANI e L.E. MORTENSON, 1973. Structural investigation of nitrogenase components from *Clostridium pasteurianum* and comparison with similar components of other organisms. *Biochimica et Biophysica Acta*. New York, 310: 51-59.
- CHUML, V.A.; B.J. THOMPSON; B.L. SMILEY e R.C. WARNER, 1960. Properties of *Azotobacter* phage PAV-1 and its DNA. *Virology*. New York, 102: 262-266.
- CLEWELL, D.B., 1972. Nature of Col E1 plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 110: 667-676.
- COHEN, S.N.; A.C.Y. CHANG e L. HUE, 1972. Non chromosomal

antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Science*. Washington, 69: 2110-2114.

CORBIN, L. e W.A. BULEN, 1969. The isolation and identification of 2,3-dihydroxybenzoic acid and 2-N, 6-N-di-(2,3-dihydroxy-benzoyl)-L-lysine formed by iron-deficient *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*. New York, 8: 757-762.

DALTON, H. e J.R. POSTGATE, 1969. Effect of oxygen on growth of *Azotobacter chroococcum* in batch and continuous cultures. *Journal of General Microbiology*. London, 54: 463-473.

DALTON, H. e J.R. POSTGATE, 1969. Growth and physiology of *Azotobacter chroococcum* in continuous culture. *Journal of General Microbiology*. London, 56: 307 - 319.

DATTA, N. e R.W. HEDGES, 1971. Compatibility groups among fi-R factors. *Nature*. London, 234: 222.

DAVID, M.; M. TRONCHET e J. DÉNARIÉ, 1981. Transformation of *Azotobacter vinelandii* with plasmids RP4 (Inc P-1 group) and RSF 1010 (Inc Q group). *Journal of Bacteriology*.

Baltimore, 146: 1154-1157.

DAVIS, L.C.; V.K. SHAH; W.J. BRILL e W.H. ORME-JOHNSON, 1972.

Nitrogenase II. Changes in the EPR signal of component
..I (iron-molybdenum protein) of *Azotobacter vinelandii*
during repression and derepression. *Biochimica et*
Biophysica Acta. New York, 256: 512-523.

DETROY, R.W.; D.F. WITZ; R.A. PAREJKO e P.W. WILSON, 1968.

Reduction of N₂ by complementary functioning of two
components from nitrogen-fixing bacteria. *Proceedings*
of the National Academy of Sciences. USA, 61: 537-541.

DILWORTH, M.J., 1966. Acetylene reduction by nitrogen-
fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*.

Biochimica et Biophysica Acta. New York, 127: 285-294.

DITTA, G.; S. STANFIELD; D. CORBIN e D. HELSINKI, 1980.

Broad host range DNA cloning system from Gram negative
bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium*
meliloti. *Proceedings of the National Academy of Science*.
Washington, 77: 7347-7351.

DIXON, R.; F.C. CANNON e A. KONDOROSI, 1976. Construction
of a P plasmid carrying nitrogen fixation genes from *K.*
pneumoniae. *Nature*. London, 260: 268-271.

- DIXON, R.; C. KENNEDY; A. KONDOROSI; V. KRISHNAPILLAI e M. MERRICK, 1977. Complementation analysis of *Klebsiella pneumoniae* mutants defective in nitrogen fixation. *Molecular and General Genetics*. Berlin, 157: 189-198.
- DOBEREINER, J., 1966. *Azotobacter paspali* sp n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Rio de Janeiro, 11: 357-365.
- DOBEREINER, J., 1973. Fixation of atmospheric nitrogen in the rhizosphere of tropical gramine. *Revista de Microbiologia*. São Paulo, 1: 461-481.
- DOBEREINER, J., 1977. Potential for nitrogen fixation in tropical legumes and grasses. In: DOBEREINER, J. *et alii*, Eds., *Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics*. Plenum Press, New York. p. 13-24.
- DOBEREINER, J.; J.M. DAY e P.J. DART, 1972. Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum* - *Azotobacter paspali* association. *Journal of General Microbiology*. London, 71: 103-116.
- DOBEREINER, J.; J.M. DAY e P.J. DART, 1973. Rhizosphere

associations between grasses and nitrogen fixing bacteria. Effect of O_2 on nitrogenase activity in the rhizosphere of *Paspalum notatum*. *Soil Biology Biochemistry*. New York, 5: 157-159.

DOMINGO, E.; N. GORDON e R. WARNER, 1972. *Azotobacter* phages: properties of phage A12, A21, A31, A41 and their constituents DNAs. *Virology*. New York, 49: 439-452.

DROZD, J. e J.R. POSTGATE, 1970. Effect of oxygen on acetylene reduction cytochrome content and respiratory activity of *Azotobacter chroococcum*. *Journal of General Microbiology*. London, 63: 63-73.

DROZD, J.; R.S. TUBB e J.R. POSTGATE, 1972. A chemostat study of the effect of fixed nitrogen sources on nitrogen fixation, membranes and free amino-acids in *Azotobacter chroococcum*. *Journal of General Microbiology*. London, 73: 221-232.

DUFF, J.T. e O. WYSS, 1961. Isolation and characterization of a new series of *Azotobacter* bacteriophages. *Journal of General Microbiology*. London, 24: 273-289.

EADY, R.R.; R. ISSACH; C. KENNEDY; J.R. POSTGATE e H.D. RATCLIFFE, 1978. Nitrogenase synthesis in *Klebsiella*

pneumoniae: comparison of ammonium and oxygen regulation. *Journal of General Microbiology*. London, 104: 277 - 285.

EADY, R.R. e J.R. POSTGATE, 1974. Nitrogenase. *Nature*. London, 249: 805-810.

ELMERICH, C., 1984. *Azotobacter* and *Azospirillum* genetics and molecular Biology. In: SUBBA RAO, N.S., Ed., *Currents developments in biological nitrogen fixation*. Oxford, IBH publishing Co., New Delhi. p. 315-346..

ELMERICH, D.W. e R.H. BURRIS, 1978. Complementary functioning of the component proteins of nitrogenase from several bacteria. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 134: 936-943.

EPHRATI-ELIZUR, E.; P.R. SRINIVASAN e S. ZAMENHOF, 1961. Genetic analysis of means of transformation of histidine linkage groups in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Science*. Washington, 47: 56-63.

ESCHEVERRIGARAY, S.L., 1983. Estabilidade genética e heterose em híbridos interespecíficos de leveduras. Piracicaba, ESALQ/USP, 167 p. (Dissertação de Mestrado).

- ESPIN, G.; A. ALVAREZ-MORALES; F. CANNON; R. DIXON e M. MERRICK, 1982. Cloning of the *glnA*, *ntrB*, *ntrC* genes of *Klebsiella pneumoniae* and studies of their role in regulation of the nitrogen fixation (*nif*) gene cluster. *Molecular and General Genetics*. Berlin, 186: 518-524.
- EVANS, H.J. e L.E. BARBER, 1977. Biological nitrogen fixation for food and fiber production. *Science*. New York, 197: 332-339.
- FISHER, R. e W.J. BRILL, 1969. Mutant of *Azotobacter vinelandii* unable to fix nitrogen. *Biochimica et Biophysica Acta*. New York, 184: 99-105.
- FRANCE, C. e C. ELMERICH, 1981. Physiological properties and plasmid content of several strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum*. *Annales de microbiologie, Institut Pasteur*. Paris, 132A: 3-17.
- FRANCE, C.; C. ROSEMBERG; B. QUIVIGER e C. ELMERICH, 1981. Plasmid and bacteriophages of *Azospirillum*. *The Society for General Microbiology Quartely*. England, 8:136.
- FRANCO, A.A.; J.R.R. PERES e M. NERY, 1978. The use of *Azotobacter paspali* N_2 -ase (C_2H_2 - reduction activity) to measure molybdenum deficiency in soils. *Plant and*

Soil. The Hague, 50: 1-11.

FRIEDMAN, A.M.; S.R. LONG; S.E. BROWN; W.J. BUIKEMA e F.M.

AUSUBEL, 1982. Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene*. Amsterdam, 18: 289-296.

GORDON, J.K. e W.J. BRILL, 1972. Mutants that produce nitrogenase in the presence of ammonia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Washington, 69: 3501-3503.

GORDON, J.K. e W.J. BRILL, 1974. Derepression of nitrogenase synthesis in the presence of excess NH_4^+ . *Biophysical Research Communications*. New York, 59: 967-971.

GORDON, J.K. e R.A. MORE, 1981. Ammonium and methylammonium transport by the nitrogen fixing bacterium *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 148: 435-442.

GORDON, J.K.; V.K. SHAH e W.J. BRILL, 1981. Feedback inhibition of nitrogenase. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 148: 884-888.

- GREEN, M.; M. ALEXANDER e P.W. WILSON, 1953. Mutants of the *Azotobacter* unable to use N_2 . *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 66: 623-624.
- GROSS, D.C.; A.K. VIDAVER e R.V. KLUCAS, 1979. Plasmids, biological properties and efficacy of nitrogen fixation in *Rhizobium japonicum* strains indigenous to alkaline soils. *Journal of General Microbiology*. London, 114: 257-266.
- GUERRY, P.; J. Van EMBDEN e S. FALKOW, 1974. Molecular nature of two nonconjugative plasmids carrying drug resistance genes. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 117: 619-630.
- HAAKER, H. e C. VEEGER, 1977. Involvement of the cytoplasmic membrans in nitrogen fixation by *Azotobacter vinelandii*. *European Journal Biochemistry*. Berlin, 77: 1-10.
- HAGEMAN, R.V. e R.H. BURRIS, 1978. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Washington, 75: 2699-2702.
- HAUSINGER, R.P. e J.B. HOWARD, 1980. Comparison of the iron proteins from the nitrogen fixation complexes of

Azotobacter vinelandii, *Clostridium pasteurianum* and *Klebsiella pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Washington, 77: 3826-3830.

HELINSKI, D.R., 1977. Plasmids as vector for gene cloning.

In: HOLAENDER, A., Ed., *Genetic engineering for nitrogen fixation*. Plenum Press, New York. p. 19-49.

HIGASHI, S., 1967. Transfer of clover infectivity of *Rhizobium trifolii* to *Rhizobium phaseoli* as mediated by an episomic factor. *Journal General Applied of Microbiology*. Tokio, 13: 391-403.

HILL, S.; C. KENNEDY; E. KAVANAGH; R.B. GOLBERG e R. HANAU, 1981. Nitrogen fixation gene (*nif L*) involved in oxygen regulation of nitrogenase synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*. London, 290: 424-426.

JENSEN, V., 1961. Rhamnose for detection and isolation of *Azotobacter vinelandii* Lipman. *Nature*. London, 190: 823-833.

JOHNSTON, A.W.B.; J.L. BEYNON; A.V. BUCHANAN-WOLLASTON; S. M. SETCHELL; P.R. HIRSCH e J.F. BERINGER, 1978. High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature*, London, 276: 635-636.

- JOHNSTON, J.H. e M.H. RICHMOND, 1970. The increased rate of loss of penicillinase plasmids from *Staphylococcus aureus* in the presence of rifampicin. *Journal of General Microbiology*. London, 60: 137-139.
- KADO, C.I. e S.T. LIU, 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 145: 1365-1373.
- KARLSSON, J.L. e H.A. BARKER, 1948. Induced biochemical mutants of *Azotobacter agilis*. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 56: 671-677.
- KELLY, M., 1969a. Some properties of purified nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*. *Biochimica et Biophysica Acta*. New York, 171: 9-22.
- KELLY, M., 1969b. Comparisons and cross reactions of nitrogenase from *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter chroococcum* and *Bacillus polymyxa*. *Biochimica et Biophysica Acta*. New York, 191: 527-540.
- KELLY, M.S. e R.H. PRITCHARD, 1965. Unstable linkage between genetic markers in transformation. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 89: 1314-1321.

KENNEDY, C., 1977. Linkage map of the nitrogen (*nif*) genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular and General Genetics*. Berlin, 157: 199-204.

KENNEDY, C.; F. CANNON; M. DIXON e J.R. POSTGATE, 1981. Recent advances in the genetics and regulation of nitrogen fixation. In: _____, Eds., *Current perspectives in nitrogen fixation*. Elsevier, p. 146-156.

KENNEDY, C.; R. EADY; E. KONDOROSI e D.K. REKOSH, 1976. The molybdenum-iron protein of *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase. Evidence for nonidentical subunits from peptide mapping. *Biochemical Journal*. Cambridge, 155: 383-389.

KENNEDY, C. e R.L. ROBSON, 1983. Activation of *nif* gene expression in *Azotobacter* by the *nif A* gene product of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*. London, 301: 626-628.

KNOVICKA, J.; L. POPE e O. WYSS, 1972. Morphology and nucleic acid composition of *Azotobacter* bacteriophages. *Journal of virology*. Michigan, 10: 150-152.

KONDOROSI, A.; E. VINCZE; A.W.B. JOHNSTON e J.E. BERINGER, 1980. A comparison of three *Rhizobium* linkage maps. *Molecular and General Genetics*. Berlin, 178: 403-408.

- KROL, A.J.M.; J.G.J. HONTELEZ; B. ROOZENDAAL e A. van KAMEN, 1981. On the operon structure of the nitrogenase genes of *Rhizobium leguminosarum* and *Azotobacter vinelandii*. *Nucleic Acids Research*. Michigan, 10: 4147-4157.
- LAANE, C.; W. KRONE; W. KONINGS; H. HAAKER e C. VEEGER, 1980. Short term effect of ammonium chloride on nitrogen fixation by *Azotobacter vinelandii* and by bacteroids of *Rhizobium leguminosarum*. *European Journal of Biochemistry*. Berlin, 103: 39-46.
- LACKS, S. e R.D. HOTCHKISS, 1960. A study of the genetic material determining an enzyme activity in *Pneumococcus*. *Biochimica et Biophysica Acta*. New York, 39: 508-518.
- LEES, H. e J.R. POSTGATE, 1973. The behavior of *Azotobacter chroococcum* in oxygen- and phosphate-limited chemostat culture. *Journal of General Microbiology*. London, 75: 161-166.
- LEDERBERG, J. e E.M. LEDERBERG, 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 63: 399-406.
- LEMOS, M.V.F., 1980. Estudos genéticos no microrganismo fixador do nitrogênio *Azospirillum brasilense*. Ribeirão

Preto, 70 p. (Tese de Doutorado).

LEONARD, C.G. e M.J. MATTHEIS, 1965. Different transforming characteristics of colonial variants from auxotrophic mutants of *Bacillus licheniformis*. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 90: 558-559.

LUDELL, D.J. e J.B. HOWARD, 1978. Isolation and partial characterization of two different subunits from the molybdenum-iron protein of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase. *Journal of Biological Chemistry*. New York, 253: 3422-3426.

MACHADO, V.C. e J. DOBEREINER, 1969. Estudos complementares sobre a fisiologia de *Azotobacter paspali* e sua dependência da planta (*Paspalum notatum*). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Rio de Janeiro, 4: 53-58.

MAIER, R.J. e W.J. BRILL, 1976. Ineffective and non-nodulating mutant strains of *Rhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 127: 763-769.

MAIER, R.J.; P.E. BISHOP e W.J. BRILL, 1978. Transfer from *Rhizobium japonicum* to *Azotobacter vinelandii* of genes required for nodulation. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 134: 1199-1201.

- MANDEL, M. e A. HIGA, 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology*. New York, 53: 159-162.
- MARCUS, L. e T. KANESHIRO, 1972. Lipid composition of *Azotobacter vinelandii* in which the internal membrane network is induced or repressed. *Biochimica et Biophysica Acta*. New York, 288: 296-303.
- MAY, J.W.; R.H. HOUGHTON e C.J. PERRET, 1964. The effect of growth at elevated temperatures on some heritable properties of *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology*. London, 37: 157-169.
- MAZUR, B.; D. RICE e R. HASELKORN, 1980. Identification of blue green algal nitrogen fixation genes by using heterologous DNA hybridization probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA, 77: 186-190.
- MERRICK, M.J., 1982. A new model for nitrogen control. *Nature*. London, 267: 362-363.
- MEYERS, J.A.; D. SANCHES; L.P. ELWELL e S. FALKON, 1976. A simple agarose electrophoresis method for identification and characterization of plasmid deoxiribonucleic acid. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 127: 1529-1537.

MISHRA, A.K. e O. WYSS, 1969. An adenine-requiring mutant of *Azotobacter vinelandii* blocked in inosinic acid synthesis. *Experientia*. Basel, 21: 85- 88.

MONSOUR, V.; O. WYSS; D.S. KELLOG e D.S. JUNIOR, 1955.
A bacteriophage for *Azotobacter*. *Journal of Bacteriology*.
Baltimore, 70: 486-487.

MORTENSON, L.E.; J.A. MORRIS e D.Y. YENG, 1967. Purification, metal composition and properties of molybdo-ferredoxin and azoferredoxin, two of the components of the nitrogen-fixing system of *Clostridium pasteurianum*. *Biochimica et Biophysica Acta*. New York, 127: 18-25.

MUMFORD, F.E.; J.E. CARNAHAN e J. CASTLE, 1959. Nitrogen fixation of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 77: 86-90.

NAGATANI, H.H. e W.J. BRILL, 1974. The effect of Mo, W and V on the synthesis of nitrogenase components in *Azotobacter vinelandii*. *Biochimica et Biophysica Acta*. New York, 362: 160-166.

NAGATANI, H.H.; M. SHIMIZU e R.C. VALENTINE, 1971. The mechanism of ammonia assimilation in nitrogen fixing bacteria. *Archive of Microbiology*. Berlin, 79: 164-175.

NAGATANI, H.H.; V.K. SHAH e W.J. BRILL, 1974. Activation of inactive nitrogenase by acid treated component I. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 120: 697-701.

NEIRA, C.A. e J. DOBEREINER, 1977. Nitrogen fixation in grasses. *Advances in Agronomy*. New York, 29: 1-38.

NESTER, E.W. e J. LEDERBERG, 1961. Linkage of genetic units of *Bacillus subtilis* in DNA transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Washington, 47: 52-55.

NORRIS, J.R. e D.W. RIBBONS, 1970. *Methods in Microbiology*. vol. 3A - Academic Press, London. 795 p.

NUTI, M.P.; A.M. LEDEBOER; A.A. LEPIDI e R.A. SCHILPEROORT, 1977. Large plasmids in different *Rhizobium* species. *Journal of General Microbiology*. London, 100: 241 - 248.

OISHI, M. e S.D. COSLOY, 1974. Specialised transformation in *Escherichia coli* K12. *Nature*. London, 248: 112-116.

OPPENHEIM, J. e L. MARCUS, 1970. Correlation of ultra-structure in *Azotobacter vinelandii* with nitrogen source of growth. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 101: 286-291.

OPPENHEIM, J.; R.J. FISHER; P.W. WILSON e L. MARCUS, 1970.

Properties of a soluble nitrogenase in *Azotobacter*.

Journal of Bacteriology. Baltimore, 101: 292-296.

PAGE, W.J., 1977. Transformation of *Azotobacter vinelandii*

strains unable to fix nitrogen with *Rhizobium* spp DNA.

Canadian Journal of Microbiology. Ottawa, 24: 209-214.

PAGE, W.J. e J.L. DORAN, 1981. Recovery of competence in

calcium limited *Azotobacter vinelandii*. *Journal of*

Bacteriology. Baltimore, 146: 33-40.

PAGE, W.J. e H.L. SADOFF, 1976a. Physiological factors

affecting transformation of *Azotobacter vinelandii*.

Journal of Bacteriology. Baltimore, 125: 1080-1087.

PAGE, W.J. e H.L. SADOFF, 1976b. Control of transformation

competence in *Azotobacter vinelandii* by nitrogen

catabolite derepression. *Journal of Bacteriology*.

Baltimore, 125: 1088-1095.

PAGE, W.J. e M. von TIGERSTROM, 1978. Induction of

transformation competence in *Azotobacter vinelandii*

iron-limited cultures. *Canadian Journal of*

Microbiology. Ottawa, 24: 1590-1594.

- PAGE, W.J. e M. von TIGERSTROM, 1979. Optimal conditions for transformation of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 139: 1058-1061.
- PIENKOS, P.T. e W.J. BRILL, 1981. Molybdenum accumulation and storage in *Klebsiella pneumoniae* and *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 145: 743-751.
- PIENKOS, P.T.; S. KLEVICKIS e W.J. BRILL, 1981. *In vitro* activation of inactive nitrogenase component I with molybdate. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 145: 248-256.
- POLSINELLI, M.; E. BALDANZI; M. BAZZICALUPO e E. GALLORI, 1980. Transfer of plasmid pRD1 from *Escherichia coli* to *Azospirillum brasilense*. *Molecular and General Genetics*. Berlin, 178: 709-711.
- POSTGATE, J.R. e KRISHNAPILLAI, V., 1977. Expression of *Klebsiella nif* and *his* genes in *Salmonella typhimurium*. *Journal of General Microbiology*. London, 98: 379 - 385.
- PRAKASH, R.K.; R.A. SCHILPEROORT e M.P. NUTI, 1981. Large plasmids of fast-growing rhizobia: homology studies and

location of structural nitrogen fixation (*nif*) genes.
Journal of Bacteriology. Baltimore, 145: 1129-1136.

QUINTO, C.; H. de La VEGA; M. FLORES; L. FERNANDEZ; T.
BALLADO; G. SOBERON e R. PALACIOS, 1982. Nitrogen
fixation genes are reiterated in *Rhizobium phaseoli*.
Nature. London, 299: 724-726.

QUISPEL, A., 1974. Introduction general. In: _____, Ed.,
The biology of nitrogen fixation. North-Holland Publ.
Co., Amsterdam. p. 1-8.

RICE, D.G.; B.J. MAZUR e R. HASELKORN, 1982. Isolation and
physical mapping of nitrogen fixation genes from the
cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Journal of Biological*
Chemistry. New York, 257: 13157-13163.

RICKENBERG, H.V., 1974. Cyclic-AMP in prokariotes. *Annual*
Review Microbiology. Palo Alto, 28: 353-369.

RIVERA-ORTIZ, M. e R.H. BURRIS, 1975. Interactions among
substrates and inhibitors of nitrogenase. *Journal of*
Bacteriology. Baltimore, 123: 537-545.

ROBSON, R.L., 1979. Characterization of an oxygen stable
nitrogenase complex isolated from *Azotobacter chroococcum*.

Biochemical Journal. Cambridge, 181: 569-575.

ROBSON, R.L., 1981. Detection and function of indigenous plasmids of *Azotobacter*. *The Society for General Microbiology Quarterly*. England, 8: 136-137.

ROBSON, R.L. e J.R. POSTGATE, 1980. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Annual Review Microbiology*. Palo Alto, 34: 183-207.

ROBERTS, G.P. e W.J. BRILL, 1981. Genetics and regulation of nitrogen fixation. *Annual Review Microbiology*. Palo Alto, 35: 207-235.

ROBERTS, G.P.; T. MAC NEIL; D. MAC NEIL e W.J. BRILL, 1978. Regulation and characterization of protein products coded by the *nif* (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 136: 267-279.

ROSENBERG, C.; P. BOISTARD; J. DÉNARIÉ e F. CASSE-DELBARD, 1981. Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. *Molecular and General Genetics*. Berlin, 184: 326-333.

- RUBIN, S.T. e E.D. ROSENBLUM, 1975. Effects of ethidium bromide on growth and on loss of the penicillinase plasmid of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 108: 1200-1204.
- RUVKUN, G.B. e F.M. AUSUBEL, 1980. Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Washington, 77: 191-195.
- SADOFF, H.L.; E. BERKE e B. LOPERFIDO, 1971. Physiological studies of encystment in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 105: 185-189.
- SADOFF, H.L.; B. SHIMEI e S. ELLIS, 1979. Characterization of *Azotobacter vinelandii* deoxyribonucleic acid and folded chromosomes. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 138: 871-877.
- SAITO, S.M.T., 1978. Relações entre fixação de $^{15}\text{N}_2$, evolução de H_2 e redução de C_2H_2 em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.). Piracicaba, ESALQ/USP, 97 p. (Tese de Doutorado).
- SANTOS, D.S. e M.H.T. AFFONSO, 1982. 1º Curso avançado sobre biologia molecular de plasmídios bacterianos - guia de trabalhos práticos. Escola Paulista de Medicina.

- SCHENK, S.P.; C.F. EARHART e O. WYSS, 1977. A unique envelope protein in *Azotobacter vinelandii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. New York, 77: 1452-1458.
- SEN, M. e S.P. SEN, 1965. Interspecific transformation in *Azotobacter*. *Journal of General Microbiology*. London, 41:1-6.
- SHAH, V.K. e W.J. BRILL, 1973. Nitrogenase IV. Simple method of purification to homogeneity of nitrogenase components from *Azotobacter vinelandii*. *Biochimica et Biophysica Acta*. New York, 305: 445-454.
- SHAH, V.K. e W.J. BRILL, 1977. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA, 74: 3249-3253.
- SHAH, V.K.; L.C. DAVIS e W.J. BRILL, 1972. Nitrogenase I. Repression and derepression of the iron-molybdenum and iron proteins of nitrogenase in *Azotobacter vinelandii*. *Biochimica et Biophysica Acta*. New York, 256: 498-511.
- SHAH, V.K.; L.C. DAVIS; J.K. GORDON; W.H. ORME-JOHNSON e W. J. BRILL, 1973. Nitrogenase III. Nitrogenaseless mutants of *Azotobacter vinelandii*: activities cross-

reactions and EPR spectra. *Biochimica et Biophysica Acta*. New York, 292: 246-255.

SHAH, V.K.; L.C. DAVIS; M. STIEGHORST e W.J. BRILL, 1974.
Mutant of *Azotobacter vinelandii* that hyperproduces
nitrogenase component II. *Journal of Bacteriology*.
Baltimore, 117: 917-919.

SHANMUGAM, K.T. e C. MORANDI, 1976. Amino acids as repressors
of nitrogenase biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae*.
Biochimica et Biophysica Acta. New York, 437: 322-332.

SHERINGS, G.; H. HAAKER e L. VEEGER, 1977. Regulation of
nitrogen fixation by Fe-S protein II in *Azotobacter*
vinelandii. *European Journal of Biochemistry*. Berlin,
77: 621-630.

SIBOLD, L., 1982. The polar effect on *nif* M of mutations
in the *nif* V, S, V genes of *Klebsiella pneumoniae*
depends on their plasmid or chromosomal location.
Molecular and General Genetics. Berlin, 186: 569-571.

SMITH, B.E.; R.N.F. THORNELEY; R.R. EADY e L.E. MORTENSON,
1976. Nitrogenases from *Klebsiella pneumoniae* and
Clostridium pasteurianum. Kinetic investigations of
cross-reactions as a probe of the enzyme mechanism.

The Biochemical Journal. Cambridge, 157: 439-447.

SOCOLOFSKY, M.D. e O. WYSS, 1961. Cysts of *Azotobacter*.

Journal of Bacteriology. Baltimore, 81: 946-954.

SOCOLOFSKY, M.E. e O. WYSS, 1962. Resistance of the

Azotobacter cyst. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 84: 119-124.

SONSTEIN, S.A. e J.N. BALDWIN, 1972. Nature of the

elimination of the penicillinase plasmid from *Staphylococcus aureus* by surface-active agents. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 111: 152-155

SORGER, G.J., 1968. Regulation of nitrogen fixation in

Azotobacter vinelandii OP and in an apparently partially constitutive mutant. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 95: 1721-1726.

SORGER, G.J. e D. TROFIMENKOFF, 1970. Nitrogenaseless

mutants of *Azotobacter vinelandii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Washington, 65: 74-80.

SPRENT, J.I., 1979. The range of nitrogen fixing organisms.

In: _____, Ed., *The biology of nitrogen-fixing organisms*. McGraw-Hill Ltda. p. 1-45.

- STRANDBERG, G.W. e P.W. WILSON, 1967. Molecular H_2 and the N_2 function of *Azotobacter*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Washington, 58: 1404-1409.
- STRANDBERG, G.W. e P.W. WILSON, 1968. Formation of the nitrogen fixing enzyme system in *Azotobacter vinelandii*. *Canadian Journal of Microbiology*. Ottawa, 14: 25-31.
- St. JOHN, R.T. e W.J. BRILL, 1972. Inhibitory effect of methylalanine on glucose grown *Azotobacter vinelandii*. *Biochimica et Biophysica Acta*. New York, 261: 63-69.
- STREICHER, S.L.; E.G. GURNEY e R.C. VALENTINE, 1972. The nitrogen fixation genes. *Nature*. London, 239: 495-499.
- STREICHER, S.L.; K.T. SHANMUGAM; F. AUSUBEL; C. MORANDI e R.B. GOLDBERG, 1979. Regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*: evidence for a role of glutamine synthetase as regulator of nitrogenase synthesis. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 120: 815-821.
- STUMBO, C.R. e P.L. GAINEY, 1938. An apparent induced loss of nitrogen-fixing ability in *Azotobacter*. *Journal of Agricultural Research*. Washington, 57: 217-227.
- SUNDARESAN, V.; J.D.G. JONES; D.W. OW e F.M. AUSUBEL,

Klebsiella pneumoniae nif A product activates the *Rhizobium meliloti* nitrogenase promoter. *Nature*. London, 301: 728-732.

SWISHER, R.H.; M.L. LANDT e F.J. REITHEL, 1977. The molecular weight of and evidence for two types of subunits in the molybdenum-iron-protein of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase. *Biochemical Journal*. Cambridge, 163: 427-433.

TANAKA, M.; M. HANIU; K. YASUNOBU e L.E. MORTENSON, 1977a. The amino acid sequence of *Clostridium pasteurianum* iron protein, a component of nitrogenase I. Tryptic peptides. *Journal Biological Chemistry*. New York, 252: 7081-7088.

TANAKA, M.; M. HANIU; K.T. YASUNOBU e L.E. MORTENSON, 1977b. The amino acid sequence of *Clostridium pasteurianum* iron protein, a component of nitrogenase III. The NH₂-terminal and COOH-terminal sequences, tryptic peptides of large cyanogen bromide peptides and the complete sequences. *Journal Biological Chemistry*. New York, 252: 7093-7100.

TERZAGHI, B.E., 1980a. Ultraviolet sensitivity and mutagenesis of *Azotobacter*. *Journal of General*

Microbiology. London, 118: 271-273.

TERZAGHI, B.E., 1980b. A method for the isolation of *Azotobacter* mutants derepressed for *nif*. *Journal of General Microbiology*. London, 118: 275-278.

THOMPSON, B.J.; E. DOMINGO e R.C. WARNER, 1980a.
Pseudolysogeny of *Azotobacter* phages. *Virology*. New York, 102: 267-277.

THOMPSON, B.J.; M.S. WAGNER; E. DOMINGO e R.C. WARNER, 1980b.
Pseudolysogeny conversion of *Azotobacter vinelandii* by phage A21 and the formation of a stably converted form. *Virology*. New York, 102: 278-285.

THOMPSON, B.J.; E. DOMINGO e R. WARNER, 1973. Properties of *Azotobacter* phage A14 and its DNA. *Virology*. New York, 56: 523-531.

THORNELEY, R.N.F.; R.R. EADY e M.G. YATES, 1975. Nitrogenases of *Klebsiella pneumoniae* and *Azotobacter chroococcum*: complex formation between the component proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. New York, 403: 269-284.

TSAI, L.B. e L.E. MORTENSON, 1978. Interaction of the nitrogenase components of *Anabaena cylindrica* with those

of *Clostridium pasteurianum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. New York, 81: 280-285.

TSHITENGE, G.; N. LUYINDULA; P.F. LURQUIN e L. LEDOUX, 1975.

Plasmid DNA in *Rhizobium vigna* e *R. trifolii*.

Biochimica et Biophysica Acta. New York, 414: 357-361.

VOLPON, A.G.T.; H. De-POLLI e J. DOBEREINER, 1981.

Physiology of nitrogen fixation in *Azospirillum lipoferum*

Br 17 (ATCC29709). *Archive of Microbiology*. Berlin,

128: 371-375.

WACKERNAGEL, W., 1973. Genetic transformation in *Escherichia coli*: the inhibitory role of the rec BC DNase.

Biochemical and Biophysical Research Communications.

New York, 51: 306-311.

WEIR, K.L., 1980. Nitrogen fixation association with

grasses. *Tropical Grassland*. Brisbane, 14(3): 194-201.

WISE, E.M.; S.P. ALEXANDER e M. POWERS, 1973. Adenosine

3'-5'-cyclic monophosphate as a regulator of bacterial

transformation. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences. Washington, 70: 471-474.

WYSS, O. e B.M. WYSS, 1950. Mutants of *Azotobacter* that

do not fix nitrogen. *Journal of Bacteriology*.
Baltimore, 59: 287-291.

YATES, M.G., 1970. Control of respiration and nitrogen fixation by oxygen and adenine nucleotides in N₂ grown *Azotobacter chroococcum*. *Journal of General Microbiology*. London, 60: 393-401.

YATES, M.G. e C.W. JONES, 1974. Respiration and nitrogen fixation in *Azotobacter*. *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, London, 11: 97-135.

YOUNG, F.E. e J. SPIZIZEN, 1963. Incorporation of deoxy-ribonucleic acid in the *Bacillus subtilis* transformation system. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 86: 392-400.

ZURKOWSKI, W., 1981. Conjugational transfer of the nodulation-conferring plasmid pWZ2 in *Rhizobium trifolii*. *Molecular and General Genetics*. Berlin, 181: 522-524.

ZURKOWSKI, W., 1982. Molecular mechanism for loss of nodulation properties of *R. trifolii*. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 150: 999-1007.

ZURKOWSKI, W. e Z. LORKIEWICZ, 1979. Plasmid-mediated control of nodulation in *Rhizobium trifolii*. *Archive of Microbiology*. Berlin, 123: 195-201.