TÂNIA REGINA DOS SANTOS

RESERVA NITROGENADA NO GÊNERO *BEIJERINCKIA* ISOLADA DA RIZOSFERA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo 2011

TÂNIA REGINA DOS SANTOS

RESERVA NITROGENADA NO GÊNERO *BEIJERINCKIA* ISOLADA DA RIZOSFERA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Heloiza Ramos Barbosa

Versão corrigida

São Paulo 2011 DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Santos, Tânia Regina dos.

Reserva nitrogenada no gênero Beijerinckia isolada da rizosfera de cana-de-açúcar / Tânia Regina dos Santos. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Heloiza Ramos Barbosa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Fisiología de microrganismos.

Versão do título para o inglês: Nitrogen reserve in the genus Beijerinckia isolated from sugarcane rhizosphere.

Descritores: 1. Beijerinckia 2. Fixação de de nitrogênio 3. Acúmulo nitrogenado 4. Aminoácidos 5. Cianoficina 6. Cana-de-açúcar I. Barbosa, Heloiza Ramos II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT III. Título.

ICB/SBIB0121/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a):Tânia Regina dos Santos.Título da Dissertação:Reserva nitrogenada no gênero Beijerinckia isolada da
rizosfera de cana-de-açúcar.Orientador(a):Heloiza Ramos Barbosa.

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438 e-mail: cop/@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 260/08, referente ao projeto intitulado: "*Reserva protéica no gênero Beijerinckia*" sob a responsabilidade de Tânia Regina dos Santos, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSH - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 26 de agosto de 2008.

1. Munh

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. LUIZ VICENTE RIZZO Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais pela dedicação, incentivo e apoio constante para a minha formação.

Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter sempre iluminado o meu caminho para chegar onde estou com muita força e dedicação;

À Prof^a. Dra. Heloiza Ramos Barbosa pela oportunidade, credibilidade e aprendizado durante todos estes anos;

Ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez pela co-orientação de fundamental importância para este trabalho;

À Prof^a Dra. Maria Terêsa Machini de Miranda do Instituto de Química pelo apoio e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho;

À Prof^a Dra. Rita de Cássia Café Ferreira e seus alunos Milene e Rafael pela ajuda com a técnica de SDS-PAGE e pelas sugestões valiosas ao meu trabalho;

À Prof^a Dra. Luiziana Ferreira da Silva e seus alunos por todo auxílio;

À Prof^a Dra. Norma Yamanouye e à sua aluna Cintia do Instituto Butantan pela ajuda;

A todos os alunos do Departamento de Microbiologia que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, em especial à Daniela Licio e ao Rogério;

Aos companheiros de laboratório: Alessandra, Adriana, Carolina, Lina, Felipe Ibanez, Simone, Roberta, Ricardo, Teresa, Zilda... Obrigada por toda ajuda;

Aos funcionários: Leonor, José Maria, Selma, João Paulo, Tadeu, Zé, Alice, Aninha, Marcos, Eliane e Fábia pela atenção com que vocês sempre me trataram;

À Íris T. Moribe que se tornou uma grande amiga agradeço por toda sua ajuda e apoio em todos os momentos;

Ao Dr. Cleber Wanderlei Liria por toda ajuda com as análises químicas. Muito obrigada;

À Dra. Sônia Gagioti pela dedicação e atenção. Obrigada;

À Rosana Prisco pela grande ajuda com as análises estatísticas;

Às amigas Carolina Krebs e Zilda M. de Oliveira pelo grande apoio e incentivo em todos os momentos. Obrigada;

Aos amigos da Faculdade Mackenzie: Maria Theresa, Renata Soares, Diogo, Flávia, Milena Cichy, Patty, Cris e Katherine pela sincera e verdadeira amizade;

Aos meus pais e familiares pelo apoio, carinho e amor em todos os momentos da minha formação profissional;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei, não fosse por elas, eu não teria saído do lugar... As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito."

Chico Xavier

RESUMO

SANTOS, T. R. **Reserva nitrogenada no gênero** *Beijerinckia* isolada da rizosfera de cana-de-açúcar. 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Beijerinckia sp., bactéria de vida livre fixadora de nitrogênio, comumente encontrada em solos tropicais lateríticos. Em Beijerinckia derxii a presença de grânulos intracelulares indicou o acúmulo de material nitrogenado durante a fase estacionária. A cianoficina produzida por cianobactérias é a única reserva nitrogenada intracelular descrita até hoje. O presente trabalho teve por objetivos verificar o acúmulo de material nitrogenado intracelular associado à Fixação Biológica de Nitrogênio em cinco isolados de Beijerinckia da rizosfera de cana-de-açúcar (Saccharum sp.); selecionar a melhor metodologia de extração dessa reserva nitrogenada; analisar quimicamente esta reserva e verificar se um gene correspondente ao cphA, encontrado em cianobactéria, está presente nestes isolados. Os resultados mostraram um aumento na concentração de proteína celular total concomitantemente a atividade da nitrogenase durante a fase estacionária de todos os isolados. A fixação de nitrogênio durante esta fase sugere que o destino do nitrogênio fixado seriam os grânulos de armazenamento. A análise guímica por HPLC confirmou a presença de arginina em teor muito elevado em relação aos demais aminoácidos após a extração por um dos métodos testados, sugerindo uma reserva diferente da cianoficina. Em recombinantes de Escherichia coli confirmou-se um possível gene envolvido no armazenamento de material nitrogenado em Beijerinckia sp. A ocorrência de reservas nitrogenadas parece ser comum a este gênero e pode estar associada ao processo de fixação biológica de nitrogênio.

Palavras-chave: *Beijerinckia.* Fixação de Nitrogênio. Acúmulo Nitrogenado. Aminoácidos. Cianoficina. Cana-de-açúcar.

ABSTRACT

SANTOS, T. R. **Nitrogen reserve in the genus** *Beijerinckia* isolated from sugarcane **rhizosphere**. 2011. 87 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Beijerinckia sp., bacteria of free-living nitrogen-fixing, commonly found in tropical lateritic soils. In Beijerinckia derxii the presence of intracellular granules indicated the buildup of nitrogenous material during the stationary phase. The cyanophycin produced by cyanobacteria is the only intracellular nitrogen reserves described to date. This study was designed to evaluate the intracellular buildup of nitrogen associated with Biological Nitrogen Fixation in five Beijerinckia isolated from the rhizosphere of sugarcane (Saccharum sp.); select the best method for extraction of nitrogen reserve; chemically analyze this reservation and verify that the cphA a corresponding gene, found in cyanobacteria, is present in these isolates. The results showed an increase in total cellular protein concentration concomitantly nitrogenase activity during the stationary phase of all isolates. The nitrogen fixation during this phase suggests that the fate of fixed nitrogen would be the storage granules. Chemical analysis by HPLC confirmed the presence of very high content of arginine in relation to other amino acids after extraction of the methods tested, suggesting a different reserve of cyanophycin. In recombinant Escherichia coli confirmed a possible gene involved in nitrogen storage material in Beijerinckia sp. The occurrence of nitrogen reserves seems to be common to this genus and can be associated with the process of Biological Nitrogen Fixation.

Keywords: *Beijerinckia*. Nitrogen Fixation. Nitrogen Accumulation. Aminoacids. Cyanophycin. Sugarcane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo do nitrogênio	18
Figura 2.	Fluxo de elétrons na redução do nitrogênio	19
Figura 3.	Estrutura química da cianoficina	29
Figura 4.	Perfil protéico da cianoficina extraída da cianobactéria, Synechocystis sp PCC6308 (coluna 1) e das linhagens de <i>E. coli</i> recombinantes (colunas 2 a 7)	30
Figura 5.	Esquema do ensaio experimental para avaliação do crescimento de <i>Beijerinckia</i> sp	35
Figura 6.	Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 48	46
Figura 7.	Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 91	46
Figura 8.	Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 55	47
Figura 9.	Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 88	47
Figura 10.	Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 177	48
Figura 11.	Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado <i>Beijerinckia derxii</i>	48
Figura 12.	Grânulos intracelulares visualizados por microscopia óptica (1000x) por meio da reação de Sakaguchi, apresentando uma coloração avermelhada no interior celular	51
Figura 13.	Perfil da reserva extraída de <i>B. derxii,</i> pelo método de Simon e Weathers (1976) modificado, após análise de aminoácidos por HPLC	54
Figura 14.	Perfil da reserva extraída, pelo método de Simon e Weathers (1976) modificado, em cinco isolados de <i>Beijerinckia</i> sp e em <i>B. derxii</i> pela técnica SDS-PAGE em gel 12,5%	55
Figura 15.	Perfil do aumento protéico total e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 48	78
Figura 16.	Perfil do aumento protéico e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 55	78

Figura 17.	Perfil do aumento protéico e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 8879
Figura 18.	Perfil do aumento protéico e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 9179
Figura 19.	Perfil do aumento protéico e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 17780
Figura 20.	Perfil do aumento protéico e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado <i>Beijerinckia derxii</i> 80
Figura 21.	Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 4856
Figura 22.	Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 5557
Figura 23.	Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 8857
Figura 24.	Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 9158
Figura 25.	Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 17758
Figura 26.	Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado <i>Beijerinckia derxii</i> 59
Figura 27.	Comparação dos perfis protéicos de cada isolado59
Figura 28.	Comparação do aumento máximo de proteína total em relação ao tempo inicial de todos os isolados, pelo teste estatístico Tukey (p< 0,05)60
Figura 29.	Perfil da reserva extraída de <i>B. derxii,</i> pelo método de Elbahloul et al. (2005), após análise de aminoácidos por HPLC62
Figura 30.	Reação de Sakaguchi: 1) controle com água, 2) controle com arginina (0,5 mM) e 3) amostra purificada ICBR 88 pelo método de Elbahloul et al. (2005)63
Figura 31.	Perfil da reserva purificada, pelo método de Elbahloul et al. (2005), em cinco isolados de <i>Beijerinckia</i> sp. e em <i>B. derxii</i> pela técnica SDS-PAGE em gel 12,5%
Figura 32.	Perfis de migração em gel de agarose (1%) dos a <i>mplicons</i> de 2096 pb de todos os isolados de <i>Beijerinckia</i> sp. obtidos por PCR com " <i>primers</i> " desenhados com base na sequência genômica de <i>B. indica</i> 65
Figura 33.	Perfis de migração em gel de agarose 1%; 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder,

	Invitrogen; 2) Plasmídio digerido com <i>Eco</i> RI; 3) <i>Amplicon</i> de 2096 pb de <i>B. derxii</i> ATCC 3396266
Figura 34.	Grânulos intracelulares visualizados por microscopia óptica (1000x) por meio da reação de Sakaguchi, apresentando uma coloração avermelhada no interior celular do recombinante <i>E. coli</i> XL1 Blue
Figura 35.	Perfil da concentração de proteína total e da viabilidade celular durante a fase estacionária do controle (<i>E. coli</i> XL1 Blue sem o a <i>mplicon</i> de 2096 pb) em meio LBA contendo arginina (10 mM)67
Figura 36.	Perfil do aumento protéico celular e da viabilidade celular, durante a fase estacionária, do recombinante (<i>E. coli</i> XL1 Blue com o a <i>mplicon</i> de 2096 pb) em meio LBA contendo arginina (10 mM)68
Figura 37.	Perfil da concentração de proteína total e da viabilidade celular durante a fase estacionária do controle (<i>E. coli</i> XL1 Blue sem o a <i>mplicon</i> de 2096 pb) em meio LBA contendo arginina (10 mM) e ácido aspártico (10 mM)68
Figura 38.	Perfil do aumento protéico celular e da viabilidade celular, durante a fase estacionária, do recombinante (<i>E. coli</i> XL1 Blue com o a <i>mplicon</i> de 2096 pb) em meio LBA contendo arginina (10 mM) e ácido aspártico (10 mM)69

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Fixação Biológica de Nitrogênio	17
1.2 Nitrogenase	19
1.3 Características do gênero Beijerinckia	20
1.4 Beijerinckia e sua importância nos solos	21
1.5 Produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal	23
1.5.1 Arginina	24
1.6 Poli aminoácidos versus proteínas	25
1.6.1 Acido Poli-γ-glutâmico (PGA-γ)	26
1.6.2 Poli (ε-L-lisina)	27
1.6.3 Cianoficina: reserva nitrogenada	28
2 OBJETIVOS	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Material biológico	34
3.2 Preservação das bactérias e meios de cultura	34
3.3 Avaliação do crescimento e do acúmulo da reserva nitrogenada	
nos isolados de <i>Beijerinckia</i> sp	35
3.3.1 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	35
3.3.2 Redução de acetileno	36
3.3.3 Dosagem de proteína celular total	37
3.4 Remoção do exopolissacarideo (muco polissacarídico) celular	37
3.5 Determinação da biomassa	37
3.6 Reação de Sakaguchi	37
3.7 Obtenção dos grânulos e purificação da reserva nitrogenada	38
3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de sulfato de	
dodecil sódico (SDS-PAGE)	40
3.9 Determinação da composição de aminoácidos da reserva	40
3.10 Espectrometria de massa	40

3.11 Análise estatística	- 41
3.12 Verificação da presença do gene <i>cphA</i>	- 41
3.12.1 Extração de DNA genômico	- 41
3.12.2 Amplificação de gene provavelmente envolvido na síntese	
da reserva nitrogenada em Beijerinckia sp	42
3.12.3 Clonagem e transferência de plasmídio por transformação	42
3.12.4 Extração de plasmídio	- 43
3.12.5 Verificação do acúmulo de material nitrogenado no recombinante	- 43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	- 44
5 CONCLUSÕES	- 70
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	- 78
ANEXO A – Repetição dos ensaios com todos os isolados de <i>Beijerinckia</i> sp.	
durante a fase estacionária de crescimento	78
ANEXO B – Perfis do aumento protéico celular e da atividade da	
nitrogenase dos isolados em triplicata durante a fase estacionária	81
ANEXO C – Proporção molar média dos aminoácidos presentes na reserva	
de todos os isolados de <i>Beijerinckia</i> sp	- 82
ANEXO D – Comparação do perfil da amostra ICBR 88 com os padrões de	
arginina (Arg) e poli arginina (Poli Arg) pela Espectrometria de Massa	- 84
ANEXO E – Alinhamento feito pelo programa BLASTn do <i>amplicon</i>	
com a sequência genômica de <i>B. indica</i> (subsp.indica ATCC 9039)	- 85

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio é um elemento essencial constituinte de todos os seres vivos presente, principalmente, nas proteínas e ácidos nucléicos. Apesar da atmosfera ser composta por 78% de $N_{2,}$ a maioria dos organismos vivos necessita absorver nitrogênio combinado, o que torna este elemento um dos fatores limitantes do crescimento celular (VITOUSEK, 1997). A molécula de N_2 é composta de tripla ligação, altamente estável e somente alguns microrganismos procarióticos, bactérias e actinomicetos têm a capacidade de utilizar o nitrogênio atmosférico, por possuírem o complexo enzimático denominado nitrogenase (NEVES; RUMJANEK, 1998). Esta enzima, responsável pelo processo de fixação de nitrogênio, reduz o N_2 a amônia (REES; HOWARD, 2000). A reação é termodinamicamente desfavorável, requerendo grande quantidade de energia de ativação para reduzir N_2 a amônia (BARBOSA; TORRES, 1999).

A bactéria fixadora de nitrogênio (BFN) é chamada diazotrófica. Na natureza, o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) pode ser realizado por microrganismos simbiontes, como *Rhizobium*, por microrganismos de vida livre, como as bactérias do gênero *Beijerinckia* e *Azotobacter* (RAIJ, 1991) e por bactérias endofíticas como *Herbaspirillum seropedicae* (BASTIÁN et al., 1998). Nas BFN de vida livre e nas endofíticas o nitrogênio fixado é usado pela própria bactéria para síntese de seu material nitrogenado e sua multiplicação. As simbiontes após um período em que a população se divide, passam por uma fase denominada bacteróide e, já dentro do nódulo, param de se multiplicar. Então, excretam amônia que é assimilada no citoplasma das células da planta hospedeira e formam solutos orgânicos nitrogenados, os quais são transportados pelo xilema e distribuídos para o resto do vegetal (DILWORTH; GLENN, 1991).

No ciclo do nitrogênio (Figura 1) a fixação biológica de nitrogênio é responsável por uma parcela do total de amônia requerida pelos seres vivos; outra parte é proveniente da decomposição, por microrganismos, de compostos orgânicos nitrogenados de plantas, microrganismos e animais mortos. Uma terceira possibilidade de obtenção de amônia é a redução de nitratos e nitritos, realizada por vegetais superiores e microrganismos. A amônia produzida é incorporada a aminoácidos, podendo fazer parte de proteínas ou de outros compostos nitrogenados ou também servir de fonte de energia, sendo oxidada a nitrato pelas bactérias quimiolitotróficas, processo denominado nitrificação. O processo inverso, a desnitrificação, ocorre quando o nitrato é reduzido, dando origem ao gás nitrogênio que volta à atmosfera, resultando na perda do nitrogênio combinado (BARBOSA; TORRES, 1999).



Figura 1. Ciclo do nitrogênio. Fonte: Portal Escola Ciência e Cultura (2010).

A fixação biológica do nitrogênio constitui uma alternativa para agricultura sustentável, produtiva e ambientalmente equilibrada. As bactérias diazotróficas, além de contribuírem com o nitrogênio combinado, exercem papel importante no desenvolvimento das plantas: produzem substâncias promotoras de crescimento vegetal como fitormônios (OLIVEIRA, 2009), sideróforos e antibióticos; suprem os solos

com matéria orgânica e recuperam solos degradados (POSTGATE, 1998; DÖBEREINER, 1997).

1.2 Nitrogenase

Os microrganismos fixadores de nitrogênio, através da enzima nitrogenase, fixam o N₂ atmosférico na presença de ATP como fonte de energia. A nitrogenase é o fator chave da fixação biológica de nitrogênio. Essa enzima é composta por duas proteínas distintas (REES; HOWARD, 2000) uma delas, chamada Molibdo-Fe-proteína (MoFe proteína) ou proteína I é um tetrâmero que liga e reduz o nitrogênio. Acredita-se que um dos centros metálicos, o co-fator FeMo, represente o sítio de redução do substrato da enzima. A outra proteína é um dímero composto por polipeptídeos idênticos chamada Ferro-proteína ou proteína II, que tem a função de passar elétrons para a proteína I (BURRIS, 1991). Os componentes do sistema da nitrogenase são sensíveis ao oxigênio, portanto os microrganismos que são aeróbios estritos têm mecanismos para proteger suas nitrogenases (WHITE, 1995). A Figura 2 mostra um esquema da redução do N₂ a amônia, catalisada pela nitrogenase.



Figura 2. Fluxo de elétrons na redução do nitrogênio. Fonte: Taiz e Ziegler (1998).

A transferência de elétrons da Ferro-proteína para a Molibdo-Fe-proteína requer a hidrólise de ATP para ADP+ Pi. A Ferro-proteína é reduzida pela ferredoxina ou outros redutores. Quando reduzida, esta proteína é ligada a duas moléculas de ATP e se combina com a MoFe-proteína. Quando um elétron é transferido, ocorre a hidrólise de ATP. Este complexo protéico é dissociado e a MoFe-proteína fica reduzida e doa elétron para a molécula de N₂. Como um único elétron é insuficiente para a redução completa do nitrogênio, o ciclo se repete até que sejam acumulados elétrons suficientes para ocorrer a redução total. Como duas moléculas de ATP são requeridas para cada elétron transferido, a reação dispende um mínimo de 16 moléculas de ATP em condições ideais (BURRIS, 1991). O processo completo de funcionamento da nitrogenase é muito complexo e ainda não está totalmente esclarecido.

A reação final da redução do N₂ pode ser resumida na seguinte equação:

 $N_2 + 8H^+ + 8e^- \longrightarrow 2NH_3 + H_2$

As nitrogenases foram purificadas de diferentes tipos de microrganismos e mostraram-se extremamente similares entre si independente de sua origem (BURRIS, 1991). Esta enzima tem como substrato fisiológico o nitrogênio, porém apresenta a capacidade de reduzir outros substratos como: o acetileno (C_2H_2) que é reduzido a etileno (C_2H_4); o óxido nitroso (N_2O) reduzido a nitrogênio e água, e prótons de hidrogênio ($2H^+$) reduzidos a hidrogênio (H_2) (SPRENT; SPRENT, 1990). Segundo Zhao et al. (2006), esta enzima também pode utilizar como substratos a azida e o cianeto.

1.3 Características do gênero Beijerinckia

O gênero *Beijerinckia* foi descrito pela primeira vez em 1939 como pertencente a espécie *Azotobacter indicum.* Posteriormente foi re-classificado como o novo gênero *Beijerinckia* (DERX, 1950). São bactérias Gram-negativas, na forma de bacilos ligeiramente curvados, contendo no citoplasma grandes glóbulos redondos muito refringentes, compostos por polihidroxialcanoatos (HOLT et al., 1994).

São microrganismos fixadores de N_2 , quimiorganotróficos, com metabolismo aeróbio e crescimento na faixa de pH entre 3,0 a 9,5-10,0 e a temperatura ótima entre

20 e 30 °C. Não é capaz de crescer em meio de cultura com peptona. A glicose, frutose e sacarose são utilizadas por todas as linhagens (HOLT et al., 1994). Produz exopolissacarideo ou muco polissacarídico elástico que torna o meio de cultura líquido altamente viscoso. Esse muco é citado como o principal, senão o único, mecanismo de proteção aos sistemas sensíveis ao oxigênio, como é o caso da nitrogenase (BARBOSA; ALTERTHUM, 1992).

Outras observações a respeito da fisiologia de *B. derxii* foram muito importantes para ampliar os conhecimentos a respeito deste microrganismo e aumentar as informações relacionadas ao seu papel ecológico. Procurando uma explicação de porque a enzima nitrogenase apresentava-se ativa durante a fase estacionária de crescimento, onde o número de células permanece constante, MIYASAKA et al. (2003), detectou que *B. derxii* ATCC 33962 era capaz de acumular material nitrogenado concentrado em grânulos intracelulares contendo arginina.

Quatro espécies de *Beijerinckia* estão descritas até hoje, sendo elas: *B. indica*, *B. mobilis*, *B. fluminensis* e *B. derxii* (BECKING, 1974). Todas elas são espécies de vida livre, encontradas no solo, principalmente em regiões tropicais (HOLT et al., 1994).

1.4 Beijerinckia e sua importância nos solos

Segundo Becking (1961), uma grande porcentagem de solos lateríticos contêm *Beijerinckia* sp. Os solos lateríticos caracterizam-se por serem ácidos, pobres em fosfato e nitrogênio combinado e ricos em elementos tóxicos como o alumínio e manganês. A predominância desta bactéria neste tipo de solo deve estar ligada à adaptação às condições ambientais que favorecem o seu desenvolvimento e não o de outras bactérias. Como solos lateríticos são mais comuns em regiões tropicais, a presença de *Beijerinckia* em grande número nesses solos explicaria, em parte, sua distribuição geográfica (BECKING, 1961); sua ausência em zonas secas, também revela sensibilidade contra o ressecamento (DÖBEREINER, 1959a). Ao contrário, seu número aumenta com o crescimento dos níveis de umidade, atingindo seu máximo em solos encharcados (DÖBEREINER; ALVAHYDO, 1959). Este fato levou ao estudo desta bactéria como bioinoculante de culturas de arroz. A pesquisa mostrou que, com a inoculação de uma das linhagens de *Beijerinckia,* a produção de arroz foi similar àquela obtida com adubação nitrogenada (DÖBEREINER; RUSCHEL, 1961). Tais estudos chamaram a atenção para a possível contribuição de *Beijerinckia* ao meio ambiente, como bactéria fixadora de nitrogênio.

No Brasil, o gênero *Beijerinckia* foi detectado em 59% dos solos amostrados por Döbereiner (1959a). Apesar de ser encontrada com freqüência em solos brasileiros, um estudo mais aprofundado, pesquisando as características fisiológicas desta bactéria somente teve início vários anos após a divulgação de seus primeiros isolamentos. Em 1988, Barbosa e Carvalhal isolaram oito linhagens de *Beijerinckia* de 25 amostras de solo de cerrado, da região de Emas, Pirassununga, S.P. O sistema de fixação de N₂ de *Beijerinckia* sp., o complexo nitrogenase, mostrou-se bem estabelecido e adaptado, mesmo sob condições desfavoráveis para o crescimento celular. Barbosa et al. (2002) verificaram que em condições como pH 2,8 ou baixa disponibilidade de O₂ ou presença de substâncias tóxicas, como o alumínio e tiossulfato de sódio, a atividade da nitrogenase foi sempre preservada.

Também em solos brasileiros, foi verificada uma estreita relação de *Beijerinckia* com plantas de cana-de-açúcar. Entre os solos de canaviais estudados, 95% continham *Beijerinckia* sp., evidenciando uma influência favorável da vegetação no desenvolvimento desta bactéria, possivelmente devido à presença de sacarose residual nas raízes, que atuaria como fonte de carbono (DÖBEREINER, 1959b).

Vários genótipos de cana-de-açúcar apresentam facilidades de se associarem com bactérias fixadoras de nitrogênio e assim obtêm grande parte do nitrogênio necessário através da fixação biológica de nitrogênio. Várias espécies de bactérias fixadoras de N₂ como *Beijerinckia, Bacillus, Azotobacter, Derxia, Enterobacter e Azospirillum* foram isoladas do solo e da rizosfera de cana-de-açúcar e outras gramíneas. A pesquisa tem demonstrado que a chave para o sucesso da fixação biológica de N₂ na agricultura está numa seleção de genótipos e de bactérias que se associem mais eficientemente (QUESADA et al., 2003).

1.5 Produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal

As bactérias fixadoras de N₂ podem produzir substâncias que atuam de maneira similar aos fitormônios produzidos pelas plantas (TIEN et al., 1979). Esses compostos são chamados de reguladores de crescimento de plantas- RCPs (MELO, 1998).

Estudos que envolveram a co-cultura de *Beijerinckia* com outros microrganismos, não diazotróficos mostraram que *B. derxii* é capaz de influenciar positivamente o crescimento e manutenção da viabilidade de seus parceiros na co-cultura *in vitro*. Na tentativa de explicar os estímulos produzidos pela inoculação em plantas, várias substâncias nitrogenadas foram pesquisadas no sobrenadante de culturas de *B. derxii,* crescida em diversas condições. Além da presença de diferentes aminoácidos, de poliaminas e de ácido indolacético, também foi detectada a capacidade da bactéria em produzir etileno (THULER et al., 2003). O etileno é um dos hormônios vegetais mais usados na agricultura, em função de seus efeitos sobre muitos processos fisiológicos, tais como, controle do amadurecimento de frutos, indução de raízes, quebra da dormência de sementes e gemas, senescência de flores e folhas (RODRIGUES; LEITE, 2004).

Payne et al. (1957) demonstraram a liberação de aminoácidos por bactérias no solo e no meio de cultura. Em estudo publicado em 1994 Pati et al. mostraram que as bactérias diazotróficas *Azotobacter chroococcum*, *Beijerinckia indica* e *Corynebacterium* sp. liberaram determinados aminoácidos no meio de cultura. Segundo Oliveira (2009), foram obtidos da rizosfera de cana-de-açúcar nove isolados do gênero *Beijerinckia* dos quais cinco isolados liberaram diferentes aminoácidos. A produção de aminoácidos e vitaminas por microrganismos da rizosfera é um fator importante no estudo das interações entre bactéria-planta.

Considerando que aminoácidos são excelentes fontes de carbono e nitrogênio, além de serem unidades de proteínas, sua absorção é altamente favorável para uma grande variedade de organismos como, por exemplo, as plantas. Estas utilizam uma grande variedade de formas químicas de nitrogênio, variando de compostos inorgânicos simples, como NH⁺₄ e NO⁻₃ às formas de N poliméricos, como as proteínas (NÄSHOLM et al., 2009). O aminoácido arginina, por exemplo, age como um eficiente promotor de

enraizamento de toletes da cana-de-açúcar, causando ainda emergência precoce das gemas (NETTO, 2006).

1.5.1 Arginina

A arginina é um aminoácido metabolicamente versátil e além de ser um precursor da síntese de poliaminas, serve como fonte de carbono, nitrogênio e de energia através de uma variedade de vias catabólicas em bactérias. O catabolismo da arginina foi previamente visto numa ampla base de bactérias (ABDELAL, 1979) incluindo *Pseudomonas* (ITOH; NAKADA, 2004). Segundo Lu (2006), a biossíntese de L-arginina em bactérias foi um foco de interesse de pesquisa nas últimas décadas em regulação metabólica, da qual resultaram vários achados de interesse geral. Há três rotas para a biossíntese de arginina provenientes de L-glutamato. Na chamada via linear como em *Escherichia coli*, uma molécula de Acetil-CoA é consumido para converter L-glutamato em L-ornithina em cinco etapas através de uma série de intermediários acetilados.

Há quatro vias catabólicas da arginina utilizadas pelas bactérias: (1) Via arginase foi mais bem estudada em bacilos e *Agrobacterium*. A arginase tem sua função conhecida no ciclo da uréia dos eucariontes e também serve como a primeira enzima da via arginase para a utilização de arginina em muitos microorganismos; (2) Via arginina deiminase (ADI) esta via é amplamente distribuída entre as eubactérias e archaea, e os genes foram inicialmente caracterizados em *Pseudomonas aeruginosa*. A principal função fisiológica desta via parece ser o fornecimento de ATP em condições anaeróbias; (3) Via arginina succinyltransferase (AST) foi descoberta em *Pseudomonas* e *Burkholderia*. A organização dos operons conhecidos (*aru*) é altamente conservada em *Pseudomonas* e *Burkholderia* e pode proporcionar uma vantagem em resposta a Larginina exógena nestas bactérias, que podem utilizar L-arginina de forma muito eficiente como a única fonte de carbono e nitrogênio; (4) Via arginina transaminase/ oxidase/ desidrogenase enzimas desta via foram relatadas pela primeira vez em *Pseudomonas putida* (LU, 2006). Synechococcus apresenta a via arginina oxidase e o gene *aoxA* que codifica uma oxidase L-aminoácidos (L-AOX) com L-arginina sendo o melhor substrato para o crescimento celular (BOCKHOLT; SCHOLTEN-BECK; PISTORIUS, 1996). O *aoxA* mutante (enzima ausente) não pôde crescer em presença de L-arginina como única fonte de nitrogênio, sugerindo que a enzima L-AOX é essencial para a utilização de arginina neste microrganismo. Em outra cianobactéria *Synechocystis*, a enzima arginase é responsável pela utilização de L-arginina pela via arginase. A arginina pode servir como fonte de nitrogênio após a mobilização de cianoficina (multi- L-arginyl poli-Laspartato), uma reserva única de grânulos intracelulares em cianobactérias (QUINTERO et al., 2000).

Segundo Lu (2006), existem vários reguladores de transcrição relacionados ao controle do metabolismo da arginina em bactérias, os principais tipos são ArgR / AHRC e ArgRp. Apesar das diferenças na organização de genes do metabolismo da arginina, as proteínas ArgR e seus locais de destino são altamente conservados entre os organismos muito diversificados, incluindo bactérias Gram-positivas (AHRC de *B. subtilis*), Gram-negativas, e extremófilos. Em geral, a regulação é exercida pela ligação do ArgR a seu sítio operador anterior aos genes-alvo, levando à repressão de genes da biossíntese de arginina e ativação de genes catabólicos na presença de arginina. É possível que alguns genes relacionados ao metabolismo da arginina são induzidos ou reprimidos apenas quando a concentração de arginina intracelular atinja um nível elevado ou quando o sistema de regulação está ausente.

As principais aplicações da arginina estão na indústria farmacêutica e como intensificador de sabor na indústria alimentícia. Nos seres humanos, a arginina é classificada como um aminoácido condicionalmente essencial para a síntese de proteína, e seu metabolismo também dá origem ao óxido nítrico, metabólitos do ciclo da uréia creatina, prolina e poliaminas (IKEDA, 2003).

1.6 Poli aminoácidos versus proteínas

Segundo Feng et al. (2007), as poliamidas abrangem uma grande quantidade de compostos de polímeros com seus constituintes ligados por ligações amida e são

divididas em duas categorias: os poli aminoácidos que são formados por um tipo de monômero, e as proteínas que são compostos constituídos por diferentes tipos de aminoácidos. A maioria das poliamidas são proteínas e um pequeno grupo de poliamidas são referidas como poli aminoácidos, a fim de distingui-los das proteínas devido a diferentes características de biossíntese. Existem várias diferenças entre eles: (1) A proteína é composta por grande variedade de aminoácidos, enquanto o poli aminoácido é composto de apenas um tipo de aminoácido, pelo menos no esqueleto principal. (2) As proteínas são biosintetizadas sob a direção de DNA, o que significa que a síntese de proteínas é modelo-dependente, incluindo a transcrição, complexo ribossomo e o mecanismo de tradução. Pelo fato da biossíntese de poli aminoácido ser catalisada por algumas enzimas simples, os inibidores da tradução como o cloranfenicol não afetam a biossíntese de poli aminoácidos. (3) As proteínas apresentam comprimento exato, enquanto os poli aminoácidos mostram dispersão notável de peso molecular. (4) Enquanto ligações amida em proteínas são formadas apenas entre os grupos α -amino e γ -carboxílico (ligações α -amida), ligações amida em poli aminoácidos envolvem funções da cadeia de outro lado, ou seja, grupos β -e y-carboxílico e ϵ -amino.

Existem três diferentes poli aminoácidos apresentados na natureza: poli- γ glutâmico (PGA- γ), poli- ϵ -lisina (ϵ -PL) e cianoficina. O PGA- γ é constituído de unidades ácido D e L-glutâmico ligadas por ligações amida entre α -amino e γ -grupos ácido carboxílico. A ϵ -PL é composta de monômero de lisina pela ligação do grupo α -carboxila e grupo ϵ -amino da lisina. Diferente desses dois tipos de poli aminoácidos, os constituintes do terceiro poli aminoácido, cianoficina, é um esqueleto de α -aspártico contendo resíduos de arginina independentes ligados ao grupo β -carboxila (FENG et al., 2007).

1.6.1 Acido Poli-y-glutâmico (PGA-y)

Poli-γ-glutâmico é um polímero extracelular hidrossolúvel e biodegradável, constituído de unidades ácido D-e L-glutâmico ligadas por ligações amida entre α-amino e γ-grupos ácido carboxílico. PGA-γ foi descoberto como sendo a cápsula da bactéria gram-positiva *Bacillus anthracis*. Posteriormente, descobriu-se em outros *Bacillus* sp,

tais como, *B. licheniformis, B. megaterium, B. subtilis e B. amyloliquefaciens*. A síntese de PGA-γ é independente de ribossomo sendo um processo catalisado por enzima (FENG et al., 2007).

A chave intermediária da síntese de PGA- γ é o α -cetoglutarato, que é um precursor direto do ácido L-glutâmico e é sintetizado no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Verificou-se que em *B. licheniformis* as enzimas: glutamato sintase e a glutamato desidrogenase são insensíveis à concentração do produto final, que resulta em alta concentração intracelular de ácido L-glutâmico e é favorável ao aumento da produtividade das PGA- γ (SCHREIER; BERNLOH, 1984).

Segundo Feng et al. (2007), diversas aplicações tem sido desenvolvidas nas indústrias de alimentos e cosméticos, bem como em indústrias farmacêuticas. Além disso, pode funcionar como um agente de adaptação em diversas aplicações ambientais, tais como íons absorventes de metais pesados.

1.6.2 Poli (ε-L-lisina)

Poli (ϵ -L-lisina) (ϵ -PL) é um polímero catiônico em pH neutro e caracteriza-se pela ligação peptídica entre a carboxila e os grupos ϵ -amino da L-lisina. A ϵ -PL foi descoberta pela primeira vez por Shima e Sakai em 1977 que encontraram um composto no meio de cultura de uma cepa denominada *Streptomyces albulus* 346. Para isolar poli (ϵ -L-lisina) de linhagens produtoras foi usado um corante ácido, o Poly- R-487. Quando as variedades produziam o polímero extracelular, o corante era condensado em torno dessas colônias. Por este método, várias cepas foram analisadas, como *Streptomyces, Kita satospora* e um fungo *Epichloe* sp. (FENG et al., 2007).

No início do crescimento de *Streptomyces albulus* 346, a produtividade máxima de poli (ϵ -L-lisina) (ϵ -PL) é apenas cerca de 0,5 g/L sob a condição de cultivo otimizado. O controle do pH no meio de cultivo é essencial para a acumulação de ϵ -PL durante o processo de crescimento. O valor inicial do pH do meio de cultura é mantido em 6,0 e, quando as células cresciam até a fase estacionária, a acumulação de ϵ -PL poderia ser observada. Para produzir ϵ -PL de maneira eficiente, o valor de pH do meio é regulado

na faixa de pH 3,0 a 5,0. Posteriormente, a produtividade ϵ -PL por células em repouso, utilizando a glicose e (NH4)2SO4 como substratos e sob condições de pH ácido a acumulação de ϵ -PL foi melhorada significativamente sendo obtida uma produtividade máxima de 4 - 5 g/L (SHIMA; SAKAI, 1977).

Segundo Feng et al. (2007) a poli (ε -L-lisina) é de atividade antibiótica e usada principalmente para indústria de alimentos. Além disso, a ε -PL combinada com outros aditivos alimentares, tais como o vinagre, glicina e o etanol aumenta a eficiência da preservação de vários alimentos. Como a ε -PL é inofensiva ao ser humano e biodegradável sua capacidade de ligação a água foi utilizada para a síntese de hidrogel por reticulação de ε -PL e polissacarídeos. O hidro-gel já é um produto comercial aplicado na agricultura e indústrias médicas.

1.6.3 Cianoficina: reserva nitrogenada

A presença de reservas nitrogenadas em qualquer tipo de célula é raramente citada na literatura. No entanto, um tipo de reserva intracelular de nitrogênio foi descrito por Simon em 1971, que isolou de células de *Anabaena cylindrica*, uma cianobactéria fixadora de N₂, um polipeptídio formado de dois aminoácidos: ácido aspártico e arginina com razão molar 1:1. Este polímero foi denominado cianoficina e se apresenta na forma de grânulos com peso molecular variando de 25000 a 100000 daltons; a estrutura da cianoficina é altamente ramificada sendo formada por um esqueleto de ácido aspártico ao qual estão ligados resíduos de arginina a cada grupo carboxila livre (SIMON; WEATHERS, 1976). A Figura 3 mostra a estrutura química da cianoficina.

Posteriormente, a reserva foi descrita em outra espécie de cianobactéria não fixadora de N₂: *Aphanocapsa* 6308 (ALLEN; WEATHERS, 1980). Em microrganismos procarióticos, o acúmulo de polímeros orgânicos e inorgânicos é feito na forma de corpos de inclusão. Estes materiais são formados quando os microrganismos se desenvolvem de forma não balanceada, pelo excesso ou falta de algum macronutriente (PERRY; STALEY, 1997).

A cianoficina apresenta estrutura química única, sendo sintetizada no final da fase exponencial e sua máxima produção ocorre durante a fase estacionária de

crescimento. Simon (1973); Dembinska e Allen (1988) determinaram, em *Anabaena cylindrica* que, em presença de cloranfenicol, não havia inibição da síntese de cianoficina, ficando evidente que sua produção é independente de ribossomo.



Figura 3. Estrutura química da cianoficina. Fonte: Berg (2003).

Mackerras et al. (1990) sugeriram que a cianoficina serve como reservatório dinâmico, que depende do suprimento de nitrogênio do ambiente e das demandas metabólicas das células. Este mecanismo capacitaria a cianobactéria a maximizar seu acúmulo nitrogenado, com a vantagem de tornar o nitrogênio fixado sempre disponível, provendo a cianobactéria de uma capacidade competitiva sobre outros microrganismos.

A biossíntese do polímero de reserva é catalisada pela cianoficina sintetase (CphA). A síntese do polímero requer ATP, um polímero pré-formado de cianoficina e os aminoácidos constituintes: arginina e aspartato (HAI et al., 1999). Berg et al. (2000) sugeriram que a enzima possui dois sítios de ligação para ATP e provavelmente dois sítios ativos; os polímeros pré-formados são alongados pela porção C-terminal sendo

os aminoácidos constituintes adicionados passo a passo, primeiro o ácido aspártico seguido pela arginina.

Segundo Aboulmagd, Oppermann-Sanio e Steinbüchel (2000) a cianobactéria *Synechocystis* sp PCC6308 sintetiza cianoficina num teor máximo de 16% da massa seca celular. A funcionalidade do gene *cphA* de *Synechocystis* sp PCC6308 foi comprovada por expressão heteróloga da enzima CphA ativa e síntese de cianoficina em *Escherichia coli* que obteve um teor máximo de 26,6% da massa seca celular. A Figura 4 mostra o perfil proteíco destas *E. coli* recombinantes.



Figura 4. Perfil protéico da cianoficina extraída da cianobactéria, *Synechocystis* sp. PCC6308 (coluna 1) e das linhagens de *E. coli* recombinantes (colunas 2 a 7). Fonte: Aboulmagd, Oppermann-Sanio e Steinbüchel (2000).

Até há poucos anos, cianoficina era descrita apenas em cianobactérias. Krehenbrink, Oppermann-Sanio e Steinbüchel (2002) analisaram 65 seqüências genômicas de microrganismos não-cianobactérias e encontraram genes capazes de codificar proteínas homólogas à CphA em *Acinetobacter* sp linhagem ADP1 com 40% de identidade de aminoácidos, em *Bordetella bronchiseptica* linhagem RB50 (39%), em *Bordetella pertussis*, linhagem Tahoma I (39%), em *Bordetella parapertussis*, linhagem 12822 (39%), em *Clostridium botulinum* linhagem ATCC 3502 (39%), em *Desulfitobacterium hafniense* linhagem DCB-2 (38%) e em *Nitrosomonas europaea* linhagem ATCC 25978 (37%).

Segundo Krehenbrink, Oppermann-Sanio e Steinbüchel (2002) *Acinetobacter* sp DSM 587 acumula cianoficina até 1,4% de proteína celular total sob condições de limitação de fosfato e a atividade da cianoficina sintetase foi detectada, indicando sua função de reserva, nesta linhagem. O gene homólogo ao *cphA* de *Acinetobacter* sp linhagem DSM 587 foi amplificado e introduzido em *Escherichia coli*. A linhagem recombinante de *E. coli* expressou atividade de *cphA* e acumulou cianoficina até 7,5% da massa seca celular, indicando a funcionalidade da enzima. Neste recombinante, a cianoficina era composta de aspartato, arginina e lisina, enquanto que a cianoficina isolada de *Acinetobacter* sp linhagem DSM 587 mostrou composição equimolar de aspartato e arginina, evidenciando que a capacidade de biossíntese desta reserva não é restrita a cianobactéria.

Além da clonagem e a expressão do gene *cph*A em *E. coli* recombinante (HAI et al., 2006), também podem ser linhagens hospedeiras *Ralstonia eutropha* e *Pseudomonas putida* (VOSS et al., 2004; DINIZ; VOSS; STEINBÜCHEL, 2006). A composição destas "cianoficinas recombinantes" é similar àquela observada em cianobactéria exceto pela detecção de pequena quantidade de lisina (Lys) (ZIEGLER et al., 1998; OPPERMANN-SANIO; STEINBÜCHEL, 2002). A disponibilidade de seqüências do genoma dos vários microrganismos tornou possível relatar que diversas espécies de não-cianobactérias possuem genes que apresentam similaridades elevadas à seqüência de genes codificadores da cianoficina sintetase (KREHENBRIK et al., 2002; FÜSER; STEINBÜCHEL, 2007).

Um importante papel da cianoficina na natureza foi descrito por Watanabe; Kiyohara (1960) que propuseram um método, usando cianobactérias, para melhorar a fertilidade dos solos cultivados com arroz. O aumento da fertilidade dependia da multiplicação, fixação de nitrogênio e produção de cianoficina pelas cianobactérias. Com a morte celular, sua decomposição era promovida pela ação de enzimas de outros microrganismos habitantes do solo. A decomposição liberava a cianoficina ao ambiente, aumentando, assim, seu teor em nitrogênio.

A cianoficina purificada também desperta interesse biotecnológico uma vez que o polímero pode ser modificado quimicamente e convertido em poliaspartato pela redução do conteúdo de arginina (SCHWAMBORN, 1998). Pode ser aplicada em vários processos técnicos como um substituto biodegradável do poliacrilato (OPPERMANN-SANIO; STEINBÜCHEL, 2002). Um índice elevado de cianoficina, um alto rendimento

celular, um tempo de cultivo mais curto e procedimentos de cultura mais simples melhoraria suas condições de produção (ABOULMAGD et al., 2001).

Há muitos biopolímeros conhecidos, mas apenas três tipos deles foram encontrados em microorganismos até o presente. Devido à diversidade de microrganismos em diferentes condições ambientais, é possível identificar mais linhagens com alta capacidade para produzir poli aminoácidos e outros biopolímeros. Poli aminoácidos são biomateriais úteis para uma boa interação com o meio ambiente, alta solubilidade e capacidade de biodegradação. No entanto, um grande obstáculo na sua aplicação em larga escala é o custo bastante elevado e a baixa produtividade (FENG et al., 2007).

2 OBJETIVOS

- Avaliar se cinco isolados de *Beijerinckia* sp. da rizosfera de cana-de-açúcar são capazes de acumular material nitrogenado em forma de grânulo intracelular;
- Selecionar a melhor metodologia de extração dessa reserva nitrogenada e determinar sua concentração;
- Analisar a composição química da reserva;
- Verificar se um gene correspondente ao *cphA*, encontrado em cianobactéria, está presente nos isolados de *Beijerinckia*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Durante o trabalho já finalizado por Oliveira (2009), foram isoladas e identificadas linhagens de *Beijerinckia* sp. provenientes da rizosfera de cana-de-açúcar (*Saccharum sp*) provenientes das Fazendas São Francisco e Santa Rita, Sertãozinho, Estado de São Paulo. Os seguintes isolados foram objeto de estudo do presente trabalho: ICBR 48, ICBR 55, ICBR 88, ICBR 91 e ICBR 177. Os números de acesso atribuídos no banco de dados do GenBank são, respectivamente, *Beijerinckia* sp. - FJ441065; *Beijerinckia* sp. - FJ44106; *Beijerinckia* sp. - FJ441067; *Beijerinckia* sp. - FJ441072; *Beijerinckia* sp. FJ441073.

Beijerinckia derxii ATCC 33962 foi isolada de solo de cerrado da região de Emas, Pirassununga, Estado de São Paulo (BARBOSA; CARVALHAL, 1988) e identificada pelo ATCC (American Type Colection Culture).

3.2 Preservação das bactérias e meios de cultura

Os isolados de *Beijerinckia* sp. foram cultivados em meio seletivo LG líquido ou acrescido de $15g.l^{-1}$ de ágar para meio sólido. O meio LG contém (g.L⁻¹): K2HPO4 – 0,10; CaCl2.2H2O – 0,02; MgSO4.7H2O – 0,2; Na2MoO4.2H2O – 0,002; KH2PO4 - 0,03; FeCl3.2H2O – 0,01; CoCl2.H2O – 0,0008 e Glicose - 10 (BARBOSA et al., 2002). As culturas puras de *Beijerinckia* sp. foram preservadas a -80 ^oC em glicerol a 20% no meio LG (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995).

A *Escherichia coli* foi cultivada em meio LB (*Luria-Bertani*) contendo (g.L⁻¹): Triptona – 10; Extrato de levedura – 5 e Cloreto de Sódio (NaCl) – 10 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Para o cultivo dos recombinantes foi acrescido no meio 1 μ l.mL⁻¹ de ampicilina (100 mg.mL⁻¹).

3.3 Avaliação do crescimento e do acúmulo da reserva nitrogenada nos isolados de *Beijerinckia* sp.

As análises a seguir foram realizadas com todos os isolados em triplicata e também com a espécie *B. derxii* ATCC 33962 para comparação dos dados.

Os isolados do gênero *Beijerinckia* foram semeados em meio LG sólido (BARBOSA et al., 2002). Após crescimento a 30 °C por 8 dias, uma colônia foi inoculada em tubo de ensaio com 7 mL de meio LG e incubado por 48 h a 30 °C, 200 rpm. Após este período, 5 mL de cultura foram inoculados em frasco Erlenmeyer (capacidade 250 mL) contendo 55 mL de LG líquido e incubada a 30 °C sob agitação por 72 h. Passado esse tempo, os 60 mL foram inoculados em frasco Erlenmeyer de 1000 mL contendo 440 mL de meio LG. A cultura permaneceu sob agitação (200 rpm) de 72 a 120 h a 30 °C (TOLEDO, 2001). Após este período sob agitação, que teve a finalidade de aumentar o número de células, foi verificado que o crescimento populacional estacionou e a cultura foi incubada sem agitação em estufa a 30 °C por aproximadamente 500 h para o aumento exclusivamente da biomassa (Figura 5).



Figura 5. Esquema do ensaio experimental para avaliação do crescimento de Beijerinckia sp.

Periodicamente, foram retiradas amostras da cultura estacionada para a determinação de:

- Unidades Formadoras de Colônias (UFC) segundo Barbosa et al. (1995);
- Atividade da Nitrogenase por meio do ARA (Acetylene Reduction Assay) segundo Turner e Gibson (1980);
- Conteúdo protéico total das culturas pelo método de Bradford (1976).

3.3.1 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

A quantificação bacteriana foi realizada por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), método da gota descrito por Barbosa et al. (1995). Foram feitas diluições seriadas para determinação do número de bactérias viáveis: 100 μ L de cultura foram adicionados a 900 μ L de água estéril e a suspensão foi homogeneizada. Desta suspensão foram retirados 100 μ L, transferidos para o próximo tubo e feitas diluições seriadas. Foram semeadas quatro diluições (10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷), seis gotas de cada diluição e cada gota contendo 25 μ L. As colônias foram contadas após 48 h de incubação a 30 °C.

3.3.2 Redução de acetileno

A determinação da atividade específica da nitrogenase foi feita seguindo a técnica de "Acetylene Reduction Assay" (ARA) segundo Turner e Gibson (1980). Em frasco de vidro (capacidade 10 mL) foram colocados 2 mL de cultura e vedado com tampa de borracha e lacre de alumínio. Retirou-se 10% da fase aérea do frasco e injetou-se 0,8 mL de acetileno (substrato da nitrogenase). O frasco ficou sob agitação por 2 h e foi verificada por cromatografia gasosa a redução do acetileno em etileno. Utilizou-se o cromatógrafo a gás Shimadzu GC-14A, com coluna Porapak-N 80/100 – INOX a 70 °C, injetor a 180 °C e detector de ionização de chama a 230 °C. Os padrões de acetileno e etileno foram preparados e analisados da mesma forma utilizando-se meio de cultura líquido.
3.3.3 Dosagem de proteína celular total

O conteúdo protéico total das culturas foi determinado pelo método de Bradford (1976), usando albumina bovina como padrão. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro Cary 50 Bio Spectrophotometer.

3.4 Remoção do exopolissacarideo (muco polissacarídico) celular

Quando o conteúdo protéico celular estabilizou por volta de 500 h de cultura, o volume total (500 mL) foi centrifugado por 30 min a 13.000 rpm para eliminar o meio de cultura. As células foram lavadas com água destilada para remoção do exopolissacarideo celular. O número de lavagens era no mínimo seis vezes, dependendo da quantidade de exopolissacarideo produzido pela linhagem. No final, o precipitado celular foi ressuspenso em 50 mL (10% o volume de cultura inicial) de água destilada estéril.

3.5 Determinação da biomassa

Dez mililitros de cada suspensão celular foram centrifugados (7000 rpm, 10 min, 10 °C), ressuspensos em água e filtrados em membrana de poro 0,45 µm Millipore (Millipore S. A., Massachusetts, EUA). As membranas junto com as células foram secas por 4 h a 100 °C na estufa, e posteriormente por 20 min em dessecador, quando foi determinada a massa seca celular por pesagem das membranas.

3.6 Reação de Sakaguchi

Após a remoção do exopolissacarideo, células íntegras de todas as linhagens foram submetidas à reação de Sakaguchi, pelo método de Baker modificado (1947). Foram feitos esfregaços em lâmina, fixados e mergulhados por 15 min na seguinte solução: 2 mL de NaOH a 1% em água, 50 μL de α-naftol 1% em etanol 70% e 100 μL de hipoclorito a 1% em água. Após este período, as lâminas foram secadas com papel filtro. Em seguida, o material foi mergulhado em solução 1:1 de piridina e clorofórmio. A

visualização do esfregaço foi feita por microscopia óptica e registrado por fotografia. Este método evidencia a presença de arginina no material de reserva por meio da coloração, ou seja, o grupo guanidina do aminoácido arginina em meio alcalino forma um complexo verde com o α- naftol que, em presença de hipoclorito de sódio (NaClO) passa a avermelhado segundo Mackerras et al. (1990).

3.7 Obtenção dos grânulos e purificação da reserva nitrogenada

Para a extração e purificação da reserva foram testados os seguintes métodos:

 Simon e Weathers (1976) descrito para extração de cianoficina em cianobactérias.

As células de *Beijerinckia* sp. foram congeladas, por 24 h em freezer a 20 °C, com a finalidade de facilitar o rompimento celular. A ruptura celular foi concluída com a sonicação por ultra-som a 20% de amplitude, em sonicador (Branson – VWR Scientific®), por 5 min utilizando o detergente Triton X-100. Após a sonicação da amostra (50 mL) foi dosada proteína total e a suspensão foi lavada com água destilada até a remoção do Triton.

O precipitado foi ressuspenso em HCI 0,1N, pH 2 para solubilizar o conteúdo da reserva. Após 30 min a temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada a 13.000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi reservado e o precipitado foi re-extraído com HCI 0,1N. Por fim, os sobrenadantes foram agrupados e o pH neutralizado (pH 7) para precipitação do material de reserva.

 Steinbüchel et al. (2009) método descrito para extração de cianoficina em Saccharomyces cerevisiae.

Os extratos celulares de *Beijerinckia* sp. após a sonicação descrita acima foram centrifugados duas vezes a 13.000 rpm por 10 min. Após a centrifugação o sobrenadante e o precipitado celular foram tratados separadamente.

Ao sobrenadante foram adicionados 200 µg. mL⁻¹ de proteinase K e incubado a 60 °C "overnight". Após a incubação foi adicionado álcool etílico (75%) gelado para ocorrer precipitação do material de reserva e depois

centrifugado a 13.000 rpm por 15 min. Realizou-se uma lavagem com acetona e, após a secagem do material a 65 °C este foi dissolvido em Tris- HCl 20 mM (pH 7) e precipitado novamente. As etapas de lavagem foram repetidas três vezes para purificar.

O precipitado separado no início do método foi ressuspenso em HCI 0,1M e centrifugado a 13.000 rpm por 15 min. Este sobrenadante foi neutralizado com NaOH 1N para ocorrer precipitação. O precipitado foi centrifugado e lavado duas vezes com H₂O destilada. Para purificar o material de reserva, este foi dissolvido em HCI 0,1M e precipitado por mais três vezes.

 Elbahloul et al. (2005) proposto para extração de cianoficina em Acinetobacter calcoaceticus ADP1.

O conteúdo celular de Beijerinckia sp foi liofilizado e determinado o peso seco. O conteúdo liofilizado foi suspenso em 5 mL de acetona e vigorosamente agitado por 5 min para dissolver os lipídios da parede celular. As células foram centrifugadas por 10 min a 13.000 rpm para remoção da acetona. Depois foram lavadas duas vezes com Tris- HCl 50 mM (pH 7,5), a 13.000 rpm por 10 min, para remover todas as proteínas solúveis e outros compostos. As células foram suspensas em 5 mL de HCI 0,1M e agitadas por 30 min em temperatura ambiente. Foram centrifugadas e 5 mL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo. Adicionaram-se 5 mL de tampão de precipitação (Tris- HCI 0,1M pH 7,5) e ajustou-se para pH 12 com a adição de NaOH 0,1M. A mistura foi incubada por 10 min no gelo para completar a precipitação e depois centrifugada a 13.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e 1 mL de HCI 0,1M foi adicionado ao precipitado para solubilizar o material de reserva novamente. Centrifugou-se por 2 min para remover as proteínas insolúveis. A concentração do material purificado foi medida por espectrometria pelo método de Bradford (1976).

3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de sulfato de dodecil sódico (SDS-PAGE)

Após a purificação da reserva foi realizada a técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida -Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) com gel de acrilamida 12,5%, segundo Laemmli (1970), para análise do perfil da reserva nitrogenada de todos os isolados. Para a coloração do gel foi utilizada uma solução de *Comassie Blue*.

A técnica foi padronizada para acertar a concentração e o valor do pH do tampão até encontrar o valor adequado. Inicialmente o pH do tampão utilizado na técnica era de 6,8 que ocasionava a precipitação do material nitrogenado. Foi feito um tampão de amostra com citrato (pH 2,5), segundo Ferreira (2002), acrescido de uréia (8M). Ajustou-se o tampão para pH 2 para manter a solubilização do material até o final da técnica.

3.9 Determinação da composição de aminoácidos da reserva

A composição dos aminoácidos do material nitrogenado extraído dos grânulos foi determinada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) após sua hidrólise segundo Avdalovic et al. (1999). Realizada no laboratório de Química de Peptídeos do Instituto de Química de São Paulo – USP/SP, pela Prof^a Dr^a Maria Terêsa Machini de Miranda.

O analisador de aminoácidos Dionex® é composto por: amostrador automático (AS40), bomba quaternária (GS50), forno para a coluna (LC25), coluna de troca iônica (2x250 mm, AminoPac PA10), detector eletroquímico (ED50) e uma plataforma "Chromeleon" para controle e aquisição de dados.

3.10 Espectrometria de massa

As análises por espectrometria de massa foram realizadas em espectrômetro no modo ESI *("eletrospray ionization")* por injeção direta. A técnica baseia-se em um analisador do tipo quadrupolo que ioniza a amostra utilizando um "*eletrospray"*.

3.11 Análise estatística

Os dados de dosagem protéica celular e de atividade da nitrogenase foram submetidos á análise estatística de variância pelo ANOVA (p< 0.05), e teste de comparações múltiplas - Tukey (p< 0.05). Foram empregados para comparar os isolados entre si e com *Beijerinckia derxii*.

3.12 Verificação da presença de genes cphA

Foi feita uma busca por genes semelhantes ao *cph*A de *Synechocystes* em genomas de alfa-proteobacterias e também uma comparação da seqüência genômica deste gene ao genoma já completo de *Beijerinckia indica* (subsp. indica ATCC 9039). Essa busca de similaridade foi realizada no banco de dados do GenBank através do programa BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997). Este programa está disponível no site do NCBI (National Center for Biotechnology Information – www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.12.1 Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico das linhagens de *Beijerinckia* foi realizada com a utilização do *"kit"* de extração *"Wizard Genomic DNA Purification"* Promega (Promega S. A., EUA), seguindo orientações do fabricante. A eficiência da metodologia foi comprovada através da visualização do DNA por eletroforese em gel de agarose (1,0% p/v) em tampão 1x TAE (Tris-Acetate-EDTA), foi utilizado o marcador de peso molecular de 1kb DNA ladder Invitrogen (Invitrogen S. A., California, EUA); o gel foi corado em solução com brometo de etídio (0,5 μg.mL⁻¹), visualizado e fotografado em equipamento *Multi Doc-It Digital Imaging System – M20 Transilluminator –* Cambridge – UK.

3.12.2 Amplificação de gene provavelmente envolvido na síntese da reserva nitrogenada em Beijerinckia sp.

A amplificação da sequência genômica de B. *derxii* ATCC 33962 e dos isolados de *Beijerinckia* sp. foi realizada utilizando a técnica de PCR e os seguintes iniciadores desenhados com base na sequência genômica de B. *indica* similar ao *cphA*: 5'-AGATCATCCTCGCGCAATGTC – 3' e 5'- AGCCGACTTTCTTGAAACGCA – 3'. A reação de amplificação foi feita em termociclador (Eppendorf, Master Cycler 5330) programado para realizar uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, 30 ciclos de: desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 57 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 3 min, seguida de extensão final a 72 °C por 10 min. Após a amplificação, 2 µl da reação de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose como descrito no item 3.11.1. Para posterior sequenciamento o produto de PCR foi purificado utilizando o *"kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification"* seguindo instruções do fabricante GE Helthcare (GE S. A., Rio de Janeiro, R.J., Brasil). O DNA foi quantificado em equipamento Thermo Scientific NanoDropTM 1000 Spectrophotometer.

3.12.3 Clonagem e transferência de plasmídio por transformação

Apenas o gene amplificado de *B. derxii* ATCC 33962 foi clonado no vetor pGEM T-Easy (Promega) seguindo instruções do fabricante, e expresso na linhagem de *Escherichia coli* XL1 Blue (BULLOCK; FERNANDEZ; SHORT, 1987). A linhagem de E. *coli* XL1 Blue foi inoculada em 25 mL de meio LB contendo MgCl₂ (10 mM) e MgSO₄ (10 mM) e incubada em agitador rotativo a 37 °C por 3 h. Em tubos estéreis, foram centrifugadas 10 mL da cultura por 15 min, 4000 rpm, 4 °C e o "pellet" foi ressuspenso com 4 mL de tampão de transformação, as células foram mantidas por 15 min em gelo e novamente centrifugadas. Para obtenção das células competentes, a massa de células foi ressuspensa em 0,8 mL do tampão de transformação, a suspensão celular foi dividida em alíquotas de 200 µL e mantida em banho de gelo. As células foram utilizadas imediatamente.

Para cada 200 µL de células competentes, adicionaram-se 5 µL de DNA, (~150 ng) incubou-se em banho de gelo por 30 min e a mistura foi submetida a um choque térmico a 42 °C por 2 min e imediatamente resfriada em gelo. Adicionou-se 600 µL de meio LB, e incubou-se por 1 h a 37 °C. Clones transformantes foram selecionados em meio de cultura contendo ampicilina, suplementado com IPTG (isopropil-tio- β -D-galactosídeo) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo) para diferenciar clones recombinantes contendo o inserto de DNA.

3.12.4 Extração de plasmídio

Para a confirmação da inserção do *amplicon* no vetor foi feita a extração do plasmídio do recombinante com o *Kit PureYieldTM Plasmid Miniprep System* seguindo instruções do fabricante (Promega), e digerido com a enzima *Eco*RI. A análise dos fragmentos foi realizada por eletroforese em gel de agarose (1,0% p/v).

3.12.5 Verificação do acúmulo de material nitrogenado no recombinante

O clone recombinante foi cultivado em meio LB com ampicilina conforme descrito no item 3.2 e acrescido de arginina (10 mM) e ácido aspártico (10 mM). Estas culturas ficaram por 4 h sob agitação a 37 °C para ocorrer o crescimento celular e depois por 48 h sem agitação em estufa a 37 °C para verificar o acúmulo da reserva na fase estacionária. Foram retiradas amostras em alguns intervalos de tempo para dosagem de proteína total pelo método de Bradford (1976) e para determinação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) pelo método da gota segundo Barbosa et al. (1995). Linhagem de *E. coli* XL1 Blue contendo apenas o vetor pGEM T-Easy foi utilizado como controle nestes experimentos para avaliar a produção do material de reserva de nitrogênio.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primeiros ensaios foram direcionados às medidas do crescimento dos isolados de *Beijerinckia* sp., para se determinar o início da fase estacionária. Em *Beijerinckia derxii* o acúmulo de material nitrogenado ocorreu na fase estacionária de crescimento (Miyasaka et al., 2003). Já em cianobactérias como o *Synechococcus* sp, não-diazotrófica, acumula cianoficina como uma reserva temporária de nitrogênio assimilado durante a transição da fase exponencial para a fase estacionária (HAI et al., 1999).

Os isolados ICBR 48 e ICBR 91 permaneceram mais tempo sob agitação, pois apresentaram uma fase exponencial maior comparado com a dos outros isolados. Os dados da Tabela 1 mostram que todas as culturas bacterianas já estavam em fase estacionária quando foram transferidas de cultura em agitação para condições estacionadas para verificação do aumento protéico total.

Tabela 1 – Acompanhamento da fase estacionária de cada isolado de Beijerinckia sp., sob condições estacionadas em estufa a 30 °C, por medidas de Unidades Formadoras de Colônias (UFC. mL⁻¹).

	ICBR 48	ICBR 55	ICBR 88	ICBR 91	ICBR 177	B. derxii
Tempo(h)	(UFC. mL ⁻¹)	(UFC. mL⁻¹)	(UFC. mL ⁻¹)			
0*	9,8 10 ⁸	9,6 10 ⁸	6,2 10 ⁸	8,7 10 ⁸	7,0 10 ⁸	8,0 10 ⁸
72	9,6 10 ⁸	6,3 10 ⁸	8,8 10 ⁸	9,7 10 ⁸	9,2 10 ⁸	9,3 10 ⁸
144	8,2 10 ⁸	5,9 10 ⁸	8,2 10 ⁸	8,0 10 ⁸	8,1 10 ⁸	7,9 10 ⁸
216	8,0 10 ⁸	6,6 10 ⁸	**	7,0 10 ⁸	**	**
254	**	**	7,7 10 ⁸	**	8,2 10 ⁸	7,6 10 ⁸
288	7,7 10 ⁸	6,0 10 ⁸	**	**	**	**
362	$7,5 10^8$	5,8 10 ⁸	7,0 10 ⁸	6,8 10 ⁸	7,0 10 ⁸	8,1 10 ⁸
434	7,3 10 ⁸	5,6 10 ⁸	7,4 10 ⁸	6,3 10 ⁸	8,6 10 ⁸	8,3 10 ⁸
506	7,9 10 ⁸		7,6 10 ⁸	6,6 10 ⁸	7,9 10 ⁸	7,7 10 ⁸

* 0h refere-se ao 1º dia de cultura estacionada

**nos tempos em branco não se realizou contagem

A Tabela 2 mostra que todos os isolados apresentaram atividade da nitrogenase na fase estacionária. A enzima permaneceu ativa na maior parte do tempo diminuindo ao longo do período. Dados descritos por Thuler et al. (2003) mostraram, que, quando agitada, a população de *Beijerinckia derxii* apresentava uma queda brusca na atividade da nitrogenase, no final da fase exponencial. A cultura sem agitação, contudo não perdia essa atividade. Segundo Miyasaka et al. (2003), na cultura de *B. derxii* sem agitação, em ausência de crescimento celular, havia condições de funcionamento da nitrogenase pela menor disponibilidade de oxigênio pois, segundo Barbosa e Alterthum (1992), a nitrogenase fica inativa em presença de altas taxas de O₂. Contudo, o gênero *Beijerinckia* sp. produz um exopolissacarideo que é citado como o principal, senão o único, mecanismo de proteção aos sistemas sensíveis ao oxigênio, como é o caso da nitrogenase. Segundo Zhao et al. (2006), a nitrogenase é o fator chave da fixação biológica de nitrogênio. Além de catalisar a redução de N₂ a amônia, reduz também pequenas moléculas insaturadas como acetileno, azida e cianeto.

Tabela 2 - Atividade específica da nitrogenase (fmoles/ufc.h) de cada isolado de *Beijerinckia* sp., sob condições estacionadas em estufa a 30 °C.

Tempo(h)	ICBR 48	ICBR 55	ICBR 88	ICBR 91	ICBR 177	B. derxii
0*	1,31	2,66	5,7	3,22	2,74	2,07
72	0,54	2,17	3,74	1,31	1,36	2,89
144	0,37	1,04	1,77	0,96	1,12	1,78
216	0,46	0,74		0,62		
254			1,41		0,62	1,13
288	0,54	0,27				
362	0,35	0	0,56	0,56	0,46	0,85
434	0,08	0	0,69	0,21	0,28	0,34
506	0		0,14	0,19	0	0

* Oh refere-se ao 1º dia de cultura estacionada

As Figuras 6, 7, 8, 9, 10 e 11 a seguir mostram o aumento protéico celular ao longo da fase estacionária de todos os isolados de *Beijerinckia* sp. indicando um possível acúmulo de material nitrogenado nestes isolados.

Quando as culturas deixaram de ser agitadas (72 h) os valores de concentração de proteína total em todos os isolados, foram próximos, em média com 67 µg/mL. No intervalo em que as culturas ficaram estacionadas o tempo de duração da atividade da nitrogenase variou entre os isolados. O ICBR 48 e ICBR 91 tiveram um aumento protéico celular semelhantes de 41,6% e 43,1% respectivamente. O isolado ICBR 55 teve o menor aumento protéico (31,5%) e a atividade cessou em 360 h. O isolado ICBR 88 teve o maior aumento protéico celular, 80,2%, e permaneceu com a enzima ativa durante toda a fase estacionária. Porém, a atividade enzimática da ICBR 91

permaneceu durante as 500 h e teve um aumento inferior ao da ICBR 88. Por isso não se pode afirmar que há uma relação direta do acúmulo protéico com o tempo de duração da atividade da nitrogenase, na fase estacionária. A ICBR 177 e a *B. derxii* cessaram a atividade em 434 h e tiveram um aumento protéico de 35,7% e 38,3% respectivamente (Tabela 3).



Figura 6. Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 48.



Figura 7. Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 91.



Figura 8. Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 55.



Figura 9. Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 88.



Figura 10. Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 177.



Figura 11. Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado *Beijerinckia derxii.*

Uma comparação entre os valores de atividade da nitrogenase e de aumento protéico celular mostra que a bactéria ICBR 88 foi aquela que apresentou maiores valores de atividade enzimática e também um maior aumento protéico até o final do ensaio. No entanto, nos demais isolados não foi possível se correlacionar diretamente o aumento da concentração protéica celular com a atividade da nitrogenase.

Os dados da dosagem protéica total foram submetidos à Análise de Variância -ANOVA, seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. Observou-se que, nestes primeiros experimentos para todos os isolados, existe aumento significativo no conteúdo protéico celular em relação ao tempo (p< 0,001).

Isolados	Média da massa seca celular (g.mL ⁻¹)	Primeira dosagem protéica da fase estacionária (μg.mL ⁻¹)	Ultima dosagem protéica da fase estacionária (μg.mL ⁻¹)	Aumento protéico celular (μg.mL ⁻¹)	Aumento protéico celular (%)
ICBR 48	1,08	73,89	104,66	30,77	41,6
ICBR 55	1,22	68,35	89,85	21,50	31,5
ICBR 88	1,52	57,84	104,22	46,38	80,2
ICBR 91	1,32	70,29	100,55	30,26	43,1
ICBR 177	1,48	66,30	89,97	23,67	35,7
B. derxii	1,34	65,11	90,03	24,92	38,3

Tabela 3 - Biomassa dos cinco isolados de *Beijerinckia* sp. e da B. *derxii* e aumento protéico total durante a fase estacionária.

A Tabela 3 mostra a média da massa seca determinada após as lavagens para remoção do exopolissacarideo. Não foi possível correlacionar as medidas de massa seca dos isolados com a concentração protéica. Talvez se as medidas fossem determinadas em maior quantidade de células os resultados poderiam apresentar melhores correlações. Sendo assim, a diferença dos valores de aumento protéico total poderia ter duas hipóteses: a primeira é que a população bacteriana não teria atingido o seu potencial de armazenamento de material nitrogenado, em forma de grânulos, neste intervalo de tempo analisado, ou seja, o tempo de 500 h na fase estacionária não foi o suficiente para detectar o aumento máximo de reserva de todas as culturas. Esta idéia foi motivada pelos dados obtidos com a *Beijerinckia* ICBR 88 que, no ponto de 500 h, ainda não havia estabilizado os valores de proteína total, mostrando, portanto,

tendência a continuar aumentando a reserva nitrogenada. Neste caso seria necessário prolongar o tempo das medidas durante a fase estacionária de crescimento; a segunda hipótese é que os isolados podem ser de espécies diferentes, justificando assim diferenças metabólicas durante esta fase de crescimento.

O aumento de proteína celular concomitante à manutenção da atividade da nitrogenase verificados nos cinco isolados de *Beijerinckia* sp., durante a fase estacionária de crescimento, sugere que o destino do nitrogênio fixado seria os grânulos de armazenamento, como proposto para *Beijerinckia derxii* por Miyasaka (2003). Esses dados também sugerem que a ocorrência de reservas nitrogenadas seja comum ao gênero *Beijerinckia* e está associada ao processo de fixação biológica de nitrogênio, já que a atividade da nitrogenase foi detectada durante grande parte da fase estacionária.

A reação de Sakaguchi foi utilizada por Simon em 1971 para caracterização química da cianoficina em cianobactérias e, revelou presença de arginina nos grânulos intracelulares de *Anabaena cylindrica*. A Figura 12 mostra a cor avermelhada no interior das células de *Beijerinckia*, região evidenciada pela reação de Sakaguchi (BAKER, 1947), positiva para todos os isolados, ou seja, todos apresentam grânulos intracelulares de material nitrogenado e há presença de arginina em sua constituição. Segundo Simon e Weathers (1976), a cianoficina é um polímero constituído de quantidade equimolar de arginina e ácido aspártico como um esqueleto de poliaspartato com argininas ligadas ao grupo β -carboxila de cada aspartato pelo seu grupo α -amino.



Beijerinckia derxii



Figura 12. Grânulos intracelulares visualizados por microscopia óptica (1000x) por meio da reação de Sakaguchi, apresentando uma coloração avermelhada no interior celular.

Verificada a presença de grânulos de reserva procederam-se às extrações deste material nitrogenado.

A Tabela 4 mostra as dosagens protéicas totais realizadas com células integras. Os valores obtidos após a sonicação (50 mL de amostra sonicada) mostraram um aumento de proteína total, o que revela que com as células íntegras não se consegue determinar os maiores valores de proteína celular. Dando continuidade ao método, esta tabela mostra as dosagens após a extração (3 mL de amostra purificada em pH 2) pelo método de Simon e Weathers (1976). Os cálculos de porcentagem da reserva após o método de purificação mostraram que cerca de 12% do material foi recuperado.

Isolados	Dosagem pós- lavagem para remoção do muco (μg/mL)	Dosagem pós- sonicação (μg/mL)	Dosagem pós- purificação (μg/mL) pH 2	% reserva recuperada
ICBR 48	441,83	740,20	4057,5	11,0
ICBR 55	428,06	616,95	4410,0	14,3
ICBR 88	439,75	801,34	5005,5	12,5
ICBR 91	498,68	756,59	4062,9	10,7
ICBR 177	503,12	739,74	4419,0	11,9
B. derxii	468,67	625,18	3625,5	11,6
concentração	10x	10x	15x	

Tabela 4 - Dosagens protéicas durante as etapas da metodologia descrita por Simon eWeathers (1976) e porcentagem de reserva recuperada ao final do método.

Como reservas nitrogenadas em *Beijerinckia* nunca foram estudadas, portanto não havendo método na literatura apropriado para sua recuperação, houve a necessidade da aplicação de mais de um método para se certificar que não se estaria perdendo material. Foram, então, testados diferentes métodos para se chegar àquele que produzisse melhores resultados. Assim, o próximo passo foi empregar o método de Simon e Weathers (1976) com modificações: o precipitado foi re-extraído por mais duas vezes com HCI 0,1N. Como pode ser visto na Tabela 5 houve maior recuperação de material purificado ao final do método modificado comparado com o método do mesmo autor, sem as modificações.

Isolados	Dosagem pós- purificação (μg/mL) pH 2 (sem modificação)	% reserva recuperada	Dosagem pós- purificação (μg/mL) pH 2 (modificado)	% reserva recuperada
ICBR 48	4057,5	11,0	6056,3	16,4
ICBR 55	4410	14,3	4909,3	15,9
ICBR 88	5005,5	12,5	5020,9	12,6
ICBR 91	4062,9	10,7	6639,8	17,6
ICBR 177	4419	11,9	6556,0	17,7
B. derxii	3625,5	11,6	4776,1	15,3

 Tabela 5 - Comparação da porcentagem de reserva recuperada após o método descrito por Simon e Weathers (1976) modificado.

A análise por HPLC para a avaliação da composição em aminoácidos da reserva nitrogenada de *B. derxii* não detectou arginina no material extraído pelo método de Simon e Weathers (1976). Na amostra de *B. derxii* foram detectados vários aminoácidos: lisina, alanina, treonina, glicina, valina, isoleucina, leucina, metionina, histidina, fenilalanina, glutamato, tirosina e aspartato. Este último, descrito como componente da cianoficina segundo Simon (1971), foi detectado em proporção molar pequena em relação aos outros aminoácidos (Figura 13). Estes resultados contradizem a reação de Sakaguchi que revelou a presença de arginina nos grânulos intracelulares de todos os isolados. Portanto, esta metodologia descrita para cianobactérias não é o método apropriado para a purificação da reserva nitrogenada no gênero *Beijerinckia* sp. Por isto, foi testada outra técnica de purificação descrita por Steinbüchel et al. (2009) padronizada para extração de cianoficina em *Saccharomyces cerevisiae*.



Figura 13. Perfil da reserva extraída de *B. derxii,* pelo método de Simon e Weathers (1976) modificado, após análise de aminoácidos por HPLC.

A Figura 14 mostra o perfil da reserva extraída, pelo método de Simon e Weathers (1976) modificado, nos isolados de *Beijerinckia* apresentando diversas bandas de pesos moleculares diferentes.



Figura 14. Perfil da reserva extraída, pelo método de Simon e Weathers (1976) modificado, em cinco isolados de *Beijerinckia* sp. (ICBR48 – 35,54 μg, ICBR55 - 36,83 μg, ICBR88 – 46,38 μg, ICBR91 – 28,42 μg, ICBR177 – 41,57 μg) e em *B. derxii* (28,16 μg) pela técnica SDS-PAGE em gel 12,5%.

A repetição dos ensaios vistos nas Figuras 15, 16, 17, 18, 19 e 20 (ANEXO A), mostra o aumento protéico celular e a atividade específica da nitrogenase em todos os isolados de Beijerinckia durante a fase estacionária. Cada isolado iniciou com uma concentração de proteína total diferente como visto também nos primeiros ensaios descritos anteriormente. O aumento no conteúdo protéico em relação ao tempo é significativo (p< 0,001) em cada isolado. A nitrogenase permaneceu ativa, mas diminuiu sua atividade ao longo do tempo. Esta queda não permite que se faça uma correlação direta entre atividade da enzima e acúmulo nitrogenado, uma vez que atividade enzimática diminui e a quantidade de reserva aumenta. Este fato provavelmente ocorre porque não deve haver uma programação da célula para direcionar o produto da nitrogenase (NH₃) ao acúmulo. Certamente o nitrogênio fixado participa da síntese de todas as moléculas nitrogenadas, necessárias às células. Porém, segundo Kolter, Siegele e Tormo (1993), quando a população bacteriana encontra-se estável, em condições de fase estacionária com a diminuição de nutrientes, ela não mais se multiplica, mas, a síntese de proteínas apesar de ser diminuída, não cessa, pois, esta apresenta proteínas características, só encontradas nesse estágio fase de desenvolvimento celular. O presente trabalho mostra, no entanto, que mesmo em condições pouco favoráveis (diminuição de nutrientes) na fase estacionária a célula continua com sua nitrogenase ativa por um longo tempo e que parte do produto é armazenado para utilização no momento de maior escassez dos nutrientes.

Com o método de extração descrito por Steinbüchel et al. (2009) não foram obtidos bons resultados, pois, ao final desta metodologia não foram detectados níveis significativos de aminoácidos na análise por HPLC. Neste método também se utiliza o princípio da alternância de pH 2 e 7 para solubilizar e precipitar, respectivamente, o material nitrogenado em questão, como descrito por Simon e Weathers (1976). A principal diferença desta nova técnica é a utilização de proteinase K.

Outra metodologia de purificação descrita por Elbahloul et al. (2005) foi testada. Para isto, os ensaios na fase estacionária foram repetidos conforme os primeiros. As Figuras 21, 22, 23, 24, 25 e 26 mostram que todos os isolados apresentaram aumento de proteína total e a atividade da nitrogenase se manteve durante o ensaio, diminuindo ao longo do tempo. O isolado ICBR 88 foi o que teve maior aumento protéico com 45,14 μg/mL similar ao valor do primeiro experimento relatado anteriormente com 46,38 μg/mL. O ICBR 55 e ICBR 91 tiveram um aumento protéico similar de 30,08 μg/mL e 31,31 μg/mL respectivamente. Os isolados ICBR 177 e *B. derxii* apresentaram também um aumento similar de 33,65 μg/mL e 34,53 μg/mL (Tabela 6). O isolado ICBR 48 teve o menor aumento de proteína total com 28,01 μg/mL, sendo que nos primeiros experimentos foi a ICBR 55 que apresentou o menor valor (21,50 μg/mL). Portanto, ocorre uma variação no acúmulo de material nitrogenado num mesmo isolado, ou seja, um mesmo isolado apresentou variações, quando comparados os experimentos de cada um (ANEXO B).



Figura 21. Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 48.



Figura 22. Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 55.



Figura 23. Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 88.



Figura 24. Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 91.



Figura 25. Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 177.



Figura 26. Perfil do aumento protéico celular e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado *Beijerinckia derxii.*

A Figura 27 mostra a comparação dos perfis protéicos de cada isolado nestes últimos ensaios ao longo da fase estacionária. Verifica-se que o perfil do isolado ICBR 88 destaca-se dos demais apresentando maior aumento.



Figura 27. Comparação dos perfis protéicos de cada isolado.

O método ANOVA seguido por comparações múltiplas pelo método de Tukey foi empregado para comparar o aumento protéico total dos isolados entre si e com *Beijerinckia derxii*. Verificou-se que os isolados ICBR 48, ICBR 55, ICBR 91 e ICBR 177 não apresentaram diferenças significativas com a *B. derxii*. Porém, o isolado ICBR 88 apresentou diferença significativa com a *B. derxii* e com todos os outros isolados no aumento máximo protéico durante a fase estacionária (p< 0,05) (Figura 28).



Figura 28. Comparação do aumento máximo de proteína total em relação ao tempo inicial de todos os isolados, pelo teste estatístico Tukey (p< 0,05).

A Tabela 6 mostra a massa seca celular de cada isolado após a liofilização. Observa-se que o isolado ICBR 88 apresentou maior peso seco e por isso pode estar relacionado ao aumento protéico celular. Os demais isolados apresentaram valores próximos de peso seco celular e consequentemente, valores (µg.mL⁻¹) parecidos de aumento protéico durante a fase estacionária. Estes dados revelam que os valores de peso seco celular foram mais consistentes quando se utilizou a técnica de liofilização ao invés da filtração em membrana de poro. A liofilização possibilitou relacionar os dados de massa seca com o aumento protéico, não sendo possível com a outra técnica.

Isolados	Média do peso seco celular (g.mL ⁻¹)	Primeira dosagem protéica da fase estacionária (μg.mL ⁻¹)	Ultima dosagem protéica da fase estacionária (μg.mL ⁻¹)	Aumento protéico celular (μg.mL ⁻¹)
ICBR 48	0,069	22,64	50,65	28,01
ICBR 55	0,064	16,15	46,23	30,08
ICBR 88	0,116	50,95	96,09	45,14
ICBR 91	0,057	11,22	42,53	31,31
ICBR 177	0,076	23,66	57,31	33,65
B. derxii	0,079	25,31	59,84	34,53

Tabela 6 -	· Biomassa d	dos cinco	isolados	de Beijei	<i>'inckia</i> sp.	e da B.	derxii	e aumento	protéico
	celular dura	ante a fas	e estacio	onária.					

A Tabela 7 mostra as dosagens protéicas realizadas antes e após a purificação (1mL de amostra purificada em pH 2) pelo método de Elbahloul et. al. (2005). Os cálculos da porcentagem de reserva recuperada após o método de purificação mostraram que cerca de 21% do material foi recuperado. A produtividade foi em média 0,22% do peso seco celular que, comparada a produtividade de cianoficina produzida por *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 (1,4% do peso seco celular) (ELBAHLOUL et. al., 2005), é considerada baixa. Porém, é maior se comparada com a produtividade de cianoficina produzida por *Anabaena cylindrica*, 0,1% do peso seco celular (SIMON, 1973).

Isolados	Dosagem antes da purificação (μg/mL)	Dosagem pós- purificação (μg/mL) pH 2	% reserva recuperada	Produtividade (%)
ICBR 48	777,9	156,2	20,1	0,23
ICBR 55	702,8	138,9	19,8	0,22
ICBR 88	869,2	247,7	28,5	0,21
ICBR 91	810,4	142,1	17,5	0,25
ICBR 177	830,1	176,4	21,2	0,23
B. derxii	644,0	122,3	19,0	0,15

Tabela 7 - Dosagens protéicas e porcentagens de reserva recuperada após as etapas dametodologia descrita por Elbahloul et al. (2005).

A metodologia padronizada para extração de cianoficina em *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 por Elbahloul et al. (2005) foi aplicada na amostra de *B. derxii* e detectou-se arginina em grande proporção molar (126,56) e aspartato em proporção

molar muito pequena comparada a arginina. A Figura 29 mostra que foram detectados vários aminoácidos: lisina, alanina, treonina, glicina, valina, isoleucina, leucina, metionina, histidina, fenilalanina, glutamato, tirosina e aspartato em proporções muito pequenas comparadas com a proporção de arginina presente na amostra. Todas as amostras dos demais isolados, extraídas por este mesmo método, apresentaram um perfil semelhante com um alto teor de arginina (ANEXO C). Segundo Krehenbrink, Oppermann-Sanio e Steinbüchel (2002), a cianoficina isolada de *Acinetobacter* sp. linhagem DSM 587 mostrou composição equimolar de aspartato e arginina. Isto pode significar que a reserva nitrogenada encontrada no gênero *Beijerinckia* seja diferente da cianoficina encontrada em cianobactérias e em *Acinetobacter* sp.



Figura 29. Perfil da reserva extraída de *B. derxii,* pelo método de Elbahloul et al. (2005), após análise de aminoácidos por HPLC.

A Figura 30 mostra a reação de Sakaguchi realizada na amostra ICBR 88 purificada após a extração pelo método de Elbahloul et al. (2005). A cor avermelhada evidencia a presença de arginina e quando comparada aos controles apresenta uma intensidade maior na cor, indicando um alto teor de arginina. Todas as amostras extraídas dos demais isolados de *Beijerinckia* sp. também apresentaram coloração

avermelhada. A presença de arginina também foi confirmada por espectrometria de massa dessa amostra ICBR 88 (ANEXO D) e dos demais isolados, pela detecção da massa molar da arginina. Segundo Abdelal (1979), a arginina é um aminoácido metabolicamente versátil e além de ser um precursor da síntese de poliaminas, serve como fonte de carbono, nitrogênio e de energia através de uma variedade de vias catabólicas presentes numa ampla base de bactérias.



Figura 30. Reação de Sakaguchi: 1) controle com água, 2) controle com arginina (0,5mM) e 3) amostra purificada ICBR 88 após o método de Elbahloul et al. (2005).

Reservas nitrogenadas são raras porque nitrogênio prontamente assimilável é escasso na natureza. Os aminoácidos que compõem o material de reserva em bactérias podem ser utilizados por outros organismos. Podem, portanto, apresentar um importante papel ecológico atuando como estimulante do metabolismo vegetal, fazendo com que as plantas se recuperem mais rapidamente de estresses causados por vários fatores como: seca, injúria por defensivo, ataques de pragas e doenças, proporcionando às culturas um potencial produtivo. O aminoácido arginina, por exemplo, age como um eficiente promotor de enraizamento de toletes da cana-de-açúcar, causando ainda emergência precoce das gemas (NETTO, 2006). As principais aplicações da arginina estão na indústria farmacêutica e como intensificador de sabor na indústria alimentícia. Nos seres humanos, a arginina é classificada como um aminoácido condicionalmente essencial para a síntese de proteína, e seu metabolismo também dá origem ao óxido nítrico, metabólitos do ciclo da uréia creatina, prolina e poliaminas. A arginina atua num importante papel na divisão celular, cicatrização de

feridas, removedor da amônia do corpo, função imune, e liberação de hormônios. (IKEDA, 2003).

As proteínas apresentam peso molecular exato, enquanto os poli aminoácidos mostram dispersão notável de peso molecular (FENG et al., 2007). A cianoficina é uma reserva nitrogenada de peso molecular que varia de 25000 a 100000 daltons mostrando assim um perfil com bandas de diferentes pesos moleculares (SIMON; WEATHERS, 1976). Pela técnica SDS-PAGE foram obtidos os perfis da reserva de todos os isolados de *Beijerinckia*. Estes perfis foram iguais entre os isolados e apresentaram diversas bandas que variavam de 15000 a 120000 daltons (Figuras 31 e 14) indicando ser um poli aminoácido. Porém, é diferente do perfil da cianoficina observado em *Synechococcus* sp PCC6308 e nas linhagens de *E. coli* recombinantes por Aboulmagd, Oppermann-Sanio e Steinbüchel (2000) (Figura 4).



Figura 31. Perfil da reserva purificada, pelo método de Elbahloul et al. (2005), em cinco isolados de *Beijerinckia* sp. (ICBR48 – 38,34 μg, ICBR55 -33,35 μg, ICBR88 – 31,38 μg, ICBR91 – 31,42 μg, ICBR177 – 33,56 μg) e em *B. derxii* (38,12 μg) pela técnica SDS-PAGE em gel 12,5%.

Segundo Feng et al. (2007), existem três diferentes poli aminoácidos apresentados na natureza: poli γ-glutâmico (PGA-γ), poli ε-lisina (ε-PL) e cianoficina. O poli-γ-glutâmico é um polímero extracelular, hidrossolúvel e descoberto como sendo a cápsula da bactéria gram-positiva *Bacillus anthracis*. A poli ε-lisina é um polímero também extracelular descoberto pela primeira vez em *Streptomyces albulus* 346.

Diferente desses dois tipos de poli aminoácidos, a cianoficina é uma reserva nitrogenada intracelular descoberta inicialmente em *Anabaena cylindrica*.

A cianoficina é um polímero cuja síntese é catalisada pela cianoficina sintetase (CphA). Até há poucos anos, cianoficina era descrita apenas em cianobactérias. Krehenbrinck, Oppermann-Sanio e Steinbüchel (2002) analisaram sequências genômicas de microrganismos não-cianobactérias e encontraram genes capazes de codificar proteínas ortólogas a CphA. Um estudo inicial com base na sequência de genes *cphA* presentes em cianobactérias, clostridia, beta e gama-proteobactérias revelou que *B. derxii* ATCC 33962 não apresentava gene com similaridade ao *cphA* encontrado nesses grupos bacterianos.

A busca no genoma de *Beijerinckia indica* (subsp. indica ATCC 9039) revelou apenas a presença de um gene (*murD*) com baixa similaridade ao *cphA* de *Synechocystes*. Esse gene (*murD*), localizado na região 771775 a 773163 do genoma de *B. indica* e no locus Bind_0690, codifica uma *UDP-N-cetylmuramyl-tripeptide synthetase*. Com base no genoma de *B. indica* ATCC 9039 foram desenhados iniciadores (*primers*) para amplificação deste gene. A Figura 26 mostra os *amplicons* obtidos em PCR utilizando como molde o DNA genômico de diferentes isolados de *Beijerinckia*.



Figura 32. Perfis de migração em gel de agarose (1%) dos a*mplicons* de 2096 pb de todos os isolados de *Beijerinckia* sp. obtidos por PCR com "*primers*" desenhados com base na sequência genômica de *B. indica.*

O *amplicon* de 2096 pb do DNA genômico de *Beijerinckia derxii* ATCC 33962 foi sequenciado apenas para confirmação dos dados. O alinhamento realizado pelo programa BLASTn deste *amplicon* com a sequência genômica de *B. indica* ATCC 9039 apresentou 100% de identidade (ANEXO E).

A Figura 33 mostra o perfil da digestão do plasmídio com a enzima *Eco*RI apresentando 3 bandas: 1^a) vetor pGEM T-Easy com o inserto (~5090 pb); 2^a) vetor pGEM T-Easy (~3000 pb) e 3^a) inserto (2096 pb), confirmando a inserção do *amplicon* de 2096 pb da *B. derxii* ATCC 33962 no vetor.



Figura 33. Perfis de migração em gel de agarose 1%; 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder, Invitrogen; 2) Plasmídio digerido com *Eco*RI; 3) *Amplicon* de 2096 pb de *B. derxii* ATCC 33962.

A linhagem recombinante, *E. coli* XL1 Blue abrigando o vetor pGEM T-Easy contendo o a*mplicon* de 2096 pb, que foi cultivada em meio com arginina e ácido aspártico revelou pela reação de Sakaguchi a presença de grânulos intracelulares de coloração avermelhada (Figura 34), indicativo da presença de arginina como observado nos isolados de *Beijerinckia* (Figura 12).



Figura 34. Grânulos intracelulares visualizados por microscopia óptica (1000x) por meio da reação de Sakaguchi, apresentando uma coloração avermelhada no interior celular do recombinante *E. coli* XL1 Blue.

As Figuras 35, 36, 37 e 38 mostram os perfis das concentrações de células (UFC/mL) e de proteína total detectada nessas células. Como se observa, em todas as condições de cultivo testadas, a linhagem controle (*E. coli* XL1 Blue contendo apenas o vetor pGEM T-Easy) não apresenta aumento no conteúdo de proteína total durante a fase estacionária de crescimento. Por outro lado, para a linhagem *E. coli* XL1 Blue abrigando o vetor pGEM T-Easy contendo o *amplicon* de 2096 pb observa-se um aumento na concentração de proteína total durante a fase estacionária de crescimento em níveis semelhantes àqueles observados para linhagens de *Beijerinckia,* sugerindo que ocorre o acúmulo de material de reserva de nitrogênio.



Figura 35. Perfil da concentração de proteína total (μg.mL⁻¹) e da viabilidade celular (UFC. mL⁻¹) durante a fase estacionária do controle (*E. coli* XL1 Blue sem o a*mplicon* de 2096 pb) em meio LBA contendo arginina (10 mM).



Figura 36. Perfil do aumento protéico celular (μg.mL⁻¹) e da viabilidade celular (UFC. mL⁻¹), durante a fase estacionária, do recombinante (*E. coli* XL1 Blue com o a*mplicon* de 2096 pb) em meio LBA contendo arginina (10 mM).



Figura 37. Perfil da concentração de proteína total (μg.mL⁻¹) e da viabilidade celular (UFC. mL⁻¹) durante a fase estacionária do controle (*E. coli* XL1 Blue sem o a*mplicon* de 2096 pb) em meio LBA contendo arginina (10 mM) e ácido aspártico (10 mM).



Figura 38. Perfil do aumento protéico celular (μg.mL⁻¹) e da viabilidade celular (UFC. mL⁻¹), durante a fase estacionária, do recombinante (*E. coli* XL1 Blue com o a*mplicon* de 2096 pb) em meio LBA contendo arginina (10 mM) e ácido aspártico (10 mM).

A matéria orgânica do solo pode conter uma grande variedade de compostos orgânicos nitrogenados, aminoácidos livres em geral representam apenas uma pequena fração deste conjunto. Em contraste, aminoácidos ligados que formam peptídeos e proteínas podem contribuir com mais da metade do *"pool"* de nitrogênio orgânico da solução do solo (NÄSHOLM et al., 2009). A aplicação de cianobactérias na agricultura se mostrou viável pelos resultados verificados por Watanabe e Kiyohara (1960). Em culturas de arroz observaram que a inoculação de uma linhagem de *Beijerinckia*, foi capaz de aumentar sua produção similar da adubação nitrogenada, indicando a contribuição desta bactéria através da disponibilidade de algum tipo de composto nitrogenado ou substância estimuladora do crescimento vegetal (DOBEREINER; RUSCHEL, 1961).

5 CONCLUSÕES

- A ocorrência de reservas nitrogenadas é comum aos cinco isolados de Beijerinckia sp. e está associada ao processo de Fixação Biológica de Nitrogênio;
- O método de extração da reserva que mostrou melhores resultados foi o de Elbahloul et. al. (2005);
- A reserva nitrogenada encontrada em *Beijerinckia* sp. apresenta composição de aminoácidos diferente da cianoficina pelo alto teor de arginina evidenciado e por não ter sido encontrado ácido aspártico na mesma proporção molar da arginina;
- Presença de uma reserva nitrogenada intracelular inédita, nunca descrita anteriormente em outros microrganismos;
- Descoberta de um possível gene envolvido no acúmulo de material nitrogenado em *Beijerinckia* sp.

REFERÊNCIAS¹

ABDELAL, A. Arginine catabolism by microorganisms. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 33, p. 139–168, 1979.

ABOULMAGD, E.; OPPERMANN-SANIO, F. B.; STEINBÜCHEL, A. Molecular characterization of the cyanophycin synthetase from *Synechocystis* sp strain PCC6308. **Arch. Microbiol.**, v. 174, p. 297-306, 2000.

ABOULMAGD, E. et al. Heterologous expression of cyanophycin synthetase and cyanophycin synthesis in the industrial relevant bacteria *Corynebacterium glutamicum* and *Ralstonia eutropha* and in *Pseudomonas putida*. **BioMacromol.,** v. 2 p. 1338–1342, 2001.

ALLEN, M. M.; WEATHERS, P. J. Structure and composition of cyanophycin granules in the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6808. J. Bacteriol., v. 141, p. 959-962, 1980.

ALTSCHUL, S. F. et al. A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

AVDALOVIC, N., et al. An integrated amperometry waveform for the direct, sensitive detection of amino acids and amino sugars following anion-exchange chromatography. **Anal Chem.**, v. 71, p. 2774-2781. 1999.

BAKER, J. R. The histochemical recognition of certain guanidine derivatives. J. Microscop. Scien., v. 88, p. 115-121, 1947.

BARBOSA, H. R.; ALTERTHUM, F. The role of extracellular polysaccharide in cell viability and nitrogenase activity of *Beijerinckia derxii*. **Can. J. Microbiol.**, v. 38, p. 986-988, 1992.

BARBOSA, H. R.; CARVALHAL, M. L. C. Isolamento e caracterização morfo-fisiológica de bactérias fixadoras de nitrogênio aeróbias, de vida livre, de solo de cerrado. **Rev. Microbiol.**, v. 19, p. 365-368, 1988.

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. **Microbiologia básica**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1999. 196 p.

BARBOSA, H. R. et al. Counting of viable cluster-forming and non cluster-forming bacteria: a comparison between the drop and the spread methods. J. Microbiol. Methods, v. 22, p. 39-50, 1995.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARBOSA, H. R. et al. Nitrogenase activity of *Beijerinckia derxii* is preserved under adverse conditions for its growth. Braz. **J. Microbiol.**, v. 33, p. 223-229, 2002.

BASTIÁN, F. et al. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regul.**, v. 24, p. 7-11, 1998.

BECKING, J. H. Studies on nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia*. **Plant and Soil**, v. 14, p. 49-81, 1961.

BECKING, J. H. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia*. **Soil Scien.,** v. 118, p. 196-212, 1974.

BERG, H. et al. Biosynthesis of the cyanobacterial reserve polymer multi-L-arginyl-poly-L- aspartic acid (cyanophycin). **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 5561-5570, 2000.

BERG, H. Untersuchungen zu Funktion und Struktur der Cyanophycin-Synthetase von Anabaena variabilis ATCC 29413. 2003. 123 p. Dissertation (Biotechnology) - Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, 2003.

BOCKHOLT, R.; SCHOLTEN-BECK, G.; PISTORIUS, E. K. Construction and partial characterization of an L-amino acid oxidase-free *Synechococcus* PCC 7942 mutant and localization of the Lamino acid oxidase in the corresponding wild type. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1307, p. 111–121, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BULLOCK, W. O.; FERNANDEZ, J. M.; SHORT, J. M. XL1 Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. J. Biotechnol., v. 5, p. 376-379, 1987.

BURRIS, R. H. Nitrogenases. J. Biol. Chem., v. 266, p. 9339-9342, 1991.

DEMBINSKA, M. E.; ALLEN, M. M. Cyanophycin granule size variation in *Aphanocapsa*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 134, p. 295-298, 1988.

DERX, H. G. *Beijerinckia*, a new genus of N-fixing bacteria occuring in tropical soils. **Proc. Neth. Acad. Sci. Amsterdan**, v. 53, p. 140-147, 1950.

DILWORTH, M. J.; GLENN, A. R. **Biology and biochemistry of nitrogen fixation**. New York: Elsevier, 1991. 438 p.

DINIZ, S. C; VOSS, I; STEINBÜCHEL, A. Optimization of cyanophycin production in recombinant strains of *Pseudomonas putida* and *Ralstonia eutropha* employing
elementary mode analysis and statistical experimental design. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 93, p. 698-717, 2006.

DÖBEREINER, J. Sobre a ocorrência de *Beijerinckia* em alguns Estados do Brasil. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 19, n. 2, p. 151-160, 1959a.

DÖBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de "*Beijerinckia*" do solo. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 19, n. 3, p. 251-258, 1959b.

DÖBEREINER, J. A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. Seropédica: CNPAB/EMBRAPA, 1997.

DÖBEREINER, J.; ALVAHYDO, R. Influência da umidade do solo na população de bactérias do gênero *Beijerinckia derx*. **Ciência e Cultura**, v. 11, n. 4, p. 208-218, 1959.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa, 1995. 60 p.

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A. P. Inoculação do arroz com bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Beijerinckia derx*. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 21, n. 4, p. 397-407, 1961.

ELBAHLOUL, Y. et al. Physiological Conditions Conducive to High Cyanophycin Content in Biomass of Acinetobacter calcoaceticus Strain ADP1. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 2, p. 858-866, 2005.

FENG S. et al. Microbial production of natural poly amino acid. Sci. China Ser. B-Chem., v. 50, n. 3, p. 291-303, 2007.

FERREIRA, A. O. F. et al. Guia Prático da Farmácia Magistral. 2ª ed. São Paulo: Pharmabooks, 2002.

FÜSER, G.; STEINBÜCHEL, A. Analysis of genome sequences for genes of cyanophycin metabolism: identifying putative cyanophycin metabolizing prokaryotes. **Macromol. Biosci.,** v. 7, p. 278-296, 2007.

HAI, T. et al. Purification and characterization of cyanophycin and cyanophycin synthetase from the thermophilic Synechococcus sp. MA19. FEMS. **Microbiol. Lett.**, v. 181, p. 229-236, 1999.

HAI, T. et al. Engineered cyanophycin synthetase (CphA) from *Nostoc ellipsosporum* confers enhanced CphA activity and cyanophycin accumulation to *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 7652-7660, 2006.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology.** 9th ed. Philadelphia, Williams & Wilkins. 1994. 787 p.

IKEDA, M. Amino acid production processes. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 79, p. 1-35, 2003.

ITOH, Y.; NAKADA, Y. Arginine and polyamine metabolism. In: RAMOS, J. (Ed.). **Pseudomonas**. New York, Kluwer/Plenum, 2004. p. 243–272.

KOLTER, R.; SIEGELE, D. A.; TORMO, A. The stationary phase of the bacterial life cycle. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 47, p. 855-874, 1993.

KREHENBRINK, M; OPPERMANN-SANIO, F. B.; STEINBÜCHEL, A. Evaluation of non-cyanobacterial genome sequences for accurrence of genes encoding proteins homologous to cyanophycin synthetase and cloning of an active cyanophicin synthetase from *Acinetobacter* sp strain DSM 587. **Arch. Microbiol.**, v. 177, p. 371-380, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LU, C. D. Pathways and regulation of bacterial arginina metabolism and perspectives for obtaining arginine overproducing strains. **Appl. Microbiol. Biotechnol**., v. 70, p. 261–272, 2006.

MACKERRAS, A. H. et al. Transient accumulations of cyanophycin in *Anabaena cylindrica* and *Synechocystis* 6308. J. Gen. Microbiol., v. 136, p. 2057-2065, 1990.

MIYASAKA, N. R. S. et al. During stationary phase, *Beijerinckia derxii* shows nitrogenase activity concomitant with the release and accumulation of nitrogenated substances. **Microbiol. Res.**, v. 158, p. 309-315, 2003.

NÄSHOLM, T. et al. Uptake of organic nitrogen by plants. **New Phytologist,** v. 182, p. 31-48, 2009.

NETTO, J. M. Maturadores e reguladores vegetais na cultura da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V. et al. (Ed.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba, São Paulo: CP 2, 2006. p. 307-318.

NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa, 1998. 486 p.

OPPERMANN-SANIO, F. B.; STEINBÜCHEL, A. Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 11-22, 2002.

OLIVEIRA, Z. M. Bactérias diazotróficas isoladas da rizosfera de cana-de-açúcar: efeito da adubação orgânica sobre sua fisiologia. 2009. 165 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PATI, B. R. et al. Studies on the amino acids released by phyllosphere diazotrophic bacteria. **Microbiol. Res.**, v. 149, p. 287-290, 1994.

PAYNE, T. M. B. et al. The relationship between soil bacteria with simple nutritional requirements and those requiring amino acids. **Can. J. Microbiol.**, v. 3, p. 73-82, 1957.

PERRY, J. J.; STALEY, J. T. **Microbiology**: dynamics and diversity. Orlando: Saunders College Publishing, 1997.

PORTAL ESCOLA CIÊNCIA E CULTURA. O ciclo do nitrogênio. 2010. Disponível em: ortalcienciaecultura.blogspot.com> Acesso em: 15 nov. 2010.

POSTGATE, J. R. **Nitrogen Fixation**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 252 p.

QUESADA, D. M. A fixação biológica de nitrogênio como suporte para a produção de energia renovável. **An. 3. Enc. Energ. Meio Rural**, 2003.

QUINTERO, M. J. et al. Arginine catabolism in the cyanobacterium Synechocystis sp. Strain PCC 6803 involves the urea cycle and arginase pathway. **J. Bacteriol**, v. 182, p. 1008–1015, 2000.

RAIJ, B. V. **Fertilidade do solo e adubação.** Piracicaba, SP: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, POTAFOS, 1991. 343 p.

REES, D. C.; HOWARD, J. B. Nitrogenase: standing at the crossroads. **Curr. Opinion Chem. Biol.**, v. 4, p. 559-566, 2000.

RODRIGUES, T. J. D.; LEITE, I. C. **Fisiologia vegetal:** hormônios das plantas. Jaboticabal: FUNEP, 2004. 78 p.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning:** a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHREIER, H. J.; BERNLOH, R. W. Purification and properties of glutamate synthase from *Bacillus licheniformis*. J. Bacteriol., v. 160, n. 2, p. 591-599, 1984.

SCHWAMBORN, M. Chemical synthesis of polyaspartates: a biodegradable alternative to currently used polycarboxylate homo- and copolymers. **Polym. Degrad. Stabil.,** v. 59, p. 39-45, 1998.

SIMON, R. D. Cyanophycin granules from the blue-green alga *Anabaena cylindrica*: A reserve material consisting of copolymers of aspartic acid and arginine. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 68, p. 265-267, 1971.

SIMON, R. D. The effect of chroramphenicol on the production of cyanophycin granule polypeptide in the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. **Arch. Mikrobiol**., v. 92, p. 115-122, 1973.

SIMON, R. D.; WEATHERS, P. Determination of the structure of novel polypeptide containing aspartic acid and arginine which is found in cyanobacteria. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 420, p. 165-176, 1976.

SHIMA, S., SAKAI, H. Polylysine produced by *Streptomyces*. Agric Biol Chem., v. 41, n. 9, p. 1907-1909, 1977.

SPIEKERMANN, P. et al. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. **Arch. Microbiol.**, v. 171, p. 73-80, 1999.

SPRENT, J. I.; SPRENT, P. **Nitrogen fixing organisms**; pure and applied aspects. London: Chapman and Hall, 1990. 256 p.

STEINBÜCHEL, A. et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of novel cyanophycins with an extended range of constituents aminoacids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 3437-3446, 2009.

TAIZ, L.; ZIEGLER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3rd ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 1998. 720 p.

THULER, D. S. et al. *Beijerinckia derxii* releases plant growth regulators and amino acids in synthetic media independent of nitrogenase activity. **J. Appl. Microbiol**., v. 95, p. 799-806, 2003.

TOLEDO, M. B. D. Presença de reserva protéica em Beijerinckia derxii, bactéria fixadora de nitrogênio, quimiorganotrófica de vida livre. 2001. 63 f. Dissertação (Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

TURNER, G. L.; GIBSON, A. H. Measurement of nitrogen fixation by indirect means. In: BERGENSEN, F. J. **Methods for evaluating biological nitrogen fixation.** London: John Wiley e Son Publ., p. 111-39, 1980.

VITOUSEK, P. M. et al. Human alteration of the global nitrogen cycle: causes and consequences, **Issues in Ecology**, p. 4-61, 1997.

VOSS, I. et al. Identification of the *Anabaena* sp. PCC7120 cyanophycin synthetase as suitable enzyme for production of cyanophycin in Gram-negative bacteria like *Pseudomonas putida* and *Ralstonia eutropha*. **Biomacromol**., v. 5, p. 1588–1595, 2004.

WATANABE, A.; KIYOHARA, T. Decomposition of blue-green algae as effected by the action of soil bacteria. **J. Gen. Appl. Microbiol**., v. 5, p. 175-179, 1960.

WHITE, D. **The physiology and biochemistry of prokaryotes**. New York: Oxford University Press, 1995. 378 p.

ZHAO et al. Diversity of nitrogenase Systems in Diazotrophs. J. Integr. Plant Biology., v. 48, p. 745-755, 2006.

ZIEGLER, K. et al. Molecular characterization of cyanophycin synthetase, the enzyme catalyzing the biosynthesis of the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-asparttic acid (cyanophycin) **Eur. J. Biochem**., v. 254, p. 154-159, 1998.

ANEXOS





Figura 15. Perfil do aumento protéico total e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 48.



Figura 16. Perfil do aumento protéico e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 55.



Figura 17. Perfil do aumento protéico e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 88.



Figura 18. Perfil do aumento protéico e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 91.



Figura 19. Perfil do aumento protéico e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado ICBR 177.



Figura 20. Perfil do aumento protéico e da atividade específica da nitrogenase, durante a fase estacionária do isolado *Beijerinckia derxii.*



ANEXO B - Perfis do aumento protéico celular e da atividade da nitrogenase dos isolados, em triplicata,

durante a fase estacionária

médio		edio	ICBR 48	48a dil 10x		48b dil 10x		48c dil 10x	
	No.	Prop		No.		No.		No.	
	Mols	Mol	Peak Name	Mols	Proporção	Mols	Proporção	Mols	Proporção
	Médio	Média		nmols	molar	nmols	molar	nmols	molar
	13,59	473,85	Arginine	13,46	520,29	13,59	417,79	13,71	483,47
	0,08	2,80	Lysine	0,08	3,11	0,08	2,54	0,08	2,75
	0,12	4,02	Alanine	0,12	4,45	0,12	3,64	0,11	3,98
	0,05	1,82	Treonine	0,05	1,98	0,05	1,61	0,05	1,87
	0,09	3,12	Glycine	0,09	3,46	0,09	2,81	0,09	3,09
	0,07	2,36	Valine	0,07	2,55	0,07	2,14	0,07	2,40
	0,05	1,78	Proline	0,05	1,96	0,05	1,60	0,05	1,77
	0,05	1,64	Isoleucine	0,05	1,78	0,05	1,52	0,05	1,63
	0,07	2,43	Leucine	0,07	2,65	0,07	2,24	0,07	2,39
	0,03	1,00	Histidine	0,03	1,00	0,03	1,00	0,03	1,00
	0,02	0,71	Phenylalanine	0,02	0,74	0,02	0,72	0,02	0,69
	0,12	4,18	Glutamate	0,13	4,84	0,13	3,96	0,11	3,76
	0,07	2,60	Aspartate	0,08	2,91	0,08	2,49	0,07	2,40
	0,02	0,63	Tyrosine	0,01	0,57	0,02	0,66	0,02	0,64

ANEXO C – Proporção molar média dos aminoácidos presentes na reserva de todos os isolados de *Beijerinckia* sp.

médio		ICBR 55	55a dil 10x		55b dil 10x		55c dil 10x	
	Prop		No.		No.		No.	
No. Mols	Mol	Peak Name	Mols	Proporção	Mols	Proporção	Mols	Proporção
Médio	Média		nmols	molar	nmols	molar	nmols	molar
12,25	488,79	Arginine	12,06	457,44	12,41	468,52	12,29	540,42
0,06	2,33	Lysine	0,06	2,23	0,06	2,17	0,06	2,58
0,09	3,61	Alanine	0,09	3,50	0,09	3,38	0,09	3,96
0,04	1,61	Treonine	0,04	1,56	0,04	1,51	0,04	1,77
0,07	2,88	Glycine	0,07	2,74	0,07	2,75	0,07	3,14
0,05	2,08	Valine	0,05	1,83	0,05	1,85	0,06	2,58
0,04	1,60	Proline	0,04	1,56	0,04	1,52	0,04	1,72
0,04	1,50	Isoleucine	0,04	1,49	0,04	1,42	0,04	1,59
0,05	2,19	Leucine	0,06	2,15	0,06	2,08	0,05	2,34
0,03	1,00	Histidine	0,03	1,00	0,03	1,00	0,02	1,00
0,02	0,64	Phenylalanine	0,02	0,67	0,02	0,63	0,01	0,62
0,10	4,17	Glutamate	0,10	3,71	0,11	4,12	0,11	4,69
0,06	2,27	Aspartate	0,05	1,98	0,06	2,13	0,06	2,69
0,01	0,54	Tyrosine	0,01	0,47	0,01	0,52	0,01	0,64

médio		ICBR 91	91a dil 10x		91b dil 10x		91c dil 10x	
	Prop		No.		No.		No.	
No. Mols	Mol	Peak Name	Mols	Proporção	Mols	Proporção	Mols	Proporção
Médio	Média		nmols	molar	nmols	molar	nmols	molar
7,73	145,48	Arginine	7,79	126,91	7,25	174,23	8,15	135,30
0,13	2,42	Lysine	0,15	2,44	0,10	2,36	0,15	2,45
0,18	3,27	Alanine	0,20	3,31	0,13	3,20	0,20	3,28
0,08	1,53	Treonine	0,10	1,56	0,06	1,48	0,09	1,56
0,18	3,32	Glycine	0,21	3,34	0,14	3,26	0,20	3,36

0,11	2,06	Valine	0,13	2,10	0,08	1,93	0,13	2,15
0,08	1,48	Proline	0,09	1,51	0,06	1,45	0,09	1,49
0,07	1,35	Isoleucine	0,09	1,39	0,05	1,29	0,08	1,38
0,12	2,16	Leucine	0,14	2,22	0,09	2,10	0,13	2,17
0,05	1,00	Histidine	0,06	1,00	0,04	1,00	0,06	1,00
0,04	0,80	Phenylalanine	0,05	0,82	0,03	0,78	0,05	0,81
0,16	2,94	Glutamate	0,18	2,95	0,11	2,59	0,20	3,27
0,13	2,34	Aspartate	0,14	2,26	0,10	2,46	0,14	2,29
0,04	0,65	Tyrosine	0,04	0,66	0,03	0,64	0,04	0,66

médio		ICBR 88	88a dil 10x		88b dil 10x		88c dil 10x	
	Prop		No.		No.		No.	
No. Mols	Mol	Peak Name	Mols	Proporção	Mols	Proporção	Mols	Proporção
Médio	Média		nmols	molar	nmols	molar	nmols	molar
13,80	565,43	Arginine	13,65	559,18	13,80	552,70	13,96	584,42
0,05	1,98	Lysine	0,05	1,92	0,05	1,97	0,05	2,04
0,09	3,65	Alanine	0,09	3,54	0,09	3,64	0,09	3,76
0,04	1,58	Treonine	0,04	1,54	0,04	1,60	0,04	1,60
0,07	2,99	Glycine	0,07	2,85	0,07	3,00	0,07	3,13
0,05	1,92	Valine	0,05	1,86	0,05	1,86	0,05	2,05
0,04	1,60	Proline	0,04	1,54	0,04	1,59	0,04	1,66
0,03	1,37	Isoleucine	0,03	1,34	0,03	1,36	0,03	1,42
0,05	2,17	Leucine	0,05	2,10	0,05	2,13	0,05	2,28
0,02	1,00	Histidine	0,02	1,00	0,02	1,00	0,02	1,00
0,01	0,59	Phenylalanine	0,02	0,64	0,01	0,58	0,01	0,56
0,09	3,54	Glutamate	0,06	2,61	0,10	3,91	0,10	4,11
0,06	2,41	Aspartate	0,05	2,21	0,06	2,35	0,06	2,68
0,01	0,53	Tyrosine	0,01	0,49	0,01	0,52	0,01	0,59

médio		ICBR 177	177a dil 10x		177b dil 10x		177c dil 10x	
	Prop		No.		No.		No.	
No. Mols	Mol	Peak Name	Mols	Proporção	Mols	Proporção	Mols	Proporção
Médio	Média		nmols	molar	nmols	molar	nmols	molar
14,90	399,70	Arginine	15,09	389,00	14,69	429,28	14,91	380,84
0,10	2,79	Lysine	0,11	2,76	0,10	2,90	0,11	2,71
0,15	4,02	Alanine	0,16	4,03	0,14	4,14	0,15	3,89
0,07	1,86	Treonine	0,07	1,86	0,07	1,93	0,07	1,79
0,12	3,32	Glycine	0,13	3,33	0,12	3,42	0,13	3,22
0,09	2,32	Valine	0,09	2,34	0,08	2,35	0,09	2,26
0,07	1,83	Proline	0,07	1,82	0,06	1,88	0,07	1,79
0,06	1,61	Isoleucine	0,06	1,59	0,06	1,67	0,06	1,56
0,09	2,47	Leucine	0,09	2,45	0,09	2,55	0,09	2,41
0,04	1,00	Histidine	0,04	1,00	0,03	1,00	0,04	1,00
0,03	0,87	Phenylalanine	0,03	0,87	0,03	0,89	0,03	0,85
0,16	4,33	Glutamate	0,17	4,29	0,16	4,55	0,16	4,15
0,10	2,68	Aspartate	0,10	2,61	0,10	2,81	0,10	2,64
0,03	0,72	Tyrosine	0,03	0,73	0,03	0,74	0,03	0,70

ANEXO D – Comparação do perfil da amostra ICBR 88 com os padrões de arginina (Arg) e poli arginina (Poli Arg) pela Espectrometria de Massa





intz.

0.0



ANEXO E - Alinhamento feito pelo programa BLASTn do *amplicon* com a sequência genômica de *B. indica* (subsp.indica ATCC 9039)

>lcl 6 Length	4369 =2096		
Score Ident Stran	= 387 ities d=Plus	1 bits (2096), Expect = 0.0 = 2096/2096 (100%), Gaps = 0/2096 (0%) /Plus	
Query	1	AGCCGACTTTCTTGAAACGCAGTGAGGAAGAGGCAAAACGCAATGTGCCGCGCGTCGTGC	60
Sbjct	1	AGCCGACTTTCTTGAAACGCAGTGAGGAAGAGGCAAAACGCAATGTGCCGCGCGTCGTGC	60
Query	61	GTCCGGAAACGTCTGAATCGATGCGCTATCTGATGCGTCTGAATGCGGAAATTGGATCGG	120
Sbjct	61	GTCCGGAAACGTCTGAATCGATGCGCTATCTGATGCGTCTGAATGCGGAAATTGGATCGG	120
Query	121	CGCGTCTGGTTGATATCAAGGGCTATTTCATCGGCGGCAAGACCGGCACGGCCGACAAGA	180
Sbjct	121	CGCGTCTGGTTGATATCAAGGGCTATTTCATCGGCGGCAAGACCGGCACGGCCGACAAGA	180
Query	181	TCGTGCATGGCCATTACGCCAAGGATAAAGTGTTCACGACGTTCATGGCGATCATGCCGG	240
Sbjct	181	TCGTGCATGGCCATTACGCCAAGGATAAAGTGTTCACGACGTTCATGGCGATCATGCCGG	240
Query	241	CCGACAAGCCGAAATATCTTTTCCTGACGCTGATGGATGAGCCGCAGGGCCTGCCGGAAA	300
Sbjct	241	CCGACAAGCCGAAATATCTTTTCCTGACGCTGATGGATGAGCCGCAGGGCCTGCCGGAAA	300
Query	301	CGGGCGGTTATCGGACGGCTGCCTGGAACTCTGGCTCGGTGACGGCACGGATCATCGAAC	360
Sbjct	301	CGGGCGGTTATCGGACGGCTGCCTGGAACTCTGGCTCGGTGACGGCACGGATCATCGAAC	360
Query	361	GGACCGGGCCTTTGCTTGGCATTCCGCCGCGTCTCGAATTGCCGACACAGCCTTTCCCGC	420
Sbjct	361	GGACCGGGCCTTTGCTTGGCATTCCGCCGCGTCTCGAATTGCCGACACAGCCTTTCCCGC	420
Query	421	TGCTCGCCAAGCTCGGCTATGGCATCGCCAATGTTCCCCAGACGAGTCGGGGAGAGCATT	480
Sbjct	421	TGCTCGCCAAGCTCGGCTATGGCATCGCCAATGTTCCCCAGACGAGTCGGGGAGAGCATT	480
Query	481	GATGCGGCTTGATGCACTCTTCCCCGATGCATTAATCGAACCGCCGGCTTTTGGTGCGCG	540
Sbjct	481	GATGCGGCTTGATGCACTCTTCCCCGATGCATTAATCGAACCGCCGGCTTTTGGTGCGCG	540
Query	541	TGAGATCGCTGGCCTTGCCTGTGACAGCCGATTGGTTGCCAAGGATCAAGTCTTTTTCGC	600
Sbjct	541	TGAGATCGCTGGCCTTGCCTGTGACAGCCGATTGGTTGCCAAGGATCAAGTCTTTTCGC	600
Query	601	CGTTCCTGGCACCAAGGCGGATGGTTTGACCTATGCGCCCGAGGCGGTGCGGCGTGGTGC	660
Sbjct	601	CGTTCCTGGCACCAAGGCGGATGGTTTGACCTATGCGCCCGAGGCGGTGCGGCGTGGTGC	660

Query	661	CTTGGCCGTCGTCACGGAACAATCCGCATCGGTGCCGTTCGAAACGGCGGCTCTGGTCAA	720
Sbjct	661	CTTGGCCGTCGTCACGGAACAATCCGCATCGGTGCCGTTCGAAACGGCGGCTCTGGTCAA	720
Query	721	AGTCGCGGATGTTCGTTCCGCGCTCGCGATTGCCTCGGCCCGTTTCTATGCGCGCCAGCC	780
Sbjct	721	AGTCGCGGATGTTCGTTCCGCGCTCGCGATTGCCTCGGCCCGTTTCTATGCGCGCCAGC	
Query	781	TGAAACCGTGGTTGCGGTGACGGGGACCAGCGGCAAGACATCGGTCGCAGCCTTTGCCCG	840
Sbjct	781	TGAAACCGTGGTTGCGGTGACGGGGGCCAGCGGCAAGACATCGGTCGCAGCCTTTGCCCG	840
Query	841	GCAGATCTGGGCCAGCCTGGGGTTCAAGGCCGCTTCTGTCGGCACTTTGGGCGTCGTGGC	900
Sbjct	841	GCAGATCTGGGCCAGCCTGGGGTTCAAGGCCGCTTCTGTCGGCACTTTGGGCGTCGTGG	900
Query	901	CCCGGATGGCGCGAGCTATGGCGGTCTGACGACGCCTGATCCGATCAGCCTGCATCGCAC	960
Sbjct	901	CCCGGATGGCGCGAGCTATGGCGGTCTGACGACGCCTGATCCGATCAGCCTGCATCGCAC	960
Query	961	GCTCGATGAATTGGCCGGCGCCGGCGTGACGCATCTTGCCTTGGAAGCGTCCTCGCACGG	1020
Sbjct	961	GCTCGATGAATTGGCCGGCGCGGCGTGACGCATCTTGCCTTGGAAGCGTCCTCGCACGG	1020
Query	1021	GCTCGATCAGCATCGGCTGGATTATGTGCGGCTGAAGGCGGCGGGTTTCACCAATCTCTC	1080
Sbjct	1021	GCTCGATCAGCATCGGCTGGATTATGTGCGGCTGAAGGCGGCGGGTTTCACCAATCTCTC	1080
Query	1081	GCGCGATCATCTCGATTATCATCCGACCCTCGAAGCCTATTTCCAGGCGAAGCTCCTGCT	1140
Sbjct	1081	GCGCGATCATCTCGATTATCATCCGACCCTCGAAGCCTATTTCCAGGCGAAGCTCCTGCT	1140
Query	1141	CTTCACCCATGTCTTGCCGGCTGACGGCACGGTGGTGGTCGATGCCGACAGTTCCGCCGG	1200
Sbjct	1141	CTTCACCCATGTCTTGCCGGCTGACGGCACGGTGGTGGTCGATGCCGACAGTTCCGCCGG	1200
Query	1201	CCATGAGGTGATCGATGTCGCCAAGGCGCGCGGGCTGAAGGTCTTTTCCTTAGGGTTTGC	1260
Sbjct	1201	CCATGAGGTGATCGATGTCGCCAAGGCGCGCGCGGGCTGAAGGTCTTTTCCTTAGGGTTTGC	1260
Query	1261	GGGCGAGACACTGCACCTCCTCGAGGCCAGACCCGAGGCGGCGGCGACTTTGCTGCGCTT	1320
Sbjct	1261	GGGCGAGACACTGCACCTCCTCGAGGCCAGACCCGAGGCGGCGGCGACTTTGCTGCGCTT	1320
Query	1321	GACCTTCGCAGGCAAGGATTGGGCCTTGCGCCTGCCTCTGGTTGGGAGTTTCCAAGCTGC	1380
Sbjct	1321	GACCTTCGCAGGCAAGGATTGGGCCTTGCGCCTGCCTCTGGTTGGGAGTTTCCAAGCTGC	1380
Query	1381	CAATGCCTTGATGGCGGCTGGCCTTTGCATCAGCACCGGCGCTGCGCCGGACGCGGTTTT	1440
Sbjct	1381	CAATGCCTTGATGGCGGCTGGCCTTTGCATCAGCACCGGCGCTGCGCCGGACGCGGTTTT	1440
Query	1441	TGCCGCGCTTGAAAGGCTCGAAGGTGCCCCTGGCCGCCTCGAAAAGGTCGGTGAACGGCG	1500
Sbjct	1441	TGCCGCGCTTGAAAGGCTCGAAGGTGCCCCTGGCCGCCTCGAAAAGGTCGGTGAACGGCG	1500

Query	1501	${\tt TGGTGCGTCCATTTTCGTCGATTATGCCCACAAGCCCGATGCGCTGGAAAAAGCCTTGCA$	1560
Sbjct	1501	TGGTGCGTCCATTTTCGTCGATTATGCCCACAAGCCCGATGCGCTGGAAAAAGCCTTGCA	1560
Query	1561	GGCCTTGCGGCCCTTCACGCAAAAGAGGCTGATCGTGATTTTCGGGTGTGGTGGCGATCG	1620
Sbjct	1561	GGCCTTGCGGCCCTTCACGCAAAAGAGGCTGATCGTGATTTTCGGGTGTGGTGGCGATCG	1620
Query	1621	CGATGCCGGCAAGCGGCCCCTGATGGGTGAAATCGCTGCGCGGCTCGCCGATCATGTCAT	1680
Sbjct	1621	CGATGCCGGCAAGCGGCCCCTGATGGGTGAAATCGCTGCGCGGCTCGCCGATCATGTCAT	1680
Query	1681	TGTCACCGATGACAATCCGCGCGCGGGGGGGGCCAGCCAG	1740
Sbjct	1681	TGTCACCGATGACAATCCGCGCAGCGAGGATCCAGATCTCATTCGCAAGGCCATTCTGCA	1740
Query	1741	AGGGGCTGGTTCAGGTCCTCATATTCGCGAGATCGGCGATCGCGAGGCGGCGATCAAAAG	1800
Sbjct	1741	AGGGGCTGGTTCAGGTCCTCATATTCGCGAGATCGGCGATCGCGAGGCGGCGATCAAAAG	1800
Query	1801	CGGAATTGGCATGCTGGAGCCCGGCGATCTTCTGCTGATTGCTGGCAAGGGCCATGAAAC	1860
Sbjct	1801	CGGAATTGGCATGCTGGAGCCCGGCGATCTTCTGCTGATTGCTGGCAAGGGCCATGAAAC	1860
Query	1861	CGGCCAGATCCTGGCTGACAGGACGCTGCCCTTTTCCGATCGCGATTGCGCCCGCGCGCG	1920
Sbjct	1861	CGGCCAGATCCTGGCTGACAGGACGCTGCCCTTTTCCGATCGCGATTGCGCCCGCGCGC	1920
Query	1921	GCTTGAGGACCATGCTGCATGAACGAGATTTTGATGCCCGAAAGCGTCGATAAGGAGATT	1980
Sbjct	1921	GCTTGAGGACCATGCTGCATGAACGAGATTTTGATGCCCGAAAGCGTCGATAAGGAGATT	1980
Query	1981	TTGTGGACGCCGCTCGGTCTCGTCACGCCTTTGCAGGCCCGTGTCAGTGGTCATGTTCCG	2040
Sbjct	1981	TTGTGGACGCCGCTCGGTCTCGTCACGCCTTTGCAGGCCCGTGTCAGTGGTCATGTTCCG	2040
Query	2041	TTGCGCCCGGCGCGCGGGATTTCCATCGATACGCGGACATTGCGCGAGGATGATCT 209	96
Sbjct	2041	TTGCGCCCGGCGCGCGGGATTTCCATCGATACGCGGACATTGCGCGAGGATGATCT 205	96