



Procedimentos para Isolamento de Bactérias que expressam Sistemas Alternativos de Nitrogenases: Preparo de Vidraria e Meios de Cultura

Gabriela Cavalcanti Alves¹
Marinete Flores da Silva²
Wilson Cabral da Fonseca³
Kátia Regina dos Santos Teixeira⁴

Introdução

Na natureza, bactérias diazotróficas de diversos grupos apresentam ampla faixa de distribuição. Estes microrganismos são conhecidos pela capacidade de fixar o N₂ atmosférico através de um complexo enzimático, a Nitrogenase. Esta enzima catalisa o processo de redução do nitrogênio atmosférico a NH₄⁺ e para realizar esta transformação depende da presença de metais, que participam como cofatores, associados a sua estrutura protéica quaternária. Atualmente, são conhecidos três tipos de nitrogenase: a clássica, que depende da presença de molibdênio (Mo-dependente), outra em que o vanádio (V) substitui o Mo (V-dependente) e a terceira que só tem ferro (Fe-dependente ou nitrogenase alternativa).

Desde 1932, Bortels já havia observado que a fixação de nitrogênio pode ocorrer na ausência de molibdênio, porém só na década de 80 essa hipótese foi confirmada. Estudos de caracterização genética e análise de expressão protéica em géis bidimensionais (2D), permitiram estabelecer que os sistemas alternativos de nitrogenases eram geneticamente independentes e são expressos em condições limitantes de Mo (Bishop et al., 1980; 1986). *Azotobacter vinelandii* foi o primeiro microrganismo onde foram caracterizados os três tipos de nitrogenases (Pau et al., 1989). A partir destes estudos foi possível a caracterização de nitrogenases independentes de Mo em outros microrganismos encontrados em diversos ambientes (Chien et al., 2000).

Os genes que codificam as proteínas da nitrogenase 1 (ou Mo-dependente) são chamados de *nif*, os genes para a nitrogenase 2 (ou V-dependente) de *vnf* e no caso da nitrogenase 3 (ou Fe-dependente ou nitrogenase alternativa) de *anf* (Masepohl & Klipp, 1996). A expressão de cada nitrogenase é controlada pela disponibilidade dos metais no ambiente. Quando molibdênio está presente, somente a nitrogenase 1 (Mo – dependente) é sintetizada. Na falta deste e na presença de vanádio, observa-se a expressão da nitrogenase 2 (V - dependente). Quando ambos (Mo e V) estão ausentes, apenas a nitrogenase 3 (nitrogenase alternativa ou Fe-dependente) é expressa. Neste sentido, para avaliar a diversidade de bactérias deste grupo funcional no ambiente e isolar representantes capazes de expressar sistemas

alternativos (nitrogenase 2 e 3) para fixação de nitrogênio atmosférico devem ser consideradas algumas medidas para o preparo de vidraria e meio de cultura livres de molibdênio.

O objetivo deste trabalho é detalhar procedimentos metodológicos que foram introduzidos na rotina de estudos aplicados a exploração de bactérias diazotróficas. Desta forma se espera que o potencial de contribuição dos sistemas alternativos de FBN presentes em diferentes agroecossistemas possa ser avaliado.

Preparo de vidrarias e descartáveis

Molibdênio é um metal encontrado nos solos em quantidades que variam entre 0,5 a 5 ppm. Estes teores de Mo correspondem a soma das diferentes formas em que ele pode ser encontrado no sistema: solúvel, adsorvido a fração coloidal ou retido na rede cristalina dos minerais primários e quelado à matéria orgânica (Gupta & Lipsett, 1981).

Uma das condições indispensáveis para isolamento de microrganismos capazes de expressar sistemas alternativos de FBN é a condução de experimentos em vidrarias livres de resíduos de Mo. Em geral, o preparo das vidrarias é feito pelo tratamento dos frascos com soluções ácidas, seguido de etapas de neutralização e enxágüe com água bidestilada ou purificada em sistema de deionização ou Milli-Q. O procedimento utilizado nos experimentos para preparo das vidrarias foi o descrito por Kahnert et al. (2000). O procedimento consistiu nas lavagens consecutivas das vidrarias em solução de HCl 3M (3x), NaOH 0,4M (3x) e água deionizada e purificada em Milli-Q (3x). Alternativamente, um protocolo descrito por Chien et al. (2000) também foi utilizado em experimentos de limitação de molibdênio, para tal a vidraria foi lavada com solução de H₂SO₄ 1M (2x) e submetida a vários enxágües com H₂O Milli-Q. Todo o tipo de vidraria, tais como provetas, pipetas, erlenmeyers, beckers e outros tipos de frascos utilizados para o cultivo de microrganismos em meio de cultura livre de Mo devem ser submetidos ao mesmo tipo de tratamento e, posteriormente, submetidos a esterilização.

¹ Bolsista de Graduação - UFRRJ

² Bolsista de Pós-Graduação - UFRRJ

³ Laboratorista da Embrapa Agrobiologia. BR 465, km 7 – Seropédica/RJ

⁴ Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia. BR 465, km 7 – Seropédica/RJ

Preparo de meio de cultura livre de Mo

Outro pré-requisito para isolar microrganismos que expressam nitrogenases alternativas ou, avaliar o impacto da limitação de Mo sobre o potencial de fixação de nitrogênio em bactérias já isoladas, é o uso de reagentes de altíssima pureza livre de níveis traços de Mo (> 1ppm). Alternativamente, alguns reagentes como fontes de carbono e tampão podem ser submetidos a um tratamento para remoção de traços de Mo como representado na figura 1. Como exemplo de preparo de meio de cultura livre de Mo será descrito a seguir as etapas realizadas para o preparo do meio Burk's livre de Mo (**Burk's -Mo**), conforme Strandberg & Wilson (1968).

Etapas de preparo de meios de cultura livres de Molibdênio (- Mo)

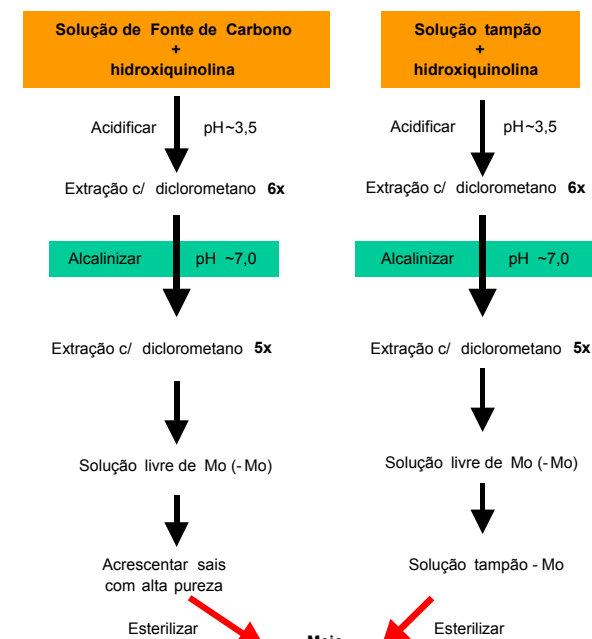


Figura 1 - Etapas de preparo de meios de cultura livre de Molibdênio

Uma solução estoque de sacarose (40 g/ 200 mL de água deionizada) 10x concentrada, é colocada em um frasco de 500 mL e acrescenta-se 0,4 g de α -hidroxiquinolina. Após a solubilização deste reagente antioxidante, a solução de fonte de carbono adquire cor amarela e o pH é ajustado com HCl para 3,5. Esta mistura é submetida a extração com aproximadamente 30 – 40 mL de clorofórmio (este reagente pode ser utilizado em substituição ao diclorometano – que é o reagente recomendado no protocolo original). O volume do reagente extrator pode ser variável e deverá formar uma superfície de volume equivalente de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ em relação ao fundo do frasco que contém a solução a ser tratada. O processo de extração, realizado em capela de exaustão, consiste de agitação vigorosa até formação de solução homogênea entre a fase aquosa e a fase de clorofórmio.

Esta mistura deve ser mantida em agitação durante no mínimo 2 h. Após este período, o agitador é desligado e a mistura deixada em repouso para separação das fases aquosa e de clorofórmio (20 min aproximadamente). A remoção da fase de clorofórmio (maior densidade) é feita em funil de separação, e a fase superior remanescente deve ser coletada e submetida a uma nova etapa

de extração. Este processo deve ser repetido por 5 vezes consecutivas. Após a última extração, o pH da mistura é ajustado para pH 7,2 com NaOH ultrapuro (ou KOH ultrapuro). A mudança do pH é facilmente detectada pela coloração esverdeada que a solução adquire, devido a presença da α -hidroxiquinolina, e deve ser confirmada com uma tira de indicador de pH. Após o ajuste do pH, a mistura é submetida novamente, por 6 vezes consecutivas, ao processo de extração de Mo com clorofórmio. Ao longo dessas extrações observa-se que o complexo formado pela α -hidroxiquinolina e o Mo, em solução alcalina, é lavado, resultando no clareamento da fase aquosa remanescente no funil de separação. Esta fase aquosa é transferida para frasco livre de Mo e submetida ao borbulhamento com ar comprimido ou N_2 (filtrado) até a completa exaustão do clorofórmio residual ainda presente na solução. Para complementar esta solução de fonte de carbono livre de Mo, sais ultrapuros que devem compor o meio Burk's são pesados 0,4 g de $MgSO_4$, 0,18 g de $CaCl_2$ e 2 mg de citrato de ferro, e acrescentados para preparo da solução estoque 10x concentrada. Aliquotas devem ser distribuídas em frascos marcados com **-Mo 10x BS** (o que significa sais de meio Burk's contendo sacarose, sem molibdênio). Esta solução é esterilizada em panela de pressão ou autoclave e pode ser estocada a temperatura ambiente até o uso.

Para o preparo da solução de tampão fosfato livre de Mo deve ser aplicada a mesma estratégia descrita para preparo da solução estoque de **-Mo 10x BS**, exceto pelo fato da solução de tampão fosfato ser preparada 40 vezes concentrada. Para preparo de uma solução estoque de 100 mL, são pesados 0,8 g de KH_2PO_4 e 3,2 g de K_2HPO_4 e dissolvidos em água deionizada. A esta solução adiciona-se 0,1 g de α -hidroxiquinolina e, as etapas subsequentes são realizadas como apresentado na figura 1. Ao final da última extração, o pH deve ser ajustado de acordo com o experimento a ser realizado com soluções de ácido ou base preparadas com sais ultrapuros. Nenhum outro sal deve ser acrescentado a esta solução tampão. As alíquotas dessa solução são distribuídas em frascos livres de Mo e marcadas como **-Mo 40x Burk's buffer** (ou Tampão para meio Burk's livre de Mo) com o pH final indicado no rótulo. A esterilização é realizada preferencialmente em panela de pressão ou autoclave (cuidando para que não haja contaminação dessa solução pela presença de vapores derivados de outras soluções que contenham Mo).

Preparo do meio Burk's 1x (concentração de trabalho)

Para preparo de 1 L de meio Burk's líquido, junte em um frasco estéril e livre de Mo, 100 mL da solução **-Mo 10x BS**, 25 mL de **-Mo 40x Burk's buffer** (estéril) e complete com água deionizada ou Milli-Q (estéril).

Para preparo de meio Burk's sólido, pesa-se 23 g de Ágar de alta pureza (Ágar Noble é recomendado) para preparo de 1 L de meio de cultura sólido. Alguns cuidados são essenciais para o preparo do meio sólido. Primeiro, prepara-se uma solução ágar-água. Para tanto, a quantidade de ágar-noble é pesada em relação ao volume de meio sólido que será preparado e acrescenta-se água deionizada, descontando os volumes das soluções estoques que deverão ser adicionadas (**-Mo BS** e **-Mo Burk's buffer**). A solução de ágar-água é autoclavada em panela de pressão para

evitar que haja perda de consistência devido a hidrólise do ágar nas condições de esterilização em autoclave. Para preparo do meio sólido é só acrescentar as soluções de **-Mo 10x BS** e **-Mo 40x Burk's buffer** ao ágar-água liquefeito (aproximadamente 70°C) que após homogeneizado será distribuído em placas de Petri.

Validação da metodologia para o isolamento de bactérias que expressam sistemas alternativos de nitrogenases.

O isolamento de bactérias associadas a solos de pastagem nativa, cobertura natural com grama batatais (*Paspalum notatum*) e cultivados com diferentes consórcios de leguminosas, hortaliças e fruteiras foi realizado a partir do uso de meio de cultura Burk's livre de Mo. Os sítios de coleta consistiram de 4 diferentes áreas de cultivo do Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA). Nesta área localizada em Seropédica – RJ, mais conhecida como Fazendinha do Km 47, são aplicadas práticas agroecológicas de manejo para produção de alimentos. A estratégia para o isolamento consistiu na coleta de amostras de solo (0 – 5 cm de profundidade) de cada uma das áreas. Foram inoculados 200 mg de solo em frascos de 50 mL contendo 10 mL de meio de cultura (ou frascos de 100 mL contendo 20 mL de meio). O processo de isolamento consistiu em várias etapas de transferências visando o enriquecimento de organismos capazes de expressar sistemas alternativos de nitrogenase na ausência de Mo (Figura 2 e 3).

Durante esta etapa do processo de isolamento, foi observado que nos tratamentos inoculados com solos das áreas 3 e 4, após a 1ª transferência, não houve multiplicação de microrganismos nas condições de ausência de N-combinado e limitação de Mo.



capazes de se multiplicarem, após a 4ª transferência, na ausência de nitrogênio em condições livres de Mo.

Uma outra possibilidade é que o uso de um único meio de cultura pode, devido a limitada oferta de nutrientes, ter sido um fator que interferiu na avaliação da diversidade presente naquelas áreas. Portanto, outros meios de cultura devem ser testados neste tipo de estudo.

Ensaio de redução de acetileno foram aplicados para testar a capacidade de fixar nitrogênio, em condições livres de Mo, dos microrganismos que se multiplicaram e foram selecionados ao longo das transferências (Figura 4).

Os resultados obtidos sugerem a presença de atividade da nitrogenase nas culturas e podem ser indicadores da expressão de sistemas alternativos capazes de fixar nitrogênio atmosférico.



Figura 2 – Detalhe das transferências consecutivas realizadas durante o processo de isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio em meio livre de Mo. Cada transferência correspondeu a uma diluição de 1:1000 do inóculo original (O).

Estes resultados sugerem que as condições de cultivo utilizadas limitaram a multiplicação de microrganismos que apresentam potencial de expressar sistemas alternativos de nitrogenases.

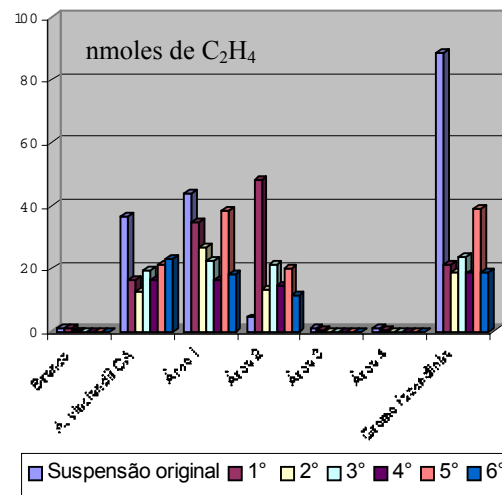


Figura 4 – Variação da atividade da nitrogenase pelo método de redução de acetileno.

A estirpe de *A. vinelandii*, utilizada como controle, se manteve estável no meio BS-Mo apresentando uma atividade média de ARA em torno de 20 nmoles h⁻¹ mL⁻¹, até a 6ª transferência.

Os resultados obtidos através da técnica de Atividade de Redução de Acetileno (ARA) e a presença de células capazes de se multiplicarem após a 6ª transferência em meio seletivo sem

Mo indicam a existência de microrganismos capazes de fixar o nitrogênio atmosférico através de sistemas alternativos da nitrogenase.

Com base nestes ensaios foi evidenciada a presença de microrganismos com potencial de expressão de sistemas alternativos de nitrogenases no SIPA. Porém, estes dados precisam ser confirmados através de técnicas moleculares que permitam a detecção ou amplificação de genes *vnf* e *anf* a partir dos isolados obtidos.

Referências Bibliográficas

BISHOP, P. E. JARLENSKI, D. M. L. HETHERINGTON, D. R. **Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii***. J. Bacteriol., v. 150, n. 3, p. 1244-1251, 1980.

BISHOP, P. E., HAWKINS, M. E., EADY, R. R. Nitrogen fixation in molybdenum – deficient continuous culture by a strain for nitrogenase (*nifHDK*). Biochem. J., v. 238, p. 437-442, 1986.

BORTELS, H. **Weitere unthersuchugen uber die bedeutung von molybdan, vanadium, wolfram und anderen erdasenstoffen fur stickstoffbindende und andere mikroorganismen**. Zent. Bakteriologie, Parasit. abtil, Stuttgart, v. 95, p. 193-218, 1932.

CHIEN, Y-T.; AUERBURCH, V.; BRABBAN, A. D.; ZINDER, S. **Analysis of genes encoding na alternative nitrogenase in the archaeon *Methanosarcina barkeri* 227**. J. Bacteriol., v. 182, n.11, p. 3247-3253, 2000.

GUPTA, V.; LIPSETT, J. **Molybdenum in soils, plants and animais**. Adv. Agronomy., v. 34, p. 73-115, 1981.

KAHNERT, A.; VERMEIJ, P.; WIETEK, C.; JAMES, P.; LEISINGER, T.; KERTESZ, M. A. **The *ssu* locus plays a key role in organosulfur metabolism in *Pseudomonas putida* S-313**. J. Bacteriol., v. 182, n.10, p. 2869-2878, 2000.

MASEPOHL, B.; KLIPP, W. **Organization and regulation of genes encoding the molybdenum nitrogenase and the alternative nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus***. Archives of Microbiology, v. 165, p. 80-90, 1996.

PAU, R. N., MITCHENALL, C. A.; ROBSON, R. L. Genetic evidence for in *Azotobacter vinelandii* nitrogenase lacking molybdenum and vanadium. J. Bacteriol., v. 171, p. 124-129, 1989.

STRANDBERG, G. W.; WILSON, P. W. **Formation of the nitrogen-fixing enzyme system in *Azotobacter vinelandii***. Can. J. Microbiol., v. 14, n. 1, p. 25-31, 1968.

Comunicado Técnico, 71



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento
Governo Federal

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR465 – km 7
Caixa Postal 74505
23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil
Telefone: (0xx21) 2682-1500
Fax: (0xx21) 2682-1230
Home page: www.cnpab.embrapa.br
e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

1ª impressão (2004): 50 exemplares

Comitê de publicações

Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Verônica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente

Revisor e/ou ad hoc: Rosa Maria Pitard e Norma Gouvea Rumjanek
Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix.
Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia.