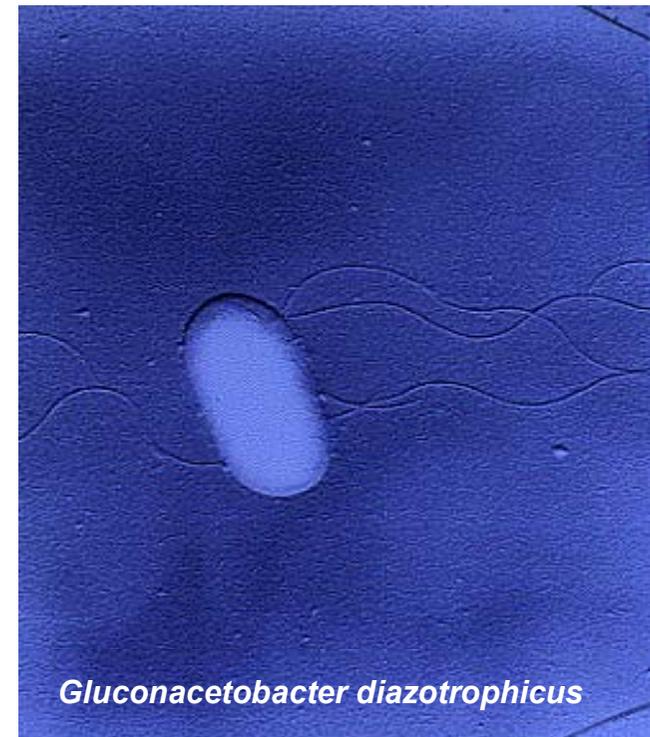


Efeito de Fontes de Carbono no Co-Cultivo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 e Leveduras



República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto

Presidente

Silvio Crestana

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Ernesto Paterniani

Hélio Tollini

Marcelo Barbosa Saintive

Membros

Diretoria Executiva

Silvio Crestana

Diretor Presidente

Tatiana Deane de Abreu Sá

José Geraldo Eugênio de França

Kepler Euclides Filho

Diretores Executivos

Embrapa Agrobiologia

José Ivo Baldani

Chefe Geral

Eduardo Francia Carneiro Campello

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Rosângela Stralio

Chefe Adjunto Administrativo

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.

MEHDI, K.; PENNINGKX, M. J. An important role for glutathione in γ - glutamyltranspeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, New York, v. 143, p. 1885-1889, 1997.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pr. Citri Tipo B. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 9., 1986, Campinas. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986. Resumo n. 32.

STEPHAN, M. P.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, K. R. S.; MARTINEZ-DRETS, G.; DÖBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 77, p. 67-72, 1991.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 56, p. 105-114, 1992.

VIANA, F. C.; GOI, S. R.; BALDANI, J. I.; TEIXEIRA, K. R. S. Ajuste de metodologias para avaliar a expressão diferencial de genes e proteínas durante co-cultivo entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* e leveduras. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRRJ, 10., 2000, Seropédica. **Anais...** Seropédica: Editora da Universidade Rural, 2000. p. 301-302.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.-I.; ISHIKAWA, T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 61, n. 8, p. 1244-1251, 1997. Validation List no. 64; Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 48, p. 327-328, 1998.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1517-8498

Maio/2005

Documentos 193

Efeito de Fontes de Carbono no Co-Cultivo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 e Leveduras

Fernanda Carvalho Viana
Kátia Regina dos Santos Teixeira

Seropédica – RJ
2005

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas 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

Comitê Local 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:

Revisores e/ou ad hoc: Norma Gouvea Rumjanek e Gustavo Ribeiro Xavier

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix

Edição eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2005): 50 exemplares

V614e Viana, Fernanda Carvalho

Efeito de Fontes de Carbono, no Co-Cultivo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 e Leveduras / Kátia Regina dos Santos Teixeira. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 20 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 193).

ISSN 1517-8498

1. Bactéria diazotrófica. 2. Carbono. 3. Microrganismo. I. Teixeira, Kátia Regina dos Santos, colab. II. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). III. Título. IV. Série.

CDD 579

© Embrapa 2005

A eletroforese do RNA total extraído a partir das bactérias e leveduras (dados não apresentados) cultivadas independentemente só permitiu detectar o RNA total das bactérias. Este resultado é provavelmente devido ao baixo número de células das amostras coletadas, já que o crescimento deste microrganismo foi limitado nas condições de cultivo apresentada. Com base nestes resultados a hipótese de que a bactéria realmente iniciou a fixação de N poderá ser comprovada através da hibridização do RNA total com sonda do gene *nifA*, que é o gene responsável pela ativação da transcrição dos genes *nif* responsáveis pela expressão da FBN.

5. Addendum

Este documento é resultado das atividades realizadas pela bolsista do CNPq/PIBIC Fernanda Carvalho Viana – Laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia. Apoio Pronex II.

6. Referências Bibliográficas

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, The Hague, v. 108, p. 23-31, 1988.

COJHO, E. H.; REIS, V. M.; SCHEMBERG, A. C. G.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amyolytic yeast nitrogen-free. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 106, p. 341-346, 1993.

FARRELL JR., R. E. **RNA methodologies**: A laboratory guide for isolation and characterization. San Diego: Academic, 1993. 317 p.

GIUSTI, G. Adenodsi-Desaminase. In: BERGEMEYER, H. V. (Ed.). **Methoden der enzymatischen analyse**. Weinheim: Verlag Chemie, 1970. p. 1049-1056.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1229-1244, 2004.

partir das 38 h de cultivo, enquanto que a bactéria aumenta seu número de células até as 30 h (figura 7A). Após 53 h de cultivo, após estagnação do crescimento da bactéria, houve novo acúmulo de proteínas pelas células concomitante com aumento do n° de células (figura 7A e B).

O restabelecimento do crescimento bacteriano pode ser consequência do início da FBN, uma vez que a quantidade de N fornecido inicialmente ao meio já havia sido consumida e podendo ter alcançado o nível limitante para seu crescimento. Além disso, é possível que a bactéria a partir das 53 h de cultivo a bactéria tenha se beneficiado dos restos celulares da levedura que estava presente no meio, utilizando-os como fonte de carbono para sua sobrevivência.

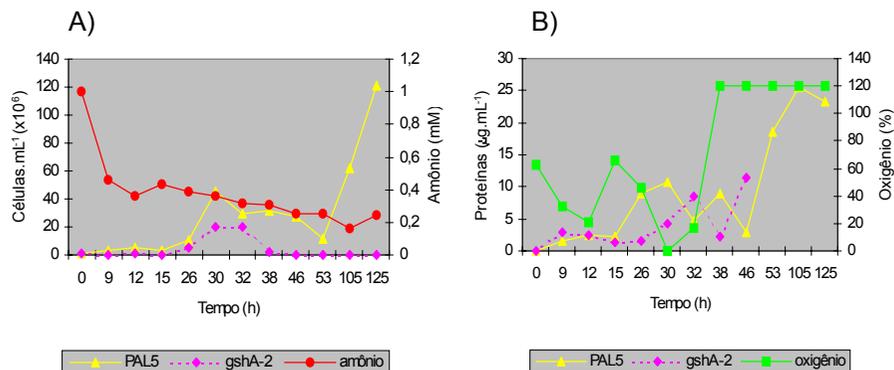


Figura 7 - Crescimento em co-cultivo da estirpe PAL5 e da mutante gshA-2, dosagem de proteínas totais, n° de células e consumo de oxigênio e amônio em função do tempo.

4. Considerações finais

Por fim, pode-se concluir que a bactéria em co-cultivo com uma levedura na presença de amido foi capaz de sobreviver. Este fato confirma a dependência da bactéria em relação a levedura para crescer na presença de amido como fonte de C, como sugerido por COJHO et al. (1993). Porém em nenhum dos experimentos realizados até o momento foi possível confirmar a sugestão destes autores sobre a contribuição da FBN para a sobrevivência da levedura.

Autores

Fernanda Carvalho Viana

Eng. Agrônomo, bolsista de PIBIB/IC, Embrapa Agrobiologia/CNPq
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505, Cep 23851-970, Seropédica/RJ

Kátia Regina dos Santos Teixeira

Bióloga, PhD em Biologia Celular e Molecular, Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia.
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505, Cep 23851-970, Seropédica/RJ
e-mail: katia@cnpab.embrapa.br

No experimento com 1 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ observou-se que a bactéria cresceu até aproximadamente 45 h, quando apresenta um período de adaptação devido a limitação de N. Posteriormente, um novo período de crescimento foi observado, possivelmente decorrente da indução de proteínas adequadas a condição de fixação de N. Já em condições de N não limitantes, na presença de 10 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a bactéria não sofreu limitação de N ao longo do cultivo e conseqüentemente não foi necessário iniciar a FBN (figura 6B). A curva de proteínas totais (figura 6B) apresentou a mesma tendência da observada no experimento anterior, ou seja, acompanhou o aumento do número de células da bactéria até 58 h de incubação. As 67 h após o início de incubação o número de células diminuiu e o conteúdo protéico não foi alterado significativamente.

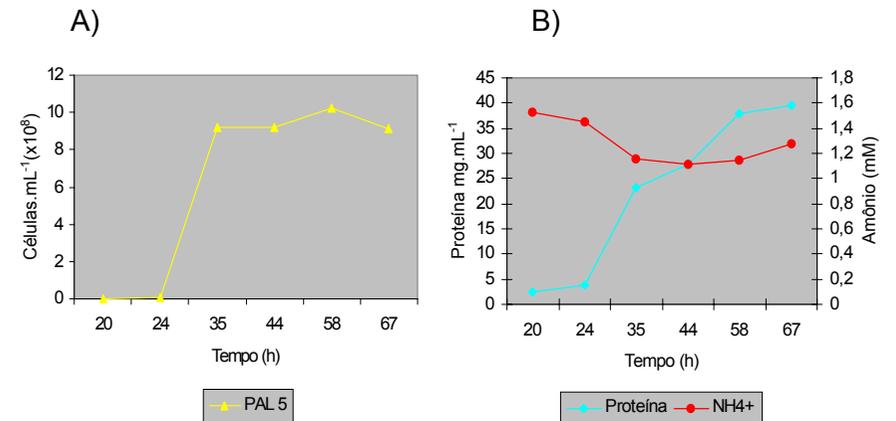


Figura 6 - Crescimento, dosagem de amônio e acúmulo de proteínas pela estirpe PAL5 em cultivo independente com glicose (5 g L⁻¹) e 10 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

3.6. Experimento em condições controladas da estirpe PAL5 em co-cultivo com a mutante *gshA-2*

Neste experimento foi utilizado amido (1%) como fonte de carbono, pH ajustado para 6,0 e 1 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Através da figura 7 pode-se observar que a levedura mutante para seu crescimento a

Na figura 5, também pode ser observado que o aumento do número de células foi acompanhado pelo de proteínas totais a partir das 48 h de incubação. É possível que neste momento a bactéria tenha tido necessidade de sintetizar novas proteínas para sua sobrevivência o que refletiu no aumento da transcrição do RNA evidenciado pela análise de RNA total. Às 62 h de cultivo com o mesmo tratamento, o crescimento já estava limitado por vários fatores como fonte de C e N disponível. No entanto, neste momento a banda forte observada no gel associada ao maior valor de proteínas totais, pode estar relacionada ao maior número de células contida na última amostra coletada ou, então, a outro ciclo de síntese de proteínas que estaria ocorrendo para garantir a sobrevivência do microrganismo nesta condição de limitação extrema de C e N. Este fato sugere, que a bactéria estaria iniciando a síntese de proteínas para a FBN, como pode ser detectado pelo acúmulo de proteínas apresentado nas figuras 1, 2 e 5. Neste caso, a atividade da nitrogenase poderia ser comprovada indiretamente através do método de redução de acetileno (ARA), o qual não foi avaliado nestes experimentos.

Quando o amido foi utilizado no meio como única fonte de carbono, verificamos somente bandas fracas de RNA total e baixa dosagem de proteínas totais em todas as amostras coletadas ao longo do cultivo (figuras 4 e 5) confirmando, portanto, o fato de que a bactéria não é capaz de utilizar o amido como fonte de carbono para o seu crescimento na ausência da levedura.

3.5. Experimento em condições controladas da estirpe PAL5 em cultivo independente com 10 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 5g L⁻¹ de glicose:

O pH inicial ajustado para 5,5 foi diminuindo no decorrer do experimento, chegando a 2,4 (dados não apresentados), o que é característico de *G. diazotrophicus* como descrito por CAVALCANTE & DÖBEREINER (1988).

Através da figura 6A podemos observar que a bactéria começa a crescer exponencialmente a partir das 24 h. O número de células aumenta até às 35 h de cultivo tendendo a estabilizar a partir deste ponto.

Apresentação

A preocupação crescente da sociedade com a preservação e a conservação ambiental tem resultado na busca pelo setor produtivo de tecnologias para a implantação de sistemas de produção agrícola com enfoques ecológicos, rentáveis e socialmente justos. O enfoque agroecológico do empreendimento agrícola se orienta para o uso responsável dos recursos naturais (solo, água, fauna, flora, energia e minerais).

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia orienta sua programação de P&D para o avanço de conhecimento e desenvolvimento de soluções tecnológicas para uma agricultura sustentável.

A agricultura sustentável, produtiva e ambientalmente equilibrada apoia-se em práticas conservacionistas de preparo do solo, rotações de culturas e consórcios, no uso da adubação verde e de controle biológico de pragas, bem como no emprego eficiente dos recursos naturais. Infere-se daí que os processos biológicos que ocorrem no sistema solo/planta, efetivados por microrganismos e pequenos invertebrados, constituem a base sobre a qual a agricultura agroecológica se sustenta.

O documento 193/2005 aborda a questão do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) envolvendo a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* em co-cultivo com leveduras como modelo de simbiose entre bactérias diazotróficas endofíticas e o eucarionte. Uma das questões ainda não elucidada no processo de FBN em plantas não leguminosas refere-se a transferência do N fixado pela bactéria para as plantas. Neste estudo procurou-se avaliar como o N fixado pela bactéria é usado para o crescimento das Leveduras na presença das fontes de carbono amido e glicose. Os estudos realizados não permitiram concluir sobre a contribuição da FBN para a sobrevivência da levedura mas confirma a dependência da bactéria em relação a levedura para crescer na presença de amido como fonte de carbono.

O modelo usado gerou informações importantes para o entendimento da interação planta/ bactéria e deve ser mais explorado visando detalhar como a cana-de-açúcar se beneficia do processo de fixação biológica de nitrogênio contribuindo assim para a sustentabilidade da cultura que apresenta baixa resposta a adubação nitrogenada.

José Ivo Baldani
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

SUMÁRIO

1. Introdução	7
2. Material e Métodos	8
2.1. Microrganismos e meios de cultivos utilizados	8
2.2. Experimento em condições não controladas de pH e oxigênio dissolvido	9
2.3. Experimento em fermentador sob condições controladas	9
2.4. Análise das amostras	10
3. Resultados e Discussão	10
3.1. Experimento em condições não controladas	10
3.2. Experimento em condições controladas da estirpe PAL5 em presença de glicose 5 g L ⁻¹ e 1 mM de (NH ₄) ₂ SO ₄	12
3.3. Experimento em condições controladas da estirpe PAL5 em presença de amido (1%) e 1 mM de (NH ₄) ₂ SO ₄	13
3.4. Avaliação do RNA total e Proteínas extraídos nos experimentos controlados da estirpe PAL5 com 1 mM de (NH ₄) ₂ SO ₄	14
3.5. Experimento em condições controladas da estirpe PAL5 em cultivo independente com 10 mM de (NH ₄) ₂ SO ₄ e 5g L ⁻¹ de glicose	16
3.6. Experimento em condições controladas da estirpe PAL5 em co-cultivo com a mutante <i>gshA-2</i>	17
4. Considerações finais	18
5. Addendum	19
6. Referências Bibliográficas	19

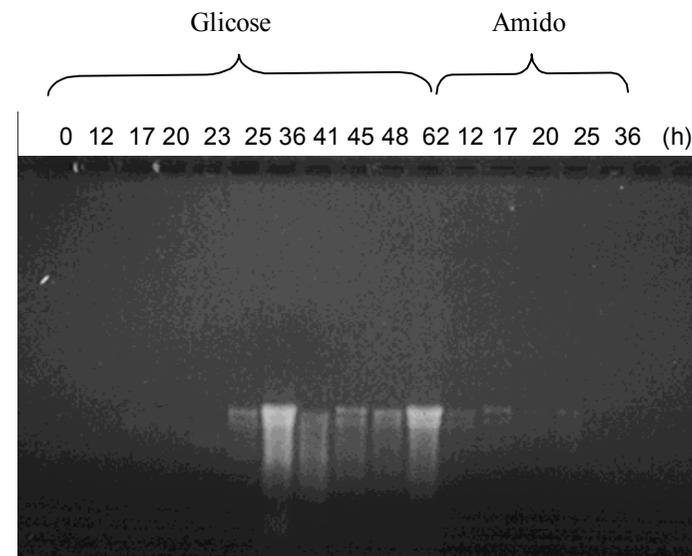


Figura 4. Eletroforese dos extratos de RNA total em gel de formaldeído da estirpe PAL 5 cultivada na presença de glicose e amido como fonte de C .

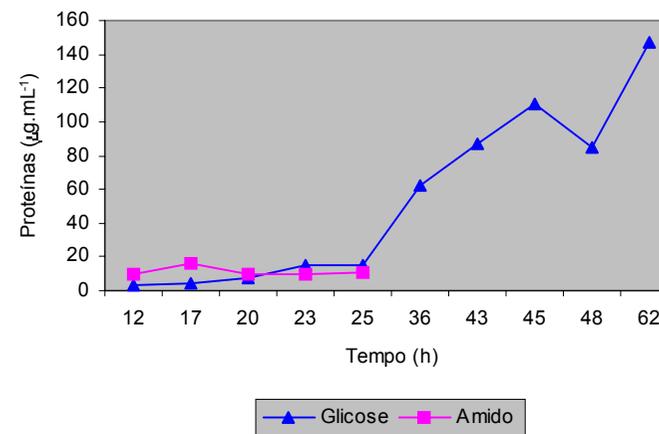


Figura 5 - Proteínas totais da estirpe PAL5 em condições controladas com 1mM de (NH₄)₂SO₄ e diferentes fontes de carbono.

estabilização do número de células após às 12 h de incubação. A diminuição do número de células registrada pode ter sido devido ao comportamento desse grupo de microrganismos, no qual tem sido observado que células de *G. diazotrophicus* apresentam uma drástica diminuição do volume celular em condições adversas. Este fato pode ter resultado em contagem subestimada do número de células. Estes resultados comprovam que a bactéria é incapaz de sobreviver independentemente quando a fonte de carbono disponível é o amido.

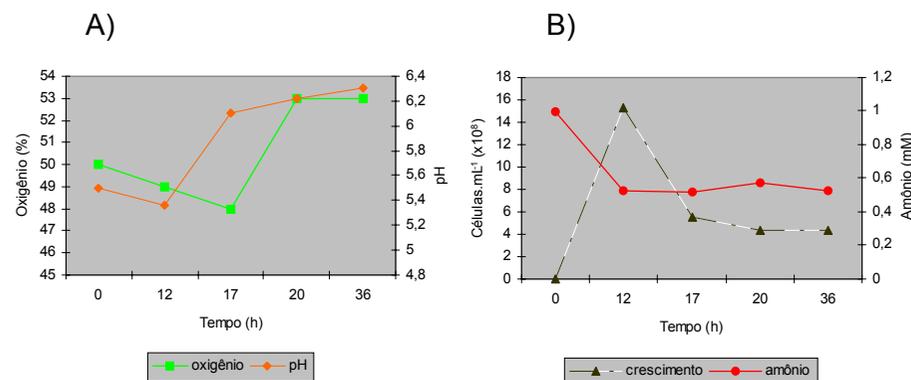


Figura 3 - Consumo de oxigênio dissolvido, pH (A), número de células e dosagem de amônio (B) em função do tempo do cultivo independente da estirpe PAL5 em condições controladas em meio contendo amido (1%).

3.4. Avaliação do RNA total e Proteínas extraídos nos experimentos controlados da estirpe PAL5 com 1 mM de (NH₄)₂SO₄

Durante estes experimentos, foram coletadas amostras para extração do RNA total. Através da eletroforese em gel de formaldeído, a figura 4 mostra que à 36 h do início do experimento utilizando glicose (5g L⁻¹), o gel apresentou uma banda mais forte do que as amostras anteriores e, neste momento, também podemos observar um aumento na quantidade de proteínas totais do mesmo tratamento (figura 5).

Efeito de Fontes de Carbono no Co-Cultivo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 e Leveduras

Fernanda Carvalho Viana
Kátia Regina dos Santos

1. Introdução

A cana-de-açúcar é uma das principais gramíneas cultivadas no Brasil de importância econômica desde a colonização do Brasil. Além de seu alto potencial energético, a cana-de-açúcar é uma das gramíneas que mostram os maiores ganhos de nitrogênio (N) obtidos através da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988). Estes resultados levaram muitos pesquisadores a estudarem a contribuição da FBN para a manutenção da produtividade de cana-de-açúcar, uma vez que a aplicação de adubos nitrogenados no Brasil é em geral muito baixa, principalmente devido a falta de subsídios. Diversos microrganismos fixadores de nitrogênio, ou diazotróficos, têm sido encontrados associados a esta cultura, entre eles *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988; YAMADA et al., 1997). Em geral, estes microrganismos contribuem com quantidades expressivas de N derivado da fixação de nitrogênio para a planta e podem atuar como agentes promotores de crescimento vegetal através de sua interação com a planta (KENNEDY et al., 2004). Em algumas cultivares da cana-de-açúcar a contribuição da FBN pode chegar a mais de 60% do N acumulado na biomassa vegetal (URQUIAGA et al., 1992). A bactéria *G. diazotrophicus*, originalmente isolada das raízes de cana-de-açúcar, é uma bactéria capaz de tolerar elevada concentração de açúcar e, também, de fixar N em baixo pH (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988).

Em 1993, COJHO et al., estudaram um sistema de co-cultivo de *G. diazotrophicus* com uma levedura *Lipomyces spencermartinsiae* (nv. classificação de *L. kononenkoae*). Neste estudo, os autores

sugerem que cerca de 50% do N fixado pela bactéria foi transferido para a levedura desde o início do cultivo. Além disso os autores postularam que a levedura garantia o suprimento de fonte de carbono (C), derivado do metabolismo do amido, para a bactéria. Apesar destes resultados, um estudo realizado com *Saccharomyces cerevisiae* mostrou que esta levedura consegue triplicar seu crescimento em condições limitantes de N, enquanto que uma mutante (*gshA-2*), responde de forma negativa a falta de N, não sendo capaz de manter taxa equivalente de crescimento nas mesmas condições testadas da estirpe selvagem (MEHDI & PENNINGCKX, 1997).

Visando comprovar o benefício entre *G. diazotrophicus* e leveduras, como um modelo de simbiose entre bactérias diazotrófica e eucarionte, neste trabalho foram analisadas células cultivadas independentemente e derivadas do co-cultivo dos microrganismos como modelo de interação bactéria-planta. O objetivo deste estudo foi avaliar quantitativamente a presença de N em meio de cultivo líquido com diferentes fontes de C como o amido e a glicose e verificar se o processo de FBN da *G. diazotrophicus* associada a outro organismo (leveduras) pode ser considerado como modelo para interação bactéria-planta.

2. Material e Métodos

2.1. Microrganismos e meios de cultivos utilizados

Os microrganismos utilizados foram a estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*, a mutante *gshA-2* da levedura (MEHDI & PENNINGCKX, 1997) *Saccharomyces cerevisiae* e a levedura *Lipomyces spencermartinsiae* cepa CBS5608 (COJHO et al., 1993). A cepa CBS5608 de *L. spencermartinsiae*, foi utilizada nos experimentos anteriormente por ser capaz de crescer na presença de amido sem provocar a inibição do crescimento de *G. diazotrophicus*. No entanto, os autores não consideraram a capacidade deste organismo em sobreviver em condições limitantes de N, como observado em *S. cerevisiae* através do metabolismo da glutatona. A mutante *gshA-2* de *S. cerevisiae*, foi escolhida por

48 h houve estabilização do número de células seguido por um período de aumento, apesar do N ter praticamente se esgotado.

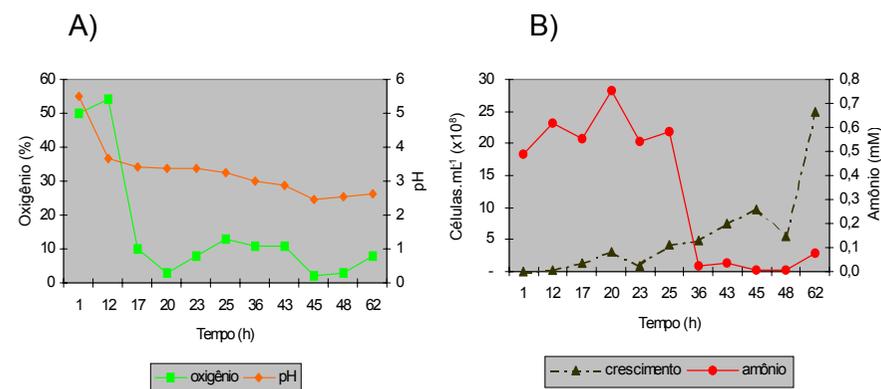


Figura 2 – Consumo de oxigênio dissolvido, pH (A), número de células e dosagem de amônio (B) em função do tempo do cultivo independente da estirpe PAL5 em condições controladas em meio contendo glicose (5g L⁻¹).

3.3. Experimento em condições controladas da estirpe PAL5 em presença de amido (1%) e 1 mM de (NH₄)₂SO₄:

Nesta etapa foi utilizado o amido (1%), 1 mM de (NH₄)₂SO₄ e o pH ajustado para 5,5. A figura 3 mostra, ao contrário do observado em presença de glicose como fonte de C, que quando o amido estava presente no meio houve aumento do pH, consumo de oxigênio e de N apenas nas primeiras 12 h de cultivo, sugerindo que o crescimento da bactéria foi limitado quando o amido foi fornecido como fonte de C.

As curvas de crescimento e dosagem de amônio, mostram um pico de ambas às 12 h de incubação. Neste período deve ter ocorrido a utilização de fonte de C reserva da bactéria, que pode ter sido armazenado durante o cultivo do pré-inóculo em condições de C e N em excesso, fazendo com que houvesse aumento do número de células e consumo inicial de N até 12 h.

Provavelmente ao término do estoque da fonte de C que a bactéria tinha disponível, pode-se observar uma tendência a estabilização de pH, consumo de oxigênio e N fornecido concomitante com a

para a célula, e este fato pode explicar a alteração no acúmulo de proteínas. As 120 h de cultivo pode-se observar que após um período de adaptação, a bactéria foi capaz superar a limitação de N através da FBN e houve uma tendência de acúmulo de proteínas pelas células (figura 1B). A falta de correlação entre as curvas de proteína e número de células da estirpe PAL5 em co-cultivo com a *gshA-2* e da *gshA-2* em co-cultivo e cultivo independente pode estar relacionada com o método aplicado, pois nestes casos não foi possível detectar proteínas nas diferentes frações dos filtrados correspondentes a estes organismos após 24 horas de cultivo.

3.2. Experimento em condições controladas da estirpe PAL5 em presença de glicose 5 g L⁻¹ e 1 mM de (NH₄)₂SO₄

Quando a glicose foi utilizada como fonte de carbono durante cultivo independente da estirpe PAL5 houve queda do pH inicial de 5,5 para 3,5 após 12 h de incubação, e também foi observado rápido consumo de oxigênio (Figura 2). Estes resultados estão relacionados com o crescimento da bactéria durante o experimento como previamente observado por STEPHAN et al. (1991). A rápida queda no pH logo após a estirpe PAL5 ser inoculada pôde ser acompanhado no decorrer do tempo, tendo sido mais pronunciado até às 36 h. Após este período o decréscimo observado continuou mais lentamente até o final do experimento. Esta acidificação do meio já havia sido observado por alguns autores quando a glicose está presente no meio como fonte de C e análise do sobrenadante em HPLC indicou o acúmulo de compostos ácidos derivado da oxidação da glicose em ácidos do tipo 2 ceto-glucônico e 2,5 ceto-glucônico (STEPHAN et al., 1991).

A dosagem de amônio revela o consumo do N fornecido (inicialmente 1 mM de (NH₄)₂SO₄ em presença de glicose. Após 25 h de experimento o N que estava presente no meio de cultivo foi quase que totalmente consumido pela bactéria porém a partir das 48 h pode ser observado uma tendência de acúmulo de N no meio novamente.

O aumento do número de células a partir das 23 h e o consumo de N ocorreram concomitantemente até às 36 h de cultivo. Porém às

dependem de N combinado para seu crescimento (MEHDI & PENNINGCKX, 1997).

Foi utilizado como pré-inóculo meio DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986) em tubos de ensaio contendo 5 mL deste meio, no qual os microrganismos foram crescidos independentemente por uma noite. Para preparo do inóculo foi retirado 1mL do pré-inóculo e adicionado a 100 mL de meio LGI em frascos com capacidade de 250 mL. O meio LGI continha por litro 0,6 g de KH₂PO₄; 0,2 g de K₂HPO₄; 0,2 g de MgSO₄.7H₂O; 0,02 g de CaCl₂.2H₂O; 0,002 g de NaMoO₄.2H₂O; 0,01 g de FeCl₃.6H₂O; 5 g de glicose e sem indicador de pH. A fonte de N utilizada foi 10 mM de (NH₄)₂SO₄. O meio para o experimento em fermentador, com capacidade para 3,0 L foi o mesmo meio usado para o inóculo, porém variou-se a fonte de C entre o amido (1%) e a glicose (5 g L⁻¹) e a concentração de (NH₄)₂SO₄ (1 mM ou 10 mM) de acordo com os experimentos.

2.2. Experimento em condições não controladas de pH e oxigênio dissolvido

Experimentos teste para estabelecimento do tempo de geração (curva de crescimento) foram realizados em frascos de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura no qual aproximadamente 10⁵ células de cada microrganismo foram crescidas com 5 mM de glutamato de sódio e 1% de amido (como fonte de C). O pH e oxigênio não foram controlados, porém a temperatura foi mantida a 30°C e agitação de 150 rpm.

2.3. Experimento em fermentador sob condições controladas

Os experimentos em condições controladas foram realizados em fermentador. A temperatura foi mantida com o auxílio de um banho-maria a 30°C, agitação de 400 rpm e o gás ou mistura de gases foram mantidos a um fluxo constante 0,3L/min. Para cada um dos experimentos realizados diferentes porcentagens de saturação de oxigênio dissolvido foram utilizadas (100%, 50% e 10%). As células, cerca de 10⁵, foram crescidas em presença de 1 mM ou 10 mM de (NH₄)₂SO₄ como fonte de N e amido 1% ou glicose 5g L⁻¹ como fontes de carbono.

2.4. Análise das amostras

Durante o desenvolvimento dos experimentos, amostras foram coletadas para dosagem de proteínas totais (LOWRY et al., 1951), contagem do número de células em câmara de Neubauer, leitura da densidade óptica a 560nm, extração do RNA total e eletroforese em gel de formaldeído (FARRELL JR., 1993) e dosagem de amônio (GIUSTI, 1970) presente em amostras do sobrenadante. No caso das leveduras foi necessário um processo mais drástico para a liberação de proteínas, sendo utilizada uma lise a quente seguida pelo rompimento físico das células (VIANA et al., 2000). Para análise de proteínas derivadas do co-cultivo dos microrganismos, foi feita a separação dos organismos através do uso de filtro de nitrocelulose, para separar as células bacterianas das de levedura. Em seguida, as células de leveduras retidas na superfície do filtro foram liberadas através de lavagem com água destilada.

3. Resultados e Discussão

Visando estabelecer o ciclo do N entre a bactéria diazotrófica e microrganismos eucarióticos foram realizados estudos para caracterizar as interações entre *G. diazotrophicus* e duas cepas de leveduras, uma selvagem outra mutante, em co-cultivo.

A cepa CBS5608 de *L. spencermartinsiae*, foi utilizada nos experimentos de COJHO et al. (1993) por ser capaz de crescer na presença de amido sem provocar a inibição do crescimento de *G. diazotrophicus*, porém acredita-se que este organismo é capaz de sobreviver em condições limitantes de N, podendo triplicar sua biomassa através do metabolismo da glutatona, como observado em *S. cerevisiae*. Por esta razão, foi incluído neste trabalho o mutante *gshA-2* de *S. cerevisiae*, como controle pois esta cepa depende de N combinado para seu crescimento (MEHDI & PENNINGCKX, 1997).

3.1. Experimento em condições não controladas

Os resultados do experimento teste (apresentados na XI Jornada de Iniciação Científica - UFRRJ, 2001) estão apresentados na figura 1.

Pode ser observado que quando a estirpe PAL5 e a levedura mutante *gshA-2* foram cultivadas independentemente em presença de amido não foi verificado aumento do número de células ou de proteínas totais, indicando que ambas estavam limitadas em nutrientes essenciais (C e N) para seu crescimento. Comportamento semelhante foi observado durante o co-cultivo de ambos microrganismos (PAL5 com *gshA-2*) nas mesmas condições.

Por outro lado, quando a levedura CBS5608 foi cultivada independentemente observou-se que apesar da limitação de N no meio de cultura ela apresentou um aumento do número de células e proteínas totais até o final do experimento (figura 1).

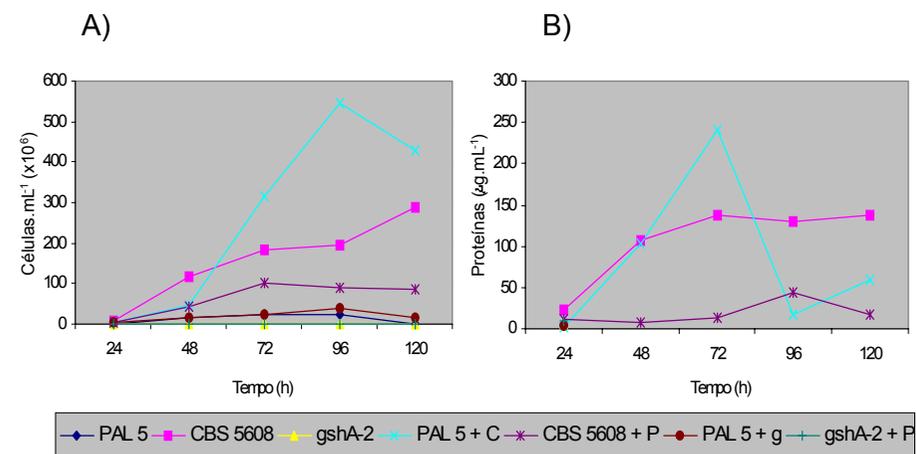


Figura 1 - Número de células (A) e proteínas totais (B) quantificadas durante cultivo independente e co-cultivo de *G. diazotrophicus* e Leveduras em meio LGI com 1% de amido e 5 mM de glutamato de sódio.

Durante o co-cultivo com a levedura CBS5608, a bactéria PAL5 foi capaz de acumular proteínas e aumentar seu número de células. No entanto, a diminuição no conteúdo de proteínas do filtrado de PAL5 após 72h pode ser explicado por um estágio de transição em que o N disponível foi completamente limitado. Nestas condições, a bactéria tem que sintetizar proteínas específicas que permitam a expressão da FBN, processo que requer um alto gasto energético