

Introdução

O gênero *Azospirillum* compreende bactérias diazotróficas que estão associadas com gramíneas como arroz, trigo, milho e cana-de-açúcar. Espécies deste gênero têm sido estudadas devido a uma série de características que as tornam importante para os seres humanos como a capacidade de promover o crescimento vegetal através da produção de fitormônios e fixação biológica do nitrogênio. Estudos de regulação da expressão gênica demonstraram que a fixação do nitrogênio ocorre apenas em condições especiais devido ao grande gasto energético por parte do microrganismo. Uma das condições necessárias para a expressão da nitrogenase é baixa disponibilidade de nitrogênio intracelular, portanto a utilização de fertilizantes nitrogenados, como a uréia, inibem a fixação biológica, além de possuir altos custos financeiros e causar danos ambientais. O sequenciamento dos genomas de *A. brasilense* e *A. B510* ocorridos no corrente ano assim como o sequenciamento parcial do genoma de *A. amazonense* realizado pelo nosso laboratório demonstrou que esse gênero possui a capacidade de utilizar uréia como fonte de nitrogênio, apesar disso os genes codificantes para urease e proteínas acessórias nunca foram estudadas. Este trabalho tem como objetivo a caracterização do cluster da urease de *A. amazonense* e a atividade da enzima em diferentes condições de crescimento. Os resultados obtidos demonstraram que a organização dos genes da urease e proteínas acessórias diferem entre as espécies do gênero, sendo que *A. brasilense* e *A. B510* possuem um gene codificante para glutamato racemase entre os genes *ureC* e *ureE* não encontrado em *A. amazonense*. Esta espécie possui uma proteína de membrana denominada *HupE/UreJ* que relaciona hidrogenases e ureases, o que não ocorre nas outras duas espécies.

Métodos

- A sequência dos genes das espécies estudadas foram obtidas no NCBI, com exceção dos genes de *Azospirillum amazonense*.
- A construção do cluster da urease nas diferentes bactérias foi realizada com o auxílio do programa *Artemis* (Sanger®) - **Figura 2**.
- Para a multiplicação de *A. amazonense* foi utilizado o meio definido AMM descrito por Fabiano E. *et al.* (1985), modificando a fonte de nitrogênio que para uréia.
- Foram realizados testes com diferentes concentrações de uréia que variavam entre 100mM e 1mM para definir a melhor condição de crescimento quando comparado com cloreto de amônio.
- A construção dos *primers* para o RT-PCR foi realizada utilizando o site *primer3*.

Tabela 2.

- A purificação do RNA para a realização do RT-PCR será realizada utilizando reagente TRIZOL® em diferentes tempos de indução.
- O ensaio para quantificar a atividade da enzima será realizado utilizando a metodologia de M. W. Weatherburn (1967) que determina a amônia presente em solução.

Resultados

- A comparação das sequências de DNA do cluster da urease de *Azospirillum amazonense* com os genes depositados no banco de dados GeneBank resultou em altos níveis de similaridade com genes de outros diazotróficos - **Tabela 1**
- 10mM foi definida como a melhor concentração de uréia para os experimentos de indução já que não houve diferença na OD com relação às outras amostras.

Gene	Tamanho (pb)	Produto	Organismo	E-value	Primer UP	Primer DO
ureD	837	Urease accessory protein UreD	Methylobacterium sp. 4-46	2,00E-52	gaagatctatcgcccaac	gtcgaacaggatggttctc
ureA	303	Urease, gamma subunit	Rhizobium leguminosarum bv. trifolii WSM1325	5,00E-43	cttgagaaggcaagctgc	ctcgggatggttcagcttc
ureB	331	Urease, beta subunit	Labrenzia alexandrii DFL-11	5,00E-41		
ureC	1716	Urease, subunit alpha	Sinorhizobium meliloti 1021	0	ctgaagctgcatgaggactg	cggatggtatcatccctg
ureE	537	UreE urease accessory-like protein	Roseomonas cervicalis ATCC 49957	2,00E-28		
ureF	354	Urease accessory protein	Starkeya novella DSM 506	1,00E-20		
ureG	636	Urease accessory protein	Beijerinckia indica subsp. indica ATCC 9039	3,00E-89	gacatcatctgcatcgaatcc	ccacgtcgatgacgtagatg
hupE/ureJ	463	HupE/UreJ protein	Acidovorax avenae subsp. avenae ATCC 19860	9,00E-06		

Tabela 1. Resultado do BLASTX das sequências dos genes relacionados à expressão da urease e proteínas acessórias encontradas em *Azospirillum amazonense* em comparação com genes depositados no Genebank.

- A padronização do PCR para os *primers* sintetizados foi realizada, não sendo observado o aparecimento de bandas inespecíficas (**Figura 1**).
- A análise do cluster da urease mostra diferença na organização dos genes nas diferentes espécies de bactérias analisadas. *A. amazonense* possui uma proteína de membrana denominada *HupE/UreJ* que não ocorre no mesmo contexto gênico nas outras espécies além de não possuir genes para outras proteínas dentro do cluster da urease, semelhante ao que ocorre em *Klebsiella*. *A. brasilense* e *A. B510* diferentemente, possuem um gene codificante para glutamato racemase entre os genes *ureC* e *ureE* o que não é encontrado em *A. amazonense*.

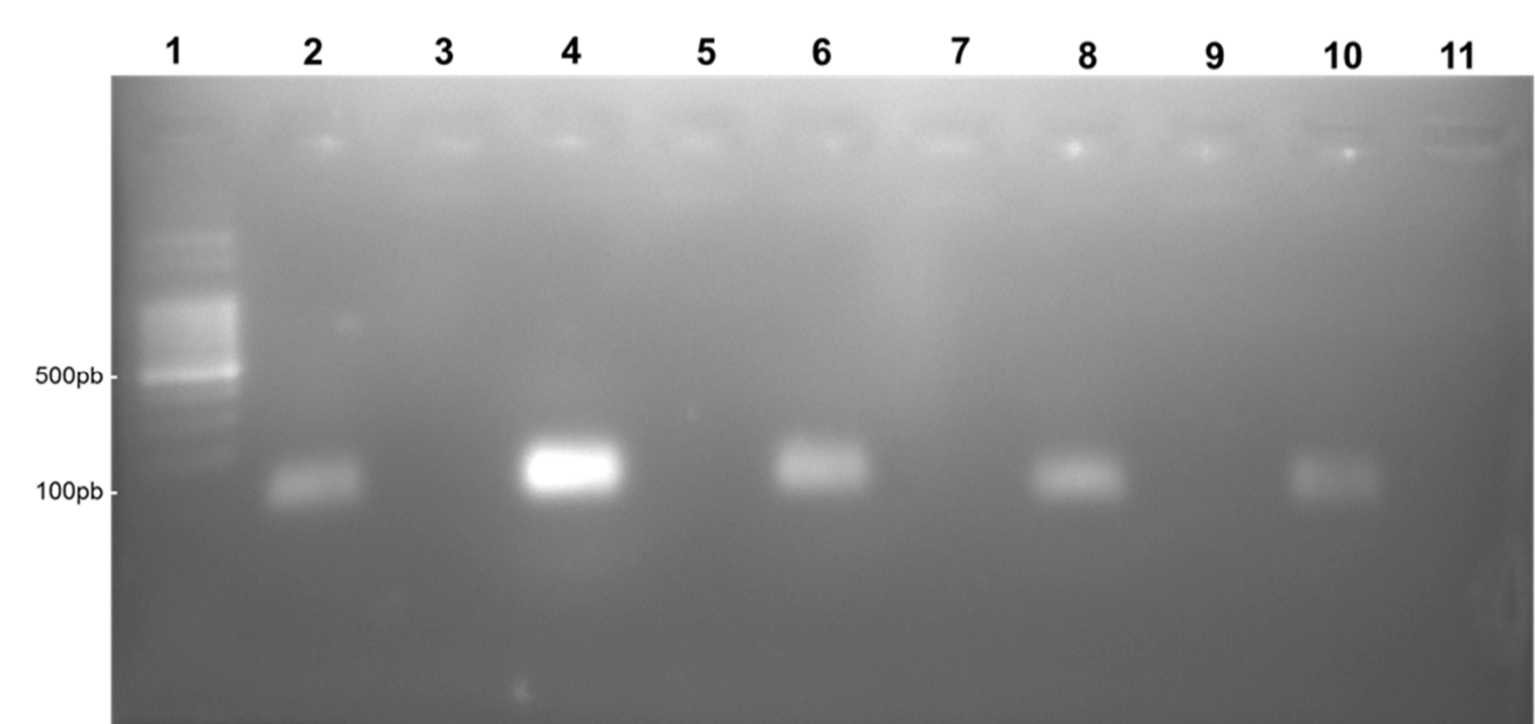


Figura 1. PCR para teste dos *primers* sintetizados. 1- marcador de peso molecular; 2- *primer ureA*; 4- *ureC*; 6- *ureD*; 8- *ureG*; 10- *utrC*. Canaletas 3, 5, 7, 9 e 11 controles negativos das ampliações em 2, 4, 6, 8 e 10 respectivamente.

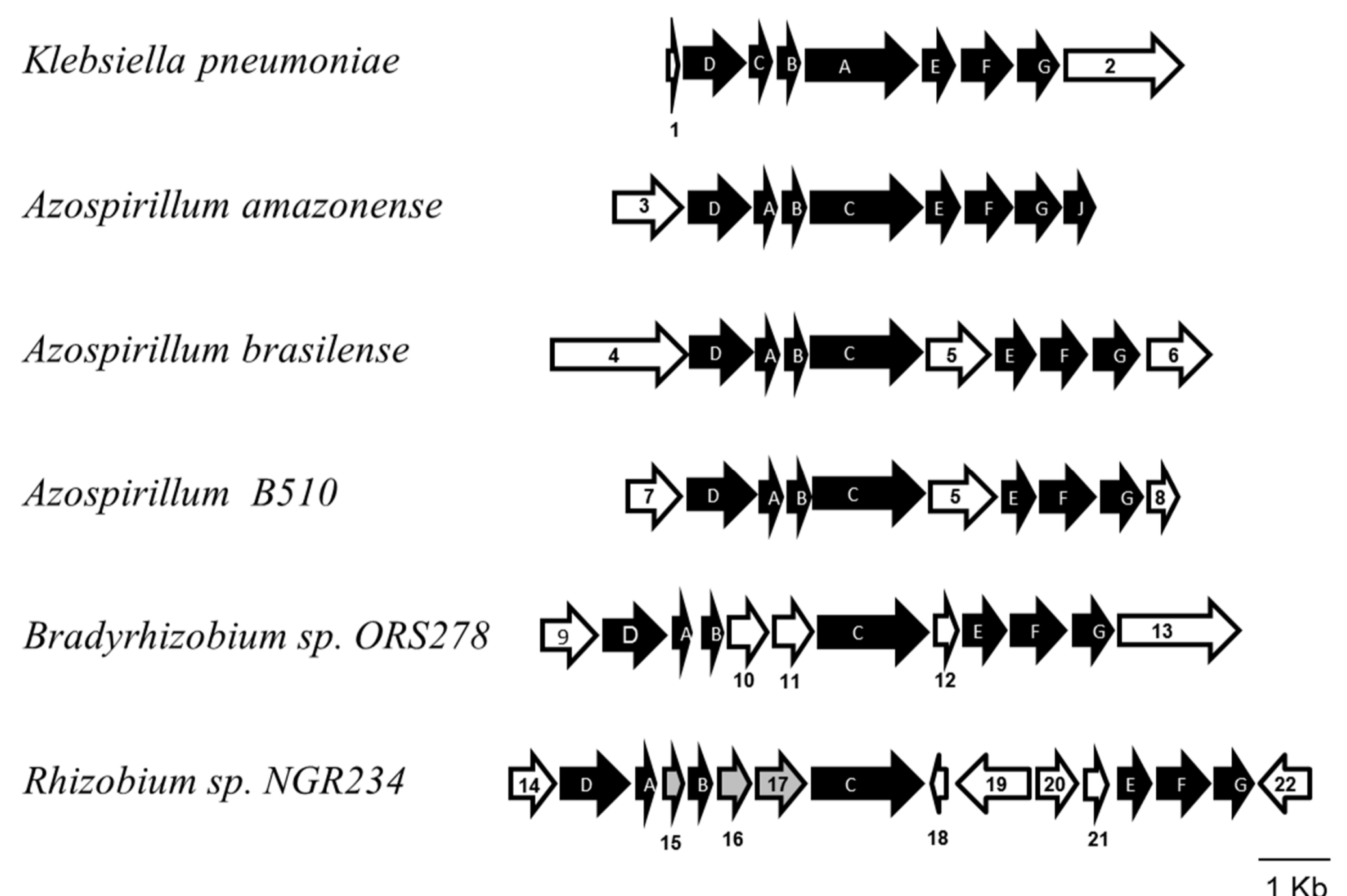


Figura 2- Organização do cluster da urease em diferentes bactérias. As setas pretas referem-se aos genes que estão envolvidos na expressão da urease, sendo que cada letra se refere a proteína da **Tabela 1**. As setas brancas representam as proteínas que não estão envolvidas com a urease mas se encontram inseridas neste cluster, e são elas: 1- proteína hipotética; 2- sistema de dois componentes de histidina quinase; 3- regulador transcricional *gstR*; 4- xantina desidrogenase; 5- glutamato racemase; 6- proteína hipotética; 7- regulador LuxR; 8- proteína hipotética; 9- transportador ABC; 10- fosfohidrolase; 11- conservada hipotética; 12- conservada hipotética; 13- histidina quinase; 14- cloroperoxidase; 15, 16, 17- proteínas acessórias da urease encontradas somente no gênero *Rhizobium* (em cinza); 18- proteína hipotética; 19- transposase; 20- peroxidase; 21- proteína hipotética; 22- regulador transcricional família Crp/Fnr.

Perspectivas

- Realização do ensaio enzimático e RT-PCR para avaliação da atividade da urease bem como sua expressão em diferentes condições de meio de cultivo.
- Análise *in silico* em bancos de dados de estrutura de proteínas (PHYRE) para determinar a similaridade com ureases com estrutura já definida.
- Sequenciamento do produto dos PCRs para confirmar a especificidade dos fragmentos de DNA amplificados.