

Fixação do dióxido de carbono por bactérias
nitrificantes (*)

E .MALAVOLTA, O. J. CROCOMO

**Centro Nacional de Energia Nuclear na Agricultura
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Universidade de São Paulo
Piracicaba, São Paulo - Brasil**

e C.C. DELWICHE

**Kearney Foundation of Soil Science
University of California
Davis, California, Est. Unid. Amer. Norte**

INTRODUÇÃO

As bactérias autotróficas são capazes de crescer às custas da energia libertada na oxidação de materiais incompletamente oxidados. Diferem entre si, segundo exigem ou não energia luminosa; na segunda alternativa são chamadas quimiossintéticas que podem ser aeróbicas e, em menor número, anaeróbicas.

As bactérias nitrificantes, pertencentes aos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* principalmente, oxidam, respectivamente, a amônia e nitrito nas condições naturais; em qualquer caso, o processo de oxidação do substrato mineral fornece a energia necessária para a fixação do gás carbônico indispensável para a síntese do material celular; estudos com preparações livres de células mostraram que tanto *Nitrosomonas* como *Nitrobacter* esterificam fosfato inorgânico durante a oxidação de hidroxilamina e nitrito, respectivamente, para produzir ATP (trifosfato de adenosina) ^(2,7,12)

Os estudos sobre a fixação do gás carbônico por algumas bactérias quimiossintéticas, realizados nos últimos anos revelam existir nelas um processo semelhante ao encontrado na fotossíntese executada pela planta verde⁽⁴⁾. Num trabalho preliminar de MALAVOLTA et al.⁽¹²⁾ logo confirmado por KHOUDOKORMOFF⁽¹²⁾ verificou-se que células de *Nitrobacter* fixaram o gás carbônico marcado com ¹⁴C produzindo o ácido-3-fosfoglicérico, hexoses mono e difosfato e outros intermediários conhecidos do ciclo de Calvin. São dados aqui mais detalhes a respeito, inclusive alguns resultados obtidos em ensaios com preparações livres de células, tanto de *Nitrosomonas* como de *Nitrobacter*.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes e drogas foram obtidos no comércio; ácidos oxaloacéticos e fosfoenolpirúvico (sal de triciclo hexilamina) - California Foundation for Biochemical Research; nucleótidos di e trifosfatados (sais de sódio) - Nutricional Bio-

(*) Parte de um plano de trabalho executado com ajuda da Fundação Rockefeller, N. York. Est. Unid. Amer. do Norte e Conselho Nacional de Pesquisa, Rio de Janeiro, Brasil.

chemicals Corp. ou Pabst Laboratories; Ba¹⁴CO₃ — Oak Ridge Natl. Laboratory.

O NaH¹⁴CO₃ foi obtido fixando-se o ¹⁴CO₂ (libertado do Ba¹⁴CO₃ por ácido sulfúrico a 10%) por NaOH 0,05 M num sistema sob vácuo.

Nitrobacter agilis fornecido pela American Type Culture ou isolado dos arrelvados do parque da Universidade da Califórnia em Berkeley, Calif., Est. Un. da Amer. do Norte, foi cultivado em 8 litros do meio descrito por ALEEM & ALEXANDER⁽¹⁾, colhido com auxílio de centrifuga Sharples e depois de duas lavagens com água destilada e gelada, foi suspenso em 25ml de tampão tris 0,1 M pH 7,8 (tris (hidroximetil) aminometano). A colheita expressa como pêso do material sêco variou usualmente de 110-150 mg. *Nitrosomonas europea* também foi isolada de solo de jardim; cultivou-se em 11 litros do meio de ENGEL & ALEXANDER⁽²⁾ modificando reduzindo-se à metade a concentração de sulfato de amônio; a colheita se fazia quando a concentração de nitrito era da ordem de 37 milimoles por litro; o pêso das células úmidas era então da ordem de 2,5 g; as células eram colhidas conforme a descrição dada para o caso de *Nitrobacter*.

Os extratos livres de células foram preparados por desintegração ultrassônica de suspensões das mesmas em tris pH 7,8 com ajuda de um "10 KC magneto-strictive oscillator" da Raytheon, durante 20 minutos, segundo-se centrifugação a $3.500 \times G/0/5^{\circ}C$ para separar os detritos.

A radioatividade foi medida com auxílio de tubo Geiger-Müller de janela de mica e blindado com chumbo. Usou-se filme Kodak "no screen" para raio-x a fim de localizar compostos radioativos isolados por cromatografia de papel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fixação do gás carbônico por células intactas de N. agilis.

Com o fim de estudar a fixação do gás carbônico, 10 ml de suspensão celular foram incubados com 1 ml de KNO₂ 0,1M, 2 ml de NaH¹⁴CO₃ 0,01 M e 2 ml de H₂O em um frasco de Erlenmeyer, fechado durante 3 horas. As células foram então centrifugadas, suspensas em 5 ml de água destilada e postas em etanol a 80% em ebulição.

Depois da centrifugação e separação dos lipídeos, o extrato alcoólico era concentrado sob vácuo, à temperatura ambiente e cromatografado primeiramente em

fenol/H₂O e depois em butanol/ácido propiônico/H₂O de acordo com a técnica de BENSON et al.⁽⁶⁾.

Durante o período de incubação todo o nitrito desapareceu do sistema — tendo sido oxidado a nitrato ou metabolizado — e aproximadamente 1 micromol de CO₂ foi fixado segundo revelaram as contagens do extrato alcoólico (75% da atividade total, aproximadamente), e do resíduo insolúvel (20%); muito pouca atividade foi encontrada na fração lipídica (5% do total fixado, apenas).

Os radioautógrafos feitos com os cromatogramas bidimensionais encontraram um padrão de distribuição das manchas idênticas ao encontrado num estudo feito sobre a marcha do carbono em plantas superiores e nos microorganismos previamente mencionados.

Pulverizando-se o papel com o reagente molibdico de HANES & ISHERWOOD⁽⁹⁾ verificou-se que vários compostos fosforilados se achavam presentes nos cromatogramas. Depois de eluição e co-cromatografia nos solventes empregados por BANDURSKI & AXELROD⁽³⁾ foram identificadas as seguintes substâncias: hexoses mono e difosfato, ácido fosfoglicérico e ácido fosfopirúvico. O filme de raios-x foi impressionado por cerca de 12 compostos radioativos; a figura 1 mostra, entretanto, apenas aqueles que reagiram mais fortemente, com a emulsão; a distribuição de radioatividade em vários compostos aparece no Quadro I. Como se vê a maior proporção do ¹⁴CO₂ fixado se encontrou no ácido fosfoglicérico a porta de entrada do carbono no ciclo de Calvin; a formação desses compostos foi posteriormente confirmada em trabalhos com extratos livres de células como se verá mais adiante. A identificação dos outros intermediários permite concluir que existe em *Nitrobacter* o equipamento enzimático necessário para fixar o gás carbônico do mesmo modo encontrado em outros organismos — o ciclo de Calvin. É lícito dizer-se, pois, que o caso particular da quimiossíntese executada por *Nitrobacter* não difere em essência do conceito geral: produção de ligações fosfatadas altamente energéticas na oxidação do substrato parcialmente oxidado, para fixar o gás carbônico. Permanece, por equanto o problema do esclarecimento da origem de produtos reduzidos (nucleótidos de piridina, por exemplo) necessários para reduzir CO₂ ao nível de carboidrato; o sistema de oxi-redução nitrito/nitrato está muito longe daquele correspondente à redução dos nucleótidos de piridina

(ver LEE⁽¹¹⁾.) Não se deve aqui perder de vista a possibilidade de ocorrer redução desses nucleótidos pelo inverso do transporte eletrônico, com energia fornecida pelo ATP formado durante a oxidação de nitrito e nitrato.

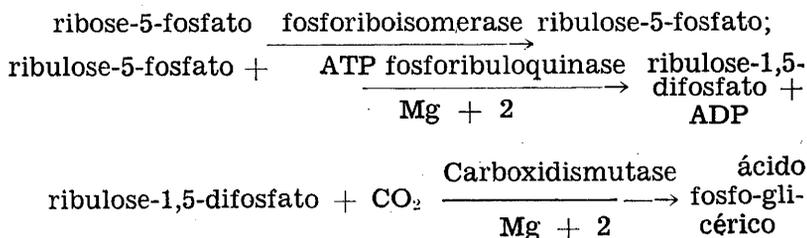
QUADRO I

Distribuição relativa da radioatividade fixada por *Nitrobacter* durante a oxidação do nitrito a nitrato.

Composto	% da radioatividade aplicada no papel
Ácido 3-fosfoglicérico	59
Hexose monofosfatos	12
Hexose difosfatos	13
Triosefosfato	6
Fosfopiruvato	5

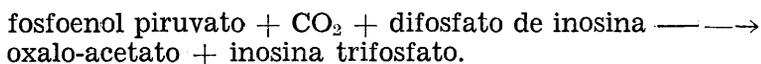
Fixação do gás carbônico por preparação livres de células. O trabalho anterior evidenciou a presença nas células de *Nitrobacter* de numerosos ênzimos implicados na operação do ciclo de Calvin. Tentou-se em seguida obter fixação do CO₂ por extratos livres das células; em outras palavras: procurou-se demonstrar a atividade de dos sistemas enzimáticos iniciais para a fixação, aqueles que levaram à produção do ácido fosfoglicérico. Os ensaios com células intactas não permitiram pelo modo como foram conduzidos, verificar a possível presença de vias heterotróficas para fixação do gás carbônico; pelo menos uma dessas já era de ocorrência conhecida num organismo quimiossintético, conforme demonstraram SUSUKI & WERKMAN⁽¹³⁾.

O Quadro II dá os resultados obtidos quando se estudou a fixação do ¹⁴CO₂ usando R-5-P (ribose-5-fosfato) como substrato em presença do ATP e Mg⁺²; fosfoglicerato foi identificado como produto da reação; isto revela a ocorrência das seguintes reações:



É interessante notar a pequena, porém significativa, fixação do gás carbônico por *Nitrobacter* quando se omitiu ATP do sistema fornecendo em seu lugar o meio gerador do mesmo, ou seja, ADP, PO_4^{-3} e NO_2^- . Os dados mostraram pois, existir nas bactérias nitrificantes um equipamento enzimótico para a fixação do CO_2 tal como ocorre na planta verde e em outros microrganismos autotróficos.

O Quadro III mostra estar em operação tanto em *Nitrosomonas* como em *Nitrobacter* a carboxilase oxaloacética de BAUGH et al.⁽⁵⁾, enzimo que fixa CO_2 pela reação:



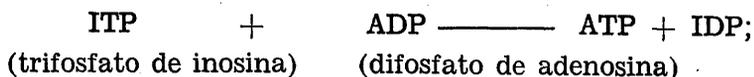
QUADRO II

Fixação do CO_2 por extratos de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* via reação de carboxidimentose.

Tratamento	Radioatividade fixada, c.p.m.	
	<i>Nitrosomonas</i>	<i>Nitrobacter</i>
Completo	16.000	2.500
— R-5-P	601	0
— Mg+2	6.725	0
— ATP	16.600	175
— ATP, + ADP, + P + NO_2^-	—	575
Completo fervido	150	10

Completo: 1 ml prep. em tris pH 7,8 (= 15 e 9 mg proteína respectivamente); 10 micromoles R-5-P e ATP; 20 micromoles de Mg^{+2} ; 15 micromoles de ADP e PO_4^{-3} ; 50 micromoles NO_2^- ; 5 micromoles $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (5×10^5 c.p.m.); fase: ar; incubação: 60 minutos.

Note-se que não foi fornecido o nucleótido coenzimótico da reação; note-se também que, com base no peso da proteína fornecida na preparação, a fixação por *Nitrosomonas* foi aproximadamente 5 vezes maior que aquela verificada no caso de *Nitrobacter*; isto sugere existir principalmente na preparação do *Nitrosomonas* uma difosfoquinase de nucleótido responsável pela reação:



O ADP poderia estar contaminando o produto comercial usado para fornecer ATP. Comparando-se os Quadros II e III nota-se que, nas condições experimentais, as duas vias são responsáveis pela fixação de aproximadamente as mesmas quantidades de CO_2 ; está por demonstrar se êste seria o caso *in vivo*.

QUADRO III

Fixação do CO_2 por extratos de *Nitrosomonas* e
Nitrobacter via carboxilase oxaloacética.

Tratamento	Radioatividade fixada, c.p.m.	
	<i>Nitrosomonas</i>	<i>Nitrobacter</i>
Completo	13.325	1.515
— fosfoenolpiruvato	150	0
— Mn^{+2}	75	15
— trifosfato de inosina (ITP)	1.350	15
Completo fervido	50	0

Completo: 1 ml prep. em tris pH 7,8 (= 17 e 9 mg proteína, respectivamente); 5 micromoles PEP, ITP e Mn^{+2} ; 5 micromoles $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (5×10^5 cpm); fase: N_2 ; incubação: 60 minutos.

RESUMO E CONCLUSÕES

1. Durante a oxidação do substrato, tanto *Nitrosomonas* como *Nitrobacter* armazenam parte da energia disponível na forma das ligações altamente energéticas do trifosfato de adenosina (ATP). Essa energia química é empregada para fixar gás carbônico. Desconhece-se a origem do poder redutor, havendo porém alguma evidência sugerindo que parte do ATP seja consumida na redução de nucleótido de piridina.

2. As células de *Nitrobacter* fixam o gás carbônico segundo a mesma marcha conhecida para a fotossíntese das plantas superiores.

3. Os extratos livres de células de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, quando incubados como $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ e cofatores adequados, mostraram existir duas portas para a entrada do gás carbônico em compostos orgânicos, uma delas sendo, como era antecipado, a reação da carboxidismutase. Uma porção considerável de gás carbônico, foi, entretanto, incorporada através do sistema de carboxilase oxaloacética. Torna-se claro, portanto, que ambos os gêneros de bactérias possuem mecanismos autotrófico e heterotrófico para a fixação do gás carbônico necessário para a síntese primária de material celular.

ABSTRACT

During the oxidation of the substrate, both *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* have part of the energy made available as high energy phosphate, namely ADP and ATP. This chemical energy is used to fix CO_2 . The nature of the reducing power is unknown at present.

Active cells of *Nitrobacter* were shown to fix CO_2 along the same pathway as found in higher plant photosynthesis.

Sonic extracts of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* when incubated with $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ and cofactors showed two ports of entry of CO_2 into organic compounds one being, as expected, the carboxidismutase reaction. On protein basis an equivalent amount of CO_2 was, however, incorporated via the oxaloacetic carboxylase reaction. It is clear then that both microorganisms possess typical autotrophic and heterotrophic mechanisms for the fixation of CO_2 which is required for the primary synthesis of cell material.

REFERÊNCIAS

- (1) ALEEM, M.I.H. & ALEXANDER, M. J. *Bacteriol.* 76:510 (1958)
- (2) ALEEM, M.I.H. & HASON, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 46:763 (1960).
- (3) BANDURSKI, R.S. & AXELROD, B. *J. Biol. Chem.* 193 : 405 (1951)
- (4) BASSHAM, J.A., BENSON, A.A., KAY, L.D., HARRIS, A.F., WILSON,, A.T. & CALVIN, M. J. *Am. Chem. Soc.* 72 : 1710 (1950)

- (5) BAUGH, C.L., CLAUS, G.W. & WERKMAN, C.H. *Arch. Biochem. Biophys.* 86 : 255 (1960).
- (6) BENSON, A.A., BASSHAM, J.A., CALVIN, M., GOODALE, T.C., HAAS, V.A., & STEPLA, W. *J. Am. Chem. Soc.* 72 : 1710 (1950).
- (7) BURGE, W.D., MALAVOLTA, E., & DELWICHE, C.C. *J. Bacteriol.* 85 : 106 (1963).
- (8) ENGEL, M.S. & ALEXANDER, M. *J. Bacteriol.* 78 : 796 (1959).
- (9) HANES, C.S. & ISHERWOOD, F.A., *Nature* 164 : 1107 (1949).
- (10) KHOUDOKORMOFF, V.A. *Ann. Inst. Pasteur* 100 : 257 (1961).
- (12) MALAVOLTA, E., DELWICHE, C.C. & BURGE, W.D. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1 : 445 (1960).
- (11) LEES, H. *Bacteriol. Revs.* 26 : 165 (1962).
- (13) SUSUKI, I. & WERKMAN, C.H. *Arch. Biochem. Biophys.* 76 : 103 (1958).

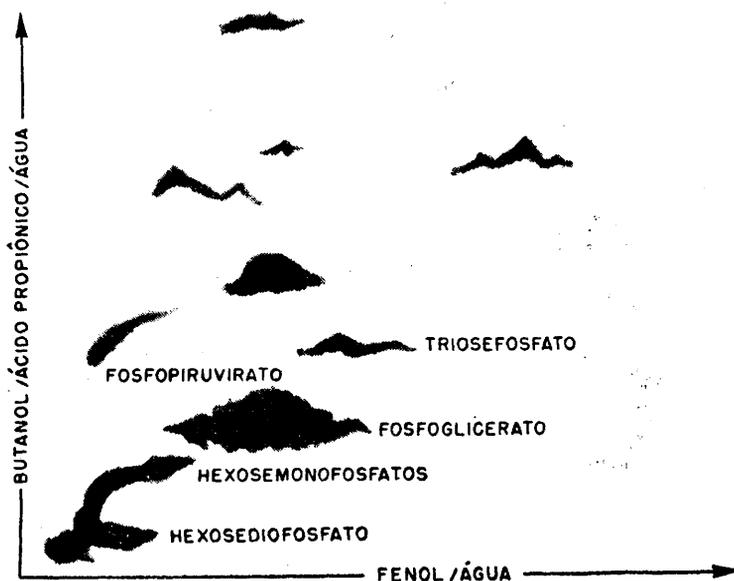


Fig. 1 — Radiocromatograma de extrato de células intactas de *N. agilis* expostas aos $^{14}\text{CO}_2$ durante a oxidação de nitrito.

