

(NOTA N.º 2)

## Fixação do Dióxido de Carbono e Fosforilação em *Nitrobacter agilis* (\*) (\*\*)

E. MALAVOLTA

E. S. A. «Luiz de Queiroz»

C. C. DELWICHE e W. D. BURGE

Univ. of California, Berkeley, Calif., U. S. A.

---

(\*) Trabalho executado na Kearney Foundation of Soil Science, Univ. of California, Berkeley, Calif., U.S.A., durante uma bolsa (E.M.) da Fundação Rockefeller. Abreviações: ATP, trifosfato de adenosina; tris, tris hidroxiaminometano; ADP, difosfato de adenosina; DNP, dinitrofenol.

(\*\*) Recebido para publicação em 28/10/1960.

Durante a oxidação autotrófica de uma molécula grama de nitrito por *Nitrobacter*, aproximadamente 17,5 quilocalorias de energia se tornam disponíveis para a fixação do  $\text{CO}_2$ . É razoável admitir que pelo menos parte dessa energia é encaminhada para outras reações na forma de ligações altamente energéticas do ATP. O trabalho executado com outros microrganismos autotróficos como *Thiobacillus denitrificans* (Aubert et al., 1957) torna atraente a hipótese de que em *Nitrobacter* a marcha para a fixação do carbono siga o caminho conhecido nas plantas superiores (Bassham et al., 1954).

*Nitrobacter agilis* fornecido pela American Type Culture Collection ou isolado dos arrevaldos do parque da Universidade da California em Berkeley foi cultivado em 8 litros do meio descrito por Aleem e Alexander (1958), colhido com auxílio da centrífuga Sharples e, depois de duas lavagens com água destilada e gelada, foi suspenso em 25 ml de tampão tris, pH 7,8. A colheita, expressa como pêsso do material celular sêco, variava usualmente de 110-150 miligramas.

Com o fim de estudar a fixação do  $\text{CO}_2$ , 10 ml da suspensão celular foram incubados com 1 ml de 0,1 M  $\text{KNO}_2$ , 2 ml de  $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$  0,01 M e 2 ml de  $\text{H}_2$  em um frasco de Erlenmeyer fechado durante 3 horas. As células eram então centrifugadas, suspensas em 5 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  e postas em etanol fervente. Depois da centrifugação e separação dos lipídeos o extrato alcoólico era concentrado sob vácuo à temperatura ambiente e cromatografado primeiramente em fenol e depois em butanol: ácido propiônico:  $\text{H}_2\text{O}$  (Benson et al., 1950).

Durante o período de incubação todo o nitrito desapareceu do sistema — tendo sido oxidado a nitrato ou metabolizado — e aproximadamente 1 micromol de  $\text{CO}_2$  foi fixado. Achou-se que perto de 75 por cento do radiocarbono se achava no extrato alcoólico, o restante aparecendo no resíduo insolúvel. Muito pouca radioatividade foi detectada na fração gordurosa.

Os radioautógrafos feitos com os cromatogramas bidimensionais mostraram um padrão de distribuição das manchas idêntico ao encontrado nos estudos com plantas superiores e microrganismos previamente mencionados. Pulverizando o papel com o reagente molíbdico de Hanes e Ischerwood (1949) verificou-se que vários compostos fosforilados se achavam presentes nos cromatogramas. Depois de eluição e co-cromatografia nos solventes empregados por Bandurski e Axelrod (1951) foram identificadas as

seguintes substâncias: hexose mono e difosfatos, ácido fosfoglicérico, triosefosfato e ácido fosfopirúvico. O filme de raios-x permitiu detectar 14 compostos radioativos; a Figura 1 mostra, entretanto, apenas aqueles que impressionaram mais fortemente a emulsão. Sessenta por cento da atividade aplicada originalmente no papel foi recuperada como ácido fosfoglicérico. A formação desse primeiro produto, porta de entrada do  $\text{CO}_2$  assimilado, foi posteriormente confirmada com extratos livres de células obtidos como se explica mais adiante (Malavolta et al., 1960).

A produção de compostos orgânicos fosforilados por *N. agilis* foi observada tanto com células intactas como com extratos ultrassônicos. No primeiro caso a mistura de reação continha 10 ml de suspensão celular, 0,5 ml de  $\text{KNO}_2$  0,1 M, 0,5 mc de íonio  $\text{PO}_4$ , 0,2 ml de  $\text{KF}$  0,075 M e 0,2 ml de  $\text{MgCl}_2$  0,05 M. No tratamento de controle omitiu-se nitrito. Depois de 90 minutos de incubação as células foram mortas com ácido tricloroacético a 35 por cento, centrifugadas e a solução sobrenadante cromatografada usando os solventes já mencionados. A radioautografia e reações coloridas (Burrows et al., 1952) nos cromatogramas revelaram a presença do ATP somente no sistema completo. Os radioautógrafos correspondentes ao tratamento sem nitrito mostraram apenas a mancha correspondente ao fosfato inorgânico marcado. As células, durante o período de incubação, oxidaram todo o nitrito fornecido. Como este foi apenas um ensaio qualitativo destinado simplesmente a verificar se *Nitrobacter* é capaz de produzir ATP, não se pode fornecer dado algum com respeito à quantidade de  $\text{P}^{32}$  incorporado em relação ao nitrito oxidado.

Os extratos livres de células foram preparados por desintegração ultrassônica das mesmas no "10 KC Raytheon oscillator" durante 30 minutos seguida de centrifugação dos restos celulares a 3.500 x gravidade, por 30 minutos (Aleem e Alexander, 1958). Nos experimentos com extratos livres de células usou-se os sistemas que aparecem na Tabela 1. Após 90 minutos de incubação adicionava-se 0,5 ml de ácido tricloroacético a 35 por cento; a solução desproteínizada era então analisada para fósforo inorgânico pelo método de Rider e Mellon (1946). Como se vê na Tabela 1, para cada micromol de nitrito oxidado, aproximadamente 0,5 micromoles de fósforo inorgânico desapareciam; em outras palavras, a relação P/O do processo fosforilativo é igual a 0,5. É provável, por conseguinte, que pelo menos uma ligação fosfatada altamente energética se produz quando há a oxidação de uma molécula de nitrito. A consideração de variação global da energia livre na reação sugere que no máximo duas de tais ligações podem ser esperadas. Isto, aliás, estaria de acordo com o mecanismo de trans-

porte eletrônico durante a oxidação de nitrito proposto por Aleem e Nason (1959).

Uma adenosinotriphosfatase foi verificada estar muito ativa em *Nitrobacter* e nada foi feito para segurar o ATP formado — o que indica ser a P/O = 0,5 um valor mínimo.

Em outro ensaio o mesmo sistema foi empregado; entretanto em lugar de fosfato não radiativo usou-se  $P^{32}O_4$  livre de vetor inerte. Os radiocromatogramas revelaram a presença de ATP identificado não só pelo seu Rf mas também por reações coloridas no papel. Embora o ensaio traçador com células intactas evidenciasse apenas a produção de ATP, com as preparações livres de células foram observados outros compostos orgânicos de fosforo (e talvez pirofosfato) cuja identificação não foi ainda tentada (ver Fig. 2).

Parece, pois, lícito concluir que em *Nitrobacter* existem mecanismos para a síntese de ligações fosfatadas ricas de energia e para a fixação do gás carbônico semelhantes aos descritos para outros organismos. Detalhes a respeito desses ensaios e de outros já conduzidos serão publicados em outro lugar.

### SUMMARY

1. Intact cells of *Nitrobacter agilis* fix  $CO_2$  during the oxidation of nitrite according to the same pathway found to occur in photosynthesis by higher plants. Activity of carboxidismutase — the crucial enzyme for fixation — was demonstrated in cell free extracts.

2. High energy phosphates (as ATP) are generated during the oxidation of nitrite with an apparent P/O ratio of 0.5.

### LITERATURA CITADA

- ALEEM, M. I. H., e ALEXANDER, M., J. Bacteriol. **76**, 510 (1958).  
 ALEEM, M. I. H., e NASON, A., Biochem. Biophys. Research Comm. **1**, 323 (1959).  
 AUBERT, J. P., MILHAUD, G., e MILLET, Y., Ann. Inst. Pasteur **92**, 515 (1957).  
 BANDURSKI, R. S., e AXELROD, B., J. Biol. Chem. **193**, 405 (1951).  
 BASSHAM, J. A., BENSON, A. A., KAY, L. D., HARRIS, A. F., WILSON, A. T. e CALVIN, M., J. Am. Chem. Soc. **76**, 1760 (1954).  
 BENSON, A. A., BASSHAM, J. A., CALVIN, M., GOODALE, T. C., HAAS, V. A. e STEPKA, W., J. Am. Chem. Soc. **72**, 1710 (1950).  
 BURROWS, S., GRYLLS, F. S. M., e HARRISON, J. S., Nature **170**, 800 (1952).  
 GOMORI, G., J. Lab. e Clin. Med., **27**, 955 (1941-42).  
 HANES, C. S., e ISHERWOOD, F. A., Nature **164**, 1107 (1949).  
 MALAVOLTA, E., DELWICHE, C. C. e BURGE, W. D., Não publicado (1960).  
 RIDER, B. F., e MELLON, M. G., Ind. and Eng. Chem., Anal. Ed. **18**, 96 (1946).

TABELA 1  
Fosforilação por extratos de *Nitrobacter*

TRATAMENTO	Micromoles de $\text{NO}_2^-$ oxidados	Micromoles de $\text{PO}_4$ esterificados
Completo	4,75	2,37
Completo fervido	0,12	0,00
Menos $\text{PO}_4^{=}$	3,21	0,05
Menos $\text{NO}_2^-$	0,10	0,00
Menos ADP	4,56	0,56
Menos $\text{Mg}^{=}$	4,80	0,15
Menos $\text{F}^-$	4,77	0,00
Menos citocromo <i>c</i>	2,89	0,23
Mais DNP	4,50	0,10

O sistema completo continha 2,5 ml de extrato livre de célula (0,8 mg N/ml), 1 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,005 M, 1 ml de  $\text{KNO}_2$  0,005 M, 0,1 ml de ADP 0,05 M, 0,2 ml de  $\text{MgCl}_2$  0,05 M, 0,2 ml de KF 0,075 M e 0,1 ml de citocromo *c* a 0,5 por cento num volume total de 10 ml. 1 ml de DNP 0,001 M foi adicionado onde se indicou.

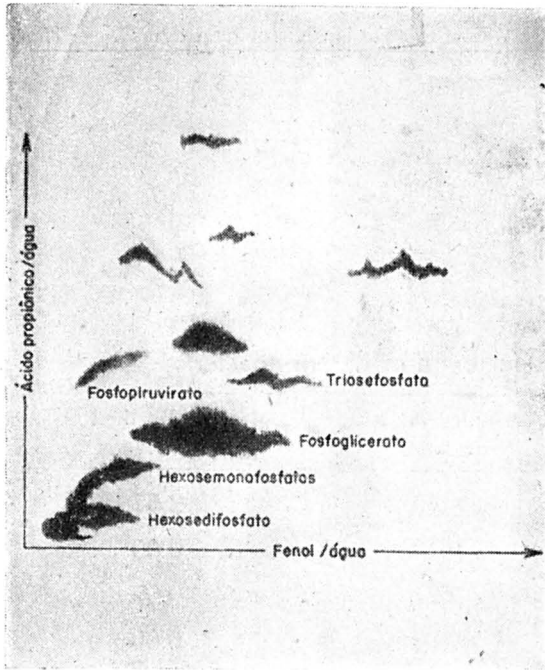


FIG. 1. Produtos da assimilação do  $C^{14}O_2$  por *Nitrobacter agilis*

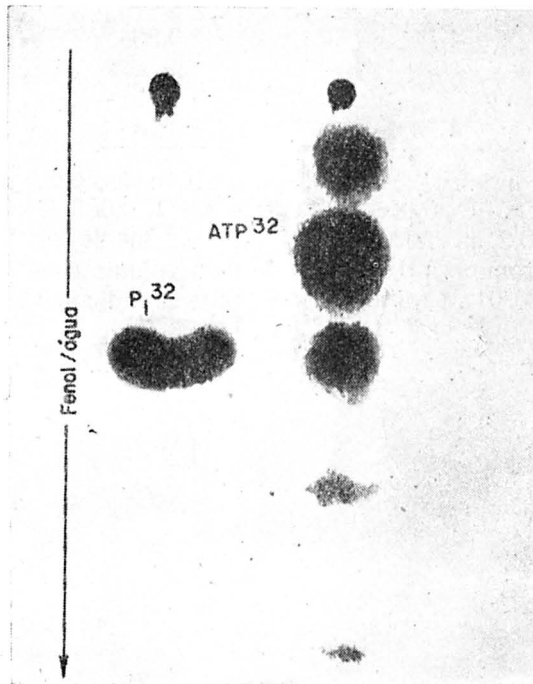


FIG. 2. Produtos da incorporação do  $P^{32}O_4$  por preparações de *Nitrobacter agilis* livres de células, como aparecem no radiocromatograma; o fosfato inorgânico marcado foi usado como referência.