

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

Caracterização inicial do sistema genético da fixação biológica do nitrogênio em
Paenibacillus riograndensis e sua regulação

GABRIELA DE CARVALHO FERNANDES

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Luciane Maria Pereira Passaglia

Porto Alegre, março de 2013.

Este trabalho foi realizado no Núcleo de Microbiologia Agrícola, Laboratório de Genética Molecular Vegetal, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), via Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) da Fixação Biológica do Nitrogênio.

"Enquanto eu tiver perguntas e não houver resposta
continuarei a escrever."

(Clarice Lispector, em *A Hora da Estrela*)

AGRADECIMENTOS

À professora Luciane Passaglia, por sua acolhida tão disponível e por sua tão presente preocupação.

Aos professores Irene Silveira Schrank, Raul Sperotto e Márcia Margis, pela disponibilidade para avaliação do trabalho.

Aos grandes companheiros do Laboratório de Genética Molecular Vegetal, pela convivência diária e por toda a ajuda nos detalhes rotineiros.

Aos grandes companheiros do Núcleo de Microbiologia Agrícola, pela acolhida, pelo dia-a-dia mais próximo no decorrer desses dois anos e pelos momentos compartilhados.

Às "paleopessoas" imprescindíveis para essa jornada. Especialmente ao grande amigo Marcos André, melhor pessoa possível em qualquer cidade.

Aos amigos da Biologia, pelas aventuras, aflições e sonhos ainda compartilhados. Especialmente aos eternos companheiros de laboratório Luiz Carlos e Ivna Salmito, pela amizade e torcida fundamentais.

Às grandes amigas da vida, Daniela, Danielle, Raffaella e Sabrina, por cruzarem a minha vida e ficarem, por sua preocupação, interesse e torcida.

Às mais que especiais colegas de AP, Sheila Yuri e Joana Potira, pela incomparável convivência. Especialmente à Sheila, pela parceria sempre e pela amizade essencial.

À minha vibrante e envolvente família, por tudo.

Aos meus pais, mais que tudo, por tudo.

RESUMO

O nitrogênio é um elemento essencial à vida na Terra. Em geral, a disponibilização desse elemento para os seres vivos se dá por meio da fixação biológica do nitrogênio (FBN). Os micro-organismos capazes de realizar a FBN são denominados de diazotróficos e contêm o complexo enzimático da nitrogenase. Por ser um processo extremamente dispendioso, a FBN é regulada, principalmente, em nível transcricional, em resposta à quantidade de nitrogênio fixado e aos níveis de oxigênio. Os mecanismos de regulação do processo em bactérias Gram-negativas estão bem caracterizados, porém, em bactérias Gram-positivas, os estudos ainda são escassos. *Paenibacillus riograndensis* é uma bactéria Gram-positiva diazotrófica aeróbia facultativa e formadora de esporos, cujo sequenciamento completo do genoma a capacita como um interessante modelo para o estudo da regulação da FBN. No genoma de *P. riograndensis* foram identificados três agrupamentos contendo genes relacionados à FBN. Um deles, com uma organização estrutural menos conservada, foi considerado inativo a partir de análises de PCR em tempo real e de atividade de promotor. Os outros dois tiveram seus transcritos identificados e induzidos sob condições de fixação de nitrogênio, sendo um deles responsável pela codificação de um sistema alternativo da nitrogenase, independente de molibdênio. Esse sistema alternativo foi identificado como sendo aquele composto apenas por ferro e validado tanto pela análise das sequências dos genes estruturais, como pela atividade enzimática em meio sem molibdênio. Sequências localizadas a aproximadamente 250 pares de bases (pb) a montante do início da tradução dos primeiros genes dos dois agrupamentos funcionais também tiveram suas atividades como regiões reguladoras validadas pelo reconhecimento em *Escherichia coli*, com um provável padrão de iniciação da transcrição constitutivo. Uma menor atividade de transcrição foi observada no fragmento de 500 pb localizado a montante do agrupamento dos genes da nitrogenase alternativa, indicando a presença de regiões contendo motivos de regulação negativa do processo. Investigações mais detalhadas dessas sequências podem revelar padrões inéditos para a regulação da FBN em bactérias Gram-positivas, em geral, e em *P. riograndensis*, em particular.

ABSTRACT

Nitrogen is an essential element for life. In general, it becomes available to biosphere mainly through biological nitrogen fixation (BNF). Microorganisms named diazotrophs perform BNF and they have the nitrogenase enzyme. As BNF is a very energetic expensive process, it is tightly regulated mainly at transcriptional level in response to available nitrogen and oxygen levels. Regulatory networks comprising BNF systems in Gram-negative bacteria are well characterized, while studies related to Gram-positive bacteria are scarce. *Paenibacillus riograndensis* is a Gram-positive endospore-forming facultative anaerobic diazotroph, whose complete genome sequence presents it as an interesting model for the study of BNF regulation. In *P. riograndensis* genome three cluster comprising BNF related genes were identified. One of them, displaying a less conserved structural organization, was stated as inactive from real time PCR and promoter activity analysis. The other ones had their transcripts identified and responded to nitrogen fixation conditions. One of the active clusters comprises genes coding for an alternative nitrogenase system independent of molybdenum, the iron-only system. This alternative system was validated by enzymatic activity under Mo-depleted conditions. Sequences 250 base pairs (bp) upstream from the first open reading frame (ORF) of each active cluster had their promoter activities validated by recognizing in *Escherichia coli*, showing a probable constitutive expression pattern. A weaker promoter activity was identified in a fragment 500 bp upstream of the first ORF from the alternative cluster, suggesting the presence of a negative regulation motif. Future investigations may provide us with new patterns of BNF regulation in Gram-positive bacteria, in general, and in *P. riograndensis* in particular.

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
1.1 Nitrogênio	8
1.2 Fixação Biológica do Nitrogênio	8
1.3 Organização Gênica e Regulação em Diazotróficos.....	10
1.4 Diazotróficos Gram-positivos	13
1.5 <i>Paenibacillus riograndensis</i>	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 MANUSCRITO A SER SUBMETIDO À REVISTA MICROBIOLOGY	17
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Nitrogênio

O nitrogênio é um elemento essencial à vida na Terra. Ele é necessário, por exemplo, para a síntese de proteínas, como componente de aminoácidos, e de ácidos nucleicos, como componente das bases nitrogenadas, biomoléculas fundamentais a todas as formas de vida. Tal elemento está presente no solo em diversas formas e sob diferentes estados de oxidação. As transformações entre essas formas são mediadas, principalmente, por micro-organismos (Robertson, 1996).

Entretanto, o nitrogênio gasoso ou molecular (N_2), constituinte majoritário da atmosfera terrestre e maior reservatório do elemento no planeta, não está disponível para a maioria dos seres vivos, devido à força da tripla ligação que une os dois átomos na molécula (Galloway et al., 2004). Em consequência, apesar da abundância, o nitrogênio disponível não pode ser prontamente utilizado pelos seres vivos em geral. Dessa forma, acredita-se que ele seja o principal elemento limitante da produtividade em diversos ecossistemas naturais terrestres e marinhos (Vitousek e Howarth, 1991). Para melhorar a produtividade em sistemas agrícolas, nitrogênio reativo é adicionado por meio de fertilizantes químicos, o que provoca profundas alterações no ciclo desse elemento (Galloway et al., 2004). Porém, grande parte desse aporte de nitrogênio é perdida por volatilização ou lixiviação, o que está relacionado a vários problemas ambientais, como efeito estufa e poluição de corpos de água (Rejesus e Hornbaker, 1999).

Além da interferência humana, com a fixação industrial, a transformação de N_2 em nitrogênio reativo se dá por descargas elétricas e por meio da fixação biológica, processo este que representa a principal via de entrada do N_2 no ciclo, tornando-o disponível para assimilação por todos os seres vivos (Bottomley e Myrold, 1996).

1.2 Fixação Biológica do Nitrogênio

A redução do dinitrogênio à amônia, catalisada por sistemas enzimáticos de micro-organismos, é denominada de fixação biológica do nitrogênio (FBN) e desempenha papel fundamental na disponibilização de formas metabolicamente utilizáveis de nitrogênio para a biosfera (Howard e Rees, 1996). A capacidade de fixar nitrogênio, apesar de não ser encontrada no domínio Eukarya, encontra-se amplamente distribuída em vários grupos de

Bacteria e Archaea, compatível com uma diversa gama de fisiologias em diferentes habitats (Dixon e Kanh, 2004; Raymond et al., 2004).

Os micro-organismos fixadores de nitrogênio, denominados de diazotróficos, realizam o processo de FBN por meio do complexo enzimático denominado nitrogenase. O sistema de nitrogenase mais estudado é o que contém o cofator contendo molibdênio. Esse sistema é composto pela ferro-molibdênio-proteína (ou dinitrogenase, componente heterotetramérico $\alpha_2\beta_2$), que contém o sítio ativo para redução do nitrogênio, e pela ferro-proteína (ou dinitrogenase redutase, componente homodimérico γ_2) que atua como ligadora de nucleotídeo e doadora de elétrons (Rees e Howard, 2000). O mecanismo de ação do complexo nitrogenase envolve a transferência de elétrons da Fe-proteína para a Fe-Mo-proteína por meio dos centros metálicos componentes das estruturas das subunidades. A Fe-proteína reduzida ligada a dois ATP forma um complexo com a Fe-Mo-proteína, ocorre a transferência de elétron, e as subunidades se dissociam. Esse ciclo deve ser repetido até o acúmulo do número suficiente de elétrons para a redução do substrato (Rees e Howard, 2000). Dessa forma, a transferência de cada elétron envolve um ciclo de associação e disassociação entre os componentes, com hidrólise de duas moléculas de ATP. Para a redução de uma molécula de dinitrogênio à amônia é necessária a transferência de oito elétrons, com gasto de 16 moléculas de ATP (Hageman e Burris, 1978; Dixon e Kahn, 2004; Seefeldt et al., 2009).

O complexo metaloproteico acima descrito é o sistema universal distribuído na natureza e inicialmente concebido como o único responsável pela FBN (Bishop e Joerger, 1990). Na década de 1980, porém, mutantes *Nif⁻* de *Azotobacter vinelandii*, incapazes de fixar nitrogênio, apresentaram reversão do fenótipo, tornando-se novamente fixadores em condições de deficiência de Mo. Tais mutantes isolados não apresentavam quantidades consideráveis das subunidades conhecidas da nitrogenase, mas apresentavam novas proteínas, também encontradas na linhagem selvagem fixadora em condições de depleção de Mo, indicando a existência de um sistema alternativo (Bishop et al., 1980). Tal sistema foi validado a partir do estudo de uma linhagem mutante de *A. vinelandii* com deleção dos genes estruturais conhecidos da nitrogenase, mas capaz de fixar nitrogênio em deficiência de Mo (Bishop et al., 1986), e o consecutivo isolamento dos reconhecidos sistemas alternativos independentes de Mo e baseados em vanádio de *A. vinelandii* (Hales et al., 1986) e *A. chroococcum* (Robson et al., 1986). *A. vinelandii* foi ainda modelo para a

determinação de um segundo sistema alternativo, independente de Mo e V e reprimido por esses metais, baseado apenas em ferro (Chisnell et al, 1988; Pau et al., 1989). A expressão desses sistemas alternativos pode ser relevante, por exemplo, em solos ácidos com elevado conteúdo de óxidos de ferro, onde o molibdênio é limitante, ou em outros ambientes com baixa disponibilidade de molibdênio (Bishop e Joerger, 1990).

É reconhecida a extrema sensibilidade dos três sistemas de FBN ao oxigênio. Preparações *in vitro* de nitrogenase são rapidamente inativadas por O₂. Os microorganismos diazotróficos, portanto, devem conciliar a atividade desse complexo enzimático com a presença de oxigênio, à exceção daqueles anaeróbios estritos. Nesse sentido, diversas estratégias para limitar o contato entre a nitrogenase e o oxigênio foram desenvolvidas (Gallon, 1992). Uma notável exceção a esse padrão é a nitrogenase de *Streptomyces thermoautotrophicus*, cujos componentes não apresentam qualquer sensibilidade ao O₂, além de apresentarem outras características intrigantes, como menor requerimento energético e mesmo a dependência de O₂ para a fixação, compondo um sistema completamente distinto de FBN (Ribbe et al., 1997).

1.3 Organização Gênica e Regulação em Diazotróficos

A complexidade bioquímica da nitrogenase encontra-se refletida na organização gênica e na regulação da expressão dos genes componentes do sistema básico de FBN, denominados genes *nif* (do inglês *nitrogen fixation*) (Jacobson et al., 1989). A FBN representa elevado gasto energético para os diazotróficos, pois, além do ATP utilizado nos ciclos de redução entre as subunidades da nitrogenase, é necessário sintetizar grande quantidade da enzima para utilizar o N₂, devido ao seu lento tempo de *turnover*. Além disso, a sensibilidade do complexo ao oxigênio impõe limitações à sua atividade. A síntese dos componentes da nitrogenase é regulada em nível transcricional em resposta à disponibilidade de nitrogênio fixado e à concentração externa de O₂, de forma que a enzima não é expressa em condições desnecessárias ou desfavoráveis (Dixon e Kanh, 2004).

Klebsiella pneumoniae, bactéria de vida livre aeróbia facultativa, foi o primeiro diazotrófico com os genes *nif* identificados e caracterizados (Arnold et al., 1988). Esses genes e seus respectivos produtos são: *nifH* (Fe-proteína); *nifD* (cadeia α da Fe-Mo-proteína); *nifK* (cadeia β da Fe-Mo-proteína); *nifF* e *nifJ* (componentes de transporte de

elétrons); *nifE*, *nifN*, *nifV*, *nifB* e *nifQ* (enzimas da via biossintética do cofator Fe-Mo); *nifM* (componente de maturação da Fe-proteína); *nifL* (elemento de regulação negativa); *nifA* (elemento de regulação positiva); além de outros genes de função não determinada.

Em *K. pneumoniae*, os 20 genes *nif* identificados encontram-se agrupados em organização bem compacta em uma região cromossômica abrangendo 24.206 pares de bases, organizados em 8 operons: *nifJ*, *nifHDKTY*, *nifENX*, *nifUSVWZ*, *nifM*, *nifF*, *nifLA* e *nifBQ* (Arnold et al., 1988). Jacobson e colaboradores (1989) relataram uma organização bastante semelhante em *Azotobacter vinelandii*, diazotrófico aeróbio obrigatório, com a diferença de apresentar potenciais genes adicionais, com função não caracterizada. No genoma de *Pseudomonas stutzeri* A1501, bactéria de vida livre que coloniza a rizosfera de arroz, foi identificado um grupo de genes *nif* bem conservados dispostos de maneira semelhante à descrita em *A. vinelandii* compondo uma ilha genômica, provavelmente adquirida por transferência horizontal (Yan et al., 2008). Desnoues e colaboradores (2003) demonstraram a funcionalidade dos genes *nif* de *P. stutzeri* e relataram que sua expressão está sob controle de *rpoN*, *nifLA* e *ntrBC*.

Os sistemas de fixação alternativos correspondem também a sistemas genéticos distintos. Os genes que codificam as subunidades da nitrogenase baseada em vanádio são denominados *vnf* (vanadium nitrogen fixation) e estão divididos em dois operons em *A. vinelandii* com *vnfH*, que codifica a dinitrogenase redutase, e *vnfDGGK*, que codificam as subunidades da dinitrogenase, sendo esta uma proteína hexamérica ($\alpha_2\beta_2\delta_2$) (Robson et al., 1989). O sistema baseado apenas em ferro é codificado pelos denominados genes *anf* (alternative nitrogen fixation), codificados em um único operon em *A. vinelandii*, *anfHDGK*, e constituído também por uma dinitrogenase redutase hexamérica ($\alpha_2\beta_2\delta_2$) (Joerger et al., 1989).

Apesar de os componentes estruturais da nitrogenase serem reconhecidamente bem conservados dentre os diversos grupos de diazotróficos, os circuitos regulatórios aos quais esses componentes estão sujeitos são bastante variáveis. Até hoje, pouco é conhecido acerca da regulação do metabolismo geral do nitrogênio e da sua fixação em Archaea (Weidenbach et al., 2012). Os promotores *nif* caracterizados em Archaea são regulados negativamente pelo repressor NrpR (Lie e Leigh, 2003). Em *Methanococcus maripaludis*, dímeros de NrpR ligam-se a sequências consenso palindrômicas de dois operadores *in tandem* no promotor, resultando em repressão completa ou intermediária, de acordo com a

fonte de nitrogênio. O nitrogênio disponível em forma de amônia é percebido indiretamente através dos níveis de 2-oxoglutarato, que interage com o repressor e enfraquece sua ligação, liberando a transcrição dos genes *nif* em deficiência de nitrogênio (Lie et al., 2005).

Ao contrário dos poucos exemplos estudados em Archaea, a regulação da FBN em Bacteria é extensivamente investigada, com modelos bem caracterizados de Proteobacteria. Genes *nif* de Proteobacteria estão sujeitos à ativação transcricional pelo regulador central NifA (produto do gene *nifA*), que atua junto ao fator σ^{54} da RNA polimerase (também denominado RpoN, produto do gene *rpoN*) (Dixon e Kanh, 2004). O fator σ^{54} reconhece sequências promotoras não-usuais, com sequências consenso localizadas próximas às posições -12/-24 do sítio de início da transcrição, e depende de EBPs (*enhancer binding proteins*, família em que está classificada NifA) ligadas a UAS (*upstream activating sequence*, localizadas usualmente de -80 a -100) para a formação do complexo aberto e transcionalmente ativo (Morett e Buck, 1988; Morett e Buck, 1989).

A expressão de *nifA* está sob o controle do sistema NtrBC, um sistema de dois componentes de controle em resposta ao status global de nitrogênio da célula. NtrB é a proteína sensora do sistema, com atividade quinase/fosfatase, que controla a proteína reguladora de resposta, NtrC. NtrC, por sua vez, é um ativador transcricional, assim como NifA, e controla sua expressão na forma fosforilada diante de disponibilidade limitante de amônia (Merrick e Edwards, 1995; Dixon e Kanh, 2004).

Em Proteobacteria em geral, NifA detecta diretamente os níveis de O₂ e é inativada na sua presença. Em organismos da subdivisão Gama, há um gene adicional (*nifL*) responsável pela regulação negativa do sistema e codificado no mesmo operon. NifL interage com NifA formando um complexo inativo em resposta a O₂ e nitrogênio fixado (Dixon, 1998). Em *K. pneumoniae*, a atividade de NtrC controla tanto a expressão do operon *nifLA*, como a atividade de NifA via NifL (He et al., 1997). Há diversos sistemas para sensoriamento de O₂, além de outros sistemas baseados em proteínas PII (de transdução de sinal) envolvidos com a regulação de acordo com a disponibilidade de outras fontes de nitrogênio. As diversas vias de sinalização caracterizadas regulam, em última instância, a expressão e/ou atividade de NifA (Dixon e Kanh, 2004).

Para os sistemas alternativos também foram descritos ativadores transcricionais correspondentes, denominados *vnfA* e *anfA*, com promotores dependentes do sistema Ntr,

codificados separadamente dos elementos estruturais, que têm promotores também dirigidos por σ^{54} (Joerger et al., 1989). A ativação dos sistemas alternativos é controlada por meio da expressão de seus ativadores correspondentes, que é reprimida por Mo e amônia. Vanádio também reprime o sistema *anf* (Premakumar et al., 1998). Tais ativadores aparentemente reconhecem sequências específicas diferentes daquela reconhecida por NifA (Woodley et al., 1996).

A bactéria púrpura fototrófica *Rhodobacter capsulatus*, que, além da nitrogenase convencional, fixa nitrogênio com a enzima alternativa que contém apenas ferro, tem padrões de organização e regulação distintos. São relatados mais de 50 genes envolvidos na síntese e regulação dessas enzimas, agrupados em quatro regiões dispersas no genoma (Masepohl e Klipp, 1996). O promotor para a nitrogenase alternativa é ativado de maneira independente de σ^{54} em condições de depleção de N₂ por NtrC e tem sua expressão reprimida por traços de molibdênio, situação em que é expressa a enzima convencional (Kutcshe et al., 1996). Ambas as enzimas ainda estão sujeitas à regulação pós-traducional, sendo inativadas por ADP-ribosilação reversível, em resposta à disponibilidade de amônia e à intensidade luminosa (Masepohl et al., 2002).

1.4 Diazotróficos Gram-positivos

A organização e a regulação dos genes relacionados à FBN são relativamente bem caracterizadas em modelos de bactérias Gram-negativas. Porém, tal conhecimento é escasso com relação às Gram-positivas. Dentre essas, as mais estudadas encontram-se no gênero *Clostridium*. Apesar da conservação dos genes *nif* estruturais em *Clostridium*, cuja expressão também está sujeita à disponibilidade de amônia, suas regiões promotoras diferem dos motivos caracterizados em modelos de Proteobacteria. Além disso, esses micro-organismos não apresentam um gene semelhante ao gene *nifA* (Chen, 2004). A ausência de *nifA* também é relatada em *Frankia*, gênero de bactérias Gram-positivas que realizam simbiose com plantas não-leguminosas (Harriot et al., 1995).

Em *Clostridium pasteurianum* foram identificados, além do gene codificador da Fe-proteína (*nifH*), cinco sequências *nifH*-like (*nifH2* a *nifH6*) com variação na identidade entre as sequências. O acúmulo de transcritos das demais sequências, além de *nifH1*, sugere a funcionalidade de mais de um gene *nifH* em condições de fixação (Wang et al., 1988; Kasap e Chen, 2005). As sequências promotoras avaliadas em *C. pasteurianum* não mostraram homologia às sequências consenso *nif* descritas para *K. pneumoniae*. Ao

contrário, foram identificadas sequências consenso correspondentes às regiões -10 e -35 de promotores de *Escherichia coli* reconhecidos pelo fator σ^{70} , de expressão constitutiva. Na região -100, as sequências são bastante conservadas entre as seis unidades transcricionais e também diferem da UAS reconhecida por NifA. Para a determinação da sequência consenso, a sequência reversa ou o reverso complementar de algumas unidades foram utilizados, o que levou os autores a postularem que tais segmentos podem atuar independente da orientação (Wang et al., 1988).

Em *Heliobacterium chlorum*, os genes estão agrupados na seguinte ordem, todos com a mesma orientação, compondo um único operon: *nif11*, *nif12*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *fdx*, *nifB* e *nifV*. Os genes *nifI* são encontrados apenas em operons de archaeas metanogênicas e de algumas bactérias anaeróbias estritas, como é o caso de *H. chlorum*. De maneira intrigante, eles estão localizados antes de *nifH* nesse operon descrito (Enkh-Amgalan et al., 2006a). Uma ORF sem homólogos *nif*, localizada a montante do operon e co-transcrita com *nifI* é proposta como responsável pela regulação da transcrição. Mais a montante dessa ORF foram identificadas sequências semelhantes às sequências consensuais -10/-35 de promotores dirigidos por σ^{70} . Por mecanismo de anti-terminação, o produto dessa ORF permitiria a continuação da transcrição do operon, em princípio expresso constitutivamente, em condições de limitação de nitrogênio. Com relação à UAS, não foram encontradas sequências semelhantes às típicas de Gram-negativas ou à sequência encontrada em *C. pasteurianum* (Enkh-Amgalan et al., 2006b).

Observa-se, portanto, que o que é descrito para a regulação e organização gênica da FBN em bactérias fixadoras Gram-positivas difere bastante das características identificadas em bactérias Gram-negativas. Além disso, são notáveis as diferenças encontradas entre os poucos organismos estudados, de forma que não há um padrão estabelecido para tal regulação em diazotróficos Gram-positivos.

1.5 *Paenibacillus riograndensis*

Paenibacillus riograndensis é um bacilo Gram-positivo aeróbio facultativo diazotrófico e formador de esporos. A linhagem primeiramente classificada nessa espécie, SBR5^T, foi isolada da rizosfera de trigo no Rio Grande do Sul, Brasil (Beneduzi et al., 2008; Beneduzi et al., 2010).

Além da fixação do nitrogênio, *P. riograndensis* apresenta outras características que o classificam como bactéria promotora do crescimento vegetal: elevada produção de

compostos indólicos e sideróforos e a capacidade de solubilizar fosfatos. Experimentos em casa de vegetação demonstraram sua habilidade em promover o crescimento de plantas de trigo, com aumento da parte aérea e do peso seco das plantas inoculadas. A partir disso, e somado à sua capacidade de produzir esporos, é proposto seu uso para a formulação de inoculantes (Beneduzi et al., 2008).

O genoma de *P. riograndensis* SBR5^T foi sequenciado (número de acesso no GenBank: AGBD01000000, Beneduzi et al., 2011), o que abre perspectivas para a caracterização funcional do sistema genético componente da FBN nesse organismo. Ao total, foram identificados 23 genes *nif*, em uma organização que compreende, além de um operon completo, *nifBHDKENXV*, cópias de genes dispersos pelo genoma, e genes que codificam a nitrogenase alternativa (Anf, com cofator baseado apenas em ferro). Entretanto, não foi identificado um gene correspondente ao *nifA*, regulador central em modelos diazotróficos bem estudados. É notável, ainda, o elevado número de fatores sigma identificados no genoma, com um total de 46, o que sugere uma regulação transcricional bem versátil (Beneduzi et al., 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar os genes relacionados à fixação biológica do nitrogênio (FBN) em *Paenibacillus riograndensis* e sua regulação.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar a organização dos genes relacionados à FBN identificados no genoma de *P. riograndensis*;
- b) Validar a funcionalidade dos sistemas genéticos identificados;
- c) Determinar a influência de nitrogênio fixado na regulação da fixação em *P. riograndensis*;
- d) Identificar os promotores dos genes relacionados à FBN em *P. riograndensis*.

3 MANUSCRITO A SER SUBMETIDO À REVISTA MICROBIOLOGY

The biological nitrogen fixation system in *Paenibacillus riograndensis*: genome organization and characterization

Gabriela de Carvalho Fernandes¹, Samanta Bolzan de Campos¹, Anelise Beneduzi², Laura Junqueira Trarbach¹, and Luciane M. P. Passaglia^{1, *}

¹ Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15.053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Rua Gonçalves Dias 570, 90130-060, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author at: Departamento de Genética. Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15.053, Prédio 43312, sala 207b, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brazil. Tel.: +55 51 3308 9813; fax +55 51 3308 7311. E-mail address: luciane.passaglia@ufrgs.br (L. M. P. Passaglia)

Abstract

Biological nitrogen fixation (BNF) is a tightly regulated process that is carried out by diazotrophic organisms, and the mechanisms that regulate the expression of BNF-related genes in Gram-negative bacteria are well characterized. *Paenibacillus riograndensis* is a Gram-positive endospore-forming facultative anaerobic diazotroph, and it is an interesting model to study BNF regulation due to the availability of its genome sequence and its agricultural utility. Three clusters of BNF-related genes with dissimilar phylogenetic histories were identified in the *P. riograndensis* genome. One striking feature of the *P. riograndensis* nitrogen fixation system is the apparent absence of regulatory genes, and it is likely that the compact set of *nif* genes (eight) found in *P. riograndensis* is sufficient for this bacterium to perform nitrogen fixation. *P. riograndensis nifH2* was considered inactive based on transcript analysis, whereas transcripts of *nifH1* and *anf* were detected under nitrogen-limited conditions. The functionality of the alternative nitrogenase system

was also validated by enzymatic activity analyses. The regions from 0 to 250 bp upstream of the two active clusters seem to harbor primary transcription activation sequences, producing a constitutive expression pattern in *E. coli*. The activation of both *P. riograndensis nifH1* and *anfH* under nitrogen fixing conditions indicated that they may share a common activation mechanism, with an additional molybdenum responsive element present to down-regulate *anf* genes.

Introduction

As a major component of many biomolecules, nitrogen is an essential element for life, and it is found in abundance in Earth's atmosphere as N_2 . Nevertheless, this reservoir is inaccessible to most organisms, which are not able to use it directly because of the strength of its triple bond (Howard & Rees, 1996; Galloway et al., 2004). Diverse prokaryotes throughout the Bacteria and Archaea domains, with an extensive variety of physiologies and habitats (Raymond et al., 2004; Dixon & Kahn, 2004), exhibit the ability to reduce N_2 to ammonia through the biological nitrogen fixation (BNF) process (Howard & Rees, 1996).

The BNF process is carried out by nitrogenase, a complex metalloenzyme. The NifH (γ_2) homodimeric component, the iron protein, transfers electrons to the second component, the heterotetrameric iron-molybdenum protein [NifDK ($\alpha_2\beta_2$)], which reduces N_2 (Rees & Howard, 2000). In addition to this molybdenum-based system, which is present in all diazotrophs studied to date, alternative systems in which the molybdenum is replaced by vanadium or by iron in co-factors of hexameric components ($\alpha_2\beta_2\delta_2$) have been reported in some organisms (Robson *et al.*, 1989; Joerger *et al.*, 1989; Schneider *et al.*, 1991). These enzymatic systems comprise either three distinct genetic systems: *nif*, *vnf*, and *anf*, respectively (Bishop & Joerger, 1990; Eady, 1996; Zhao *et al.*, 2006).

In addition to the slow turnover time, which is observed because large amounts of protein are required to be synthesized to provide the nitrogen supply, nitrogenase activity itself represents a notable energy input, and all nitrogenase systems are regulated in response to fixed nitrogen, mainly at transcriptional level. Oxygen is also another important regulator, as nitrogenase components exhibit extreme oxygen sensitivity (Dixon & Kahn, 2004). The best studied group with respect to nitrogen fixation regulation is the Bacteria, which include the well characterized Gram-negative Proteobacterial models;

these organisms have regulatory cascades leading to NifA, which in turns activates σ^{54} -dependent promoters, resulting in *nif* transcription (Dixon & Kahn, 2004). However, the few examples studied within Gram-positive bacteria show completely distinct regulatory patterns, including σ^{70} -driven promoters with negative regulatory mechanisms (Wang *et al.*, 1988; Enkh-Amgalan *et al.*, 2006b).

Paenibacillus riograndensis is a Gram-positive endospore-forming facultative anaerobic diazotrophic bacterium. Its type strain, SBR5^T, was isolated from the wheat rhizosphere (Beneduzi *et al.*, 2008; Beneduzi *et al.*; 2010), and becomes interesting to study BNF, due to its determined genome sequence (Beneduzi *et al.*, 2011). In addition to nitrogen fixation, SBR5^T displays other characteristics that promote plant growth, such as siderophore and indolic compound production and phosphate solubilization, and it has thus attracted interest as a potential inoculant (Beneduzi *et al.*, 2008). Here, we aim to characterize the *Paenibacillus riograndensis* nitrogen fixation system and to identify candidate mechanisms that may contribute to its regulation.

Methods

Bacterial strains and growth conditions. *Paenibacillus riograndensis* SBR5^T was grown at 30°C in rich King B medium (Glickmann & Dessaux, 1995) for maintenance and as a control of non-nitrogen fixing condition. Semi-solid (0.3% agar) TBNR medium (Seldin *et al.*, 1983) was used to measure nitrogenase activity. *Azospirillum brasilense* Sp7 strain was grown under the same conditions. *Escherichia coli* DH5 α was grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of ampicillin, when carrying the pGEM[®]-T Easy (Promega) or pBSK+ (Stratagene) cloning vectors, or with 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of kanamycin, when carrying the pPROBE-NT' promoter-probe vector (Miller *et al.*, 2000).

Nitrogenase activity. Nitrogenase activity was measured by acetylene reduction assay (ARA) as described by Boddey (1987), with some modifications. Briefly, after 24 h of incubation in 10 ml flask containing 4 ml of semi-solid TBNR medium, acetylene was added to 10% (v/v) of the air phase. The bacteria were cultured in the flasks for 24 h, and ethylene (C₂H₂) production was then measured by gas chromatography (Clarus 600, Perkin Elmer) with a flame ionization detector connected to a computer with a chromatography data analysis system. Aliquots of 50 μl were collected, lysed with 0.2 M NaOH for 12 h at room temperature, and then subjected to protein concentration determination by the

Bradford method (Bradford, 1976). The results represent the means of three replicates, expressed as $\text{nmol C}_2\text{H}_2 \text{ mg protein}^{-1} \text{ h}^{-1}$. To verify the effect of nitrogen availability on nitrogenase activity, cells were washed twice with sterile saline solution (0.85% NaCl) and cultured in modified TBNR medium, in which the usual nitrogen source (yeast extract) was depleted and substituted by increasing amounts of fixed nitrogen (ammonium acetate). To assess alternative nitrogenase activity, TBNR medium was depleted of molybdenum by activated carbon filtration, as described by Schneider *et al.* (1991). The *A. brasilense* Sp7 strain, which has no alternative nitrogenase, was used as a control. Prior to inoculation, the cells were washed twice with Mo-free TBNR broth.

Sequence analysis. The genetic organization of the *nif*-cluster in the *P. riograndensis* genome was reconstructed based on published sequence (available from the GenBank database under access number AGBD01000000). Protein sequences annotated as NifH and AnfH from diverse diazotroph species were downloaded from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Sequences were aligned in MEGA5.1 (Tamura *et al.*, 2011), and the alignment was corrected manually. NifH phylogeny was assessed using the mixed model in MrBayes v. 3.2.1 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003).

Quantitative real-time RT-qPCR. Cells were cultured under nitrogen fixing and non-nitrogen fixing conditions (semi-solid TBNR and King B media, respectively; three biological replicates each) and harvested. Total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The samples were treated with DNase (Promega) and used as template for cDNA synthesis using random hexamer primers and M-MLV reverse transcriptase (Promega). Diluted cDNA (1:100) was used as a template for quantitative real time PCR, performed in a Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) under the following conditions: initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 40 cycles of 94°C for 10 s, 60°C for 10 s and 72°C for 15 s, and a final extension at 94°C for 15 s. The PCR was performed in 25 μl reactions containing Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) and SYBR Green. The primers designed to amplify each target are listed in Table 1. Sample amounts were normalized against the 16S rRNA gene expression level. All reactions were performed in four technical replicates, and the results represent the relative expression levels determined using the comparative $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (Livak & Schmittgen, 2001). The expression level of each target gene under

nitrogen-fixing conditions was compared to the level in the control (non-fixing condition) using Student's T test ($p < 0.05$).

Table 1: Primers used for real-time RT-PCR to detect *Paenibacillus riograndensis* transcripts under nitrogen fixation conditions

Primer designation	Target	Sequence (5' to 3')
1F	<i>nifH1</i>	CCCAATATAACCCTGCCCATC
1R		TTTTTGAGTGCAGCTTCTTC
2F	<i>nifH2</i>	TGATAATCATGCGGTACGAG
2R		TCCAGCTCCTCAAATATTCT
3F	<i>anfH</i>	GAAGCAGAGCGGTGTCCGC
3R		TTGCTCTCCGCATCGAACTCAA
16SF	<i>16S</i>	CACGTGTAGCGGTGAAATGC
16SR	<i>rRNA</i>	ACTTCGGCACCAAGGGTATC

Cloning of putative *nif* promoter sequences. Based on the SBR5^T genome sequence, primers were designed to amplify fragments encompassing the 250 and 500 bp upstream of the start codon of the first ORF of each nitrogen fixation cluster identified (Table 2). The sequences were amplified by PCR, cloned into the pGEM[®]-T Easy vector and sequenced to validate their identities. Sequencing was performed on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer automatic sequencer (Applied Biosystems) in the ACTGene Laboratory (Centro de Biotecnologia, UFRGS, RS, Brazil) using forward and reverse primers, as described by the manufacturer. Putative promoter sequences were cloned into the pBSK+ vector and then subcloned in the appropriate orientation to control *gfp* expression in the pPROBE-NT' promoter-probe vector (Miller *at al.*, 2000).

Table 2: Primers used to amplify putative promoter sequences upstream of *Paenibacillus riograndensis* nitrogen fixation gene clusters

<i>nif</i> cluster	Target designation	Target size (bp)	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
I	P1.1	258	AAAATGGCTGCAATGGAAAC	TTCCACCTCCTAAAAGTGAC
	P1.2	434	TTGTTTCATTGCCGATAAAACC	
II	P2.1	252	CCAGAGCGGTTCTGTACGAC	CTTATAGCCTGCGACCGATAGG
	P2.2	510	AATCAACAGGAGGGATGCAG	
III	P3.1	258	ACATGAGTGTTCGAAAACG	TTCTCCACACTCCCTTTGATTT
	P3.2	453	TCATGGTTTTCTCTCCTCTCG	

Promoter activity. *E. coli* DH5 α harboring pPROBE-NT' constructs, as well as the strain harboring the empty vector and the non-transformed strain, were cultured in LB broth overnight at 37°C. Samples were collected after 5 and 24 h. Gfp fluorescence (excitation at 485 nm and emission at 535 nm) was measured in 200 μ l samples of cultures using a Plate CHAMELEON multilabel detection platform (Hidex Oy) and corrected to the background level measured in uninoculated medium. The fluorescence values obtained were normalized by the protein content in each sample, determined according to the Bradford method (1976) as stated above. The results represent the means of three replicates, expressed as relative fluorescence units (RFU) μ g protein⁻¹. The activity level of each construct was tested against the controls (wild-type strain and the strain carrying the empty vector) using one-way ANOVA and Dunnett's unilateral comparison test ($P < 0.05$). Inactive constructs were excluded from further analysis. The activity levels of active constructs were compared, checking for interaction with time (two-way ANOVA, simple main effect analysis). The effect of time (5 or 24 h) within the same construct was also verified (Student's T or T' test, depending on variance homogeneity).

Results

***P. riograndensis* contains three genetic clusters related to nitrogen fixation.** Three clusters containing genes related to nitrogen fixation were identified in the *P. riograndensis* genome (Fig. 1). Cluster I includes the largest number of *nif* genes, comprising the *nifB1H1D1K1E1N1X1orf1orf2V* genes. Cluster II contains fewer *nif* genes (*nifH2B2-4-unrelated-orfs-nifD2K2*) and has a dissimilar organization in which *nifB2*, together with four other non-*nif*-related genes, disrupts the region of conserved structural

genes (*nifHDK*). Cluster III comprises *anfHDKGK*, the structural genes encoding the iron-only alternative nitrogenase (Joerger *et al.*, 1989), and additional copies of *nifENX*. Beyond those three clusters, only three copies of *nifU* gene were found scattered through the genome (data not shown).

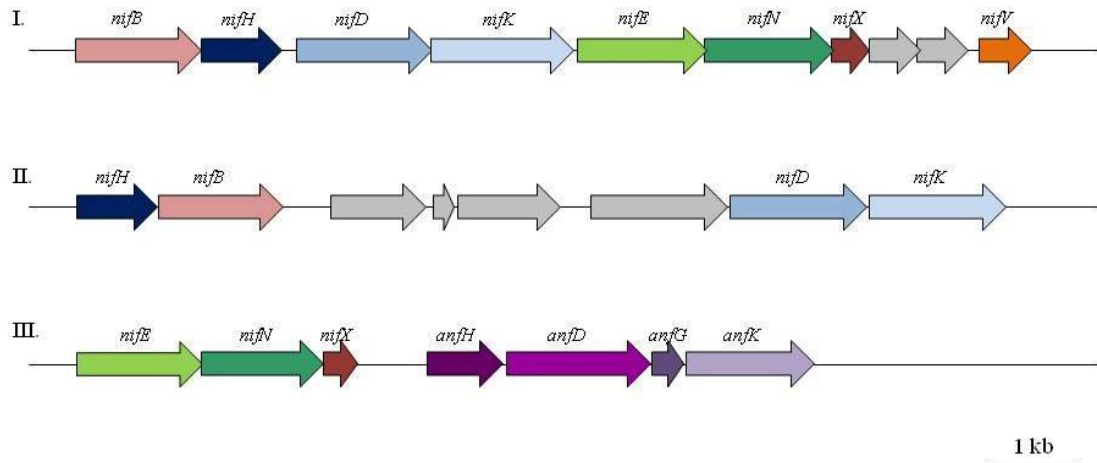


Figure 1. The genetic organization of the three clusters containing nitrogen fixation-related genes found in the *Paenibacillus riograndensis* genome.

The sequences of the *P. riograndensis* NifH1, NifH2, and AnfH proteins were compared with several other sequences available in the GenBank database, and a phylogenetic tree was constructed (Fig. 2). In this tree, one cluster comprising nearly all NifH sequences from the *Paenibacillus* genus and no NifH sequences belonging to other bacterial genera was observed. The *P. riograndensis* NifH1 sequence (SBR5 NifH1) was also included in this cluster. The sequences of the NifH proteins from *Heliobacterium*, *Cyanobacteria*, and *Frankia* genera were positioned near this cluster. Other NifH sequences belonging to Gram-positive bacteria were grouped separately, at the base of the tree, where *P. riograndensis* NifH2 (SBR5 NifH2) clustered together with sequences from the *Clostridium* and *Acetobacterium* genera. This branch containing the second sequence of *P. riograndensis* (NifH2) includes the only one other *Paenibacillus* NifH (*P. durus* NifH3, CAC277951Pd3). The third *P. riograndensis* sequence (SBR5 AnfH) was grouped with the other AnfH sequences analyzed, supporting its role in the alternative nitrogenase system.

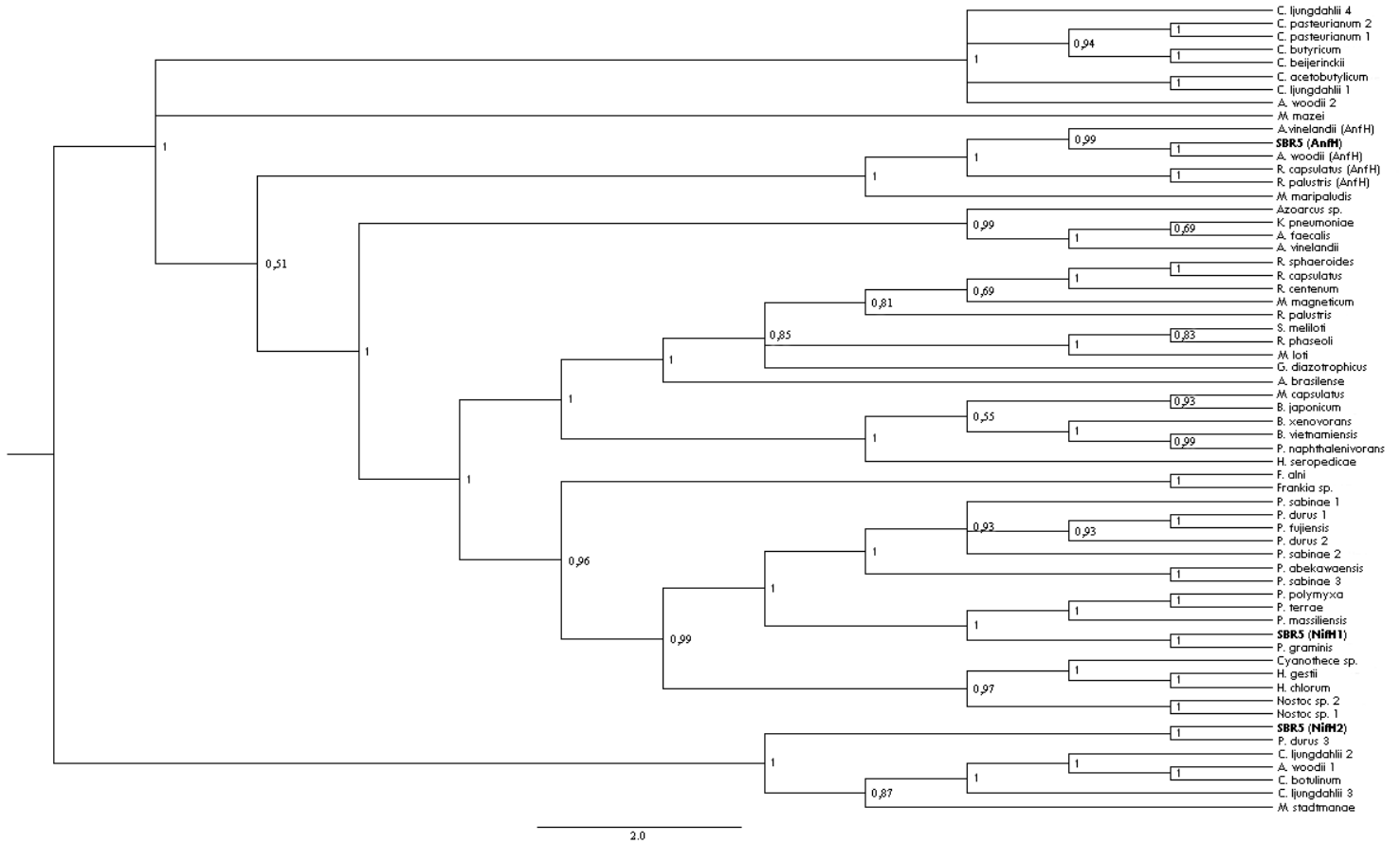


Figure 2. The relationships between NifH and AnfH sequences. A tree showing the phylogenetic analysis of NifH and AnfH polypeptide sequences collected from diverse diazotroph species. The tree was constructed with a mixed model using MrBayes software. Accession numbers of sequences are as follows: *Acetobacterium woodii*: YP_005267713.1 (1), YP_005268477.1 (2), YP_005268384.1 (AnfH); *Alcaligenes faecalis*: CAA65427.1; *Azoarcus* sp.: YP_932042.1; *Azospirillum brasilense*: AAB02342.1; *Azotobacter vinelandii*: AAA64709.1, AAA82508.1 (AnfH); *Bradyrhizobium japonicum*: AAG60754.1; *Burkholderia vietnamiensis*: ABO58940.1; *Burkholderia xenovorans*: E34499.1; *Clostridium acetobutylicum*: YP_005669395.1; *Clostridium beijerinckii*: AAF77055.2; *Clostridium botulinum*: YP001253231.1; *Clostridium butyricum*: ZP04525525.1; *Clostridium ljungdahlii*: YP003778674.1 (1), YP003780465.1(2), YP003780472.1 (3), YP003780513.1 (4); *Clostridium ljungdahlii*: YP003778674.1 (1), YP003780465.1(2), YP003780472.1 (3), YP003780513.1 (4); *Clostridium pasteurianum* : AAT37644.1 (1), AAT37643.2 (2); *Cyanothece* sp.: YP_002377415.1; *Frankia alni*: AAA96262.1; *Frankia* sp.: AAB36876.1; *Gluconacetobacter diazotrophicus*: CAP54379.1; *Heliobacterium chlorum*: BAD95753.1; *Heliobacterium gestii*: BAE02721.1; *Herbaspirillum seropedicae*: YP003776253.1; *Klebsiella pneumoniae*: AAO85881.1; *Magnetospirillum magneticum*: BAE50378.1; *Mesorhizobium loti*: BAB52275.1; *Methanococcus maripaludis*: AAC45512.1; *Methanosarcina mazei*: AAK33112.1; *Methanospaera stadmanae*: ABC57502.1; *Methylococcus capsulatus*: AAU90633.1; *Nostoc* sp.: NP_485497.1 (1), NP_484917.1 (2); *Paenibacillus abekawaensis*: BAH24186.1; *Paenibacillus durus*: CAD56229.1 (1), CAC27791.1 (2),

CAC27795.1 (3); *Paenibacillus fujiensis*: BAH24165.; *Paenibacillus graminis*: BAH23271.1; *Paenibacillus massiliensis*: AAX07130.1; *Paenibacillus polymyxa*: ADM26623.1; *Paenibacillus sabinae*: ADM52725.1 (1), ADM52729.1 (2), ADM52732.1 (3); *Paenibacillus terrae*: YP005075592.1; *Polaromonas naphthalenivorans*: ABM37652.1; *Rhizobium phaseoli*: AAA26321.1; *Rhodobacter capsulatus*: CAA30716.1, YP_003576757.1 (AnfH); *Rhodobacter capsulatus*: CAA30716.1; *Rhodobacter sphaeroides*: YP_001167452.1; *Rhodopseudomonas palustris*: ABD05679.1, YP_004109434.1 (AnfH); *Rhodospirillum centenum*: ACJ01032.1; *Sinorhizobium meliloti*: AAK65107.1.

Minimal concentrations of ammonium repress nitrogenase activity. *P. riograndensis* exhibits nitrogenase activity below standard levels when no fixed nitrogen (as ammonium acetate) is added to the medium or when it is added at concentrations up to 1 mM. It is possible that, at these extremely low ammonium concentrations, nitrogen availability is limiting even to the enzyme synthesis itself. Nitrogenase activity reaches a maximum at 2 mM ammonium and then begins to decline, reaching zero at approximately 5 mM ammonium (Fig. 3). Concentrations above 5 mM produced similar values (data not shown).

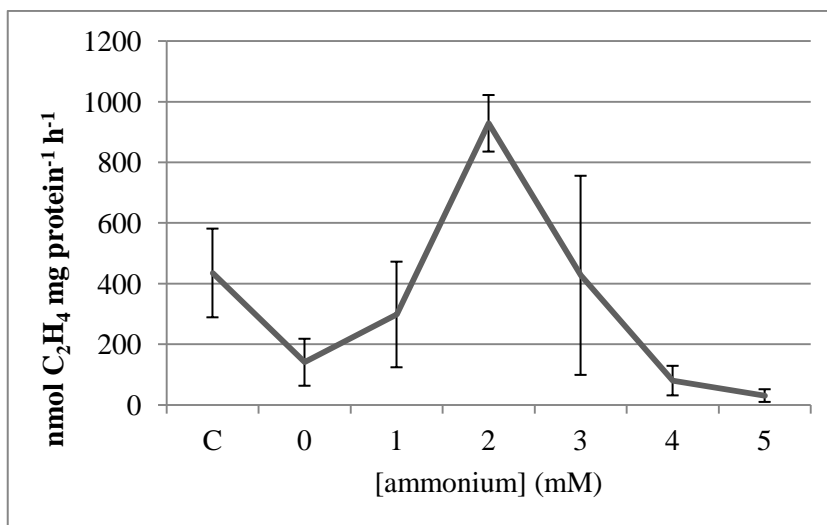


Figure 3. Nitrogenase activity is modulated by the concentration of available nitrogen. Nitrogenase activity, detected via ethylene (C₂H₂) production, in response to the addition of fixed nitrogen (ammonium acetate). C: Standard TBNR medium. 0: Modified TBNR medium, depleted of its nitrogen source, yeast extract. 1 to 5: Final concentration (mM) of added ammonium acetate to modified TBNR medium.

***Paenibacillus riograndensis* fixes nitrogen under molybdenum-depletion conditions.**

When the nitrogenase activity of SBR5 was assessed in TBNR medium that had been treated to remove the molybdenum, its high nitrogenase activity levels were maintained (Fig. 4). The opposite was observed for *A. brasilense* Sp7, in which the activity observed under standard conditions tended to zero when molybdenum was depleted, due to the absence of alternative enzymes in this bacterium (Fallik *et al.*, 1991). This result validated the existence of the alternative nitrogenase system deduced from SBR5 genome sequence.

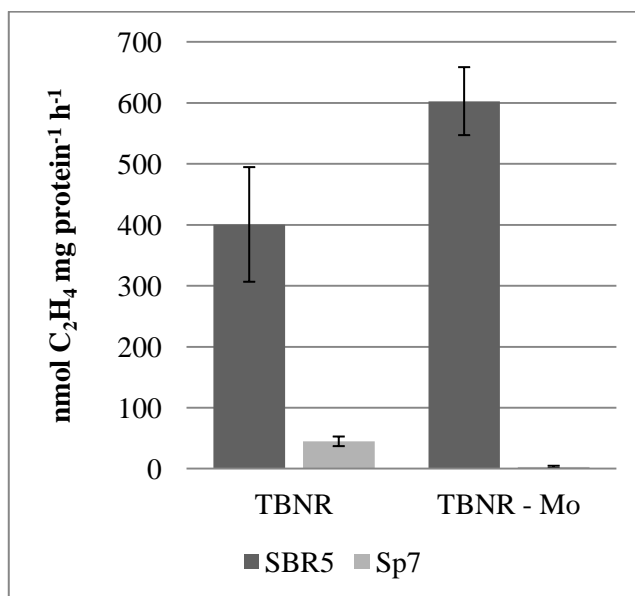


Figure 4. Alternative nitrogenase activity. Nitrogenase activity, detected via ethylene (C₂H₂) production, under standard (TBNR) and molybdenum-depleted (TBNR -Mo) conditions in *Paenibacillus riograndensis* (SBR5) and *Azospirillum brasilense* (Sp7).

***nifH1* and *anfH* are activated under nitrogen fixation conditions, while *nifH2* is not expressed.** The *P. riograndensis* transcription profile was assessed under standard nitrogen-fixing conditions (Fig. 5). The transcription of both *nifH1* and *anfH* was activated in response to the tested condition; the transcripts of both genes were detected at higher levels under nitrogen-fixing conditions than under non-fixing conditions ($P < 0.05$, Student's T test). *nifH1* exhibited the greatest increase in expression, indicating that it is the main factor responsible for nitrogenase reductase synthesis. *anfH* transcription also increased, albeit weakly. The absence of *nifH2* transcription under both control and nitrogen-fixing conditions indicated that this gene could be inactive.

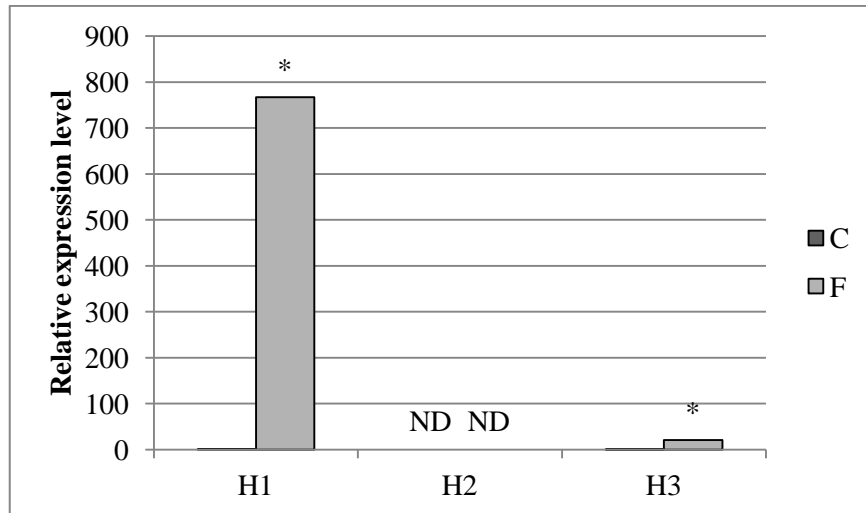


Figure 5. *Paenibacillus riograndensis* expression profile under nitrogen fixation conditions. The relative expression levels of the *P. riograndensis nifH1* (H1), *nifH2* (H2), and *anfH* (H3) genes (normalized to 16S rRNA expression) under standard nitrogen fixation conditions (F, cultivated on TBNR medium) and control non-fixing conditions (C, cultivated on KB medium). ND: non-determined. * indicates statistically significant differences ($P < 0.05$, Student's T test) in comparison to control conditions.

***E. coli* recognizes sequences in the small putative promoter fragment.** In an effort to identify regulatory regions that could be involved in the activation of the BNF system in *P. riograndensis*, fragments of approximately 250 and 500 base pairs (bp) upstream of each of the three *nif* clusters were tested for their ability to activate a *gfp* reporter gene in a heterologous system (Fig. 6). To verify whether these promoters could also exhibit a starvation response pattern, their activity was tested in the same cultures at different times (5 and 24 h of growth). It was evident that the P2 sequences related to cluster II, which exhibited no transcription, also had no promoter activities. The P1 and P3 sequences, on the other hand, showed significant promoter activities. The P1 sequences exhibited greater activities than P3, consistent with the expression profiles. This result suggests that *E. coli* is able to recognize *P. riograndensis nif/anf* promoters.

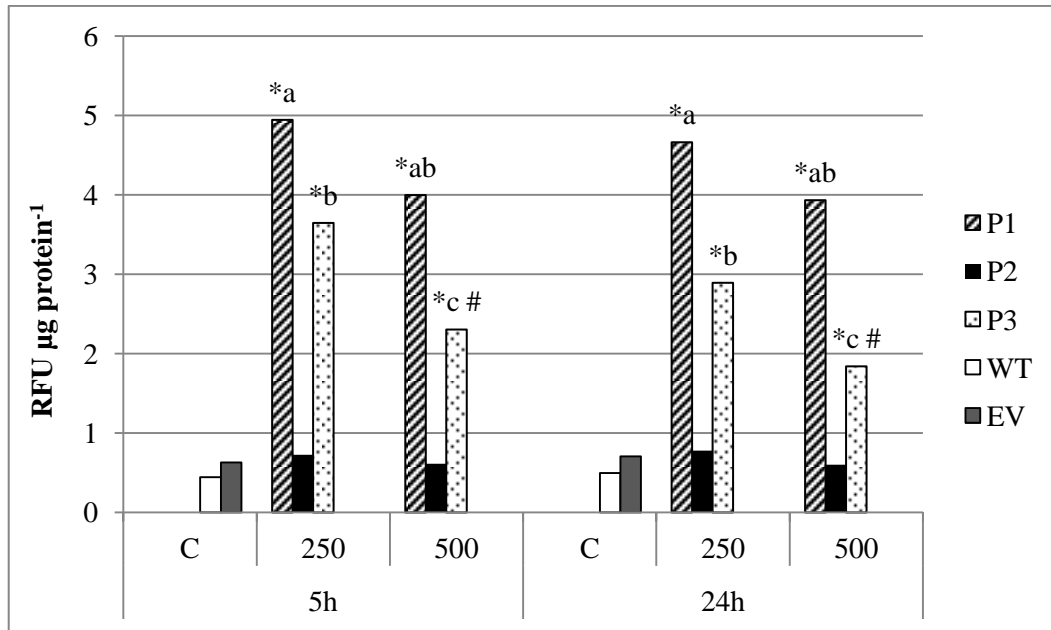


Figure 6: *Paenibacillus riograndensis nif* promoter activity in *Escherichia coli*. Relative fluorescence units (RFU) $\mu\text{g protein}^{-1}$ detected in *E. coli* DH5 α clones harboring the pPROBE-NT' plasmid, in which promoter fragments of approximately 250 and 500 bp upstream of *P. riograndensis* gene clusters I (P1), II (P2) and III (P3) were able to drive *gfp* expression, measured after 5 and 24 h of bacterial growth. Wild-type DH5 α (WT) and DH5 α harboring the empty vector (EV) were used as controls (C). * indicates statistically significant difference of each construct in comparison to both controls (one-way ANOVA, Dunnet unilateral test, $p < 0.05$), denoting active promoters. Among them, values represented by the same letter do not differ significantly at each time (two-way ANOVA, simple main effect analysis, $p < 0.05$). # indicates statistically significant difference (Student T or T' test, $p < 0.05$) related to time within the same construct.

Overall, no differences in activity were detected between cultures at 5 h (fresh cultures) and 24 h (starved cultures) of growth, indicating that the expression of *nif/anf* genes in *P. riograndensis* is likely constitutive. For the P1 promoter, there were no differences between the small (250 bp) and the large fragment (500 bp), demonstrating that the smaller fragment must contain the regulatory motifs that are required to activate Gfp expression. This was not true for P3, however; instead, we observed less activity with the larger fragment (P3.2, 500 bp). This observation suggests that the smaller fragment contains the regulatory motifs required to activate Gfp expression and that the 250 bp upstream of this region may contain a negative regulatory motif. The P3.2 fragment is also the only exception to the proposed constitutive expression profile; the gene activity under its control was reduced after 24 h of growth, indicating that the negative regulatory element in the 250-500 bp region might respond to starvation.

Discussion

The *P. riograndensis* genome contains three clusters of nitrogen fixation-related genes. The conserved organization found in genetic cluster I is similar to that of the *nif* clusters found in other Gram-positive bacteria, such as *P. massiliensis* (Hongxin *et al.*, 2006), in which *nifB1* precedes the structural *nifH1D1K1*, and in *Heliobacterium chlorum* (Enkh-Amgalan *et al.*, 2006a), although absence of the *nifI* genes, found in *H. chlorum*. One striking feature of the *P. riograndensis* nitrogen fixation system is the apparent absence of regulatory genes. The absence of the classical *nifLA* genes present in proteobacterial systems has been proposed for Gram-positive species (Chen, 2004). In some strictly anaerobic diazotrophs, a putative regulatory *nifI* gene with proposed role in nitrogenase switch-off was identified. In *H. chlorum*, the product of *orfI* was proposed to have an anti-termination transcription regulation function (Enkh-Amgalan *et al.*, 2006a; Enkh-Amgalan *et al.*, 2006b). No sequences related to these two genes were found in the *P. riograndensis* genome, suggesting the presence of a novel regulatory mechanism.

The *P. riograndensis* genome contains few *nif* genes, in contrast to other well-characterized systems with greater numbers of *nif* genes; for example, 20 *nif* genes are found in *Klebsiella pneumoniae* (Arnold *et al.*, 1988) genome, and 15 *nif* genes are found in *Azotobacter vinelandii* genome (Jacobson *et al.*, 1989). Thus, it is likely that the compact set of *nif* genes (eight) found in *P. riograndensis* is sufficient for this bacterium to perform nitrogen fixation, making additional genes non-essential or even unnecessary.

With respect to the phylogenetic analysis, other authors have postulated one coherent cluster comprising NifH sequences from *Paenibacillus* spp. (Xie *et al.*, 2012), and NifH1 from *P. riograndensis* is positioned within this cluster. Replicated sequences found in the genomes of other *Paenibacillus* species were also grouped in this cluster and were proposed to have arisen from duplication events within these genomes (Choo *et al.*, 2003). The vertical inheritance of these sequences is supported by the coherence of this cluster relative to the 16S rDNA phylogeny (Beneduzi *et al.*, 2012). Replicated sequences in *Clostridium pasteurianum* are indeed considered have arisen from duplication events (Wang *et al.*, 1988). *P. riograndensis* NifH2 was grouped in a separate branch along with the only one other sequence from the genus, NifH3 from *P. durus*. Choo *et al.* (2003) reported the divergence of this sequence and speculated that *P. durus* NifH3 could even have an unrelated function, belonging to a group of genes involved in bacteriochlorophyll

synthesis. However, *P. durus nif* genes were not investigated at transcriptional level, and there are no data describing their functionality (Choo *et al.*, 2003). The transcriptional analysis in the present work demonstrated that *P. riograndensis nifH2* is not expressed, indicating that this gene may have lost its activity. Moreover, given their position at the base of the phylogenetic tree, *P. riograndensis NifH2* and *P. durus NifH3* may also be the remnants of an ancestral nitrogenase, proposed to be a general detoxase that existed before the specialization to molecular nitrogen reduction (Fani *et al.*, 2000). In contrast, *P. riograndensis nifH1*, which was shown to be transcribed, grouped with sequences that have been functionally validated, such as the three *P. sabiniae nifH* sequences, the transcription of which has been detected, and all of which were able to complement a *K. pneumoniae Nif* mutant (Hong *et al.*, 2012). The promoters of these sequences are also recognized by *E. coli* (Hong *et al.*, 2012), as was observed for the *P. riograndensis* P1 and P3 regulatory regions.

The third sequence, *AnfH*, is one of the structural components of the alternative iron-only nitrogenase system. *AnfH* grouped with the sequences of other well-documented alternative nitrogenases. Transcripts of the *P. riograndensis anfH* gene were detected, and its activity was validated under molybdenum depletion conditions. The presence of an alternative system in the genus *Paenibacillus* has been proposed previously but is controversial. Rosado *et al.* (1998) showed that multiple copies of the *nifH* gene are present in the *P. durus* genome and proposed that the proteins of three *Paenibacillus* strains, *P. azotofixans* P3E20 and RBN4 and *P. durus* DSMZ1735, formed a cluster with the alternative (*anf*) nitrogenases. However, a deeper analysis of the sequences in *P. durus* ATCC 35681 showed that they all belong to the *nif* system and that no *anf* sequences were found (Choo *et al.*, 2003). Therefore, the present work is the first to date to report an alternative nitrogenase system in the *Paenibacillus* genus, supported by both sequence analysis and enzymatic activity data.

Evaluating the response to NH_4Cl in various species of *Paenibacillus*, Xie *et al.* (2012) reported maximum levels of nitrogenase activity at very low concentrations, up to 0.1 mM. We did not test *P. riograndensis* activity at this very low condition because it did not exhibit nitrogenase activity in the presence of 1 mM fixed nitrogen. In contrast, the nitrogen fixation in *P. durus* is not as sensitive to available nitrogen, and its gene transcripts were detected at concentrations as high as 60 mM ammonium acetate (Teixeira

et al., 2008). The inhibition of nitrogenase activity by ammonium depends on several factors, such as the dissolved oxygen concentration, pH, and respiratory rate, which could explain these disparities (Klugkist & Haaker, 1984). An analysis of the *nif* cluster promoter in *P. massiliensis* revealed weak modulation by ammonium and strong inhibition by molecular oxygen, with substantial activity levels even under high ammonium conditions (Hongxin *et al.*, 2006). If *P. massiliensis* has another regulatory mechanism in response to fixed nitrogen, because enzymatic activity was not determined under these conditions, it must be post-transcriptional, such as the ADP-ribosylation that has been described for a few other organisms (Zhang *et al.*, 1993; Masepohl *et al.*, 2002), but this has not yet been investigated in this genus. This variability reveals a disparity in the sensing and regulatory mechanisms related to the BNF process among even closely related species. The molecular mechanisms that are responsible for repression by ammonium in *P. riograndensis* are yet to be determined.

The activation of both *P. riograndensis nifH1* and *anfH* under nitrogen fixing conditions indicated that they may share a common activation mechanism, with an additional molybdenum responsive element (to be described) present to down-regulate the *anf* genes. It is expected that alternative systems must be repressed when molybdenum is available (Pau *et al.*, 1989; Kutsche *et al.*, 1996), but *anfH* transcripts were still detected when molybdenum was present, although at a low level compared to *nifH1* under standard BNF conditions. This molybdenum responsive element may in fact be located beyond the 250 bp upstream of *P. riograndensis* cluster III because the transcriptional analysis of the P3.2 (500 bp) fragment suggested the presence of a repressive element in this region.

The apparent constitutive expression pattern proposed for the P1 and P3 promoters has already been proposed in other Gram-positive diazotrophs, with σ^{70} -10 and -35 consensus sequences characterized in *Clostridium* sp. and *Heliobacterium chlorum* (Wang *et al.*, 1988; Enkh-Amgalan *et al.*, 2006b). Neither of these two consensus sequences was identified in the *P. riograndensis* P1 and P3 promoter sequences, which suggests that the regulatory regions of the *P. riograndensis* genes involved in the nitrogen fixation process could be recognized by another σ factor. Thus, this bacterium must possess some negative regulatory mechanism beyond transcription initiation and distinct from the known mechanisms already described; this should be investigated further. A deeper analysis of these regulatory sequences in the homologous system will provide a better understanding

of the BNF in *P. riograndensis* and could reveal additional novel and interesting regulatory mechanisms.

Acknowledgements

This work was financed by a grant and fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) da Fixação Biológica do Nitrogênio (Brazil), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors thank personally to Caroline Cabreira, Lauro Neto and Rafael Rauber.

References

- Beneduzi, A., Campos, S., Ambrosini, A., Souza, R. De, Granada, C., Costa, P., Arruda, L., Moreira, F., Vargas, L. K. & other authors. (2011).** Genome Sequence of the Diazotrophic Gram-Positive Rhizobacterium *Paenibacillus riograndensis* SBR5^T. *Journal Bact* **193**, 6391–6392.
- Beneduzi, A., Costa, P. B., Parma, M., Melo, I. S., Bodanese-Zanettini, M. H., Passaglia, L. M. P. (2010)** *Paenibacillus riograndensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Triticum aestivum*. *Int J Syst Evol Micr* **60**, 128-133.
- Beneduzi, A., Peres, D., Costa, P. B., Bodanese-Zanettini, M. H., Passaglia, L. M. P. (2008)** Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil. *Res in Microbiology* **159**, 244-250.
- Bishop, P. E. & Joerger, R. D. (1990).** Genetics and molecular biology of alternative nitrogen fixation systems. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **41**, 109–125.
- Boddey, R. M. (1987).** Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. *Crit Rev Plant Sci* **6**, 209–266
- Bradford, M. M. (1976).** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **254**, 248–254.
- Chen, J. S. (2004)** Nitrogen fixation in the clostridia. In: *Genetics and regulation of nitrogen fixation in free-living bacteria*, pp.53-64. Edited by W. Klipp, B. Masepohl, J. R. Gallon and W. E. Newton, Kluwer Academic Publishers.
- Choo, Q., Samian, M. & Najimudin, N. (2003).** Phylogeny and Characterization of Three *nifH*-Homologous Genes from *Paenibacillus azotofixans*. *Appl Environ Microb* **69**, 3658–3662.

- Dixon, R. & Kahn, D. (2004).** Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *Nat Rev Microbiol* **2**, 621–631.
- Eady, R. R. (1996).** Structure - Function Relationships of Alternative Nitrogenases. *Chem Rev* **96**, 3013–3030.
- Enkh-Amgalan, J., Kawasaki, H. & Seki, T. (2006a).** Molecular evolution of the *nif* gene cluster carrying *nifH* and *nifD* genes in the Gram-positive phototrophic bacterium *Heliobacterium chlorum*. *Int J Syst Evol Micr* **56**, 65–74.
- Enkh-Amgalan, J., Kawasaki, H., Oh-oka, H. & Seki, T. (2006b).** Cloning and characterization of a novel gene involved in nitrogen fixation in *Heliobacterium chlorum*: a possible regulatory gene. *Arch Microbiol* **186**, 327–337.
- Fallik, E., Chan, Y. & Robert, L. (1991).** Detection of Alternative Nitrogenases in Aerobic Gram-Negative Nitrogen-Fixing Bacteria. *J Bacteriol* **173**, 365–371.
- Fani, R., Gallo, R. & Lio, P. (2000).** Molecular Evolution of Nitrogen Fixation: The Evolutionary History of the *nifD*, *nifK*, *nifE*, and *nifN* Genes. *J Mol Evol* **51**, 1–11.
- Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., Asner, G. P., Cleveland, C. C., Green, P. A. & other authors. (2004).** Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* **70**, 153–226.
- Glickmann, E. & Dessaux, Y. (1995).** A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **61**, 793–796.
- Hong, Y., Ma, Y., Wu, L., Maki, M., Qin, W. & Chen, S. (2012).** Characterization and analysis of *nifH* genes from *Paenibacillus sabiniae* T27. *Microbiol Res* **167**, 596–601. Elsevier GmbH.
- Hongxin, Z., Baoen, X. I. E. & Sanfeng, C. (2006).** Cloning and sequencing of *nifBHDKENX* genes of *Paenibacillus massiliensis* T7 and its *nif* promoter analysis. *Science in China* **49**, 115-122.
- Howard, J. B. & Rees, D. C. (1996).** Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation. *Chem Rev* **96**, 2965–2982.
- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. (2001).** MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**, 754–755.
- Jacobson, M. R., Brigle, K. E., Bennett, L. T., Setterquist, R. A., Wilson, M. S., Cash, V. L., Beynon, J. I. M., Newton, W. E. & Dean, D. R. (1989).** Physical and Genetic Map of the Major *nif* Gene Cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **171**, 1017–1027.

- Joerger, R. D., Jacobson, M. R., Premakumar, R., Wolfinger, E. D. & Bishop, P. E. (1989).** Nucleotide sequence and mutational analysis of the structural genes (*anfHDGK*) for the second alternative nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **171**, 1075–86.
- Klugkist, J. & Haaker, H. (1984).** Inhibition of Nitrogenase Activity by Ammonium Chloride in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **157**, 148–151.
- Kutsche, M., Leimkuhler, S., Angermuller, S. & Klipp, W. (2010).** Promoters Controlling Expression of the Alternative Nitrogenase and the Molybdenum Uptake System in *Rhodobacter capsulatus* are Activated by NtrC, Independent of σ^{54} , and Repressed by Molybdenum. *J Bacteriol* **178**, 2010–2017.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402–408.
- Masepohl, B., Drepper, T., Paschen, A., Groß, S., Pawlowski, A., Raabe, K., Riedel, K. & Klipp, W. (2002).** Regulation of Nitrogen Fixation in the Phototrophic Purple Bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 243–248.
- Miller, W. G., Leveau, J. H. J., Lindow, S. E., Biology, M. & Hall, K. (2000).** Improved *gfp* and *inaZ* Broad-Host-Range Promoter-Probe Vectors. *MPMI* **13**, 1243–1250.
- Pau, R. N., Mitchenall, L. A. & Robson, R. L. (1989).** Genetic Evidence for an *Azotobacter vinelandii* Nitrogenase Lacking Molybdenum and Vanadium. *J Bacteriol* **171**, 124–129.
- Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R. & Blankenship, R. E. (2004).** The natural history of nitrogen fixation. *Mol Biol Evol* **21**, 541–54.
- Rees, D. C. & Howard, J. B. (2000).** Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 559–566.
- Robson, R. L., Woodley, P. R., Pau, R. N. & Eady, R. R. (1989).** Structural genes for the vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum*. *The EMBO Journal* **8**, 1217–1224.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. (2003).** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572–1574.
- Rosado, A. S., Duarte, G. F. & Seldin, L. (1998).** Genetic Diversity of *nifH* Gene Sequences in *Paenibacillus azotofixans* Strains and Soil Samples Analyzed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments. *Appl Environ Microb* **64**, 2770–2779.
- Schneider, K., Muller, A., Johannes, K.-U., Diemann, E. & Kottmann, J. (1991).** Selective Removal of Molybdenum Traces from Growth Media of N_2 -Fixing Bacteria. *Anal Biochem* **193**, 292–298.

- Schneider, K., Muller, A., Schramm, U. & Klipp, W. (1991).** Demonstration of a molybdenum- and vanadium-independent nitrogenase in a *nifHDK*-deletion mutant of *Rhodobacter capsulatus*. *Eur J Biochem* **195**, 653–661.
- Seldin, L., Elsas, J. D. V. A. N. & Penido, E. G. C. (1983).** Bacillus nitrogen fixers from Brazilian soils. *Plant Soil* **255**, 243–255.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011).** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731–2739.
- Teixeira, R. L. F., Weid, I. Von Der, Seldin, L. & Rosado, A. S. (2008).** Differential expression of *nifH* and *anfH* genes in *Paenibacillus durus* analysed by reverse transcriptase-PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Lett Appl Microbiol* **46**, 344–349.
- Wang, S., Chen, J. & Johnson, J. L. (1988).** The presence of five *nifH*-like sequences in *Clostridium pasteurianum*: sequence divergence and transcription properties. *Nucleic Acids Res* **16**, 439–454.
- Zhang, Y., Burris, R. H., Ludden, P. W. & Roberts, G. P. (1993).** Posttranslational Regulation of Nitrogenase Activity by Anaerobiosis and Ammonium in *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol* **175**, 6781–6788.
- Zhao, Y., Bian, S., Zhou, H. & Huang, J. (2006).** Diversity of Nitrogenase Systems in Diazotrophs. *J Integr Plant Biol* **48**, 745–755.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Componentes estruturais bem conservados estão imersos nos mais distintos sistemas regulatórios, abrangendo a ampla diversidade dentre os organismos diazotróficos. O sistema de fixação do nitrogênio em *P. riograndensis* revelou, além do sistema genético convencional, codificado pelos genes *nif*, um sistema de nitrogenase alternativo composto pelos genes estruturais *anf*, que codificam a nitrogenase baseada apenas em ferro. Transcritos de ambos os sistemas foram detectados e o sistema alternativo também foi validado pela atividade enzimática. Os mecanismos regulatórios subjacentes a esses sistemas, entretanto, permanecem obscuros. Os motivos característicos regulatórios identificados em outros diazotróficos estudados não foram encontrados na sequência dos promotores dos agrupamentos genéticos aqui identificados. Os fragmentos analisados foram reconhecidos por *E. coli*, de acordo com a identificação dos transcritos em *P. riograndensis*, o que indica que foram reconhecidos de fato os promotores responsáveis pela fixação de *P. riograndensis*, com um padrão de expressão aparentemente constitutivo. Os mecanismos moleculares específicos em princípio necessários para regular então negativamente os sistemas não são conhecidos.

A análise dos fragmentos que contêm os promotores *in vivo* no próprio modelo de estudo será importante para investigar esses mecanismos. Infelizmente, por se tratar de uma espécie recém-descrita, os protocolos de manipulação não estão bem estabelecidos. Bactérias Gram-positivas formadoras de esporos são consideradas mais resistentes à transformação, e espécies do gênero *Paenibacillus* são reconhecidamente difíceis de transformar (Hong et al., 2012). O protocolo otimizado de transformação por eletroporação proposto por Murray e Aronstein (2008) para *P. larvae* foi utilizado como base para a transformação de *P. riograndensis* nesse trabalho. Porém, os protocolos propostos parecem ser muito específicos de acordo com as espécies, e mesmo as tentativas de adaptação propostas até então, com alteração de meios de cultura, soluções e intensidade do pulso elétrico aplicado, não foram suficientes para obter sucesso na transformação. Apesar das dificuldades relatadas e da extrema especificidade das condições necessárias, há relatos de sucesso na literatura de transformação de espécies do gênero *Paenibacillus* e do gênero relacionado *Bacillus* (Choi et al., 2007; Poppinga e Genersch, 2011; Zhang et al., 2011), o que nos leva a acreditar que a otimização dos parâmetros para a transformação favorecerá a obtenção dos transformantes.

Obtidos tais transformantes, em concerto com novos dados de análise do perfil transcricional em resposta a condições de repressão dos sistemas (disponibilidade de amônia e depleção de molibdênio, por exemplo) será possível observar se o padrão de ativação dos genes está de acordo com o observado pelo reconhecimento em *E. coli* e detectar mecanismos regulatórios específicos. Poderemos investigar os mecanismos de resposta a amônia e a molibdênio, se agem na ativação dos promotores ou são mecanismos após o início da transcrição, ou mesmo mecanismos pós-traducionais.

Uma outra abordagem será aquela relacionada à identificação das regiões importantes na ativação da transcrição. Isso poderá ser realizado através de mutagênese sítio dirigida, a fim de identificarmos quais os nucleotídeos são importantes para a ligação de uma suposta proteína ativadora e, mais futuramente, a identificação dessa proteína por ensaios de retardamento em gel e duplo híbrido. Como pode ser notado, esse trabalho é apenas o início de uma ampla linha de investigação destinada a desvendar os mecanismos reguladores do processo de FBN em *P. riograndensis*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnold W, Rump A, Klipp W, Priefer UB and Pühler A (1988) Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Molecular Biology* 203: 715–738.
- Beneduzi A, Campos S, Ambrosini A, Souza R de, Granada C, Costa P, Arruda L, et al. (2011) Genome Sequence of the Diazotrophic Gram-Positive Rhizobacterium *Paenibacillus riograndensis* SBR5^T. *J Bacteriol* 193(22): 6391–6392.
- Beneduzi A, Costa PB, Parma M, Melo IS, Bodanese-Zanettini MH, and Passaglia LMP (2010) *Paenibacillus riograndensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Triticum aestivum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 128–133.
- Bishop PE and Joerger RD (1990) Genetics and molecular biology of alternative nitrogen fixation systems. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 41:109–125.
- Bishop PE, Hawkinst ME, and Eady RR (1986) Nitrogen fixation in molybdenum-deficient continuous culture by strain of *Azotobacter vinelandii* carrying a deletion of the structural genes for nitrogenase (*nifHDK*). *Biochem J* 238: 437–442.
- Bishop PE, Jarlenskit DML, and Hetherington DR (1980) Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *PNAS* 77(12):7342–7346.
- Bottomley PJ and Myrold DD (1996) Biological N Inputs. In: Paul EA and Clark FE (eds) *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London, p. 365-386.
- Chen JS (2004) Nitrogen fixation in the clostridia. In: Klipp W, Masepohl B, Gallon JR and Newton WE (eds) *Genetics and regulation of nitrogen fixation in free-living bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.53-64.
- Chisnell JR, Premakumar R, and Bishop PE (1988) Purification of a Second Alternative Nitrogenase from a *nifHDK* Deletion Strain of *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 170(1):27–33.
- Desnoues N, Lin M, Guo X, Ma L, Carreño-Lopez R, and Elmerich C (2003) Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. *Microbiology* 149:2251–2262.
- Dixon R (1998) The oxygen-responsive NIFL-NIFA complex: a novel two-component regulatory system controlling nitrogenase synthesis in γ -Proteobacteria. *Arch Microbiol* 169:371–380.
- Dixon R and Kahn D (2004) Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *Nature Reviews Microbiology* 2:621–631.

- Enkh-Amgalan J, Kawasaki H, and Seki T (2006a) Molecular evolution of the *nif* gene cluster carrying *nifH* and *nifD* genes in the Gram-positive phototrophic bacterium *Heliobacterium chlorum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:65–74.
- Enkh-Amgalan J, Kawasaki H, Oh-oka H, and Seki T (2006b) Cloning and characterization of a novel gene involved in nitrogen fixation in *Heliobacterium chlorum* : a possible regulatory gene. *Arch Microbiol* 186:327–337.
- Gallon JR (1992) Reconciling the incompatible : N₂ fixation and O₂. *New Phytol* 122:571–609.
- Galloway JN, Dentener FJ, Capone DG, Boyer EW, Howarth RW, Seitzinger SP, Asner GP, et al. (2004) Nitrogen cycles : past , present , and future. *Biogeochemistry* 70:153–226.
- Hageman R V and Burris RH (1978) Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. *PNAS* 75(6):2699–2702.
- Hales BJ, Case EE, Morningstar JE, Dzeda MF, and Mauterer LA (1986) Isolation of a New Vanadium-Containing Nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry* 25(23):7252–7255.
- Harriott OT, Hosted TJ and Benson DR (1995) Sequences of *nifX*, *nifW*, *nifZ*, *nifB* and two ORF in the Frankia nitrogen fixation gene cluster. *Gene* 161: 63–67.
- He L, Soupene E, and Kustu S (1997) NtrC is required for control of *Klebsiella pneumoniae* NifL activity. *J Bacteriol* 179(23):7446–7455.
- Howard JB and Rees DC (1996) Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation. *Chem Rev* 96:2965–2982.
- Jacobson MR, Brigle KE, Bennett LT, Setterquist RA, Wilson MS, Cash VL, Beynon JIM, Newton WE, and Dean DR (1989) Physical and Genetic Map of the Major *nif* Gene Cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 171(2):1017–1027.
- Joerger RD and Jacobson MR (1989) Two *nifA*-Like Genes Required for Expression of Alternative Nitrogenases by *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 171(6):3258–3267.
- Joerger RD, Jacobson MR, Premakumar R, Wolfinger ED, and Bishop PE (1989) Nucleotide sequence and mutational analysis of the structural genes (*anfHDGK*) for the second alternative nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 171(2):1075–86.
- Kasap M and Chen J (2005) *Clostridium pasteurianum* W5 synthesizes two NifH-related polypeptides under nitrogen-fixing conditions. *Microbiology* 151:2353–2362.
- Kutsche M, Leimkühler S, Angermüller S, and Klipp W (2010) Promoters controlling expression of the alternative nitrogenase and the molybdenum uptake system in

- Rhodobacter capsulatus* are activated by NtrC, independent of sigma54 , and repressed by molybdenum. J Bacteriol 178(7):2010–2017.
- Lie TJ and Leigh JA (2003) A novel repressor of *nif* and *glnA* expression in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. Mol Microbiol 47(1):235–246.
- Lie TJ, Wood GE, and Leigh JA (2005) Regulation of *nif* Expression in *Methanococcus maripaludis*. J Biol Chem 280(7):5236–5241.
- Lu Y, Zhang C, Lv FX, Bie XM, and Lu Z (2012) Study on the electro-transformation conditions of improving transformation efficiency for *Bacillus subtilis*. Lett Appl Microbiol 55:9–14.
- Masepohl B, Drepper T, Paschen A, Groß S, Pawlowski A, Raabe K, Riedel K, and Klipp W (2002) Regulation of Nitrogen Fixation in the Phototrophic Purple Bacterium *Rhodobacter capsulatus*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 4(3):243–248.
- Masepohl MB and Klipp W (1996) Organization and regulation of genes encoding the molybdenum nitrogenase and the alternative nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. Arch Microbiol 165:80–90.
- Merrick MJ and Edwards RA (1995) Nitrogen control in bacteria. Microbiol Rev 59(4):604–622.
- Morett E and Buck M (1988) NifA-dependent in vivo protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a protein binding site. PNAS 85:9401–9405.
- Morett E and Buck M (1989) In vivo studies on the interaction of RNA polymerase- σ 54 with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* *nifH* promoters: the role of NifA in the formation of an open promoter complex. Journal of Molecular Biology 210: 65-77.
- Murray KD and Aronstein KA (2008) Transformation of the Gram-positive honey bee pathogen, *Paenibacillus larvae*, by electroporation. J Microbiol Meth 75: 325-328.
- Pau RN, Mitchenall LA, and Robson RL (1989) Genetic Evidence for an *Azotobacter vinelandii* Nitrogenase Lacking Molybdenum and Vanadium. J Bacteriol 171(1):124–129.
- Poppinga L and Genersch E (2011) Heterologous expression of green fluorescent protein in *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood of honey bees. J Appl Microbiol 120:430–435.
- Premakumar R, Pau RN, Mitchenall LA, Easo M, and Bishop PE (1998) Regulation of the transcriptional activators AnfA and VnfA by metals and ammonium in *Azotobacter vinelandii*. FEMS Microbiol Lett 164:63–68.

- Raymond J, Siefert JL, Staples CR, and Blankenship RE (2004) The natural history of nitrogen fixation. *Mol Biol Evol* 21(3):541–54.
- Rees DC and Howard JB (2000) Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr Opin Chem Biol* 4:559–566.
- Rejesus RM and Hornbaker RH (1999) Economic and environmental evaluation of alternative pollution-reducing nitrogen management practices in central Illinois. *Agric. Ecosyst. Environ.* 75:41–53.
- Ribbe M, Gadkari D, and Meyer O (1997). N₂ Fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* Involves a Molybdenum-Dinitrogenase and a Manganese-Superoxide Oxidoreductase That Couple N₂ Reduction to the Oxidation of Superoxide Produced from O₂ by a Molybdenum-CO Dehydrogenase. *J Biol Chem* 272(42):26627–26633.
- Robertson GP (1996) Nitrogen Transformations. In: Paul EA and Clark FE (eds) *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London, p. 341-364.
- Robson RL, Eady RR, Richardson TH, Miller RW, Hawkins M, and Postgate JR (1986) The alternative nitrogenase of *Azotobacter chroococcum* is a vanadium enzyme. *Nature* 322(24):388–390.
- Robson RL, Woodley PR, Pau RN, and Eady RR (1989) Structural genes for the vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum*. *The EMBO Journal* 8(4):1217–1224.
- Seefeldt LC, Hoffman BM, and Dean DR (2009) Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase. *Annu Rev Biochem* 78:701–722.
- Vitousek PM and Howarth RW (2008) Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry* 13(2):87–115.
- Wang S, Chen J, and Johnson JL (1988) The presence of five nifH-like sequences in *Clostridium pasteurianum*: sequence divergence and transcription properties. *Nucleic Acids Res* 16(2):439–454.
- Weidenbach K, Ehlers C, Kock J, and Schmitz RA (2010) NrpRII mediates contacts between NrpRI and general transcription factors in the archaeon *Methanosarcina mazei* Go1. *FEBS J* 277:4398–4411.
- Woodley P, Buck M, Kennedy C (1996) Identification of sequences important for recognition of vnf genes by the VnfA transcriptional activator in *Azotobacter vinelandii*. *Fems Microbiol Lett* 135: 213–221.
- Yan Y, Yang J, Dou Y, Chen M, Ping S, Peng J, Lu W, et al. (2008) Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *PNAS* 105:7564–7569.