

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

Novos elementos regulatórios da fixação biológica do nitrogênio em  
*Paenibacillus riograndensis* SBR5<sup>T</sup>

GABRIELA DE CARVALHO FERNANDES

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular)

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciane Maria Pereira Passaglia

Porto Alegre, abril de 2017.

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), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), via Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) da Fixação Biológica do Nitrogênio.

“Lembrete  
Se procurar bem, você acaba  
encontrando.  
Não a explicação (duvidosa) do mundo,  
Mas a poesia (inexplicável) da vida.”

(Carlos Drummond de Andrade)

## AGRADECIMENTOS

À professora Luciane Passaglia pela oportunidade para iniciar essa trajetória, pela orientação presente e livre ao longo desses seis anos, por ser a maior fonte de motivação e eterno exemplo profissional e pessoal.

Ao professor Karl Forchhammer pela disponibilidade e parceria estabelecida para o desenvolvimento de parte da tese, pela orientação presente e empolgação singular.

À professora Cristina Paiva, minha orientadora na iniciação científica, pelos ensinamentos que me foram tão válidos ao longo do mestrado e do doutorado e pelo eterno incentivo.

À psicóloga Msc. Michelle Deluchi, que me acompanhou em grande parte da jornada, por sua dedicação e profissionalismo exemplares, de fundamental importância para a conclusão dessa tese. Por todos os anos compartilhados e pelas videoconferências na madrugada e nos fins de semana da Alemanha.

Aos amigos de Tübingen pelas aventuras e experiências compartilhadas dentro e fora da Universidade. Especialmente a Ksenia Hauf, por ser o meu anjo na chegada ao laboratório, pela atenção e pelo conhecimento compartilhado, e por todas as horas de questionamentos e discussões.

Aos companheiros do Laboratório de Genética Molecular Vegetal por todos os protocolos, células, dúvidas, aflições e realizações divididos ao longo desses anos.

Aos companheiros do Núcleo de Microbiologia Agrícola, pelo dia-a-dia mais próximo, pela rotina alegre e pela música compartilhada.

Especialmente ao Dr. Fernando Hayashi Sant'Anna por sua contribuição e dedicação fundamentais ao desenvolvimento e amadurecimento do trabalho e por toda a sua paciência, à Dra. Evelise Bach pela grande parceria no trabalho e na vida, e à eterna companheira Msc. Fernanda Moreira pela parceria e amizade desde o início.

Aos amigos quase doutores Marcos André Sales e Felipe Bezerra Ribeiro, pelos sonhos sonhados desde a graduação e pelas aventuras pelo Brasil e pelo mundo.

À minha família, que sempre aceitou e apoiou as minhas escolhas, pelo orgulho na alegria compartilhada em cada pequena conquista.



## 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* SBR5<sup>T</sup> é uma bactéria Gram-positiva diazotrófica aeróbia facultativa e formadora de esporos, interessante modelo para o estudo da regulação da FBN com o genoma completo disponível. O fator de transcrição GlnR foi proposto como regulador dos genes *nif* em *Paenibacillus* spp. a partir de análises *in silico*. O presente trabalho identificou sítios de ligação de GlnR em promotores de genes envolvido com a FBN e validou o papel de GlnR como regulador negativo dos genes *nif* em *P. riograndensis*. Também foi demonstrado que a enzima glutamina sintetase interage com GlnR quando está inibida por *feedback* e estabiliza a ligação de GlnR às regiões reguladoras dos genes *nif*. Um modelo de repressão baseado em operadores múltiplos foi proposto integrando a regulação da FBN à regulação global do nitrogênio exercida por GlnR. Na tentativa de identificar elementos específicos relacionados à regulação do molibdênio (componente do cofator enzimático) e da nitrogenase alternativa (com cofator independente de molibdênio), foi acessado o perfil transcricional de *P. riograndensis* sob condições de limitação de nitrogênio e molibdênio. Alguns fatores de transcrição especificamente induzidos sob tais condições e provavelmente relacionados à homeostase de metais foram identificados. Com relação à glutamina sintetase, além da demonstração da interação entre a enzima e o fator de transcrição GlnR, duas proteínas adicionais homólogas de glutamina sintetase e que não participam dessa regulação foram identificadas codificadas no genoma. Uma delas foi caracterizada como glutamina sintetase funcional, enquanto a outra não apresentou atividade bioquímica. Além disso, um protocolo para transformação da linhagem em estudo foi estabelecido e otimizado, o que permitirá aprofundar os estudos de genética molecular tanto da FBN como de outros processos de interesse em *P. riograndensis*.

## 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* SBR5<sup>T</sup> 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. The transcription factor GlnR has been proposed as the *nif* regulator in *Paenibacillus* spp. based on *in silico* analysis. The present work identified GlnR-binding sites at BNF-related promoters and validated GlnR role as *nif* negative regulator in *P. riograndensis*. It was also demonstrated that the feedback-inhibited glutamine synthetase enzyme interacts with GlnR and stabilizes its binding activity in the *nif* genes promoters. A multiple operator model was proposed to integrate BNF regulation and the global nitrogen regulation coordinated by GlnR. In an effort to identify specific regulatory elements related to molybdenum (enzymatic cofactor component) and the alternative nitrogenase (which presents a molybdenum-independent cofactor), the transcriptional profile of *P. riograndensis* was accessed under nitrogen and molybdenum limiting conditions. Transcription factors specifically induced under such conditions and probably related to metal homeostasis were identified. Regarding the glutamine synthetase, two additional glutamine synthetase homologs that do not take part in GlnR regulation were identified. One of them was characterized as a functional glutamine synthetase, while the other did not display biochemical activity. Also, a protocol to transform the model in study was established and optimized. This protocol allows the development of further molecular research to unveil BNF and other interesting processes in *P. riograndensis*.

## SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
1.1 Nitrogênio e Fixação Biológica do Nitrogênio .....	8
1.2 Homeostase do nitrogênio.....	9
1.3 Bioquímica da Fixação Biológica do Nitrogênio .....	14
1.4 Organização Gênica e Regulação em Diazotróficos .....	16
1.5 Diazotróficos Gram-positivos .....	21
1.6 O gênero <i>Paenibacillus</i> .....	22
1.7 <i>Paenibacillus riograndensis</i> .....	26
2 OBJETIVOS .....	29
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos Específicos.....	29
3 CAPÍTULO I - Estabelecimento de uma ferramenta para manipulação genética de <i>P. riograndensis</i> SBR5. ....	30
4 CAPÍTULO II - Validação do papel do fator de transcrição GlnR e sua interação com a GS no controle da expressão dos genes <i>nif</i> . ....	40
5 CAPÍTULO III - Perfil transcricional de <i>P. riograndensis</i> SBR5 sob privação de nitrogênio e de molibdênio.....	57
6 CAPÍTULO IV - Caracterização preliminar de dois homólogos de glutamina sintetase identificados no genoma de <i>P. riograndensis</i> . ....	70
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	87
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	90

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Nitrogênio e Fixação Biológica do 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, e as transformações entre essas formas são mediadas principalmente por micro-organismos. Entretanto, o maior reservatório de nitrogênio, o dinitrogênio, nitrogênio gasoso ou molecular ( $N_2$ ), constituinte majoritário da atmosfera terrestre, 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 em tal forma não pode ser prontamente utilizado pelos seres vivos em geral. Dessa forma, acredita-se que esse elemento seja o principal limitante da produtividade em diversos ecossistemas naturais terrestres e marinhos (Vitousek e Howarth 1991).

Atividades humanas contribuem para a disponibilização de nitrogênio reativo, destacando-se a produção e aplicação de fertilizantes químicos para melhorar a produtividade em sistemas agrícolas, o que provoca profundas alterações no ciclo desse elemento (Galloway et al. 1995; 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; Zhu e Chen 2002). Além disso, a produção de alimentos em diversas partes do mundo ainda enfrenta a limitação desse elemento, ressaltando a ineficiência da prática do uso de fertilizantes (Galloway et al. 2008).

Práticas e tecnologias de agricultura sustentável apresentam-se como alternativa para sustentar a produtividade agrícola em acordo com a sustentabilidade ambiental (Singh et al. 2011). Destaca-se, nesse contexto, a importância da microbiota do solo e o potencial para exploração de seus efeitos benéficos sobre a produtividade das lavouras, com a aplicação de bactérias promotoras do crescimento vegetal (em inglês PGPB, *Plant Growth Promoting Bacteria*) (Singh et al. 2011; Chauhan et al. 2015). Tais bactérias podem beneficiar as plantas com as quais interagem de maneira indireta, pela indução de resistência sistêmica ou competição com patógenos por nicho ou nutrientes, e de maneira

direta, estimulando o crescimento por meio da produção de fitormônios ou biofertilização, por exemplo, que consiste na disponibilização de nutrientes para a planta (Lugtenberg e Kamilova 2009).

A redução do dinitrogênio a amônia, catalisada por sistemas enzimáticos de micro-organismos, é denominada fixação biológica do nitrogênio (FBN) e desempenha papel fundamental na disponibilização de formas metabolicamente utilizáveis de nitrogênio para a biosfera (Howard e Rees 1996). Os micro-organismos fixadores de nitrogênio, também denominados diazotróficos, podem disponibilizar tal nutriente para as plantas por meio de associações benéficas. Bactérias coletivamente denominadas rizóbios estabelecem relações simbióticas íntimas com legumes, realizando a fixação do nitrogênio em nódulos especializados nas raízes, em uma interação clássica bastante estudada (Masson-Boivin et al. 2009). Além dessas relações simbióticas, ampla diversidade de diazotróficos de vida livre no solo pode disponibilizar nitrogênio para as plantas em associações menos íntimas, habitando a rizosfera (Hayat et al. 2010). A aplicação de PGPB diazotróficas como bioinoculantes reduz a necessidade de aplicação de fertilizantes químicos, além de outros benefícios, como redução da perda de nitrogênio por lixiviação, redução na emissão de gases de efeito estufa e redução dos custos, com incremento da produção (Kennedy et al. 2004).

## **1.2 Homeostase do nitrogênio**

Como já mencionado, a disponibilidade de nitrogênio é limitante, de forma que a capacidade de utilizar o nitrogênio gasoso representa grande vantagem na competição entre os micro-organismos habitantes do solo. O  $N_2$ , entretanto, não é a fonte preferencial, pois representa elevado investimento energético, sendo preterido diante de outras fontes disponíveis de nitrogênio reativo (Dixon e Kahn 2004).

Resíduos de plantas e micro-organismos representam a principal fonte de matéria orgânica no solo, de forma que proteínas, quitina e peptidoglicano são as fontes de nitrogênio mais abundantes, enquanto formas minerais já representam menor proporção do elemento disponível (Kögel-Knabner 2002). Os micro-organismos apresentam seu repertório de enzimas e transportadores para utilizar essas diferentes fontes, e a capacidade

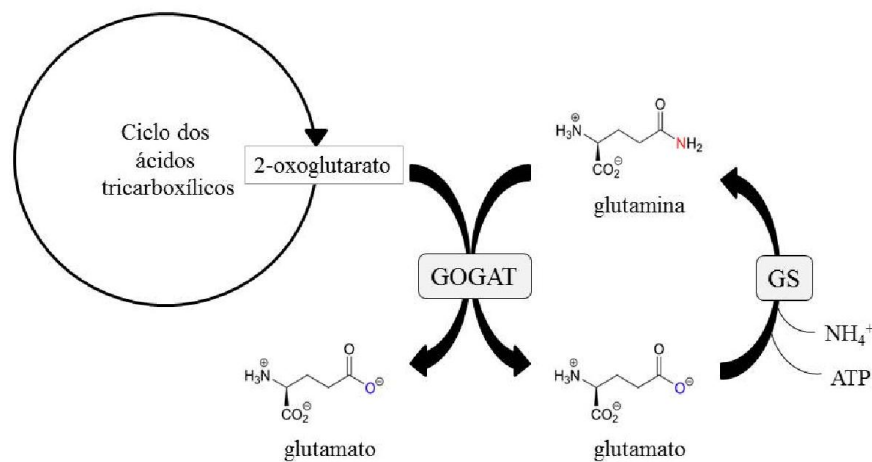
de regular tais sistemas de acordo com a sua preferência e disponibilidade também representa uma vantagem competitiva (Geisseler et al. 2010).

O íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) é considerado a fonte preferencial de nitrogênio para bactérias e fungos, em adição aos aminoácidos glutamato e glutamina (Merrick e Edwards 1995; Marzluf 1997). Tais aminoácidos são os doadores de N (como grupamento amina) nas reações anabólicas, sendo o glutamato provedor de 80 - 88% do nitrogênio incorporado em biomassa (Gunka e Commichau 2012). Demais fontes inorgânicas, como nitrato e nitrito, têm transportadores específicos e são reduzidas a amônio para posterior assimilação. Com relação às fontes orgânicas, é necessária a degradação de polímeros orgânicos complexos por enzimas extracelulares, como proteases, quitinases e peptidoglicano-hidrolases. As subunidades liberadas podem ser mineralizadas a amônio para posterior transporte e assimilação, como no caso da hidrólise da ureia e oxidação de aminoácidos, com consequente liberação de amônio, ou podem ser prontamente transportadas para utilização direta. Tais vias de utilização do nitrogênio no solo, assim como a diversidade de fontes de nitrogênio, foram revisadas por Geisseler et al. (2010). Mecanismos de controle da expressão gênica reprimem genes para utilização de fontes alternativas quando as fontes preferenciais estão disponíveis, em sistemas gerais de regulação do nitrogênio (Magasanik 1993).

Em última instância, é produzido ou liberado amônio, cuja assimilação se dá por meio de duas vias bioquímicas. No ciclo glutamina-sintetase/glutamato-sintase (GS/GOGAT, representado na Figura 1), amônio é incorporado a glutamato gerando glutamina pela atividade ATP-dependente da enzima glutamina sintetase (GS). A glutamina, por sua vez, é utilizada junto a uma molécula de 2-oxoglutarato para a síntese de duas moléculas de glutamato pela glutamato sintase (GOGAT, glutamina:2-oxoglutarato-aminotransferase) (Leigh e Dodsworth 2007). Alternativamente, o amônio pode ser assimilado de maneira direta como glutamato a partir do 2-oxoglutarato pela enzima NADPH<sub>2</sub>-dependente glutamato-desidrogenase (GDH). Apesar dessa via ser independente de ATP, portanto vantajosa sob limitação energética, a GDH apresenta baixa afinidade por amônio, de forma que o ciclo GS/GOGAT é reconhecido como a principal via assimilatória (Gunka e Commichau 2012).

Em ambas as vias, o esqueleto carbônico utilizado (2-oxoglutarato) é proveniente do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (Figura 1), de forma que tal ponto representa uma

importante conexão entre o metabolismo do carbono e o do nitrogênio (Huergo e Dixon 2015). Em relação à sinalização intracelular, o acúmulo de 2-oxoglutarato (2OG) geralmente indica deficiência de nitrogênio, enquanto o acúmulo de glutamina (Gln) indica excesso de nitrogênio (Leigh e Dodsworth 2007; Huergo e Dixon 2015). Acredita-se que os níveis de glutamato, o principal doador de grupamento amina, são mantidos altos e constantes (Leigh e Dodsworth 2007; Bennett et al. 2009), de forma que os demais compostos integram vias de sensoriamento e resposta da homeostase do nitrogênio. Nesse contexto, a GS é um ponto-chave de regulação.

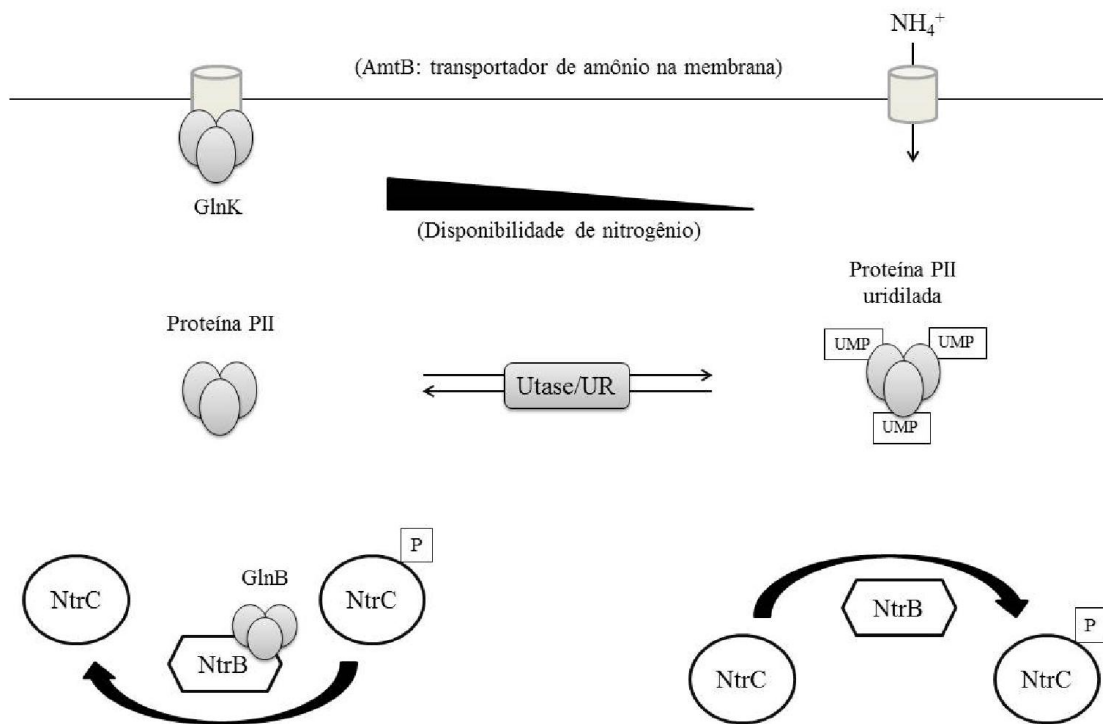


**Figura 1** - Representação do ciclo GS/GOGAT (glutamina-sintetase/glutamato-sintase) de assimilação de amônio e sua conexão com o metabolismo do carbono por meio do 2-oxoglutarato, intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Adaptado a partir de Gunka e Commichau 2012.

Uma série de estudos caracterizou a regulação da GS em *Escherichia coli*, que envolve modulação por *feedback* negativo e modificação covalente. Tal enzima é composta por doze subunidades, organizadas como dois anéis hexaméricos superpostos, e depende de  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Mn}^{2+}$  para sua atividade (Meek e Villafranca 1980; Almassy et al. 1986). Tal atividade está sujeita à inibição parcial por *feedback* por ao menos sete produtos finais do metabolismo da glutamina, que, em combinação, podem inibir quase completamente a atividade enzimática, com efeito cumulativo (Woolfolk e Stadtman 1964). A susceptibilidade da enzima ao *feedback* é modulada por adenililação de um resíduo de

tirosina por uma adenilil-transferase (ATase) específica, e maior proporção de subunidades modificadas resulta em maior inibição cumulativa (Kingdon et al. 1967; Shapiro e Stadtman 1968). A atividade da ATase, por sua vez, é regulada pela proteína GlnB, membro da família de proteínas PII (Anderson e Stadtman 1971).

As proteínas PII formam uma superfamília de proteínas triméricas sinalizadoras que integram sinais do status de nitrogênio, carbono e energia ligando-se aos efetores clássicos ATP, ADP e 2OG. Elas transmitem esses sinais interagindo com diversas proteínas-alvo, integrantes de diferentes vias de assimilação do nitrogênio, de forma a modular a sua atividade (Forchhammer 2008). A GlnB de *E. coli* também sofre modificação covalente, sendo uridilada em um resíduo de tirosina por uma uridilil-transferase (UTase/UR) específica que responde aos níveis de glutamina (Figura 2), de forma que esse efetor é integrado indiretamente nas vias reguladas pela PII (Son e Rhee 1987).



**Figura 2** - Representação da modificação das proteínas PII pela uridilil-transferase (UTase/UR) em resposta à disponibilidade de nitrogênio intracelular e da modulação do transportador de amônio AmtB e do sistema de dois componentes NtrBC em *Escherichia coli*. Adaptado a partir de Dixon e Kahn 2004.



O sistema global de regulação de nitrogênio compreende ainda o sistema de dois componentes NtrBC, composto pela proteína sensora quinase/fosfatase NtrB e o fator de transcrição de resposta NtrC (Figura 2), modulados por interação com a proteína PII GlnB (Stock et al. 1989; Merrick e Edwards 1995). A versão fosforilada de NtrC ativa a transcrição de promotores dependentes do fator  $\sigma^{54}$  da RNA-polimerase (também denominado RpoN, produto do gene *rpoN*) sob limitação de nitrogênio (Reitzer e Magasanik 1985). Dentre esses, encontra-se o promotor de *glnA*, gene codificador da GS (Reitzer e Magasanik 1985). Dessa forma, as cascatas moduladas por GlnB regulam tanto a transcrição como a atividade da GS.

*E. coli* apresenta ainda uma segunda proteína PII, GlnK (Van Heeswijk et al. 1995). Tal proteína é codificada pelo gene parálogo *glnK* no operon *amtBglnK*, em uma ligação conservada com o gene codificador do transportador de amônio AmtB: ambas as proteínas interagem e transmitem o status de amônia ao sistema NtrBC (Javelle e Merrick 2005). A forma não-uridilada da PII, sob excesso de N, complexa o transportador de amônio e bloqueia sua atividade. Tal operon é induzido sob privação de N, de forma que GlnK coordena a regulação em condições de deficiência, enquanto GlnB funciona como sensor primário constitutivo (Blauwkamp e Ninfa 2002).

Embora as características desse sistema modelo de *E. coli* tenham sido observadas em Proteobacteria em geral, sistemas distintos são conhecidos em outras bactérias, e um exemplo de estudo de caso bem caracterizado é o de *Bacillus subtilis*. Nesse modelo Gram-positivo, dois fatores de transcrição da família MerR controlam a expressão gênica de acordo com a homeostase do nitrogênio (Fisher 1999). TnrA é o regulador principal e atua como repressor ou ativador de genes de diversas vias para utilização do nitrogênio sob condições de privação (Wray et al. 1996). O regulador secundário GlnR atua na repressão de um conjunto mais restrito de genes em condições de suficiência, incluindo o operon *glnRA* (Brown e Sonenshein 1996), em que o regulador é codificado junto à GS com uma ligação gênica amplamente conservada (Kormelink et al. 2012).

Trabalhos mais detalhados com as proteínas acima descritas revelaram características únicas: além da sua atividade enzimática clássica, a GS de *B. subtilis* tem propriedades regulatórias e controla a expressão gênica através da interação com os fatores de transcrição (Sonenshein 2008), sendo classificada, portanto, como “*trigger enzyme*”

(Commichau e Stülke 2008). Essa enzima, ao contrário da ortóloga de *E. coli*, não está sujeita à modificação covalente, mas é inibida por *feedback* diretamente por glutamina, além de outras moléculas, como outros aminoácidos e AMP, de forma que a enzima funciona como sensor direto da disponibilidade de nitrogênio (Fisher 1999). Em sua versão inibida por *feedback*, a GS interage com TnrA, de forma a bloquear sua ligação ao DNA (Wray et al. 2001), e com GlnR, estabilizando sua atividade (Fisher e Wray 2008).

Em mais um exemplo de regulador com características peculiares, a GlnK de *B. subtilis* parece não sofrer modificação covalente (Wray et al. 1994). O operon *amtBglnK* é expresso em limitação de nitrogênio, e o complexo AmtB-GlnK é formado sob limitação energética (sendo o ATP o principal efetor, enquanto o 2OG tem um efeito fraco), sequestrando também o fator TnrA na membrana (Detsch e Stülke 2003; Heinrich et al. 2006). TnrA ligada à membrana via interação com GlnK (no complexo ternário AmtB-GlnK-TnrA) mantém sua atividade transcricional, e esse parece ser um mecanismo de proteção contra degradação proteolítica (Kayumov et al. 2011).

### 1.3 Bioquímica da Fixação Biológica do Nitrogênio

Sujeito aos mecanismos gerais de captação de nitrogênio que controlam diferentes sistemas enzimáticos e aos transportadores para utilizar as diversas fontes disponíveis encontra-se o sistema da nitrogenase, complexo enzimático metaloproteico responsável pela redução do N<sub>2</sub> à amônia. 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 Kahn 2004; Raymond et al. 2004).

O sistema de nitrogenase mais estudado é o que contém o cofator baseado em molibdênio. Esse sistema é composto pela ferro-molibdênio-proteína (Fe-Mo-proteína, ou dinitrogenase, componente heterotetramérico  $\alpha_2\beta_2$ ), que contém o sítio ativo para redução do nitrogênio, e pela ferro-proteína (Fe-proteína, ou dinitrogenase redutase, componente homodimérico  $\gamma_2$ ) que atua como ligadora de nucleotídeo e doadora de elétrons (Rees e Howard 2000). O mecanismo de ação do complexo da 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 ATPs

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. Na estequiometria mínima 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):  $N_2 + 8H^+ + 16 ATP + 8e^- \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$ .

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<sup>-</sup> 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 (V) 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). Apesar de a escassez de molibdênio não ser uma ocorrência comum, micro-habitats depletados em molibdênio podem ser gerados pela intensa atividade de transporte de alguns micro-organismos, e nessas condições as nitrogenase alternativas representariam uma vantagem adaptativa (Betancourt et al. 2008).

É reconhecida a extrema sensibilidade dos três sistemas de FBN ao oxigênio. Preparações *in vitro* de nitrogenase são rapidamente inativadas por O<sub>2</sub>. Os micro-

organismos diazotróficos, portanto, devem conciliar a atividade desses complexos enzimáticos 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 O<sub>2</sub>, além de apresentarem outras características intrigantes, como menor requerimento energético e mesmo a dependência de O<sub>2</sub> para a fixação, compondo um sistema completamente distinto de FBN (Ribbe et al. 1997).

#### 1.4 Organização e Regulação da Expressão Gênica 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*) (Joerger 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 N<sub>2</sub>, 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 O<sub>2</sub>, de forma que a enzima não é expressa em condições desnecessárias ou desfavoráveis (Dixon e Kahn 2004).

*Klebsiella oxytoca* (previamente *K. 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  $\alpha$  da Fe-Mo-proteína); *nifK* (cadeia  $\beta$  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. oxytoca*, os 20 genes *nif* identificados encontram-se agrupados em organização bem compacta em uma região cromossômica abrangendo 24.206 pb,

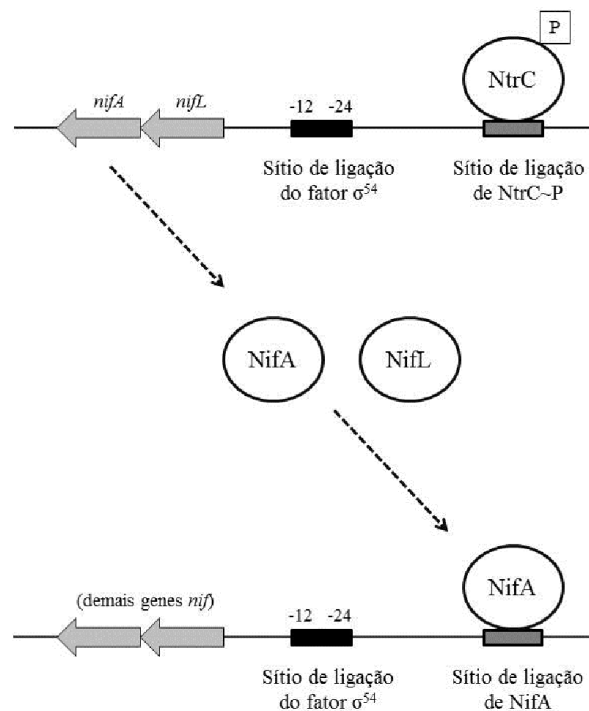
organizados em 8 operons: *nifJ*, *nifHDKTY*, *nifENX*, *nifUSVWZ*, *nifM*, *nifF*, *nifLA* e *nifBQ* (Arnold et al. 1988). Jacobson et al. (1989) relataram uma organização bastante semelhante em *Azotobacter vinelandii*, diazotrófico aeróbico obrigatório, com a diferença de apresentar potenciais genes adicionais, com funções ainda não caracterizadas. 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 et al. (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 *vnfDGK*, 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. 2010). 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 consensuais 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, em que os elementos específicos da regulação da FBN integram-se aos sistemas globais da homeostase do nitrogênio (Figura 3). Genes *nif* de Proteobacteria estão sujeitos à ativação transcricional pelo regulador central NifA (produto do gene *nifA*), que atua junto ao fator  $\sigma^{54}$  da RNA-polimerase (Dixon e Kahn 2004). O fator  $\sigma^{54}$  reconhece sequências promotoras não-usuais, com sequências consensuais localizadas próximas às posições -12/-24 em relação ao sítio de início da transcrição, e depende de EBPs (*enhancer binding proteins*, família em que está classificada NifA) ligadas a UAS (*upstream activating sequences*, localizadas usualmente de -80 a -100) para a formação do complexo aberto e transcionalmente ativo (Morett e Buck 1988). A expressão de *nifA* em geral está sob o controle do sistema NtrBC (Figura 3), um sistema de dois componentes de controle em resposta ao status global de nitrogênio da célula previamente descrito, de forma que a expressão de *nifA* é indiretamente modulada por proteínas PII (Merrick e Edwards 1995; Dixon e Kahn 2004).

Em Proteobacteria em geral, NifA sensoria diretamente os níveis de O<sub>2</sub>, sendo 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 (Figura 3). NifL interage com NifA formando um complexo inativo em resposta a O<sub>2</sub> e nitrogênio fixado (Dixon 1998).



**Figura 3** - Representação da atuação das proteínas regulatórias NifL e NifA na expressão dos demais genes *nif* em  $\gamma$ -Proteobacteria. Os genes que codificam as proteínas Nif regulatórias estão sob controle do sistema global NtrBC. NifL atua como regulador negativo interagindo com NifA em resposta a  $O_2$  e nitrogênio fixado. NifA atua como regulador positivo, ativando a transcrição de promotores *nif* dirigidos pelo fator  $\sigma^{54}$  da RNA-polimerase. Adaptado a partir de Dixon e Kahn 2004.

Em *K. oxytoca*, a proteína PII GlnK é necessária para liberar NifA do efeito inibitório de NifL, e o estado de uridilação de GlnK parece irrelevante para essa interação (He et al. 1998; Jack et al. 1999). Outro modelo, *A. vinelandii*, apesar de apresentar os mesmos elementos centrais, apresenta apenas uma PII, a GlnK, cuja expressão no operon *glnKamtB* é independente de NtrC, assim como a expressão de *nifLA* (Meletzus et al. 1998). NifA está ativo sob limitação de nitrogênio, sensoreando diretamente o 2OG (Little et al. 2000). Esse caso, a atuação de GlnK é bem diferente, e a versão não-uridilada é necessária para promover a interação NifA-NifL, inativando NifA quando em suficiência (Rudnick et al. 2002).

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  $\sigma^{54}$  (Joerger e Jacobson 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 das enzimas envolvidas, agrupados em quatro regiões dispersas no genoma (Masepohl e Klipp 1996). O promotor dos genes que codificam a nitrogenase alternativa é ativado de maneira independente de  $\sigma^{54}$  em condições de depleção de  $N_2$  por NtrC e tem sua expressão reprimida por traços de molibdênio, situação em que é expressa a enzima convencional (Kutsche 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).

Em adição à regulação transcricional estrita, mecanismos de modificação pós-traducional para controle da atividade da nitrogenase foram encontrados em vários diazotróficos, relevantes como uma resposta rápida a alterações transitórias no ambiente. Dentre esses, o mecanismo melhor caracterizado é o de ADP-ribosilação reversível de NifH (Nordlund e Högbom 2013). Esse sistema responde tanto à disponibilidade de nitrogênio, quanto ao status energético da célula, em resposta ao escuro, em bactérias fototróficas, ou à anaerobiose, em bactérias facultativas. Duas enzimas caracterizadas sujeitas à regulação antagônica compõem esse sistema: a dinitrogenase-redutase-ADP-ribosiltransferase (DraT) e a dinitrogenase-redutase-ADP-ribosil-glicohidrolase (DraG).

Enquanto a via de resposta à depleção de energia permanece obscura, a via de resposta ao nitrogênio está relativamente bem elucidada em alguns organismos (Huergo et al. 2012). Um modelo caracterizado em detalhes é *Azospirillum brasilense*, em que DraT e DraG interagem diretamente com as proteínas PII, preferencialmente as formas não-uridiladas, da mesma maneira que as PII interagem com AmtB (Huergo et al. 2009). A formação de um complexo ternário AmtB-GlnZ(PII)-DraG explica a inativação de DraG associada à membrana após um choque de amônia (Huergo et al. 2006; Huergo et al.



2007). No modelo proposto, DraG estaria inativada nesse complexo quando em suficiência de nitrogênio, enquanto DraT seria ativada pela interação com GlnB, resultando na modificação de NifH e consequente inativação da nitrogenase.

Membros de uma família distinta de proteínas PII, NifI<sub>1</sub> e NifI<sub>2</sub>, estão envolvidos em um outro mecanismo de inativação da nitrogenase em grupos distintos de micro-organismos. Os genes que codificam essas proteínas são encontrados associados aos operons da nitrogenase em Archaea metanogênicas e em algumas bactérias anaeróbias (Sant'Anna et al. 2009), e o sistema está bem caracterizado em *Methanococcus maripaludis*. Nesse caso, a proteína PII é heteromérica, formada por subunidades de NifI<sub>1</sub> e NifI<sub>2</sub>, e interrompe o fluxo de elétrons interagindo diretamente com NifDK sob disponibilidade de amônio, enquanto a interação é desfeita pelo acúmulo de 2OG (Dodsworth e Leigh 2006; Huerger et al. 2012).

### 1.5 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, e os estudos clássicos caracterizam bactérias do gênero *Clostridium*. Apesar da conservação dos genes *nif* estruturais em *Clostridium* spp., 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 2005). A ausência de *nifA* também é relatada em *Frankia*, gênero de bactérias Gram-positivas que realizam simbiose com plantas não-leguminosas (Harriott 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 ortologia às sequências consensuais *nif* descritas para *K. oxytoca*. Ao contrário, foram identificadas sequências consenso correspondentes às regiões -10 e -35 de promotores de *E. coli* reconhecidos pelo fator  $\sigma^{70}$ , 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 consensual, 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: *nifI*<sub>1</sub>, *nifI*<sub>2</sub>, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *fdx*, *nifB* e *nifV*. Os genes *nifI* codificam as proteínas PII que estariam envolvidas com a inativação pós-traducional da enzima. De maneira intrigante, eles estão localizados antes de *nifH* nesse operon descrito (Enkh-Amgalan et al. 2006b). Uma ORF sem homólogos *nif*, localizada a montante do operon e co-transcrita com o operon *nif* 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  $\sigma^{70}$ . 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. 2006a).

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

## 1.6 O gênero *Paenibacillus*

O gênero *Paenibacillus* compreende bactérias Gram-positivas aeróbias facultativas e formadoras de esporos, anteriormente identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus* e posteriormente reclassificadas em um novo gênero (Ash et al. 1993), cuja espécie-tipo é *P. polymyxa* (Trüper 2005). Membros de tal gênero são isolados de ampla variedade de habitats, com uma diversidade que compreende atualmente cerca de 200 espécies (Grady et al. 2016). O ambiente em que essas bactérias são encontradas mais comumente é o solo,

com relatos de isolados de diferentes tipos de solo (Uetanabaro et al. 2003; Huang et al. 2016), incluindo ambientes extremos como deserto (Wang et al. 2008b) e solos sob forte influência de radiação gama na Antártica (Dsouza et al. 2014). No solo, também é frequente o isolamento de bactérias do gênero associadas à rizosfera de plantas como begônia (Jin et al. 2011b), pinheiro (Kim et al. 2009), arroz (Zhang et al. 2015), sorgo (Coelho et al. 2007), milho e trigo (Berge et al. 2002), por exemplo. Relatos de *Paenibacillus* patogênicos já são incomuns, porém uma espécie extensivamente estudada é *P. larve*, agente causador de uma infecção letal de relevância econômica em abelhas (Genersch 2010). Além disso, bactérias do gênero têm sido isoladas de seres humanos, mas, quando associadas a infecções, são apenas infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos (Grady et al. 2016).

O que chama a atenção na caracterização do gênero é o amplo potencial biotecnológico. Diversas linhagens apresentam atividade contra bactérias e fungos patogênicos humanos (Seldin et al. 1999; Lorentz et al. 2006), e antimicrobianos vêm sendo isolados e caracterizados, principalmente lipopeptídeos (Huang et al. 2014) e peptídeos, como a paenibactina (He et al. 2007) e variantes da penibacilina (Anandaraj et al. 2009). Em adição à atividade antimicrobiana, a paenilamicina produzida por *P. larvae* apresenta também atividade citotóxica (Garcia-Gonzalez et al. 2014). Além dos antibióticos, outro produto derivado de *Paenibacillus* spp. são as ciclodextrinas (Suominen et al. 2003; Vollú et al. 2008), interessantes por seu uso na indústria farmacêutica como carreadores de drogas, com ainda diversas aplicações em cosméticos e na indústria alimentícia (Del Valle 2004). Enzimas produtoras de ciclodextrinas de *P. macerans* e *P. pabuli* foram caracterizadas molecularmente e engenheiradas para aprimorar suas características de interesse industrial (Jemli et al. 2008; Han et al. 2013).

Além das enzimas acima descritas, *Paenibacillus* spp. produzem um amplo repertório de enzimas hidrolíticas, como celulasas (Wang et al. 2008a; Park et al. 2012), xilanases (Ko et al. 2010), proteases (Alvarez et al. 2006), pectinases (Ko et al. 2007), amilases e quitinases (Pason et al. 2006). Em adição aos antibióticos e enzimas, *Paenibacillus* spp. também produzem exopolissacarídeos e biossurfactantes (Liang et al. 2014; Liang e Wang 2015), e são capazes de degradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Daane et al. 2002). O surfactante isolado de *Paenibacillus dendritiformis* foi investigado para biorremediação, com capacidade para aplicação em

tratamento de solos contaminados com HPAs e remoção de óleo em condições ambientais extremas (Bezza e Chirwa 2015).

Além da produção de compostos de interesse para saúde e aplicação industrial, é necessário ressaltar a aplicabilidade do gênero para a agricultura sustentável. Apesar de não serem classicamente estudadas e empregadas em formulação de inoculantes comerciais, bactérias do gênero *Paenibacillus* têm recebido destaque como novas PGPB com grande potencial (Chauhan et al. 2015), com indicação para o desenvolvimento de formulações comerciais para aplicação no campo para promover o crescimento vegetal, controlar patógenos e até degradar os resíduos após a colheita (Weselowski et al. 2016). Além das vias metabólicas relacionadas à promoção do crescimento vegetal, a análise comparativa do genoma sequenciado de quatro isolados de *P. polymyxa* ressalta genes relevantes para interação com o hospedeiro e *fitness* ecológico (Eastman et al. 2014), ressaltando a vantagem competitiva dessas bactérias.

O repertório das enzimas hidrolíticas secretadas já mencionado contribui para o antagonismo contra organismos fitopatogênicos habitantes do solo (Dijksterhuis et al. 1999; von Der Weid et al. 2003). O controle de doenças, somado à promoção do crescimento vegetal, foi alcançado com sucesso em tomate contra *Fusarium* (Xu e Kim 2014) e em batata contra *Pectobacterium*, por exemplo (Lapidot et al. 2015). Em adição aos micro-organismos, secreções de *P. polymyxa* GBR-1 apresentaram atividade *in vitro* e *in vivo* contra o nematoide das galhas *Meloidogyne incognita* (Khan et al. 2008).

Outra classe de compostos que contribui para o antagonismo é a dos sideróforos, moléculas de baixo peso molecular quelantes de ferro de alta afinidade (Wandersman e Delepelaire 2004). Além de apresentar uma vantagem na competição por nutrientes no solo com outros micro-organismos, os sideróforos liberados por bactérias podem ser utilizados pelas plantas, disponibilizando o ferro diretamente (Lugtenberg e Kamilova 2009; Beneduzi et al. 2012). Apesar de não tão comum, há relatos de produção de sideróforos em *Paenibacillus* spp. (Wen et al. 2011; Hertlein et al. 2014), e acredita-se que os genes para a síntese desses compostos tenham sido adquiridos recentemente em algumas linhagens por transferência horizontal (Eastman et al. 2014). Outras substâncias secretadas por *Paenibacillus* spp. são hormônios vegetais, incluindo citocininas, auxinas e outros compostos indólicos (Lebuhn et al. 1997; Timmusk et al. 1999; Da Mota et al. 2008),

fitoestimuladores que contribuem para o crescimento das plantas diretamente, independente da presença de patógenos.

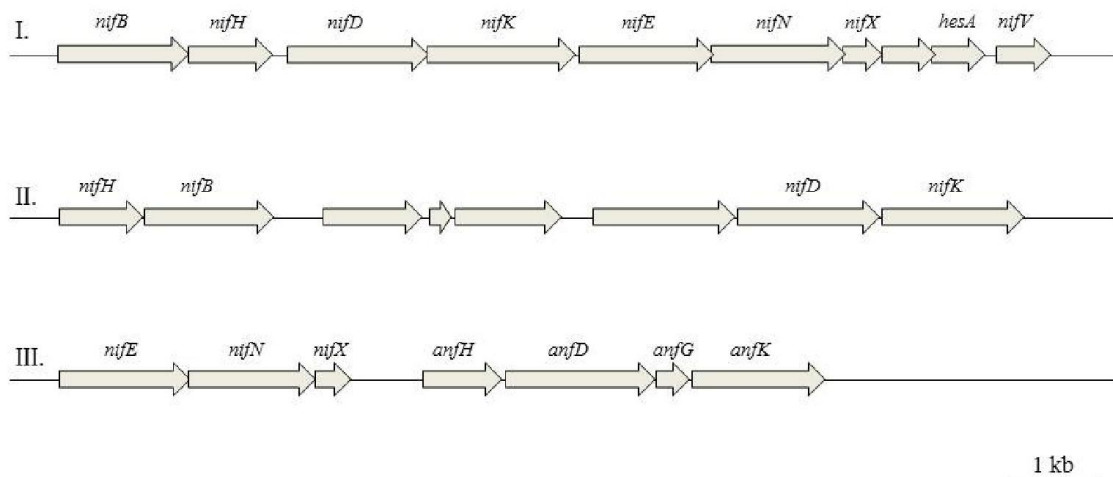
A fixação biológica do nitrogênio é uma característica frequentemente associada ao gênero *Paenibacillus* (Jin et al. 2011a; Xie et al. 2014). Os estudos iniciais mais específicos sobre a FBN neste gênero demonstraram que a atividade da nitrogenase é inibida por concentrações crescentes de amônia e O<sub>2</sub> (Xie et al. 2012). Mas os achados mais interessantes se referem à organização gênica: conjuntos de genes *nif* bem compactos, compostos por nove ou dez genes, são característicos dos diazotróficos do gênero (Xie et al. 2014). Além disso, algumas linhagens apresentam genes *nif* adicionais dispersos no genoma, e há relatos com genes *vnf* e *anf*, codificadores das nitrogenases alternativas (Choo et al. 2003; Hong et al. 2012; Xie et al. 2014). A expressão de um operon *nif* de *Paenibacillus* em *E. coli* permitiu a expressão da enzima nitrogenase e a fixação do nitrogênio por esse hospedeiro (Wang et al. 2013). As análises filogenéticas e a presença de elementos de inserção próximos a esses genes indicam fortemente que a FBN foi adquirida em eventos antigos de transferência horizontal, com eventos posteriores de aquisição dos genes *vnf* e *anf*, e ocorrências de perda que resultaram nas linhagens não-diazotróficas (Li et al. 2014; Xie et al. 2014).

Com relação à expressão gênica, promotores *nif* de *Paenibacillus sabiniae* foram reconhecidos por *E. coli*, porém tais investigações foram realizadas apenas em sistemas heterólogos, devido às dificuldades de manipulação genética de *P. sabiniae* (Hong et al. 2012). Wang et al. (2013) identificaram a sequência consensual para  $\sigma^{70}$  no promotor *nif* de *Paenibacillus* sp. WLY78 e demonstraram o reconhecimento desse promotor pelos fatores  $\sigma$  recombinantes de *E. coli* e de *Paenibacillus* sp. WLY78. Dessa forma, foi validada a proposta de um promotor primário constitutivo, mas os mecanismos específicos de regulação negativa continuam obscuros, visto que é reconhecido que a expressão dos genes não é constitutiva, mas responde à disponibilidade de nitrogênio e O<sub>2</sub> (Fernandes et al. 2014; Shi et al. 2016). A única proposta para tais elementos regulatórios é apresentada por Xie et al. (2014) em seu trabalho de genômica comparativa, em que a sequência consensual reconhecida por GlnR/TnrA foi encontrada conservada em promotores *nif* de quinze isolados diazotróficos do gênero.

## 1.7 *Paenibacillus riograndensis*

*Paenibacillus riograndensis* é um bacilo Gram-positivo aeróbio facultativo diazotrófico e formador de esporos. A linhagem primeiramente classificada nessa espécie, SBR5<sup>T</sup>, foi isolada da rizosfera de trigo no Rio Grande do Sul, Brasil, em um trabalho de prospecção de bactérias promotoras do crescimento vegetal (Beneduzi et al. 2008; Beneduzi et al. 2010). *P. riograndensis* apresenta características interessantes, além da fixação biológica do nitrogênio, como a produção de compostos indólicos e a capacidade de solubilizar fosfatos. Experimentos iniciais em casa de vegetação demonstraram sua capacidade de 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, foi proposto seu uso para a formulação de inoculantes (Beneduzi et al. 2008). A produção de enzimas hidrolíticas por essa linhagem, tais como amilase, celulase, quitinase e protease (Bach et al. 2016), é característica de interesse biotecnológico não apenas do ponto de vista agrônomo, como também industrial.

Atualmente está disponível o genoma completo de *P. riograndensis* SBR5<sup>T</sup> [número de acesso no GenBank: LN831776, (Brito et al. 2015)], o que abre perspectivas para a caracterização funcional do sistema genético componente da FBN nesse organismo e de outros sistemas. O genoma de SBR5 consiste de um cromossomo circular de 7.893.056 pb com 6705 genes codificadores de proteínas (Brito et al. 2015). Em relação à FBN, SBR5 apresenta em seu genoma um agrupamento gênico bem conservado composto por dez genes, *nifBHDKENXorfIhesAnifV* (Figura 4), que compõem uma unidade transcricional (Fernandes et al. 2014).



**Figura 4** - Representação dos agrupamentos gênicos com genes relacionados à FBN identificados no genoma de *Paenibacillus riograndensis* SBR5<sup>T</sup>. Adaptado a partir de Fernandes et al. 2014.

Além desse operon principal, outros agrupamentos gênicos contendo genes relacionados são encontrados no genoma (Figura 4). Um deles contém os genes *anfHDKG*, que codificariam a nitrogenase alternativa baseada em ferro apenas, e genes *nifENX*, compondo dois operons independentes (Fernandes et al. 2014). Outro agrupamento contém os genes *nifH*, *nifB*, *nifD* e *nifK*, interrompidos por ORFs não-*nif*. Transcritos desse *nifH* (*nifH2*) não foram identificados, e a análise filogenética das sequências codificadas por *nifH1* e *anfH* revelaram uma relação evolutiva bem distante, de forma que a sequência de *nifH2* não é resultado de uma duplicação dentro do genoma (Fernandes et al. 2014), diferente do que já foi relatado para cópias adicionais de genes *nif* em outros isolados de *Paenibacillus* (Choo et al. 2003; Hong et al. 2012). Em nível transcricional, foi demonstrada a modulação dos genes *nifH1* e *anfH*, que são induzidos sob privação de nitrogênio, sendo *anfH* induzido preferencialmente sob privação de molibdênio, enquanto *nifH1* é induzido preferencialmente sob condições de fixação padrão, na presença de molibdênio. Somado à detecção da atividade da nitrogenase com a remoção do molibdênio, esses dados dão suporte à proposição da nitrogenase alternativa nessa linhagem (Fernandes et al. 2014).

NifA, o tradicional ativador dos genes *nif* caracterizado em Proteobacteria, não foi encontrado no genoma de SBR5, como já descrito nos relatos das demais bactérias Gram-

positivas diazotróficas investigadas. Em relação a outros elementos de sistemas de regulação em resposta ao nitrogênio, o genoma de SBR5 contém três genes que codificam homólogos da enzima glutamina-sintetase, um dos quais apresenta a ligação com *glnR*, e apenas um gene codificador de homólogo de proteína PII.

### **1.8 Justificativa**

Como já descrito anteriormente, esses são elementos tradicionais de sensoriamento e controle de acordo com o status de nitrogênio. As proteínas PII, além do seu papel no controle de diversos alvos relacionados à homeostase geral do nitrogênio, também são relatadas como elementos de regulação em diferentes níveis da FBN em vários modelos de diazotróficos, desde a regulação transcricional, interagindo com os fatores de transcrição NtrC e NifA, até a regulação pós-traducional da atividade da nitrogenase. A glutamina-sintetase, por sua vez, é reconhecida como elemento chave na assimilação de amônia, sendo submetida a diferentes mecanismos para regulação da sua atividade. Tais mecanismos são extensivamente caracterizados em modelos não-diazotróficos. As propriedades intrigantes na regulação de outros alvos por parte da GS de *B. subtilis* foram caracterizadas em uma série de trabalhos acerca da sua interação com os fatores de transcrição GlnR e TnrA, responsáveis pelo controle global da homeostase do nitrogênio. Esses fatores de transcrição são exclusivos de bactérias Gram-positivas. Trabalhos que caracterizam sua função em outras bactérias, que não o modelo *B. subtilis*, revelam alguma variação em torno de um regulon relativamente constante composto por genes envolvidos em diferentes vias de assimilação do nitrogênio (Doroshchuk et al. 2006; Kormelink et al. 2012), mas nenhum deles investiga bactérias diazotróficas. Dessa forma, esses elementos tradicionais da regulação do nitrogênio, apesar de não previamente implicados na regulação da FBN em diazotróficos, representam grande potencial na tentativa de elucidar tais mecanismos em diazotróficos Gram-positivos.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Identificar elementos centrais para a regulação dos genes relacionados à fixação biológica do nitrogênio em *Paenibacillus riograndensis* SBR5<sup>T</sup>.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- a) Estabelecer um protocolo de transformação para *P. riograndensis*;
- b) Validar o repressor GlnR como o fator de transcrição que controla a expressão dos genes relacionados à fixação biológica do nitrogênio em *P. riograndensis*;
- c) Elucidar o papel da enzima glutamina-sintetase na cascata regulatória que controla tais genes;
- d) Propor elementos envolvidos com a regulação específica da nitrogenase alternativa;
- e) Caracterizar os homólogos de glutamina-sintetase identificados no genoma de *P. riograndensis*.

### **3 CAPÍTULO I** - Estabelecimento de uma ferramenta para manipulação genética de *P. riograndensis* SBR5.

As dificuldades para transformar nosso objeto de estudo representaram grande empecilho para o progresso da pesquisa com essa bactéria, de forma que nosso trabalho inicial limitou-se a caracterizar regiões gênicas com potencial regulatório relacionadas à FBN de SBR5 em *E. coli* (Fernandes et al. 2014), uma limitação que já fora relatada para *P. sabinae* (Hong et al. 2012). Por ser um isolado ambiental proveniente de um trabalho do nosso grupo de pesquisa, as técnicas para cultivo e manipulação em laboratório não estavam estabelecidas, de forma que muitas vezes os protocolos precisaram ser estabelecidos e/ou otimizados para cada objetivo a ser cumprido. A transformação bacteriana é uma ferramenta básica de manipulação genética e fundamental para estudos em biologia molecular. Entretanto, os protocolos disponíveis na literatura para transformação de outras espécies de *Paenibacillus* mostraram-se insuficientes para recuperar transformantes da linhagem de interesse. Esse capítulo apresenta, então, o estabelecimento e a otimização de um protocolo para transformação por eletroporação do nosso objeto de estudo. A habilidade de transformar *P. riograndensis* SBR5 permite agora estudos mais aprofundados para validação dos elementos propostos envolvidos na regulação da FBN, assim como outras características de interesse. Esse trabalho foi publicado no periódico *Journal of Microbiological Methods* em 2016.

#### 4 CAPÍTULO II - Validação do papel do fator de transcrição GlnR e sua interação com a GS no controle da expressão dos genes *nif*.

Os elementos-chave regulatórios da FBN em bactérias Gram-positivas permaneceram um mistério até a proposição dos sítios de ligação para GlnR/TnrA identificados a partir do alinhamento de sequências de promotores *nif* de *Paenibacillus* diazotróficos (Xie et al. 2014). Esse capítulo apresenta evidência experimental com elementos de *P. riograndensis* para tal proposição, caracterizando *in vitro* a ligação de GlnR a fragmentos de DNA contendo regiões reguladoras da FBN, assim como a interação entre GlnR e a glutamina sintetase (GS), responsável pela transmissão do status de nitrogênio da célula, estabilizando a repressão exercida por GlnR. Esse trabalho foi desenvolvido na Universidade de Tübingen em parceria com o professor Karl Forchhammer e foi aceito para publicação no periódico The FEBS Letters em 2017.

### **5 CAPÍTULO III - Perfil transcricional de *P. riograndensis* SBR5 sob privação de nitrogênio e de molibdênio.**

Muitas perguntas permanecem em aberto acerca da regulação genética da FBN em *P. riograndensis*, especialmente em relação à regulação dos genes *anf*, que codificam a nitrogenase alternativa baseada em ferro. O perfil transcricional de SBR5 foi avaliado nas condições de privação de nitrogênio e molibdênio na tentativa de obter indicações de elementos envolvidos na regulação específica do sistema de fixação de N alternativo. Esse trabalho foi escrito em formato de “Short Communication” de acordo com o periódico *Biology and Fertility of Soils*.

## **6 CAPÍTULO IV - Caracterização preliminar de dois homólogos de glutamina sintetase identificados no genoma de *P. riograndensis*.**

Por apresentar a ligação gênica com *glnR* e interagir com o fator de transcrição GlnR, a enzima caracterizada no Capítulo II (de agora em diante denominada GS1) foi escolhida para investigação mais aprofundada. Entretanto, além dessa proteína, duas outras sequências homólogas à glutamina sintetase foram identificadas no genoma de *P. riograndensis*. Como elemento central e ponto-chave de regulação da homeostase do nitrogênio, a ocorrência dessas proteínas adicionais levanta questionamentos acerca das suas origens e funções. Esse capítulo apresenta uma caracterização inicial da sequência primária dessas proteínas e suas atividades bioquímicas e foi escrito de acordo com o periódico *Systematic and Applied Microbiology*.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Componentes estruturais bem conservados estão imersos nos mais distintos sistemas regulatórios, abrangendo a ampla diversidade dentre os organismos diazotróficos. A presente tese propôs-se a investigar alguns elementos regulatórios básicos bem caracterizados, na tentativa de esclarecer a regulação transcricional da FBN em *P. riograndensis*, dentro do contexto de que tal regulação é pouco caracterizada em diazotróficos Gram-positivos. Além dos resultados apresentados, o papel da proteína PII nesse circuito também foi investigado. Não foi possível detectar a interação da proteína PII com o fator de transcrição GlnR por Surface Plasmon Resonance (SPR). Na tentativa de detectar tal interação a partir de outra metodologia, ensaios de *pull-down in vitro* foram conduzidos, porém os resultados obtidos foram inconclusivos. Partiu-se então para a realização de ensaios de Isothermal Titration Calorimetry (ITC), para detectar a ligação da proteína PII a pequenas moléculas. Além dos efetores clássicos de proteínas PII (ATP, ADP e 2-oxoglutarato), foram avaliados outros possíveis efetores (AMP, cAMP e GTP), mas nenhuma das moléculas testadas foi reconhecida pela proteína. Dessa forma, os dados observados não permitiram conectar tal proteína à regulação do nitrogênio, e, por isso, não foram explorados no decorrer dessa tese. Isso é de fato surpreendente, visto que proteínas PII estão envolvidas na regulação geral do nitrogênio e na regulação específica da FBN em diversos organismos. A investigação do papel da proteína PII em *P. riograndensis* certamente pode trazer achados inusitados.

A investigação com GlnR e GS, por sua vez, permitiu estabelecer o papel de GlnR como regulador central dos genes *nif* e elucidar uma parte das cascatas regulatórias que governam a expressão desses genes em *P. riograndensis*. Esses também são elementos clássicos da regulação geral do nitrogênio, porém, os genes da FBN não faziam parte do seu repertório de alvos já conhecido. Dessa forma, o papel regulatório desses bem conhecidos elementos (GlnR e GS) foi estendido, preenchendo lacunas relevantes na história da FBN, de forma a contribuir para a compreensão de uma característica tão fundamental à vida.

A capacidade para transformar o modelo de estudo *P. riograndensis* agora estabelecida permite aprofundar a pesquisa em regulação genética com a adição de dados obtidos *in vivo*, como, por exemplo, a partir da obtenção de mutantes para validar a função das proteínas regulatórias. Outra maneira de dar seguimento a essa linha de pesquisa é

caracterizar *in vivo* os operadores que foram validados *in vitro*, assim como variantes mutantes, para definir claramente a sequência consenso reconhecida por GlnR. Plasmídeos contendo as sequências dos promotores caracterizadas dirigindo a expressão de um gene repórter podem, agora, ser facilmente introduzidos na bactéria para avaliar a atividade desses promotores, e combinações contendo os operadores auxiliares podem ser utilizadas para testar o modelo proposto de operadores múltiplos.

Um dos objetivos do trabalho, o de identificar genes co-regulados com cada sistema da nitrogenase, a partir das análises do transcriptoma, não pôde ser alcançado. Infelizmente, os dados obtidos a partir das análises das bibliotecas de RNA nas condições de fixação de nitrogênio padrão e alternativa não forneceram suporte adequado. A metodologia empregada para remoção dos traços de molibdênio foi descrita na literatura como mais específica e eficiente que outras metodologias também utilizadas. Entretanto, tal procedimento não se mostrou suficiente para remover completamente os traços de molibdênio do meio de cultura e ativar a transcrição dos genes codificadores do sistema alternativo. A execução da metodologia deve ser revisada e uma curva de crescimento nas condições estabelecidas deve ser realizada com o objetivo de identificar a melhor fase para a coleta das células, de forma a garantir que traços contaminantes de molibdênio ainda presentes no meio no início do cultivo tenham sido consumidos. Dessa forma, espera-se encontrar ativadores específicos do sistema alternativo, uma vez que, segundo os resultados obtidos, não foi possível determinar a regulação dos genes *anf* pelo fator GlnR, repressor do sistema de fixação padrão.

Outra perspectiva interessante a partir desse trabalho é a investigação mais aprofundada dos homólogos de GS adicionais identificados. Os dados iniciais indicam que o objeto de estudo contém duas glutamina sintetases funcionais, e apenas uma delas tem propriedades regulatórias da expressão gênica. A possibilidade de uma função específica dessa segunda glutamina sintetase permanece em aberto e requer uma caracterização bioquímica mais extensa. A terceira proteína apresenta sequência bem menos conservada. Sua atividade bioquímica não foi validada, o que indica que ela pode ser especializada em outra reação, ou pode ter perdido a função. Essas três sequências aparentam não resultar de eventos de duplicação dentro do genoma, mas possuir histórias evolutivas mais distantes. Entretanto, é necessária uma análise mais detalhada, buscando sequências em maior número de genomas para construir uma nova filogenia testando métodos mais robustos, na

tentativa de obter uma reconstrução filogenética acurada e com suporte estatístico adequado para melhor compreender a origem dessas proteínas.

A investigação do sistema genético da fixação do nitrogênio em *P. riograndensis* proporcionou achados relevantes para a compreensão básica da regulação da expressão da nitrogenase em resposta à disponibilidade de nitrogênio. Muitas questões ainda permanecem em aberto, e a investigação dessa linhagem e de suas características peculiares ainda trará achados interessantes para compreender a diversidade dos sistemas da nitrogenase e dos organismos diazotróficos.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almassy RJ, Janson CA, Hamlin R, Xuong N-H and Eisenberg D (1986) Novel subunit-subunit interactions in the structure of glutamine synthetase. *Nature* 323:304–309.

Alvarez VM, Von Der Weid I, Seldin L and Santos ALS (2006) Influence of growth conditions on the production of extracellular proteolytic enzymes in *Paenibacillus peoriae* NRRL BD-62 and *Paenibacillus polymyxa* SCE2. *Lett Appl Microbiol* 43:625–630. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02015.x

Anandaraj B, Vellaichamy A, Kachman M, Selvamanikandan A, Pegu S and Murugan V (2009) Co-production of two new peptide antibiotics by a bacterial isolate *Paenibacillus alvei* NP75. *Biochem Biophys Res Commun* 379:179–185. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.12.007

Anderson WB and Stadtman ER (1971) Purification and Functional Roles of the PI and PII Components of *Escherichia coli* Glutamine Synthetase Deadenylation System. *Arch Biochem Biophys* 143:428–443.

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*. *J Mol Biol* 203:715–738. doi: 10.1016/0022-2836(88)90205-7

Ash C, Priest FG and Collins MD (1993) Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64:253–260. doi: 10.1007/BF00873085

Bach E, Seger GD dos S, Fernandes G de C, Lisboa BB and Passaglia LMP (2016) Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Appl Soil Ecol* 99:141–149. doi: 10.1016/j.apsoil.2015.11.002

Beneduzi A, Ambrosini A and Passaglia LMP (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet Mol Biol* 35:1044–1051. doi: 10.1590/S1415-47572012000600020

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. doi: 10.1099/ijs.0.011973-0

Beneduzi A, Peres D, da Costa PB, Bodanese Zanettini MH and Passaglia LMP (2008) Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil. *Res Microbiol* 159:244–250. doi: 10.1016/j.resmic.2008.03.003

Bennett BD, Kimball EH, Gao M, Osterhout R, Van Dien SJ and Rabinowitz JD (2009)

- Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol* 5:593–599. doi: 10.1038/nchembio.186.Absolute
- Berge O, Guinebretière M-H, Achouak W, Normand P and Heulin T (2002) *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:607–616.
- Betancourt DA, Loveless TM, Brown JW and Bishop PE (2008) Characterization of diazotrophs containing Mo-independent nitrogenases, isolated from diverse natural environments. *Appl Environ Microbiol* 74:3471–3480. doi: 10.1128/AEM.02694-07
- Bezza FA and Chirwa EMN (2015) Biosurfactant from *Paenibacillus dendritiformis* and its application in assisting polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and motor oil sludge removal from contaminated soil and sand media. *Process Saf Environ Prot* 98:354–364. doi: 10.1016/j.psep.2015.09.004
- 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 Hetheringtont DR (1980) Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *PNAS* 77:7342–7346.
- 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.
- Blauwkamp TA and Ninfa AJ (2002) Physiological role of the GlnK signal transduction protein of *Escherichia coli*: survival of nitrogen starvation. *Mol Microbiol* 46:203–214. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03153.x
- Brito LF, Bach E, Kalinowski J, Rückert C, Wibberg D, Passaglia LM and Wendisch VF (2015) Complete genome sequence of *Paenibacillus riograndensis* SBR5<sup>T</sup>, a Gram-positive diazotrophic rhizobacterium. *J Biotechnol* 207:30–31. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.04.025
- Brown SW and Sonenshein AL (1996) Autogenous Regulation of the *Bacillus subtilis* *glnRA* Operon. *J Bacteriol* 178:2450–2454.
- Chauhan H, Bagyaraj DJ, Selvakumar G and Sundaram SP (2015) Novel plant growth promoting rhizobacteria—Prospects and potential. *Appl Soil Ecol* 95:38–53. doi: 10.1016/j.apsoil.2015.05.011
- Chen J (2005) Genomic aspects of nitrogen fixation in the Clostridia. In: Palacios R and Newton WE (eds) *Genomes and Genomics of Nitrogen-fixing Organisms*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 13–26

- Chisnell JR, Premakumar R and Bishop PE (1988) Purification of a Second Alternative Nitrogenase from a *nifHDK* Deletion Strain of *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 170:27–33.
- Choo Q-C, Samian M-R and Najimudin N (2003) Phylogeny and Characterization of Three *nifH*-Homologous Genes from *Paenibacillus azotofixans*. *Appl Environ Microbiol* 69:3658–3662. doi: 10.1128/AEM.69.6.3658
- Coelho MRR, Da Mota FF, Carneiro NP, Marriel IE, Paiva E, Rosado AS and Seldin L (2007) Diversity of *Paenibacillus* spp. in the Rhizosphere of four sorghum (*Sorghum bicolor*) cultivars sown with two contrasting levels of nitrogen fertilizer assessed by rpoB-based PCR-DGGE and sequencing analysis. *J Microbiol Biotechnol* 17:753–760.
- Commichau FM and Stülke J (2008) Trigger enzymes: bifunctional proteins active in metabolism and in controlling gene expression. *Mol Microbiol* 67:692–702. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06071.x
- Da Mota FF, Gomes EA and Seldin L (2008) Auxin production and detection of the gene coding for the Auxin Efflux Carrier (AEC) protein in *Paenibacillus polymyxa*. *J Microbiol* 46:257–264. doi: 10.1007/s12275-007-0245-x
- Daane LL, Harjono I, Barns SM, Launen LA, Palleron NJ and Häggblom MM (2002) PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:131–139. doi: 10.1099/00207713-52-1-131
- Del Valle EMM (2004) Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochem* 39:1033–1046. doi: 10.1016/S0032-9592(03)00258-9
- 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. doi: 10.1099/mic.0.26270-0
- Detsch C and Stülke J (2003) Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. *Microbiology* 149:3289–3297. doi: 10.1099/mic.0.26512-0
- Dijksterhuis J, Sanders M, Gorris LGM and Smid EJ (1999) Antibiosis plays a role in the context of direct interaction during antagonism of *Paenibacillus polymyxa* towards *Fusarium oxysporum*. *J Appl Microbiol* 86:13–21.
- Dixon R (1998) The oxygen-responsive NIFL-NIFA complex : a novel two-component regulatory system controlling nitrogenase synthesis in  $\gamma$ -Proteobacteria. *Arch Microbiol* 169:371–380.
- Dixon R and Kahn D (2004) Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *Nat Rev*

Microbiol 2:621–631. doi: 10.1038/nrmicro954

Dodsworth JA and Leigh JA (2006) Regulation of nitrogenase by 2-oxoglutarate-reversible, direct binding of a PII-like nitrogen sensor protein to dinitrogenase. Proc Natl Acad Sci U S A 103:9779–9784. doi: DOI 10.1073/pnas.0602278103

Doroshchuk NA, Gelfand MS and Rodionov DA (2006) Regulation of nitrogen metabolism in gram-positive bacteria. Mol Biol 40:919–926. doi: 10.1134/S0026893306050190

Dsouza M, Taylor MW, Ryan J, MacKenzie A, Lagutin K, Anderson RF, Turner SJ and Aislabie J (2014) *Paenibacillus darwinianus* sp. nov., isolated from gamma-irradiated Antarctic soil. Int J Syst Evol Microbiol 64:1406–1411. doi: 10.1099/ijs.0.056697-0

Eastman AW, Heinrichs DE and Yuan Z-C (2014) Comparative and genetic analysis of the four sequenced *Paenibacillus polymyxa* genomes reveals a diverse metabolism and conservation of genes relevant to plant-growth promotion and competitiveness. BMC Genomics 15:851. doi: 10.1186/1471-2164-15-851

Enkh-Amgalan J, Kawasaki H, Oh-oka H and Seki T (2006a) Cloning and characterization of a novel gene involved in nitrogen fixation in *Heliobacterium chlorum*: a possible regulatory gene. Arch Microbiol 186:327–337. doi: 10.1007/s00203-006-0148-y

Enkh-Amgalan J, Kawasaki H and Seki T (2006b) 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. doi: 10.1099/ijs.0.63815-0

Fernandes GDC, Trarbach LJ, de Campos SB, Beneduzi A and Passaglia LMP (2014) Alternative nitrogenase and pseudogenes: unique features of the *Paenibacillus riograndensis* nitrogen fixation system. Res Microbiol 165:571–580. doi: 10.1016/j.resmic.2014.06.002

Fisher SH (1999) Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence! Mol Microbiol 32:223–232. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01333.x

Fisher SH and Wray L V (2008) *Bacillus subtilis* glutamine synthetase regulates its own synthesis by acting as a chaperone to stabilize GlnR-DNA complexes. Proc Natl Acad Sci U S A 105:1014–1019. doi: 10.1073/pnas.0709949105

Forchhammer K (2008) PII signal transducers: novel functional and structural insights. Trends Microbiol 16:65–72. doi: 10.1016/j.tim.2007.11.004

Gallon JR (1992) Reconciling the incompatible: N<sub>2</sub> fixation and O<sub>2</sub>. New Phytol 122:571–609.

Galloway JN, Dentener FJ, Capone DG, Boyer EW, Howarth RW, Seitzinger SP, Asner

- GP, Cleveland CC, Green PA, Holland EA et al. (2004) Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* 70:153–226.
- Galloway JN, Townsend AR, Erisman JW, Bekunda M, Cai Z, Freney JR, Martinelli LA, Seitzinger SP and Sutton MA (2008) Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science* 320:889–892. doi: 10.1126/science.1136674
- Galloway N, Schlesinger WH, Ii HL, Michaels A and Schnoor L (1995) Nitrogen fixation: Anthropogenic enhancement-environmental response. *Global Biogeochem Cycles* 9:235–252.
- Garcia-Gonzalez E, Müller S, Hertlein G, Heid N, Süßmuth RD and Genersch E (2014) Biological effects of paenilamicin, a secondary metabolite antibiotic produced by the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae*. *Microbiologyopen* 3:642–656. doi: 10.1002/mbo3.195
- Geisseler D, Horwath WR, Joergensen RG and Ludwig B (2010) Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms - A review. *Soil Biol Biochem* 42:2058–2067. doi: 10.1016/j.soilbio.2010.08.021
- Genersch E (2010) American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol* 103:S10–S19. doi: 10.1016/j.jip.2009.06.015
- Grady EN, MacDonald J, Liu L, Richman A and Yuan Z-C (2016) Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb Cell Fact* 15:203–220. doi: 10.1186/s12934-016-0603-7
- Gunka K and Commichau FM (2012) Control of glutamate homeostasis in *Bacillus subtilis*: A complex interplay between ammonium assimilation, glutamate biosynthesis and degradation. *Mol Microbiol* 85:213–224. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08105.x
- Hageman R V and Burris RH (1978) Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:2699–2702.
- Hales BJ, Case EE, Morningstar JE, Dzeda MF and Mauterer LA (1986) Isolation of a New Vanadium-Containing Nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry* 25:7252–7255.
- Han R, Liu L, Shin HD, Chen RR, Du G and Chen J (2013) Site-saturation engineering of lysine 47 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* to enhance substrate specificity towards maltodextrin for enzymatic synthesis of 2-O-d-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G). *Appl Microbiol Biotechnol* 97:5851–5860. doi: 10.1007/s00253-012-4514-1
- 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. doi: 10.1016/0378-1119(95)00300-U

Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R and Ahmed I (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol* 60:579–598. doi: 10.1007/s13213-010-0117-1

He L, Soupene E, Ninfa A and Kustu S (1998) Physiological Role for the GlnK Protein of Enteric Bacteria: Relief of NifL Inhibition under Nitrogen-Limiting Conditions. *J Bacteriol* 180:6661–6667.

He Z, Kisla D, Zhang L, Yuan C, Green-Church KB and Yousef AE (2007) Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. *Appl Environ Microbiol* 73:168–178. doi: 10.1128/AEM.02023-06

Heinrich A, Woyda K, Brauburger K, Meiss G, Detsch C, Stülke J and Forchhammer K (2006) Interaction of the membrane-bound GlnK-AmtB complex with the master regulator of nitrogen metabolism TnrA in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 281:34909–34917. doi: 10.1074/jbc.M607582200

Hertlein G, Müller S, Garcia-Gonzalez E, Poppinga L, Süssmuth RD and Genersch E (2014) Production of the catechol type siderophore bacillibactin by the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *PLoS One* 9:1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0108272

Hong Y, Ma Y, Wu L, Maki M, Qin W and Chen S (2012) Characterization and analysis of *nifH* genes from *Paenibacillus sabiniae* T27. *Microbiol Res* 167:596–601. doi: 10.1016/j.micres.2012.05.003

Howard JB and Rees DC (1996) Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation. *Chem Rev* 96:2965–2982.

Huang E, Guo Y and Yousef AE (2014) Biosynthesis of the new broad-spectrum lipopeptide antibiotic paenibacterin in *Paenibacillus thiaminolyticus* OSY-SE. *Res Microbiol* 165:243–251. doi: 10.1016/j.resmic.2014.02.002

Huang Z, Dai W, Zhou Z, Wang G, Lin G, Yan X and Zhao F (2016) *Paenibacillus terreus* sp. nov., isolated from forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:243–247. doi: 10.1099/ijsem.0.000704

Huergo LF and Dixon R (2015) The Emergence of 2-Oxoglutarate as a Master Regulator Metabolite. *Microbiol Mol Biol Rev* 79:419–435. doi: 10.1128/MMBR.00038-15

Huergo LF, Merrick M, Monteiro RA, Chubatsu LS, Steffens MBR, Pedrosa O and Souza EM (2009) *In Vitro* Interactions between the PII Proteins and the Nitrogenase Regulatory Enzymes Dinitrogenase Reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) and Dinitrogenase Reductase-activating Glycohydrolase (DraG) in *Azospirillum brasilense*. *J Biol Chem*

284:6674–6682. doi: 10.1074/jbc.M807378200

Huergo LF, Merrick M, Pedrosa FO, Chubatsu LS, Araujo LM and Souza EM (2007) Ternary complex formation between AmtB, GlnZ and the nitrogenase regulatory enzyme DraG reveals a novel facet of nitrogen regulation in bacteria. *Mol Microbiol* 66:1523–1535. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06016.x

Huergo LF, Pedrosa FO, Muller-Santos M, Chubatsu LS, Monteiro RA, Merrick M and Souza EM (2012) PII signal transduction proteins: Pivotal players in post-translational control of nitrogenase activity. *Microbiology* 158:176–190. doi: 10.1099/mic.0.049783-0

Huergo LF, Souza EM, Araujo MS, Pedrosa FO, Chubatsu LS, Steffens MBR and Merrick M (2006) ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense* is regulated by AmtB-dependent membrane sequestration of DraG. *Mol Microbiol* 59:326–337. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04944.x

Jack R, Zamaroczy MDE and Merrick M (1999) The Signal Transduction Protein GlnK Is Required for NifL-Dependent Nitrogen Control of *nif* Gene Expression in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* 181:1156–1162.

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* 171:1017–1027.

Javelle A and Merrick M (2005) Complex formation between AmtB and GlnK: an ancestral role in prokaryotic nitrogen control. *Biochem Soc Trans* 33:170–172. doi: 10.1042/BST0330170

Jemli S, Ben Messaoud E, Ben Mabrouk S and Bejar S (2008) The cyclodextrin glycosyltransferase of *Paenibacillus pabuli* US132 strain: molecular characterization and overproduction of the recombinant enzyme. *J Biomed Biotechnol* 1:1–9. doi: 10.1155/2008/692573

Jin HJ, Tu R, Xu F and Chen SF (2011a) Identification of nitrogen-fixing *Paenibacillus* from different plant rhizospheres and a novel *nifH* gene detected in the *P. stellifer*. *Microbiology* 80:117–124. doi: 10.1134/S0026261711010097

Jin H-J, Zhou Y-G, Liu H-C and Chen S-F (2011b) *Paenibacillus jilunii* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Begonia semperflorens*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:1350–1355. doi: 10.1099/ijs.0.025056-0

Joerger RD and Jacobson MR (1989) Two *nifA*-Like Genes Required for Expression of Alternative Nitrogenases by *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 171:3258–3267.

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 171:1075–86.
- Kasap M and Chen J-S (2005) *Clostridium pasteurianum* W5 synthesizes two NifH-related polypeptides under nitrogen-fixing conditions. Microbiology 151:2353–2362. doi: 10.1099/mic.0.27931-0
- Kayumov A, Heinrich A, Fedorova K, Ilinskaya O and Forchhammer K (2011) Interaction of the general transcription factor TnrA with the PII-like protein GlnK and glutamine synthetase in *Bacillus subtilis*. FEBS J 278:1779–1789. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08102.x
- Kennedy IR, Choudhury ATMA and Kecskés ML (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: Can their potential for plant growth promotion be better exploited? Soil Biol Biochem 36:1229–1244. doi: 10.1016/j.soilbio.2004.04.006
- Khan Z, Kim SG, Jeon YH, Khan HU, Son SH and Kim YH (2008) A plant growth promoting rhizobacterium, *Paenibacillus polymyxa* strain GBR-1, suppresses root-knot nematode. Bioresour Technol 99:3016–3023. doi: 10.1016/j.biortech.2007.06.031
- Kim BC, Lee KH, Kim MN, Kim EM, Rhee MS, Kwon O-Y and Shin K-S (2009) *Paenibacillus pinihumi* sp. nov., a cellulolytic bacterium isolated from the rhizosphere of *Pinus densiflora*. J Microbiol 47:530–535. doi: 10.1007/s12275-009-0270-z
- Kingdon HS, Shapiro BM and Stadtman E (1967) Regulation of glutamine synthetase, VIII. ATP: Glutamine synthetase adenylyltransferase, an enzyme that catalyzes alterations in the regulatory properties of glutamine synthetase. Proc Natl Acad Sci U S A 58:1703–1710.
- Ko CH, Chen WL, Tsai CH, Jane WN, Liu CC and Tu J (2007) *Paenibacillus campinasensis* BL11: A wood material-utilizing bacterial strain isolated from black liquor. Bioresour Technol 98:2727–2733. doi: 10.1016/j.biortech.2006.09.034
- Ko CH, Lin ZP, Tu J, Tsai CH, Liu CC, Chen HT and Wang TP (2010) Xylanase production by *Paenibacillus campinasensis* BL11 and its pretreatment of hardwood kraft pulp bleaching. Int Biodeterior Biodegrad 64:13–19. doi: 10.1016/j.ibiod.2009.10.001
- Kögel-Knabner I (2002) The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. Soil Biol Biochem 34:139–162. doi: 10.1016/S0038-0717(01)00158-4
- Kormelink T, Koenders E, Hagemeyer Y, Overmars L, Siezen RJ, de Vos WM and Francke C (2012) Comparative genome analysis of central nitrogen metabolism and its control by GlnR in the class Bacilli. BMC Genomics 13:191. doi: 10.1186/1471-2164-13-191
- Kutsche M, Leimkühler S, Angermüller S and Klipp W (1996) 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* 178:2010–2017.

Lapidot D, Dror R, Vered E, Mishli O, Levy D and Helman Y (2015) Disease protection and growth promotion of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) by *Paenibacillus dendritiformis*. *Plant Pathol* 64:545–551. doi: 10.1111/ppa.12285

Lebuhn M, Heulin T and Hartmann A (1997) Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiol Ecol* 22:325–334.

Leigh JA and Dodsworth JA (2007) Nitrogen regulation in Bacteria and Archaea. *Annu Rev Microbiol* 61:349–377. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093409

Li X, Deng Z, Liu Z, Yan Y, Wang T, Xie J, Lin M, Cheng Q and Chen S (2014) The genome of *Paenibacillus sabiniae* T27 provides insight into evolution, organization and functional elucidation of *nif* and *nif*-like genes. *BMC Genomics* 15:723–737. doi: 10.1186/1471-2164-15-723

Liang T-W and Wang S-L (2015) Recent Advances in Exopolysaccharides from *Paenibacillus* spp.: Production, Isolation, Structure, and Bioactivities. *Mar Drugs* 13:1847–1863. doi: 10.3390/md13041847

Liang T-W, Wu C-C, Cheng W-T, Chen Y-C, Wang C-L, Wang I-L and Wang S-L (2014) Exopolysaccharides and antimicrobial biosurfactants produced by *Paenibacillus macerans* TKU029. *Appl Biochem Biotechnol* 172:933–950. doi: 10.1007/s12010-013-0568-5

Lie TJ and Leigh JA (2003) A novel repressor of *nif* and *glnA* expression in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Mol Microbiol* 47:235–246.

Lie TJ, Wood GE and Leigh JA (2005) Regulation of *nif* Expression in *Methanococcus maripaludis*. *J Biol Chem* 280:5236–5241. doi: 10.1074/jbc.M411778200

Little R, Reyes-ramirez F, Zhang Y, Heeswijk WC Van and Dixon R (2000) Signal transduction to the *Azotobacter vinelandii* NIFL-NIFA regulatory system is influenced directly by interaction with 2-oxoglutarate and the PII regulatory protein. *EMBO J* 19:6041–6050.

Lorentz RH, Ártico S, Da Silveira AB, Einsfeld A and Corção G (2006) Evaluation of antimicrobial activity in *Paenibacillus* spp. strains isolated from natural environment. *Lett Appl Microbiol* 43:541–547. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01995.x

Lugtenberg B and Kamilova F (2009) Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63:541–556. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918

- Magasanik B (1993) The regulation of nitrogen utilization in enteric bacteria. *J Cell Biochem* 51:34–40. doi: 10.1002/jcb.240510108
- Marzluf GA (1997) Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:17–32.
- 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* 4:243–248.
- 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.
- Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X and Batut J (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol* 17:458–466. doi: 10.1016/j.tim.2009.07.004
- Meek TD and Villafranca JJ (1980) Kinetic Mechanism of *Escherichia coli* Glutamine Synthetase. *Biochemistry* 19:5513–5519.
- Meletzus D, Rudnick P, Doetsch N, Green A and Kennedy C (1998) Characterization of the *glnK-amtB* Operon of *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 180:3260–3264.
- Merrick MJ and Edwards RA (1995) Nitrogen Control in Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 59:604–622.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9401–9405.
- Nordlund S and Högbom M (2013) ADP-ribosylation, a mechanism regulating nitrogenase activity. *FEBS J* 280:3484–3490. doi: 10.1111/febs.12279
- Park IH, Chang J, Lee YS, Fang SJ and Choi YL (2012) Gene cloning of endoglucanase Cel5A from cellulose-degrading *Paenibacillus xylanilyticus* KJ-03 and purification and characterization of the recombinant enzyme. *Protein J* 31:238–245. doi: 10.1007/s10930-012-9396-7
- Pason P, Kyu KL and Ratanakhanokchai K (2006) *Paenibacillus curdolanolyticus* strain B-6 xylanolytic-cellulolytic enzyme system that degrades insoluble polysaccharides. *Appl Environ Microbiol* 72:2483–2490. doi: 10.1128/AEM.72.4.2483-2490.2006
- Pau RN, Mitchenall LA and Robson RL (1989) Genetic Evidence for an *Azotobacter vinelandii* Nitrogenase Lacking Molybdenum and Vanadium. *J Bacteriol* 171:124–129.
- 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 21:541–54. doi: 10.1093/molbev/msh047

Rees DC and Howard JB (2000) Nitrogenase: standing at the crossroads. Curr Opin Chem Biol 4:559–566.

Reitzer LJ and Magasanik B (1985) Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. Proc Natl Acad Sci U S A 82:1979–1983. doi: 10.1073/pnas.82.7.1979

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) N<sub>2</sub> Fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* Involves a Molybdenum-Dinitrogenase and a Manganese-Superoxide Oxidoreductase That Couple N<sub>2</sub> Reduction to the Oxidation of Superoxide Produced from O<sub>2</sub> by a Molybdenum-CO Dehydrogenase. J Biol Chem 272:26627–26633.

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 322:388–390.

Robson RL, Woodley PR, Pau RN and Eady RR (1989) Structural genes for the vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum*. EMBO J 8:1217–1224.

Rudnick P, Kunz C, Gunatilaka MK, Hines ER and Kennedy C (2002) Role of GlnK in NifL-Mediated Regulation of NifA Activity in *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol 184:812–820. doi: 10.1128/JB.184.3.812

Sant’Anna FH, Trentini DB, De Souto Weber S, Cecagno R, Da Silva SC and Schrank IS (2009) The PII superfamily revised: A novel group and evolutionary insights. J Mol Evol 68:322–336. doi: 10.1007/s00239-009-9209-6

Seefeldt LC, Hoffman BM and Dean DR (2009) Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase. Annu Rev Biochem 78:701–722. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.070907.103812

Seldin L, de Azevedo FS, Alviano DS, Alviano CS and de Freire Bastos MC (1999) Inhibitory activity of *Paenibacillus polymyxa* SCE2 against human pathogenic microorganisms. Lett Appl Microbiol 28:423–427.

Shapiro BM and Stadtman ER (1968) The novel phosphodiester residue of adenylylated glutamine synthetase from *Escherichia coli*. J Biol Chem 243:3769–3771.

Shi H, Wang L, Li X, Liu X, Hao T, He X and Chen S (2016) Genome-wide transcriptome profiling of nitrogen fixation in *Paenibacillus* sp. WLY78. BMC Microbiol 16:25–35. doi: 10.1186/s12866-016-0642-6

- Singh JS, Pandey VC and Singh DP (2011) Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agric Ecosyst Environ* 140:339–353. doi: 10.1016/j.agee.2011.01.017
- Son HS and Rhee SG (1987) Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase: Purification and properties of PII protein and nucleotide sequence of its structural gene. *J Biol Chem* 262:8690–8695.
- Sonenshein AL (2008) Control of nitrogen metabolism by *Bacillus subtilis* glutamine synthetase. *Mol Microbiol* 68:242–245. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06174.x
- Stock JB, Ninfa AJ and Stock AM (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev.*
- Suominen I, Spröer C, Kämpfer P, Rainey FA, Lounatmaa K and Salkinoja-Salonen M (2003) *Paenibacillus stellifer* sp. nov., a cyclodextrin-producing species isolated from paperboard. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1369–1374. doi: 10.1099/ijs.0.02277-0
- Timmusk S, Nicander B, Granhall U and Tillberg E (1999) Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biol Biochem* 31:1847–1852. doi: 10.1016/S0038-0717(99)00113-3
- Trüper HG (2005) The type species of the genus *Paenibacillus* Ash *et al.* 1994 is *Paenibacillus polymyxa*. *Opinion 77. Int J Syst Evol Microbiol* 55:513. doi: 10.1099/ijs.0.63546-0
- Uetanabaro AP, Wahrenburg C, Hunger W, Pukall R, Spröer C, Stackebrandt E, de Canhos VP, Claus D and Fritze D (2003) *Paenibacillus agarexedens* sp. nov., nom. rev., and *Paenibacillus agaridevorans* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1051–1057. doi: 10.1099/ijs.0.02420-0
- Van Heeswijk WC, Stegeman B, Hoving S, Molenaar D, Kahn D and Westerhoff H V (1995) An additional PII in *Escherichia coli*: A new regulatory protein in the glutamine synthetase cascade. *FEMS Microbiol Lett* 132:153–157.
- Vitousek PM and Howarth RW (1991) Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry* 13:87–115.
- Vollú RE, da Mota FF, Gomes EA and Seldin L (2008) Cyclodextrin production and genetic characterization of cyclodextrin glucanotransferase of *Paenibacillus graminis*. *Biotechnol Lett* 30:929–935. doi: 10.1007/s10529-008-9635-3
- von Der Weid I, Alviano DS, Santos a. LS, Soares RM a, Alviano CS and Seldin L (2003) Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi. *J Appl Microbiol* 95:1143–1151. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02097.x
- Wandersman C and Delepelaire P (2004) Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores. *Annu Rev Microbiol* 58:611–47. doi: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123811
- Wang CM, Shyu CL, Ho SP and Chiou SH (2008a) Characterization of a novel

thermophilic, cellulose-degrading bacterium *Paenibacillus* sp. strain B39. Lett Appl Microbiol 47:46–53. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02385.x

Wang L, Zhang L, Liu Z, Zhao D, Liu X, Zhang B, Xie J, Hong Y, Li P, Chen S et al. (2013) A Minimal Nitrogen Fixation Gene Cluster from *Paenibacillus* sp. WLY78 Enables Expression of Active Nitrogenase in *Escherichia coli*. PLoS Genet 9:1–11. doi: 10.1371/journal.pgen.1003865

Wang M, Yang M, Zhou G, Luo X, Zhang L, Tang Y and Fang C (2008b) *Paenibacillus tarimensis* sp. nov., isolated from sand in Xinjiang, China. Int J Syst Evol Microbiol 58:2081–2085. doi: 10.1099/ijs.0.65445-0

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 16:439–454.

Weidenbach K, Ehlers C, Kock J and Schmitz RA (2010) NrpRII mediates contacts between NrpRI and general transcription factors in the archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1. FEBS J 277:4398–4411. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07821.x

Wen Y, Wu X, Teng Y, Qian C, Zhan Z, Zhao Y and Li O (2011) Identification and analysis of the gene cluster involved in biosynthesis of paenibactin, a catecholate siderophore produced by *Paenibacillus elgii* B69. Environ Microbiol 13:2726–2737. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02542.x

Weselowski B, Nathoo N, Eastman AW, MacDonald J and Yuan Z-C (2016) Isolation, identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* CR1 with potentials for biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production. BMC Microbiol 16:244–254. doi: 10.1186/s12866-016-0860-y

Woodley P, Buck M and 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. doi: 10.1016/0378-1097(95)00453-X

Woolfolk CA and Stadtman ER (1964) Cumulative feedback inhibition in the multiple end product regulation of glutamine synthetase activity in *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun 17:313–319. doi: 10.1016/0006-291X(64)90003-8

Wray L V., Atkinson MR and Fisher SH (1994) The nitrogen-regulated *Bacillus subtilis* *nrgAB* operon encodes a membrane protein and a protein highly similar to the *Escherichia coli* *glnB*-encoded PII protein. J Bacteriol 176:108–114.

Wray L V, Ferson AMYE, Rohrer K and Fisher SH (1996) TnrA, a transcription factor required for global nitrogen regulation in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci U S A 93:8841–8845.

Wray L V, Zalieckas JM and Fisher SH (2001) *Bacillus subtilis* Glutamine Synthetase Controls Gene Expression through a Protein-Protein Interaction with Transcription Factor TnrA. Cell 107:427–435.

Xie JB, Bai LQ, Wang LY and Chen SF (2012) Phylogeny of 16S rRNA and *nifH* genes

and regulation of nitrogenase activity by oxygen and ammonium in the genus *Paenibacillus*. *Microbiology* 81:702–709.

Xie JB, Du Z, Bai L, Tian C, Zhang Y, Xie JY, Wang T, Liu X, Chen X, Cheng Q et al. (2014) Comparative Genomic Analysis of N<sub>2</sub>-Fixing and Non-N<sub>2</sub>-Fixing *Paenibacillus* spp.: Organization, Evolution and Expression of the Nitrogen Fixation Genes. *PLoS Genet* 10:1–17. doi: 10.1371/journal.pgen.1004231

Xu SJ and Kim BS (2014) Mycobiology Biocontrol of Fusarium Crown and Root Rot and Promotion of Growth of Tomato by *Paenibacillus* Strains Isolated from Soil. *Mycobiology* 42:158–166.

Yan Y, Yang J, Dou Y, Chen M, Ping S, Peng J, Lu W, Zhang W, Yao Z, Li H et al. (2008) Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7564–7569.

Zhang L, Gao J-S, Zhang S, Ali Sheirdil R, Wang X-C and Zhang X-X (2015) *Paenibacillus rhizoryzae* sp. nov., isolated from rice rhizosphere. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:3053–3059. doi: 10.1099/ijs.0.000376

Zhu ZL and Chen DL (2002) Nitrogen fertilizer use in China - Contributions to food production, impacts on the environment and best management strategies. *Nutr Cycl Agroecosystems* 63:117–127. doi: 10.1023/A:1021107026067