

TD
179 R. 9393



GENETICA DE LA ASIMILACION DEL NITRATO
EN Azotobacter vinelandii
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL



Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 120 número 7 del libro
correspondiente.

Sevilla, 29 MAYO 1987

El Jefe del Negociado de Tesis,
P. Dolores Diaz Alcaide

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en
Ciencias Biológicas por el Licenciado Francisco Javier
Luque Vazquez.

Francisco Luque

Sevilla, Junio de 1987

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en
de la
de esta Universidad desde el día
hasta el día

Sevilla de **DIRECTORA**
EL DIRECTOR DE

María Dolores Tortolero García

Dra. María Dolores Tortolero García.
Profesora Titular de Biología.

A Amparo y Laura

A mis padres

Quiero expresar mi agradecimiento a María Tortolero, Directora de esta tesis, por su constante dedicación e interés en la realización de este trabajo y en mi formación científica.

A Norman Pieniazek por su gran ayuda y todo lo que he aprendido con él.

A todos mis compañeros del Departamento de Genética que han hecho que el trabajo resultase siempre grato y especialmente a Eduardo Santero, Juan Ramón Medina y Pepe Casadesús por sus inestimables aportaciones e ideas para la realización de este trabajo.

A Asunción Fernandez y Pepe Cordoba por su constante colaboración, a Isabel Fuentes por su gran ayuda en la realización de las gráficas y a Javier Avalos por su desinteresada ayuda en la realización de fotos y diapositivas.

INDICE

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCION.....	3
1. Azotobacter y el ciclo del nitrógeno.....	4
2. Análisis genético en Azotobacter.....	8
2.1 Mutagénesis.....	8
2.1.1 El ICR-191.....	9
2.1.2 El transposón Tn5.....	11
2.2 Sistemas de transferencia de material genético.....	11
3. Azotobacter y el metabolismo del nitrógeno.....	12
3.1 Asimilación del amonio.....	12
3.1.2 Regulación de la asimilación del nitrógeno en bacterias.....	13
3.2 Asimilación del nitrato.....	17
3.2.1 Las nitrato reductasas asimilatorias..	17
3.2.2 Nitrito reductasas asimilatorias.....	20
3.2.3 Regulación de la asimilación de nitrato.....	21
4. Objetivo de esta tesis.....	24
MATERIALES Y METODOS.....	25
1. Estirpes y plásmidos utilizados.....	26
2. Tampones y soluciones.....	26
3. Medios y condiciones de cultivo.....	31
3.1 <u>Azotobacter vinelandii</u>	31
3.2 <u>Escherichia coli</u>	32
3.3 Agentes selectivos.....	32
4. Métodos genéticos.....	33
4.1 Aislamiento de mutantes.....	33
4.1.1 Mutagénesis con ICR-191.....	33
4.1.2 Mutagénesis con Tn5.....	34
4.2 Conjugación.....	34
4.3 Transformación.....	35

4.3.1 Transformación en <u>E. coli</u>	35
4.3.2 Transformación en <u>A. vinelandii</u>	36
4.4 Segregación y enriquecimiento.....	36
5. Métodos analíticos.....	37
5.1 Determinación de proteína.....	37
5.2 Determinación de nitrato.....	38
5.3 Determinación de nitrito.....	38
5.4 Determinación de amonio.....	39
6. Métodos bioquímicos.....	40
6.1 Ensayos enzimáticos.....	40
6.1.1 Obtención de extractos.....	40
6.1.2 Permeabilización de las células.....	40
6.1.3 Actividad nitrato reductasa.....	40
6.1.4 Actividad nitrito reductasa.....	41
6.1.5 Actividad transferasa de la glutamina sintetasa.....	42
6.2 Aislamiento de DNA.....	43
6.2.1 Aislamiento de DNA plasmídico.....	43
6.2.2 Aislamiento de DNA cromosómico de <u>A.</u> <u>vinelandii</u>	43
6.2.2.1 Aislamiento de DNA purificado de <u>A. vinelandii</u>	44
6.2.2.2 Aislamiento de DNA cromosómico para transformación.....	44
6.3 Restricción del DNA.....	45
6.4 Ligamiento del DNA.....	45
6.5 Desfosforilación de los extremos 5' del DNA.	45
6.6 Electroforesis.....	45
6.7 Obtención de extractos de empaquetamiento...	45
6.8 Empaquetamiento del DNA.....	46
6.9 Infección de <u>E. coli</u> por lambda.....	47
RESULTADOS Y DISCUSION.....	48
1. Estudio fisiológico de la asimilación de nitrato.	49
1.1 Determinación de la sensibilidad a clorato..	49

1.2 Ensayos de las actividades nitrato y nitrito reductasas.....	52
1.3 Inducción de la nitrato reductasa por nitrato.....	54
1.4 Actividades de las nitrato y nitrito reductasas en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno.....	56
1.5 Actividades nitrato y nitrito reductasas en células con hambre de nitrógeno.....	59
1.6 Efecto del medio fresco sobre las actividades nitrato y nitrito reductasas....	61
1.7 Efecto de la aireación sobre la actividad nitrato reductasa.....	61
1.8 Efecto del amonio sobre las actividades nitrato y nitrito reductasa.....	63
1.9 Represión de la síntesis de las nitrato y nitrito reductasas por amonio con diferentes fuentes de carbono.....	66
Discusión.....	69
2. Obtención de mutantes.....	72
2.1 Mutagénesis con ICR-191.....	72
2.1.1 Letalidad y mutagenicidad del ICR-191.	72
2.1.2 Obtención de mutantes auxotróficos y Nif ⁻	73
2.1.3 Obtención de mutantes no utilizadores de azúcares.....	75
2.1.4 Obtención de mutantes resistentes a clorato a partir de la estirpe UW136..	77
2.1.5 Obtención de mutantes resistentes a clorato a partir de la estirpe Nif ⁻ UW6 ^r	81
2.2 Mutagénesis con transposón.....	81
2.2.1 Obtención de resistentes a clorato Nif ⁻ con Tn5.....	83
Discusión.....	85

3. Estudio de los mutantes resistentes a clorato que tienen actividad nitrato reductasa.....	89
3.1 Represión de la nitrato reductasa de los mutantes AS40-49.....	89
3.2 Consumo de amonio de UW136 y AS45.....	90
3.3 Actividad glutamina sintetasa (GS).....	90
3.4 Represión de las nitrato y nitrito reductasas en medios con diferentes fuentes de carbono.....	99
3.5 Actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa de los mutantes MV91-95.....	101
Discusión.....	104
4. Estudio de mutantes incapaces de asimilar nitrato	106
4.1 Curvas de crecimiento.....	106
4.2 Complementación de los mutantes Chl^{R} Nar^{-} Nir^{-} con los genes <u>ntrA</u> y <u>ntrC</u>	108
4.3 Fisiología de los mutantes en el gen <u>ntrC</u> ...	109
4.4 Efecto del medio fresco sobre las dos reductasas en mutantes en los genes <u>ntrA</u> y <u>ntrC</u>	111
4.5 Estudio de los mutantes Chl^{R} Nar^{-} Nir^{-} no complementables por <u>ntrA</u> ni <u>ntrC</u>	113
4.6 Actividad nitrato reductasa de los mutantes Nar^{-} Nir^{+}	113
4.7 Fisiología de los mutantes afectados en una sola de las reductasas.....	115
Discusión.....	117
5. Clonación de genes implicados en la asimilación del nitrato.....	120
5.1 Construcción de una genoteca.....	120
5.2 Complementación con la genoteca de mutantes deficientes en la asimilación de nitrato....	123
5.3 Cotransformación entre los marcadores Nar y Nir	129
Discusión.....	130

CONCLUSIONES.....	132
BIBLIOGRAFIA.....	135

ABREVIATURAS

ADP	Adenosín 5'-difosfato
ATP	Adenosín 5'-trifosfato
CIP	Fosfatasa alcalina de intestina de vaca
Chl	Clorato
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNA-asa	Desoxirribonucleasa
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FeMoCo	Cofactor de hierro y molibdeno
FMN	Flavín mononucleótido
g	gramo
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
Hfr	Estirpe con el plásmido F integrado en el cromosoma
Km	kanamicina
Kpb	Kilopares de bases
l	Litro
M	Molar
MoCo	Cofactor de molibdeno
MOPS	Acido 3-(N-morfilo)propano sulfónico
MTA	Mezcla de bromuros de alquiltrimetilamonio
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato
Nar	Capacidad de reducir nitrato "in vivo"
Nif	Capacidad de fijar nitrógeno
Nir	Capacidad de reducir nitrito
nm	nanometro
N'NEDA	N-(naftil-(1))-etilen-diamina diclorhidrato
pb	pares de bases

P/V	Peso/Volumen
RNA	Acido ribonucleico
RNA-asa	Ribonucleasa
Rif	Rifampicina
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
Tc	Tetraciclina
Tris	Trihidroximetilaminometano
U	Unidad enzimática
V/V	Volumen/Volumen

INTRODUCCION

1. Azotobacter y el ciclo de nitrógeno

El nitrógeno es un elemento fundamental para los seres vivos. Tras el carbono, el hidrógeno y el oxígeno, es cuantitativamente, el elemento más abundante de la materia viva, de la que constituye del 8 al 16%. Cualitativamente forma parte de moléculas tan importantes para la vida como los ácidos nucleicos y las proteínas.

Aunque el nitrógeno constituye el elemento más abundante de la atmósfera (79%), su disponibilidad para la gran mayoría de los organismos está limitada a la pequeña proporción del total que representa el nitrógeno fijado. Solo algunos procariotas, que reciben el nombre de diazotrofos o fijadores de nitrógeno pueden utilizar el nitrógeno atmosférico, en forma de N_2 , y convertirlo en nitrógeno combinado bajo forma de amonio.

El nitrógeno fijado se puede encontrar en diversos estados de oxidación como nitrato, nitrito, amonio o nitrógeno orgánico y puede pasar finalmente a nitrógeno atmosférico cerrando un proceso conocido como "ciclo del nitrógeno". En la figura 1 se presenta un esquema de este ciclo. El nitrógeno orgánico procedente de la desintegración de los organismos y de sus excreciones puede ser transformado en amonio en un proceso denominado amonificación. El amonio puede ser oxidado hasta nitrato, en un proceso denominado nitrificación, que es llevado a cabo por las bacterias nitrificantes. El amonio y el nitrato pueden ser absorbidos por las plantas y microorganismos y pasar de nuevo a formar parte de la materia orgánica, proceso conocido como asimilación. En ambientes anaerobios o microaerobios algunas bacterias pueden realizar un proceso conocido como desnitrificación, mediante el cual el nitrato se

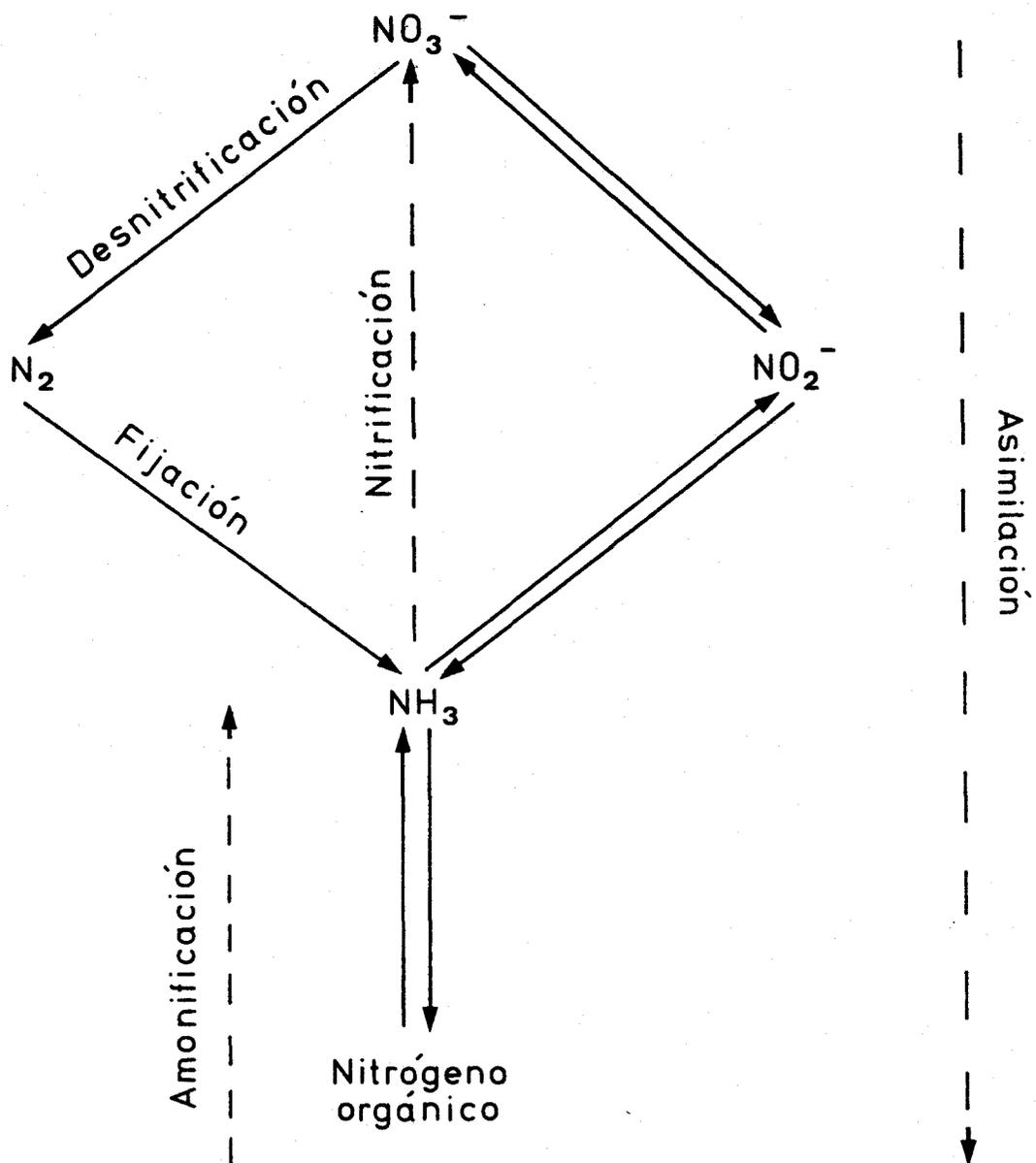


Figura 1: Ciclo del nitrógeno en la Biosfera.

transforma en nitrógeno molecular o en óxidos de este elemento que escapan a la atmósfera. El suelo pierde nitrógeno por desnitrificación, por volatilización del amonio, por el lavado de los nitratos con el agua de la lluvia y sobre todo por la recolección de las plantas; estas pérdidas se compensan por la reducción de nitrógeno atmosférico a amonio "fijación de nitrógeno". La atmósfera es la gran reserva de nitrógeno de la naturaleza y la fijación de nitrógeno molecular la etapa estabilizadora del ciclo de este elemento.

La reducción de N_2 puede ocurrir de tres maneras distintas. En primer lugar, las descargas eléctricas de las tormentas, las radiaciones ultravioletas, los rayos cósmicos o la fricción de los meteoritos con la atmósfera pueden proporcionar la energía requerida para producir óxidos de nitrógeno e incluso amoniaco a partir de N_2 atmosférico. En segundo lugar, el N_2 del aire puede ser reducido industrialmente con hidrógeno gaseoso por el procedimiento de Haber-Bosch. En tercer lugar, existe la ya mencionada fijación biológica, realizada solo por algunos procariotas.

Se estima que se fijan anualmente unos 275 millones de Tm de nitrógeno, de las cuales 175 corresponden a la fijación biológica, 70 a la industrial y 30 a la espontánea. Por lo tanto, la fijación biológica supone más del 60% del nitrógeno fijado y más del doble del nitrógeno añadido a los cultivos en fertilizantes.

El género Azotobacter, descrito por primera vez por M. W. Beijerinck en 1901, comprende unas bacterias del suelo, gramnegativas, aerobias estrictas, que forman quistes, y que son capaces de utilizar como fuente de nitrógeno tanto el N_2 atmosférico, como el nitrato, el

nitrito o el amonio. Las características principales del género Azotobacter como fijador de nitrógeno son las siguientes: Son bacterias fijadoras libres, es decir, para fijar el N_2 no necesitan establecer simbiosis con otros organismos, característica que comparten con otros géneros bien conocidos como por ejemplo Klebsiella o Clostridium. Es uno de los pocos géneros (junto a Azomonas, Beijerinckia y Derxia) que fija nitrógeno en aerobiosis, y ello gracias a que ha desarrollado unos sofisticados mecanismos que protegen a la nitrogenasa de la inactivación irreversible por O_2 , bien manteniendo un microambiente anaerobio eliminando el O_2 mediante una intensa actividad respiratoria (mecanismo que se conoce como "protección respiratoria"), o bien inactivando reversiblemente a la nitrogenasa mediante la unión a otra proteína, proteína Shethna (Shethna, 1970) cuando el nivel de O_2 es suficientemente alto (mecanismo que se conoce como "protección conformacional"). Y por último es el único género en el que se han descrito dos nitrogenasas: una nitrogenasa convencional dependiente de molibdeno y otra que solo se expresa en ausencia de molibdeno, descrita por primera vez en A. vinelandii (Bishop et al., 1980; Bishop, 1982). Recientemente se ha purificado, a partir de unos mutantes de A. chroococcum, que presentan una delección de los genes estructurales de la nitrogenasa, nifHDK, otra nitrogenasa que en vez de molibdeno tiene vanadio (Robson et al., 1986).

Se ha discutido mucho la utilidad de Azotobacter como fertilizante nitrogenado, y de hecho se ha empleado como fertilizante en una amplia variedad de cultivos. Se han realizado numerosos estudios sobre el efecto de la inoculación con Azotobacter sobre el crecimiento de las plantas. Los estudios realizados en la URSS y otros países del Este describen aumentos de rendimiento en diversos tipos de cultivo, especialmente de patata,

(Rubenchick, 1960). También en determinados suelos de Egipto (Hegazi et al., 1974) y de la India (Karunakar y Rajgopalan, 1936) se ha descrito un incremento muy notable del rendimiento tras inoculación de cultivos de caña de azúcar, maíz y sorgo. En cambio en otros países como Suiza, Francia, Dinamarca, Finlandia y EEUU los resultados han sido negativos (Hamdi, 1985). En cualquier caso, no está demostrado que el aumento en el rendimiento de las plantas sea debido a la incorporación de nitrógeno al suelo. Otra posibilidad es que dicho efecto se deba a sustancias, como las giberelinas, citoquininas y ácido indolacético, liberadas por este tipo de bacterias (Vancura, 1961; Brown et al., 1968) o al antagonismo que ejerce Azotobacter sobre ciertas bacterias y hongos patógenos como Candida, Monilia y Alternaria.

2. Análisis genético en Azotobacter

La especie más estudiada dentro del género Azotobacter desde el punto de vista genético es A. vinelandii. Los primeros mutantes Nif⁻ (que han perdido la capacidad de fijar nitrógeno) descritos en la literatura fueron obtenidos precisamente en A. vinelandii hace varias décadas. A pesar de ello, la genética de este organismo está muy atrasada presentando dos problemas fundamentales. Uno de ellos es el escaso número de mutantes distintos de los que se dispone para utilizarlos como marcadores genéticos y el otro es la falta de un mecanismo eficaz de transferencia de material cromosómico que permita llevar a cabo estudios de recombinación y complementación.

2.1 Mutagénesis

El limitado número de mutantes descritos de

Azotobacter probablemente se deba no a una dificultad de la mutagénesis en sí sino a que Azotobacter tiene un elevado número de copias del cromosoma (Sadoff et al., 1979; Robson et al., 1984).

Se ha empleado una extensa gama de mutágenos distintos, luz ultravioleta, nitrosoguanidina, etilmetanosulfonato, hidroxilamina y transposones (Kennedy y Toukdarian, 1987) y el resultado ha sido el aislamiento de mutantes Nif^- y algún auxótrofo de Adenina, Uracilo, Hipoxantina o cisteína (Contreras, 1987; Kennedy y Toukdarian, 1987), así como resistentes a antibióticos o a antimetabolitos.

2.1.1 El ICR-191

El ICR-191 es una acridina altamente mutagénica en Escherichia coli y otros organismos. Los compuestos ICR son similares a la proflavina: se trata de compuestos heterocíclicos planos que además llevan una cadena de poliamida, figura 2.

Varios tipos de pruebas sugieren que los compuestos ICR producen mutaciones por desfase, (Ames y Whitfield, 1966; Roth, 1974). La mayoría de las mutaciones inducidas por ICR no revierten con mutágenos que producen sustituciones de bases, pero sí lo son por el propio ICR. Los compuestos de ICR inducen mutaciones con efectos polares, lo cual sugiere que producen cambios de fase y la polaridad se debe a que aparecen codones sin sentido en la nueva fase de lectura de la traducción. Martin (1967) y Newton (1970) demostraron que la reversión de mutaciones inducidas por ICR frecuentemente ocurre por mutación en un segundo sitio dentro del gen mutante. Estas mutaciones que originan la reversión provocan normalmente cambios de pauta de

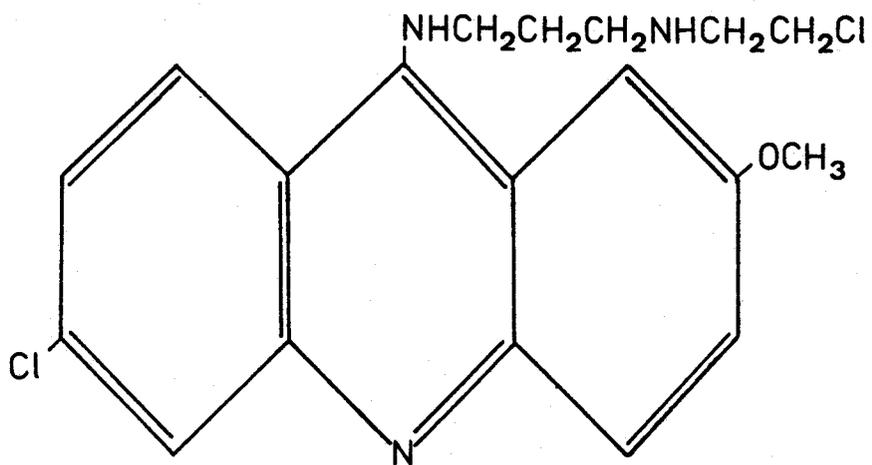


Figura 2: Esquema de la molécula de ICR-191.

lectura como puede comprobarse al estudiarlas en un contexto genético normal.

La mejor demostración de que los compuestos ICR producen cambios de fase la ofrecieron Brammer et al. (1967) y Berger et al. (1968). Estos encontraron mutaciones por desfase en el gen trpA de E. coli que se compensaban mutuamente.

2.1.2 El transposón Tn5

El transposón Tn5 fue descubierto por Berg et al. (1975) y es uno de los transposones menos específicos que se conocen. Los análisis genéticos demuestran que Tn5 se inserta en muchos loci diferentes del cromosoma de E. coli (Shaw y Berg, 1979) y en muchos sitios diferentes dentro de un mismo gen (Berg, 1977; Berg et al., 1980), aunque tiene preferencia por determinadas regiones (Berg et al., 1980; Shaw y Berg, 1979).

El transposón Tn5 determina resistencia a kanamicina y neomicina en todas las bacterias probadas y resistencia a estreptomycin en bacterias no entéricas (Putnoky et al., 1983; O'Neill et al., 1984) incluido A. vinelandii, donde ha sido estudiado recientemente y se han obtenido algunos mutantes (Contreras, 1987).

2.2 Sistemas de transferencia de material genético

La estirpe silvestre de A. vinelandii, UW carece de plásmidos endógenos que permitan transferir material cromosómico de una cepa a otra por conjugación. Tampoco se han empleado fagos para transferir material genético por transducción, a pesar de que se han descrito fagos de Azotobacter. La única utilidad, hasta ahora, de los mismos ha sido para comprobar si un cultivo de

Azotobacter está o no contaminado (Kennedy y Toukdarian, 1987). Hasta hace poco el único sistema de transferencia de DNA cromosómico que se conocía era la transformación (Page, 1978; Page y Tigerstrom, 1979). Más recientemente se ha descrito la transformación con DNA plasmídico (David et al., 1981; Glick et al., 1985). También es posible transferir material cromosómico por conjugación empleando el plásmido promiscuo del grupo IncP-1, R68.45 (Tortolero et al., 1983).

3. Azotobacter y el metabolismo del nitrógeno

3.1 Asimilación del amonio

El amonio producido por fijación, por reducción de nitrato o de nitrito, por degradación de compuestos orgánicos o tomado directamente del medio, puede ser incorporado a esqueletos carbonados por varias vías metabólicas, de las cuales las más importantes son la catalizada por la glutamato deshidrogenasa (GDH) y la catalizada por las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT) o ruta GS/GOGAT.

La GDH cataliza la aminación reductiva del 2-oxoglutarato en glutamato, figura 3. Esta reacción solo puede tener lugar a altas concentraciones de amonio debido a la alta K_m de esta enzima para el amonio.

La incorporación de amonio a esqueletos carbonados por la ruta GS/GOGAT tiene lugar en dos etapas. En la primera, una molécula de glutamato reacciona con una de amonio para dar una molécula de glutamina. Esta reacción está catalizada por la glutamina sintetasa, enzima que ha sido muy estudiada por su papel clave en el metabolismo del nitrógeno. La GS es una enzima

homomultimérica que en bacterias gramnegativas puede tener cada una de sus subunidades en forma adenilada (poco activa) o desadenilada (activa). La adenilación y desadenilación de la GS responde a la fuente de nitrógeno utilizada y es llevada a cabo por un sistema de varias enzimas. En la segunda etapa, que es catalizada por la GOGAT, se produce una transaminación desde la molécula de glutamina antes formada hasta una molécula de 2-oxoglutarato para dar como producto dos moléculas de glutamato, figura 3.

En la mayor parte de los organismos estudiados la ruta GS/GOGAT resulta ser la vía principal de incorporación de amonio a esqueletos carbonados (Tempest et al., 1973; Mifflin y Lea, 1976; Tyler, 1978), a excepción hecha de los hongos (Brown et al., 1974). Además se ha comprobado que algunas bacterias carecen de actividad GDH detectable, como por ejemplo Bacillus megaterium (Elmerich y Aubert, 1971), Rodopseudomonas capsulata (Johansson y Gest, 1976), Rhizobium (Ludwing, 1978) y en A. chroococcum (Bárcena, 1980), así como muchas cianobacterias (Meeks et al., 1977).

3.1.2 Regulación de la producción y asimilación del amonio en bacterias

El control genético de la producción de amonio y su posterior incorporación a esqueletos carbonados se ha estudiado mucho en enterobacterias. Los datos obtenidos con otras bacterias gramnegativas, como Rhizobium o Azotobacter, muestran la existencia de ciertas similitudes entre éstas y las enterobacterias, aunque se detectan diferencias importantes.

En enterobacterias, el sistema de control (ntr) está constituido por tres genes: ntrA (glnE), ntrB

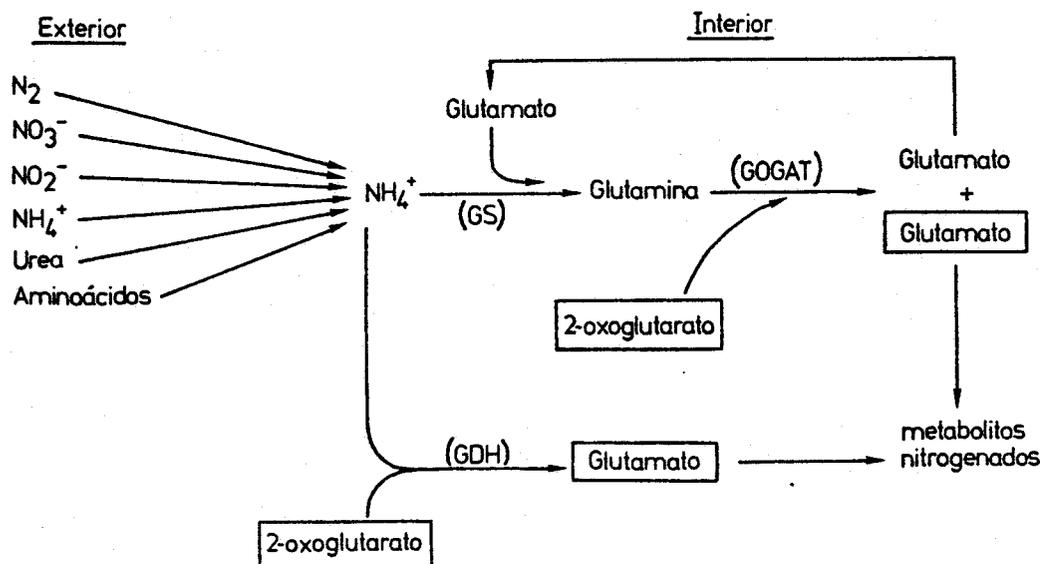


Figura 3: Vías de incorporación de amonio en bacterias.

(glnL) y ntrC (glnG). Los genes ntrB y ntrC están ligados y forman parte de un operón junto con el gen estructural de la glutamina sintetasa (glnA) (De Bruijn y Ausubel, 1981; MacFarland et al., 1981; Pahel et al., 1982). El gen ntrA, por el contrario, está localizado lejos de los anteriores. La acción conjunta de estos tres genes permite controlar la expresión de una serie de sistemas encaminados a proporcionar amonio (fijación de nitrógeno, degradación de ciertos aminoácidos, etc.) y del propio operón glnAntrBC.

Se sabe que diferentes enterobacterias, como Salmonella typhimurium (García et al., 1977), Escherichia coli (Pahel et al., 1978) o Klebsiella aerogenes (Gaillardin y Magasanik, 1978) poseen el gen ntrA. En todos los casos conocidos los mutantes ntrA⁻ son auxótrofos para glutamina e incapaces de utilizar otras vías de producción de amonio (fenotipo Ntr⁻), incluyendo la fijación de nitrógeno en K. pneumoniae (Leonardo y Goldberg, 1980). Los mutantes ntrA⁻ de A. vinelandii son también nif⁻, aunque, a diferencia de las enterobacterias, tienen glutamina sintetasa (Santero et al., 1986).

La expresión del gen ntrA es constitutiva, independiente de la fuente de nitrógeno y de la presencia de producto NtrA funcional (Merrick y Steward, 1985). En estudios realizados con ciertos plásmidos se observó que la proteína NtrA competía con la subunidad sigma-70 de la RNA-polimerasa, producto del gen rpoD, lo que sugería que la proteína NtrA podía ser un factor sigma específico para los promotores del metabolismo del nitrógeno, los cuales tienen una secuencia consenso diferente de la del resto de los promotores bacterianos, (Beynon et al., 1983; Ow et al., 1983; Ow et al., 1985). Esta suposición ha sido confirmada tras el aislamiento y

la purificación parcial de la proteína NtrA, Hirschman et al., 1985.

La función del gen ntrB no se conoce. Se ha demostrado que este gen tiene funciones represoras, ya que se pueden obtener estirpes superreprimidas que pierden este fenotipo al introducir deleciones en ntrB (Foor et al., 1978; Bueno et al., 1985). Sin embargo, también se ha observado que las deleciones de este gen no producen una alteración drástica de la regulación de la glutamina sintetasa (Chen et al., 1982). Recientemente se ha establecido que el gen ntrB tiene capacidad represora, pero su efecto solo se puede notar a concentraciones de nitrógeno intermedias. En estas condiciones los mutantes por deleción de ntrB tienen niveles sensiblemente más altos de glutamina sintetasa que la estirpe silvestre (Bueno et al., 1985). La función del producto ntrB sería la de modular los niveles de expresión de los genes del metabolismo del nitrógeno, siempre dentro de unos límites intermedios, pudiendo quizás actuar como un intermediario en la transferencia de información de la disponibilidad de nitrógeno desde los productos de los genes glnB y glnD (enzimas responsables de la adenilación y desadenilación de la glutamina sintetasa) hasta los productos de los genes ntrA y ntrC (Backman et al., 1983).

El gen ntrC ha sido objeto de numerosos estudios, en los que se ha revelado como un activador esencial para la expresión de los genes del metabolismo del nitrógeno (Kustu et al., 1979; Pahel y Tyler, 1979; Rothman et al., 1982). En el operón glnAntrBC tiene además funciones represoras, ya que mutantes ntrA⁻ (auxótrofos de glutamina) pueden revertir a protótrofos por mutaciones que inactiven ntrC, Magasanik (1982). Se podido demostrar que la proteína NtrC interacciona con

el DNA (Hirschman et al., 1985; Hawkes et al., 1985), lo que sugiere que la función activadora la realiza directamente sobre el DNA.

3.2 Asimilación del nitrato

El nitrato es la forma de nitrógeno inorgánico más abundante en los suelos y es asimilado tanto por plantas, algas y hongos como por numerosos microorganismos procarióticos. La asimilación del nitrato es, por lo tanto, un fenómeno cuantitativamente importante. Cualitativamente también tiene importancia, ya que la presencia de nitrato inhibe la fijación de nitrógeno en fijadores aerobios, como por ejemplo en A. vinelandii (Lee y Wilson, 1943; Wilson et al., 1943), A. agile (Burns, 1965; Lee y Wilson, 1943), A. chroococcum (Lee y Wilson, 1943; Zoond, 1926) y Anabaena cylindrica (Fogg, 1942). El nitrato tiene efectos negativos sobre el establecimiento de la simbiosis Rhizobium-leguminosa, impidiendo la formación de nódulos e inhibiendo la fijación de nitrógeno en los nódulos ya formados (Nutman, 1956; Virtanen et al., 1947).

Tanto en eucariotas como en procariotas, fotosintéticos o no, la reducción asimilativa del nitrato se realiza mediante dos etapas: la reducción del nitrato hasta nitrito, reacción que es catalizada por la nitrato reductasa y que supone la transferencia hasta el nitrato de 2 electrones, y la reducción del nitrito hasta amonio, en una reacción llevada a cabo por la nitrito reductasa y que supone la transferencia de 6 electrones hasta el nitrito.

3.2.1 Las nitrato reductasas asimilatorias

La nitrato reductasa asimilatoria es la primera

enzima en la reducción del nitrato hasta amonio. Se trata de una molibdo proteína que cataliza la reducción por 2 electrones del nitrato hasta nitrito en una gran variedad de organismos: bacterias, hongos, algas y plantas superiores (Payne, 1973; Guerrero et al., 1981).

Atendiendo a la especificidad del donador de electrones, se pueden distinguir dos tipos de nitrato reductasas asimilatorias: (I) Dependientes de ferredoxina, las cuales se presentan típicamente en cianobacterias y (II) dependientes de piridín nucleótidos, que se encuentran fundamentalmente en organismos eucarióticos.

En diversas cianobacterias, como Anabaena cylindrica (Hattori, 1970), Anacystis nidulans (Manzano et al., 1976) y Nostoc moscorum (Ortega et al., 1976), se ha puesto de manifiesto la existencia de una nitrato reductasa asimilatoria que puede aceptar electrones directamente desde la ferredoxina reducida, pero no desde piridín nucleótidos reducidos. La nitrato reductasa de Anacystis ha sido purificada hasta homogeneidad y parcialmente caracterizada (Manzano et al., 1978). Esta enzima es una molibdo proteína compuesta por una sola cadena polipeptídica de 75 kilodaltons de peso molecular y que carece de flavinas y citocromos (Candau, 1979).

No existen pruebas claras que demuestren que las nitrato reductasas asimilatorias de bacterias fotosintéticas utilicen ferredoxina como donador fisiológico de electrones (Guerrero et al., 1981).

En bacterias aerobias quimiótrofas se conocen pocos datos acerca de esta enzima. Si bien se ha podido detectar actividad dependiente de ferredoxina "in vitro"

en A. chroococcum (Tortolero et al., 1975), no se puede concluir que éste sea el donador fisiológico de electrones a la nitrato reductasa. La nitrato reductasa de A. chroococcum es una enzima soluble (Guerrero et al., 1973); sin embargo, A. vinelandii posee una nitrato reductasa unida a grandes partículas (Taniguchi y Ohmachi, 1960). Recientemente ha sido purificada hasta homogeneidad la nitrato reductasa asimilatoria de la bacteria también fijadora de nitrógeno Derxia gummosa (Wang y Nicholas, 1986); dicha enzima está compuesta por dos subunidades de 88 y 80 kdaltons y contiene citocromo b₅₅₇; Como donador de electrones utiliza el piridín nucleótido NADH y su actividad resulta estimulada por la presencia de FAD o FMN. En hongos, algas verdes y plantas superiores la nitrato reductasa es una molibdo proteína que contiene FAD y citocromo b₅₅₇ y que cataliza la reducción de nitrato a nitrito utilizando NAD(P)H como donador de electrones (Garret y Amy, 1978; Hewitt, 1975; Hewitt y Notton, 1980; Losada y Guerrero, 1979; Vennesland y Guerrero, 1979). De acuerdo con la especificidad mostrada por NADH o NADPH, se pueden distinguir tres tipos de nitrato reductasas.

Un tipo usa específicamente NADH y corresponde a la nitrato reductasa que se encuentra en las hojas de la mayoría de las plantas superiores (Beevers y Hageman, 1969; Beevers y Hageman, 1972; Kuo et al., 1980) y en algunas algas verdes, como por ejemplo, Chlorella (Solomonson, 1979; Syrett y Morris, 1963). Otro tipo es el encontrado mayoritariamente en algas verdes (Ahmed y Spiller, 1976; Diez et al., 1977) y en levaduras (Guerrero y Gutierrez, 1977; Rivas et al., 1973), el cual puede usar indistintamente ambas moléculas de piridín nucleótidos con aproximadamente la misma afinidad por ambas. Son por tanto dependientes de NAD(P)H. Por último, en los hongos filamentosos

Aspergillus nidulans (McDonald y Coddington, 1974) y Neurospora crassa (Pan y Nason, 1978), la nitrato reductasa usa específicamente NADPH.

3.2.2 Nitrito reductasas asimilatorias

La nitrito reductasa asimilatoria cataliza la reducción del nitrito hasta amonio en una reacción que implica la transferencia de 6 electrones. Esto es un hecho inusual ya que tan solo la nitrogenasa y la sulfito reductasa, además de la nitrito reductasa, catalizan reacciones en las que se transfieren 6 electrones. Hay una gran similitud entre la nitrito reductasa y la sulfito reductasa, pudiendo esta última reducir "in vitro" al nitrito.

Atendiendo al donador de electrones las nitrito reductasas se pueden dividir en dos grupos: (I) Dependientes de ferredoxina, características de organismos fotosintéticos y (II) dependientes de piridín nucleótidos reducidos, que se encuentran en organismos no fotosintéticos.

Las nitrito reductasas dependientes de ferredoxina son normalmente enzimas solubles que contienen como grupos prostéticos una agrupación sulfoférrica y un grupo sirohemo (Guerrero et al., 1981).

Las nitrito reductasas asimilatorias dependientes de NAD(P)H se pueden separar en tres grupos: Uno compuesto por aquellas que pueden utilizar indistintamente ambos piridín nucleótidos como donador de electrones, como la del hongo Neurospora (Garrett y Amy, 1978). Un segundo grupo lo formarían las nitrito reductasas con una marcada especificidad por el NADPH como donador de electrones, como la de la levadura

Torulopsis nitratophila (Rivas et al., 1973). Por último, un tercer grupo lo forman las enzimas que se encuentran en organismos procarióticos no fotosintéticos y tienen como donador de electrones específico al NADH. En general, las nitrito reductasas dependientes de piridín nucleótidos tienen como grupos prostéticos FAD y un grupo sirohemo (Guerrero et al., 1981).

3.2.3 Regulación de la asimilación de nitrato

En los diferentes organismos estudiados la capacidad de utilizar nitrato varía en respuesta a cambios en parámetros ambientales, la luz, la temperatura, el pH, los niveles de CO₂ y O₂, la fuente de nitrógeno y otros factores (Beevers y Hageman, 1972; Garrett y Amy, 1978; Hewitt et al., 1976; Losada y Guerrero, 1979; Morris, 1974; Syrett y Leftley, 1976; Vennesland y Guerrero, 1979).

La regulación de la reducción del nitrato hasta amonio puede tener lugar por la inactivación de las enzimas, que puede ser reversible (Interconversión metabólica) o irreversible (Degradación proteolítica) o por el control sobre la síntesis de las enzimas.

Se ha otorgado un papel importante en la regulación de esta ruta a la reducción del nitrato hasta nitrito por la nitrato reductasa, por lo que esta enzima ha sido objeto de numerosos estudios; en comparación, la reducción de nitrito hasta amonio ha sido mucho menos estudiada. Otro punto posible de regulación de la ruta es la entrada del ión nitrato al interior celular.

Existen pruebas de interconversiones metabólicas reversibles de la nitrato reductasa en algas (Losada y Guerrero, 1979; Vennesland y Guerrero, 1979). Además se

han observado inactivaciones reversibles en estudios "in vitro" en plantas (Leong y Shen, 1979; Palacián et al., 1974; Trinity y Filner, 1979; Wallace, 1975) y en la bacteria A. chroococcum (Guerrero et al., 1973).

En Neurospora se han detectado inactivadores específicos de la nitrato reductasa que tienen actividad proteasa (Sorger et al., 1978). Existen además numerosos casos descritos de degradación proteolítica de la nitrato reductasa en respuesta a cambios ambientales, tanto en plantas (Jolly y Tolbert, 1978; Kadam et al., 1974; Sherrad et al., 1979; Wallace, 1978; Yamaya et al., 1980; Yamaya y Ohira, 1976) como en hongos (Garrett y Amy, 1978; Hewitt, 1975; Sorger et al., 1978; Vennesland y Guerrero, 1979).

En cuanto al control de la síntesis de la nitrato reductasa, existen numerosos estudios en los hongos Neurospora crassa y Aspergillus nidulans. En ambos casos, la síntesis de la nitrato reductasa está sujeta a inducción por nitrato y represión por amonio y la propia enzima regula autogenamente su síntesis (Cove y Pateman, 1969; Tomsett y Garrett, 1981).

Todos los datos existentes en cianobacterias indican que el amonio actúa como represor de la asimilación de nitrato, tanto en fijadoras de nitrógeno (Bagchi y Singh, 1984; Hattori, 1962; Herrero et al., 1981; Meeks et al., 1983; Ohmori et al., 1977) como en no fijadoras (Flores et al., 1980; Manzano et al., 1976; Stevens y van Baalen, 1974). En cianobacterias no fijadoras de nitrógeno no es necesario la presencia de nitrato para la síntesis de la nitrato reductasa, obteniéndose una alta actividad de esta enzima en ausencia de nitrato y de amonio (Herrero et al., 1981). Los resultados obtenidos con cianobacterias fijadoras de

nitrógeno difieren de los anteriores, ya que muestran en su mayoría que el nitrato actúa como inductor de la síntesis de altos niveles de nitrato reductasa (Herrero et al., 1981; Meeks et al., 1983). No obstante, Bagchi y Singh (1984), encontraron que en Nostoc moscorum el nitrato no es inductor de la síntesis de nitrato reductasa, aunque es necesario para activar el sistema de transporte al interior celular.

Los estudios realizados en bacterias sobre la reducción de nitrato se han centrado fundamentalmente en nitrato reductasas disimilatorias, especialmente la de E. coli, de la cual se poseen numerosos datos bioquímicos y genéticos. La nitrato reductasa de E. coli está codificada por tres genes narG, narH y narI (Edwards et al., 1983; MacGregor, 1975) que forman una sola unidad transcripcional (Bonney-Orth et al., 1981; Edwards et al., 1983; Ingledew y Poole, 1984). La síntesis de la nitrato reductasa disimilatoria es inducida por nitrato y reprimida por oxígeno (Fimmel y Haddock, 1979; Showe y DeMoss, 1968; Stewart, 1982). Al igual que sucede en hongos, la propia enzima ejerce un control autógeno de su síntesis (Bonney et al., 1986).

En contraste con las nitrato reductasas disimilatorias la información sobre nitrato reductasas asimilatorias en bacterias es muy escasa. El sistema mejor conocido es el de Pseudomonas aeruginosa. Esta bacteria posee dos nitrato reductasas, una asimilatoria y otra disimilatoria, que son genéticamente distintas (Sias et al., 1980). Se han obtenido mutantes de P. aeruginosa incapaces de asimilar nitrato y se han dividido en tres grupos: Uno formado por mutantes que carecen de la nitrato reductasa asimilatoria, otro que carece de la nitrito reductasa asimilatoria y un último grupo que carece de ambas enzimas (Sias e Ingraham,

1979).

En A. vinelandii, Sorger (1969) obtuvo un mutante que carecía de actividad nitrato reductasa. Recientemente, se han descrito mutantes en el gen ntrA, que carecen de nitrato reductasa, nitrito reductasa y nitrogenasa (Santero et al., 1986) y mutantes en el gen ntrC, los cuales carecen de nitrato reductasa pero no de nitrogenasa (Toukdarian et al., 1986).

4. Objetivo de esta tesis

El objeto de esta tesis ha sido estudiar la genética de la asimilación de nitrato en la bacteria A. vinelandii. Se han abordado los siguientes puntos:

- 1) Estudio fisiológico de la asimilación de nitrato en estirpes silvestres.
- 2) Obtención de una amplia colección de mutantes afectados en la asimilación de nitrato.
- 3) Clasificación de dichos mutantes en distintos grupos atendiendo a diferencias fenotípicas y a la complementación con cósmidos que llevan genes reguladores ya descritos.
- 4) Caracterización fisiológica de los distintos grupos de mutantes.
- 5) Construcción de una genoteca y complementación con esta de los mutantes obtenidos.

MATERIALES Y METODOS

1. Estirpes y plásmidos utilizados

Las estirpes y plásmidos utilizados se indican en la tabla I.

2. Tampones y soluciones

-Tampón fosfato 0.5 M, pH 7.5

PO ₄ H ₂ K.....	10.88 g
PO ₄ HK ₂	73.12 g
H ₂ O.....	hasta 1 l

-Solución de Fe-EDTA

Se preparó mezclando las soluciones A y B. La mezcla se oxida burbujeando con aire durante una noche.

Solución A: EDTA ácido libre.....	16 g
KOH.....	10.4 g
H ₂ O.....	hasta 186 ml

Solución B: SO ₄ Fe.7 H ₂ O.....	13.7 g
H ₂ O.....	hasta 346 ml

-Reactivo Holmes-Bonner

Se preparó siguiendo el procedimiento descrito por Maniatis et al. (1982). Una solución de cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 24:1 se mezcla en volúmenes iguales con una solución de fenol saturada con tampón Tris-EDTA.

Tabla I: Estirpes y plásmidos utilizados

Estirpe o plásmido	Genotipo/Fenotipo o marcador	Origen o referencia
<u>Azotobacter vinelandii</u>		
UW	Silvestre	Bishop y Brill
UW136	Rif ^r	"
UW6 ^r	Nif-6(I ⁻ II ⁺) Rif ^r	C. Kennedy
AS29	<u>ntrA-9</u> Rif ^r	Santero et al. (1986)
AS30	Nif-6 Nir ⁻ Rif ^r	Esta tesis
AS31	Nif-6 <u>ntrC-1</u> Rif ^r	"
AS32	Nif-6 <u>ntrC-2</u> Rif ^r	"
AS33	Nif-6 <u>ntrC-3</u> Rif ^r	"
AS34	Nif-6 <u>ntrC-4</u> Rif ^r	"
AS35	Nif-6 Nar ⁻ Rif ^r	"
AS36	"	"
AS37	"	"
AS38	"	"
AS39	"	"
AS40	Chl ^r Nar ⁺ Rif ^r	"
AS41	"	"
AS42	"	"
AS43	"	"
AS44	"	"
AS45	"	"
AS46	"	"
AS47	"	"
AS48	"	"
AS49	"	"
AS60	Nif-6 Nar ⁻ Nir ⁻ Rif ^r	"
AS61	"	"
AS62	"	"
AS63	"	"
MV91	(Chl Nar ⁺ Nif ⁻)::Tn5 Rif ^r	"

MV92	(Chl ^r Nar ⁺ Nif ⁻)::Tn5	Esta tesis
	Rif ^r	
MV93	"	"
MV94	"	"
MV95	"	"

Escherichia coli

HB101	<u>proA2, leuB1, thil</u> <u>ara14, lacY, galK, Xyl5</u> <u>Mtl1, supE, recA13</u> <u>hsdS20, rpsL20</u>	Maniatis <u>et al.</u> (1982)
Q358	<u>hsdR_k⁻, hsdM_k⁺, supF</u> (su ⁺ _{II})	N. Pieniazek
SMR10	C-la(Lambda <u>cos2 B</u> <u>red3, gam am210</u> <u>cIts857, xisl, nin5</u>)/ lambda	N. Pieniazek

Plásmidos

pCA1	(Nar-Nir), Km ^r	Esta tesis
pGS9	Cm ^r , Km ^r (Tn5)	C. Kennedy
pHS255	(cos), Km ^r	N. Pieniazek
pLV50	(<u>glnA-ntrG</u>), Tc ^r	C. Kennedy
pLV72	(<u>ntrA</u>), Tc ^r	"
pRK2013	Km ^r , Tra ⁺	Figurski y Helinski, (1979)

-Tampón Tris-EDTA (TE)

Contiene Tris (10 mM) y EDTANa₂ (1 mM). El pH deseado se ajusta añadiendo ClH concentrado.

-Tampón TES

Contiene Tris (10 mM), EDTANa₂ (100 mM) y ClNa (150 mM). El pH es 8.0 y se ajusta con ClH.

El tampón TESL es similar, al TES, excepto que la concentración de EDTANa₂ y de ClNa es 100 veces menor.

-Tampón SMCK

Está constituido por dos soluciones preparadas y autoclavadas por separado y mezcladas antes de usar de la siguiente manera: H₂O (190 ml), solución A (8 ml) y solución B (2 ml).

Solución A: PO ₄ HNa ₂ anhidro.....	52.5 g
PO ₄ H ₂ K.....	22.5 g
H ₂ O.....	hasta 300 ml
 Solución B: ClNa.....	 10 g
ClNH ₄	20 g
Cl ₂ Mg 1M.....	20 ml
Cl ₂ Ca 1M.....	2 ml
H ₂ O.....	hasta 200 ml

-Tampón TSP

H ₂ O.....	13.2 ml
Tris.ClH 1M (pH 7.9).....	0.6 ml
Espermidina 0.25 M.....	0.6 ml
Putrescina 0.25 M.....	0.6 ml

-Tampón TEK x10

H₂O.....850 ml
 ClK..... 37.3 g
 Tris.ClH 1M (pH 8.1).....100 ml
 EDTA 0.2M (pH 7.0)..... 50 ml

-Tampón para digestiones con enzimas de restricción

Las digestiones con enzimas de restricción se realizaron con el tampón de fuerza iónica adecuada según las especificaciones de la casa comercial.

Fuerza iónica:	<u>Media</u>	<u>Alta</u>
ClNa.....	50 mM	100 mM
Tris-ClH (pH 7.5).....	10 mM	50 mM
Cl ₂ Mg.....	10 mM	10 mM
DTT.....	1 mM	1 mM

-Tampón para el ligamiento del DNA

El tampón de ligamiento se prepara concentrado 10 veces. Las concentraciones en la reacción son:

Tris-ClH (pH 7.5).....66 mM
 Cl₂Mg..... 5 mM
 DTT..... 5 mM
 ATP..... 1 mM

El ATP se prepara por separado.

-Solución SSC x10

Citrato Na..... 15 mM
 ClNa.....150 mM

-Tampón CIP x10

Tris-ClH (pH 9.0).....	1	M
Cl ₂ Mg.....	20	mM
Cl ₂ Zn.....	2	mM
Espermidina.....	20	mM

-Tampón STE x5

Tris-ClH (pH 8.0).....	100	mM
ClNa.....	500	mM
EDTA.Na ₂	10	mM

3. Medios y condiciones de cultivo

3.1 A. vinelandii

El medio mínimo utilizado para cultivar A. vinelandii ha sido el medio Burk modificado, cuya composición es la siguiente:

SO ₄ Mg.7H ₂ O.....	0.2	g
Cl ₂ Ca.2H ₂ O.....	5	mg
ClNa.....	0.2	g
Solución Fe-EDTA.....	1	ml
MoO ₄ Na ₂ .2H ₂ O.....	0.29	mg
Sacarosa.....	5	g
Tampón fosfato 0.5M (pH 7.5).....	40	ml
H ₂ O.....	hasta	1 l

Cuando fue necesario este medio mínimo se suplementó con acetato amónico (1g/l), nitrato potásico (0.8 g/l) o nitrito sódico (0.2 g/l).

Para inducir el estado competente en A. vinelandii en los experimentos de transformación se utilizó el



medio (TF) que carece de molibdato y de hierro y que lleva acetato amónico (1.1 g/l).

El medio rico no definido (BSNA) es el mismo medio mínimo suplementado con triptona (2g/l) y extracto de levadura (1g/l). Los medios sólidos contenían además agar (15g/l).

Los cultivos líquidos se incubaron a 30 °C con aireación o agitación vigorosa (250 rpm). Los medios sólidos se cultivaron también a 30 °C.

3.2 E. coli

El medio utilizado ha sido el medio rico no definido Luria-Bertani, que contiene:

Triptona.....	10 g
Extracto de levadura.....	5 g
ClNa.....	5 g
H ₂ O.....	hasta 1 l

El pH se ajusta con NaOH a 7.2.

Para experimentos de infección con el fago lambda se añadió además tris-ClH 10 mM (pH 7.5) y SO₄Mg 20 mM (medio LTM).

3.3 Agentes selectivos

Para la selección e identificación de diferentes estirpes y plásmidos se han utilizado una serie de agentes selectivos, tanto en A. vinelandii como en E. coli, a las siguientes concentraciones:

<u>Compuesto</u>	<u>Concentración (µg/ml)</u>	
	<u>A. vinelandii</u>	<u>E. coli</u>
Kanamicina (Km)	1	40
Tetraciclina (Tc)	10	10
Rifampicina (Rif)	20	20
Clorato potásico (Chl)	12550	-

4. Métodos genéticos

4.1 Aislamiento de mutantes

Durante el desarrollo de esta tesis se ha aislado una colección de mutantes utilizando los agentes mutagénicos y procedimientos que a continuación se describen.

4.1.1 Mutagénesis con ICR-191

La mutagénesis de A. vinelandii con ICR-191 se realizó partiendo de cultivos en fase exponencial. Una muestra de estos cultivos se diluyó hasta alcanzar una concentración aproximada de 5000 células/ml. Se tomó 0.1 ml de la dilución anterior y se añadió a un tubo que contenía 2.8 ml de agar de cobertera (agar 5 g/l, ClNa 5 g/l) al que previamente se le había añadido 0.1 ml de una solución de ICR-191 (100 µg/ml). El contenido del tubo se vertió inmediatamente en una caja de Petri con 22 ml de medio Burk suplementado con acetato amónico o BSNA. Las cajas de mutagénesis se incubaron en oscuridad a 30°C durante 6 días. Transcurrido este período se expusieron bajo una luz fluorescente durante 24 horas para descomponer el mutágeno.

4.1.2 Mutagénesis con Tn5

Para mutagenizar con Tn5 se ha utilizado como vehículo el plásmido pGS9. Este plásmido no puede mantenerse establemente en A. vinelandii y es susceptible de ser transferido por conjugación.

Para asegurar la máxima frecuencia de conjugación se ha empleado el plásmido pRK2013 como plásmido "ayudador" de la transferencia.

Se partió de cultivos de las estirpes HB101/pGS9 y HB101/pRK2013 en medio rico LB y de la estirpe UW136 en medio Burk suplementado con acetato amónico. El cultivo de UW136 se concentró 5 veces en tampón fosfato (x0.04). Se mezclaron 0.1 ml de cada uno de los tres cultivos sobre una placa de medio rico BSNA y se incubó durante 24 horas a 30°C. Finalizado este período, se recogió la biomasa producida y se resuspendió en 0.2 ml de tampón fosfato (x0.04). Los 0.2 ml de células se sembraron en una caja de medio Burk suplementado con acetato amónico, kanamicina y rifampicina, y se incubó a 30°C durante 4 días. Las colonias aparecidas al cabo de ese tiempo (aproximadamente $3-5 \times 10^3$) se recogieron en 5 ml de tampón fosfato (x0.04).

4.2 Conjugación

Las conjugaciones se realizaron siempre entre E. coli y A. vinelandii. Se partió siempre de cultivos crecidos hasta fase estacionaria. Se diluyeron hasta una densidad óptica de 0.15 y se incubaron de nuevo hasta 0.5-0.6. Se mezclaron 0.1 ml de la estirpe de E. coli donadora, 0.1 ml de HB101/pRK2013 y 0.1 ml de la estirpe receptora de A. vinelandii en placas de medio rico BSNA. Se incubó durante 24 horas a 30°C, se recogió la biomasa

con 0.2 ml de tampón fosfato (x0.04) y se sembró en medio selectivo.

4.3 Transformación

4.3.1 Transformación en E. coli

Para la obtención de células competentes de E. coli se siguió el método de choque térmico en Cl_2Ca (Mandell y Higa, 1970), con ligeras modificaciones. La estirpe que se pretendía transformar se cultivó en medio LB durante una noche. Una muestra de ese cultivo se diluyó 100 veces en LB y se incubó a 37°C durante 2 a 4 horas, hasta alcanzar una concentración aproximada de 10^8 bacterias/ml. En ese momento se enfrió el cultivo en hielo durante 15 minutos. Al cabo de ese tiempo, las células se centrifugaron a 10^4 rpm durante 10 minutos y se resuspendieron en la mitad del volumen inicial de Cl_2Ca 50 mM frío, manteniéndose en hielo durante 30 minutos. A continuación, la suspensión se centrifugó de nuevo y se resuspendió en un 1/100 del volumen inicial de Cl_2Ca frío, manteniéndose en hielo durante al menos 2 horas. Tras este tratamiento las células estaban competentes, se les añadía glicerol hasta una concentración final del 15%, se distribuían en tubos Eppendorf (0.2 ml/tubo) y se congelaban a -70°C. Por este procedimiento se pueden mantener en estado competente durante un período de 6 meses.

Para realizar el experimento de transformación se descongelaba una muestra de 0.2 ml, manteniéndola en hielo durante 1 hora. Una vez descongelada, se mezcló 0.1 ml de la suspensión bacteriana con el DNA correspondiente, y se dejaba en hielo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se incubaba durante 2 minutos a 42°C. La mezcla de DNA y bacterias se

inoculaba en 5 ml de medio LB previamente calentado a 37°C y se incubaba durante aproximadamente 2 horas. Por último se sembraba en medio selectivo adecuado, tras hacer las diluciones pertinentes.

4.3.2 Transformación en A. vinelandii

Para obtener células competentes se siguió el procedimiento descrito por Page y von Tigerstrom, (1979) con algunas variaciones. Se partió de preinóculos de la estirpe deseada en medio TF crecida hasta fase estacionaria. A continuación se diluyó 10 veces en el mismo medio hasta una densidad óptica de 1, tomando el cultivo un intenso color amarillo verdoso.

Para transformar con DNA cromosómico se mezclaron 0.5 ml del cultivo y 0.1 ml de la solución de DNA y se sembraron en una placa de medio Burk suplementado con acetato amónico. Se incubó durante 24 horas a 30°C. La biomasa resultante se recogió con tampón fosfato (x0.04) y se sembró en medio selectivo adecuado.

Para transformar con DNA plasmídico se utilizó el método descrito por Glick et al. (1985), ligeramente modificado. Se concentraron células competentes de 10 a 20 veces en medio TF. Se añadió la solución de DNA y se incubó a 30°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se añadió 10 volúmenes de medio TF y se incubó de nuevo a 30°C durante 1 hora. Por último se sembró en el medio selectivo adecuado con las diluciones pertinentes.

4.4 Segregación y enriquecimiento

Para permitir la expresión de alelos recesivos aparecidos por mutación o introducidos en un nuevo contexto genético por transformación se dejó en todos

los casos un período de segregación de aproximadamente 12 generaciones en un medio no selectivo. Esta segregación se llevó a cabo diluyendo las células mutagenizadas o transformadas hasta una concentración de aproximadamente 2×10^7 bacterias/ml e incubando hasta alcanzar una concentración de aproximadamente 5×10^8 bacterias/ml, repitiéndose la operación durante tres veces consecutivas.

En los experimentos de aislamiento de mutantes, a la etapa de segregación siguió otra de enriquecimiento. Para ello, las células provenientes de la segregación se recogieron por centrifugación, se lavaron tres veces con tampón fosfato ($\times 0.04$) y se inocularon a una concentración de aproximadamente 5×10^7 bacterias/ml en el medio en el cual no deben crecer los mutantes deseados y sí las bacterias silvestres. Se incubó a 30°C durante 3 horas y se añadió ampicilina y D-cicloserina a una concentración de $20 \mu\text{g/ml}$, incubándose posteriormente durante 15 horas. El cultivo resultante se sembró en placas con un factor de dilución de 1.

5. Métodos analíticos

5.1 Determinación de proteína

La determinación de proteína se realizó por el método de Lowry modificado por Markwell et al. (1978). Se utilizaron las siguientes soluciones:

Solución A:	CO_3Na_2	2	%
	NaOH.....	0.4	%
	Tartrato.NaK.....	0.16	%
	SDS.....	1	%
Solución B:	$\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	4	%

Solución C: 100 de A + 1 de B, preparar antes de usar.

Solución D: Folin 1:1 con H₂O.

El procedimiento seguido fue el siguiente: A 1 ml de cada muestra en NaOH 0.1 N conteniendo una cantidad de proteína entre 20 y 40 µg, se le añadió 3 ml de solución C. Se incubó durante 45 minutos a 30°C. Tras este tiempo se añadió 0.3 ml de solución D y se incubó 45 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se midió la absorción a 750 nm. Se hizo una recta patrón con seroalbúmina bovina en NaOH 0.1 N.

5.2 Determinación de nitrato

La determinación de nitrato se realizó según el método descrito por Cawse (1967). El procedimiento seguido fue el siguiente: Se tomó 1 ml de cada muestra con una cantidad de nitrato entre 0 y 500 nmoles. Se añadió ácido amidosulfónico (2% P/V) y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se agitó vigorosamente. A continuación se añadió 3 ml de ácido perclórico (6.65%) y se incubó durante 25 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorción a 210 nm. Se realizó una recta de calibrado con nitrato potásico.

5.3 Determinación de nitrito

La determinación de nitrito se realizó según el método descrito por Snell y Snell (1949). Para ello se utilizaron las siguientes soluciones:

Solución A: Sulfanilamida 58 mM en ClH 2.4 N.

Solución B: N'NEDA 0.69 mM.

La determinación se realizó añadiendo a 1 ml de muestra 1 ml de solución A y 1 ml de solución B. Se agitó vigorosamente y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se añadió 2 ml de H₂O y se midió la absorción a 540 nm. Se realizó una recta de calibrado con nitrito sódico.

5.4 Determinación de amonio

La determinación de amonio se realizó según el método descrito por Solorzano (1969). Se utilizaron las siguientes soluciones:

Solución A: Fenol..... 0.1 g
Etanol.....15 ml

Solución B: Nitroprusiato.Na..... 0.1 g
H₂O.....20 ml

(Guardada en botella topacio y con una duración máxima de un mes).

Solución C: Citrato.3Na..... 5 g
NaOH..... 0.25 g
H₂O.....hasta 25 ml

Solución D: Hipoclorito.Na..... 1.5 N

Solución E: 20 ml de solución C + 5 ml de solución D. Preparada antes de usar.

La determinación se realizó añadiendo a 1 ml de muestra y por este orden: H₂O (3.1 ml), Solución A (0.2 ml), Solución B (0.2 ml) y Solución E (0.5 ml). La mezcla se incubó en oscuridad durante 1 hora y se midió la absorción a 640 nm. Se realizó una recta de calibrado con acetato amónico.

6. Métodos bioquímicos

6.1 Ensayos enzimáticos

6.1.1 Obtención de extractos

Los extractos se obtuvieron por sonicación de suspensiones celulares concentradas 20 veces en tampón MOPS-KOH 25 mM (pH 7.5) + Ditione 2,6-dicloro-4-piridil sulfonato 0.5 mM, durante 5 minutos con 50 vatios de potencia a intervalos de medio minuto con 1 minuto de descanso y manteniendo el extracto en hielo. Se centrifugó a 16.000 rpm en frío durante 20 minutos y se tomó el sobrenadante para realizar las determinaciones enzimáticas.

6.1.2 Permeabilización de las células

Para ensayos de nitrato reductasa las células se permeabilizaron añadiendo tolueno (20 µg/ml) y agitando vigorosamente durante 2 minutos.

Para ensayos de glutamina sintetasa se añadió MTAB (100 µg/ml) directamente a las células en medio de cultivo y se agitó vigorosamente durante 30 segundos.

6.1.3 Actividad nitrato reductasa

El método utilizado consiste en una modificación del descrito por Guerrero et al. (1973). El ensayo se realizó con cultivos en fase exponencial. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron tres veces con tampón MOPS-KOH 0.1 M (pH 7.0) + EDTA 0.5 mM y finalmente se resuspendieron en un 1/10 del volumen inicial en el mismo tampón.

La mezcla de ensayo contenía:

MOPS-KOH 0.5 M (pH 7.0).....	0.4 ml
NO ₃ K 100 mM.....	0.2 ml
Metil viológeno 1.5 mM.....	0.2 ml
CNOK 10 mM.....	0.2 ml
Células y H ₂ O.....	0.8 ml
S ₂ O ₄ Na ₂ (8 mg/ml en CO ₃ HNa 95 mM)	0.2 ml

La mezcla de ensayo se incubó durante 60 minutos a 30°C. La reacción se paró agitando vigorosamente hasta oxidar completamente el metil viológeno reducido. Se centrifugó y se tomó 1 ml de sobrenadante para determinar la concentración de nitrito.

6.1.4 Actividad nitrito reductasa

El método utilizado es una modificación del descrito por Vega et al. (1973). El ensayo se realizó con cultivos en fase exponencial. Se recogieron las células por centrifugación y se lavaron tres veces con Tampón fosfato 12.5 mM (pH 7.5). Se resuspendieron finalmente en un volumen de un 1/10 del inicial en el mismo tampón.

La mezcla de reacción contenía:

Tampón fosfato 0.5 M (pH 7.5).....	0.2 ml
NO ₂ Na 10 mM.....	0.1 ml
Metil viológeno 1.5 mM.....	0.14 ml
H ₂ O.....	0.26 ml
Células.....	0.2 ml
S ₂ O ₄ Na ₂ (26 mg/ml en CO ₃ HNa 0.29 M)	0.2 ml

La mezcla de reacción se incubó durante 60 minutos a 30°C. La reacción se paró por agitación vigorosa hasta oxidar completamente el metil viológeno. Se centrifugó y se tomó una muestra de sobrenadante diluida 10 veces en

la que se determinó la concentración de nitrito.

6.1.5 Actividad transferasa de la glutamina sintetasa

El ensayo se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Siedel y Shelton (1979) con pequeñas modificaciones. Las células se permeabilizaron en el medio de cultivo con MTA a una concentración final de 100 µg/ml. Se utilizaron las siguientes soluciones:

Solución A: Glutamina.....73 mg
 MnCl₂.4H₂O..... 1.2 mg
 NH₂OH(ClH).....34.5 mg
 MOPS-KOH 0.25 M (pH 7.5) 4 ml
 H₂O..... 6 ml

Solución B: ADP..... 9.8 mg
 AsO₄HNa₂.7H₂O.....312 mg
 MOPS-KOH 0.25 M (pH 7.5) 5 ml
 H₂O..... 5 ml

Solución C: Cl₃Fe..... 33.3 g
 Acido tricloroacético. 60 ml
 ClH..... 7.7 ml
 H₂O.....hasta 1 l

El ensayo se realizó añadiendo a 0.2 ml de muestra 0.5 ml de solución A, 0.25 ml de B y 0.25 ml de H₂O. Los ensayos se hacían por duplicado, añadiendo a uno de los tubos 0.02 ml de Cl₂Mg (3 M). Las mezclas de reacción se incubaron durante 30 minutos a 30°C y se pararon añadiendo 2 ml de solución C. Se centrifugó y se midió la absorción del sobrenadante a 540 nm. Se realizó una recta de calibrado con L-glutamil-gamma-mono-hidroxamato.

6.2 Aislamiento de DNA

6.2.1 Aislamiento de DNA plasmídico

Para el aislamiento de DNA plasmídico, tanto desde E. coli como desde A. vinelandii, se ha seguido el procedimiento de lisis alcalina descrita por Maniatis et al. (1982). Se han utilizado las siguientes soluciones:

Solución A: Glucosa (50 mM), Tris-ClH (25 mM pH 8.0) y EDTA (10 mM pH 7.5).

Solución B: NaOH 0.2 N y SDS 1%.

Solución C: Acetato potásico (5 M pH 4.8).

El procedimiento seguido fue el siguiente: En un tubo Eppendorf se pusieron 1.5 ml de cultivo de E. coli o 5 ml de cultivo de A. vinelandii (concentrados en 1.5 ml). Se centrifugó durante 1 minuto y el sobrenadante se resuspendió en 0.1 ml de solución A conteniendo lisozima (1 mg/ml). Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se añadió 0.2 ml de solución B, se mezcló con cuidado y se incubó 5 minutos en hielo. Se añadió 0.15 ml de solución C y se incubó durante 15 minutos en hielo. Se centrifugó durante 1 minuto y el sobrenadante se pasó a un nuevo tubo Eppendorf. Finalmente se desproteinizó utilizando el reactivo de Holmes-Bonner y se precipitó con etanol absoluto, procedimientos ambos descritos en detalle por Maniatis et al. (1982).

6.2.2 Aislamiento de DNA cromosómico de A. vinelandii

Dependiendo de la futura utilización del DNA que se va a aislar, el procedimiento varía sustancialmente.

6.2.2.1 Aislamiento de DNA purificado de A. vinelandii

El método seguido ha sido descrito por Robson et al. (1984). Se cultivó A. vinelandii en medio Burk (200 ml) hasta el final de la fase exponencial. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con 25 ml de ClNa (3% P/V). Se resuspendieron en 10 ml de TES y se les añadió 1.6 ml de SDS (10%). Se incubó a 37°C durante 10 minutos. Tras esta incubación el DNA se precipitó con 1.2 ml de acetato sódico (3 M) seguido de 10 ml de isopropanol a -20°C. Se mezcló cuidadosamente y se recogió el DNA con barillas de vidrio. Se dejó secar durante 2 horas y se disolvió en 3 ml de SSC. Se añadió RNA-asa (10 µg/ml) y se incubó a 37°C durante 30 minutos. A continuación se añadió proteinasa K (0.5 mg/ml) y se incubó en agitación suave durante 4 horas a 37°C. Por último se desproteinizó usando el reactivo de Holmes-Bonner y se precipitó con etanol absoluto. Finalmente se resuspendió en 0.5 ml de TESL. La concentración de DNA se estimó espectrofotométricamente.

6.2.2.2 Aislamiento de DNA cromosómico para transformación

El procedimiento utilizado ha sido el descrito por Page y Sadoff (1976). Cultivos de 10 ml en medio Burk suplementado con acetato amónico se llevaron hasta final de la fase exponencial. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 3 ml de una solución que contiene: ClNa (1.5 M), citrato.Na₃ (15 mM) y SDS (0.2%). Se incubaron durante 90 minutos a 65°C y se agitó vigorosamente durante 2 minutos. Los lisados se guardaban a -20°C hasta su utilización.



6.3 Restricción del DNA

Las digestiones con enzimas de restricción se realizaron durante 1 hora a 30°C. 1 µl de enzima se añadió a 9 µl de DNA en tampón de restricción.

6.4 Ligamiento del DNA

Las reacciones de ligamiento se realizaron durante 15 horas a 15°C en mezclas de reacción que llevaban 1 µl de ligasa, 9 µl de DNA y tampón de ligamiento.

6.5 Desfosforilación de los extremos 5' del DNA

La desfosforilación de los extremos 5' del DNA se realizó según el procedimiento descrito en Maniatis et al. (1982). El DNA disuelto en tampón TE se llevó hasta 43 µl con H₂O. Se añadió 5 µl de tampón CIP (x10) y 1 µl de fosfatasa alcalina (CIP). Se incubó a 37°C durante 30 minutos y se volvió a añadir 1 µl de CIP, continuándose la incubación durante otros 30 minutos. Tras este tratamiento se añadió 25 µl de H₂O, 20 µl de tampón STE (x5) y 5 µl de SDS (10%) y se incubó durante 15 minutos a 68°C. Finalmente el DNA se limpió mediante el reactivo de Holmes-Bonner y posterior precipitación con etanol absoluto.

6.6 Electroforesis del DNA

Todas las electroforesis de DNA se realizaron en geles de agarosa según el procedimiento habitual descrito por Maniatis et al. (1982).

6.7 Obtención de extractos de empaquetamiento

Los extractos de empaquetamiento fueron obtenidos

a partir de una sola estirpe de E. coli (SMR10) libre de producción de fagos endógenos (Rosenberg et al., 1985).

La estirpe SMR10 se cultivó en medio LB a 30°C durante una noche. Se diluyó 100 veces en 450 ml del mismo medio y se cultivó hasta alcanzar una densidad óptica a 560 nm de 0.4. El cultivo se pasó entonces a 44°C donde se incubó durante 15 minutos con una fuerte agitación, la cual no puede cesar en ningún momento. Transcurrido este tiempo se pasó a 37°C, donde se incubó durante 90 minutos, tras lo cual se enfrió en hielo durante 5 minutos. Seguidamente se centrifugó en frío y el precipitado se resuspendió cuidadosamente en 9 ml de tampón TSP (enfriado previamente). Se centrifugó de nuevo y se resuspendió en 0.7 ml de TSP. Se repartieron alícuotas de 20 µl en tubos Eppendorf abiertos que contenían 5 µl de una solución de DMSO (2.5 µl), H₂O (2.1 µl) y ATP 0.1 M (pH 7.0) (0.4 µl) y se guardaron en nitrógeno líquido hasta su utilización.

6.8 Empaquetamiento del DNA

El procedimiento seguido fue el siguiente: Se descongelaron tubos con extractos incubandolos durante 30 segundos a 28°C y poniendolos en seguida en hielo. Se añadió 10 µl de DNA en tampón TEK, se mezcló cuidadosamente y se incubó a 28°C durante 90 minutos. Tras este tiempo se añadió 0.5 ml de SMCK tampón con 50 µg/ml de DNA-asa I y 3 µl de CH₃Cl. Se agitó hasta homogenizar completamente la suspensión y se centrifugó durante 2 minutos. Se tomó el sobrenadante y se empleó, con las apropiadas diluciones, para infectar E. coli.

La eficiencia de los extractos se comprobó empaquetando DNA de lambda EMBL4 e infectando la estirpe Q358.

6.9 Infección de E. coli por el fago lambda

Se cultivó E. coli en medio LTM durante una noche a 37°C. El cultivo se puso en hielo durante 10 minutos y se centrifugó en frío para recoger las células, las cuales se resuspendieron en la mitad del volumen inicial en SO₄Mg (10 mM). Se mezcló 0.2 ml de células así preparadas con 0.1 ml de la suspensión de fagos. Se incubó durante 15 minutos a 0°C y se sembró con agar de cobertera LTM en placas de este mismo medio.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. ESTUDIO FISIOLÓGICO DE LA ASIMILACIÓN DE NITRATO

Como ya se vió en la Introducción, la asimilación de nitrato es un proceso que suele estar regulado debido a su carácter adaptativo. Generalmente los organismos cultivados en presencia de nitrato poseen altos niveles de nitrato reductasa mientras que los niveles de los cultivados en amonio son muy bajos; los datos referentes a las nitrito reductasas asimilatorias son escasos. Se discute cual es el papel que desempeña el ión nitrato en la regulación de la nitrato reductasa tanto en la inducción de la síntesis de la enzima, como en la protección frente a la inactivación o degradación de la misma.

En este capítulo pretendemos estudiar los factores que afectan a la regulación de la nitrato reductasa y de la nitrito reductasa, así como establecer las condiciones que permitan la selección de mutantes en la reducción de nitrato y posibiliten un estudio genético de esta ruta

1.1 Determinación de la sensibilidad a clorato

El clorato es un análogo estructural del nitrato que se ha utilizado ampliamente para seleccionar mutantes incapaces de reducir nitrato tanto en hongos y algas verdes como en bacterias. El método de aislamiento se basa en la capacidad de muchas nitrato reductasas de reducir al clorato hasta clorito, el cual es un compuesto muy tóxico que envenena a las células que lo producen. Sorger (1969) obtuvo un mutante de A. vinelandii resistente a clorato que carecía de actividad nitrato reductasa. Nosotros pretendemos poner a punto

las condiciones que permitan la selección de mutantes afectados exclusivamente en la asimilación de nitrato (pueden crecer en aire con N_2 como única fuente de nitrógeno) y mutantes afectados tanto en la asimilación de nitrato como en la fijación de N_2 (necesitan nitrógeno reducido para crecer). Sabemos que ambos procesos están relacionados entre sí ya que sirven para proveer al metabolismo celular de nitrógeno reducido en forma de ión amonio. La fijación de N_2 y la asimilación de nitrato pueden compartir no solo elementos regulatorios sino estructurales, como por ejemplo las primeras etapas de la síntesis del FeMoCo y del MoCo, respectivamente.

Hemos probado la sensibilidad al clorato en placas de medio Burk suplementado con distintas concentraciones de clorato (0, 5, 10, 15, 20, 50, 100 y 200 mM) y con o sin acetato amónico (1g/l). Sembramos unas 10^7 células de la estirpe UW136 por placa de medio Burk con clorato. La sensibilidad de la cepa UW136 al efecto tóxico del clorato se puede observar desde la concentración más baja utilizada (5 mM); no obstante, aparecen algunas colonias resistentes cuyo número desciende a medida que aumenta la concentración de clorato. No se observan colonias resistentes en placas carentes de amonio y suplementadas con 50 mM de clorato; en cambio, en presencia de amonio incluso a concentraciones de clorato tan elevadas como 100-200 mM siguen apareciendo colonias que resisten el efecto tóxico del clorato. En la figura 4 se representan las curvas de crecimiento de UW136 en cuatro condiciones distintas: en medio Burk, en medio Burk con 100 mM de clorato, en medio Burk suplementado con 1 g/l de acetato amónico y en medio Burk suplementado con acetato amónico y clorato simultáneamente. La sensibilidad a clorato es clara en medio sin amonio, mientras que cuando éste se añade al

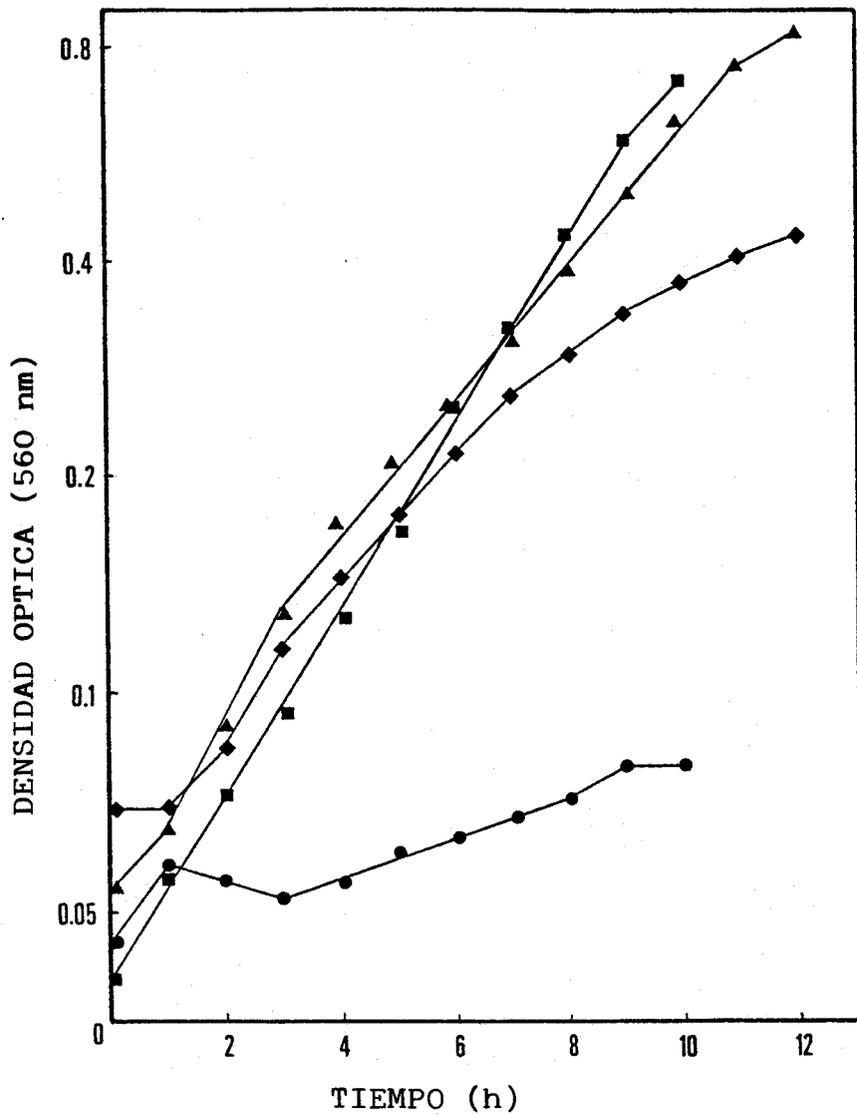


Figura 4: Curvas de crecimiento de la estirpe UW136 en medio Burk (■), Burk suplementado con acetato amónico (▲), con clorato (●) y con acetato amónico y clorato (◆).

medio tan solo se observa una cierta ralentización del crecimiento al final de la curva. Posteriormente comprobamos que disminuyendo la concentración de acetato amónico hasta 0.3 g/l, cantidad suficiente para sustentar un buen crecimiento de un mutante deficiente en la fijación de nitrógeno (UW6^r), se consiguen unas condiciones en las cuales UW136 y UW6^r son sensibles a clorato aún en presencia de dicha fuente de nitrógeno combinado. En los experimentos posteriores en esta tesis se utilizó siempre la concentración de clorato de 100 mM y cuando se suplementó con acetato amónico se hizo a la concentración de 0.3 g/l.

1.2 Ensayos de las actividades nitrato y nitrito reductasas

Se midió la actividad nitrato reductasa de cultivos de UW136 en medio Burk suplementado con nitrato siguiendo el método de Guerrero et al. (1973), tanto en células permeabilizadas con tolueno como en extractos celulares obtenidos por sonicación según se describe en Materiales y Métodos. Las actividades enzimáticas que se obtuvieron fueron muy bajas en ambos casos, como puede verse en la figura 5. La aparición de nitrito (producto final de la reacción) es casi indetectable en los extractos celulares. En las células permeabilizadas, no solo cesa la acumulación de nitrito después de los primeros cinco minutos sino que su concentración disminuye, probablemente debido a la acción de la nitrito reductasa y a la inactivación de la nitrato reductasa por la acción reductora del ditionito sobre la propia enzima. Guerrero et al. (1973) describieron un fenómeno similar con la nitrato reductasa de A. chroococcum, la cual resultaba protegida de esa inactivación durante el ensayo por la adición de

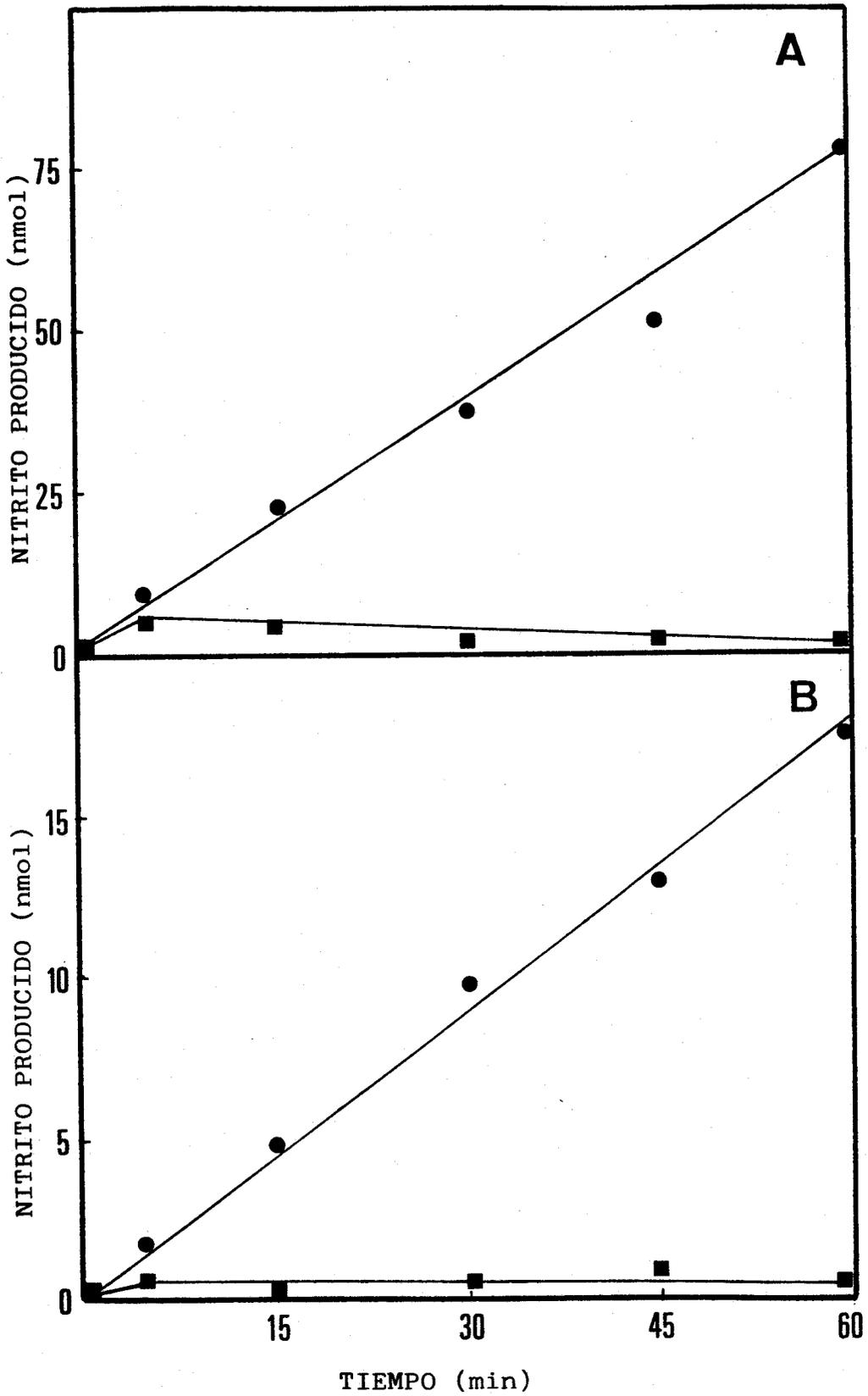


Figura 5: Actividad nitrato reductasa en células toluenizadas (A) y en extractos celulares (B), con cianato en el ensayo (●) y sin cianato (■).

cianato, por lo que repetimos los ensayos en presencia de cianato potásico (1 mM). En la figura 5 se puede ver como en A. vinelandii el cianato también tiene un efecto protector de la nitrato reductasa, permitiendo que la actividad sea lineal con el tiempo al menos durante la primera hora de ensayo, por lo que en adelante los ensayos se realizarán siempre en presencia de cianato, tal como se describe en Materiales y Métodos.

La permeabilización de las células tiene por objeto hacer más accesibles los sustratos de la reacción, entre ellos el nitrato, a la enzima. Nosotros quisimos comprobar si era posible ensayar la nitrato reductasa en células intactas, sin necesidad de permeabilizar, pues en caso afirmativo contaríamos con un método sencillo para discriminar entre los mutantes resistentes a clorato a aquellos afectados en una posible permeasa. Dichos mutantes tendrían actividad en células permeabilizadas pero no en células intactas. En la tabla II se presenta la actividad nitrato reductasa de células preincubadas en presencia de nitrato o de amonio, tanto permeabilizadas como no permeabilizadas, comprobándose que no hay diferencia entre células permeabilizadas e intactas en ninguno de los dos casos.

La actividad nitrito reductasa se ensayó según una modificación del método de Vega et al., (1973) (ver Materiales y Métodos). La actividad nitrito reductasa se midió en células enteras, resultando casi nula en células permeabilizadas con tolueno.

1.3 Inducción de la nitrato reductasa por nitrato

Con objeto de determinar la cinética de inducción por nitrato de la nitrato reductasa, cultivamos la cepa

Tabla II: Actividad nitrato reductasa en células permeabilizadas y sin permeabilizar.

	AMONIO	NITRATO
Células permeabilizadas	0.13	2.40
Células no permeabilizadas	0.12	2.20

Actividades expresadas en mU/mg.

Un cultivo de UW136 en Burk se dividió en dos subcultivos, que se incubaron durante 5 horas uno en presencia de acetato amónico (1g/l) y el otro de nitrato potásico (0.8 g/l), midiéndose la actividad nitrato reductasa en ambos subcultivos tanto toluenizando como sin toluenizar las células

UW136 en medio Burk, con aire como fuente de nitrógeno, hasta el final de la fase exponencial de crecimiento y en ese momento añadimos nitrato potásico (0.8 g/l). Se midió la actividad nitrato reductasa en muestras tomadas a intervalos de una hora. El resultado obtenido se muestra en la figura 6, pudiéndose observar que incluso tras 9 horas de incubación en nitrato no se ha alcanzado aún la saturación de la inducción. Esta extremada lentitud de la inducción de la nitrato reductasa representa una dificultad a la hora de estudiar el efecto de distintos compuestos o combinaciones de compuestos sobre la síntesis de esta enzima, ya que si la incubación se prolonga en exceso, las condiciones finales diferirán mucho de las iniciales tanto en cuanto a la concentración de los compuestos como al estado metabólico celular. Por esta razón, los ensayos enzimáticos de los siguientes experimentos de inducción y/o represión de la síntesis de la nitrato reductasa se hicieron tras incubaciones de 5 horas, a pesar de que las actividades no son las máximas posibles.

1.4 Actividades de las nitrato y nitrito reductasas en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno

Con objeto de determinar el efecto de distintos compuestos nitrogenados sobre la actividad de las nitrato y nitrito reductasas, se midieron estas actividades en células de UW136 cultivadas en medio Burk libre de nitrógeno e incubadas durante 5 horas en presencia de nitrato, nitrito, amonio o solo aire como fuente de nitrógeno. El resultado se muestra en la tabla III. Tanto la nitrato como la nitrito reductasa tienen niveles elevados cuando las células se incuban con nitrato o nitrito y bastante bajos (basales) cuando se incuban con amonio o dinitrógeno (aire), siendo también

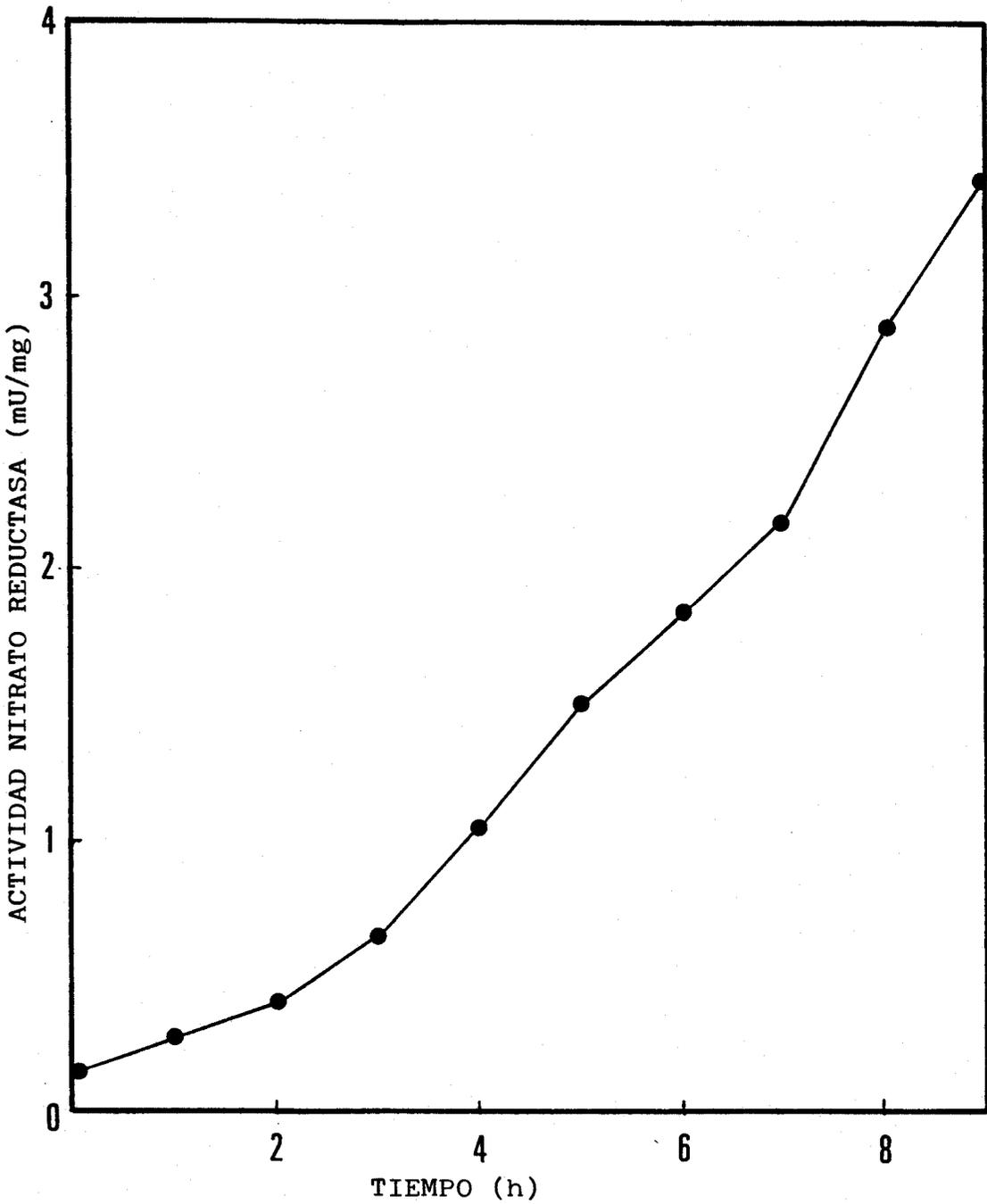


Figura 6: Cinética de inducción de la nitrato reductasa. Se añadió nitrato potásico (0.8 g/l) a un cultivo de UW136 en medio Burk y dinitrógeno. Se tomaron muestras a intervalos de 1 hora y se determinó la actividad nitrato reductasa.

Tabla III: Actividades nitrato y nitrito reductasas en diferentes fuentes de nitrógeno.

Fuente de nitrógeno	Nitrato reductasa (mU/mg)	Nitrito reductasa (mU/mg)
N ₂	0.35	1.18
ClNH ₄	0.27	2.23
NO ₂ Na	1.37	10.07
NO ₃ K	5.39	22.94

Se tomaron alícuotas de un cultivo de UW136 en Burk, se les añadió: nada (N₂), ClNH₄ (1 g/l), NO₂Na (0.3 g/l) o NO₃K (0.8 g/l), se incubaron en agitación durante 5 horas y se midieron las actividades nitrato y nitrito reductasas

en ambos casos, mayores las actividades obtenidas en presencia de nitrato que de nitrito.

1.5 Actividades nitrato y nitrito reductasas en células con hambre de nitrógeno

La baja actividad de ambas reductasas cuando las células se incuban con dinitrógeno, según vimos en el experimento anterior, podría deberse a la falta de inductor o a la represión ejercida por el amonio producido por la nitrogenasa, de manera que el incremento de ambas actividades en presencia de nitrato o de nitrito se debería más bien a la ausencia de una fuente alternativa de nitrógeno que reprimiera la síntesis de ambas reductasas que al efecto inductor de estos compuestos, si bien esto no explicaría la diferencia de actividad entre células incubadas con nitrato y con nitrito (tabla III). Para comprobar que la inducción de las nitrato y nitrito reductasas no se logra aún cuando las células se encuentren en condiciones de falta de nitrógeno, sino que se requiere la presencia de inductor, medimos la actividad enzimática de un mutante defectivo en la fijación de nitrógeno en un medio deficiente en nitrógeno. Esto se consiguió cultivándolo en medio Burk suplementado con urea (2 mM), la cual provee de nitrógeno suficiente para conseguir una cierta masa celular pero insuficiente para crecer hasta una concentración celular normal, deteniéndose el crecimiento del cultivo por falta de nitrógeno. El resultado obtenido, así como el de un control al que además se le añadió nitrato se presenta en la tabla IV, pudiéndose ver que solo si se añade nitrato hay aumento de ambas actividades.

Tabla IV: Actividades nitrato y nitrito reductasas en células con hambre de nitrógeno

	Nitrato reductasa (mU/mg)	Nitrito reductasa (mU/mg)
+NO ₃ K	2.82	10.83
-NO ₃ K	0.06	1.14

La estirpe Nif⁻ UW6^r fué cultivada durante 2 días en medio Burk suplementado con urea (2 mM) o durante 1 día con urea (2 mM) y nitrato (0.8 g/l). Se midieron las actividades nitrato y nitrito reductasa en ambos casos.

1.6 Efecto del medio fresco sobre las actividades nitrato y nitrito reductasas

Al realizar determinados experimentos observamos que si las células de un cultivo no inducido son transferidas a un medio fresco se obtienen unas actividades anormalmente altas en ausencia de inductor. Para estudiar este fenómeno, cultivamos la cepa UW136 en medio Burk para después transferir las células a un medio Burk de refresco, suplementado o no con acetato amónico, tomamos muestras a diferentes tiempos y medimos las actividades nitrato y nitrito reductasa en cada caso. El resultado se muestra en la figura 7, en la cual se vé como se produce un rápido aumento de ambas reductasas incluso en presencia de amonio, alcanzandose el máximo entre los 30 y 60 minutos después del cambio de medio. Las dos enzimas resultan estables incluso en presencia de amonio, decayendo las actividades específicas por el aumento de la proteina del cultivo, figura 7A y B, pero manteniendose constantes las actividades absolutas, figura 7C y D.

Para comprobar si esta subida de ambas actividades se debía a un súbito aumento de la concentración de la fuente de carbono, se tomó una alícuota a la cual no se le cambió de medio, sino que se le añadió sacarosa, figura 7A y B, no encontrandose ningún efecto sobre ninguna de las dos actividades.

1.7 Efecto de la aireación sobre la actividad nitrato reductasa

A. vinelandii es una bacteria aerobia estricta que posee una elevada capacidad respiratoria. Para comprobar si el grado de aireación del cultivo tenía algún efecto

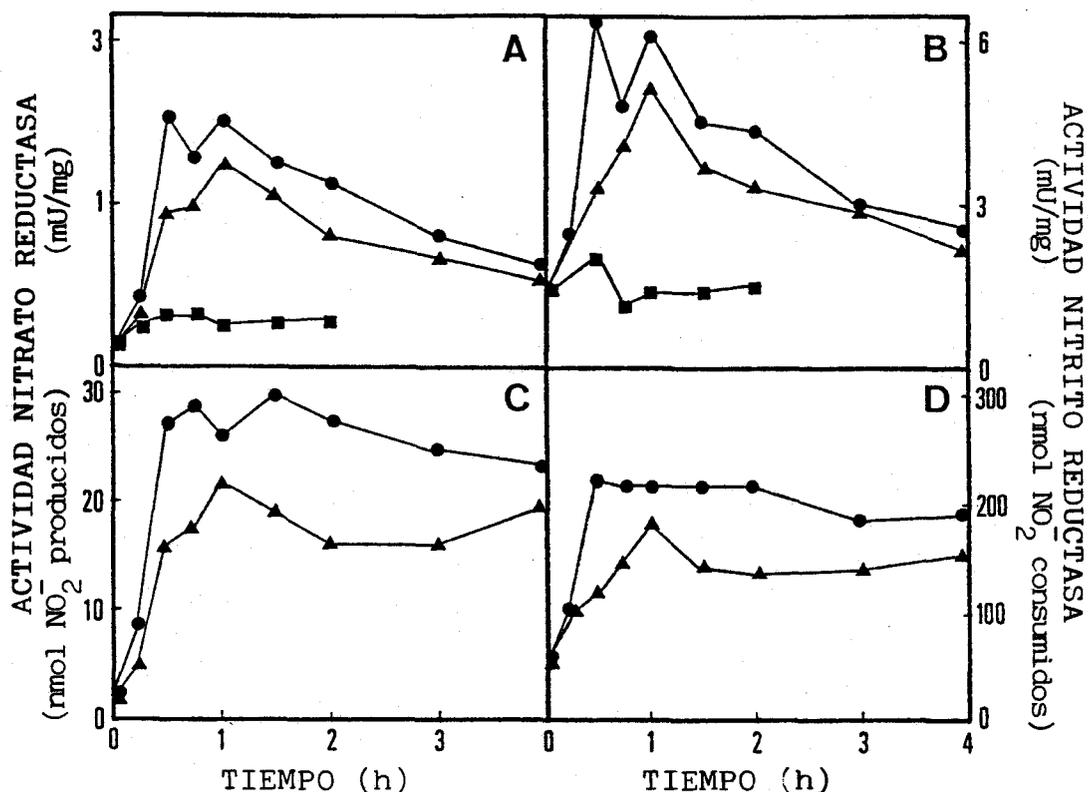


Figura 7: Efecto del medio fresco sobre las actividades nitrato y nitrito reductasa. Un cultivo de la estirpe UW136 en medio Burk a mitad de la fase exponencial de crecimiento, se repartió en 3 subcultivos: Uno se transfirió a medio Burk (●), otro a medio Burk suplementado con acetato amónico (1 g/l) (▲) y otro no se cambió de medio sino que fue suplementado con sacarosa (5 g/l) (■). Las actividades específicas se muestran en (A) nitrato reductasa y (B) nitrito reductasa. Las actividades absolutas se muestran en (C) nitrato reductasa y (D) nitrito reductasa.

sobre el nivel de actividad de la nitrato reductasa se dividieron dos cultivos de UW136, uno en medio Burk suplementado con nitrato y el otro sin suplementar, en dos subcultivos cada uno, incubándose durante 5 horas un subcultivo de cada cultivo con aireación vigorosa y el otro subcultivo con agitación. Se midió en cada subcultivo la actividad nitrato reductasa. El resultado se muestra en la tabla V, pudiéndose observar que tanto la actividad inducida con nitrato como la no inducida, fueron casi el doble cuando las células se incubaron con aireación que cuando se incubaron con agitación.

1.8 Efecto del amonio sobre las actividades nitrato y nitrito reductasa

Como ya se vió anteriormente en la Introducción, la adición de amonio suele tener como efecto inmediato la detención del consumo de nitrato en todos los organismos estudiados. La hipótesis más aceptada es que este fenómeno se produce por una inhibición del transporte del ión nitrato al interior celular y no por una inhibición de la actividad nitrato reductasa. Para comprobar el efecto a corto plazo del amonio sobre ambas reductasas, tomamos un cultivo de UW136 en Burk suplementado con NO_3K y le añadimos acetato amónico (1 g/l), incubamos durante 15 minutos y medimos las actividades nitrato y nitrito reductasas antes y después de la adición e incubación en presencia de amonio. El resultado obtenido se muestra en la tabla VI. Se pudo observar que la adición de amonio no afecta a ninguna de las dos reductasas. Hay que señalar también que los ensayos enzimáticos, como en todos los demás experimentos, se realizaron con células enteras, por lo que no se halló ningún efecto sobre un posible transporte de nitrato en las condiciones en las que se

Tabla V: Efecto del grado de aireación del cultivo sobre la actividad nitrato reductasa

Fuente de nitrógeno	Actividad nitrato reductasa (mU/mg)	
	aireación	agitación
N ₂	0.70	0.34
NO ₃ K	7.29	4.29

Cultivos de UW136 en Burk y Burk con NO₃K se dividieron en dos subcultivos cada uno, incubándose un subcultivo en aireación vigorosa y el otro en agitación a 250 rpm. Trás 5 horas se midió la actividad nitrato reductasa en cada uno de los subcultivos.

Tabla VI: Efecto del amonio sobre las actividades
nitrato y nitrito reductasas

	Nitrato reductasa (mU/mg)	Nitrito reductasa (mU/mg)
-AMONIO	8.61	34.75
+AMONIO	8.77	29.94

Se cultivó UW136 en Burk suplementado con NO_3K (0.8 g/l); en mitad de la fase exponencial de crecimiento se tomó la mitad del cultivo y se le midieron las actividades de ambas reductasas. La otra mitad del cultivo se suplementó con acetato amónico (1 g/l) y se incubó durante 15 minutos, midiéndosele también ambas actividades.

realizaron dichos ensayos.

1.9 Represión de la síntesis de las nitrato y nitrito reductasas por amonio con diferentes fuentes de carbono

Se sabe que la regulación de la nitrato reductasa está relacionada con el metabolismo del carbono en casi todos los organismos donde se ha estudiado. En primer lugar, para que haya consumo de nitrato se necesita una fuente de carbono utilizable por las células y, en segundo lugar, se ha visto en muchos de los organismos estudiados que para que el amonio ejerza su acción represora es preciso que se incorpore a esqueletos carbonados. Sin embargo, no se ha estudiado el efecto que pueda tener la fuente de carbono en la capacidad del amonio para reprimir la síntesis de la nitrato reductasa. Nosotros hemos estudiado esto tanto en la nitrato reductasa como en la nitrito reductasa, utilizando sacarosa como fuente de carbono "rica" y 2-oxoglutarato y acetato como fuentes de carbono "pobres". Los experimentos se realizaron cultivando la cepa UW136 en medio Burk con sacarosa, 2-oxoglutarato o acetato (5 g/l en los tres casos) como fuente de carbono. Se tomaron los cultivos a mitad de la fase exponencial de crecimiento, se dividieron en alícuotas a las que se suplementó con NO_3K (0.2 g/l) y diferentes concentraciones de ClNH_4 . Tras 5 horas de incubación en agitación se midió la actividad nitrato reductasa y en algunos puntos también la nitrito reductasa. El resultado obtenido con sacarosa y 2-oxoglutarato como fuentes de carbono se muestra en la figura 8, pudiéndose ver como la represión es más fuerte en 2-oxoglutarato que en sacarosa, donde incluso a la concentración de 1 g/l de ClNH_4 no se alcanza el nivel basal en ninguna de las reductasas. La actividad nitrito reductasa tiene un

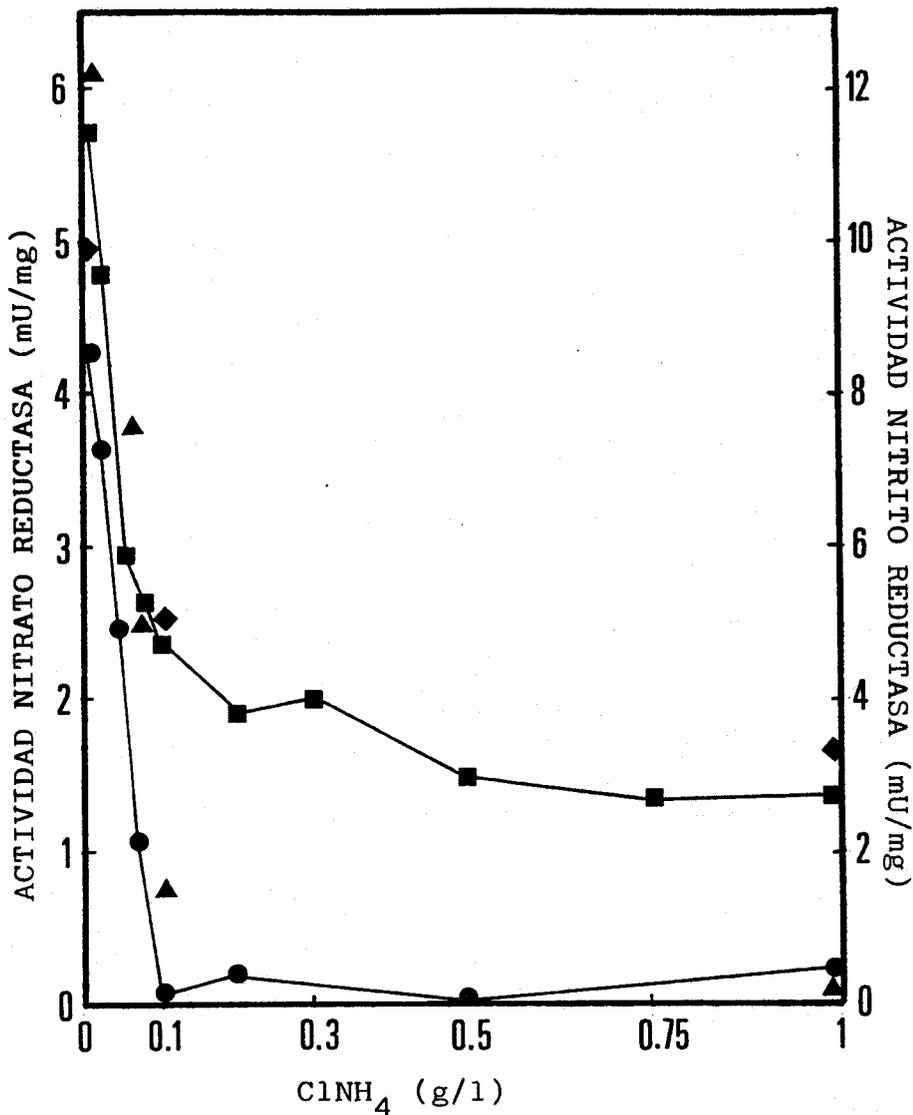


Figura 8: Represión por amonio de la síntesis de la nitrato reductasa y la nitrito reductasa en función de la fuente de carbono. Se cultivó UW136 en Burk con sacarosa (5g/l) o 2-oxoglutarato (5g/l) como fuente de carbono. A mitad de la fase exponencial se dividieron los cultivos en alícuotas a las que se suplementó con nitrato potásico (0.2 g/l) y cloruro amónico a diferentes concentraciones. Se incubó en agitación (250 rpm) durante 5 horas y se determinó la actividad nitrato reductasa y en algunas concentraciones de amonio también la nitrito reductasa. (■) Actividad nitrato reductasa en sacarosa y (●) en 2-oxoglutarato. (◆) Actividad nitrito reductasa en sacarosa y (▲) en 2-oxoglutarato.



comportamiento similar a la nitrato reductasa. Con acetato se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con 2-oxoglutarato.

DISCUSION

Como ya había sido descrito por Sorger (1969), A. vinelandii es sensible a clorato cuando se cultiva en medio Burk fijando nitrógeno. Nosotros hemos comprobado este hecho (figura 4) y hemos buscado condiciones en las cuales siga mostrandose sensible incluso en presencia de una fuente de nitrógeno reducido capaz de sustentar el crecimiento completo de un mutante defectivo en la fijación de nitrógeno, lo que se consigue con una concentración de clorato de 100 mM y de acetato amónico de 0.3 g/l. Esto nos permitirá la búsqueda de mutantes afectados simultaneamente en la reducción de nitrato y en la fijación de nitrógeno, así como obtener mutantes a partir de una estirpe Nif^- , con lo cual se podrá ver facilmente la capacidad de estos mutantes de utilizar nitrato o nitrito como fuente de nitrógeno.

El ensayo de la actividad nitrato reductasa resultó ser muy ineficiente. En extractos celulares no se detecta casi actividad y en células permeabilizadas la reacción se detiene a partir de los primeros 5 minutos de ensayo. La adición de cianato en el ensayo ha permitido obtener una cierta actividad en extractos celulares y hacer lineal el ensayo hasta al menos una hora con células permeabilizadas, figura 5. Este fenómeno es similar al descrito por Guerrero et al (1973) en A. chroococcum. La permeabilización de las células es innecesaria tanto en células cultivadas en nitrato como en amonio, obteniendose los mismos resultados con células enteras, tabla II.

La adición de nitrato a un cultivo creciendo en dinitrógeno provoca el aumento de la actividad nitrato reductasa (figura 6). Este proceso resulta ser

extremadamente lento por lo que es lógico pensar que no se trata de una activación de enzima preexistente inactiva, sino de síntesis de novo. En la tabla III se observa como cultivos preincubados en nitrato o nitrito tienen niveles elevados tanto de nitrato reductasa como de nitrito reductasa (mayores en nitrato que en nitrito), mientras que en amonio o dinitrógeno ambas actividades son muy bajas, resultado similar al obtenido por Guerrero et al (1973) para la nitrato reductasa en A. chroococcum. Esto, unido a que como se muestra en la tabla IV, en células cultivadas en hambre de nitrógeno no se elevan los niveles de ninguna de las dos enzimas, nos lleva a concluir que tanto la nitrato como la nitrito reductasa son enzimas inducibles por nitrato y en menor medida por nitrito.

Las actividades de ambas enzimas también aumentan cuando las células se transfieren a un medio fresco, sucediendo esto incluso en presencia de amonio, figura 7. Esta subida de actividad de ambas enzimas alcanza el máximo nivel entre los 30 y 60 minutos después del cambio de medio y se mantiene constante en valores absolutos, decreciendo lentamente en valores específicos debido al aumento de proteína del cultivo. Esto indica que ambas enzimas son muy estables, manteniéndose activas incluso en ausencia de los sustratos y presencia de amonio. La adición de amonio a un cultivo crecido en nitrato, no afecta a los niveles de actividad de ninguna de las dos enzimas, tabla VI. Por todo esto cabe concluir que no hay ningún efecto de inactivación o degradación de ninguna de las dos enzimas por presencia de amonio o ausencia de nitrato.

Otro factor que incide en el nivel de actividad nitrato reductasa de un cultivo es el grado de aireación de este, en la tabla V se observa que tanto la actividad

basal como la inducida son claramente mayores cuando se airea vigorosamente un cultivo que cuando se le incubaba en agitación.

El papel represor del amonio sobre las dos reductasas se estudió en relación con la fuente de carbono. En la figura 8 se observa como el amonio es capaz de reprimir la síntesis de las nitrato y nitrito reductasas hasta los niveles basales a la concentración de 0.1 g/l y con 2-oxoglutarato como fuente de carbono (con acetato se obtienen resultados similares) mientras que si la fuente de carbono es sacarosa la represión no es total para ninguna de las reductasas incluso a la concentración de 1 g/l. Tampoco en A. chroococcum el amonio reprime totalmente la actividad nitrato reductasa, Guerrero et. al., (1973) encontraron que cultivos de A. chroococcum crecidos con nitrato amónico como fuente de nitrógeno tenían aproximadamente un tercio de la actividad obtenida cuando se crecía con nitrato.

2. OBTENCION DE MUTANTES

2.1 Mutagénesis con ICR-191

Hemos utilizado la acridina ICR-191 para obtener mutantes en A. vinelandii porque produce mutaciones por desfase de la pauta de lectura, Roth (1974), lo cual conlleva normalmente la pérdida completa de la función afectada, generando mutantes con fenotipo "cero" (no rezumantes), mucho más fácilmente interpretables y de más fácil manejo.

Las mutagénesis se llevaron a cabo en placas con medio sólido, de manera que ésta se produce al tiempo que se forma y crece la colonia. Las bacterias se sembraban en agar de cobertera al cual se había añadido previamente el ICR-191, según se especifica en Materiales y Métodos.

2.1.1 Letalidad y mutagenicidad del ICR-191

La sensibilidad de A. vinelandii al mutágeno, así como la concentración óptima para la obtención de mutantes se determinaron a partir de una curva dosis-respuesta. Esta se realizó sembrando entre 500 y 1000 bacterias por placa de medio Burk suplementado con acetato amónico con diferentes concentraciones de ICR-191. Tras 6 días de incubación a 30°C en la oscuridad y un día de incubación a la luz para destruir el mutágeno, ver Materiales y Métodos, se comprobó la frecuencia de mutantes aparecidos en cada concentración de ICR-191. Se eligió la resistencia a clorato como marcador de la eficiencia de la mutagénesis, palilleándose 100 colonias crecidas en cada dosis en

medio Burk suplementado con clorato.

Dado que la mutagénesis se realiza durante el crecimiento de la colonia, esta termina siendo un conjunto heterogéneo de bacterias silvestres y mutantes de diverso tipo. De hecho cada colonia es en sí una mutagénesis independiente. Por esta razón, las cruces hechas en medio con clorato no son homogéneamente resistentes o sensibles, creciendo o no según el caso, sino que contienen o no bacterias resistentes a clorato, por lo que aparecen o no colonias dentro de cada cruz. En la figura 9 se puede observar como hay una disminución casi lineal de la supervivencia con el aumento de la concentración de ICR-191 y un aumento del porcentaje de cruces donde aparecen colonias resistentes a clorato, obteniéndose el máximo (93%) a la concentración de ICR-191 de 4 $\mu\text{g/ml}$. La ligera disminución de mutantes que se observa al aumentar la concentración del mutágeno probablemente se deba a que con el aumento de la cantidad de ICR-191 no solo disminuye el número de colonias que aparecen, sino que estas son de menor tamaño y por tanto contienen menos bacterias.

En todos los demás experimentos utilizaremos el ICR-191 a la concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$.

2.1.2 Obtención de mutantes auxotróficos y Nif^-

Para probar la eficiencia mutagénica del compuesto ICR-191 en la inducción de mutaciones no seleccionables tales como auxotrofías o pérdida de la capacidad de fijar nitrógeno, mutagenizamos la estirpe UW136 en medio completo (BSNA).

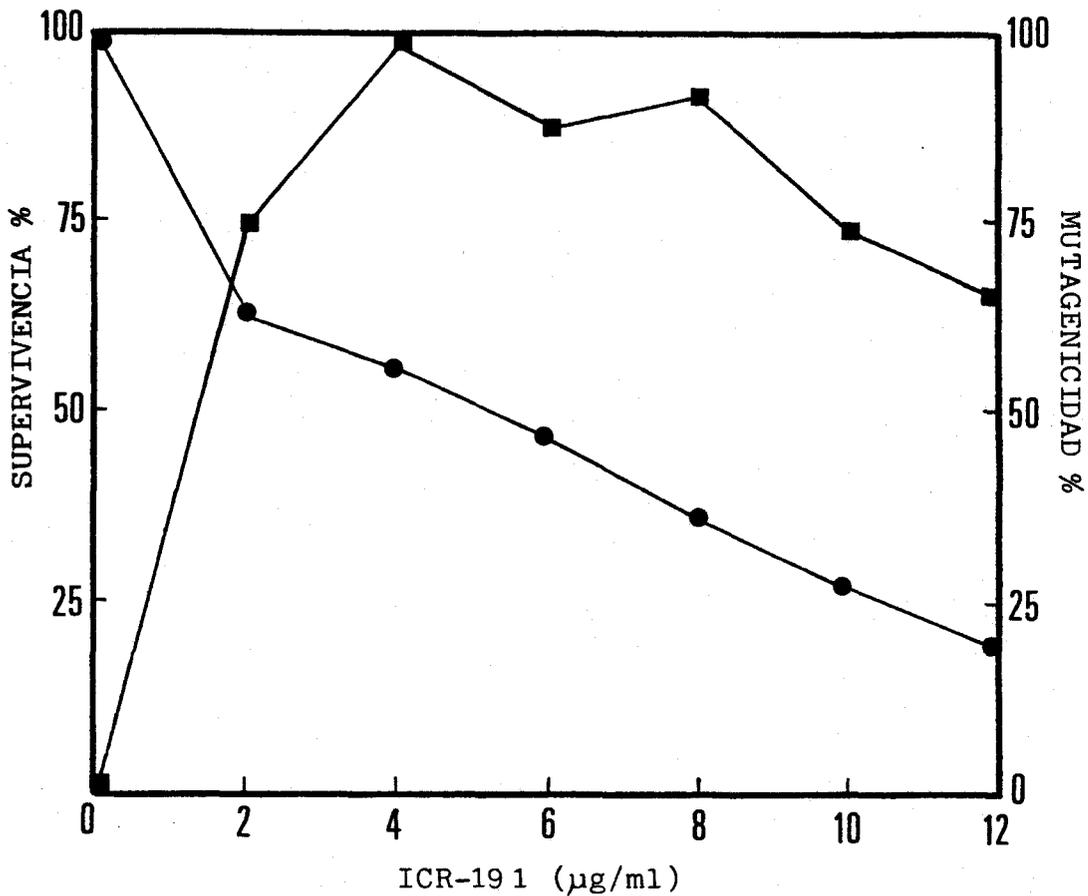


Figura 9: Supervivencia y mutagenicidad del ICR-191. Se mutagenizó la estirpe UW136 en placas con ICR-191 durante 6 días. (●) Representa el % de colonias aparecidas con respecto al control sin ICR. 100 colonias de cada concentración se sembraron mediante cruces con palillos en medio Burk con clorato, (■) representa el % de cruces en las que aparecieron colonias resistentes a clorato.

A. vinelandii posee un elevado número de copias del cromosoma por bacteria (Sadoff et. al., 1979), por lo que tuvimos que hacer recrecimientos postmutagénicos para permitir que los alelos mutantes recesivos segreguen de los silvestres que los enmascaran hasta enriquecer en copias mutantes suficientes para que se exprese la mutación. Esto se realizó haciendo 5 subcultivos en BSNA sembrando en cada uno de ellos 5 colonias mutagenizadas. Después de aproximadamente 12 generaciones se enriqueció en auxótrofos y mutantes Nif⁻ con ampicilina y D-cicloserina, según se indica en Materiales y Métodos, y se sembró en placas de medio BSNA. Las colonias aparecidas se probaron en medio Burk, donde no pueden crecer ni auxótrofos ni Nif⁻, obteniéndose un elevado porcentaje de mutantes de ambos tipos (tabla VII), que oscilaba entre el 5.6 y el 45%.

Se tomaron 10 mutantes de cada cultivo y se probó su capacidad para crecer en Burk suplementado con acetato amónico (mutantes Nif⁻). Los que dieron resultado negativo fueron sometidos al test de Holliday (1956), con objeto de determinar su auxotrofia. En la tabla VII se observa como muchos mutantes resultaron ser Nif⁻ y como, salvo en 2 mutantes Met⁻, no se pudieron identificar las auxotrofías de la mayor parte de los mutantes obtenidos, resultando todos ellos requerir triptona y mostrándose incapaces de crecer en medio mínimo suplementado con aminoácidos o casaminoácidos, por lo que se les designó como mutantes Triptona⁻.

2.1.3 Obtención de mutantes no utilizadores de azúcares

Dada la dificultad para identificar las auxotrofías en A. vinelandii, buscamos mutantes no utilizadores de azúcares. Para ello procedimos a

Tabla VII: Obtención de mutantes auxotróficos y Nif⁻

Subcultivo	% de auxótrofos o Nif ⁻	fenotipos
I	5.6	1 Nif ⁻ , 9 Triptona ⁻
II	45.0	10 Nif ⁻
III	6.5	2 Met ⁻ , 8 Triptona ⁻
IV	30.1	10 Triptona ⁻
V	22.2	6 Nif ⁻ , 4 Triptona ⁻

Se mutagenizó UW136 con ICR-191 en placas de medio BSNA. Se hicieron 5 cultivos partiendo de 5 colonias mutagenizadas cada uno. Tras 12 generaciones de segregación postmutagénica en BSNA se enriqueció en auxótrofos y Nif⁻, se sembró en placas de BSNA y las colonias aparecidas se probaron en medio Burk (% de auxótrofos o Nif⁻). Se caracterizó a 10 mutantes de cada cultivo. Los mutantes Triptona⁻ solo crecen cuando se suplementa el medio con triptona.

mutagenizar la cepa UW6^r en medio Burk suplementado con acetato amónico. Hicimos 5 subcultivos, como en el experimento anterior, en medio Burk con acetato amónico y, tras un período de recrecimiento de unas 12 generaciones, enriquecimos en mutantes no utilizadores de un azúcar diferente en cada subcultivo. Tras el enriquecimiento sembramos en medio Burk sólido con acetato amónico y probamos la capacidad de utilizar el azúcar pertinente de 1000 colonias de cada subcultivo, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla VIII, donde se observa una gran fluctuación en la aparición de mutantes, desde el 50.8% de Rhamnosa⁻, hasta el 0.1% de Sorbosa⁻ o 0% de Melibiosa⁻. Esta fluctuación puede deberse, al menos en parte, al pobre enriquecimiento habido en sorbosa, melibiosa y rafinosa, ya que estos azúcares no son buenas fuentes de carbono para A. vinelandii.

2.1.4 Obtención de mutantes resistentes a clorato a partir de la estirpe UW136

La estirpe Nif⁺ UW136 resulta adecuada para buscar mutantes afectados simultáneamente en la reducción de nitrato y la fijación de nitrógeno. Por esto procedimos a mutagenizar esta cepa con ICR-191 en placas de medio Burk con acetato amónico. Probamos la capacidad de crecer de más de 1000 colonias en medio Burk suplementado con clorato y acetato amónico. Obtuvimos unos 1000 mutantes, a los cuales probamos la capacidad de crecer en medio Burk suplementado con diversas fuentes de nitrógeno.

En la tabla IX se presentan los cuatro tipos de mutantes resistentes a clorato, clasificados según su crecimiento en distintos medios. Los del tipo I, que

Tabla VIII: Obtención de mutantes no utilizadores de azúcares

Cultivo	Azucar	% de no utilizadores
I	Rhamnosa	50.8
II	Sorbosa	0.1
III	Rafinosa	0.4
IV	Galactosa	1.7
V	Melibiosa	0

Se mutagenizó a la estirpe UW6^r en medio Burk suplementado con acetato amónico. Se hicieron 5 subcultivos partiendo de 5 colonias mutagenizadas en cada uno. Tras 12 generaciones de segregación postmutagénica en medio Burk con acetato amónico se enriqueció en un azúcar diferente en cada cultivo. Se sembró en placas de medio Burk con acetato amónico y se probaron 1000 colonias de cada cultivo en el azúcar en que se había enriquecido.

Tabla IX: Tipos fenotípicos de mutantes resistentes a clorato obtenidos a partir de UW136

Tipo	N ₂	NO ₃ K	NO ₂ Na	NH ₄ ⁺	ClO ₃ K	ClO ₃ K+NH ₄ ⁺
I	+	n.c.	n.c.	+	+	+
II	+	n.c.	n.c.	+	-	+
III	-	-	+	+	-	+
IV	-	-	-	+	-	+

Distintos tipos fenotípicos de crecimiento de los mutantes resistentes a clorato obtenidos de UW136.

+ Indica crecimiento

- Indica ausencia de crecimiento

n.c. Indica no comprobado porque al tratarse de estirpes Nif⁺ tendrían que cultivarse en una atmósfera carente de nitrógeno.

comprende a la gran mayoría de los mutantes, son resistentes a clorato (Chl^+) y Nif^+ . Los mutantes del tipo II son también Nif^+ , pero resisten al clorato solo en presencia de amonio, siendo sensibles si el medio está libre de nitrógeno. Retuvimos 10 de estos mutantes, los nombrados AS40 a AS49, para un estudio más detallado. El tipo III lo forma un solo mutante que posee el fenotipo $\text{Nif}^- \text{Nar}^-$ (no reductor de nitrato) pero es capaz de utilizar nitrito como fuente de nitrógeno (Nir^+). Esta estirpe resultó llevar dos mutaciones distintas, pudiéndose separar el fenotipo Nif^- del Nar^- mediante pruebas de reversión. Dado que este era el fenotipo esperable en mutantes afectados simultáneamente en la síntesis de los cofactores de molibdeno y de hierro-molibdeno, buscamos más mutantes y para ello hicimos 10 cultivos partiendo de 5 colonias mutagenizadas en cada uno, dimos un período de recrecimiento de 12 generaciones en medio Burk con nitrito, enriquecimos en mutantes Nif^- en medio Burk y seleccionamos resistentes a clorato en placas de medio Burk con clorato y acetato amónico. Obtuvimos mutantes resistentes a clorato en 4 de los cultivos, teniendo la mayoría de las colonias el fenotipo deseado (Tipo III). Sin embargo, de nuevo estas estirpes resultaron ser dobles mutantes, según las pruebas de reversión realizadas.

Por último el tipo IV está compuesto por 5 mutantes que presentan un fenotipo $\text{Nif}^- \text{Nar}^- \text{Nir}^-$ y que resultaron estar afectados en el gen ntrA (Santero et. al., 1986).

2.1.5 Obtención de mutantes resistentes a clorato a partir de la estirpe Nif⁻ UW6^r

Utilizamos la estirpe UW6^r de fenotipo Nif⁻ para obtener una colección de mutantes resistentes a clorato en los que poder probar facilmente el crecimiento en placas con nitrato o nitrito como fuente de nitrógeno.

La mutagénesis se realizó como en experimentos anteriores en medio Burk suplementado con acetato amónico. Se seleccionaron los mutantes resistentes a clorato en medio Burk con clorato y acetato amónico y se les determinó la capacidad de crecer en nitrato o nitrito como fuente de nitrógeno. El resultado obtenido se presenta en la tabla X. Se encontraron dos tipos de mutantes: Tipo A, incapaces de crecer con nitrato pero sí con nitrito y tipo B incapaces de crecer con ninguna de las dos fuentes de nitrógeno.

También buscamos mutantes no utilizadores de nitrito pero Nar⁺, para lo cual hicimos 3 cultivos en cada uno de los cuales inoculamos 5 colonias mutagenizadas. Dimos un recrecimiento de unas 12 geraciones en medio Burk suplementado con acetato amónico, enriquecimos en mutantes Nir⁻ en medio Burk con nitrito y sembramos en placas de Burk con acetato amónico. Probamos 1000 colonias de cada cultivo en medio Burk con nitrito y obtuvimos tan solo una colonia no utilizadora de nitrito (Nir⁻), la cual resultó ser sensible a clorato y que denominamos AS30.

2.2 Mutagénesis con transposón

Durante el transcurso de esta tesis se ha desarrollado la mutagénesis con transposones en A.

Tabla X: Tipos fenotípicos de mutantes resistentes a clorato obtenidos a partir de UW6^r

Tipo	NO ₃ K	NO ₂ Na	NH ₄ ⁺	ClO ₃ K+NH ₄ ⁺	Nº de mutantes
A	-	+	+	+	106
B	-	-	+	+	89

+ Indica crecimiento

- Indica no crecimiento

vinelandii (Contreras, 1987). Nosotros hemos intentado obtener mutantes resistentes a clorato haciendo uso del transposón Tn5.

2.2.1 Obtención de resistentes a clorato Nif⁻ con Tn5

Para mutagenizar con Tn5 se utilizó el plásmido, suicida en Azotobacter, pGS9, el cual tiene un sistema de transferencia eficaz de amplio espectro, pero una capacidad de replicación y mantenimiento restringido a enterobacterias (Selvaraj y Iyer, 1983). Se introdujo por conjugación desde la cepa de E. coli HB101/pGS9. Para mejorar la eficiencia de la conjugación se hicieron conjugaciones triparentales entre UW136, HB101/pGS9 y otra HB101, que lleva el plásmido ayudador pRK2013.

Se seleccionaron transconjugantes Km^r de UW136 en placas de medio Burk suplementado con acetato amónico, kanamicina y rifampicina. Tras 12 generaciones de segregación en el mismo medio, se sembraron las células en placas de medio Burk con clorato y acetato amónico. De los mutantes obtenidos, 5 de ellos, llamados MV91 a MV95 resultaron tener un fenotipo extraño: Nif⁻ y Chl^r, pero capaces de utilizar nitrato como fuente de nitrógeno. Para comprobar que estas estirpes no eran dobles mutantes, se transfirió por transformación su resistencia a kanamicina del transposón a la estirpe silvestre UW136. Tras un recrecimiento de 12 generaciones en medio Burk con acetato amónico y kanamicina se probó el fenotipo Nif y de resistencia a clorato de varias colonias de cada transformación, comprobando que eran todos mutantes sencillos producidos por Tn5, tabla XI.

Tabla XI: Transformación de UW136 con DNA de MV91-95

Donador	Nº de colonias Km ^r testadas	Colonias Nif ⁻ Chl ^r	Colonias Nif ⁺ Chl ^s
MV91	22	TODAS	NINGUNA
MV92	27	TODAS	NINGUNA
MV93	22	TODAS	NINGUNA
MV94	21	TODAS	NINGUNA
MV95	27	24	3

Se transformó UW136 con DNA de los mutantes MV91 a MV95, se seleccionaron los transformantes en medio Burk suplementado con acetato amónico y kanamicina, se les dió un período de recrecimiento de 12 generaciones en el mismo medio y se sembraron en placas también de este medio. Se probó la resistencia a clorato (Chl^r) y el fenotipo Nif de algunas colonias de cada transformación.

DISCUSION

En este capítulo hemos descrito la puesta a punto de la mutagénesis con ICR-191 en A. vinelandii. La mutagénesis se realizó en medio sólido, por lo que es un tratamiento que dura todo el tiempo, desde que se siembran las bacterias hasta que estas consiguen formar colonias. Por esto, cada colonia se convierte en una experiencia de mutagénesis independiente; la aparición de un mutante en un momento dado de la formación de la colonia producirá, por sucesivas divisiones un sector en la colonia compuesto por bacterias mutantes, mientras que el resto no poseerá esa mutación. El resultado final es que cada colonia consiste en un conjunto heterogéneo de bacterias con distintas alteraciones genéticas. En la figura 9 se da, como medida de la mutagenicidad del método, el porcentaje de colonias en las que detectamos la existencia de mutantes resistentes a clorato. Este porcentaje en las condiciones óptimas se acerca al 100%, lo cual indica que al menos en casi todas las colonias existe tal tipo de mutantes, pero no que la frecuencia de los mutantes en el total de las células sea próxima a la unidad.

Una vez determinada la concentración de mutágeno óptima, procedimos a probar la eficiencia del método para inducir mutaciones no seleccionables. Una dificultad en la obtención de mutantes en A. vinelandii estriba en el alto número de copias del cromosoma que posee, en torno a 40 según Sadoff et. al., (1979). Para solventar este problema tuvimos que dar períodos de recrecimiento postmutagénicos de aproximadamente 12 generaciones, permitiendo la segregación cromosómica y expresión de mutaciones recesivas. Buscamos mutantes auxotróficos y Nif⁻. Los resultados obtenidos dieron una

alta tasa de mutantes (tabla VII), pero, la mayoría de ellos no eran identificables, sino que tenían como requisito para crecer la adición de triptona, y no utilizaban aminoácidos libres ni casaminoácidos. Esto sugiere que son mutantes auxotróficos de aminoácidos, pero que no pueden permear la mayoría de ellos como tales. Es probable que A. vinelandii no posea permeasas para la mayoría o muchos de los aminoácidos y en cambio pueda permear péptidos (Kennedy y Toukdarian, 1987).

También buscamos otro tipo de mutaciones no seleccionables que no presentasen problemas de identificación. Concretamente intentamos obtener mutantes no utilizadores de varios azúcares. El procedimiento fue similar al anterior, dando recrecimientos postmutagénicos y haciendo posteriores enriquecimientos en los azúcares correspondientes. El resultado obtenido dió una muy alta frecuencia de mutantes Rhamnosa⁻ y baja en el resto de los azúcares, llegando a no ser detectada en el caso de la melibiosa (tabla VIII). Esta enorme fluctuación puede deberse al hecho de haber obtenido enriquecimientos muy pobres en estos azúcares y muy bueno en rhamnosa, igual que en auxótrofos en el experimento anterior. Es probable que estos pobres enriquecimientos se deban a que A. vinelandii no crece muy bien con estas fuentes de carbono.

La obtención de mutantes resistentes a clorato para llevar a cabo el estudio genético de la asimilación de nitrato se realizó a partir de dos estirpes, una Nif⁺ UW136 y otra Nif⁻ UW6^r. La estirpe Nif⁺ tiene la ventaja de permitirnos detectar mutantes afectados simultaneamente en la fijación de nitrógeno y la reducción de nitrato; la estirpe Nif⁻ es útil para probar facilmente el fenotipo de crecimiento con nitrato

o nitrito de los mutantes obtenidos a partir de ella. Los grupos fenotípicos de mutantes obtenidos por mutagénesis de UW136 (tabla IX), fueron 4, uno de ellos, el más abundante contiene mutantes $\text{Nif}^+ \text{Chl}^r$, el tipo II lo componían mutantes que eran también Nif^+ pero que solo resistían al clorato cuando se añade amonio al medio de cultivo; parecen tener, por tanto, una mayor capacidad de represión de la nitrato reductasa que la estirpe silvestre. El tipo III, contiene un único mutante, de fenotipo $\text{Nif}^- \text{Nar}^- \text{Nir}^+ \text{Chl}^r$ que sería de esperar en mutantes que estuvieran afectados en las etapas iniciales de la utilización del molibdeno. Aunque se buscaron más mutantes con ese fenotipo, de forma casi dirigida, ya que se seleccionaron los fenotipos Nir^+ y Chl^r y se contraseleccionó el fenotipo Nif^+ , solo se obtuvieron 4 nuevos mutantes que, al igual que el ya existente, resultaron ser dobles mutantes Nif^- , Chl^r , ya que sus revertientes Nif^+ seguían siendo resistentes a clorato y sus revertientes Nar^+ seguían siendo Nif^- . Cabe concluir que en las condiciones de cultivo utilizadas no parece posible la obtención de mutantes afectados en la incorporación del molibdeno a los cofactores de la nitrato reductasa y nitrogenasa. Los mutantes del tipo IV tenían el fenotipo $\text{Nif}^- \text{Nar}^- \text{Nir}^- \text{Chl}^r$, y resultaron estar afectados en el gen ntrA, Santero et. al., (1986)

En cuanto a los mutantes obtenidos a partir de la cepa UW6^r, aparecen agrupados en dos tipos fenotípicos (tabla X), el tipo A, que son $\text{Nar}^- \text{Nir}^+$ y el tipo B que son $\text{Nar}^- \text{Nir}^-$, repartiéndose casi al 50% entre estos dos grupos. También obtuvimos, por métodos dirigidos a mutaciones no seleccionables, un mutante Nir^- sensible a clorato (Nar^+).

Así mismo, hemos usado el transposón Tn5 para la

Obtención de mutantes Chl^r a partir de UW136, encontrando 5 mutantes que eran a la vez Nif^- , Nar^+ y Chl^r . Al ser estos mutantes Chl^r y Nar^+ similares a los mutantes tipo II obtenidos con ICR-191 podrían tener una mayor capacidad de represión de la nitrato reductasa que UW136, pero además son Nif^- , estando estos fenotipos provocados todos por la misma mutación de Tn5 según se desprende de experimentos de transformación (tabla XI), donde se transfiere la resistencia a kanamicina (producida por Tn5) a UW136, resultando transferidos a la vez el carácter Nif^- y Chl^r .

3. ESTUDIO DE LOS MUTANTES RESISTENTES A CLORATO QUE TIENEN ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA

En este capítulo presentamos el estudio realizado con los mutantes denominados AS40 a AS49, descritos en el apartado 2.1.4 y MV91 a MV95 descritos en 2.2.1. Estos mutantes fueron obtenidos por mutagénesis de la estirpe Nif^+ UW136, con ICR-191 (AS40-49) y con el transposón Tn5 (MV91-95).

Los mutantes AS40 a AS49 son resistentes a clorato solo cuando se añade amonio al medio de cultivo, por lo que deben tener actividad nitrato reductasa, que probablemente es reprimida por amonio más eficientemente que en la estirpe silvestre. Su fenotipo se muestra en la tabla IX (Tipo II). Los mutantes MV91 a MV95 son resistentes a clorato, Nif^- y capaces de utilizar nitrato como fuente de nitrógeno.

3.1 Represión de la nitrato reductasa de los mutantes AS40-49

Con objeto de comprobar si estos mutantes tienen una mayor capacidad de represión de la nitrato reductasa que la estirpe silvestre, medimos esta actividad en bacterias incubadas en presencia de una concentración fija de nitrato y concentraciones crecientes de amonio.

El experimento se realizó con cultivos en medio Burk a mitad de la fase exponencial de crecimiento, que se dividieron en alícuotas a las que se añadió nitrato potásico (0.2 g/l) y cloruro amónico a 0, 0.1 y 1 g/l. Se incubaron en agitación durante 5 horas y se midió la actividad nitrato reductasa.

El resultado obtenido se muestra en la tabla XII, donde se presentan las actividades en forma de tanto por ciento con respecto a las obtenidas en ausencia de amonio. Se observa que la nitrato reductasa de los mutantes se reprime más eficientemente que la de la estirpe silvestre. Esta diferencia se hace especialmente clara a la concentración de cloruro amónico de 0.1 g/l, en la cual hay un 50% de actividad en UW136 y menos del 19% en todos los mutantes.

3.2. Consumo de amonio de UW136 y AS45

La mayor represión por amonio de la nitrato reductasa observada en estos mutantes, podría deberse a una mayor capacidad de consumo del amonio presente en el medio de cultivo. Para probar esta hipótesis, procedimos a medir el consumo de amonio de las estirpes UW136 y AS45. El experimento se realizó con cultivos en medio Burk a mitad de la fase exponencial con la misma densidad óptica a 560 nm. Añadimos cloruro amónico a la concentración final de 1 mM y tomamos muestras cada 15 minutos, determinando el amonio en el sobrenadante por el método de Solorzano (1969).

En la figura 10 se muestran las cinéticas de consumo de amonio obtenidas, comprobándose que no existe diferencia entre UW136 y AS45.

3.3 Actividad Glutamina Sintetasa (GS)

La glutamina sintetasa es la primera enzima de la ruta de incorporación de amonio. Llamada GS-GOGAT (Glutamina Sintetasa - Glutamato sintasa). Es por tanto una enzima clave en el metabolismo del nitrógeno.

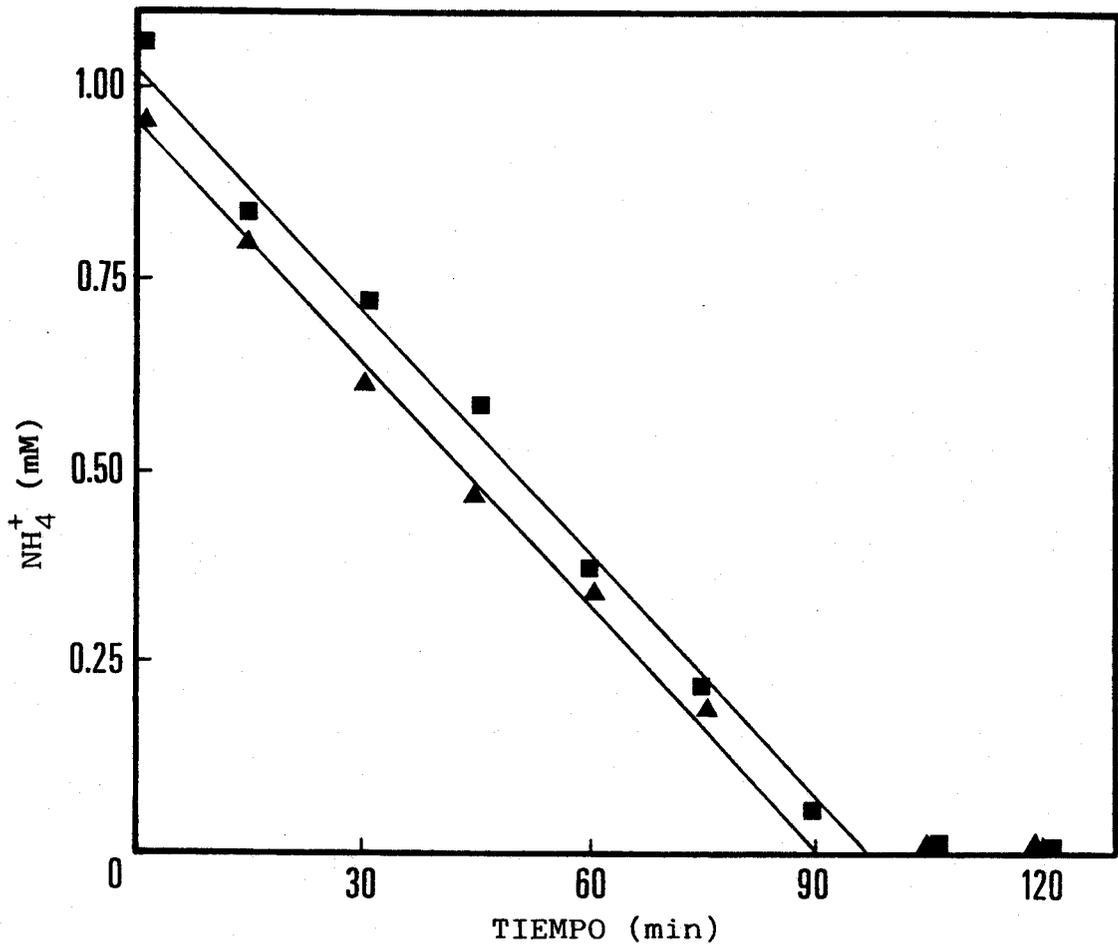


Figura 10: Consumo de amonio de las estirpes UW136 (▲) y AS45 (■). El experimento se realizó con cultivos a mitad de la fase esponencial y la misma densidad óptica a 560 nm en medio Burk. Se añadió acetato amónico (1 mM) y se tomaron muestras cada 15 minutos. Se determinó el amonio del sobrenadante por el método de Solorzano (1969).

Tabla XII: Represión por amonio de la nitrato reductasa en los mutantes AS40-49

Estirpe	NO ₃ K (0.2 g/l) ClNH ₄ (0.1 g/l)	NO ₃ K (0.2 g/l) ClNH ₄ (1 g/l)
UW136	50.13	29.26
AS40	18.44	14.67
AS41	9.29	10.37
AS42	9.32	1.69
AS43	0	5.65
AS44	12.95	12.70
AS45	13.01	12.26
AS46	10.19	12.77
AS47	12.72	19.08
AS48	8.49	6.79
AS49	0	4.13

Se presenta la actividad nitrato reductasa en % con respecto a la actividad en medio con nitrato y sin amonio. El experimento se realizó con cultivos en medio Burk a mitad de la fase exponencial, que se dividieron en alícuotas a las que se suplementó con NO₃K (0.2 g/l) y ClNH₄ a 0, 0.1 y 1 g/l. Se incubó en agitación (250 rpm) durante 5 horas y se midió la actividad nitrato reductasa.

Su actividad se regula por interconversión enzimática entre dos formas, una activa (desadenilada) y otra inactiva (adenilada). Dado que la enzima es un homomultímero (12 subunidades idénticas) puede presentar diversos grados de actividad según el número de subunidades adeniladas por ejemplar de enzima. El grado de adenilación de la GS es el resultado de una fina regulación en la que intervienen varias enzimas y que es dependiente de múltiples factores metabólicos que informan del estado metabólico celular y del balance carbono/nitrógeno (Lepo et al., 1982). A su vez, el sistema de adenilación/desadenilación de la GS puede actuar sobre los genes implicados en la regulación del metabolismo del nitrógeno (sistema ntr) (Backman et al., 1983; Bueno et al., 1985). Una alteración en el sistema de adenilación de la GS podría tener consecuencias en la regulación de los genes que estén sometidos al sistema de control general del metabolismo del nitrógeno; en nuestro caso los de las nitrato y nitrito reductasas. También, una alteración metabólica que afectase a las concentraciones de metabolitos implicados en la regulación del metabolismo del nitrógeno afectaría probablemente al grado de adenilación de la GS. Procedimos por tanto, a medir en los mutantes la GS y su capacidad para adenilarla y desadenilarla.

La desadenilación de la GS se midió en los mutantes AS41, AS45 y AS49 así como en la estirpe silvestre. Se cultivaron en medio Burk suplementado con acetato amónico, condiciones en las que la GS está fundamentalmente adenilada, hasta el final de la fase exponencial. Se tomó la mitad de cada cultivo y se les midió el grado de adenilación, las otras mitades se lavaron e incubaron durante 1 hora en medio Burk sin amonio para provocar la desadenilación de la GS, midiéndose a continuación el grado de adenilación de la



enzima. El grado de adenilación se obtiene como el cociente entre la actividad medida en presencia del ión Mn^{2+} (actividad total) y la obtenida en presencia de Mn^{2+} y Mg^{2+} (actividad desadenilada). Este cociente es mayor cuanto más adenilada está la GS, pudiendo oscilar entre 3 y 0.5 en las condiciones de ensayo usadas por nosotros (Siedel y Shelton, 1.979). En la tabla XIII se muestra el resultado obtenido, no encontrándose diferencia alguna entre la estirpe silvestre y las mutantes.

La adenilación de la GS se midió en AS45 y UW136. Cultivamos hasta mitad de la fase exponencial en medio Burk, tras pasamos los cultivos a medio Burk de refresco y los incubamos durante 30 minutos, repartimos en alícuotas y añadimos diferentes concentraciones de cloruro amónico, incubamos en agitación durante 15 minutos y medimos finalmente la actividad GS en presencia de Mn^{2+} y de $Mn^{2+}+Mg^{2+}$. El resultado obtenido (tabla XIV), fue similar en ambas estirpes. Se observa además un fenómeno inesperado, consistente en un aumento de la actividad GS al aumentar la concentración de amonio, lo cual se puede ver más gráficamente en la figura 11 donde se representa la actividad GS en Mn^{2+} y $Mn^{2+}+Mg^{2+}$ en función de la concentración de amonio. En la tabla XV se puede observar como este aumento de actividad GS no es sensible a la presencia de cloranfenicol, por lo que no debe tratarse de la inducción de la síntesis de nueva enzima sino de la activación de enzima preexistente.

Tabla XIII: Desadenilación de la Glutamina Sintetasa

Estirpe	$Mn^{2+}/Mn^{2+}+Mg^{2+}$ Burk+ NH_4^+	$Mn^{2+}/Mn^{2+}+Mg^{2+}$ Burk
UW136	1.91	0.47
AS41	2.02	0.62
AS45	2.01	0.55
AS49	2.29	0.69

El grado de adenilación se presenta como el cociente entre la actividad en presencia del ión Mn^{2+} y de $Mn^{2+}+Mg^{2+}$. Cultivos en medio Burk con acetato amónico se dividieron en dos mitades, en una de ellas se determinó directamente el grado de adenilación y la otra se traspasó a medio Burk donde se incubó durante 1 hora, al cabo de la cual se midió el grado de adenilación.

Tabla XIV: Adenilación de GS de UW136 y AS45

ClNH ₄ (mg/l)	UW136			AS45		
	a	b	a/b	a	b	a/b
0	16	40	0.40	30	45	0.67
2	94	54	1.81	208	121	1.72
4	293	135	2.17	444	207	2.14
6	424	185	2.29	416	189	2.20
10	603	219	2.75	469	231	2.03

Actividades dadas en mU/mg.

a. Actividad en presencia de Mn²⁺.

b. Actividad en presencia de Mn²⁺ y Mg²⁺.

Cultivos a mitad de la fase exponencial en medio Burk, se traspasaron a un medio Burk de refresco, se incubaron durante 30 minutos, se dividieron en alícuotas y se les añadió ClNH₄ a distintas concentraciones, tras 15 minutos de incubación en agitación se midió la actividad GS en presencia de Mn²⁺ y de Mn²⁺+Mg²⁺.

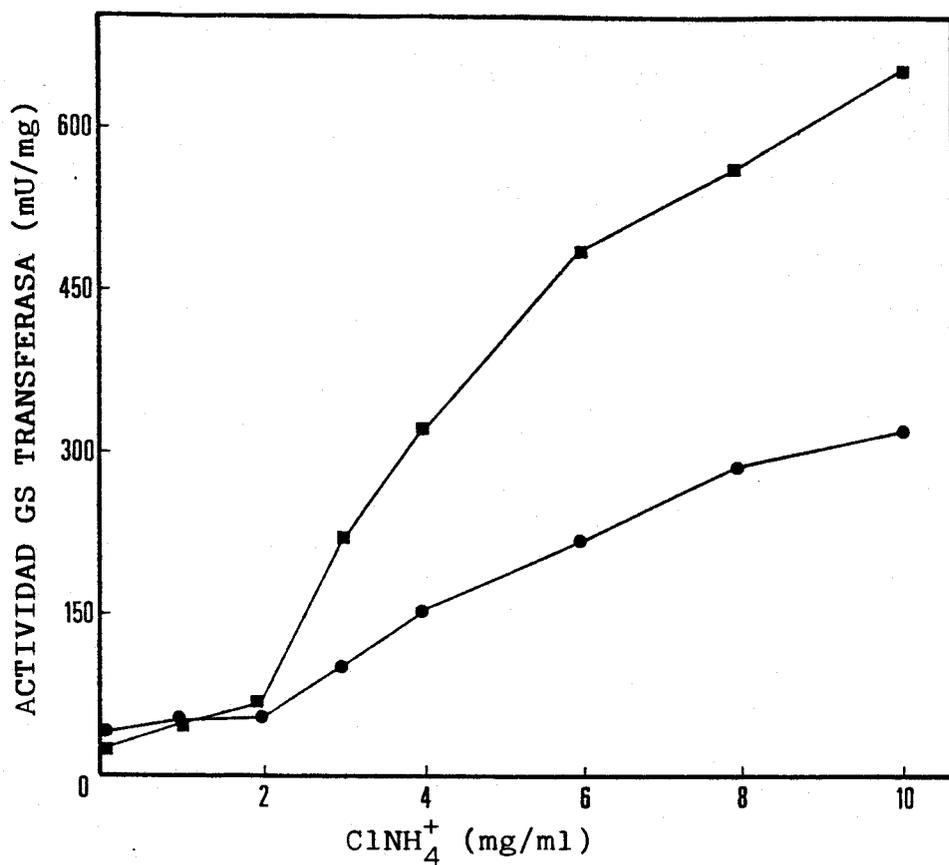


Figura 11: Aumento de la actividad GS transferasa total (■) y desadenilada (●), tras la preincubación en medio fresco y adición de amonio. El experimento se realizó según se indica en la tabla XIV.

Tabla XV: Aumento de la actividad GS de UW136 en presencia de cloranfenicol

ClNH_4 (mg/ml)	Cloranfenicol	Mn^{2+} (mU/mg)	$\text{Mn}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ (mU/mg)
0	-	16	40
0	+	20	38
10	-	603	219
10	+	543	255

El experimento se realizó según se indica en la tabla XIV.

3.4 Represión de las nitrato y nitrito reductasas en medios con diferentes fuentes de carbono

Como vimos en el apartado 1.9, la estirpe UW136 muestra una cinética de represión de ambas reductasas diferente según la fuente de carbono utilizada. La represión por amonio de estas enzimas resulta más eficiente cuando la fuente de carbono en el medio de cultivo es "pobre" (2-oxoglutarato o acetato) que cuando esta es "rica" (sacarosa). Una posible explicación del fenotipo de los mutantes AS40 a AS49 consiste en que estos mutantes sean genéticamente incapaces de reconocer la presencia de una fuente de carbono "rica" en el medio de cultivo, de manera que se comporten siempre como si estuvieran en presencia de una fuente de carbono "pobre". Esto implicaría que alguna señal o sensor presente en la estirpe silvestre, capaz de modular de algún modo la represión por amonio de la nitrato reductasa cuando la célula está en presencia de una buena fuente de carbono, se ha perdido en estos mutantes.

Para comprobar esta hipótesis, obtuvimos la cinética de represión de las nitrato y nitrito reductasas de AS45 del mismo modo que se describe en el apartado 1.9 para la estirpe silvestre. El resultado obtenido cuando la fuente de carbono utilizada fue sacarosa se muestra en la figura 12A y el obtenido con 2-oxoglutarato en 12B (en ambos casos se representa también la estirpe silvestre UW136). Se puede comprobar como a diferencia de UW136, AS45 se comporta de la misma manera con sacarosa que con 2-oxoglutarato, reprimiendo en sacarosa más eficientemente ambas reductasas que UW136, mientras que no hay diferencias entre ambas estirpes cuando la fuente de carbono utilizada es 2-oxoglutarato.

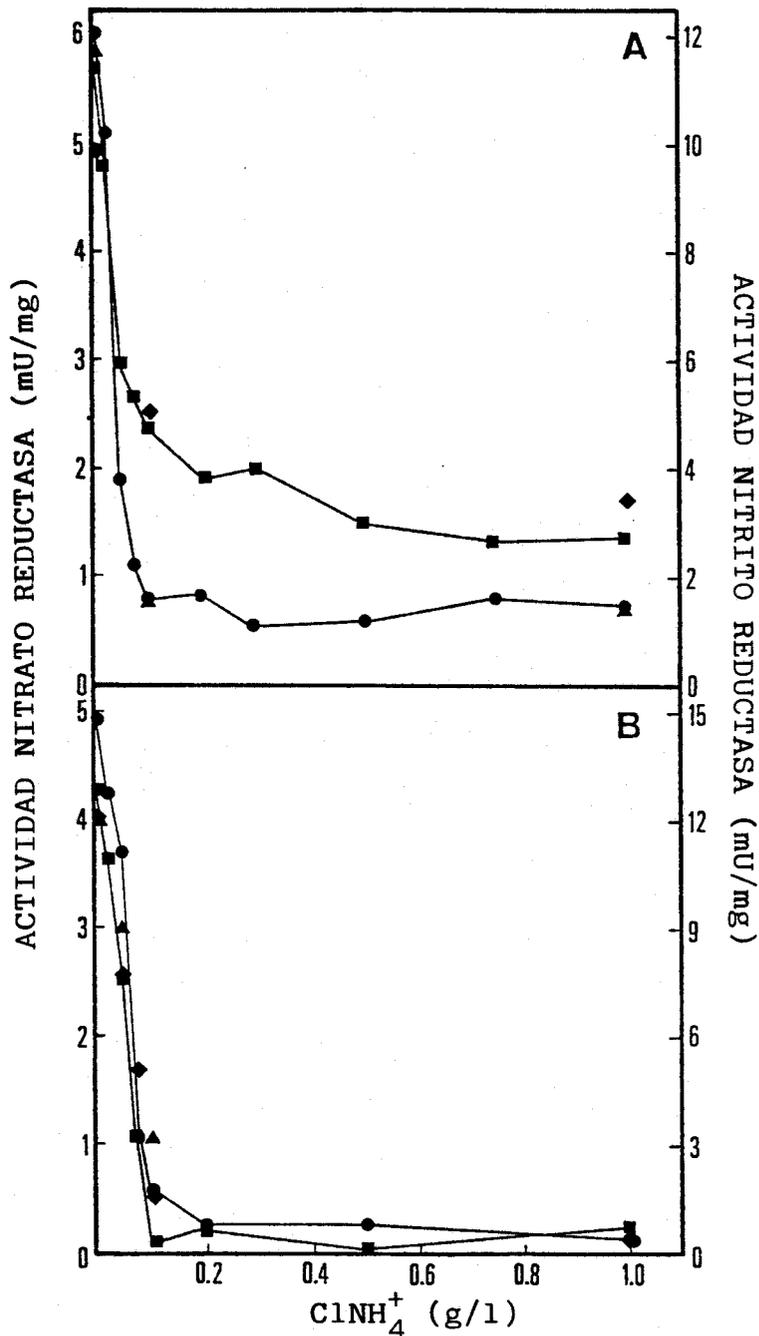


Figura 12: Cinética de represión de la nitrato reductasa y nitrito reductasa de las estirpes UW136 y AS45 con sacarosa como fuente de carbono (A) o 2-oxoglutarato (B). Nitrato reductasa de UW136 (■) y de AS45 (●). Nitrito reductasa de UW136 (◆) y de AS45 (▲). El experimento se realizó como se indica en la figura 8.

El resultado obtenido con acetato potásico fue similar al obtenido con 2-oxoglutarato.

3.5 Actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa de los mutantes MV91-95

Estos mutantes tienen un fenotipo similar, en parte, a los mutantes AS40 a AS49, ya que son $\text{Chl}^r \text{Nar}^+$, si bién, a diferencia de estos, son además Nif^- . Es por ello probable que esten afectados también en la represión de la nitrato reductasa. No obstante, este punto es de difícil comprobación debido a que al ser Nif^- han de ser cultivados en medios suplementados con amonio, lo que obliga a que para hacer su cinética de represión haya que cambiarlos a un medio nuevo suplementado con nitrato y diferentes concentraciones de amonio, y como vimos en el apartado 1.6 el refresco de los cultivos provoca una subida inespecífica de ambas reductasas, que interfiere con el balance de inducción-represión por nitrato y amonio. Por esta razón nos limitamos a medir la actividad inducida de ambas enzimas para ver si son normales y si por consiguiente cabe atribuir la resistencia a clorato a un fenómeno de represión más eficiente de la nitrato reductasa que en la cepa silvestre o si por el contrario estos mutantes poseen actividades intermedias que les confieran la capacidad de resistir el efecto tóxico del clorato y a la vez les permitan crecer con nitrato como fuente de nitrógeno.

El experimento se realizó con cultivos en medio Burk suplementado con acetato amónico a mitad de la fase exponencial de crecimiento, se lavaron y resuspendieron en medio Burk con nitrato, se incubaron en agitación durante 5 horas y se midieron ambas actividades.

El resultado obtenido se presenta en la tabla XVI, comprobándose que no hay ninguna diferencia entre estos mutantes y la estirpe silvestre.

Tabla XVI: Actividad nitrato y nitrito reductasa de los
mutantes MV91-95

Estirpe	Nitrato reductasa (mU/mg)	Nitrito reductasa (mU/mg)
UW136	7.98	14.13
MV91	6.56	13.17
MV92	6.12	13.22
MV93	6.30	12.59
MV94	6.40	12.79

Cultivos en medio Burk con acetato amónico fueron lavados y transferidos a medio Burk con nitrato e incubados en agitación durante 5 horas, tras las cuales se midieron las actividades nitrato y nitrito reductasas.

DISCUSION

En este capítulo describimos el estudio fisiológico de mutantes resistentes a clorato que no carecen de actividad nitrato reductasa. Estos mutantes han sido obtenidos a partir de la estirpe silvestre UW136, por mutagénesis con ICR-191 (AS40 a AS49) o con Tn5 (MV91 a MV91).

Los mutantes AS40 a AS49 tienen el fenotipo Nif⁺ Chl^R, aunque la resistencia a clorato es dependiente de la adición de amonio u otra fuente de nitrógeno reducido, al medio de cultivo, (tabla IX, Tipo II). Estos mutantes tienen una actividad nitrato reductasa normal, pero se reprime más fuertemente y a concentraciones de amonio menores que la de la estirpe silvestre (tabla XII). La mayor sensibilidad al efecto represor del amonio observada en estos mutantes, no se debe a una mayor capacidad de consumo de amonio (figura 10), ni a una alteración que provoque una incapacidad para activar (desadenilar) a la Glutamina Sintetasa, lo cual podría haber tenido efectos indirectos sobre la regulación general del metabolismo del nitrógeno (Backman et al., 1982; Bueno et al., 1985). Tampoco muestran ninguna diferencia con la estirpe silvestre en la capacidad de adenilar la GS, proceso este finamente regulado y dependiente del balance carbono/nitrógeno. Este hecho, unido a que estos mutantes crecen perfectamente bien en medio Burk, nos lleva a pensar que no tienen ninguna alteración metabólica que produzca un cambio importante en la concentración de metabolitos de carbono o de carbono y nitrógeno.

Una posible explicación para el comportamiento de estos mutantes estaría relacionada con el hecho de que

en la estirpe silvestre los niveles de represión por amonio de las enzimas nitrato y nitrito reductasa son dependientes de la naturaleza de la fuente de carbono empleada, siendo mayor la represión con 2-oxoglutarato o acetato que con sacarosa, apartado 1.9. Como puede observarse en la figura 12, AS45 a diferencia de UW136, reprime con igual eficiencia ambas reductasas, tanto con sacarosa como fuente de carbono como con 2-oxoglutarato o acetato. Por tanto, concluimos que A. vinelandii tiene la capacidad de distinguir entre distintas fuentes de carbono, reprimiendo, cuando se añade amonio, las nitrato y nitrito reductasas más fuertemente si la fuente de carbono empleada es "pobre" que si es "rica", y que los mutantes AS40-49 han perdido esta capacidad, comportandose siempre como si crecieran en un medio con una fuente de carbono "pobre".

Los mutantes MV91 a MV95 tienen un fenotipo Nif^- Nar^+ Chl^r . Aunque su fisiología resulta más difícil de estudiar que la de los mutantes AS40 a AS49, son más accesibles a un estudio genético, ya que, debido a su carácter Nif^- , se pueden efectuar con ellos estudios de complementación seleccionando la transferencia del alelo silvestre (Nif^+ Chl^s). Nosotros nos hemos limitado a comprobar que poseen unos niveles de actividad nitrato y nitrito reductasa normales (tabla XVI), por lo que la resistencia a clorato probablemente se deba a una mayor represión por amonio de la nitrato reductasa que en la estirpe silvestre, comportamiento que resulta similar al de los mutantes Nif^+ AS40 a AS49.

4. ESTUDIO DE MUTANTES INCAPACES DE ASIMILAR NITRATO

En este capítulo se presenta el estudio realizado con los mutantes descritos en el apartado 2.1.5, obtenidos por mutagénesis de la estirpe $Nif^- UW6^r$ con ICR-191. Estos mutantes presentan la característica común de no ser capaces de asimilar nitrato y pueden ser divididos en tres grupos según su fenotipo de crecimiento: Un grupo formado por un solo mutante (AS30) que es $Chl^S Nar^+ Nir^-$; otro formado por 106 mutantes que son $Chl^r Nar^- Nir^+$ y un último grupo compuesto por 89 mutantes de fenotipo $Chl^r Nar^- Nir^+$.

4.1 Curvas de crecimiento

Tomamos un representante de cada grupo de mutantes, AS30 ($Chl^S Nar^+ Nir^-$), AS31 ($Chl^r Nar^- Nir^-$) y AS36 ($Chl^r Nar^- Nir^+$) y la estirpe parental $UW6^r$ y realizamos curvas de crecimiento en medios Burk suplementados con distintas fuentes de nitrógeno: acetato amónico, nitrato potásico, nitrito sódico y clorato potásico + acetato amónico. El resultado obtenido se muestra en la figura 13. Aunque la sensibilidad al clorato se manifiesta como una cierta ralentización del crecimiento, resulta clara la diferencia entre las estirpes sensibles $UW6^r$ y AS30 y las resistentes AS31 y AS36, las cuales crecen en presencia de clorato de forma indistinguible a la del control con solo amonio. Como cabía esperar, la estirpe $UW6^r$ crece tanto con nitrato como con nitrito; AS36 no crece con nitrato pero sí con nitrito; AS30 y AS31 no crecen con ninguna de estas dos fuentes de nitrógeno; en el caso de AS30 la no utilización de nitrato debe estar producida tan solo por su incapacidad de asimilar

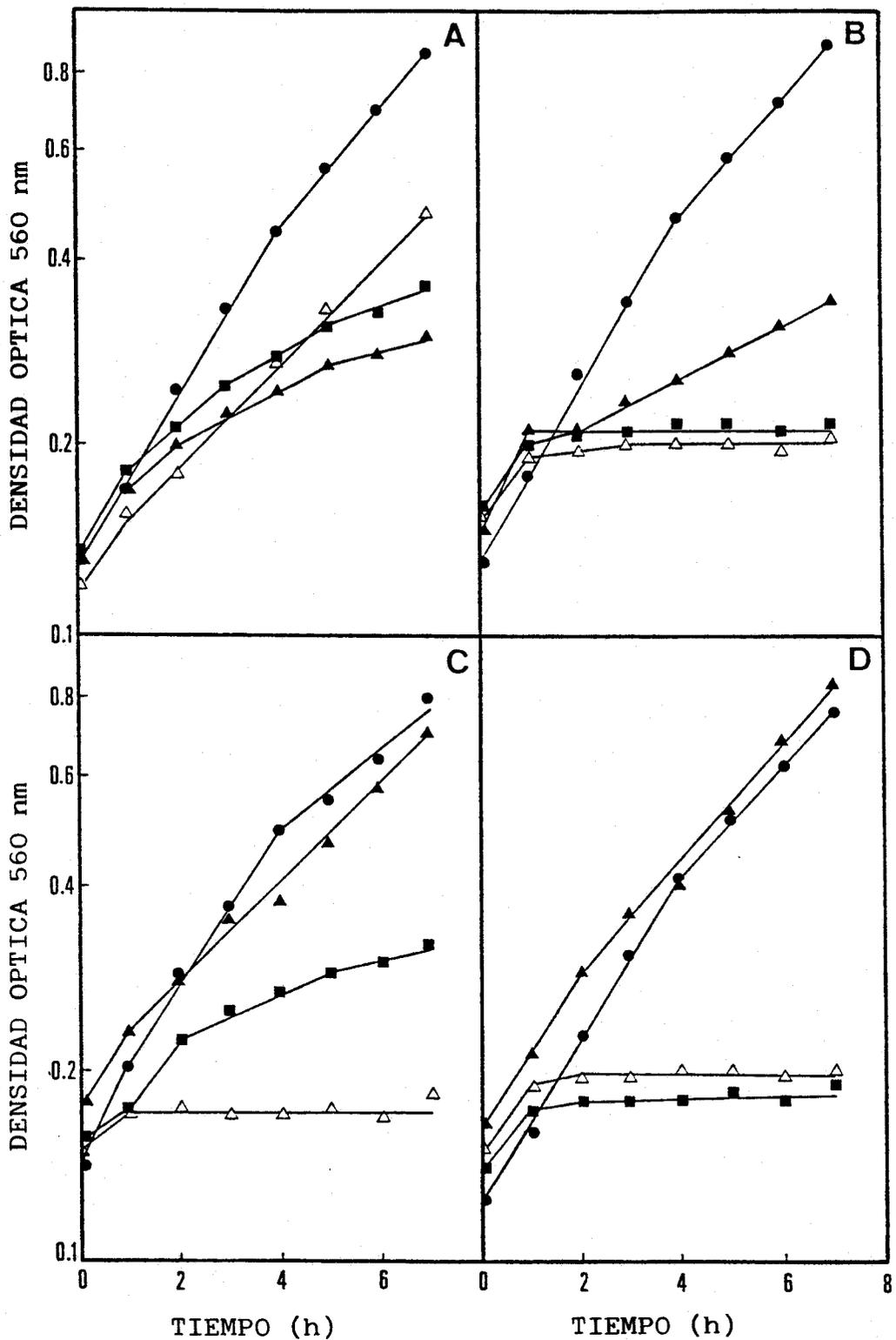


Figura 13: Curvas de crecimiento de las estirpes UW6^r (A), AS30 (B), AS36 (C) y AS31 (D) en medio Burk suplementado con: Acetato amónico (●), clorato y acetato amónico (▲), nitrato (△) y nitrito (■).

nitrito ya que es sensible a clorato y por lo tanto Nar^+ .

4.2 Complementación de los mutantes $\text{Chl}^r \text{Nar}^- \text{Nir}^-$ con los genes ntrA y ntrC

Las estirpes que presentan a la vez un fenotipo de resistencia a clorato e incapacidad de asimilar nitrato pueden estar mutadas en genes reguladores que afecten simultáneamente a la expresión de la nitrato reductasa y la nitrito reductasa. Santero et al. (1986) han descrito mutantes de A. vinelandii en el gen ntrA, los cuales no expresan los genes nif ni los de las nitrato y nitrito reductasas; además, Toukdarian y Kennedy (1986) han encontrado que mutantes en el gen ntrC de A. vinelandii no reducen nitrato, no habiendo estudiado si este gen tiene algún efecto sobre la nitrito reductasa.

En los 89 mutantes que tienen fenotipo $\text{Chl}^r \text{Nar}^- \text{Nir}^-$ introdujimos por conjugación los cósmidos pLV50 y pLV72, que llevan fragmentos cromosómicos EcoRI de A. vinelandii capaces de complementar a mutantes de E. coli en los genes ntrC y ntrA respectivamente.

Los cósmidos pLV50 y pLV72 fueron obtenidos de una genoteca de A. vinelandii construida con fragmentos EcoRI en el cósmido pLAFR1 (Toukdarian y Kennedy, 1986). Este cósmido confiere resistencia a tetraciclina y es movilizable por conjugación, aunque no es autotransferible. Las conjugaciones se realizaron mediante cruces triparentales entre cada cepa mutante de A. vinelandii, una estirpe de E. coli (HB101) portadora de pLV50 o pLV72 y otra estirpe HB101 portadora del plásmido ayudador pRK2013. Las conjugaciones se realizaron según se indican en los Materiales y Métodos y los transconjugantes se seleccionaron en medio Burk



suplementado con acetato amónico y tetraciclina. Comprobamos el crecimiento de los transconjugantes en medio Burk con nitrato y encontramos que 66 mutantes eran complementados por pLV50 (ntrG), ninguno por pLV72 (ntrA), y 23 mutantes no se complementaban con ninguno de los plásmidos. De los mutantes complementados por pLV50 y por tanto afectados seguramente en el gen ntrC nos quedamos con 4 que denominamos AS31 a AS34.

4.3 Fisiología de los mutantes en el gen ntrC

Determinamos las actividades nitrato y nitrito reductasas, el consumo de nitrato y la excreción de nitrito al medio de cultivo de los mutantes AS31 a AS34 y de la estirpe parental UW6^r tanto complementados como sin complementar con el cósmido pLV50.

El experimento se realizó con cultivos en medio Burk con acetato amónico a mitad de la fase exponencial. Las células se lavaron y resuspendieron en medio Burk suplementado con nitrato potásico (0.2 g/l), donde se incubaron en agitación durante 5 horas, transcurridas las cuales se determinó el nitrato consumido, el nitrito excretado al medio y se ensayaron las actividades nitrato y nitrito reductasa. El resultado de este experimento se presenta en la tabla XVII, donde se puede comprobar que estos mutantes poseen niveles basales de ambas reductasas y que resultan casi indetectables el nitrato consumido y el nitrito excretado al medio, mientras que cuando llevan el cósmido pLV50 quedan restauradas ambas actividades, así como la capacidad de consumo de nitrato y excreción de nitrito al medio de cultivo. La actividad nitrato reductasa de los mutantes sin pLV50 se determinó tanto en células permeabilizadas como sin permeabilizar y en ambos ensayos se obtuvieron

Tabla XVII: Actividades nitrato y nitrito reductasas, consumo de nitrato y excreción de nitrito de los mutantes ntrC complementados y sin complementar

Estirpe	Nitrato consumido ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	Nitrito excretado ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	Nitrato reductasa (mU/mg)	Nitrito reductasa (mU/mg)
UW6 ^r	13.59	0.67	6.77	14.20
UW6 ^r /pLV50	-	-	4.70	16.06
AS31	0.19	0.02	0.03	2.86
AS31/pLV50	7.48	2.38	9.11	11.23
AS32	0	0.04	0.18	1.91
AS32/pLV50	9.71	4.16	10.65	12.51
AS33	0	0.05	0.21	0.65
AS33/pLV50	10.22	4.20	11.11	12.49
AS34	0.99	0.03	0.16	3.35
AS34/pLV50	7.40	1.95	7.37	16.23

Cultivos en medio Burk suplementado con acetato amónico a mitad de la fase exponencial se lavaron y resuspendieron en Burk con NO_3K (0.2 g/l), se incubaron durante 5 horas a 30°C y con una agitación de 250 rpm. Se ensayaron las actividades de ambas reductasas y se midió el nitrato consumido y el nitrito excretado durante la incubación.

los mismos resultados.

4.4 Efecto del medio fresco sobre las dos reductasas en mutantes en los genes ntrA y ntrC

El cambio de las células de un medio agotado a otro de refresco produce una subida inespecífica de las actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa, según se describió en el punto 1.6. Este efecto es independiente de la existencia de nitrato en el medio de cultivo, por lo que nos preguntamos sobre la posibilidad de que estén implicados los genes ntrA y ntrC, necesarios para la inducción por nitrato, o si por el contrario se trata de una inducción independiente de los genes ntr.

Estudiamos el efecto del cambio de medio en las estirpes AS29 (ntrA) y su parental UW136 y en AS33 y AS34 (ntrC) y su parental UW6^r. El experimento se realizó con cultivos de las distintas cepas en medio Burk suplementado con acetato amónico a mitad de la fase exponencial. Lavamos las células y las incubamos en medio Burk. Medimos las actividades nitrato y nitrito reductasas inmediatamente transferidas las células y después de 1 hora del cambio de medio. El resultado obtenido se presenta en la tabla XVIII. No se observa ninguna inducción enzimática en los mutantes AS29, AS33 y AS34, mientras que en las estirpes parentales UW136 y UW6^r se inducen tanto la nitrato reductasa como la nitrito reductasa.

Tabla XVIII: Efecto del medio fresco sobre las nitrato y nitrito reductasas en mutantes en los genes ntrA y ntrC

Estirpe	Nitrato reductasa		Nitrito reductasa	
	(mU/mg)		(mU/mg)	
	t=0	t=1	t=0	t=1
UW136	0.14	3.30	1.41	8.65
UW6 ^r	0.10	2.83	1.00	8.67
AS29(<u>ntrA</u>)	0	0.01	0	0
AS33(<u>ntrG</u>)	0	0.01	2.18	1.44
AS34(<u>ntrG</u>)	0	0.02	0	0

Cultivos en medio Burk con acetato amónico a mitad de la fase exponencial fueron lavados y resuspendidos en medio Burk. Se midieron las actividades nitrato y nitrito reductasas a tiempos 0 y 1 hora de incubación.

4.5 Estudio de los mutantes Chl^r Nar^- Nir^- no complementables por ntrA ni ntrC

Los 23 mutantes con este fenotipo que no fueron complementados por los cósmidos pLV50 ni pLV72 se cultivaron en medio Burk suplementado con nitrato amónico (1g/l) y se les midió la actividad nitrato reductasa para comprobar si efectivamente eran Nar^- . La nitrato reductasa se ensayó tanto en células toluenizadas como sin toluenizar obteniéndose solo actividades basales en ambos casos.

El elevado número de estos mutantes hace muy improbable, si no imposible, que se trate de mutantes dobles Nar^- y Nir^- ; no obstante, para comprobar que las dos carencias están provocadas por una misma mutación, tomamos 4 mutantes (AS60 a AS63) y los transformamos con DNA de UW6^r . Seleccionamos transformantes Nir^+ en placas de medio Burk suplementado con nitrito y probamos si eran o no capaces de crecer con nitrato como fuente de nitrógeno. Todas las colonias Nir^+ probadas resultaron ser también Nar^+ , por lo que podemos concluir que ambos fenotipos están producidos por una sola mutación (tabla XIX).

4.6 Actividad nitrato reductasa de los mutantes Nar^- Nir^+

Medimos la actividad nitrato reductasa de los 106 mutantes Nar^- Nir^+ cultivados en medio Burk suplementado con urea (2 mM) y nitrato potásico (0.8 g/l) tanto en células permeabilizadas como enteras, no detectando actividad en ninguno de los mutantes, salvo en uno que denominamos AS35.

Tabla XIX: Transformación de los mutantes AS60-63 con DNA de UW6^r

Estirpe	nº de transformantes		nº de transformantes	
	Nar ⁺	Nir ⁺	Nar ⁻	Nir ⁺
AS60		5		0
AS61		18		0
AS62		2		0
AS63		18		0

Se transformó con DNA de UW6^r, se seleccionaron transformantes Nir⁺ y se probó la capacidad de utilizar nitrato de algunos de estos transformantes.

4.7 Fisiología de los mutantes afectados en una sola de las reductasas

Medimos las actividades de ambas reductasas, el consumo de nitrato y la excreción de nitrito al medio de cultivo de los mutantes AS30 ($\text{Nar}^+ \text{Nir}^-$), AS35 y AS36 ($\text{Nar}^- \text{Nir}^+$) y de la estirpe parental UW6^r.

El experimento lo realizamos del mismo modo que se describe en el punto 4.3. El resultado obtenido se muestra en la tabla XX. La estirpe mutante AS30 tiene una elevada actividad nitrato reductasa, casi el doble que la estirpe UW6^r. Esto puede deberse a que, durante el ensayo de la actividad nitrato reductasa, la nitrito reductasa está activa y puede reducir hasta amonio parte del nitrito producido en la reacción en la estirpe UW6^r, mientras que en AS30 esto no puede ocurrir porque tiene una actividad nitrito reductasa muy baja. El consumo de nitrato en esta estirpe es similar al que tiene UW6^r, pero, a diferencia de ésta, todo el nitrito producido es excretado al medio de cultivo al no poder ser reducido. La cepa mutante AS35 resulta ser rezumante para la actividad nitrato reductasa y presenta una cierta capacidad de consumo de nitrato, no excretando de forma perceptible nitrito al medio de cultivo. Por último en la cepa AS36 resulta indetectable tanto la actividad nitrato reductasa como el consumo de nitrato y lógicamente no excreta nitrito al medio.

Tabla XX: Actividades nitrato y nitrito reductasas, consumo de nitrato y excreción de nitrito de mutantes afectados en una sola de las reductasas

Estirpe	Nitrato consumido ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	Nitrito excretado ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	Nitrato reductasa (mU/mg)	Nitrito reductasa (mU/mg)
UW6 ^r	10.9	0.4	8.65	15.72
AS30	8.1	8.3	14.73	1.99
AS35	2.0	0	1.61	18.40
AS36	0	0	0	19.60

El experimento se realizó igual que se indica en la tabla XVII.

DISCUSION

Los mutantes estudiados en este apartado tienen en común la incapacidad de crecer utilizando nitrato como fuente de nitrógeno, ya sea porque carecen de actividad nitrato reductasa, por carecer de nitrito reductasa o de ambas actividades. En la figura 13 se presentan curvas de crecimiento que ilustran los distintos fenotipos: El fenotipo silvestre $\text{Chl}^S \text{Nar}^+ \text{Nir}^+$ (UW64) y los fenotipos mutantes $\text{Chl}^S \text{Nar}^+ \text{Nir}^-$ (AS30), $\text{Chl}^R \text{Nar}^- \text{Nir}^+$ (AS36) y $\text{Chl}^R \text{Nar}^- \text{Nir}^-$ (AS31).

A los mutantes que carecen de ambas reductasas se les introdujeron los cósmidos pLV50 y pLV72, que llevan los genes ntrC y ntrA de A. vinelandii respectivamente. La mayoría de los mutantes (66 de 89) se complementan con pLV50, ninguno con pLV72 y los 23 restantes no se complementan con ninguno de estos cósmidos.

Los datos fisiológicos de los mutantes en el gen ntrC se presentan en la tabla XVII. Tienen actividades basales de ambas enzimas y una capacidad de consumo de nitrato casi indetectable. El cósmido pLV50 restaura ambas actividades así como el consumo de nitrato.

Los genes ntrA y ntrC son necesarios no solo para la inducción por nitrato como vimos en el apartado 4.3, sino para la inducción inespecífica de ambas reductasas que tiene lugar cuando las células se transfieren a un medio de refresco, tabla XVIII.

Los 23 mutantes no complementables por los cósmidos pLV50 y pLV72 tienen actividades nitrato reductasas bajas o basales y no son mutantes dobles al menos en su mayoría, puesto que ambos marcadores Nar^+ y

Nir⁺ procedentes de la estirpe silvestre cotransforman al 100% a los mutantes estudiados, tabla XIX.

Durante el trabajo realizado en esta tesis hemos encontrado que hay una total correulación a nivel fisiológico entre las enzimas nitrato y nitrito reductasas. También hemos encontrado mutaciones reguladoras que en todos los casos afectan de igual modo a ambas reductasas: Mutantes afectados en la represión de ambas enzimas (AS40 a AS49) y mutantes en el gen ntrC, además de los mutantes ntrA descritos por Santero et al. (1986) que afectan simultáneamente a ambas enzimas y a los genes nif. Todo ello nos lleva a plantear la hipótesis de que los genes que determinan para ambas enzimas están formando una misma unidad transcripcional. Los 23 mutantes no complementables por ntrA ni ntrC pueden estar afectados en algunos otros genes reguladores, o en uno único de ese tipo, o ser mutantes polares, ya que el mutágeno empleado, ICR-191, produce mutaciones por desfase de lectura, que pueden producir polaridad.

Aunque los mutantes con fenotipo Chl^r Nar⁻ Nir⁺ podrían, pertenecer a distintas clases: Mutantes afectados en la actividad nitrato reductasa, mutantes afectados en el transporte del ión nitrato al interior celular, o mutantes de la cadena de transporte de electrones desde el donador fisiológico hasta la nitrato reductasa, ese no ha sido nuestro caso. Mutantes en el transporte de electrones deberían tener actividad nitrato reductasa medida con ditionito y metil viológeno como donadores de electrones, pero no tener actividad "in vivo", no siendo por tanto capaces de consumir nitrato del medio de cultivo. Solo uno de los 106 mutantes estudiados tuvo actividad nitrato reductasa medida con ditionito y metil viológeno (AS35) pero este

resultó ser un mutante rezumante, ya que esta actividad era baja (1/5 de la del silvestre) y además tenía cierta capacidad de consumo de nitrato acorde con su baja actividad nitrato reductasa (tabla XX). Tampoco encontramos mutantes afectados en el transporte del ión nitrato al interior celular, puesto que en células permeabilizadas tampoco detectamos actividad nitrato reductasa en ninguno de ellos. Dado el alto número de mutantes estudiados, pensamos que estos tipos de mutantes tal vez no se puedan aislar, bien porque no existan tales sistemas de transporte de electrones y de permeasa específicos para el nitrato, bien porque existan sistemas alternativos a ellos, o bien, en el caso de los transportadores de electrones, porque ejerzan otras funciones y su carencia sea letal para la célula.

5. CLONACION DE GENES IMPLICADOS EN LA ASIMILACION DEL NITRATO

En este apartado se describe el procedimiento seguido para la construcción de una genoteca de A. vinelandii con el objeto de aislar cósmidos que complementen a los mutantes de la asimilación de nitrato obtenidos en esta tesis y realizar estudios más detallados sobre la regulación de la ruta y la ordenación física de los genes que la componen.

5.1 Construcción de una genoteca

Hemos construido una genoteca de DNA genómico en el cósmido pHS255, figura 14. El procedimiento seguido se muestra en la figura 15; Una preparación de DNA de pHS255 se dividió en 2 mitades, una se cortó con EcoRI y la otra con HincII y los extremos producidos fueron desfosforilados por tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar que los plásmidos se pudieran recircularizar. Los sitios de corte EcoRI y HincII están a ambos lados del sitio de corte BamHI, por lo que al cortar con BamHI y mezclar ambas poblaciones de cósmido, solo podrá obtenerse la secuencia nativa en forma lineal por unión entre los extremos BamHI de cósmidos cortados con EcoRI y cósmidos cortados con HincII. Este dímero así formado es demasiado pequeño para ser empaquetado por el fago lambda y no puede crecer en tamaño porque no tiene extremos cohesivos libres con fosfatos 5' que permita la reacción de ligamiento. Únicamente serán empaquetados dímeros que hayan unido entre sus extremos BamHI un fragmento de DNA cromosómico de tamaño adecuado.

El DNA cromosómico se sometió a una digestión

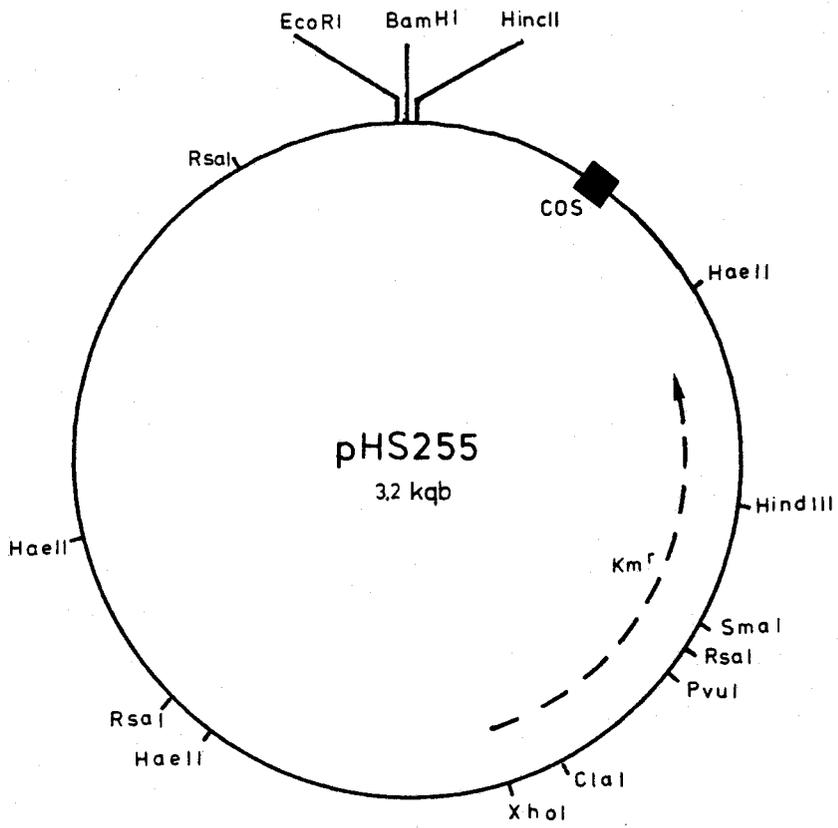


Figura 14: Mapa de restricción de pHS255.

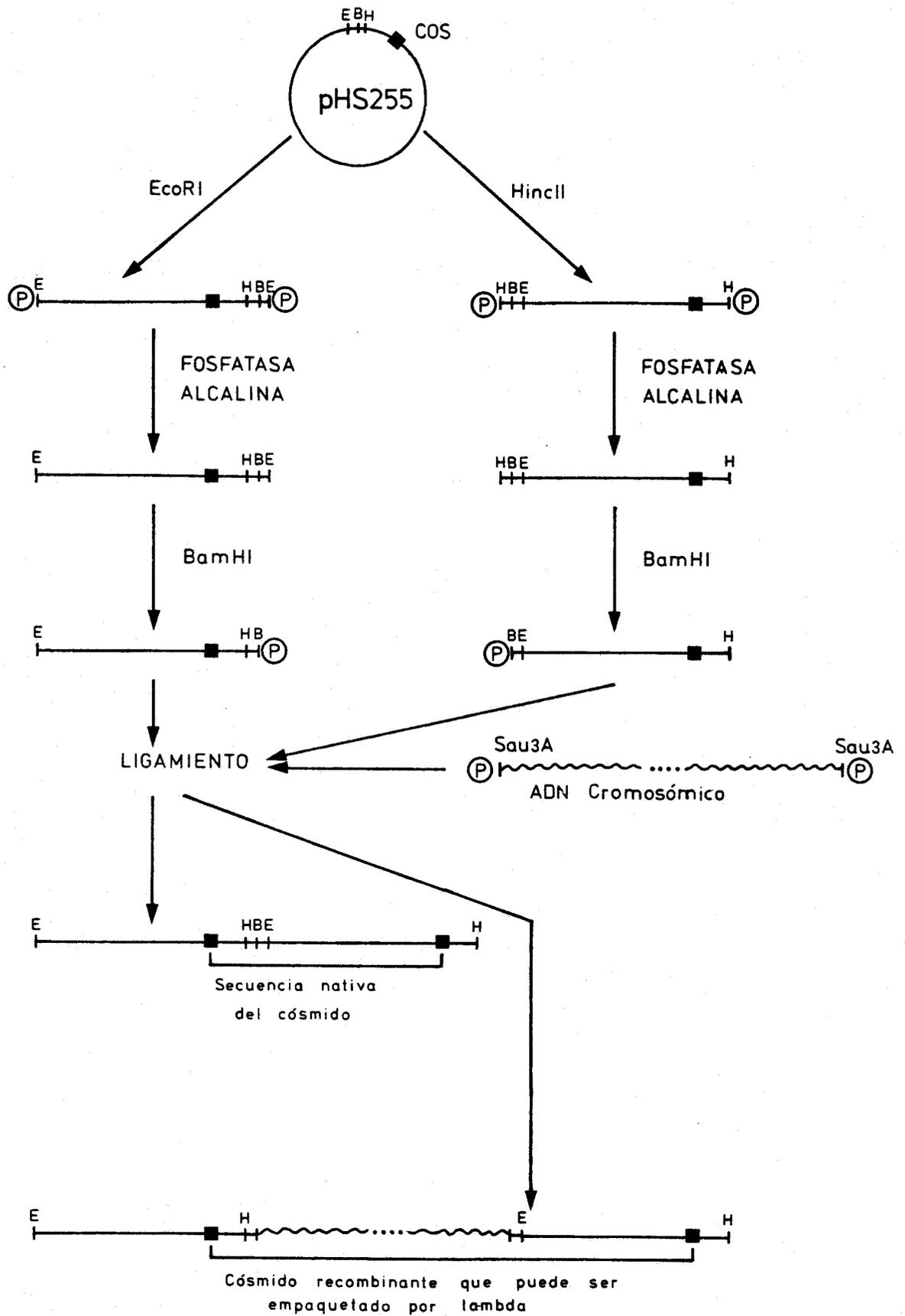


Figura 15: Estrategia de construcción de la genoteca en pHS255.

parcial con Sau3A, figura 16. Esta enzima reconoce una secuencia de 4 pb, por lo que tiene sitios de corte aproximadamente cada 200-300 pb, esto hace que en una digestión parcial se produzcan fragmentos prácticamente al azar y que por consiguiente sea posible clonar cualquier gen. Los extremos producidos por Sau3A son compatibles con los generados por BamHI, por lo que hicimos la reacción de ligamiento entre cósmidos preparados como se ha indicado anteriormente con DNA cromosómico de la estirpe UW digerido parcialmente con Sau3A y con un tamaño aproximado de 40 Kpb, figura 17. El DNA ya ligado se empaquetó en cápsidas del fago Lambda, para ello utilizamos extractos obtenidos de la estirpe de E. coli SMR10 según se indica en Materiales y Métodos. Se infectó E. coli HB101 y se seleccionó la resistencia a kanamicina conferida por el cósmido. Tomamos al azar 9 colonias Km^r y comprobamos que todas ellas llevaban un plásmido de alto peso molecular, figura 18.

Obtuvimos 540 clones de HB101 Km^r con los que se obtiene una probabilidad del 99.9% de tener clonado cualquier gen según la formula de Clarke y Carbon (1976): $N = \ln(1-p) / \ln(1-f)$, donde N es el número de clones, p es la probabilidad de encontrar al menos un clon portador de un gen dado y f es la fracción de DNA del organismo que va en cada cósmido.

5.2 Complementación con la genoteca de mutantes deficientes en la asimilación de nitrato

El cósmido pHS255 no puede ser transferido por conjugación, por lo que la complementación de los distintos mutantes con la genoteca hubo de hacerse por transformación. Esto impone una restricción puesto que

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Figura 16: Fotografía de un gel de agarosa al 0.5% en el que se observan digestiones parciales de ADN cromosómico con concentraciones crecientes de Sau3A, carriles 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11 y 12; ADN cromosómico sin cortar, carril 2; ADN de lambda, carriles 6 y 13 y ADN de lambda cortado con HindIII, carriles 1 y 7.

1 2 3 4 5 6 7

← dímero de
pHS255

← pHS255

Figura 17: Fotografía de un gel de agarosa al 0.6% en el que se observa el ligamiento entre pHS255 preparado según se indica en la figura 15 y ADN cromosómico digerido parcialmente con Sau3A a las proporciones de ADN cromosómico/plasmídico de 1/3, 1/1, 3/1 y 5/1, carriles 4, 5, 6 y 7 respectivamente. Se observa que se mantiene, aunque disminuida, la banda de pHS255 y que aparece una nueva banda de tamaño doble (dímero). El carril 1 contiene ADN de lambda, el 2 pHS255 preparado según se indica en la figura 15 y el 3 ADN cromosómico digerido parcialmente con Sau3A.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Figura 18: Fotografía de un gel de agarosa al 0.6% en el que se observa ADN extraído de varias cepas Km^r de HB101. Todas llevan un plásmido de alto peso molecular, carriles 1 al 9. En el carril 10 se muestra el cósmido pHS255 cortado como se indica en la figura 15.



no es fácil transformar a A. vinelandii con plásmidos de tan alto peso molecular. Con una ligera modificación del método de Glick et al. (1985) para transformar A. vinelandii con DNA plasmídico, ver Materiales y Métodos, conseguimos frecuencias de transformación suficientemente altas como para intentar complementar los mutantes con la genoteca.

Utilizamos a los mutantes AS30 ($\text{Nar}^+ \text{Nir}^-$), AS36 ($\text{Nar}^- \text{Nir}^+$) y AS60 ($\text{Nar}^- \text{Nir}^-$) para ser transformados con la genoteca. Solamente encontramos 2 colonias complementadas de AS30, de una de las cuales no pudimos obtener el cósmido, por lo que tan solo conseguimos un cósmido que denominamos pCA1 y que tras ser introducido en la estirpe de E. coli HB101 se volvió a reaislar y complementar de nuevo a AS30. En la figura 19 se observan los fragmentos de restricción obtenidos por digestión de pCA1 con EcoRI, BamHI, HindIII y PstI. El tamaño de pCA1 resultó ser mucho menor del esperado, 30 Kpb, ya que Lambda empaqueta cósmidos de aproximadamente 48 Kpb.

Transformamos AS36 y AS60 con pCA1 y comprobamos que ambos son complementados por este cósmido, si bien la complementación no es perfecta, resultando especialmente mala en AS60. Transformamos a continuación todos los mutantes de fenotipo $\text{Nar}^- \text{Nir}^+$ y $\text{Nar}^- \text{Nir}^-$ (no complementables por ntrG) y resultaron complementados todos ellos, si bien de nuevo esta complementación no es buena especialmente en los mutantes $\text{Nar}^- \text{Nir}^-$. Este resultado apoya la hipótesis de que los mutantes $\text{Nar}^- \text{Nir}^-$ son mutantes polares en un operón que incluiría a los genes de las nitrato y nitrito reductasas.

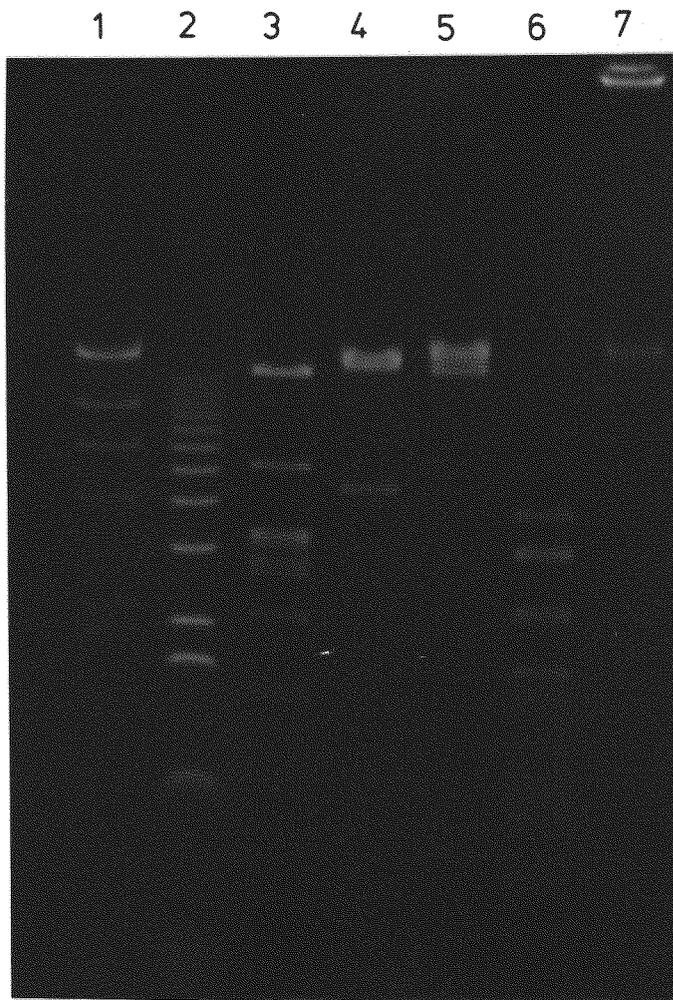


Figura 19: Fotografía de un gel de agarosa al 0.8% en el que se ve el cósmido pCA1 cortado con: EcoRI, carril 3; BamHI, carril 4; HindIII, carril 5; PstI, carril 6 y sin cortar, carril 7. El carril 1 contiene ADN de lambda cortado con HindIII y el 2 marcadores de tamaño de 1 Kpb.

5.3 Cotransformación entre los marcadores Nar y Nir

El hecho de que el mismo cósmido (pCA1) complemente a mutantes Nar⁻ y mutantes Nir⁻ indica que hay cierto ligamiento entre ambos genes. Para comprobar si efectivamente están ligados ambos genes medimos la cotransformación entre ellos.

El experimento lo realizamos utilizando como donador a la estirpe Nar⁻ Nir⁺ AS36 y como receptor a la estirpe Nar⁺ Nir⁻ AS30. Seleccionamos transformantes Nir⁺ en medio Burk suplementado con nitrito. A partir de unos 3.000 transformantes hicimos recrecimientos en medio Burk con nitrito durante unas 12 generaciones y sembramos de nuevo en placas de medio Burk con nitrito. Probamos 300 colonias en medio Burk con nitrato y todas resultaron ser Nar⁻, con lo que se obtiene una cotransformación del 100% con el tamaño de muestra utilizado, cabe por tanto concluir que ambos genes están estrechamente ligados entre sí.

Hay que señalar que la distancia de cotransformación se ha obtenido en un solo experimento. La razón para esto es que la mutación nif-6 que llevan AS30 y AS36 revierte con una cierta frecuencia, originando bacterias que fijan nitrógeno y que desplazan a los transformantes Nir⁺ durante el recrecimiento realizado después de la transformación. Por esto, a pesar de haber realizado el experimento 4 veces, solo pudimos obtener el resultado de uno de ellos, en el cual la frecuencia de transformación fue especialmente alta.

DISCUSION

Uno de los factores que han retrasado el desarrollo de la genética de Azotobacter ha sido la falta de sistemas de transferencia de DNA adecuados que permitieran realizar estudios de complementación y/o recombinación entre mutantes. Aunque han sido descritos sistemas de transferencia de DNA por conjugación (Tortolero et al., 1983) y por transformación (David et al., 1981; Glick et al., 1985; Page, 1978; Page y von Tigerstrom, 1979) y se han realizado estudios de complementación usando el plásmido pJB3JI (Santero et al., 1986) los mayores progresos se han conseguido gracias a la tecnología del DNA recombinante (Kennedy y Toukdarian, 1987). Por lo que hemos hecho una genoteca de DNA genómico de A. vinelandii que nos ha permitido aislar un cósmido que complementa a nuestros mutantes.

Todos los mutantes, 196 en total, se complementaron por el mismo cósmido, pCA1, independientemente de su fenotipo, $Nar^+ Nir^-$, $Nar^- Nir^+$ o $Nar^- Nir^-$. Esto indica que muy probablemente todos los mutantes Nar^- están afectados en el mismo gen, nitrato reductasa, siendo posible que en las condiciones empleadas para la obtención de mutantes no sea posible el aislamiento de mutantes en el cofactor de molibdeno, según se discutió en el capítulo 2. Por otro lado, el hecho de que los genes de las dos reductasas estén estrechamente ligados según se deduce del experimento de cotransformación y de que tanto los mutantes Nar^- como los Nir^- se complementen por el mismo fragmento de DNA, apoya la hipótesis de la existencia de un operón que incluya a ambos genes. Además, aunque no podamos descartar que en pCA1 vaya un gen regulador nuevo que complemente a los mutantes $Nar^- Nir^-$, la hipótesis más

plausible es que estos mutantes tengan mutaciones polares y sean por eso complementados por pCA1.

Todos los datos obtenidos en esta tesis, tanto fisiológicos como genéticos, concuerdan con la existencia del citado operón, sin embargo, para terminar de comprobar la veracidad de esta hipótesis habrá que construir mutaciones polares en pCA1 o en un plásmido con el fragmento cromosómico que nos interesa subclonado, haciendo uso de un transposón (p. ej. Tn 5) y reintroducir a este por recombinación homóloga en el cromosoma principal de A. vinelandii para comprobar que ahí también se produce el mismo efecto de polaridad.

CONCLUSIONES

- 1) Las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa están reguladas genéticamente, siendo inducibles por nitrato y en menor medida por nitrito y reprimibles por amonio.
- 2) La actividad nitrato reductasa es mayor en células cultivadas con una fuerte aireación que con agitación.
- 3) El cambio de las células de un medio agotado o semiagotado a uno de refresco produce una subida inespecífica de la nitrato reductasa y la nitrito reductasa. Este aumento de actividad se produce incluso en ausencia de los inductores y en presencia de amonio. Los genes ntrA y ntrC son necesarios para esta síntesis inespecífica de ambas enzimas.
- 4) Las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa son muy estables, manteniéndose activas incluso en ausencia de los sustratos y presencia de amonio.
- 5) El amonio reprime más eficientemente a ambas reductasas cuando la fuente de carbono es "pobre" que cuando es "rica", siendo necesaria una menor concentración de amonio y alcanzándose niveles más bajos de actividad cuando la fuente de carbono es "pobre" que cuando es "rica".
- 6) Existe algún gen cuyo producto modula la represión por amonio de la nitrato reductasa y la nitrito reductasa, haciéndola menos eficiente cuando las células están en presencia de una buena fuente de carbono. La pérdida por mutación de esta función hace que A. vinelandii reprima siempre a ambas reductasas como si estuviera en presencia de una fuente de carbono "pobre".

7) El producto del gen ntrC es necesario para la expresión de la nitrato reductasa y la nitrito reductasa.

8) La nitrato reductasa y la nitrito reductasa están correguladas y sus genes próximos en el cromosoma. Estos hechos, unido a la existencia de mutantes presuntamente polares, nos llevan a proponer la existencia de un operón que incluya a los genes estructurales de ambas enzimas.

BIBLIOGRAFIA

- AHMED, J. y H. SPILLER (1976) "Purification and some properties of the nitrate reductase from Ankistrodesmus braunii" Plant Cell Physiol. 17:1-10.
- AMES, B. N. y H. J. Whitfield (1966) "Frameshift mutagenesis in Salmonella" Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31:221-225.
- BACKMAN, K. C., Y. CHEN, S. UENO-NISHIO y B. MAGASANIK (1983) "The product of glnL is not essential for regulation of bacterial nitrogen assimilation" J. Bacteriol. 154:516-519.
- BAGCHI; S. N. y H. N. SINGH (1984) "Genetic control of nitrate reduction in the cyanobacterium Nostoc moscorum" Molec. Ge. Genet. 193:82-84.
- BARCENA, J. A. (1980) "Enzimas de la asimilación de amonio en la bacteria A. chroococcum" Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- BEEVERS, L. y R. H. HAGEMAN (1969) "Nitrate reduction in higher plants" Ann. Rev. Plant Physiol. 20:495-522.
- BEEVERS, L. y R. H. HAGEMAN (1972) "The role of light in nitrate metabolism in higher plants" En: Photophysiology, ed. A. C. Giese, 7:85-113. New York: Academic. 353 pp.
- BERG, D. (1977) "Insertion and excision of the transposable kanamycin resistance determinant Tn5" DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes. A. I. Bukhari, J. A. Shapiro y S. L. Adhya (eds), Cold Spring Harbor Press, New York. pp 205-212.
- BERG, D. E., J. DAVIES, B. ALLET y J. D. ROCHAIX (1975) "Transposition of R factor genes to bacteriophage lambda" Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72:3628-3632.
- BERG, D., A. WEISS y L. CROSSLAND (1980) "The polarity of Tn5 insertion mutations in Escherichia coli" J. Bacteriol. 142:439-446.
- BERGER, H., W. J. BRAMMER y C. YANOFSKY (1968) "Analysis of amino acid replacements resulting from frameshift and missense mutations in the tryptophan synthetase A gene of E. coli" J. Mol. Biol. 34:219-238.
- BEYNON, J., M. CANNON, V. BUCHANAN-WOLLASTON y F. CANNON (1983) "The nif promoters of Klebsiella penumoniae have a characteristic primery structure" Cell 34:665-671.

- BISHOP, P. E. (1982) "Expression of an alternative nitrogen fixation system in Azotobacter vinelandii" J. Bacteriol. 150:1244-1251.
- BISHOP, P. E., D. M. JARLENSKI y D. R. HETHERINGTON (1980) "Evidence for an alternative nitrogen fixation system in Azotobacter vinelandii" Proc. Nat. Acad. Sci USA 77:7342-7346.
- BONNEFOY-ORTH, V., M. LEPELLETIER, M. C. PASCAL y M. CHIPPAUX (1981) "Nitrate reductase and cytochrome b₅ nitrate reductase structural genes as parts of the nitrate reductase operon" Molec. Gen. Genet. 181:535-540.
- BONNEFOY, V., M. C. PASCAL J. RATOUCNIAK y M. CHIPPAUX (1986) "Autoregulation of the nar operon encoding nitrate reductase in Escherichia coli" Molec. Gen. Genet. 204:180-184.
- BRAMMER, W. J., H. BERGER y C. YANOFSKY (1967) "Altered amino acid sequences produced by reversion of frameshift mutants of tryptophan synthetase A gene of E. coli" Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58:1499-1506.
- BROWN, M., R. M. JACKSON y S. K. BURLINGHAM (1968) "Effects produced on tomato plants, Lycopersicum esculentum, by seed or root treatment with gibberelic acid" J. Exptl. Bot. 19:544-552.
- BROWN, C. M., D. S. MAC-DONALD y J. L. MEERS: (1974) "Physiological aspects of microbial inorganic nitrogen metabolism" Advac. Microbiol. Physiol. 11:1-45.
- BUENO, R., G. PAHEL y B. MAGASANIC (1985) "Role of glnB and glnD gene products in regulation of the glnALG operon of Escherichia coli" J. Bacteriol. 164:816-822.
- BURNS, R. C. (1965) "ATP-dependent hydrogen evolution by cell-free preparations of Clostridium pasteurianum" pp 289-297. En A. San Pietro (ed.) A symposium on non-heme iron in proteins: role in energy conversion. Antioch. Press, Yellow Springs, Ohio.
- CANDAU, P. (1979) "Purificación y propiedades de la ferredoxina-nitrato reductasa de la cianobacteria Anacystis nidulans" Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- CAWSE, P. A. (1967) "The determination of nitrate in soil solution by ultraviolet spectrophotometry" Analyst 92:311.

CLARKE y CARBON (1976) "A colony bank containing synthetic clones from colony banks by screening with radioactive antibody" *Methods Enzymol.* 68 pp. 436.

CONTRERAS. A. (1986) "Análisis genético con transposones en Azotobacter vinelandii" Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.

COVE, D. J. y J. A. PATEMAN (1969) "Autoregulation of the synthesis of nitrate reductase in Aspergillus nidulans" *J. Bacteriol.* 97:1374-1378.

CHEN, Y. M., K. BACKMAN y B. MAGASANIK (1982) "Characterization of a gene, glnL, whose product is involved in the regulation of nitrogen utilization in Escherichia coli" *J. Bacteriol.* 150:214-220.

DAVID, M., M. TRONCHET y J. DENARIE (1981) "Transformation of Azotobacter vinelandii with plasmids RP4 (IncP-1 group) and RSF1010 (IncQ group)" *J. Bacteriol.* 146:1154-1157.

DIEZ, J., A. CHAPARRO, J. M. VEGA y A. M. RELIMPIO (1977) "Studies on the regulation of assimilatory nitrate reductase in Ankistrodesmus braunii" *Planta* 137:231-234.

DE BRUIJIN F. J. y F. M. AUSUBEL (1981) "The cloning and transposon mutagenesis of the glnA region of Klebsiella pneumoniae: identification of glnR, a gene involved in the regulation of the nif and hut operon" *Molec. Gen. Genet.* 183:289-297.

EDWARDS, E. S., S. S. RONDEAU y J. A. DEMOSS (1983) "chlC(nar) operon of Escherichia coli includes structural genes for alfa and beta subunits of nitrate reductase" *J. Bacteriol.* 153:1513-1520.

ELMERICH, G. y J. P. AUBERT (1971) "Synthesis of glutamate by glutamine: 2-oxoglutarate amidotransferase (NADP oxido reductase) in Bacillus megaterium" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42:371-376.

FIGURSKI, D. M. y D. R. HELINSKI (1979) "Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans" *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76:1648-1652.

FIMMEL, A. y B. HADDOCK (1979) "Use of chlC-lac fusions to determine regulation of gene chlC in Escherichia coli K-12" *J. Bacteriol.* 138:726-730.

FLORES, E., M. G. GUERRERO y M. LOSADA (1980) "Short-term ammonium inhibition of nitrate utilization by Anacystis nidulans and other cyanobacteria" Arch. Microbiol. 128:137-144.

FOGG, G. E. (1942) "Studies on nitrogen fixation by blue green algae" J. Exptl. Biol. 19:78-87.

FOOR, F., R. J. CEDERGREN, S. STREICHER, S. RHEE y B. MAGASANIK (1978) "Glutamine Synthetase of Klebsiella aerogenes: properties of glnD mutants lacking uridylyltransferase" J. Bacteriol. 134:562-568.

GAILLARDIN, C. M. y B. MAGASANIK: (1978) "Involvements of the product of the glnF gene in the autogenous regulation of glutamine synthetase formation in Klebsiella aerogenes" J. Bacteriol. 133:1329-1348.

GARCIA, E., S. BANCROFT y S. G. RHEE: (1977) "The product of a newly identified gene, glnF, is required for synthesis of glutamine synthetase in Salmonella" Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74:1662-1666.

GARRETT, R. H. y N. K. AMY (1978) "Nitrate assimilation in fungi" Adv. Microb. Physiol. 18:1-65.

GLICK, B. R., H. E. BROOKS y J. J. PASTERNAK (1985) "Transformation of Azotobacter vinelandii with plasmid DNA" J. Bacteriol. 162:276-279.

GUERRERO, J. M. y M. GUTIERREZ (1977) "Purification and properties of the NAD(P)H:nitrate reductase of the yeast Rhodotorula glutinis" Biochem. Biophys. Acta 482:272-285.

GUERRERO, M. G., J. M. VEGA, E. LEADBETTER y M. LOSADA (1973) "Preparation and characterization of a soluble nitrate reductase from Azotobacter chroococcum" Arch. Microbiol. 91:287-304.

GUERRERO, M. G., J. M. VEGA y M. LOSADA (1981) "The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation" Ann. Rev. Plant Physiol. 32:169-204.

HAMDI, Y. A. (1985) "La fijación del nitrógeno en la explotación de los suelos" Boletín de Suelos de la FAO, nº 49 pp 75-82.

HATTORI, A. (1962) "Adaptive formation of nitrate reducing system in Anabaena cylindrica" Plant Cell Physiol. 3:371-377.

HATTORI, A. (1970) "Solubilization of nitrate reductase from the blue-green alga Anabaena cylindrica" Plant Cell Physiol. 11:975-978.

- HAWKES, T., M. MERRICK y R. DIXON (1985) "Interaction of purified NtrC protein with nitrogen regulated promoters from Klebsiella pneumoniae" Molec. Gen. genet. 201:492-498.
- HEGAZI, N. A., M. EDI, R. S. FARAG y M. MONIB: (1974) "Asymbiotic N₂-fixation in the rhizosphere of sugarcane planted under semi-arid conditions of Egypt" Per. Ecol. Biol. Sci. 16:23-37.
- HERRERO, A., E. FLORES y M. G. GUERRERO (1981) "Regulation of nitrate reductase levels in the cyanobacteria Anacystis nidulans, Anabaena sp. strain 7119, and Nostoc sp. strain 6719" J. Bacteriol. 145:175-180.
- HEWITT, E. J. (1975) "Assimilatory nitrate-nitrite reduction" Ann. Rev. Plant Physiol. 26:73-100.
- HEWITT, E. J., D. P. HUCKLESBY y B. A. NOTTON (1976) "Nitrate metabolism" En: Plant Biochemistry, ed. J. Bonner, J. E. Varner, pp. 633-681. New York: Academic. 925 pp.
- HEWITT, E. J. y B. A. NOTTON (1980) "Nitrate reductase systems in eukaryotic and prokaryotic organisms" En: Molybdenum and molybdenum-containing enzymes, ed. M. Coughlan, pp. 273-325. Oxford: Pergamon. 577 pp.
- HIRSCHMAN, J., P. K. WONG, K. SEI, J. KEENER y S. KUSTU: (1985) "Products of nitrogen regulatory genes ntrA and ntrC of enteric bacteria activate glnA transcription in vitro: Evidence that the ntrA product is a sigma factor" Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:7525-7529.
- HOLLIDAY, R. (1956) "A new method for the identification of biochemical mutants of microorganisms" Nature 178:987.
- INGLEDEW, W. J. y R. K. POOLE (1984) "Respiration chains of Escherichia coli" Microbiol. Rev. 48:222-271.
- JOHANSSON, B. y H. GEST (1976) "Inorganic nitrogen assimilation by the photosynthetic bacterium Rhodospseudomonas capsulata" J. Bacteriol. 128:683-688.
- JOLLY, S. O., N. E. TOLBERT (1978) "NADH-nitrate reductase inhibitor from soybean leaves" Plant Physiol. 62:197-203.
- KADAM, S. S., A. P. GANDHI, S. K. SAWHNEY y M. S. NAIK (1974) "Inhibitor of nitrate reductase in the roots of rice seedings and its effect on the enzyme activity in the presence of NADH" Biochem. Biophys. Acta 350:162-170.



KARUNAKAR, P. D. y T. RAJGOPALAN (1936) "Azotobacter inoculation of seeds of cereals-experiments with sorghum" Proc. Econ. Biologists. 1-10.

KENNEDY, C., A. TOUKDARIAN (1987) "Genetics of Azotobacters: Applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism" Ann. Rev. Microbiol., in press.

KUO, T., A. KLEINHOFES y R. L. WARNER (1980) "Purification and partial characterization of nitrate reductase from barley leaves" Plant Sci. Lett. 17:371-381.

KUSTU, S., D. BURTON, E. GARCIA, L. McCARTER y N. McFARLAND (1979) "Nitrogen control in Salmonella: regulation by the glnR and glnF gene products" Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76:4576-4580.

LEE, S. B. y P. W. WILSON (1943) "Hydrogenase and nitrogen fixation by Azotobacter" J. Biol. Chem. 151:377-385.

LEONARDO, J. M. y R. B. GOLDBERG (1980) "Regulation of nitrogen metabolism in glutamine auxotrophs of Klebsiella pneumoniae" J. Bacteriol. 142:99-110.

LEONG, C. C. y T. C. SHEN (1979) "Reversible inactivation of the nitrate reductase of rice plants" Experientia 35:584-585.

LEPO, J. E., O. WYSS y F. R. TABITA (1982) "Regulation and Biochemical characterization of the glutamine synthetase of Azotobacter vinelandii" Biochem. Biophys. Acta 704:414-421.

LOSADA, M. y M. G. GUERRERO (1979) "The photosynthetic reduction of nitrate and its regulation" En: Photosynthesis in relation to model systems, ed. J. Barber, pp. 365-408. Amsterdam: Elsevier. 434 pp.

LUDWIG, R. A. (1978) "Control of ammonium assimilation in Rhizobium 32H1" J. Bacteriol. 135:114-123.

MAGASANIK, B. (1982) "Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria" Ann. Rev. Genet. 16:135-168.

MANDELL, M. y A. HIGA (1970) "Calcium dependent bacteriophage DNA infection". J. Mol. Biol., 53:154.

MANIATIS, T., E. F. FRITSCH y J. SAMBROOK "Molecular cloning. A laboratory manual" Cold Spring Harbor Laboratory.

MANZANO, C., P. CANDAU, C. GOMEZ-MORENO, A. M. RELIMPIO y M. LOSADA (1976) "Ferredoxin-dependent photosynthetic reduction of nitrate and nitrite by particles of Anacystis nidulans" Mol. Cell. Biochem. 10:161-169.

MANZANO, C., P. CANDAU, M. G. GUERRERO (1978) "Affinity chromatography of Anacystis nidulans ferredoxin-nitrate reductase and NADP reductase on reduced ferredoxin-sepharose" Anal. Biochem. 90:408-412.

MARKWELL, M. A., S. M. HAAS, J. L. BIEBER y N. E. TOLBERT (1978) "A modification of the lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples" Anal. Biochem. 87:206-210.

MARTIN, R. G. (1967) Frameshift mutants in the histidine operon of Salmonella typhimurium" J. Mol. Biol. 26:311-328.

MCDONALD, D. W. y A. CODDINGTON (1974) "Properties of the assimilatory nitrate reductase from Aspergillus nidulans" Eur. J. Biochem. 46:169-178.

MCEWAN, A. G., J. B. JACKSON y S. J. FERGUSON (1984) "Rationalization of properties of nitrate reductase in Rhodopseudomonas capsulata" Arch. Microbiol. 137:344-349.

MCFARLAND, N., L. MCCARTER, S. ARTZ y S. KUSTU (1981) "Nitrogen regulatory locus glnR of enteric bacteria is composed of cistrons ntxB and ntxC: identification of their protein products" Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78:2135-2139.

MACGREGOR, C. H. (1975) "Synthesis of nitrate reductase components in chlorate-resistant mutants of Escherichia coli" J. Bacteriol. 121:1117-1121.

MEEKS, J. C., C. P. WOLK, S. THOMAS, W. LOCKAU, P. W. SHAFFER, S. M. AUSTIN, W. S. CHIEN y A. GALONSKY (1977) "The pathway of assimilation of $^{13}\text{NH}_4^+$ by the cyanobacterium Anabaena cylindrica" J. Biol. Chem. 252:7894-7900.

MEEKS, J. C., K. L. WYCOFF, J. S. CHAPMAN y C. S. ENDERLIN (1983) "Regulation of expression of nitrate and dinitrogen assimilation by Anabaena species" App. Env. Microbiol. 45:1351-1359.

MERRICK, M. y W. D. P. STEWART (1985) "Studies on the regulation and function of the Klebsiella pneumoniae ntrA gene" Gene, 35:297-303.

MIFLIND, B. J., P. J. LEA (1976) "The path of ammonia assimilation in the plant kingdom" TIBS 1:103-106.

- MORRIS, I. (1974) "Nitrogen assimilation and protein synthesis" En: *Algal Physiology and Biochemistry*, ed. W. D. P. Steward, pp. 583-609. Oxford: Blackwell, 989 pp.
- NEWTON, A. (1970) "Isolation and characterization of frameshift mutations in the lac operon" *J. Mol. Biol.* 49:589-601.
- NUTMAN, P. S. (1956) "The influence of the legume in root-nodule symbiosis" *Biol. Rev.* 31:109-149.
- OHMORI, M., K. OHMORI y A. STROTMANN (1977) "Inhibition of nitrate uptake by ammonia in a blue-green alga, Anabaena cylindrica" *Arch. Microbiol.* 114:225-229.
- O'NEILL, G. M. KIELY y R. A. BENDER (1984) "Trnasposon Tn5 encodes streptomycin resistance in nonenteric bacteria" *J. Bacteriol.* 159:388-389.
- ORTEGA, T., F. CASTILLO y J. CARDENAS (1976) "Photolysis of water coupled to nitrate reduction by Nostoc moscorum subcellular particles" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71:885-891.
- OW, D. W., V. SUNDARESAN, D. M. ROTHSTEIN, S. E. BROWN y F. M. AUSUBEL (1983) "Promoters regulated by the glnG (ntrC) and nifA gene products share a heptameric consensus sequence in the -15 region" *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 80:2524-2528.
- OW, D. W., Y. XIONG, Q. GU y S. CHEN (1985) "Mutational analysis of the Klebsiella pneumoniae nitrogenase promoter: sequences essential for positive control by nifA and ntrC (glnG) products" *J. Bacteriol.* 161:868-874.
- PAGE, W. J. (1978) "Transformation of Azotobacter vinelandii strains unable to fix nitrogen with Rhizobium spp. DNA" *Can. J. Microbiol.* 24:209-214.
- PAGE, W. J. y H. L. SADOFF (1976) "Control of transformation competence in Azotobacter vinelandii by nitrogen catabolite derepression" *J. Bacteriol.* 125:1088-1095.
- PAGE, W. J. y M. VON TIGERSTROM (1979) "Optimal conditions for transformation of Azotobacter vinelandii" *J. Bacteriol.* 139:1058-1061.
- PAHEL, G., D. M. ROTHSTEIN y B. MAGASANIK (1982) "Complex glnA glnL glnG operon of Escherichia coli" *J. Bacteriol.* 150:202-213.

- PAHEL, G. y B. TYLER (1979) "A new glnA-linked regulatory gene for glutamine synthetase in Escherichia coli" Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76:4544-4548.
- PAHEL, G., A. D. ZELENETZ y B. TYLER (1978) "gltB gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in Escherichia coli" J. Bacteriol. 133:139-148.
- PALACIAN, E., F. DE LA ROSA, F. CASTILLO y C. GOMEZ-MORENO (1974) "Nitrate reductase from Spinacea oleracea. Reversible inactivation by NAD(R)H and by thiols" Arch. Biochem. Biophys. 161:441-447.
- PAN, S. S. y A. NASON (1978) "Purification and characterization of homogeneous assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-nitrate reductase from Neurospora crassa" Biochem. Biophys. Acta 523:297-313.
- PAYNE, P. J. (1973) "Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms" Bacteriol. Rev. 37:409-452.
- PUTNOKY, P., G. B. KISS, I. OTT y A. KONDOROSI (1983) "Tn5 carries a streptomycin resistance determinant downstream from the kanamycin resistance gene" Molec. Gen. Genet. 191:288-294.
- RIVAS, J., M. G. GUERRERO, A. PANEQUE y M. LOSADA (1973) "Characterization of the nitrate-reducing system of the yeast Torulopsis nitratophila" Plant Sci. Lett. 1:105-113.
- ROBSON, R., J. A. CHESHYRE, C. WHEELER, R. JONES, P. R. WOODLEY y J. R. POSTGATE (1984) "Genome size and complexity in Azotobacter chroococcum" J. Gen. Microbiol. 130:1603-1612.
- ROBSON, R. L., R. R. EADY, T. H. RICHARDSON, R. W. MILLER, M. HAWKINS y J. R. POSTGATE (1986) "The alternative nitrogenase of Azotobacter chroococcum is a vanadium enzyme" Nature 322:388-390.
- ROSENBERG, S. M., M. M. STAHL, I. KOBAYASHI y W. STAHL (1985) "Improved in vitro packaging of coliphage lambda DNA: a one-strain system free from endogenous phage" Gene 38:165-175.
- ROTH, J. R. (1974) "Frameshift mutations" Ann. Rev. Gen. 8:319-346.

ROTHMAN, R., D. ROTHSTEIN, F. FOOR y B. MAGASANIK (1982) "Role of glnA-linked genes in the regulation of glutamine synthetase and histidine formation in Klebsiella aerogenes" J. Bacteriol. 150:221-230.

RUBENCHICK, L. I. (1960) "Azotobacter and its use in agriculture" Translated from Russian. Published for the National Science Foundation. Washington, D. C. US Dept. of Commerce. Washington 25, D. C.

SADOFF, H. L., B. SHIMEL y S. ELLIS (1979) "Characterization of Azotobacter vinelandii deoxiribonucleic acid and folded chromosomes" J. Bacteriol. 138:871-877.

SANTERO, E., F. LUQUE, J. R. MEDINA y M. TORTOLERO (1986) "Isolation of ntxA-like mutants of Azotobacter vinelandii" J. Bacteriol. 166:541-544.

SHAW, K. J. y C. M. BERG (1979) "Escherichia coli K12 auxotrophs induced by insertion of the transposable element Tn5" Genetics 92:741-747.

SHERRARD, J. H., J. A. KENNEDY y M. J. DALLING (1979) "In vitro stability of nitrate reductase from wheat leaves" Plant Physiol. 64:640-645.

SHETHNA, Y. I. (1970) "Non-heme iron (iron-sulfur) proteins of Azotobacter vinelandii" Biochem. Biophys. Acta, 205:58-62.

SELVARAJ, G. y V. N. IYER (1983) "Suicide plasmid vehicles for insertion mutagenesis in Rhizobium meliloti and related bacteria" J. Bacteriol. 156:1292-1300.

SIAS, S. R. y J. L. INGRAHAM (1979) "Isolation and analysis of mutants of Pseudomonas aeruginosa unable to assimilate nitrate" Arch. Microbiol. 122:263-270.

SIAS, S. R., A. H. STOUTHAMER y J. L. INGRAHAM (1980) "The assimilatory and dissimilatory nitrate reductases of Pseudomonas aeruginosa are encoded by different genes" J. Gen. Microbiol. 118:229-234.

SIEDEL, J. y E. SHELTON (1979) "Purification and properties of Azotobacter vinelandii glutamine synthetase" Arch. Biochem. Biophys. 163:155-171.

SHOWE, M. K. y J. A. DEMOSS (1968) "Localization and regulation of nitrate reductase in Escherichia coli" J. Bacteriol. 95:1305-1313.

SNELL, F. D. y C. T. SNELL (1949) "Colorimetric methods of analysis" Vol. 3 pp 804-805. Van Nostrand, New York.

SOLOMONSON, L. P. (1979) "Structure of Clorella nitrate reductase" En: Nitrogen assimilation of plants, ed. E. J. Hewitt y C. V. Cutting. pp. 199-205. London: Academic. 708 pp.

SOLORZANO, L. (1969) "Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypoclorite method" Limnol. Oceanogr. 14:799-801.

SORGER, G. J. (1969) "Regulation of nitrogen fixation in Azotobacter vinelandii OP: the role of nitrate reductase" J. Bacteriol. 98:56-61.

SORGER, G. J., R. PREMAKUMAR y D. GOODEN (1978) "Demonstration in vitro of two intracellular inactivators of nitrate reductase from Neurospora" Biochem. Biophys. Acta 540:33-47.

STEVENS, S. E., Jr., y C. VAN BAALEN (1974) "Control of nitrate reductase in a blue-green alga" Arch. Biochem. Biophys. 161:146-152.

STEWART, V. (1982) "Requirement of Fnr and NarL functions for nitrate reductase expression in Escherichia coli K-12" J. Bacteriol. 151:1320-1325.

SYRETT, P. J. y J. W. LEFTLEY (1976) "Nitrate and urea assimilation by algae" En: Perspectives in Experimental Biology, ed. N. Sunderland, 2:221-234. Oxford: Pergamon. 523 pp.

SYRETT, P. J. y I. MORRIS (1963) "The inhibition of nitrate assimilation by ammonium in Chlorella" Biochem. Biophys. Acta 67:566-575.

TANIGUCHI, S. y K. OHMACHI (1960) "Particulate nitrate reductase of Azotobacter vinelandii" J. Biochem. 48:50-62.

TEMPEST, D. W., J. L. MEERS y C. M. BROWN (1973) "The enzymes of glutamine metabolism" (S. Prusiner y E. R. Stadtman, eds.) pp. 167, Academic Press, New York.

TOMSETT, A. B. y R. H. GARETT (1981) "Biochemical analysis of mutants defective in nitrate assimilation in Neurospora crassa: evidence for autogenous control of nitrate reductase" Molec. Gen. genet. 184:183-190.

TORTOLERO, M., E. SANTERO y J. CASADESUS (1983) "Plasmid transfer and mobilization of nif markers in Azotobacter vinelandii" Microbios Lett. 22:31-35.

- TORTOLERO, M., R. VILA y A. PANEQUE (1975) "Ferredoxin-dependent nitrate reductase from Azotobacter chroococcum" Plant Sci. Lett. 5:141-145.
- TOUKDARIAN, A. y C. KENNEDY (1986) "Regulation of nitrogen metabolism in Azotobacter vinelandii: isolation of ntr and glnA genes and construction of ntr mutants" The EMBO Journal 5:399-407.
- TRINITY, P. M. y P. FILNER (1979) "Activation and inhibition of nitrate reductase extracted from cultured tobacco cells" Plant Physiol. 63:133.
- TYLER, B. (1976) "Regulation of the assimilation of nitrogen compounds" Ann. Rev. Biochem. 47:1127-1162.
- VANCURA, V. (1961) "Detection of gibberelic acid in Azotobacter cultures" Nature 192:88-89.
- VEGA, J. M., M. G. GUERRERO, E. LEADBETTER y M. LOSADA (1973) "Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide nitrite reductase from Azotobacter chroococcum" Biochem. J. 133:701-708.
- VENNESLAND, B. y M. G. GUERRERO (1979) "Reduction of nitrate and nitrite" En: Encyclopedia of plant physiology, New Ser., ed. M. Gibbs, E. Latzko, 6:445-456. Berlin: Springer. 578 pp.
- VIRTANEN, A. I., J. JORMA, H. LINKOLA y A. LINNASALMI (1947) "On the relation between nitrogen fixation and leghaemoglobin content of leguminous root nodules" Acta Chem. Scand. 1:90-111.
- WALLACE, W. (1975) "Effects of a nitrate reductase inactivating enzyme and NAD(P)H on the nitrate reductase from higher plants and Neurospora" Biochem. Biophys. Acta 377:239-250.
- WALLACE, W. (1978) "Comparison of a nitrate reductase inactivating enzyme from the maize root with a protease from yeast which inactivates tryptophan synthase" Biochem. Biophys. Acta 524:418-427.
- WANG, R. y D. J. D. NICHOLAS (1986) "Derepression of nitrate reductase from Derxia gummosa and some properties of the purified enzyme" Arch. Microbiol. 145:20-26.
- WILSON, P. W., J. F. HULL y R. H. BURRIS (1943) "Competition between free and combined nitrogen in the nutrition of Azotobacter" Proc. Nat. Acad. Sci. USA 29:289-294.

ZOOND, A. (1926) "The relation of combined nitrogen to the physiological activity of Azotobacter" Brit. J. Exptl. Biol. 4:105-113

YAMAYA, T., A. OAKS y I. L. BOESEL (1980) "Characteristics of nitrate reductase-inactivating proteins obtained from corn roots and rice cell cultures" Plant Physiol. 65:141-145.

YAMAYA, T. y K. OHIRA (1976) "Nitrate reductase inactivating factor from rice cells in suspension culture" Plant Cell Physiol. 17:633-641.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal Integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis doctoral de D. Francisco Javier Luque Urzuegui titulada Genética de la acumulación de nitrito en *Arctostaphylos Umelandii* acordó otorgarle la calificación de APTO con LODE

Sevilla, 3 de julio de 1987

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

El Presidente

El Secretario,

El Doctorado,



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672372