

GENÉTICA DE LA REGULACIÓN DE LA ASIMILACIÓN DE NITRATO
EN *AZOTOBACTER VINELANDII*

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en
Ciencias Biológicas por el Licenciado
FRANCISCO RAMOS MORALES

Sevilla, Junio de 1992

Directora:

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

A Regla

Traza el corazón del hombre sus caminos
pero es Dios quien asegura sus pasos.
(Proverbios 16,9)

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla.

A María Tortolero, Directora de la tesis, le agradezco que me diera la oportunidad de realizar el trabajo así como su interés en mi formación científica y su gran simpatía.

Quiero mostrar mi agradecimiento a los miembros del grupo de investigación de *Azotobacter vinelandii*, Gonzalo Blanco y Juan Carlos Gutiérrez por su ayuda imprescindible en la discusión y realización de los experimentos, así como a Francisco Romero, "miembro adoptivo" del grupo. A Francisco Luque, que sentó las bases sobre las que pude edificar este trabajo y a Eduardo Santero que me inició en los misterios del ADN. A los alumnos de colaboración Manuel y Rosario por su trabajo en ciertos experimentos.

A todos los miembros del Departamento les agradezco su constante ayuda material y apoyo moral. En especial agradezco a Antonio Torres, Director del Departamento de Microbiología, el haberme brindado todas las facilidades para realizar el trabajo en su Departamento.

A José Antonio Pintor, Enrique Flores y sus doctorandos les agradezco la ayuda prestada en la realización de los experimentos con radioactividad.

A todos los miembros de los departamentos de Genética y Bioquímica les agradezco su colaboración desinteresada en uno u otro momento a lo largo de la realización de la tesis.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. EL ORGANISMO: AZOTOBACTER VINELANDII	4
1.1.1. Sistemática	4
1.1.2. Importancia aplicada	5
1.1.3. Genética	6
1.1.3.1. Organización del genomio	6
1.1.3.2. Mutagénesis	7
1.1.3.3. Sistemas de transferencia genética.....	9
1.1.3.3.1. Transducción.....	9
1.1.3.3.2. Transformación.....	10
1.1.3.3.3. Conjugación.....	11
1.2. EL PROBLEMA: LA ASIMILACIÓN DE NITRATO ...	13
1.2.1. El ciclo del nitrógeno	13
1.2.2. La fijación del nitrógeno	15
1.2.3. Regulación de la fijación del nitrógeno: sistema <i>ntr</i>	18
1.2.4. La reducción del nitrato y del nitrito	21
1.2.4.1. Respiración de nitrato y desnitrificación.....	22
1.2.4.2. El cofactor de molibdeno ...	25
1.2.4.3. Asimilación de nitrato	26
1.2.4.3.1. Nitrato reductasas asimilatorias.....	27
1.2.4.3.2. Nitrito reductasas asimilatorias.....	29
1.2.4.3.3. Regulación de la asimilación de nitrato....	30
1.2.4.3.4. La asimilación de nitrato en <i>Azotobacter</i>	32
1.3. LOS OBJETIVOS DEL TRABAJO	35

2.MATERIALES Y MÉTODOS	36
2.1.ESTIRPES BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y FAGOS	37
2.2.MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	39
2.2.1. <i>Azotobacter vinelandii</i>	39
2.2.2. <i>Escherichia coli</i>	40
2.2.3.Agentes selectivos	42
2.3.TAMPONES Y SOLUCIONES	42
2.3.1.Tampón fosfato 0,5 M, pH 7,5	42
2.3.2.Solución de Fe-EDTA	42
2.3.3.Reactivo de Holmes-Bonner	43
2.3.4.Soluciones para aislar ADN plasmídico	43
2.3.5.Tampón TE	44
2.3.6.Tampón TES	44
2.3.7.Tampón TESL	44
2.3.8.Tampón SSC (x20)	44
2.3.9.Tampón TAE	44
2.3.10.Tampón de lisis para <i>A.</i> <i>vinelandii</i>	44
2.3.11.Tampones para digestiones con enzimas de restricción	44
2.3.12.Tampón para el ligamiento de ADN .	44
2.3.13.Tampón Z para β -galactosidasa	45
2.3.14.Tampón SM	45
2.3.15.Soluciones para el marcaje y detección de ADN	45
2.3.16.Soluciones para electroforesis de proteínas	45
2.3.16.1.Primer dimensión	45
2.3.16.2.Segunda dimensión	47
2.4.ESTIMACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	48
2.4.1.Actividad nitrato reductasa	48
2.4.2.Actividad nitrito reductasa	49
2.4.3.Actividad β -galactosidasa	50

2.5.MÉTODOS ANALÍTICOS	50
2.5.1.Determinación de nitrito	50
2.5.2.Determinación de proteína	51
2.5.3.Medidas de pH	51
2.5.4.Medidas espectrofotométricas	52
2.6.ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	52
2.6.1.Marcaje de proteínas con ³⁵ S	52
2.6.2.Preparación de extractos para electroforesis	53
2.6.3.Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes	53
2.6.4.Electroforesis de proteínas en condiciones no desnaturalizantes ...	54
2.6.5.Detección de proteínas en geles de poliacrilamida mediante tinción ...	55
2.6.6.Detección de proteínas en geles de poliacrilamida mediante autorradiografía	56
2.6.7.Detección de la nitrato reductasa en geles no desnaturalizantes	56
2.6.8.Electroelución	56
2.6.9.Expresión de proteínas de <i>A.</i> <i>vinelandii</i> en <i>E. coli</i>	57
2.7.MÉTODOS GENÉTICOS Y DE BIOLOGÍA MOLECULAR	
58	
2.7.1.Mutagénesis con Tn5	58
2.7.2.Mutagénesis de pPN3 con Tn5-B20 ...	58
2.7.3.Conjugación	59
2.7.4.Transformación	59
2.7.4.1. <i>Azotobacter vinelandii</i>	59
2.7.4.2. <i>Escherichia coli</i>	60
2.7.5.Infección	60
2.7.6.Segregación y enriquecimiento	60
2.7.7.Aislamiento de ADN	61
2.7.7.1.Aislamiento de ADN	

plasmídico.....	61
2.7.7.2.Aislamiento de ADN cromosómico de <i>A. vinelandii</i> ...	61
2.7.7.2.1.Aislamiento de ADN purificado.....	61
2.7.7.2.2.Aislamiento de ADN cromosómico para transformación.....	62
2.7.7.3.Aislamiento de ADN de λ	62
2.7.8.Restricción del ADN	63
2.7.9.Relleno de extremos cohesivos	63
2.7.10.Ligamiento de ADN	64
2.7.11.Electroforesis de ADN en gel de agarosa	64
2.7.12.Purificación de fragmentos de restricción mediante la técnica de "geneclean"	65
2.7.13.Análisis de ADN mediante hibridación	65
2.7.13.1.Transferencia de ADN a filtros de nailon.....	65
2.7.13.2.Marcaje de las sondas	66
2.7.13.3.Hibridación de ADN con sondas marcadas con digoxigenina-dUTP.....	66
2.7.14.Construcción de una genoteca	66
3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
3.1.OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE TN5 AFECTADOS EN LA ASIMILACIÓN DE NITRATO	70
3.1.1.Obtención de mutantes de Tn5	72
3.1.2.Actividades nitrato y nitrito reductasa	72
3.1.2.1.Actividades de los mutantes de Tn5.....	72
3.1.2.2.Actividades enzimáticas de	

	IX
mutantes de ICR.....	74
3.1.3.Hibridaciones con sonda de Tn5	74
3.1.3.1.Obtención de la sonda	74
3.1.3.2.Preparación de los filtros .	75
3.1.3.3.Hibridaciones	75
3.1.4.Otros experimentos	78
3.1.4.1.Complementación con pLV50 ..	78
3.1.4.2.Transformaciones con ADN to-tal.....	78
3.1.5.Discusión	79
3.2.CLONACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA ASIMILACIÓN DE NITRATO	83
3.2.1.Construcción de una genoteca de <i>A. vinelandii</i> en el fago I-GEM12	83
3.2.2.Obtención de sondas	83
3.2.2.1.Obtención de una sonda a partir de AS251.....	85
3.2.2.2.Obtención de una sonda a partir de AS253.....	88
3.2.3.Demostración de la existencia de un operón	89
3.2.3.1.Transformaciones con pRM3 ..	89
3.2.3.2.Mapa de restricción de pRM3	89
3.2.3.3.Construcción de derivados de pRM3.....	90
3.2.3.4.Mutagénesis de pPN3	92
3.2.3.5.Estudio de las fusiones <i>lac</i> en <i>A. vinelandii</i>	94
3.2.3.6.Mutagénesis de pPN2	98
3.2.3.7.Inserciones <i>sac</i> y Ω en <i>Azotobacter</i>	100
3.2.4.Búsqueda de genes de <i>Azotobacter vinelandii</i> en la genoteca	102
3.2.4.1.Clonación de <i>nasAB</i>	102
3.2.4.2.Subclonación en plásmidos y	

	X
definición del gen <i>nasR</i>	106
3.2.4.3.Búsqueda del gen mutado en AS253(<i>nas-5</i>).....	113
3.2.4.4.Caracterización del ADN clonado en pRM9.....	115
3.2.5.Expresión de las fusiones en diferentes fondos genéticos	117
3.2.6.Discusión	119
3.2.6.1.Construcción de la genoteca y obtención de sondas.....	119
3.2.6.2.Operón <i>nasAB</i>	120
3.2.6.3.Regulación del operón	123
3.2.6.4.Clonación de un gen semejante a <i>chlB</i>	126
3.3.ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS PROTEICOS INDUCIBLES POR NITRATO EN A. VINELANDII	127
3.3.1.Patrón electroforético de la estirpe silvestre	127
3.3.2.Patrón de los mutantes <i>ntrA</i> y <i>ntrC</i>	131
3.3.3.Patrón electroforético de otros mutantes afectados en la asimilación de nitrato	132
3.3.4.Asociación de la actividad nitrato reductasa al polipéptido de 40 kDa	135
3.3.5.Expresión de <i>nasAB</i> en <i>E. coli</i>	137
3.3.6.Discusión	140
4.CONCLUSIONES	144
5.BIBLIOGRAFÍA	146

ABREVIATURAS

A	Amperio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
Ap	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ATP	Adenosín-5'-trifosfato
Ci	Curio
Cm	Cloranfenicol
cpm	Cuentas por minuto
Chl	Clorato
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica = absorbancia
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetraacético
etidio	3,8-diamino-6-etil-5-fenilfenantridio
FAD	Flavín-adenín-dinucleótido
g	Gramo
g	Aceleración de la gravedad
GMP	Guanosín-5'-monofosfato
GTP	Guanosín-5'-trifosfato
h	Hora
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kb	Kilopares de bases de ADN
Km	Kanamicina
l	Litro
log	Logaritmo decimal
m	Metro
M	Molar
MGD	Molibdopterina guanina dinucleótido
min	Minuto
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MPT	Molibdopterina

MV	Metilviológeno
N-NEDA	N-[naftil-(1)]-etilendiamina-diclorhidrato
NAD(P)H	Nicotinamida-adenín-dinucleótido(-fosfato)
Nal	Ácido nalidíxico
Nas	Capacidad de reducción de nitrato
Nif	Capacidad de fijación de nitrógeno
Nis	Capacidad de reducción de nitrito
NiR	Nitrito reductasa
NR	Nitrato reductasa
p/v	Peso/volumen
p/p	Peso/peso
PEG	Polietilén-glicol
Rif	Rifampicina
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato sódico
Sm	Estreptomina
Spc	Espectinomicina
t	Tiempo
Tc	Tetraciclina
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
U	Unidad de actividad enzimática
V	Voltio
W	Watio
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-
galactopirano	sido
°C	Grado centígrado

1 . INTRODUCCIÓN

1.1. EL ORGANISMO: AZOTOBACTER VINELANDII

1.1.1. Sistemática

La familia *Azotobacteraceae* agrupa bacterias Gram negativas, quimioheterotrofas, aerobias estrictas, capaces, por sí solas, de fijar nitrógeno molecular. Sus hábitats naturales son los suelos, las aguas o la rizosfera de las plantas. Se divide en dos géneros: *Azotobacter*, capaz de formar quistes, y *Azomonas*, que no forma quistes. El contenido en G+C del ADN de ambos géneros difiere considerablemente: 65% para *Azotobacter*, 55% para *Azomonas*.

El género *Azotobacter* fue descrito por Beijerinck (1901) y en la actualidad incluye seis especies: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. nigricans*, *A. armeniacus* y *A. paspali*. Algunas características comunes son: diámetro celular de unos 2 μm , no producen endosporas pero sí quistes de resistencia a drogas, son aerobias, quimioorganotrofas, su pH óptimo es 7,0-7,5 y su temperatura óptima de crecimiento ronda los 32°C. Son fijadoras no simbióticas de nitrógeno, característica que comparten con géneros como *Klebsiella* y *Chlostridium*, si bien sólo los géneros *Azomonas*, *Derxia* y *Beijerinckia*, junto a *Azotobacter*, lo hacen en aerobiosis.

La formación de quistes ha sido muy estudiada. Es un fenómeno que se produce ante condiciones ambientales adversas y en el laboratorio puede inducirse pasando el cultivo de un medio con glucosa a uno con β -hidroxibutirato como única fuente de carbono (Lin y Sadoff, 1968). Las proteínas específicas del enquistamiento se producen a expensas de proteínas no esenciales (Ruppen et al., 1983), en un proceso secuencial (Su et al., 1987).

Dentro del género *Azotobacter* destaca *A. paspali*

por su gran diferencia con respecto al resto de las especies. Su hábitat se restringe a la rizosfera de *Paspalum notatum* (Barea et al., 1974), utiliza muy pocos compuestos orgánicos como fuentes de carbono y presenta particularidades morfológicas acusadas. Todo ello hizo proponer a algunos autores su separación en un nuevo género, *Azorhizophilus* (Thomson and Skerman, 1979), aunque la mayoría de los autores consideran que hay razones suficientes para mantenerlo en el género al que actualmente pertenece (De Smedt et al., 1980, Tchan et al., 1983).

Azotobacter vinelandii fue descrito por Lipman (1903). Sus células son móviles por flagelos peritricos, produce gran cantidad de polisacárido extracelular y excreta un pigmento fluorescente amarillo verdoso en medios deficientes en hierro. Es capaz de usar una gran variedad de fuentes de carbono. Puede utilizar amonio o nitrato como fuentes exclusivas de nitrógeno, con inhibición de la fijación de nitrógeno. Posee una resistencia natural a ciertos agentes antimicrobianos como el cloranfenicol (25 µg/ml) o el ácido nalidíxico (40 µg/ml).

1.1.2. Importancia aplicada

Diversas especies del género producen una serie de sustancias de interés biotecnológico: alginatos (Horan et al., 1983), poli-β-hidroxibutirato (Reusch et al., 1983), pigmentos y hormonas vegetales (González-López et al., 1986). La utilización de *Azotobacter* como fertilizante se ha discutido ampliamente. En algunos tipos de cultivo parece haber dado resultados positivos, como en la patata (Rubenchick, 1960), la caña de azúcar (Hegazi et al., 1974; Thipayathasana et al., 1988), la remolacha (Saric et al., 1990; Krstic et al., 1990), el maíz, el sorgo, el tomate y otros (Karunakar y Rajgopalan, 1936; Ishac, 1988; Monib et al., 1990). En otros casos no ha tenido incidencia en los

cultivos (Hamdi, 1985). En general, se cree que los fijadores libres de nitrógeno como *Azotobacter* contribuyen poco a la entrada de nitrógeno en la biosfera e incluso las observaciones de estimulación del crecimiento en plantas, como las mencionadas, se achacan más a la producción de determinados factores de crecimiento que al aporte de nitrógeno fijado (Postgate, 1982); sin embargo, estudios recientes con cultivos mezclados de *Azotobacter vinelandii* y *Rhodobacter capsulatus* indican que *A. vinelandii* es capaz de proporcionar una fuente de nitrógeno orgánico para el crecimiento de *R. capsulatus* (Oelze, 1991). La manipulación genética de *A. vinelandii* podría llevar a la obtención de organismos capaces de excretar amoníaco, lo que abarataría la producción de este compuesto, que actualmente se lleva a cabo por el costoso proceso de Haber-Bosch. Se ha propuesto que esto podría conseguirse mediante la construcción de una estirpe que llevara el gen de la glutamina sintetasa, *glnA*, bajo un promotor controlable por el experimentador (Luque et al., 1990). Por otro lado, se ha observado que una estirpe mutada en el gen *nifL* (Contreras et al., 1991a), gen regulador del sistema de fijación de nitrógeno, excreta amonio, dando concentraciones superiores a 5mM en el medio de cultivo (Bali et al., 1992).

1.1.3. Genética

1.1.3.1. Organización del genomio

Azotobacter contiene más ADN por célula que la mayoría de las bacterias, sin embargo, el tamaño de su cromosoma es típico de los procariotas. Experimentos de renaturalización y de digestión del ADN con restrictasas indican que su complejidad es similar a la del ADN de *E. coli* y que el tamaño del cromosoma es de unas 2000 kb, es decir, la mitad del cromosoma de *E. coli* (Robson et al., 1984). El número de cromosomas por célula durante la fase

exponencial de crecimiento se ha estimado en 40-80 para *A. vinelandii* (Sadoff *et al.*, 1979; Nagpal *et al.*, 1989) y 20-25 para *A. chroococcum* (Robson *et al.*, 1984). Se desconoce la razón por la que poseen esta alta cantidad de ADN pero se cree que puede estar relacionada con el gran tamaño de las células de *Azotobacter*, 10 veces superior al de otras bacterias.

Investigaciones recientes contradicen, sin embargo, los datos anteriores (Maldonado *et al.*, 1992, sometido a publicación). Estos autores asumen que en un organismo poliploide la heterozigosis debe ser un paso obligado en muchos procesos genéticos y por tanto, si *Azotobacter* contuviera 40-80 cromosomas por célula, los heterozigotos deberían ser comunes y relativamente estables. Sus observaciones están en contra de la existencia de estos heterozigotos y por ello concluyen que *A. vinelandii* se comporta como una bacteria haploide o moderadamente poliploide.

En todos los aislamientos de *A. chroococcum* se ha descrito la presencia de dos a seis plásmidos nativos a los que no se ha asignado función alguna. Sólo en algunas estirpes de *A. vinelandii* se ha descrito la presencia de plásmidos (Maia *et al.*, 1988).

1.1.3.2. Mutagénesis

Ha sido posible obtener mutantes de *Azotobacter* por multitud de procedimientos. En *A. vinelandii* y *A. chroococcum* se han obtenido mutantes espontáneos, y también mediante mutagénesis con nitrosoguanidina, etilmetanosulfonato, ICR 191, hidroxilamina, luz ultravioleta y transposones (Luque *et al.*, 1987; Contreras y Casadesús, 1987; Kennedy y Toukdarian, 1987; Blanco *et al.*, 1989; Contreras *et al.*, 1991b). Este último método tiene la ventaja de

aportar un marcador seleccionable (la resistencia a antibiótico codificada por el transposón) para las mutaciones no seleccionables. Mutaciones con Tn5-Mob (Blanco, 1989) han permitido la transferencia polarizada de marcadores cromosómicos. La mutagénesis con Tn5-lac ha permitido el estudio de la expresión de determinados genes a través de fusiones transcripcionales o traduccionales con el gen de la β -galactosidasa (Walmsley y Kennedy, 1991).

Con relativa facilidad se han obtenido mutantes resistentes a antibióticos como la rifampicina, la estreptomycinina o el ácido nalidíxico, aunque a veces el nivel de las resistencias obtenidas ha sido muy inferior al de *E. coli*. Estos marcadores genéticos han sido de gran utilidad en la investigación. También se han aislado mutantes resistentes a compuestos tóxicos como la metilalanina o el metilamonio (Gordon y Jacobson, 1983), que están afectados en la nitrogenasa, la L-metionina-D,L-sulfoximina, alterados en la glutamina sintetasa, o el clorato (análogo del nitrato), afectados en la nitrato reductasa (Santero *et al.*, 1986; Luque *et al.*, 1986; Luque, 1987).

Un obstáculo para la obtención de mutaciones recesivas y no directamente seleccionables es la poliploidía de *Azotobacter*, esta barrera se supera dando varias generaciones de segregación en medio no selectivo tras la mutagénesis (Luque *et al.*, 1987; Contreras *et al.*, 1987). De esta forma se han obtenido mutantes de *A. vinelandii* sin actividad nitrogenasa (Fisher y Brill, 1969), mutantes afectados en la utilización de determinados azúcares (Blanco, 1989), mutantes respiratorios (McInerney *et al.*, 1984) y mutantes sin actividad nitrito reductasa (Luque, 1987); así como mutantes Fos⁻ y Hup⁻ de *A. chroococcum* (Ramos y Robson, 1985; Postgate *et al.*, 1982).

Más dificultades ha entrañado el aislamiento de

mutantes auxótrofos. Esto se debe a que muchos de ellos son letales porque *Azotobacter* no puede permear el metabolito correspondiente. En *A. vinelandii* se han obtenido auxótrofos para metionina, uracilo, hipoxantina y adenina (Kennedy *et al.*, 1986; Luque *et al.*, 1987; Mishra y Wyss, 1968; Page y Sadoff, 1976) y en *A. beijerinckii* se han obtenido auxótrofos para adenina y leucina (Owen y Ward, 1985).

Mutantes en genes clonados en plásmidos pueden obtenerse por varios métodos. La mutagénesis con transposones y su posterior mapeo permite elegir las mutaciones de interés que luego se introducirán en *Azotobacter* por transformación y selección de la resistencia codificada por el transposón (Toukdarian y Kennedy, 1986). La introducción de deleciones con fenotipos no seleccionables se ha llevado a cabo por dos procedimientos: a) La clonación de un gen de resistencia a kanamicina en la deleción de manera que se pudiera seleccionar la resistencia a kanamicina al mismo tiempo que la deleción después de la transformación. b) La cotransformación de un gen seleccionable y del gen no seleccionable; entre los transformantes que exhiben el fenotipo seleccionable se explora la presencia del fenotipo no seleccionable (Bishop *et al.*, 1986), ya que su frecuencia es más elevada que en la población total de células resultantes de la transformación, quizás porque una gran parte del cultivo no está competente; es el fenómeno denominado congresión.

1.1.3.3.Sistemas de transferencia genética

1.1.3.3.1.Transducción

Se han descrito bacteriófagos que infectan específicamente ciertas estirpes de *A. vinelandii* o *A. chroococcum* (Bishop *et al.*, 1977). Sin embargo, su utilidad como mecanismo de transferencia genética no ha sido claramente probada. Algunos de estos fagos son capaces de

inducir conversión pseudolisogénica en la estirpe O de *A. vinelandii* (Thompson *et al.*, 1980). Los pseudolisógenos presentan propiedades semejantes a las de la estirpe UW, habitualmente usada en el laboratorio por lo que se piensa que esta estirpe pueda ser un pseudolisógeno permanente.

1.1.3.3.2. Transformación

Este método de transferencia genética se ha descrito tanto para *A. vinelandii* como para *A. chroococcum*. Sin embargo, sólo se ha estudiado y utilizado ampliamente en *A. vinelandii*. Varios factores influyen en la eficiencia de este proceso (Page y vonTigerstrom, 1979). En primer lugar la competencia de la estirpe que se desea transformar. Esto se consigue actualmente con éxito mediante el cultivo de *A. vinelandii* en un medio limitado en hierro y molibdeno. La capacidad de recombinación del ADN que entra con el ADN cromosómico es otro aspecto importante aunque parece que este es un proceso que ocurre con gran eficiencia en *Azotobacter vinelandii* donde se ha descrito la transformación con ADN tanto homólogo como heterólogo (Bishop *et al.*, 1977; Doran y Page, 1983). La transformación con ADN cromosómico ha tenido amplio uso en el establecimiento de ligamientos entre diferentes mutaciones o entre un fenotipo mutante y el marcador de resistencia a antibiótico de un transposón (Joerger *et al.*, 1986), así como en la construcción de estirpes mutantes (Toukdarian y Kennedy, 1986) y la demostración de que un fragmento de ADN clonado es portador de la información capaz de corregir la mutación correspondiente.

La transformación con plásmidos se consigue por métodos semejantes a los descritos para ADN cromosómico (Glick *et al.*, 1985) aunque con menor eficiencia. Se ha observado que la linearización del plásmido antes de la transformación aumenta la frecuencia de transformantes, siempre que los extremos del plásmido sean cohesivos.

También se ha demostrado que los plásmidos que contienen regiones homólogas al ADN de *Azotobacter* no se mantienen establemente tras la transformación, debido a la recombinación.

Existen plásmidos de amplio espectro capaces de mantenerse en *Azotobacter*. Los de los grupos de incompatibilidad P y Q se replican en *A. vinelandii* y *A. chroococcum* (David *et al.*, 1981). En *A. beijerinckii* se replican los de los grupos P y W (Owen y Ward, 1985).

1.1.3.3.3. Conjugación

Este sistema de transferencia se emplea con éxito y asiduidad en *Azotobacter* especialmente en *A. vinelandii*, en que las frecuencias de entrada de plásmidos son muy superiores a las de *A. chroococcum*. Entre los plásmidos del grupo IncP existen algunos autotransferibles, como RP4 y R68.45. Estos plásmidos tienen frecuencias de paso de *E. coli* a *A. vinelandii* de 10^{-2} por receptor y entre diferentes estirpes de *A. vinelandii* superiores a 10^{-1} (Tortolero *et al.*, 1983). Otros plásmidos IncP y todos los IncQ carecen de las funciones *tra* y estas pueden ser aportadas por plásmidos coadyuvantes como el propio RP4 o pRK2013, que ha demostrado mayor eficiencia, aunque él mismo no es capaz de mantenerse en *Azotobacter*. En el caso de *A. chroococcum* las frecuencias de paso son 100 veces inferiores. El número de copias de los plásmidos IncP o IncW en *E. coli* es de 1-10 por célula, y el de los IncQ es de 20-50. Se supone que estos números son extrapolables a *Azotobacter* pero no se sabe con seguridad. En *A. beijerinckii* y en *A. vinelandii* se ha descrito la movilización de marcadores cromosómicos mediada por los plásmidos R68.45 y RP4. Esto permitió construir un mapa genético de ligamiento en *Azotobacter vinelandii* (Blanco, 1989; Blanco *et al.*, 1990). La movilización de marcadores entre dos cepas de *A. vinelandii*

con los plásmidos IncP ocurre bidireccionalmente (Blanco *et al.*, 1991b). La movilización de la resistencia a kanamicina del transposón Tn5 insertado en el cromosoma de *Azotobacter vinelandii*, por conjugación interespecífica entre *A. vinelandii* y *E. coli* mediada por pJB3JI, un derivado de R6845, permite obtener R-primas que se forman por clonación *in vivo* de un fragmento cromosómico entre las dos IS21 del plásmido (Blanco *et al.*, 1991a).

Otros plásmidos con un rango de hospedador más estrecho pueden introducirse en *Azotobacter* por conjugación o por transformación. Esto ha permitido utilizarlos como vehículos suicidas para mutagenizar con transposones o para introducir mutaciones seleccionables en el cromosoma de *Azotobacter*.

Los métodos de biología molecular han permitido construir genotecas de *A. vinelandii* y *A. chroococcum* utilizando como vectores plásmidos y bacteriófagos. Con ellas se han realizado numerosos experimentos de clonación e hibridación (Kennedy y Toukdarian, 1987).

1.2.EL PROBLEMA: LA ASIMILACIÓN DE NITRATO

1.2.1.El ciclo del nitrógeno

El elemento químico nitrógeno es un componente clave del protoplasma (Brock y Madigan, 1988). Constituye alrededor de un 12% de la materia viva y forma parte de moléculas tan importantes como las proteínas o los ácidos nucleicos. Este elemento puede encontrarse en diversos estados de oxidación (ver Tabla I); algunos de los procesos de conversión de unas formas redox a otras las realizan exclusivamente ciertos microorganismos. En conjunto se organiza un ciclo de gran importancia en la naturaleza (Figura 1). El gas nitrógeno, N_2 , es, termodinámicamente, la forma más estable de nitrógeno, lo que explica el hecho de que, en contraste con el carbono, el mayor reservorio de nitrógeno de la tierra sea la atmósfera (Tabla II). Esto hace que la capacidad para utilizar el N_2 sea de gran importancia ecológica, ya que el aporte de nitrógeno combinado es un factor limitante de la productividad en muchos ecosistemas. La transferencia de nitrógeno entre la atmósfera y los otros compartimientos (terrestres y acuáticos) es principalmente en forma de N_2 , con una pequeña parte en forma de N_2O y NH_3 . La transferencia entre los compartimientos terrestres y acuáticos ocurre principalmente en forma de nitrógeno orgánico, NH_4^+ y NO_3^- .

Tabla I.Estados de oxidación del nitrógeno

Compuesto	Estado de oxidación
Nitrógeno orgánico (R-NH ₂)	-3
Amoniaco (NH ₃)	-3
Gas nitrógeno (N ₂)	0
Óxido nitroso (N ₂ O)	+1
Óxido nítrico (NO)	+2
Nitrito (NO ₂ ⁻)	+3
Dióxido de nitrógeno (NO ₂)	+4
Nitrato (NO ₃ ⁻)	+5

Tabla II. Reservorios de nitrógeno (Brock y Madigan, 1988)

Componente	Reserva (g)	Tiempo de residencia
Atmósfera		
NH ₃ +NH ₄ ⁺	0,003*10 ¹⁵	Desde días hasta meses
N ₂	3.800.000*10 ¹⁵	44*10 ⁶ años
N ₂ O	13*10 ¹⁵	12-13 años
NO ₃ ⁻	0,0005*10 ¹⁵	2-3 semanas
Nitrógeno orgánico	0,001*10 ¹⁵	10 días
NO	0,03*10 ¹⁵	1 mes
Tierra		
Biomasa vegetal	12*10 ¹⁵	16 años
Biomasa animal	0,2*10 ¹⁵	
N orgánico del suelo	300*10 ¹⁵	1-40 años
N inorgánico del suelo	16*10 ¹⁵	Menos de 1 año
Océanos		
Biomasa vegetal	0,3*10 ¹⁵	0,14 años
Biomasa animal	0,2*10 ¹⁵	
Materia orgánica muerta	8-30*10 ¹⁵	
N ₂ (disuelto)	22.000*10 ¹⁵	220.000 años
N ₂ O	0,2*10 ¹⁵	2,5 años
NO ₃ ⁻	570*10 ¹⁵	
NO ₂ ⁻	0,5*10 ¹⁵	
NH ₄ ⁺	7*10 ¹⁵	
Sedimentos y rocas		
Rocas	190.000000*10 ¹⁵	
Sedimentos	400.000*10 ¹⁵	400*10 ⁶ años
Depósitos de carbón	120*10 ¹⁵	

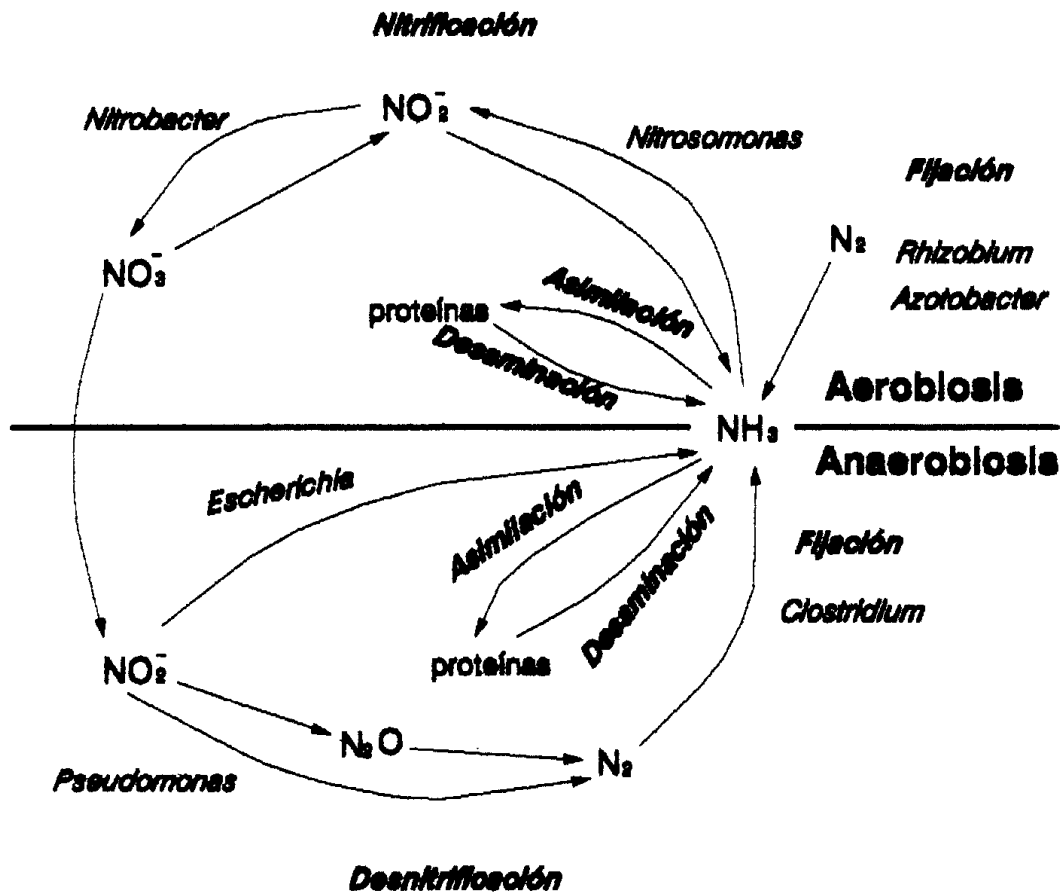


Figura 1. Ciclo del nitrógeno

1.2.2. La fijación del nitrógeno

Este importante proceso requiere una gran cantidad de energía para romper el enlace $\text{N}\equiv\text{N}$ del nitrógeno molecular. Puede ocurrir químicamente en la atmósfera debido a descargas eléctricas, radiaciones ultravioletas, combustiones, etc.. Otra parte del nitrógeno se fija industrialmente para la producción de abonos. Pero la parte principal corresponde a la fijación biológica que es responsable del 85% de los 280 millones de toneladas métricas que se fijan cada año (Brock y Madigan, 1988).

Tabla III. Algunos organismos fijadores de N₂

Libres				Simbióticos	
Aerobios		Anaerobios		Legumino- sas	No legu- minosas
Heterótro- fos	Fotótro- fos	Heterótro- fos	Fotótrofos		
Bacterias:	Cianobac- terias:	Bacterias:	Bacterias:	<i>Rhizobium</i>	<i>Frankia</i>
<i>Azotobac- ter</i>	Algunas	<i>Clostri- dium</i>	<i>Chromatium</i>	o	asociada a
<i>Klebsiella</i>		<i>Desulfovi- brio</i>	<i>Chlorobium</i>	<i>Bradyrhi- zobium</i>	<i>Alnus</i>
<i>Beijerin- ckia</i>		<i>Desulfoto- maculum</i>	<i>Rhodospiri- llum</i>	asociados a	<i>Myrica</i>
<i>Bacillus polymyxa</i>			<i>Rhodopseu- domonas</i>	diferente s	<i>Ceanothus</i>
<i>Mycobacter ium flavum</i>			<i>Rhodomicro- bium</i>	legumino- sas	<i>Comptonia</i>
<i>Azospirill um lipoferum</i>			<i>Rhodobacter</i>		<i>Casuarina</i>
<i>Citrobacte r freundii</i>			<i>Heliobacte- rium</i>		
Algunas metilo- trofas					

Sólo ciertas bacterias y cianobacterias pueden realizar la fijación biológica del nitrógeno (Tabla III). No se conocen organismos eucariotas capaces de hacerlo. El proceso supone la transferencia de seis electrones para reducir N₂ hasta 2NH₃ y no se ha aislado ningún intermedio de la reacción. El donador fisiológico de electrones es la ferredoxina y se requieren 4-5 moléculas de ATP por cada dos electrones transferidos. El proceso está catalizado por un complejo enzimático denominado nitrogenasa, que consta de dos componentes: el componente I, o dinitrogenasa, que es un tetrámero ($\alpha_2\beta_2$) que contiene hierro y molibdeno en un cofactor de gran importancia para la reacción de reducción, y el componente II, o dinitrogenasa reductasa que contiene grupos sulfoféricos. El componente II pasa los electrones de la ferredoxina al componente I, con consumo de ATP; el componente I cede posteriormente los electrones al sustrato

(Burris *et al.*, 1980; Abe *et al.*, 1990). La reacción consume dos electrones en la producción de H_2 . La razón de este aparente despilfarro se desconoce, pero va unido íntimamente al mecanismo de reacción de la nitrogenasa. La dinitrogenasa reductasa se inactiva irreversiblemente por O_2 de ahí que la fijación se lleve a cabo en anaerobiosis en la mayoría de los casos. En los fijadores aerobios estrictos, como *Azotobacter*, debe ser protegida del O_2 . Esto se realiza mediante dos mecanismos: la protección respiratoria y la protección conformacional (Postgate, 1977). El mecanismo de protección respiratoria se ha estudiado mucho en las azotobacteráceas, en las que los coeficientes respiratorios son inusualmente altos, por lo que se piensa que la respiración tiene, además de la función de generación de ATP, una función de reducir la cantidad de O_2 en el interior celular. Esta elevada tasa de respiración parece ir asociada a la formación de membranas intracitoplásmicas cuando aumentan los niveles de O_2 . La protección conformacional tiene importancia cuando el O_2 entra a una velocidad tal que no puede ser eliminado por la respiración, e implica la existencia de una forma de nitrogenasa inactiva, pero insensible al oxígeno, que se origina por asociación con una proteína que contiene 2Fe-2S, llamada Fe/S II, que protege los puntos sensibles a oxígeno del enzima (Yates, 1977; Robson, 1979; Scherings *et al.*, 1983). Esta es una situación reversible y normalmente transitoria puesto que la tasa de respiración aumenta paralelamente al incremento en los niveles de O_2 .

El estudio de la genética del proceso se limitó, hasta principios de la década de 1980, a la bacteria anaerobia facultativa *Klebsiella pneumoniae*, que ha proporcionado un modelo para el análisis genético de la fijación del nitrógeno en otros organismos. Sin embargo la aplicación de la genética molecular ha permitido un rápido avance en los conocimientos genéticos de la fijación del

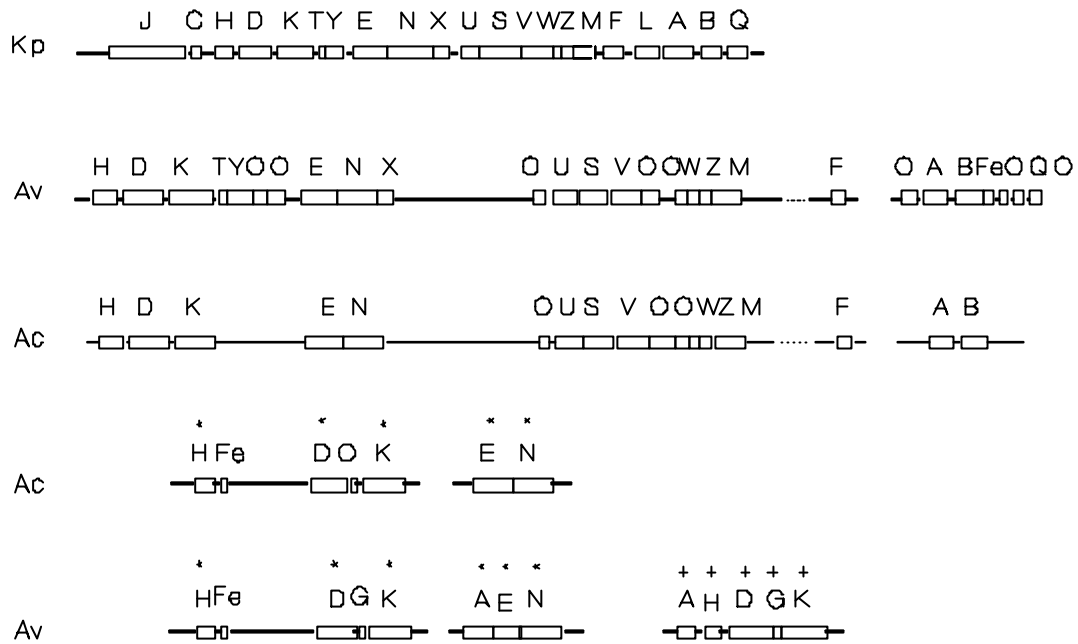


Figura 2. Organización de los genes *nif* en *Klebsiella* (Kp), *A. vinelandii* (Av) y *A. chroococcum* (Ac). *: genes para la nitrogenasa de vanadio. +: genes para la 3ª nitrogenasa.

nitrógeno en *Azotobacter*. *A. vinelandii* fue el primer organismo en que se describió un sistema alternativo de fijación de nitrógeno basado en una nitrogenasa que contiene vanadio y no molibdeno, y que luego ha sido identificada también en *A. chroococcum* y otros organismos (Bishop *et al.*, 1980; Hales *et al.*, 1986; Robson *et al.*, 1986; Bishop *et al.*, 1986; Yakunin *et al.*, 1990). En *A. vinelandii* existe una tercera nitrogenasa que no contiene molibdeno ni vanadio (Chisnell *et al.*, 1988). La organización de los genes *nif* de los tres organismos en que mejor se conoce, *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter vinelandii* y *A. chroococcum*, se esquematiza en la figura 2 (Merrick, 1988).

1.2.3. Regulación de la fijación del nitrógeno: sistema *ntr*

Klebsiella pneumoniae sigue siendo el organismo modelo para los estudios de regulación de los genes *nif*.

Los estudios realizados sobre el control de la asimilación de nitrógeno en *E. coli* y *Salmonella typhimurium* han sido también de aplicación al modelo. En este modelo los genes *ntrA* (o *rpoN* o *glnF*), *ntrB* (*glnL*) y *ntrC* (*glnG*), controlan la expresión del operón regulador específico para los genes *nif*, *nifLA*, en respuesta a la presencia de nitrógeno fijado, y los productos de *nifLA* junto con el de *ntrA* controlan el resto de los operones *nif* en respuesta al O₂ y al nitrógeno. El producto del gen *ntrA* es un factor sigma para la ARN polimerasa llamado σ^{54} , diferente al σ^{70} convencional para los promotores de *E. coli* (Hirschman et al., 1985). Se han encontrado varios promotores dependientes de σ^{54} en otros sistemas: genes *xylABC*, *cpg2* y de la pilina en *Pseudomonas*, genes *fla* en *Caulobacter*, *dctA* en *Rhizobium*, *fdhF* en *E. coli* (Gussin et al., 1986). Muchos de ellos no están controlados por nitrógeno y, por tanto, se puede decir que el factor σ^{54} no está implicado exclusivamente en el metabolismo del nitrógeno.

Los genes *ntrB* y *ntrC* pertenecen al operón *glnAntrBC* donde *glnA* es el gen estructural para la glutamina sintetasa. Las proteínas NTRB y NTRC pertenecen a una familia de proteínas que actúan por parejas. NTRB fosforila o desfosforila a NTRC en respuesta a la limitación o el exceso de nitrógeno combinado, respectivamente. NTRB está modulada a su vez por la proteína PII, producto del gen *glnB*, y ésta, a su vez, por la uridil transferasa producto de *glnD*. Cuando la concentración de amonio en el medio es baja, la relación intracelular α -cetoglutarato/glutamina es alta y esto sirve de señal para que PII sea uridililada. En esta situación NTRB fosforila a NTRC. NTRC fosforilado, junto con el producto de *ntrA*, es capaz de inducir la transcripción de los promotores sometidos a control *ntr*, entre ellos el de *nifLA*. La situación contraria lleva a que NTRB desfosforile a NTRC, que deja entonces de activar la transcripción de los genes correspondientes (figura 3).

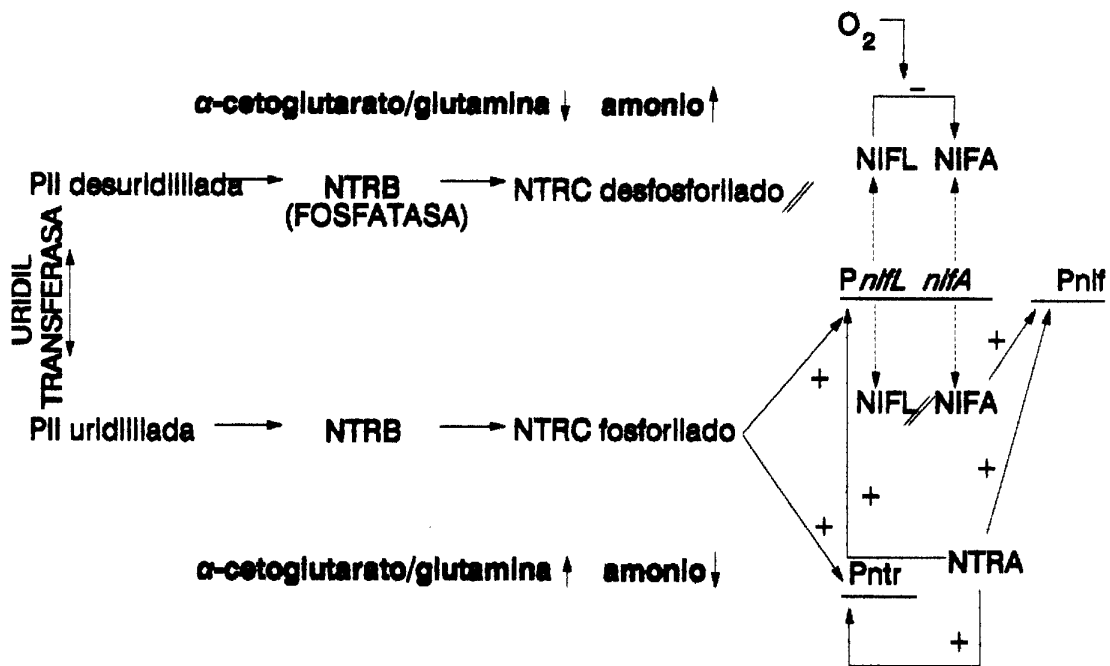


Figura 3. Esquema de la regulación mediada por el sistema *ntr*

NIFL y NIFA muestran ciertas homologías con NTRB y NTRC, respectivamente, y parecen constituir también un sistema de dos componentes en que NIFL sería la proteína que detecta el estado metabólico de la célula en cuanto a la relación carbono/nitrógeno e inactiva a NIFA cuando esa relación es baja. Hay ciertas diferencias entre los mecanismos de actuación de NTRB y NIFL, así, mientras NTRB se requiere tanto para la activación como para la inactivación de NTRC, NIFL sólo se requiere para la inactivación de NIFA. Además, el sistema *ntr* no interviene en la represión de los genes *nif* por O₂; parece ser que es NIFL quien detecta la presencia del O₂ y, de nuevo, inactiva a NIFA (Hills *et al.*, 1980; Merrick *et al.*, 1982). NIFA activa es la proteína encargada de inducir, junto con el producto de *ntrA*, al resto de los operones *nif*.

En *Azotobacter*, los sistemas *ntr/nif* muestran gran parecido con los de *Klebsiella*, si bien la situación se complica por la existencia de tres sistemas de fijación

de nitrógeno. Se sabe que los sistemas alternativos no se expresan en presencia de Mo; la segunda nitrogenasa se sintetiza en ausencia de Mo y presencia de V y la tercera sólo está presente cuando no hay Mo ni V en el medio de cultivo (Kennedy et al., 1990). En la regulación interviene un conjunto de proteínas entre las que se incluyen: los tres activadores específicos NIFA, VNFA y ANFA (Joerger et al., 1989); NIFL, que, al igual que en *Klebsiella*, se requiere para la represión por amonio de los genes para la nitrogenasa de Mo (Bali et al., 1992); y NFRX (Santero et al., 1988), que se requiere para la expresión desde los promotores de *nifH* y *anfH* y tiene semejanza con el gen *glnD* de *E. coli*, que codifica la uridil transferasa (Bueno et al., 1985; Contreras et al., 1991a). A diferencia de *Klebsiella*, en *Azotobacter*, NTRC no es necesaria para la transcripción de los promotores de los genes de la nitrogenasa de Mo (Toukdarian y Kennedy, 1986). Sin embargo, el patrón global de regulación es semejante al de *Klebsiella*: los genes *nif* no se expresan en un medio que contenga un exceso de amonio ni en presencia de un exceso de oxígeno (aunque en este caso la inhibición se ejerza más a nivel de actividad enzimática que a nivel de síntesis). Por tanto, la existencia de un sistema de protección de la nitrogenasa no evita la necesidad de regular su síntesis en respuesta al oxígeno.

1.2.4. La reducción del nitrato y del nitrito

La reducción del nitrato cumple varias funciones fisiológicas en la naturaleza que básicamente pueden reducirse a dos: servir como fuente de nitrógeno a través del proceso de asimilación y servir como aceptor de electrones para la respiración (esto se conoce como disimilación de nitrato). No siempre está clara la distinción entre nitrato y nitrito reductasas asimilatorias y

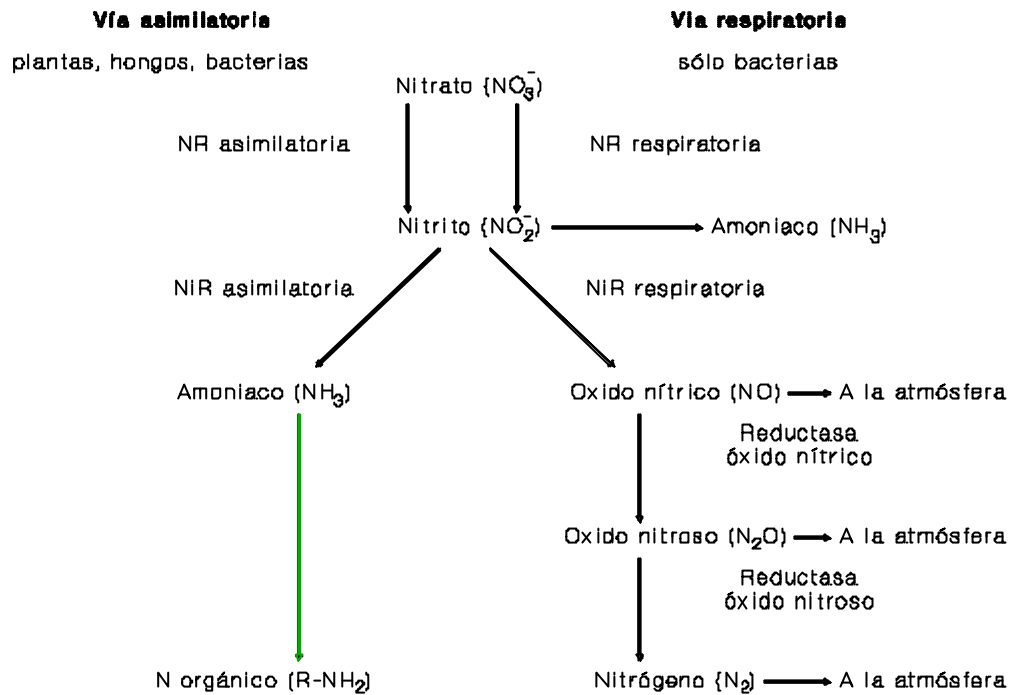


Figura 4. Reducción asimilatoria y respiratoria del nitrato

respiratorias porque en ciertos casos un mismo enzima cumple las dos funciones. Las dos vías metabólicas se comparan en la figura 4 (Brock y Madigan, 1988).

1.2.4.1. Respiración de nitrato y desnitrificación

El nitrato es uno de los aceptores de electrones alternativos al O_2 más comunes. En muchos casos se reduce hasta N_2O , NO y N_2 . Puesto que los tres son productos gaseosos, pueden salir del ambiente donde se producen y perderse, de ahí que este proceso se conozca como desnitrificación. Sin embargo, como a continuación se verá, el producto final de la respiración del nitrato puede ser amonio y en ese caso no existe desnitrificación.

La respiración de nitrato ha sido muy estudiada en las enterobacterias (Stewart, 1988). La nitrato reductasa respiratoria es el componente final en una cadena de transporte de electrones y va siempre unida a membranas.

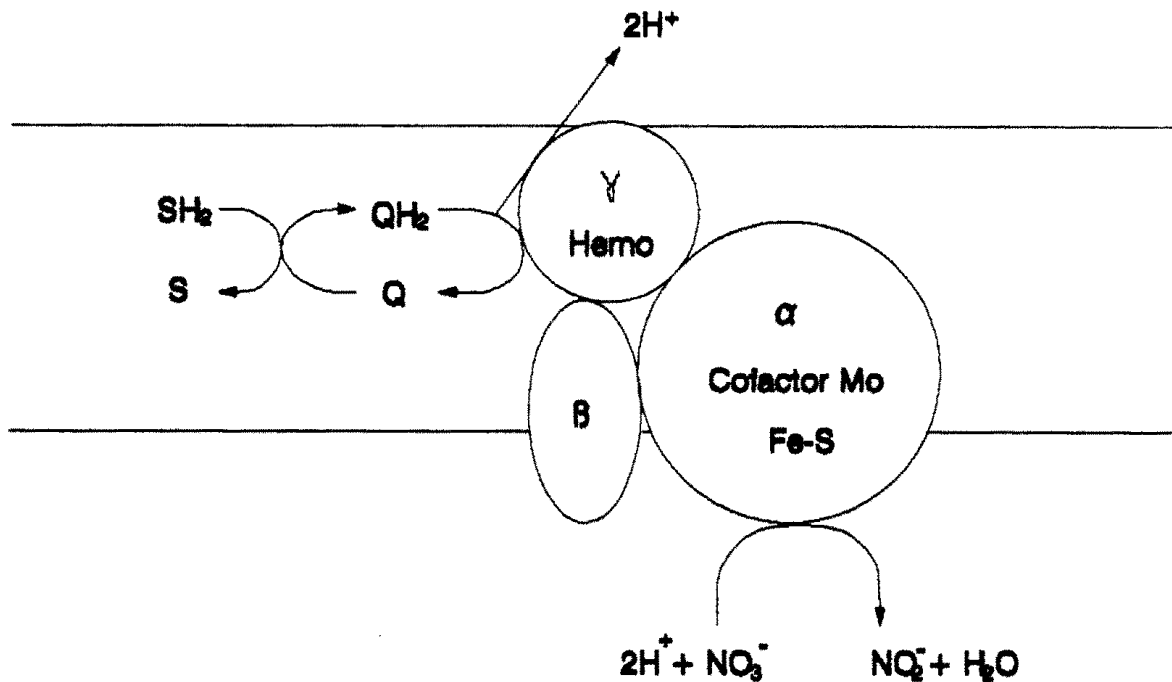


Figura 5. Representación esquemática de la nitrato reductasa de *E. coli*

Reduce el nitrato a nitrito con producción de energía que se conserva como fuerza protón motriz que luego se usa para la síntesis de ATP, el transporte de solutos y otros procesos celulares. Este enzima se induce por nitrato en ausencia de oxígeno. Es por tanto un enzima diferente, como se verá, a la nitrato reductasa asimilatoria tanto en su función como en su regulación. En *E. coli*, se compone de tres subunidades: α , β y γ , y contiene Fe, S y Mo. La figura 5 representa la estructura de la nitrato reductasa. Hay otro polipéptido, llamado δ , que no forma parte del enzima final pero interviene en la actividad del enzima.

Se sabe además que existe una segunda nitrato reductasa en *E. coli* (Iobbi *et al.*, 1987; Iobbi-Nivol *et al.*, 1990) denominada nitrato reductasa Z (frente a la A, que sería la convencional). Esta segunda nitrato reductasa tiene una estructura similar a la de la primera y sus subunidades son, hasta cierto punto intercambiables (Blasco *et al.*, 1992a; Blasco *et al.*, 1992b). Los genes estructura-

les de la nitrato reductasa A se organizan en el operón *narGHJI* y los de la Z en el *narZYWV* (Blasco *et al.*, 1989; Blasco *et al.*, 1990). Un esquema de la regulación de *narGHJI* se presenta en la figura 6 (Egan y Stewart, 1991).

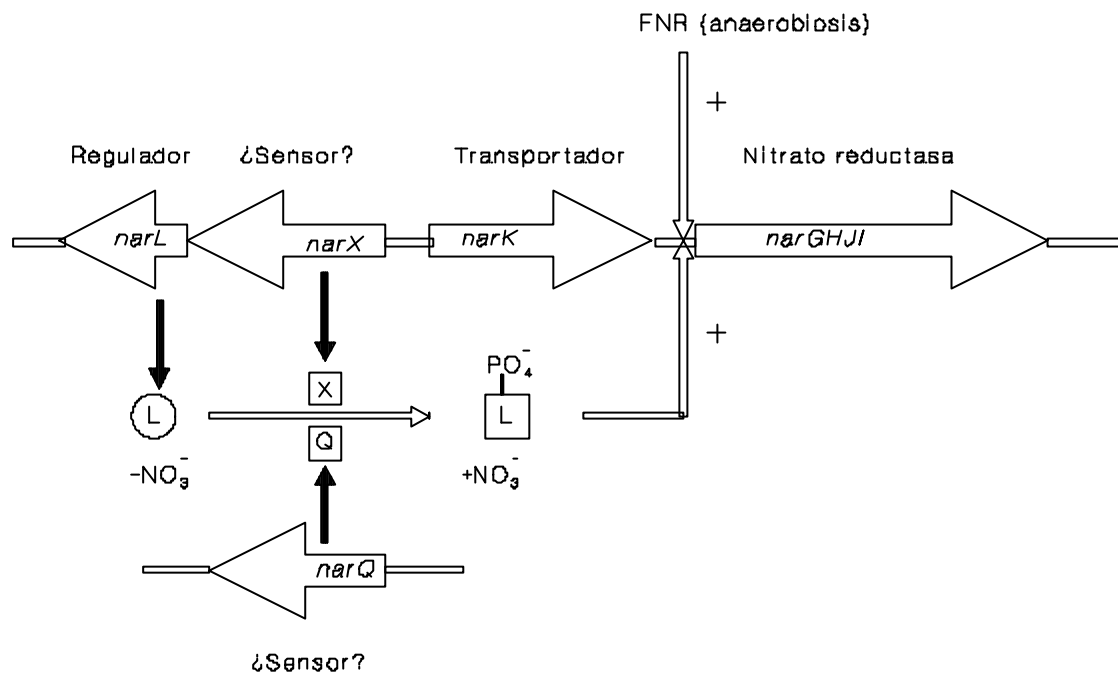


Figura 6. Esquema de la regulación de la nitrato reductasa de *E. coli*. Los genes *narGHJIJ* codifican para los polipéptidos a, b, t y d de la nitrato reductasa. d no forma parte del enzima

El nitrito, producto de la reducción respiratoria del nitrato, puede acumularse o puede ser reducido por una nitrito reductasa. El producto final de esta reacción distingue la desnitrificación de la simple respiración de nitratos. En las enterobacterias no ocurre desnitrificación sino que la nitrito reductasa reduce el nitrito a amonio en un proceso respiratorio cuya función principal es la de reoxidar el NADH aunque, al producir amonio, tiene también una función secundaria de asimilación. Sin embargo, este enzima, al igual que la nitrato reductasa respiratoria, se induce en anaerobiosis y no es reprimible por amonio.

La desnitrificación da como productos finales

productos nitrogenados gaseosos. La capacidad de crecer anaeróbicamente reduciendo óxidos de nitrógeno hasta productos gaseosos se encuentra en numerosas eubacterias y ciertas arqueobacterias (Hochstein y Tomlinson, 1988). Es un proceso respiratorio en que los óxidos de nitrógeno sirven de aceptores de electrones y se genera ATP. Se han descrito dos tipos de nitrito reductasas desnitrificantes. Unas contienen cobre y varían mucho en peso y número de subunidades. Están presentes en especies como *Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter cycloclastes*, *Pseudomonas aureofaciens* y *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Las otras contienen grupos hemo y son bastante parecidas entre sí. Tienen un peso en torno a 120 kDa y están compuestas de dos subunidades idénticas, que contienen citocromos c y d. Se han descrito en géneros tales como *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Thiobacillus*, *Azospirillum* y *Pseudomonas*. Los productos de la reacción son óxido nítrico u óxido nitroso. Los organismos desnitrificantes poseen también reductasas del óxido nítrico y del óxido nitroso que dan, como producto final, dinitrógeno, en reacciones acopladas a la producción de ATP.

1.2.4.2.El cofactor de molibdeno

El molibdeno se encuentra unido a una molibdopterina constituyendo el cofactor de molibdeno, componente esencial de las nitrato reductasas tanto respiratorias como asimilatorias y que parece ser muy semejante en todos los molibdoenzimas excepto en la nitrogenasa. Recientemente se ha descrito la existencia de dos tipos de molibdopterina. La forma más simple (MPT) se encuentra en todos los molibdoenzimas eucarióticos estudiados, como son la sulfito oxidasa, la xantina deshidrogenasa y la nitrato reductasa de *Chlorella* y de las hojas del maíz. La segunda forma se encuentra en procariotas y consiste en una molibdopterina unida a una molécula de GMP constituyendo molibdopterina guanina dinucleótido (MGD), que se encuentra en la nitrato

reductasa y la formiato reductasa de *E. coli* y en la dimetil sulfóxido reductasa de *Rhodobacter sphaeroides* (Johnson *et al.*, 1990). Se ha avanzado mucho en la comprensión del mecanismo de biosíntesis de este cofactor en el caso de *E. coli*, en el que están implicados los genes *chl* (Crawford y Campbell, 1990). La idea es que un metabolito general, quizás GTP, se convierte en un precursor intermedio en reacciones catalizadas por productos de *chlE* y del operón *chlA*, que contiene cinco fases abiertas de lectura. El precursor se une entonces a un polipéptido transportador (PA) codificado por el locus *chlA*. Los productos de *chlM* y *chlN*, que forman también parte del operón *chlA*, intervienen en la formación de MPT a partir del precursor. La formación de MGD está catalizada por productos del locus *chlB*, que posee tres grupos de complementación. Así se llega a la síntesis de un cofactor sin molibdeno. El transporte de molibdeno lo lleva a cabo un polipéptido codificado por el locus *chlD* mientras que la inserción del molibdeno en la MGD unida a la proteína transportadora PA lo llevan a cabo una o varias proteínas codificadas por el locus *chlG*. El último paso es la unión del cofactor completo a la aponitrato reductasa para formar el holoenzima que será funcional cuando se una a la membrana periplásmica. El cofactor de molibdeno actúa como una señal para la inhibición de la transcripción de *chlA* en un mecanismo de retroinhibición (Baker y Boxer, 1991). La situación en eucariotas no está aclarada, aunque existen mutantes *cnx*, deficientes en cofactor de molibdeno, tanto en hongos como en plantas superiores (Crawford y Campbell, 1990).

1.2.4.3. Asimilación de nitrato

La reducción asimilatoria del nitrato es un proceso biológico fundamental en el que una forma oxidada de nitrógeno se reduce a amonio, el cual se incorpora a esqueletos carbonados para dar lugar a los diferentes compuestos biológicos nitrogenados. Se calcula que este proceso produce 2×10^4 megatonnes de nitrógeno orgánico frente a los 2×10^2 megatonnes producidos por la fijación biológica del dinitrógeno (Guerrero *et al.*, 1981).

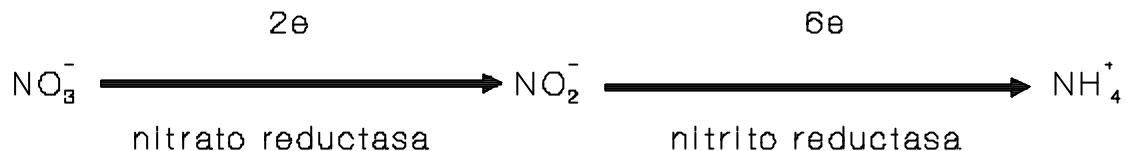


Figura 7. Reducción asimilatoria del nitrato

Este sistema de reducción implica sólo a dos metaloproteínas: la nitrato reductasa, que cataliza la reducción de nitrato a nitrito en una reacción que supone la transferencia de dos electrones, y la nitrito reductasa, que cataliza el paso de nitrito a amonio con transferencia de seis electrones (figura 7). Los dos enzimas requieren cofactores para su actividad: el cofactor de molibdeno para la nitrato reductasa (ver antes) y un grupo sirohemo para la nitrito reductasa. El amonio resultante se incorpora a compuestos orgánicos por medio de la glutamina sintetasa/-glutamato sintasa o de la glutamato deshidrogenasa, cuya existencia no se ha probado en *Azotobacter* (Toukdarian *et al.*, 1990).

1.2.4.3.1. Nitrato reductasas asimilatorias

Las nitrato reductasas aisladas de eucariotas (hongos, algas verdes y plantas superiores) son proteínas

solubles, multiméricas, con tres grupos prostéticos por subunidad: FAD, citocromo b_{557} y molibdopterina (Solomonson y Barber, 1990). El donador de electrones es siempre un piridín nucleótido reducido pero, dependiendo de la especificidad, se distinguen tres tipos de nitrato reductasa en eucariotas: específica de NADPH, que es típica de hongos; específica de NADH, presente en la mayoría de las plantas superiores y algunas algas; y biespecífica de NAD(P)H que se encuentra en especies como *Erythrina senegalensis*, *Zea mays* y *Hordeum vulgare* (Miyazaki et al., 1991; Losada et al., 1981). El enzima puede usar donadores artificiales de electrones, como el metilviológeno, el azul de bromofenol o las flavinas reducidas, para la reducción del nitrato. Además puede realizar otras actividades de reducción, englobadas bajo el nombre de diaforasa, que incluyen la reducción de ferricianuro, diclorofenolindofenol y citocromo *c* (figura 8).

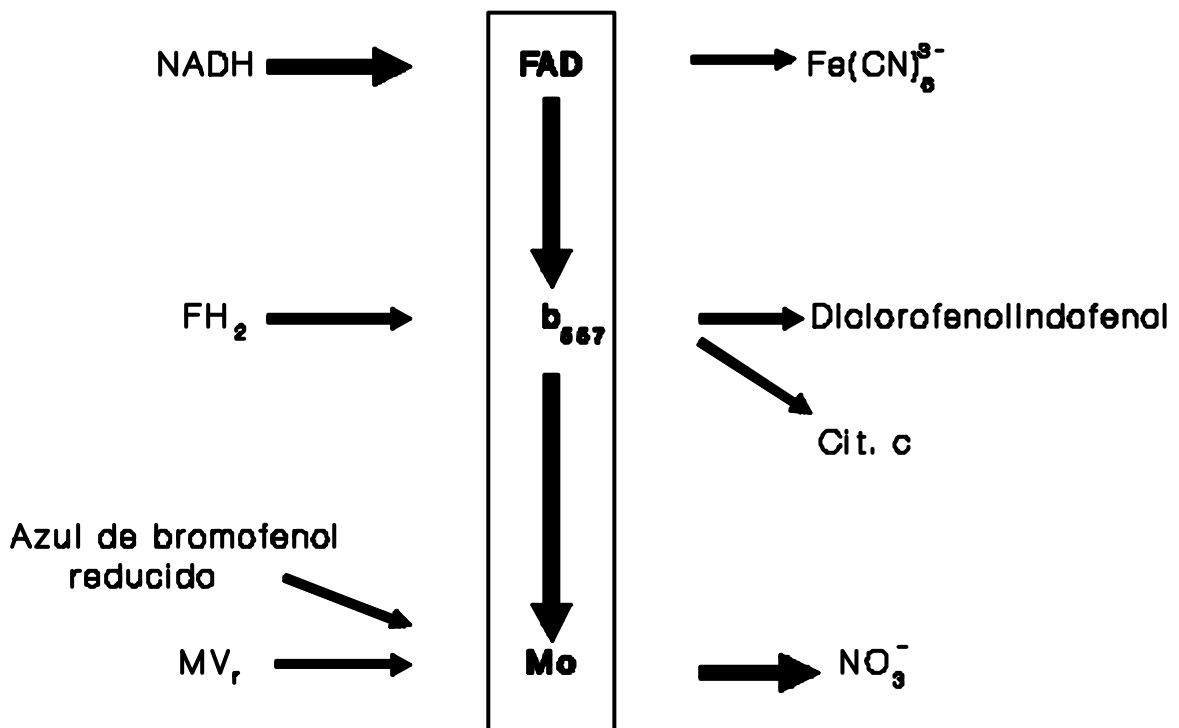


Figura 8. Interacción de donadores y aceptores de electrones con la nitrato reductasa

Las nitrato reductasas de cianobacterias, y posiblemente de bacterias fotosintéticas y quimiorganotrofas (Tortolero *et al.*, 1975; Villalobos *et al.*, 1977), son dependientes de ferredoxina y, en el caso de los procariontes fotosintéticos, están unidas a membranas fotosintéticas. Se ha purificado y se ha calculado el peso molecular del enzima en el caso de las cianobacterias *Synechococcus* sp. 6301 (Candau, 1979), *Plectonema boryanum* (Mikami e Ida, 1984) y *Anabaena variabilis* (Martín Nieto, 1991). En estos casos se ha estimado un peso en torno a 80 kDa.

1.2.4.3.2. Nitrito reductasas asimilatorias

En organismos fotosintéticos, la nitrito reductasa es dependiente de ferredoxina y es, en general, un enzima soluble que puede utilizar metilviológeno como donador artificial de electrones y que contiene un grupo prostético sirohemo, FAD y Fe_4S_4 . En los organismos de los que se ha purificado se ha visto que está constituido por un solo polipéptido con un peso en torno a los 65 kDa (Guerrero *et al.*, 1981).

En organismos no fotosintéticos las nitrito reductasas dependen de piridín nucleótidos y, al igual que las nitrato reductasas, pueden clasificarse en específicas de NADPH, como la de la levadura *Torulopsis nitratophila*, dependientes de NADH, características de organismos procariontes, y biespecíficas de NAD(P)H, como la propia del hongo *Neurospora* (Guerrero *et al.*, 1981). Los pesos moleculares oscilan entre los 290 kDa repartidos en dos subunidades para *Neurospora* hasta los 67 kDa de la proteína de *Azotobacter chroococcum* (Vega *et al.*, 1973). En *Aspergillus* y *Neurospora* se ha demostrado que esta proteína contiene FAD, grupos sulfoféricos y un grupo sirohemo (Campbell y Kinghorn, 1990).

1.2.4.3.3. Regulación de la asimilación de nitrato

Los niveles de los enzimas implicados en la asimilación de nitrato se ven influenciados por muchos factores, según se ha descrito en diversos organismos, en especial plantas superiores: luz, temperatura, pH, tensiones de O₂ y CO₂, fuente de nitrógeno, etc. La fuente de nitrógeno es el factor que más comúnmente afecta tanto al sistema de transporte de nitrato o nitrito como a la actividad y a la síntesis de la nitrato y la nitrito reductasas. En general, la actividad de estos enzimas es mínima en presencia de amonio y máxima en presencia de nitrato (Guerrero *et al.*, 1981). Sin embargo, aunque la represión por amonio está bien establecida, la inducción por nitrato no es universal. En muchas especies es suficiente la ausencia de represor para que se sinteticen los enzimas. Este es el caso para las algas verdes y las levaduras. En plantas superiores se cree, en general, que el nitrato es un inductor aunque en algunos casos no está claro y la inducción puede ocurrir con otras sustancias como las citoquininas o compuestos orgánicos nitrogenados (Schmerder y Borris, 1986). En cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno el nitrato sí se requiere como inductor (Hattori, 1962; Ohmori y Hattori, 1970; Herrero *et al.*, 1981; Flores *et al.*, 1983; Herrero *et al.*, 1985) mientras que en cianobacterias unicelulares de los géneros *Synechococcus* y *Synechocystis* no es así (Herrero *et al.*, 1981; Herrero y Guerrero, 1986; Stevens y Van Baalen, 1974).

La genética de la regulación del sistema ha avanzado mucho en hongos desde que en los años 60 se aislaron los primeros mutantes reguladores. En estos organismos existe un primer nivel de regulación representado por los genes *areA* y *nit-2*, para *Aspergillus* y *Neurospora*, respectivamente, que ya han sido clonados y secuenciados (Fu y Marzluf, 1990a; Kudla *et al.*, 1990). Los produc-

tos de estos genes median la desrepresión en condiciones de limitación de nitrógeno de la nitrato reductasa y de otros muchos genes estructurales implicados en el metabolismo del nitrógeno (Crawford y Campbell, 1990). Son dos proteínas homólogas que tienen en común un dominio en dedo de zinc del tipo Cys₂/Cys₂ que parece fundamental para su función. En *Neurospora*, existe también el gen *nmr*, encargado de impedir la expresión de varios enzimas del metabolismo del nitrógeno en presencia de amonio. En el nivel específico de regulación del sistema de asimilación de nitrato, los genes *nirA* y *nit-4*, de *Aspergillus* y *Neurospora*, son responsables de la inducción por nitrato de la nitrato y la nitrito reductasas (Burger *et al.*, 1991b; Fu *et al.*, 1989). Se sabe que ambos contienen un dominio en dedo de zinc del tipo Cys₆Zn₂ cerca del extremo amino (Burger *et al.*, 1991a; Yuan *et al.*, 1991). La proteína codificada por *nit-4* posee dos zonas ricas en glutaminas que podrían servir como activadoras de la transcripción (Yuan y Marzluf, 1992). Además parece existir una autorregulación de la síntesis de la nitrato reductasa. Este mecanismo ya fue postulado para *Aspergillus* por Cove en 1976 y existe también en *N. crassa* (Tomsett y Garrett, 1981). Fu y Marzluf, en 1988, presentaron pruebas a favor de esta hipótesis: mutantes en *nit-3*, gen estructural de la nitrato reductasa de *Neurospora*, producen constitutivamente el ARNm a partir de este gen, a diferencia de la estirpe silvestre. Lo mismo ocurre en mutantes *nit-1*, que carecen de cofactor de molibdeno, por lo que quizás el apoenzima no está en la conformación adecuada para ejercer su función autorreguladora. Estos autores proponen que la nitrato reductasa, en ausencia de nitrato, ejerce un efecto represor de su propia síntesis capturando al producto de *nit-4*.

En el reino vegetal sólo se ha demostrado la existencia de un gen regulador de la asimilación de nitrato: *nit-2* de *Chlamydomonas* (Fernández *et al.*, 1989), mientras que en plantas superiores aún no se ha encontrado

ninguno.

En la cianobacteria *Synechococcus* se ha aislado y secuenciado un gen, *ntcA*, que se requiere para la expresión de la nitrato reductasa, la nitrito reductasa, la glutamina sintetasa, el sistema de transporte de metilamina y una proteína implicada en el transporte de nitrato. Este gen regulador general de los distintos sistemas sometidos a represión nutricional por amonio es diferente de los que integran el sistema *ntr* de bacterias y de los que intervienen en hongos filamentosos (Vega-Palas *et al.*, 1990; Vega-Palas *et al.*, 1992).

En enterobacterias, el metabolismo del nitrógeno en general está controlado por el sistema *ntr*, descrito anteriormente (Magasanik, 1982; Reitzer y Magasanik, 1987). En *Azotobacter vinelandii* y *Rhizobium meliloti*, el sistema *ntr* controla la asimilación de nitrato (Santero *et al.*, 1986; Toukdarian y Kennedy, 1986) aunque no la fijación de N₂.

1.2.4.3.4. La asimilación de nitrato en *Azotobacter*

Los enzimas nitrato y nitrito reductasa se han caracterizado tanto en *A. chroococcum* como en *A. vinelandii* (Guerrero *et al.*, 1973; Spencer *et al.*, 1957; Taniguchi y Ohmachi, 1960; Vega *et al.*, 1973).

La nitrato reductasa de *A. chroococcum* es una molibdo proteína de unos 100 kDa cuya actividad se inhibe por cianuro y se estimula con cianato (Guerrero *et al.*, 1973). Puede usar ferredoxina como donador de electrones (Tortolero *et al.*, 1975) y también los donadores artificiales metilviológeno y bencilviológeno. Es un enzima soluble, aunque se ha descrito una segunda forma de nitrato reductasa asociada a membranas que aparece tras subcultivos en

medio líquido con nitrato durante 20 días y que puede recibir electrones del NADH (Vila *et al.*, 1977). El enzima carece de la actividad diaforasa propia de la nitrato reductasa de plantas. En *A. vinelandii* la mayor parte de la actividad se encuentra asociada a grandes partículas (Taniguchi y Ohmachi, 1960). En este último caso se ha descrito que el NADPH puede funcionar como donador de electrones, si bien el enzima solubilizado no acepta electrones de este donador sino de la ferredoxina o la flavodoxina (Bothe y Häger, 1981). Hay que decir que las preparaciones enzimáticas se hicieron tras subcultivar a *A. vinelandii* durante tres semanas, por tanto no se puede decir que la situación sea muy diferente a la descrita para *A. chroococcum*.

La nitrito reductasa de *A. chroococcum* depende de NADH, contiene hierro y es un enzima muy inestable cuando se trata de purificar. Su peso se ha estimado en 67 kDa (Vega *et al.*, 1973).

En *A. vinelandii*, Sorger (1969) obtuvo un mutante sin actividad nitrato reductasa. Posteriormente se han obtenido mutantes de Tn5 afectados en los genes reguladores *ntrA* y *ntrC* (Santero *et al.*, 1986; Toukdarian *et al.*, 1986) y mutantes de ICR afectados en genes reguladores y en genes posiblemente estructurales (Luque, 1987).

En cuanto a la regulación, se sabe que los dos enzimas del sistema son inducibles por nitrato y nitrito y reprimibles por amonio, si bien esta represión es más eficiente cuando la fuente de carbono es pobre que cuando es rica. Se pueden obtener mutantes que se reprimen igual cualquiera que sea la fuente de carbono (Luque *et al.*, 1987). La actividad nitrato reductasa es mayor en células cultivadas con una fuerte aireación que con agitación. El gen *ntrA* es necesario para la inducción de las reductasas

del nitrato y del nitrito y de la nitrogenasa. El gen *ntrC* sólo es necesario para los enzimas de la asimilación de nitrato a diferencia de lo que ocurre en *Klebsiella*. La nitrato reductasa y la nitrito reductasa están correguladas y mutaciones que, presuntamente, afectan a sus genes estructurales se encuentran próximas en el cromosoma. Estos datos hacían pensar en la posible existencia de un operón que incluyera a los genes estructurales de ambos enzimas (Luque, 1987).

1.3.LOS OBJETIVOS DEL TRABAJO

En el trabajo presentado a continuación se ha estudiado la asimilación de nitrato en la bacteria *Azotobacter vinelandii* desde un punto de vista principalmente genético atendiendo a ciertos aspectos de su regulación. Se han abordado los siguientes temas:

a)Aislamiento y caracterización de mutantes por inserción de Tn5 afectados en la asimilación de nitrato.

b)Aislamiento, a partir de una genoteca de *Azotobacter vinelandii*, de los genes que restauran el fenotipo silvestre de los mutantes.

c)Demostración de la existencia de un operón.

ch)Aislamiento de un nuevo gen regulador del sistema.

d)Caracterización de productos proteicos implicados en la asimilación de nitrato mediante electroforesis bidimensional de proteínas.

2.MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. ESTIRPES BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y FAGOS

Tabla IV. Estirpes bacterianas, plásmidos y bacteriófagos utilizados

ESTIRPE, PLÁSMIDO O BACTERIÓFAGO	GENOTIPO O FENOTIPO	ORIGEN O REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i>		
HB101	<i>leuB1, proA2, thi-1, ara-14, hsdR, hsdM, recA, supE, rpsL</i> (Sm ^r), <i>galK, lacY, mtl-1, xyl-15</i>	J. Casadesús
S17-1	<i>thi, pro, hsdR, recA, Spc^r</i>	J.E. Ruiz
KW251	F ⁻ , <i>supE44, galK2, galT2, melB1, hsdR, mcrB1, mcrA, argA81::Tn10, recD1014</i>	Promega
K12	Silvestre	Maniatis et al., 1982
VJS1778	<i>chlA250::Tn10d</i> (Tc ^r)	A. Garzón
VJS1779	<i>chlE251::Tn10d</i> (Tc ^r)	A. Garzón
VJS1780	<i>chlB252::Tn10d</i> (Tc ^r)	A. Garzón
VJS1784	<i>chlG256::Tn10d</i> (Tc ^r)	A. Garzón
5K	<i>resK, modK, Thr⁻, Leu⁻, tonA, supE</i>	C. Kennedy
ET8556	<i>rbs, lacZ::IS1, gyrA, hutC_k, ntrC1488</i>	C. Kennedy
71-18	Δ[<i>lac-pro</i>], F' <i>[lacI^q, lacZΔM15, proAB], supE</i>	F. Luque
NCM631	Tc ^r , <i>hsdS, gal</i> (λDE3: <i>lacI, lacUV5::T7 POL</i>), Tn10	E. Santero
NCM632	NCM631/plysE	E. Santero
<i>Azotobacter vinelandii</i>		
UW136	Rif ^r	W. Brill
UW6r	Nif-6(I ⁻ II ⁺), Rif ^r	W. Brill
AS30	Nif-6, Nis ⁻ , Rif ^r	F. Luque
AS31	Nif-6, <i>ntrC, Chl^r, Nas⁻, Nis⁻, Rif^r</i>	F. Luque
AS36	Nif-6, <i>Chl^r, Nas⁻, Rif^r</i>	F. Luque
AS61	Nif-6, <i>Chl^r, Nas⁻, Nis⁻, Rif^r</i>	F. Luque
AS236, AS237, AS238	Versiones Nif ⁺ de AS30, AS36 y AS61, respectivamente	Esta tesis
AS243	Nif-6, <i>Chl^r::Tn5, Nas⁻ (nas-1), Rif^r</i>	Esta tesis
AS244	Nif-6, <i>Chl^r::Tn5, Nas⁻ (nas-2), Rif^r</i>	Esta tesis

ESTIRPE, PLÁSMIDO O BACTERIÓFAGO	GENOTIPO O FENOTIPO	ORIGEN O REFERENCIA
AS245	Nif-6, Chl ^r ::Tn5, Nas ⁻ (<i>nas</i> -3), Rif ^r	Esta tesis
AS246	Nif-6, Chl ^r ::Tn5, Nas ⁻ (<i>nas</i> -4), Rif ^r	Esta tesis
AS247	Nif-6, Chl ^r ::Tn5, Nas ⁻ (<i>nas</i> -5), Rif ^r	Esta tesis
AS248	Nif-6, Chl ^r ::Tn5, Nas ⁻ (<i>nas</i> -6), Rif ^r	Esta tesis
AS249, AS250, AS251, AS252, AS253, AS254	versiones Nif ⁺ de las seis estirpes anteriores	Esta tesis
AS255	Chl ^r ::Tn5, Nas ⁻ , Nis ⁻ (<i>nas</i> -7), Rif ^r	Esta tesis
AS256	versión Nif-6 de AS255	Esta tesis
AS257	Nis ⁻ ::Tn5 (<i>nas</i> -8), Rif ^r	Esta tesis
AS258	versión Nif-6 de AS257	Esta tesis
AS259	<i>nasA</i> ::Ω, Rif ^r	Esta tesis
AS260	<i>nasA</i> :: <i>sac</i> , Rif ^r	Esta tesis
AS261	<i>nasA</i> :: <i>kiss</i> , Rif ^r	Esta tesis
AS262	<i>nasB</i> ::Ω, Rif ^r	Esta tesis
AS263, AS264, AS265, AS266	Versiones Nif-6 de AS259, AS260, AS261 y AS262	Esta tesis
AS267, AS268, AS269, AS270, AS271, AS272	UW136 con fusiones <i>lac</i> FUS6, FUS7, FUS10, FUS12, FUS29, FUS42 en <i>nasAB</i> , respectivamente	Esta tesis
AS273, AS274, AS275	UW136 con los plásmidos pFUS2, pFUS41 o pFUS49, respectivamente, integrados en el cromosoma	Esta tesis
AS276, AS277, AS278, AS279, AS280, AS281	Versiones Nif-6 de las correspondientes fusiones en UW136	Esta tesis
AS282, AS283, AS284	Versiones Nif ⁻ de AS273, AS274 y AS275	Esta tesis
MV511	<i>ntrC</i> ::Tn5	C. Kennedy
MV724	<i>ntrA</i> ::Tn5	C. Kennedy
<i>Plásmidos</i>		
pRK2013	Tra ⁺ , Km ^r	Figurski y Helinski, 1979
pLV50	<i>ntrC</i> , Tc ^r	A. Toukdarian
pGS9	Tra ⁺ , Km ^r (Tn5), Cm ^r	V.N. Iyer
pTZ19R	Tra ⁻ , Ap ^r	F. Luque
pHP45Ω	Tra ⁻ , Ap ^r , Ω(Sm ^r , Spc ^r)	F. Luque
pUC4kiss	Tra ⁻ , Ap ^r , <i>kiss</i> (Km ^r)	F. Luque

ESTIRPE, PLÁSMIDO O BACTERIÓFAGO	GENOTIPO O FENOTIPO	ORIGEN O REFERENCIA
pUC4kixx	Tra ⁻ , Ap ^r , kixx(Km ^r)	F. Luque
pRM3	Fragmento SalI portador de la resistencia a Km de Tn5 de la mutación <i>nas-3</i> clonado en pTZ19R	Esta tesis
pRM5	Fragmento KpnI portador de la resistencia a Km de Tn5 de la mutación <i>nas-5</i> clonado en pTZ19R	Esta tesis
pRM8, pRM11, pRM12, pRM13, pRM14, pRM17, pRM18, pRM20 y pRM21	Fragmentos obtenidos a partir de la genoteca y clonados en pTZ19R (ver tabla XIX de los Resultados)	Esta tesis
pPN3	Derivado de pRM3 sin la resistencia a Km	Esta tesis
pFUS2, pFUS6, pFUS7, pFUS10, pFUS12, pFUS29, pFUS41, pFUS42, pFUS49	Inserciones de Tn5 B20 en pPN3	Esta tesis
pPN3-Ω	Inserción de Ω en pPN3	Esta tesis
plysE	Cm ^r , pACYC184 con el gen de la lisozima de T7	E. Santero
pIZ227	Cm ^r , plysE con el gen <i>lacI</i> ^q	F. Govantes
<i>Bacteriófagos</i>		
λGEM12	Bacteriófago λ modificado para su uso como vector en la construcción de genotecas	Frischauf <i>et al.</i> , 1983
λnas3.1, nas3.4, nas3.5, nas3.7, nas3.8, nas3.10, nas3.11	Clones de la genoteca de <i>A. vinelandii</i> que hibridan con pRM3	Esta tesis
λnas5.1	Clon de la genoteca que hibrida con pRM5	Esta tesis
λB20	Portador de Tn5- <i>lacZ</i> para hacer fusiones	F. Romero

2.2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

2.2.1. *Azotobacter vinelandii*

Los cultivos líquidos se hacían en agitación fuerte (200 rpm). La temperatura de incubación era de 30°C. Los medios sólidos llevaban 15 g/l de agar ADSA-MICRO.

El medio mínimo para *A. vinelandii* era el medio de 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 u oxoglutarato	20	g
Tampón fosfato 0,5 M (pH 7,5)	40	ml
H ₂ O	hasta 1	l

El tampón fosfato se añadía después de autoclavar el medio. Este medio se suplementaba, cuando era necesario, con cloruro amónico (0,8 g/l), nitrato potásico (0,8 g/l), nitrito sódico (0,2 g/l) o nitrato amónico (1 g/l).

El medio rico no definido BSNA es el medio de Burk suplementado con triptona (2 g/l) y extracto de levadura (1 g/l). En experimentos de transformación se empleaba el medio TF, que es similar al medio de Burk pero sin hierro ni molibdeno y suplementado con 0,8 g/l de cloruro amónico.

2.2.2. Escherichia coli

La temperatura de incubación era de 37°C. En medio líquido se incubaba en agitación rotatoria continua a 200 rpm. En medios sólidos se añadía agar (15 g/l). El agar de cobertera, utilizado en las infecciones con fagos, llevaba 7,5 g/l de agar.

El medio comúnmente utilizado era el medio rico no definido de Luria-Bertani, con la siguiente fórmula:

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
ClNa	5 g
H ₂ O	hasta 1 l
El pH se ajusta a 7,2 con NaOH	

Para experimentos de infección con el fago λ se añadía además SO₄Mg 10 mM. En estos experimentos se usaba también el medio TBMM:

Triptona	10 g
ClNa	5 g
Cl ₂ Mg	10 mM
Maltosa	2 g
H ₂ O	hasta 1 l

En ciertos experimentos se empleó el medio mínimo M9, cuya composición x5 es:

PO ₄ HNa ₂	30 g
PO ₄ H ₂ K	15 g
ClNH ₄	5 g
ClNa	2,5 g
Cl ₂ Ca	15 mg
Agua destilada	hasta 1 l
Antes de usar se diluye a 1x con agua	

destilada estéril y las siguientes soluciones, por litro:

SO ₄ Mg 1M	1 ml
Fuente de carbono 20% p/v	10 ml

2.2.3. Agentes selectivos

Para la selección e identificación de diferentes estirpes y plásmidos se utilizaban agentes a las siguientes concentraciones (en µg/ml):

	<i>A. vinelandii</i>	<i>E. coli</i>
Ácido nalidíxico	500	25
Ampicilina	50	50
Cloranfenicol	25	25
ClO ₃ K	12250	100
Espectinomicina	10	100
Estreptomocina	10	100
Kanamicina	1	40
Tetraciclina	10	20
X-gal	50	50

2.3. TAMPONES Y SOLUCIONES

2.3.1. 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

2.3.2. Solución de Fe-EDTA

Solución A:

EDTA ácido libre	16 g
KOH	10,4 g
H ₂ O	hasta 186 ml

Solución B:

SO ₄ Fe.7H ₂ O	13,7 g
H ₂ O	hasta 346 ml

Se preparaba mezclando A y B y burbujeando la mezcla con aire durante una noche.

2.3.3.Reactivo de Holmes-Bonner

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

2.3.4.Soluciones para aislar ADN plasmídico

Solución I:

Glucosa	50 mM
EDTA	10 mM
Tris pH 8	25 mM
Lisozima	2 mg/ml

Solución II:

NaOH	0,2 N
SDS	1%

Solución III:

Acetato potásico 3 M , ácido fórmico 1,8 M.

2.3.5. Tampón TE

Tris 10 mM, pH 7,5-8, EDTA 1 mM.

2.3.6. Tampón TES

Tris 10 mM, EDTA 100 mM, ClNa 150 mM, pH 8,0.

2.3.7. Tampón TESL

Similar al TES pero 100 veces menos EDTA y ClNa.

2.3.8. Tampón SSC (x20)

ClNa 3 M, citrato sódico 0,3 M, pH7.

2.3.9. Tampón TAE

Tris-acético 40mM pH 8,1, EDTA 2mM.

2.3.10. Tampón de lisis para *A. vinelandii*

SDS 0,2%, SSC (x2)

2.3.11. Tampones para digestiones con enzimas de restricción

Las digestiones con enzimas de restricción se realizaban con el tampón adecuado a cada enzima suministrado por la propia casa comercial (Boehringer-Mannheim).

2.3.12. Tampón para el ligamiento de ADN

Se utilizaba el tampón suministrado por Boehringer-Mannheim.

2.3.13. Tampón Z para β -galactosidasa

PO ₄ HNa ₂	16,1 g
PO ₄ H ₂ Na	5,5 g
ClK	0,75 g
SO ₄ Mg	0,246 g
β -mercaptoetanol	2,7 ml
Agua destilada	hasta 1 l
Ajustar pH a 7.	

2.3.14. Tampón SM

ClNa	5,8 g
SO ₄ Mg.7H ₂ O	2 g
Tris-ClH 1M, pH 7,5	50 ml
Gelatina	0,1%
Agua destilada	hasta 1 l

2.3.15. Soluciones para el marcaje y detección de ADN

-Solución de hibridación: 5xSSC; reactivo de bloqueo (suministrado por Boehringer), 5%; N-lauroilsarcosina, sal sódica, 0,1%; SDS, 0,02%; formamida, 50%.

-2xSSC; SDS, 0,1%.

-0,1xSSC; SDS, 0,1%.

-Tampón 1: Tris-ClH, 100 mM; ClNa, 150 mM; pH 7,5.

-Tampón 2: Reactivo de bloqueo, 2% en tampón 1.

-Tampón 3: Tris-ClH, 100 mM; ClNa, 100 mM; Cl₂Mg, 50 mM; pH 9,5.

2.3.16. Soluciones para electroforesis de proteínas

2.3.16.1. Primera dimensión

-Tampón de cubierta:

Urea	4,8 g
Nonidet P-40 (10% en H ₂ O)	5 ml

Anfolinas 3-10	20 μ l
Anfolinas 5-7	80 μ l
β -mercaptoetanol	0,5 ml
H ₂ O	hasta 10 ml

Guardar a -70°C.

-Tampón de lisis:

Urea	5,88 g
Nonidet P-40 (10% en H ₂ O)	2 ml
Anfolinas 3-10	40 μ l
Anfolinas 5-7	160 μ l
β -mercaptoetanol	0,5 ml
H ₂ O	hasta 10 ml

Guardar a -70°C.

-Tampón de equilibrio:

Tris-ClH, 0,5 M, pH 6,8	12 ml
SDS	2 g
β -mercaptoetanol	5 ml
Glicerol	10 ml
Azul de bromofenol	0,001%
H ₂ O	hasta 100 ml

Guardar a temperatura ambiente. Es la misma solución que la de lisis de proteínas para electroforesis unidimensionales.

-Solución de acrilamida IEF:

Acrilamida (Bio-Rad)	2,84 g
Bisacrilamida (Bio-Rad)	162 mg
H ₂ O	hasta 10 ml

Filtrar. Guardar en oscuridad a 4°C. Máximo 1 mes.

-Solución de ortofosfórico:

1,5 ml de PO₄H₃ 85% en 2,25 l de agua destilada.

-Solución de sosa:

0,8 g de NaOH en 1 l de agua destilada.

-Solución de agarosa:

Agarosa	1%
Azul de bromofenol	0,001%
En tampón de equilibrio	

-Gel primera dimensión:

Urea	5,5 g
Solución de acrilamida IEF	1,3 ml
Nonidet P-40 (10%)	2 ml
Anfolinas 3-10	0,24 ml
Anfolinas 5-7	0,6 ml
TEMED	7 μ l
Persulfato amónico	10 μ l
Agua destilada	hasta 10 ml

2.3.16.2.Segunda dimensión

-Solución para el gel de resolución:

Acrilamida	30%
Bisacrilamida	0,15% o 0,8%
Filtrar y guardar a 4°C, no más de un mes.	

-Solución para el gel de apilamiento:

Acrilamida	30%
Bisacrilamida	1,5% o 0,8%
Filtrar y guardar a 4°C, no más de un mes	

-Tampón de resolución:

Tris-ClH 1,5 M, pH 8,8.

-Tampón de apilamiento:

Tris-ClH 0,5 M, pH 6,8.

-Tampón de electrodos (x5 o x10):

Trizma base	45,45 g
Glicina	216 g
Agua destilada	hasta 1,5 l

Guardar a temperatura ambiente. Para usar tomar 300 ml (o 150), añadir 15 ml de SDS 10% y llevar hasta 1,5 l con agua destilada.

-Gel de resolución (15%):

Solución de acrilamida	25 ml
SDS 10%	0,5 ml
Tampón de resolución	12,5 ml
TEMED	10 μ l
Persulfato amónico 10%	0,25 ml
Agua destilada	11,75 ml

-Gel de apilamiento:

Solución de acrilamida	1,33 ml
SDS 10%	0,1 ml
Tampón de apilamiento	2,5 ml
TEMED	10 μ l
Persulfato amónico	50 μ l
Agua destilada	6,1 ml

2.4. ESTIMACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

2.4.1. Actividad nitrato reductasa

El método utilizado es una modificación del descrito por Guerrero *et al.* (1973). El ensayo se realizaba con cultivos en fase exponencial. Las células se recogían por centrifugación, se lavaban dos veces con tampón fosfato 12,5 mM, pH 7,5 y finalmente se resuspendían en 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 se incubaba durante 60 minutos a 30°C. La reacción se paraba agitando vigorosamente hasta oxidar completamente el metilviológeno reducido. Se centrifugaba y se tomaba 1 ml de sobrenadante para determinar la concentración de nitrito.

2.4.2. Actividad nitrito reductasa

El método utilizado es una modificación del descrito por Vega *et al.* (1973). Las células se preparaban de forma idéntica a la descrita para el ensayo de la nitrato reductasa. La mezcla de ensayo 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 incubaba durante 60 minutos a 30°C. La reacción se detenía por agitación vigorosa hasta oxidar completamente el metil viológeno. Se centrifugaba y se tomaba una muestra diluida 10 veces en agua para determinar la concentración de nitrito.

2.4.3. Actividad β -galactosidasa

A partir de cultivos en fase exponencial se tomaban 100 μ l y se les añadía 900 μ l de tampón Z, 25 μ l de cloroformo y 25 μ l de SDS 0,1%. Tras incubar 10 minutos a 30°C se añadían 200 μ l de o-nitrofenil β -D-galactopiranosido (ONPG) 4 mg/ml y se continuaba la incubación hasta apreciar color amarillo. El desarrollo de color se detenía con 0,5 ml de CO_3Na_2 1 M. Se medía la densidad óptica de la mezcla a 420 y 550 nm. La actividad se expresaba en unidades Miller, obtenidas por la siguiente ecuación: $1000 \times [(DO_{420} - 1,75 \times DO_{550}) / t \times V \times DO_{660}]$, donde t es el tiempo desde la adición de ONPG hasta la adición de CO_3Na_2 en minutos, V es el volumen de cultivo en ml y DO_{660} corresponde al cultivo de partida.

2.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

2.5.1. Determinación de nitrito

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

Solución A: Sulfanilamida 58 mM en ClH 2,4 N

Solución B: N-naftil-1-etilén-diamina diclorhidrato (N'NEDA) 0,69 mM.

La determinación se realizaba añadiendo a 1 ml de muestra, 1 ml de solución A y 1 ml de solución B. Se agitaba y se incubaba 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se añadían 2 ml de agua destilada y se medía la densidad óptica a 540 nm. Se realizaba una recta de calibrado con nitrito sódico.

2.5.2. Determinación de proteína

Se realizaba por el método de Lowry modificado por Markwell *et al.* (1978). Se empleaban las siguientes soluciones:

Solución A:

CO ₃ Na ₂	2%
NaOH	0,4%
Tartrato NaK	0,16%
SDS	1%

Solución B:

SO ₄ Cu.5H ₂ O	4%
--------------------------------------	----

Solución C:

100 de A + 1 de B, preparar poco antes de usar.

Solución D:

Folín 1:1 con agua destilada.

El procedimiento era el siguiente: a 1 ml de muestra diluida en NaOH 0,1 N con 20-40 µg de proteína se le añadían 3 ml de solución C. Se incubaba durante 45 minutos a 30°C. A continuación se añadía 0,3 ml de solución D y se incubaba otros 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se medía la absorbancia a 750 nm. La recta patrón se hacía con ovoalbúmina de vaca disuelta en NaOH 0,1 N.

2.5.3. Medidas de pH

El pH de las soluciones se determinaba utilizando un pH-metro "Crison" modelo micropH 2001. Para medir el gradiente de pH en los geles de acrilamida de la primera dimensión de las electroforesis bidimensionales se cortaba el gel en secciones de 5 mm. Cada sección se colocaba en un vial con 2 ml de agua y se agitaba durante 2 horas. Finalmente se

medía el pH de cada sobrenadante.

2.5.4. Medidas espectrofotométricas

Se llevaban a cabo utilizando un espectrofotómetro PYE Unicam modelo SP8-100 UV o un espectrofotómetro Bausch y Lomb modelo Spectronic 20.

2.6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

2.6.1. Marcaje de proteínas con ³⁵S

Se tomaban cultivos de *A. vinelandii* en fase exponencial que venían utilizando nitrógeno atmosférico como única fuente de nitrógeno. Se dividían en tubos de 5 ml a los que se añadía cloruro amónico (0,8 g/l), nitrato potásico (0,8 g/l) o nada. Tras un tiempo de incubación variable se añadía metionina marcada con ³⁵S a razón de 50 µCi por tubo y se incubaba una hora más a 30°C y con agitación. Se lavaba cada cultivo con tampón fosfato 12,5 mM, pH 7,5 y se hacía el extracto para la electroforesis bidimensional.

Como patrón de pesos moleculares se utilizaba una mezcla comercial (Bio-Rad) de proteínas de pesos conocidos (en Da):

Miosina	200000
β-galactosidasa de <i>E. coli</i>	116250
Fosforilasa b de músculo de ratón	97400
Seroalbúmina de vaca	66200
Ovoalbúmina de gallina	45000
Anhidrasa carbónica de vaca	31000
Inhibidor de tripsina	21500
Lisozima de gallina	14400

2.6.2.Preparación de extractos para electroforesis

Para las bidimensionales, las células se resuspendían en el tampón de lisis (O'Farrell, 1975) y se sometían a congelaciones y descongelaciones sucesivas. Luego se centrifugaba el lisado a 15000 rpm durante 15 minutos y se guardaba el sobrenadante a -70°C hasta su utilización.

Para las unidimensionales con SDS, se concentraba 10 veces en el tampón de equilibrio y se calentaba la muestra a 95°C durante 5 minutos.

Para las electroforesis no desnaturizantes se usaban extractos obtenidos por sonicación de suspensiones celulares concentradas 20 veces en tampón MOPS-KOH 25 mM, pH 7,5 + ditioeritritol 0,5 mM. Se sonicaba con un sonicador "Branson" modelo B-12 durante 5 minutos, con 50 wátios de potencia, a intervalos de medio minuto, con un minuto de descanso y manteniendo el extracto en hielo. Se centrifugaba a 16000 rpm en frío durante 20 minutos y se conservaba el sobrenadante a -20°C hasta su utilización.

2.6.3.Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes

Las electroforesis se realizaban con aparatos de "Bio-Rad" modelos Protean II o Miniprotean II. Para las bidimensionales se seguía el procedimiento de O'Farrell (1975) modificado por Bravo (1984). En la segunda dimensión se usaban geles de poliacrilamida al 12% o 15%. La primera dimensión se desarrollaba durante 18 horas a 400 voltios y una hora a 800 V. Para la segunda dimensión se aplicaban 13,5 miliamperios por gel durante 15 horas. En las electroforesis unidimensionales se usaba el método de Laemmli (1970); los geles se preparaban con un 10%, 12% o 15% de acrilamida y se sometían a 35 miliamperios durante 4-5 horas. Los minigeles,

procesados con el aparato Miniprotean II, se sometían a 150 voltios durante 1 hora.

2.6.4. Electroforesis de proteínas en condiciones no desnaturalizantes

Se realizaba en geles de poliacrilamida en vertical.

El gel de resolución (100x62x1,5 cm) contenía:

Acrilamida	7,5%
Bisacrilamida	0,2%
Tris-ClH, pH 7,5	0,07 M
EDTA, pH 8	0,5 mM
TEMED	0,02%
Persulfato amónico	0,05%

El gel de apilamiento contenía:

Acrilamida	3,75%
Bisacrilamida	0,2%
Tris-ClH, pH 7,5	0,07 M
EDTA, pH 8	0,5 mM
TEMED	0,1%
Persulfato amónico	0,05%

Como tampón de electrodos se usaba Tris-citrato 0,025 M, pH 7. La electroforesis se realizaba a 100 voltios durante 2,5 horas, en frío.

2.6.5. Detección de proteínas en geles de poliacrilamida mediante tinción

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se teñían introduciendo el gel en una solución acuosa de azul de Coomassie al 0,25%, metanol al 40% y ácido acético al 10%. Tras 1 hora de tinción, se lavaba varias veces con una solución de metanol al 40% y ácido acético al 10%.

En la mayoría de los casos se usaba la tinción con nitrato de plata, mucho más sensible que la anterior. Se seguía el método de Blum *et al.* (1987) con los siguientes pasos:

Fijación	Metanol 50%	
	Acético 12%	1 hora
	Formaldehido(37%) 0,5 ml/l	
Lavado	Etanol 50%	3x20 min
Pretratamiento	S ₂ O ₃ Na ₂ .5H ₂ O 0,2 g/l	1 min
Lavado	Agua destilada	3x20 s
Impregnación	NO ₃ Ag 2 g/l	20 min
	Formaldehido(37%) 0,75 ml/l	
Lavado	Agua destilada	2x20 s
Revelado	CO ₃ Na ₂ 60 g/l	
	Formaldehido(37%) 0,5 ml/l	10 min
	S ₂ O ₃ Na ₂ .5H ₂ O 4 mg/l	
Lavado	Agua destilada	2x2 min
Parada	Metanol 50%	10 min
	Acético 12%	
Lavado	Metanol 50%	20 min

2.6.6. Detección de proteínas en geles de poliacrilamida mediante autorradiografía

Los geles con muestras radioactivas se sometían a fluorografía. Para ello se mantenían en dimetilsulfóxido durante 30 minutos en agitación, dos veces, y en una solución de 2,5-difeniloxazol (PPO) al 12% en dimetilsulfóxido durante 3 horas.

Posteriormente se secaban sobre un filtro Whatman 3MM a 80°C, durante 2 horas, en un secador de geles de marca Hoefer modelo SE 1160 conectado a una bomba de vacío.

Los geles se aplicaban a una película de rayos X (Kodak) y se introducían en carcasas de exposición que se mantenían a -70°C hasta el momento del revelado de la película, que se realizaba con productos suministrados por Valca siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.6.7. Detección de la nitrato reductasa en geles no desnaturizantes

Se dividía el gel en tiras transversales a la dirección de avance de las proteínas durante la electroforesis. Cada tira se dividía en dos. Una parte se introducía en la mezcla de ensayo para la actividad nitrato reductasa. Tras una hora se medía la producción de nitrito en cada mezcla.

2.6.8. Electroelución

Los fragmentos de geles de electroforesis no desnaturizantes que contenían las proteínas interesantes se sometían a una nueva electroforesis, con el mismo tampón de electrodos, en un aparato de electroelución de Bio-Rad, con objeto de extraer las proteínas para su análisis.

2.6.9. Expresión de proteínas de *A. vinelandii* en *E. coli*

Se empleaba el sistema de la ARN polimerasa de T7 (Tabor y Rychardson, 1985). La estirpe NCM631 de *E. coli* lleva, en su cromosoma, el gen de la ARN polimerasa de T7 clonado bajo el promotor P_{lac} de *E. coli* y su expresión es, por tanto, inducible por IPTG. Para mantener bajos niveles basales de ARN polimerasa de T7 se introducía en NCM631 por transformación el plásmido plysE, que lleva el gen de la lisozima de T7, o el plásmido pIZ227, portador del represor de P_{lac}. Los fragmentos de ADN de *A. vinelandii* cuya expresión se quería estudiar estaban clonados en pTZ19R, bajo un promotor dependiente de la ARN polimerasa de T7. Estos plásmidos se introducían por transformación en NCM631/plysE o NCM631/pIZ227. El marcaje específico de los productos proteicos de los genes de *A. vinelandii* se hacía de la siguiente manera: la estirpe NCM631 con la combinación de dos plásmidos correspondientes (plásmido con represor más plásmido con genes de *Azotobacter*) se incubaba a 37°C y con agitación en medio rico de Luria-Bertani hasta que alcanzaba una DO₆₀₀ de 0,4. En este momento se lavaba el cultivo con medio mínimo M9, se resuspendía en ese mismo medio, se añadía IPTG a 1 mM de concentración final para inducir la producción de la ARN polimerasa de T7 y se volvía a incubar durante 2 horas. A continuación se añadía rifampicina a 200 µg/ml, que inhibe la ARN polimerasa de *E. coli* pero no la de T7, y se incubaba 30 minutos. Finalmente, a 1 ml de este cultivo se le añadían 10 µl (10 µCi) de una mezcla de metionina y cisteína marcadas con ³⁵S, se incubaba otros 5 minutos, se recogían las células por centrifugación, se resuspendían en 100 µl de tampón de lisis (tampón de equilibrio descrito antes) y se sometían a una temperatura de 95-100°C durante 5 minutos. Los extractos proteicos así obtenidos se sometían a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y se analizaban mediante autorradiografía.

2.7. MÉTODOS GENÉTICOS Y DE BIOLOGÍA MOLECULAR

2.7.1. Mutagénesis con Tn5

Como vehículo del transposón se empleaba el plásmido pGS9, que no puede mantenerse establemente en *Azotobacter* y es susceptible de ser transferido por conjugación. Para asegurar la máxima frecuencia de conjugación de usaba el plásmido pRK2013 como coadyuvante.

Se partía de cultivos de las estirpes HB101/pGS9 y HB101/pRK2013 en medio de Luria-Bertani y de las estirpes UW136 o UW6r en medio Burk suplementado con cloruro amónico. Se mezclaban los tres cultivos poniendo 10 veces más volumen de receptor que de los donadores, se concentraba la mezcla mediante centrifugación y se aplicaba a una caja de BSNA, donde se incubaba durante 24 horas a 30°C. A continuación se recogía la biomasa producida y se sometía a segregación en medio líquido seguida o no de enriquecimiento. Por último se sembraba en los medios selectivos adecuados, que siempre llevaban rifampicina (para contraseleccionar a *Escherichia*) y kanamicina (marcador del transposón).

2.7.2. Mutagénesis de pPN3 con Tn5-B20

Para lograr fusiones *lacZ* en pPN3 se introducía este plásmido en la estirpe S17-1 de *E. coli*. Esta estirpe era entonces infectada con λ -B20, vector de Tn5-B20. La selección se hacía en cajas de Luria-Bertani con kanamicina. Sólo crecerían aquellos en que se hubiera producido un salto del transposón, bien al cromosoma de *E. coli*, bien a pPN3. Se aislaban los plásmidos de las colonias resultantes y se transferían por transformación a la estirpe 71-18 de *E. coli*, seleccionando de nuevo el paso de la resistencia a kanamicina y el de la resistencia a ampicilina (marcador de pPN3). A las colonias resultantes se les estudiaba el plásmido que contenían, que se esperaba que fuera pPN3 con una inserción de Tn5-B20 diferente en cada caso.

2.7.3. Conjugación

Generalmente, se mezclaban 1 ml de *E. coli* y 10 ml de *A. vinelandii* de cultivos estacionarios. La mezcla se centrifugaba y se depositaba en una caja de BSNA, donde se incubaba a 30°C durante 24 horas. La mezcla obtenida se plaqueaba en el medio selectivo adecuado. En ocasiones se añadía a la mezcla inicial 1 ml de cultivo de HB101/pRK2013 como coadyuvante.

2.7.4. Transformación

2.7.4.1. *Azotobacter vinelandii*

Para obtener células competentes se seguía el procedimiento descrito por Page y von Tigerstrom (1979), con algunas modificaciones. Se partía de un preinóculo de la estirpe deseada que había crecido a 28°C, con agitación, hasta fase estacionaria, en medio TF. A continuación se diluía 10 veces en el mismo medio y se incubaba de nuevo hasta el final de la fase exponencial. El cultivo competente tomaba un intenso color amarillo verdoso.

Para transformar con ADN cromosómico se mezclaban 0,5 ml del cultivo y 0,1 ml de la solución de ADN y se depositaban en una caja con medio TF. Tras incubar 24 horas a 30°C, la biomasa resultante se sembraba en el medio selectivo adecuado.

Para transformar con ADN plasmídico se utilizaba el método descrito por Glick *et al.* (1985), ligeramente modificado. Se concentraban células competentes 10 veces en medio TF. Se añadía la solución de ADN y se incubaba a 30°C durante 30 minutos. A continuación se añadían 10 volúmenes de TF y se continuaba incubando una hora más. Por último se sembraba en el medio selectivo adecuado.

2.7.4.2. *Escherichia coli*

Las transformaciones de *E. coli* se llevaban a cabo por el método del cloruro de calcio descrito por Maniatis et al. (1982).

2.7.5. Infección

Para obtener calvas de lisis de los bacteriófagos recombinantes donde se había construido la genoteca, se empleaba un cultivo en TBMM de la estirpe KW251 de *E. coli*. Este cultivo se centrifugaba y se resuspendía en medio volumen de SM. Se tomaban 100 μ l y se les añadía 10 μ l de suspensión de fagos. La mezcla se incubaba a 37°C durante 20-30 minutos y se sembraba, con agar de cobertera, en cajas de medio de Luria-Bertani suplementado con SO_4Mg 10 mM, que se incubaban 15-24 horas a 37°C.

2.7.6. Segregación y enriquecimiento

Para permitir la expresión de alelos recesivos aparecidos por mutación o introducidos en un nuevo contexto genético por transformación, se dejaba en todos los casos un período de segregación de aproximadamente 12 generaciones en un medio no selectivo. Esto se conseguía 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. La operación se repetía tres veces.

En los experimentos de aislamiento de mutantes, a la segregación seguía una etapa de enriquecimiento. Para ello, las células que provenían de la segregación se recogían por centrifugación, se lavaban dos veces con tampón fosfato diluido a la concentración del medio Burk y se inoculaban a una concentración de unas 5×10^7 bacterias/ml en el medio donde

no deben crecer los mutantes deseados y sí las bacterias silvestres. Se incubaba a 30°C durante tres horas y se añadía ampicilina y D-cicloserina a 20 µg/ml, para continuar incubando otras 15 horas. Finalmente se recogían las células por centrifugación y se sembraban en cajas.

2.7.7. Aislamiento de ADN

2.7.7.1. Aislamiento de ADN plasmídico

Se seguía el método de lisis alcalina descrito por Maniatis *et al.* (1982).

2.7.7.2. Aislamiento de ADN cromosómico de *A. vinelandii*

2.7.7.2.1. Aislamiento de ADN purificado

El método era el descrito por Robson *et al.* (1984) con leves modificaciones. Se cultivaba *A. vinelandii* en medio Burk (50 ml) hasta el final de la fase exponencial. Las células se recogían por centrifugación y se lavaban con 10 ml de ClNa (3% p/v). Se resuspendían en 10 ml de TES y se les añadía 1,6 ml de SDS al 10%. Se incubaba a 37°C durante 10 minutos y se precipitaba con 1,2 ml de acetato sódico 3M y 10 ml de isopropanol a -20°C. Se mezclaba cuidadosamente, se recogía el ADN con varillas de vidrio y se resuspendía en 3 ml de SSC. A continuación se añadía ARNasa a 10 µg/ml y se incubaba a 37°C durante 30 minutos. Luego se añadía proteinasa K a 0,5 mg/ml y se incubaba en agitación suave durante 15 horas a 37°C. Por último se desproteinizaba con el reactivo de Holmes-Bonner, se precipitaba con etanol absoluto y se resuspendía en 0,5 ml de TESL.

2.7.7.2.2. Aislamiento de ADN cromosómico para transformación

Se seguía el procedimiento de Page y Sadoff (1976). Cultivos de 10 ml en medio Burk suplementado con cloruro amónico se llevaban hasta el final de la fase exponencial. Las células se recogían por centrifugación y se resuspendían en 3 ml de la siguiente solución:

ClNa	1,5 M
Citrato sódico	15 mM
SDS	0,2 %

A continuación se incubaba 90 minutos a 65 °C y se agitaba vigorosamente durante dos minutos. Los lisados se conservaban a -20°C.

2.7.7.3. Aislamiento de ADN de λ

Se mezclaban 50 μ l de una suspensión de bacteriófagos con 100 μ l de un cultivo de *E. coli* KW251 resuspendido en SM. Se incubaba a 37°C durante 20 minutos y se pasaba a un matraz con 100 ml de Luria-Bertani suplementado con SO₄Mg 10 mM y maltosa al 0,2% que se incubaba a 37°C durante una noche y con agitación vigorosa. Se añadían 5 ml de cloroformo, se incubaba a 4°C durante 30 minutos y se centrifugaba. Al sobrenadante se le añadía ADNasa (1 μ g/ml) y ARNasa (10 μ g/ml) y se incubaba a 37°C durante 30 minutos. Se añadía ClNa a concentración final de 1M y polietilenglicol (PEG 6000) al 10% (p/v). Se disolvía a temperatura ambiente, se incubaba una hora en hielo, se centrifugaba a 11000 g durante 10 minutos a 4°C y se eliminaba el sobrenadante. El resto se dejaba secar 5 minutos y se resuspendía en 2 ml de SM. Esto se repartía en viales a razón de 600 μ l por vial. A cada uno se le añadía el mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 24:1, se mezclaba bien, se centrifugaba 5 minutos y se recogía la fase acuosa. Para lisar los fagos se añadía EDTA a 20 mM de concentración

final, proteinasa K a 50 µg/ml y SDS al 0,5% y se incubaba a 65 °C durante 1 hora. Después se añadían 150 µl de ClNa 5M y 80 µl de CTAB/ClNa, mezclando bien tras cada adición, y se incubaba 10 minutos a 65°C. Se añadía el mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico, se centrifugaba 5 minutos, se retiraba la fase acuosa y se trataba con el reactivo de Holmes-Bonner. Por último, el ADN se precipitaba con dos volúmenes de etanol a -20°C durante 30 minutos, centrifugando 15 minutos, se lavaba con etanol al 70%, se secaba y se resuspendía en tampón TE (100 µl/vial).

2.7.8. Restricción del ADN

Las endonucleasas de restricción empleadas eran suministradas por la casa Boehringer y se utilizaban de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tiempo de reacción variaba entre 1 y 4 horas. Las reacciones se detenían por incubación a 65°C durante 20 minutos o por adición de EDTA a una concentración final de 10 mM. La eficacia de la digestión se comprobaba mediante electroforesis en gel de agarosa.

2.7.9. Relleno de extremos cohesivos

Para ello se utilizaba el fragmento Klenow de la ADN-polimerasa I de *E. coli*. Este enzima y los nucleótidos necesarios para la reacción eran suministrados por la casa Boehringer. Se seguía el protocolo del fabricante.

2.7.10. Ligamiento de ADN

Las moléculas de ADN cortadas con las endonucleasas de restricción adecuadas se mezclaban y se precipitaban con etanol, se lavaban con etanol al 70% y se resuspendían en 9 μ l de tampón de ligamiento. Luego se añadía 1 μ l (1 U/ μ l) de ADN ligasa del fago T4, suministrada por Boehringer, y se incubaba a 15°C durante 15 horas. Los productos de la reacción se utilizaban para transformar a *E. coli*.

2.7.11. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Se llevaban a cabo en aparatos de la firma Bio-Rad según el procedimiento descrito por Maniatis *et al.* (1982). Para obtener patrones de tamaño se digería el ADN del fago λ con diferentes enzimas de restricción. Las bandas obtenidas con cada enzima eran las siguientes (en pb):

<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RI	<i>Hind</i> III	<i>Sma</i> I
16841	*21226	*23130	*19399
7233	7421	9416	12220
*6770	5804	6557	*8612
6527	5643	*4361	8271
5626	4878	2322	
*5505	*3530	2027	
		564	
		125	

Las bandas marcadas con * daban lugar a una banda adicional, suma de las dos, por unión a través de los extremos cos de λ

Tras la electroforesis, los geles se teñían con una solución de bromuro de etidio y las bandas de ADN se visualizaban con un transiluminador equipado con lámpara ultravioleta y se fotografiaban con cámara Polaroid.

2.7.12. Purificación de fragmentos de restricción mediante la técnica de "geneclean"

Para ello, la muestra que contenía el fragmento de ADN de interés se sometía a electroforesis en gel de agarosa. La porción de agarosa con el fragmento en cuestión se cortaba y el ADN se purificaba con el "kit geneclean" suministrado por BIO 101 Inc., siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

2.7.13. Análisis de ADN mediante hibridación

Se utilizaba el "kit" no radioactivo de marcaje y detección de ADN de la casa Boehringer-Mannheim. Este método se basa en el marcaje al azar de ADN con digoxigenina-dUTP y en la detección de híbridos mediante enzimoinmunoensayo.

2.7.13.1. Transferencia de ADN a filtros de nailon

Una vez que el ADN se había sometido a electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos se transferían a filtro de nailon (Hybond-N, Amersham). Para ello el gel se sumergía en ClH 0,25 M durante 15 minutos. Luego se lavaba con agua destilada y se incubaba en una solución de ClNa 1,5 M y NaOH 0,5 M durante 30 minutos. La transferencia se realizaba por presión durante 8-15 horas en presencia de una solución de ClNa 1,5 M y NaOH 0,25 M. Al final el filtro se secaba y el ADN se fijaba al mismo por exposición a luz ultravioleta durante 2 minutos.

Para las hibridaciones contra la genoteca, las cajas donde estaban las calvas de lisis originadas por los bacteriófagos se dejaban una hora en frío. Luego se colocaba un filtro sobre las calvas y se dejaba 5 minutos, tras los cuales el filtro se incubaba 15 minutos sobre papel Whatman 3MM saturado con una solución de NaOH 0,5M y ClNa 1,5 M, se secaba en papel 3MM y se incubaba de nuevo en el mismo soporte saturado esta vez con Tris-ClH 0,5 M, pH 7,5, ClNa

1,5 M y EDTA 0,001 M. Por último se lavaba con SSC 2x y el ADN se fijaba en el transiluminador de luz ultravioleta.

2.7.13.2. Marcaje de las sondas

El ADN para el marcaje se obtenía bien por el método de "geneclean" bien a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión. En este último caso no era necesario purificar el ADN, bastaba mantener fundida la agarosa durante la reacción de marcaje. Esta se realizaba siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.7.13.3. Hibridación de ADN con sondas marcadas con digoxigenina-dUTP

Se seguían las instrucciones del "kit" de la firma Boehringer. Se usaba formamida en las soluciones de hibridación y prehibridación. La prehibridación se hacía a 42°C durante 6 horas en presencia de ADN de esperma de arenque. La hibridación se llevaba a cabo a 42°C durante 15 horas en presencia del ADN marcado. El revelado de la hibridación se llevaba a cabo por el método quimioluminiscente Lumi-Phos 530, siguiendo las instrucciones del fabricante (Boehringer-Mannheim).

2.7.14. Construcción de una genoteca.

El ADN de λ -GEM12 (figura 9) se cortó con el enzima de restricción *Xho* I y se trató con el fragmento Klenow de la polimerasa del ADN añadiendo los desoxinucleótidos dTTP y dCTP en la mezcla de reacción. Los extremos que se forman no son compatibles y por tanto no ligan al tratar con la ligasa de ADN de T4.

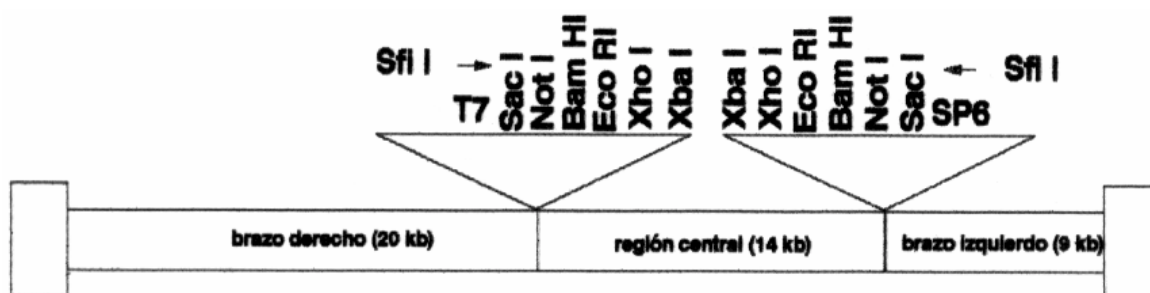


Figura 9. Mapa de restricción del vector de clonación λ -GEM12.

El ADN cromosómico, aislado según se describió antes, se sometió a una digestión parcial con *Sau* 3A. Este enzima reconoce una secuencia de 4 pares de bases, por lo que tiene sitios de corte aproximadamente cada 200-300 pb, esto hace que se produzcan fragmentos prácticamente al azar y que por tanto sea posible clonar cualquier gen. Los extremos producidos por *Sau* 3A y tratados con el fragmento Klenow más los desoxinucleótidos dGTP y dATP son incompatibles entre sí pero compatibles con los extremos producidos antes en el ADN de λ -GEM12.

Una mezcla de ADN del fago y del ADN cromosómico tratados como se ha descrito se ligó con la ADN-ligasa de T4. El ADN ligado se empaquetó en cápsidas del bacteriófago λ , para ello se utilizaron extractos comerciales de Boehringer-Mannheim según las instrucciones del fabricante. Durante el encapsidamiento se produce una selección por tamaño de las inserciones ya que, normalmente, sólo se empaquetarán fagos recombinantes que lleven inserciones de ADN cromosómico de 9-23 kb. El procedimiento se esquematiza en la figura 10.

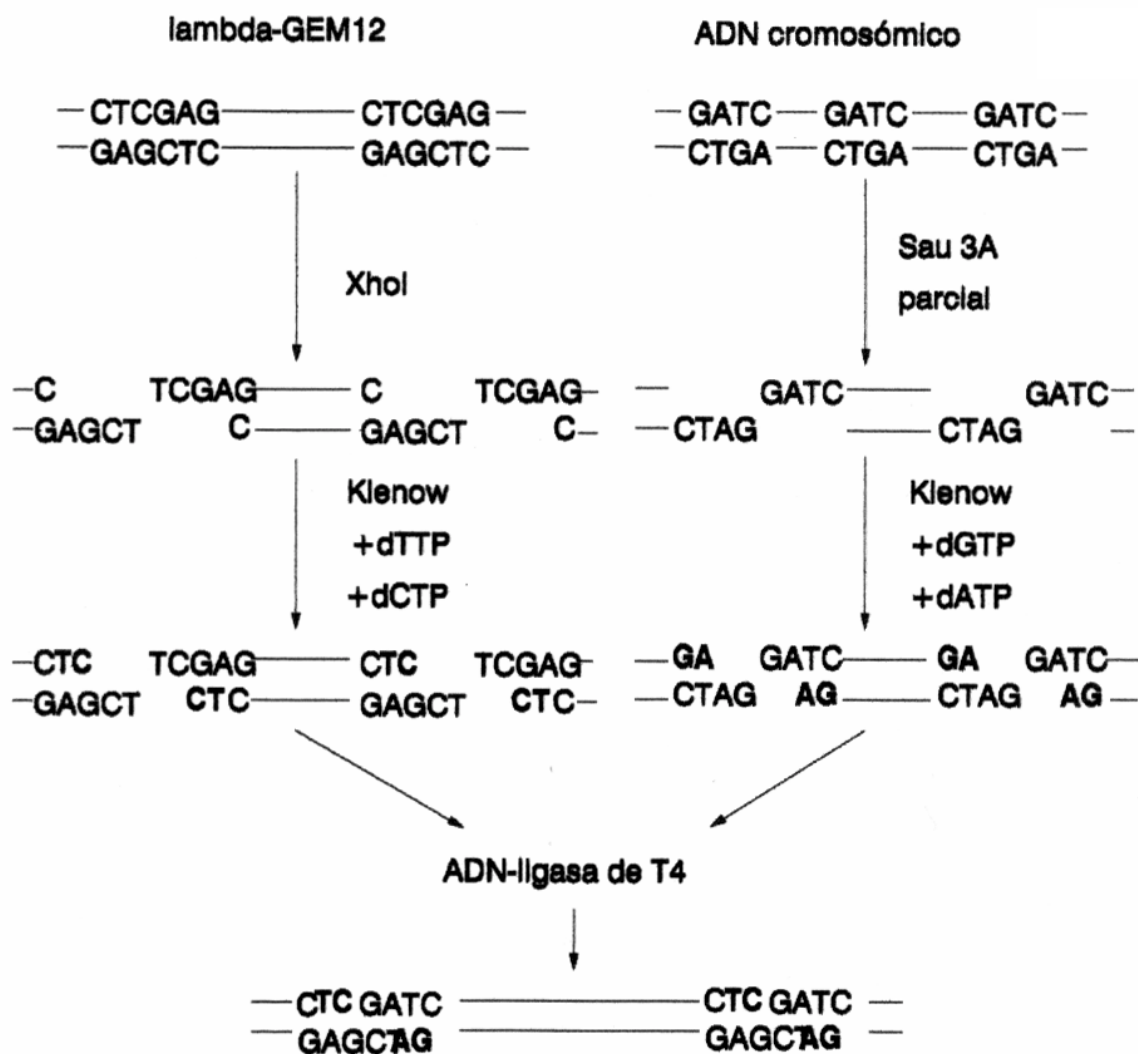


Figura 10. Estrategia de construcción de la genoteca en λ -GEM12.

3 . RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE Tn5 AFECTADOS EN LA ASIMILACIÓN DE NITRATO

3.1.1.Obtención de mutantes de Tn5

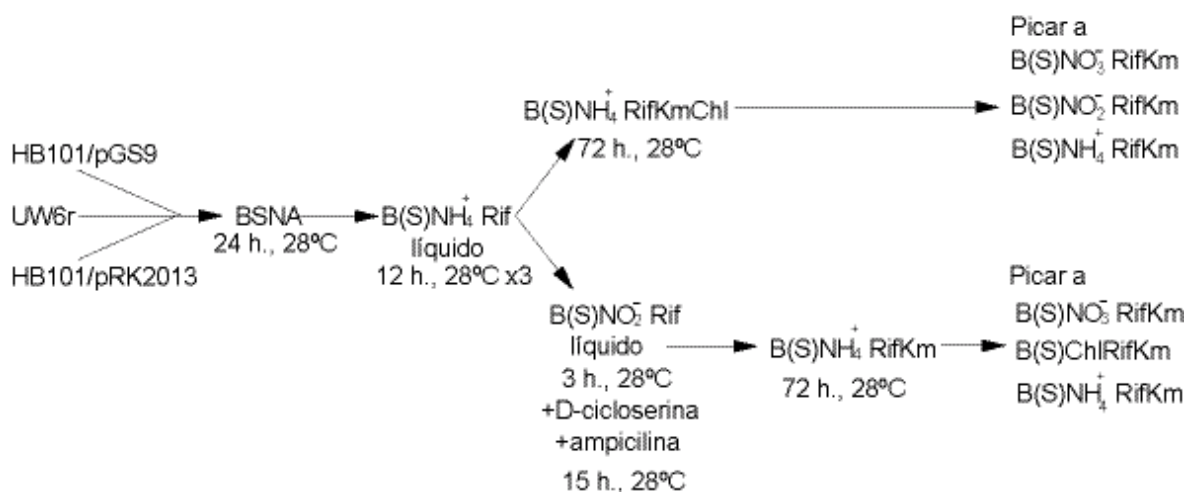


Figura 11. Mutagénesis con Tn5 de la estirpe UW6r

Se mutagenizó la estirpe UW6r de *Azotobacter vinelandii* utilizando el plásmido suicida pGS9, según se describe en Materiales y Métodos. La selección se hizo en clorato y kanamicina tras segregación o por falta de crecimiento en nitrito tras segregación, enriquecer y seleccionar en kanamicina (figura 11). Los mutantes con los que se trabajó posteriormente fueron ocho. Estas mutaciones se introdujeron en la estirpe UW136 por transformación. Con ello se comprobó que iban asociadas a Tn5 y que ninguna de ellas provocaba fenotipo Nif⁻. Los mutantes se denominaron AS243, AS244, AS245, AS246, AS247, AS248, AS256 y AS258, en su versión Nif⁻ y AS249, AS250, AS251, AS252, AS253, AS254, AS255 y AS257, en su versión Nif⁺. Para evitar confusiones de nomenclatura estas mutaciones se denominarán, respectivamente, *nas-1*, *nas-2*, *nas-3*, *nas-4*, *nas-5*, *nas-6*, *nas-7* y *nas-8*. Se estudió el crecimiento de los mutantes en cajas con nitrato o nitrito como única fuente de nitrógeno y en cajas con clorato (tabla V). Esto permitió agrupar los mutantes según sus fenotipos: AS243, AS244, AS245, AS246, AS247 y AS248 eran Chl^r Nis⁺, AS256 presentaba fenotipo Chl^r Nis⁻ y AS258 Chl^s Nis⁻.

Tabla V. Crecimiento en medio mínimo suplementado con distintas fuentes de nitrógeno o clorato de los mutantes de Tn5 y de la estirpe silvestre

ESTIRPES	CRECIMIENTO EN MEDIO SÓLIDO					
	Burk+Km	+NO ₃ ⁻	+NO ₂ ⁻	+ClO ₃ ⁻	+ClO ₃ ⁻ +NH ₄ ⁺	+NH ₄ ⁺
UW136	+	+	+	-	-	+
AS243 (<i>nas-1</i>)	-	-	+	+	+	+
AS244 (<i>nas-2</i>)	-	-	+	+	+	+
AS245 (<i>nas-3</i>)	-	-	+	+	+	+
AS246 (<i>nas-4</i>)	-	-	+	+	+	+
AS247 (<i>nas-5</i>)	-	-	+	+	+	+
AS248 (<i>nas-6</i>)	-	-	+	+	+	+
AS256 (<i>nas-7</i>)	-	-	-	+	+	+
AS258 (<i>nas-8</i>)	-	-	-	-	-	+
AS249 (<i>nas-1</i>)	+	+	+	+	+	+
AS250 (<i>nas-2</i>)	+	+	+	+	+	+
AS251 (<i>nas-3</i>)	+	+	+	+	+	+
AS252 (<i>nas-4</i>)	+	+	+	+	+	+
AS253 (<i>nas-5</i>)	+	+	+	+	+	+
AS254 (<i>nas-6</i>)	+	+	+	+	+	+
AS255 (<i>nas-7</i>)	+	+	+	+	+	+
AS257 (<i>nas-8</i>)	+	+	+	-	-	+

Se replicaron varias colonias de cada estirpe a los medios indicados.

+ indica crecimiento; - indica falta de crecimiento.

Las estirpes Nif⁺ (segunda mitad de la tabla) crecen fijando nitrógeno y por tanto sólo es interesante mirar el dato de crecimiento con clorato.

3.1.2. Actividades nitrato y nitrito reductasa

3.1.2.1. Actividades de los mutantes de Tn5

Los datos anteriores se confirmaron con los de las actividades enzimáticas que se muestran en la tabla VI y mostraban que cinco de los seis mutantes de fenotipo $\text{Chl}^r \text{Nis}^+$ presentaban actividad nitrito reductasa desregulada, por lo que su fenotipo podía denominarse $\text{Chl}^r \text{Nis}^c$ (constitutivos para la nitrito reductasa). Análogamente, el mutante AS257 presentó fenotipo $\text{Nas}^c \text{Nis}^-$ (tabla VI).

Tabla VI. Actividades enzimáticas de los mutantes de Tn5

ESTIRPES	ACTIVIDAD NITRATO RE- DUCTASA		ACTIVIDAD NITRITO RE- DUCTASA	
	-NO ₃ ⁻	+NO ₃ ⁻	-NO ₃ ⁻	+NO ₃ ⁻
UW136	0,8	13,7	4,0	26,6
AS249 (<i>nas-1</i>)	0,2	0,6	17,5	22,5
AS250 (<i>nas-2</i>)	0,1	0,1	17,5	24,4
AS251 (<i>nas-3</i>)	0,1	0,2	19,0	22,1
AS252 (<i>nas-4</i>)	0,2	0,2	3,4	23,2
AS253 (<i>nas-5</i>)	0,3	0,1	17,5	23,1
AS254 (<i>nas-6</i>)	0,0	0,1	20,5	20,5
AS255 (<i>nas-7</i>)	0,2	0,8	2,1	3,6
AS257 (<i>nas-8</i>)	10,5	12,3	2,0	2,1

Las actividades se expresan en nanomoles de nitrito producido o consumido por miligramo de proteína y por minuto. Los ensayos se hicieron tras cultivar 12 horas en medio líquido con nitrato.

Tabla VII. Actividades enzimáticas de los mutantes de ICR

ESTIRPES	ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA		ACTIVIDAD NITRITO REDUCTASA	
	-NO ₃ ⁻	+NO ₃ ⁻	-NO ₃ ⁻	+NO ₃ ⁻
UW136	1,1	13,2	5,0	29,4
AS236	2,0	14,6	4,5	6,0
AS237	0,7	0,4	29,5	32,2
AS238	0,9	0,9	1,6	0,5

Las actividades se expresan en nanomoles de nitrito producido o consumido por miligramo de proteína y por minuto. El ensayo se hizo tras cultivar 12 horas en medio líquido con nitrato.

Tabla VIII. Características fenotípicas de los mutantes de Tn5 y de ICR afectados en la asimilación de nitrato comparados con la estirpe silvestre

ESTIRPES	FENOTIPOS
UW136	Chl ^s Nas ⁺ Nis ⁺ Rif ^r Km ^s
AS249	Chl ^r Nas ⁻ Nis ^c Rif ^r Km ^r
AS250	Chl ^r Nas ⁻ Nis ^c Rif ^r Km ^r
AS251	Chl ^r Nas ⁻ Nis ^c Rif ^r Km ^r
AS252	Chl ^r Nas ⁻ Nis ⁺ Rif ^r Km ^r
AS253	Chl ^r Nas ⁻ Nis ^c Rif ^r Km ^r
AS254	Chl ^r Nas ⁻ Nis ^c Rif ^r Km ^r
AS255	Chl ^r Nas ⁻ Nis ⁻ Rif ^r Km ^r
AS257	Chl ^s Nas ^c Nis ⁻ Rif ^r Km ^r
AS236	Chl ^s Nas ⁺ Nis ⁻ Rif ^r Km ^s
AS237	Chl ^r Nas ⁻ Nis ^c Rif ^r Km ^s
AS238	Chl ^r Nas ⁻ Nis ⁻ Rif ^r Km ^s

Chl^r/Chl^s= resistente/sensible a clorato. Rif^r/Rif^s= resistente/sensible a rifampicina. Km^r/Km^s= resistente/sensible a kanamicina. Nas⁺/Nas⁻= Con/sin actividad nitrato reductasa inducible. Nis⁺/Nis⁻= Con/sin actividad nitrito reductasa inducible. Nas^c/Nis^c= Con actividad nitrato/nitrito reductasa constitutiva.

3.1.2.2. Actividades enzimáticas de mutantes de ICR

Los mutantes AS30, AS36 y AS61, obtenidos anteriormente por mutagénesis con ICR (Luque, 1987), se transformaron con ADN de la estirpe UW136 y se seleccionaron transformantes Nif⁺. En estas nuevas estirpes, denominadas respectivamente AS236, AS237 y AS238, se midieron actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa tras cultivarlas en presencia y ausencia de nitrato (tabla VII). Se observó que AS237 presentaba el mismo fenotipo que los mutantes Nas⁻ Nis^c obtenidos con Tn5 y descritos en el apartado anterior (tabla VI).

En la tabla VIII se resumen los fenotipos de los mutantes tanto de Tn5 como de ICR.

3.1.3. Hibridaciones con sonda de Tn5

Con objeto de caracterizar mejor los mutantes y de saber si las diferentes mutaciones se localizaban en la misma o diferentes regiones del cromosoma de *Azotobacter*, se procedió a hibridar una sonda de Tn5 contra el ADN de los mutantes cortado con diferentes enzimas.

3.1.3.1. Obtención de la sonda

Se empleó un fragmento *PstI* de 0,9 kb interno al gen de la resistencia a kanamicina de Tn5 (figura 12). Este fragmento se obtuvo cortando el ADN de pUC4kixx con *PstI*, separando los fragmentos por electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión y cortando el fragmento de gel adecuado. La sonda se marcó por métodos no radioactivos según se indica en Materiales y Métodos.

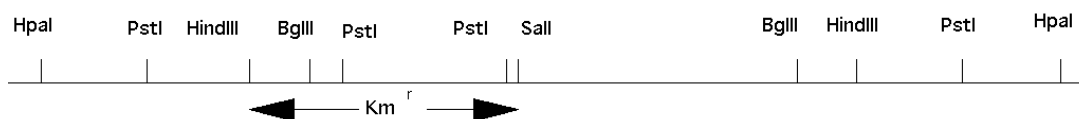


Figura 12. Mapa de restricción de Tn5

3.1.3.2. Preparación de los filtros

Se aisló ADN de cada mutante y se cortó con varios enzimas sin diana en Tn5: *EcoRI*, *ClaI*, *ApaI* y *KpnI*. Este ADN se sometió a electroforesis en gel de agarosa y se tiñó con bromuro de etidio para posteriormente transferirlo a filtros de nailon (ver Materiales y Métodos).

3.1.3.3. Hibridaciones

Se utilizó la sonda de Tn5 para detectar la presencia del transposón en el ADN total de los mutantes. Se empleó también ADN del bacteriófago λ marcado no radioactivamente con objeto de identificar los marcadores de peso molecular empleados en la electroforesis y así determinar con facilidad los pesos moleculares de los fragmentos que hibridaran con Tn5. En la figura 13 se muestra la separación mediante electroforesis de los fragmentos de ADN total cortado con *EcoRI* de algunos mutantes y la subsiguiente hibridación. En la figura 14 se presenta el resultado de la hibridación tras cortar el ADN total con *ClaI*. Igual se hizo con *ApaI* y *KpnI* y con los demás mutantes. Los tamaños aproximados de los fragmentos que hibridaron, incluyendo a Tn5, que tiene unas 5,8 kb, se presentan en la tabla IX.

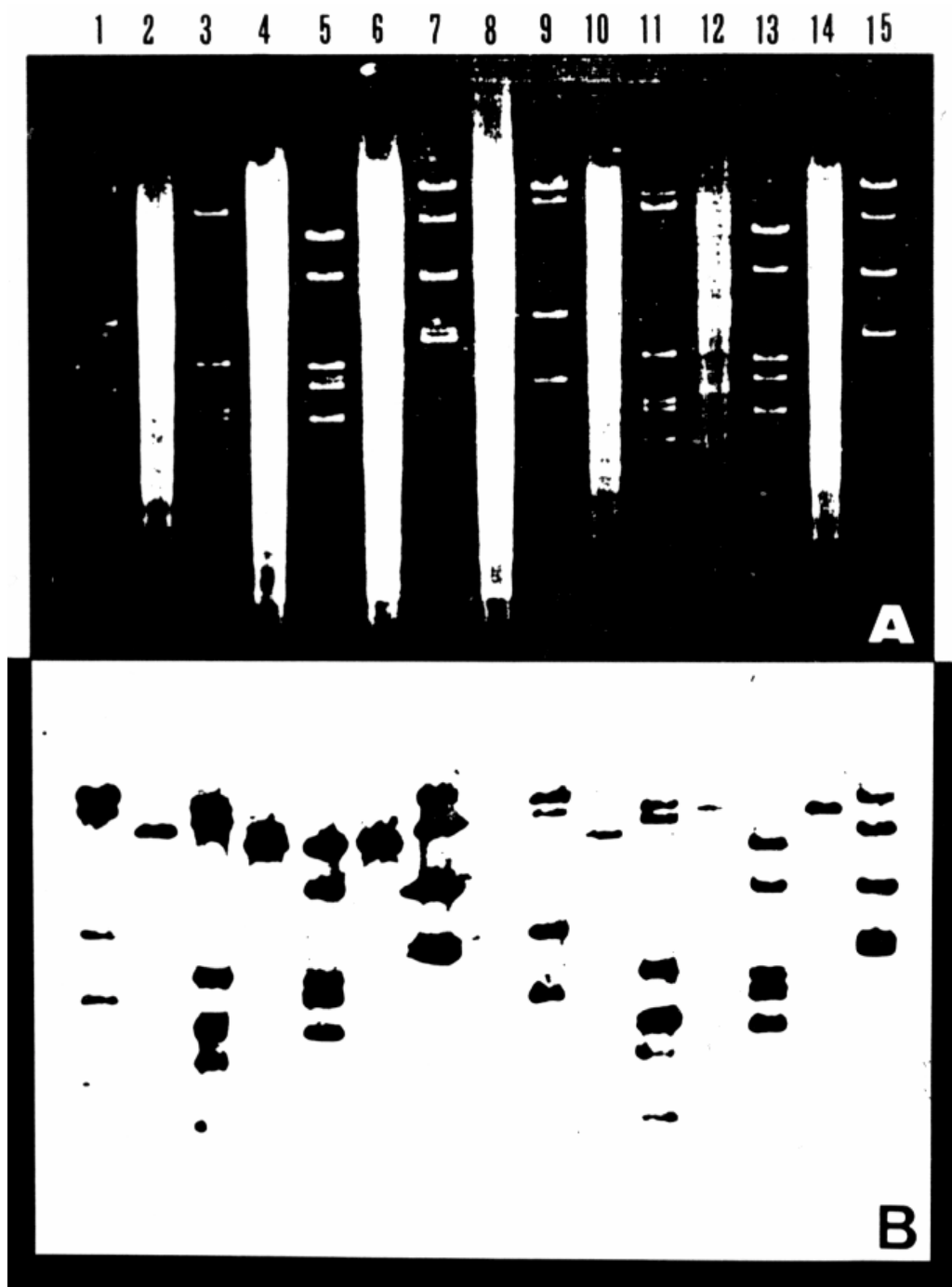
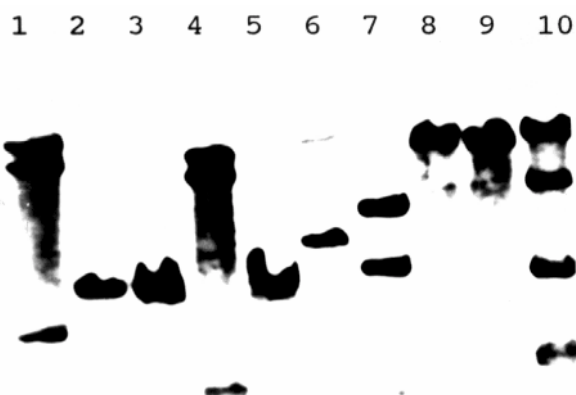


Figura 13. Experimento de hibridación tras cortar con *EcoRI*

13a: Electroforesis en gel de agarosa. Los carriles impares contienen marcadores de peso molecular obtenidos a partir de ADN del fago λ cortado con diferentes enzimas de restricción: 1 y 9 = *Hind* III, 3 y 11 = *Eco* RI, 5 y 13 = *Bam* HI, 7 y 15 = *Sma* I (ver Materiales y Métodos para los pesos moleculares). Los carriles pares contienen ADN total de varias estirpes cortado con *Eco* RI: 2 = *nas-1*, 4 = *nas-2*, 6 = *nas-3*, 8 = UW136, 10 = *nas-4*, 12 = *nas-5*, 14 = *nas-6*.
 13b: Resultado de la hibridación ADN-ADN sobre filtro de nailon correspondiente al gel de la figura 14a. Como sonda se empleó un fragmento de ADN de Tn5 y ADN de λ marcados por un método no radioactivo (ver Materiales y Métodos).



Resultado de la hibridación sobre nailon. Contenido de los carriles: 1, 4, 7, 10 = λ cortado con diferentes enzimas (*Hind* III, *Eco* RI, *Bam* HI y *Sma* I); 2, 3, 5, 6, 8 y 9 = ADN de los mutantes cortado con *Cla* I (*nas-1*, *nas-2*, *nas-3*, *nas-4*, *nas-5* y *nas-6*). Se utilizaron las mismas sondas que en la figura anterior. Para el ADN de λ sólo se muestran las bandas superiores, que sirvieron para determinar el peso molecular de las bandas de hibridación de Tn5 (tabla XII).

Figura 14. Cortes con *Cla*I e hibridación

Estos resultados nos permitieron separar a los mutantes $\text{Chl}^r \text{Nas}^- \text{Nis}^{+/c}$ en cuatro grupos por estar en fragmentos cromosómicos diferentes: el primer locus incluye a la mutación *nas-1*; el segundo a las mutaciones *nas-2* y *nas-3*; el tercero incluye a *nas-4* y el cuarto a *nas-5* y *nas-6*. Para los

Tabla IX. Bandas de hibridación con una sonda interna al gen de resistencia a kanamicina de Tn5

ESTIRPE ^a	<i>Eco</i> RI ^b	<i>Cla</i> I ^b	<i>Apa</i> I ^b	<i>Kpn</i> I ^b
AS249	19	11	16	28
AS250	17	11	-	-
AS251	17	11	28	7
AS252	19	15	12	-
AS253	23	28	7,5	7,5
AS254	23	28	7,5	-
AS255	17	11	-	-
AS257	12	11	-	-

a. Estirpes a las que se aisló ADN total. b. Enzimas, que no cortan en Tn5, con los que se cortó el ADN total; los valores se dan en kilobases e incluyen a Tn5.

estudios posteriores se continuó con un mutante de cada grupo: AS249 (*nas-1*), AS251 (*nas-3*), AS252 (*nas-4*) y AS253 (*nas-5*) (y sus versiones *Nif⁻*).

El mutante AS255, de fenotipo *Chl^r Nas⁻ Nis⁻*, se podía incluir en el grupo de *nas-3* mientras que el AS257, *Nas^c Nis⁻*, difería del patrón de hibridación de este grupo en el fragmento *EcoRI* pero coincidía en el *ClaI*.

3.1.4. Otros experimentos

3.1.4.1. Complementación con pLV50

Al mutante AS256 (*Chl^r Nas⁻ Nis⁻*) se le introdujo por conjugación el plásmido pLV50, que lleva los genes *ntrB* y *ntrC* de *A. vinelandii* con objeto de saber si estaba afectado en alguno de los genes reguladores conocidos. Sin embargo AS256/pLV50 era incapaz de crecer en cajas con nitrato como única fuente de nitrógeno.

3.1.4.2. Transformaciones con ADN total

Experimentos anteriores de transformación (Luque, 1987) determinaron la existencia de un fuerte ligamiento entre las mutaciones responsables de los fenotipos *Nis⁻* y *Nas⁻* de las estirpes AS30 y AS36, respectivamente. Con objeto de comprobar si alguna de las mutaciones *Nas⁻* de Tn5 estaba ligada a la mutación *Nis⁻* de AS30, se procedió a aislar ADN de los mutantes de Tn5 *nas-1*, *nas-3*, *nas-4* y *nas-5* y a transformar con este ADN a la estirpe AS30. Lo mismo se hizo con el mutante AS36 usando ADN del mutante *nas-8*. Los transformantes se seleccionaron en medio mínimo con amonio y kanamicina para detectar el paso del transposón. Se replicaron 100 colonias de cada transformación a cajas de medio mínimo suplementado con clorato+amonio, o nitrito (tabla X). Los resultados indican que la mutación *nas-3* se encuentra ligada a la mutación de AS30 y el resto no lo está, y que, recíprocamente, *nas-8* está

ligada a AS36.

Tabla X. Fenotipo de los transformantes obtenidos a partir de AS30 y AS36 con ADN de los mutantes de Tn5

ORIGEN ADN	RECEPTOR	NIS ⁺	NIS ⁻	CHL ^R	KM ^R
AS243	AS30	0	100	100	100
AS244	AS30	100	0	100	100
AS245	AS30	100	0	100	100
AS246	AS30	0	100	100	100
AS247	AS30	0	100	100	100
AS248	AS30	0	100	100	100
AS258	AS36	0	100	0	100

Se transformó AS30 o AS36 con ADN de cada una de las estirpes mencionadas y se seleccionaron transformantes en cajas con kanamicina. Se picaron 100 transformantes de cada a cajas de medio mínimo suplementadas con nitrito o con clorato + amonio (0,2 g/l).

3.1.5. Discusión

En este capítulo nos hemos centrado en la obtención de mutantes de Tn5 afectados en la asimilación de nitrato. Nos interesaba especialmente obtener mutantes afectados en cada uno de los dos pasos de la ruta por separado (la reducción del nitrato y la reducción del nitrito) con objeto de tocar los genes estructurales del sistema y no genes reguladores que, probablemente, afectarían a ambos pasos simultáneamente puesto que los genes responsables están corregulados (Luque *et al.*, 1987). La obtención de mutantes estructurales era muy importante para hacer frente al objetivo principal de la tesis: la clonación de los genes estructurales y el estudio de la existencia o no de un operón. Estos objetivos se abordan en

el siguiente capítulo.

Poseíamos ya mutantes presuntamente estructurales conseguidos mediante mutagénesis con ICR pero necesitábamos mutaciones asociadas a un carácter fácilmente seleccionable (Km^r) con objeto de abordar con garantías de éxito la clonación de los genes correspondientes. Como vector de Tn5 usamos pGS9 (Selvaraj e Iyer, 1983). Este plásmido es Tra^+ y puede transferirse a *Azotobacter* por conjugación pero no es capaz de replicarse porque su origen de replicación es ColE1 (específico de enterobacterias). La eficacia de este sistema de mutagénesis en *Azotobacter* había sido probada ya por Contreras de Vera (1986). Nosotros pudimos comprobar una correlación del 100% entre la resistencia a Km aportada por el transposón y el fenotipo no asimilador de nitrato de nuestros mutantes.

El hecho de que se obtuvieran mutantes tanto Nas^+ Nis^- como Nas^- Nis^+ parecía estar en contra de la existencia de un operón que incluyera a los dos genes estructurales ya que era de esperar que las inserciones de Tn5 en uno de los genes fueran polares sobre el otro. Sin embargo, el estudio de las actividades enzimáticas (tabla VI) indica que hay una desregulación de la nitrato reductasa en el mutante Nis^- y de la nitrito reductasa en el mutante Nas^- . La razón de esta desregulación podía estar en el propio Tn5. Berg *et al.* (1980) describen como inserciones de este transposón en el operón *lac* de *E. coli* pueden dar lugar a expresión constitutiva de genes pertenecientes a la misma unidad transcripcional. Al parecer ciertas regiones situadas en las IS50 de los extremos del transposón pueden ejercer actividad promotora. No obstante, esto sólo podría explicar, en nuestro caso, la constitutividad de uno de los dos genes (dependiendo del orden de transcripción relativo). La clave en este caso está en los mutantes de ICR: AS237 es Nas^- Nis^c mientras AS236 es Nas^+ Nis^- . La mutación *Nis* no es suficiente para provocar constitutividad en *Nas* y por consiguiente concluimos que ésta se debe a que una de las IS50 del Tn5 insertado en el gen de

la nitrito reductasa en el mutante AS257 (*nas-8*) actúa de promotor del gen de la nitrato reductasa. Esto viene a apoyar la existencia de un operón al que pertenecerían ambos genes y en el que el gen de la nitrito reductasa se transcribiría delante del de la nitrato reductasa.

La constitutividad de la nitrito reductasa en los mutantes AS249, AS250, AS251, AS253 y AS254 requiere otra explicación ya que AS237 presenta el mismo fenotipo sin llevar inserción de transposón alguna. La hipótesis que nos parece más plausible es la de que la nitrato reductasa esté ejerciendo, bien directamente bien a través de un intermedio, una función de represión sobre el promotor de la nitrito reductasa que se liberaría en presencia de nitrato. La eliminación del enzima por mutación haría constitutiva la transcripción desde el promotor de la nitrito reductasa. En el próximo capítulo se darán pruebas adicionales a favor de esta hipótesis y se discutirá más ampliamente.

Las hibridaciones con la sonda de Tn5 nos han permitido separar los mutantes *Nas⁻* en cuatro loci. No es de extrañar que existan varios genes necesarios para la actividad nitrato reductasa e innecesarios para la nitrito reductasa puesto que, en todos los organismos en que se ha estudiado, además del gen del apoenzima existen otros necesarios para la síntesis y ensamblaje del cofactor de molibdeno, que debe unirse al apoenzima para que este sea activo.

En todo caso, nos interesaba principalmente distinguir el gen estructural del apoenzima de los otros. El hecho de que las actividades nitrato y nitrito reductasa estuviesen correguladas y otros datos como el de la constitutividad de la nitrato reductasa al poner Tn5 en el gen de la nitrito reductasa nos hacían pensar en un operon que incluyera a los genes estructurales de ambos apoenzimas. Ya se había determinado anteriormente la proximidad entre las mutaciones de AS30 (AS236) y AS36 (AS237) (Luque, 1987) por tanto ahora tratamos de saber si alguna de las mutaciones *Nas⁻*

de Tn5 se encontraba cerca de la mutación Nis⁻ de AS30. Con los datos de la tabla X queda claro que la mutación de AS253 (*nas-3*) está cerca de la de AS30 a diferencia del resto. Aquí estaba por tanto el mejor candidato a ser el gen estructural del apoenzima nitrato reductasa. También se comprobó que la mutación de AS257 (*nas-8*) se encontraba ligada a la de AS36, es decir, probablemente afectaba al mismo gen que la mutación de AS30.

El mutante AS256 (Nas⁻ Nis⁻ de Tn5) no se complementa con pLV50 (*glnAntrBC* de *Azotobacter vinelandii*). Luque Vázquez (1987) había comprobado previamente lo mismo con el mutante AS61 (Nas⁻ Nis⁻ de ICR). Podía tratarse pues de mutaciones en un gen regulador diferente a los conocidos o de mutaciones con efecto polar en el presunto operón de los genes estructurales. Esta cuestión se aclarará más adelante.

3.2. CLONACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA ASIMILACIÓN DE NITRATO

3.2.1. Construcción de una genoteca de *A. vinelandii* en el fago λ -GEM12

Con el fin de aislar genes necesarios para la asimilación de nitrato en *Azotobacter vinelandii* se construyó una genoteca de ADN genómico de esta bacteria en el bacteriófago λ -GEM12. El procedimiento seguido se explica en Materiales y Métodos.

Se infectó con 1 μ l de la mezcla de fagos de la genoteca a la estirpe de *E. coli* KW251, como se indica en Materiales y Métodos, y se sembró en placas de medio Luria suplementado con 10 mM de $MgSO_4$, para ello se utilizó agar de cobertera con 10 mM de $MgSO_4$. Se obtuvieron 31 unidades formadoras de placas (u.f.p.). En la mezcla había un total de 1200 μ l y por tanto unas 37000 u.f.p.. A 7 u.f.p. escogidas al azar se les aisló ADN y se cortó con *Eco* RI. El tamaño del ADN clonado estaba dentro de los límites esperados.

Para tener una probabilidad del 99,99% de encontrar un gen determinado se requería analizar 1800 u.f.p., según se deduce de la fórmula 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 determinado y f es la fracción de ADN del organismo que va en cada fago recombinante.

3.2.2. Obtención de sondas

La clonación de fragmentos de ADN adyacentes a los Tn5 responsables de las mutaciones obtenidas en el apartado 3.1 era el paso previo para la búsqueda en la

genoteca de genes necesarios para la asimilación de nitrato.

En todos los casos se utilizó como vector el plásmido pTZ19R (figura 15). Este plásmido tiene un tamaño de 2,9 kb, se replica en *E. coli* y lleva un gen que confiere resistencia a ampicilina. Posee una zona con múltiples dianas

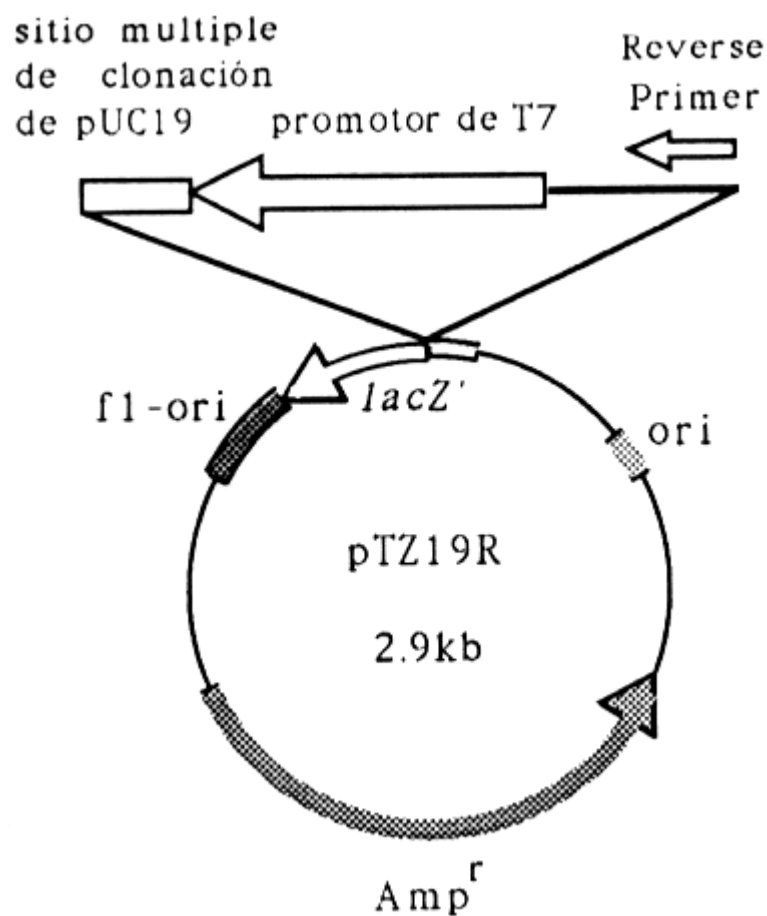


Figura 15. Mapa de pTZ19R. Las dianas de restricción de pUC19 son: *Eco* RI, *Sac* I, *Kpn* I, *Sma* I, *Bam* HI, *Xba* I, *Sal* I, *Pst* I, *Sph* I y *Hind* III

de restricción únicas que procede de pUC19. Estos sitios únicos son muy apropiados para la clonación puesto que se encuentran tras el promotor del gen *lacZ'*. El plásmido pTZ19R da color azul en un medio con X-gal e IPTG cuando se encuentra en la estirpe adecuada, en este caso *E. coli* 71-18, sin embargo las colonias portadoras de pTZ19R con un fragmento exógeno clonado entre el promotor de *lac* y el fragmento *lacZ'* presentan color blanco en X-gal, lo que permite una fácil identificación.

Para la clonación de los fragmentos que se utilizarían como sondas se contaba con un método de selección directa: la resistencia a kanamicina conferida por Tn5.

3.2.2.1. Obtención de una sonda a partir de AS251

La mutación *Nas⁻* de AS251 (*nas-3*) se encontraba ligada a la *Nis⁻* de AS30 y por tanto era interesante obtener una sonda a partir de esta mutación que permitiera la búsqueda de los genes presuntamente estructurales de la nitrato y la nitrito reductasas.

El primer intento se hizo cortando el ADN total de la estirpe AS251 con *Eco* RI, ligándolo a pTZ19R cortado con el mismo enzima, transformando la estirpe 71-18 de *E. coli* y seleccionando los transformantes en medio rico con kanamicina. No se obtuvo ningún transformante, probablemente debido al gran tamaño de la banda que se pretendía clonar (ver figura 13 y tabla IX).

Tras varios intentos se decidió emplear el enzima *Sal* I. Este enzima corta en una zona central dentro de Tn5 pero deja intacto el gen de resistencia a kanamicina (figura 12). En primer lugar se hizo una hibridación contra el ADN del mutante cortado con *Sal* I empleando la misma sonda interna al gen de resistencia a kanamicina de

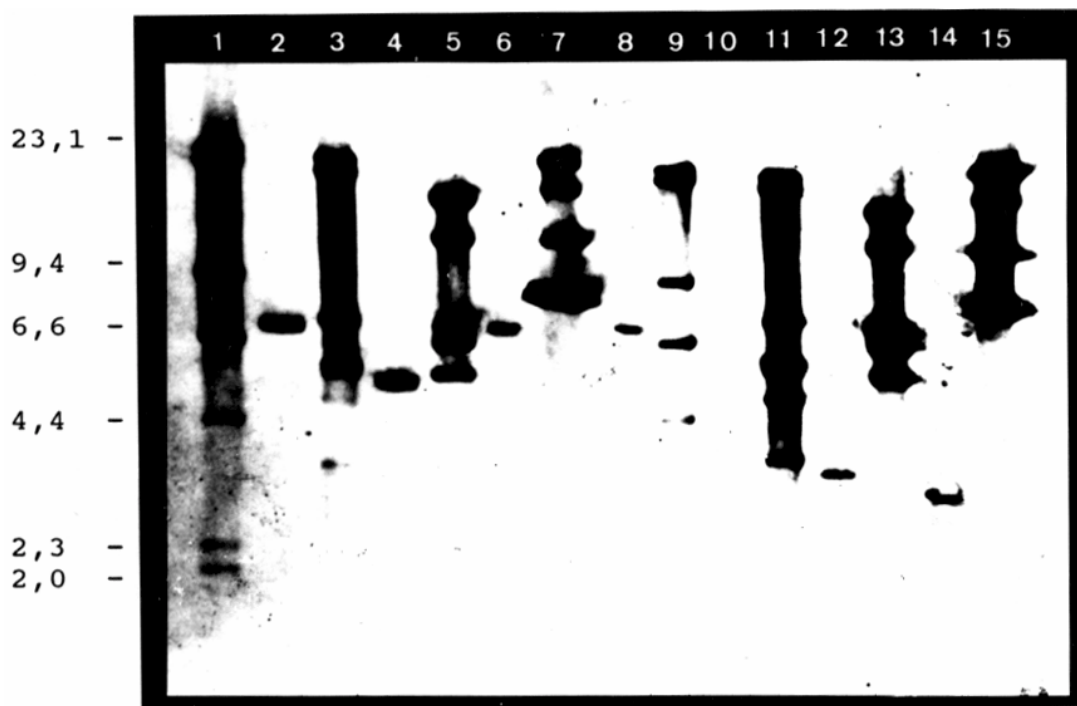


Figura 16. Hibridación con sonda de Tn5 tras cortar el ADN cromosómico con *Sal* I

Resultado de la hibridación ADN-ADN sobre filtro de nailon. Como sonda se empleó un fragmento de ADN de Tn5 y ADN de λ marcados por un método no radioactivo. Los carriles impares llevan marcadores de peso molecular idénticos a los de la figura 13. Los pares llevan ADN cromosómico de varias estirpes cortado con *Sal* I: 2 = *nas-1*, 4 = *nas-2*, 6 = *nas-3*, 8 = *nas-4*, 10 = UW136, 12 = *nas-5* y 14 = *nas-6*. Los tamaños de las bandas de ADN cromosómico que hibridan en cada caso se muestran en la tabla XI. Se indican al margen los tamaños de algunos de los marcadores en kb.

Tn5 que se usó en el apartado 3.1. Los resultados (figura 16, tabla XI) indican que, con *Sal* I, se podía clonar una banda de unas 6,7 kb (mucho menor que la de *Eco* RI) que contendría unas 2,7 kb de Tn5 (incluyendo el gen de

resistencia a kanamicina) y unas 4 kb de ADN cromosómico de *Azotobacter vinelandii*. La estirpe *nas-2* da una banda diferente a la de *nas-3* a pesar de estar ambas mutaciones en los mismos fragmentos *Eco* RI y *Cla* I.

Esto se debe a que *Sal* I corta dentro de Tn5 y por tanto, para distintas inserciones dentro de un

mismo fragmento, da diferentes bandas dependiendo de la distancia del Tn5 a la diana *Sal* I de *Azotobacter* y de la orientación concreta de cada inserción, teniendo en cuenta que solamente se detecta la parte de Tn5 que lleva el gen de resistencia a Km debido a la sonda empleada.

Tabla XI. Bandas de hibridación que se deducen de la figura 16

ESTIRPES	Sal I
<i>nas-1</i>	7
<i>nas-2</i>	5
<i>nas-3</i>	6,7
<i>nas-4</i>	6,8
<i>nas-5</i>	3,5
<i>nas-6</i>	3

Los datos de la segunda columna se dan en kilopares de bases e incluyen un fragmento de Tn5 de 2,7 kb.

Para la clonación del fragmento de *nas-3* se cortó el ADN total de la estirpe AS251 y ADN de pTZ19R con *Sal* I, se ligó con la ligasa de T4 y se transformó la estirpe 71-18 de *Escherichia coli*. Los transformantes se seleccionaron en cajas de medio Luria con kanamicina y se recomprobó en cajas con ampicilina y kanamicina. Se obtuvieron tres transformantes. Se hizo una minipreparación de ADN plasmídico de cada transformante. Una parte de cada minipreparación se cortó con *Sal* I y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (figura 17). En los tres casos aparecen las dos bandas que se esperaban: la de 2,9 kb de pTZ19R y la de 6,7 kb del inserto. Para posteriores experimentos se escogió uno de los tres plásmidos obtenidos y se denominó pRM3.

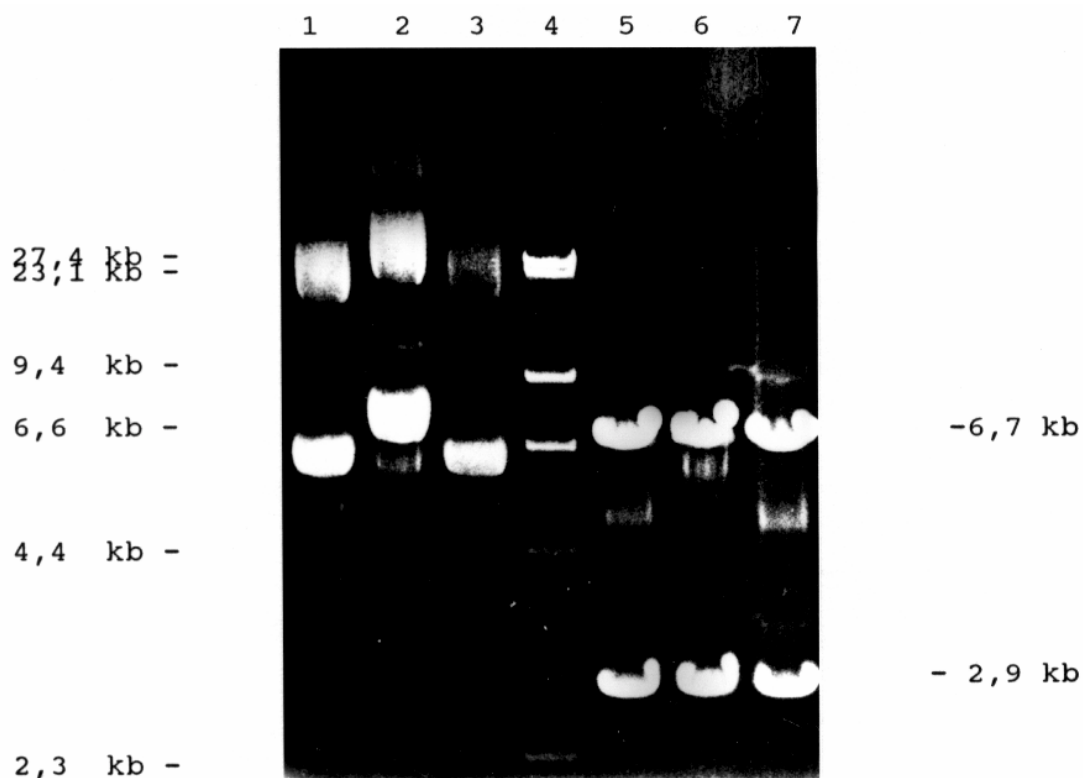
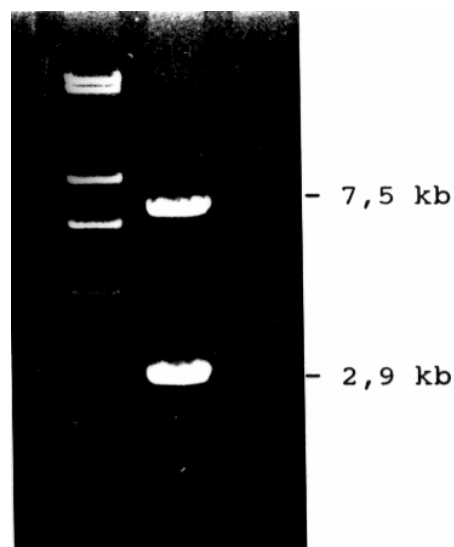


Figura 17. Electroforesis de los plásmidos obtenidos en el apartado 3.2.2.1 sin cortar (carriles 1-3) y cortados con *Sal* I (carriles 5-7). El carril central lleva λ cortado con *Hind* III. Los marcadores se indican a la izquierda

3.2.2.2. Obtención de una sonda a partir de AS253

Para el resto de las mutaciones que conferirían fenotipo $Nas^- Nis^{+/c}$ se siguió un procedimiento similar: cortes con *Sal* I, ligamiento con pTZ19R, transformación y selección en kanamicina. Sin embargo sólo se tuvo éxito con la mutación de AS253 (*nas-5*) y empleando el corte *Kpn* I. Con este enzima se obtuvo una banda de 7,5 kb que contenía a Tn5 entero (tabla IX). Por tanto la banda clonada llevaba aproximadamente 1,7 kb de ADN cromosómico de *Azotobacter vinelandii* repartido entorno a las 5,8 kb del Tn5 responsa-

ble de la mutación de AS253. El plásmido obtenido se empleó en experimentos de búsqueda en la genoteca y se denominó pRM5. En la figura 18 se muestran las bandas que se obtienen al cortar este plásmido con *Kpn* I.



3.2.3. Demostración de la existencia de un operón

3.2.3.1. Transformaciones con pRM3

Las versiones Nif^- de los ocho mutantes obtenidos en el apartado 3.2 y de los tres mutantes de ICR ya mencionados de que disponíamos se transformaron con ADN de pRM3. Los transformantes se seleccionaron en medio mínimo de Burk suplementado con nitrato. Los resultados (obtención o no de transformantes) se muestran en la tabla XII. Se deduce que pRM3 lleva una región de ADN capaz de corregir las mutaciones Nis^- (AS30 y AS258), las Nas^- de AS36 y AS244 y la $Nas^- Nis^-$ de AS256. Se confirma así el ligamiento de las estirpes AS30, AS36, AS258 (*nas-8*) y AS244 (*nas-3*) según se había determinado antes (tabla X).

Figura 18. Electroforesis del plásmido pRM5 cortado con *Kpn* I. El carril izquierdo lleva ADN de λ cortado con *Hind* III

3.2.3.2. Mapa de restricción de pRM3

El plásmido pRM3 se sometió a cortes con diferentes endonucleasas de restricción. Esto nos permitió conocer la orientación, de las dos posibles, en que se había clonado el fragmento y elaborar el mapa que se presenta en la figura 19. Los enzimas empleados fueron: *Bam* HI, *Bgl* II, *Eco* RI, *Hind* III, *Kpn* I, *Sal* I, *Sma* I y *Xho* I. Se utiliza-

ron cortes simples con cada uno de estos enzimas y dobles. Es interesante hacer notar que en la parte correspondiente a ADN cromosómico de *Azotobacter* no hay cortes *Hind* III ni *Bam* HI, y hay puntos de corte únicos para *Xho* I y *Bgl* II.

Tabla XII. Transformaciones con pRM3

ESTIRPE	TRANSFORMANTES
AS243 (<i>nas-1</i>)	-
AS244 (<i>nas-2</i>)	+
AS245 (<i>nas-3</i>)	-
AS246 (<i>nas-4</i>)	-
AS247 (<i>nas-5</i>)	-
AS248 (<i>nas-6</i>)	-
AS256 (<i>nas-7</i>)	+
AS258 (<i>nas-8</i>)	+
AS30	+
AS36	+
AS61	-

Las estirpes de la primera columna se transformaron con ADN de pRM3 y la transformación se sembró en cajas de medio mínimo con nitrato. + indica aparición de transformantes; - indica no aparición de transformantes.

3.2.3.3. Construcción de derivados de pRM3

Se construyeron dos nuevos plásmidos a partir de pRM3 que se emplearían en los experimentos de los apartados siguientes.

El plásmido pPN2 se obtuvo reclonando el fragmento *Hind* III de unas 5,7 kb de pRM3 en pTZ19R (figura 20). Con esto se consiguió un plásmido con un solo punto de corte *Bgl* II, ya que se pierde el de Tn5.

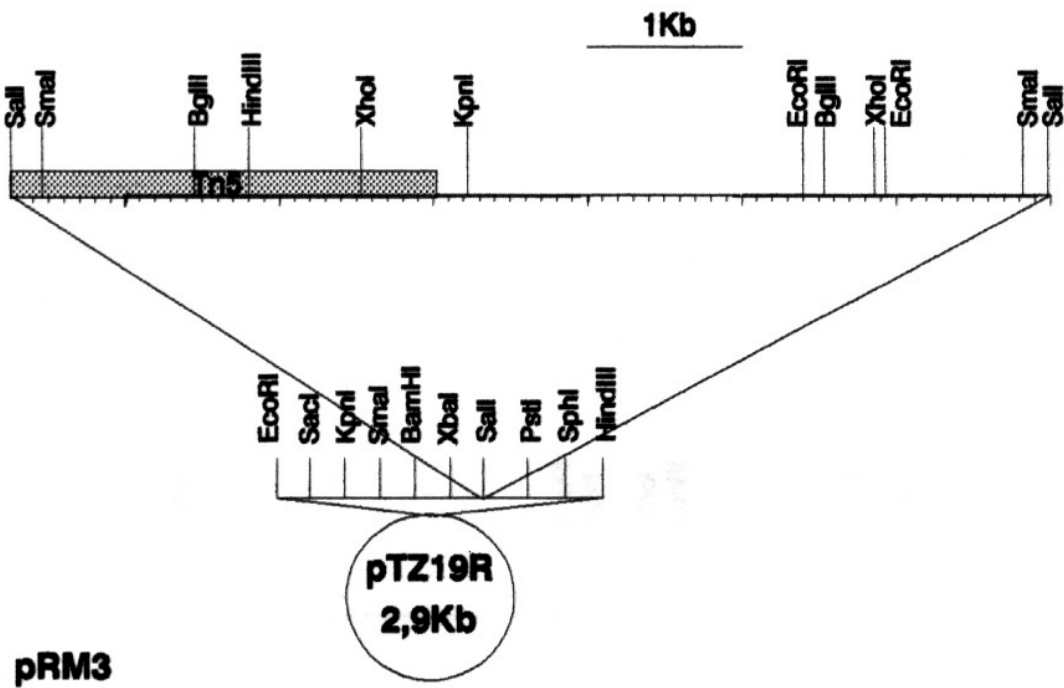


Figura 19. Mapa de restricción de pRM3

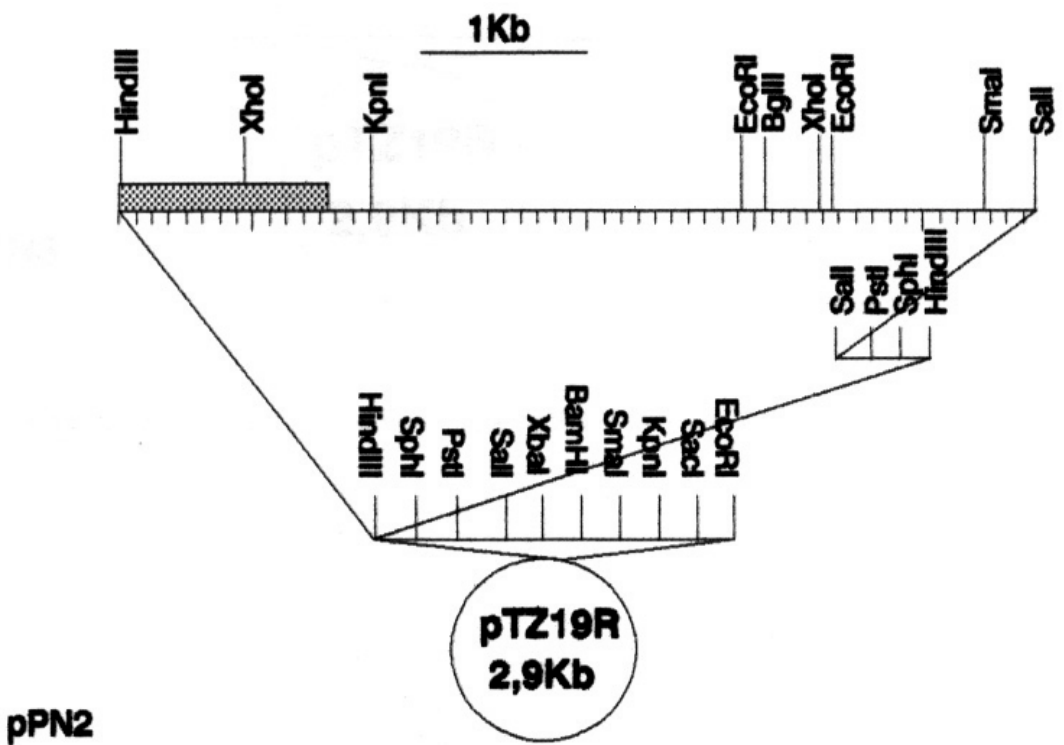


Figura 20. Mapa de restricción de pPN2

El plásmido pPN3 (figura 21) se obtuvo delecionando un fragmento *Kpn* I de pRM3 mediante corte con el enzima y recircularización con la ligasa de T4. Este nuevo plásmido llevaba únicamente ADN de *A. vinelandii* clonado en pTZ19R.

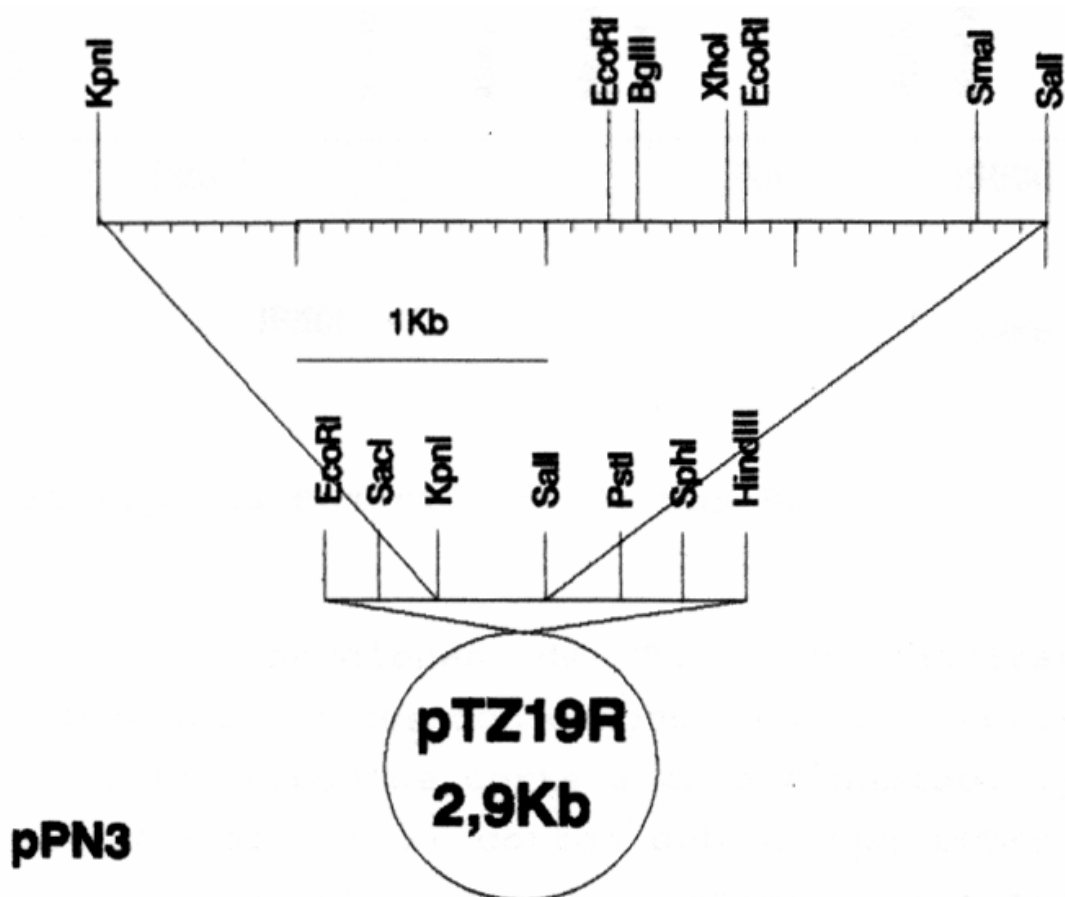


Figura 21. Mapa de restricción de pPN3

3.2.3.4. Mutagénesis de pPN3

El plásmido pPN3 se mutagenizó con un derivado de Tn5 denominado Tn5-B20 (figura 22). Este transposón lleva clonado en su extremo el gen *lacZ* de *Escherichia coli* sin

promotor y por tanto es muy apropiado para lograr fusiones *lac* transcripcionales al azar. La mutagénesis se realizó usando como vector el bacteriófago λ y como fondo genético la estirpe S17-1 de *E. coli*, tal como se detalla en Materiales y Métodos.

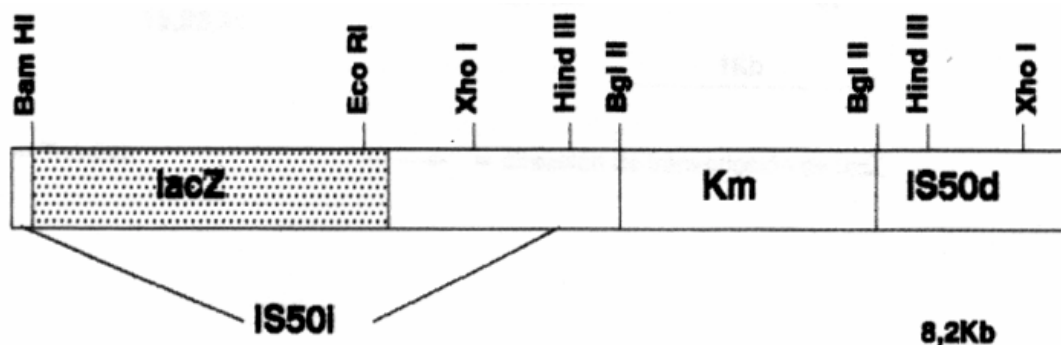


Figura 22. Mapa de restricción de Tn5 B20

Las inserciones de Tn5 B20 resultantes se mapearon mediante cortes con endonucleasas de restricción. Se hicieron dos tipos de corte a cada plásmido: 1) cortes dobles *Eco* RI+*Sal* I y 2) cortes dobles *Kpn* I+*Bam* HI. Con los resultados de estos cortes sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y el estudio de los mapas de restricción de pPN3 (figura 21) y Tn5 B20 (figura 22) fue posible saber si las inserciones estaban en el vector plasmídico (pTZ19R) o en el ADN de *A. vinelandii* clonado en pPN3. También se pudo determinar la posición aproximada de las inserciones y la orientación del gen *lacZ*.

De 49 plásmidos analizados, en los que se presumía la presencia de una inserción del transposón, 17 no llevaban inserción, 14 la llevaban en la parte de pPN3 correspondiente a pTZ19R y 18 en el ADN de *A. vinelandii* clonado en pPN3. La situación de estas 18 inserciones se detalla en la figura 23. Hay varias coincidentes por lo que

trabajamos sólo con 9 diferentes.

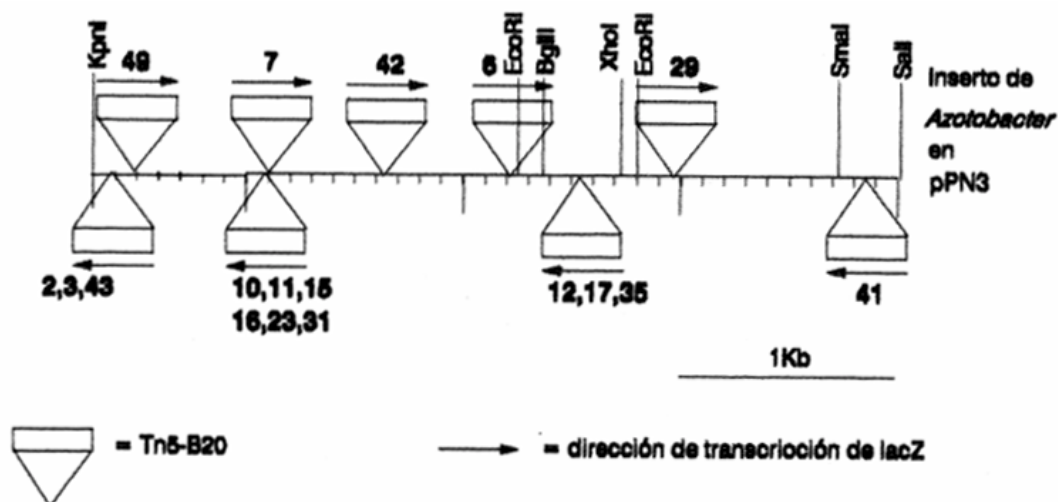


Figura 23. Mapeo de las inserciones de Tn5 B20 en pPN3

Los plásmidos correspondientes se denominaron pFUS2, pFUS6, pFUS7, pFUS10, pFUS12, pFUS29, pFUS41, pFUS42 y pFUS49.

3.2.3.5. Estudio de las fusiones *lac* en *A. vinelandii*

Con los plásmidos obtenidos en el apartado anterior se transformó a las estirpes UW136 y UW6Rif^r de *Azotobacter vinelandii*. Se seleccionó la resistencia a kanamicina aportada por el transposón y se probó la resistencia a ampicilina del vector plasmídico. Este vector no se replica en *Azotobacter* y por tanto la resistencia a ampicilina sólo puede conservarse por integración del plásmido tras un hecho simple de recombinación entre el ADN de la estirpe receptora y el ADN clonado en el plásmido. Con seis de las fusiones fue fácil obtener estirpes resistentes a kanamicina y sensibles a ampicilina en las que se había producido la integración de Tn5 por dos hechos

de recombinación del ADN circundante y la consiguiente pérdida del vector plasmídico. Con las otras tres fusiones (2, 41 y 49) sólo se obtuvieron estirpes resistentes a ambos antibióticos, es decir, integraciones del plásmido completo. Esto se debió, sin duda, a que, en los tres casos, el transposón se encontraba muy próximo al extremo del ADN clonado de *Azotobacter* y sólo se produjo un hecho de recombinación. Estas tres fusiones, que de todas formas eran interesantes de estudiar, se esquematizan en la figura 24. En estos casos hay que tener en cuenta que existe una copia mutante y otra silvestre de los genes implicados y en el caso de las fusiones 2 y 49 el promotor de *lac* presente en pTZ19R puede dar lugar a transcripción del gen de la nitrato reductasa.

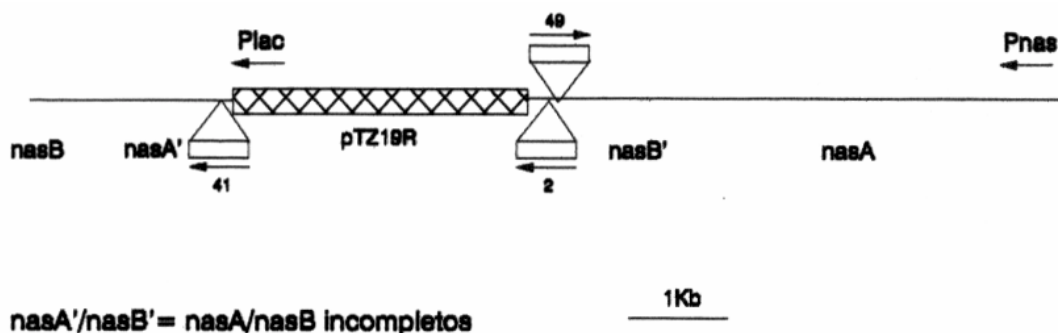


Figura 24. Integración de pFUS2, pFUS41 y pFUS49 en el ADN de *A. vinelandii*. Al gen de la nitrato reductasa se le denomina *nasB* y al de la nitrito reductasa *nasA* (seguir texto, más adelante)

En el caso de las fusiones obtenidas en la estirpe UW6r, incapaz de fijar nitrógeno, se replicaron colonias aisladas de cada estirpe a cajas de medio mínimo de Burk suplementado con: nitrato, nitrito, clorato+amonio o amonio, y se observó el crecimiento en cada caso (tabla XIII).

Tabla XIII. Crecimiento en medio mínimo suplementado con distintas fuentes de nitrógeno o clorato de los mutantes de Tn5 B20

ESTIRPE	CRECIMIENTO EN MEDIO SÓLIDO			
	NITRATO	NITRITO	CLORATO + AMONIO	AMONIO
UW6r	+	+	-	+
UW6rFUS2	+	+	-	+
UW6rFUS6	-	-	-	+
UW6rFUS7	-	-/+	+	+
UW6rFUS10	-	-/+	+	+
UW6rFUS12	-	-	-	+
UW6rFUS29	-	-	-	+
UW6rFUS41	+	+	-	+
UW6rFUS42	-	-/+	+	+
UW6rFUS49	+	+	-	+

En las fusiones obtenidas en el fondo genético de UW136, fijadora de nitrógeno, se estudiaron las actividades nitrato reductasa, nitrito reductasa y β -galactosidasa (tabla XIV).

Se observa como todas las inserciones provocan falta de crecimiento en nitrato, excepto las que llevan integrado el plásmido completo, ya que estas llevan una copia mutante y otra silvestre del ADN de *Azotobacter*. Unas afectan a la nitrato reductasa, otras a la nitrito reductasa y otras a ambas. Las fusiones 6, 12, 29 y 41 ponen

constitutiva la actividad nitrato reductasa, posiblemente por la introducción de un promotor presente en el extremo de Tn5, confirmando los datos del mutante AS258 (apartado 3.1). En las fusiones 2 y 49 también hay constitutividad de la nitrato reductasa, aunque esta se debe, probablemente al promotor de *lac* que se ha introducido por integración de pTZ19R.

Tabla XIV. Actividades enzimáticas con las diferentes fusiones *lac*

ESTIRPE	NITRATO REDUC-TASA		NITRITO REDUC-TASA		β -GALACTOSIDASA	
	-NO ₃ ⁻	+NO ₃ ⁻	-NO ₃ ⁻	+NO ₃ ⁻	-NO ₃ ⁻	+NO ₃ ⁻
UW136	0,8	13,7	4,0	26,6	4	7
UW136FUS2	11,3	10,6	2,5	22,4	19	140
UW136FUS6	10,2	12,5	0	0	10	70
UW136FUS7	0,2	0,3	3,5	3,8	13	16
UW136FUS10	0,2	0,2	5,8	8,8	405	350
UW136FUS12	11,8	18,2	0	1,0	40	307
UW136FUS29	13,9	16,3	1,6	1,7	78	60
UW136FUS41	11,2	10,9	4,1	25,3	718	733
UW136FUS42	0,1	0,1	8,0	8,9	38	47
UW136FUS49	11,5	11,3	2,9	26,5	12	11

Las actividades se expresan en miliunidades = nanomoles de nitrito producido o consumido por miligramo de proteína y por minuto.

Las actividades β -galactosidasa indican el sentido de la transcripción, el mismo en toda la región, ya que las actividades que se obtienen con las fusiones 2, y sobre todo, 10 y 12 son mucho más elevadas que las restantes. La constitutividad de la fusión 10 se discute más adelante. La fusión 41 presenta una actividad más alta pero se debe al P_{lac} (constitutivo en *Azotobacter*) de pTZ19R (ver figura 24).

Las actividades enzimáticas que se obtienen en

Azotobacter vinelandii con las inserciones FUS6, FUS12 y FUS29 indican que las tres se encuentran dentro del gen de la nitrito reductasa y ponen constitutiva la expresión del gen de la nitrato reductasa. Las actividades β -galactosidasa indican que la transcripción va del gen de la nitrito reductasa (se denominará desde ahora *nasA*) hacia el de la nitrato reductasa (*nasB*).

3.2.3.6. Mutagénesis de pPN2

Para terminar de demostrar la existencia de un operón que abarcara a ambos genes, se mutagenizó *in vitro* el plásmido pPN2. Se emplearon dos fragmentos de ADN denominados, respectivamente, *sac* y Ω . El primero se extrajo del plásmido pUC4-*sac* por corte con *Bam* HI. Este fragmento es portador de un gen de resistencia a kanamicina y de genes que confieren sensibilidad a sacarosa. El fragmento Ω se extrajo también de su vector plasmídico (pHP45 Ω) con *Bam* HI. Este elemento genético confiere resistencia a estreptomycinina y a espectinomycinina y lleva en ambos extremos señales de terminación de la transcripción y la traducción. Esto lo hacía muy adecuado para estudiar si los genes *nasA* y *nasB* formaban parte de la misma unidad transcripcional. En ambos casos se siguió la misma estrategia: los fragmentos extraídos con *Bam* HI se ligaron a pPN2 cortado con *Bgl* II. Este enzima tiene una diana única en pPN2 situada dentro de *nasA* y da extremos compatibles con *Bam* HI. De este modo, se obtuvieron los plásmidos pPN2*sac* y pPN2 Ω , que se esquematizan en las figuras 25 y 26.

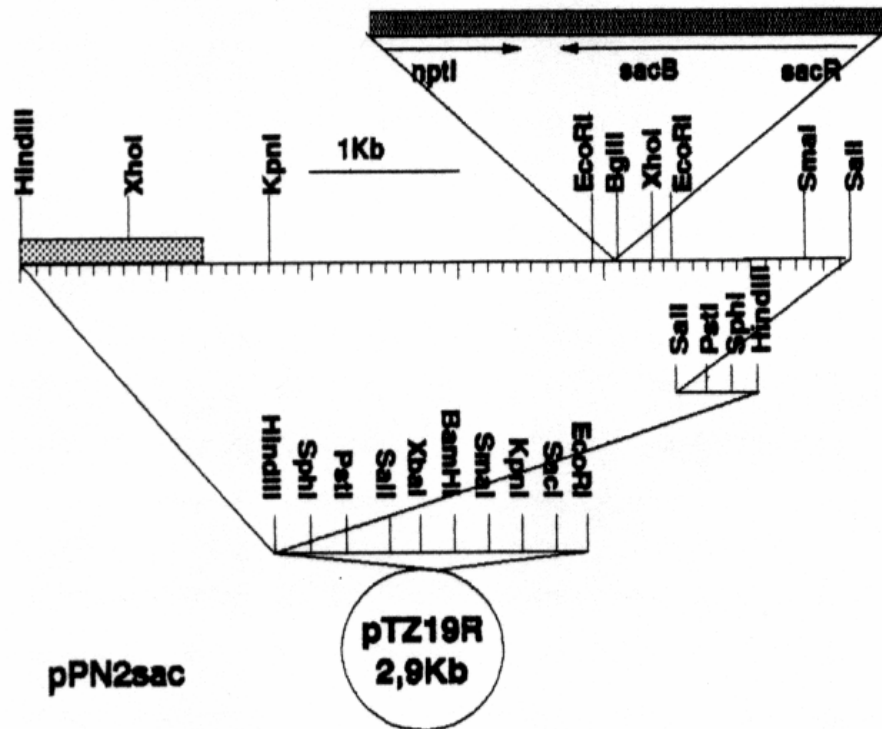


Figura 25. Mapa de restricción de pPN2sac

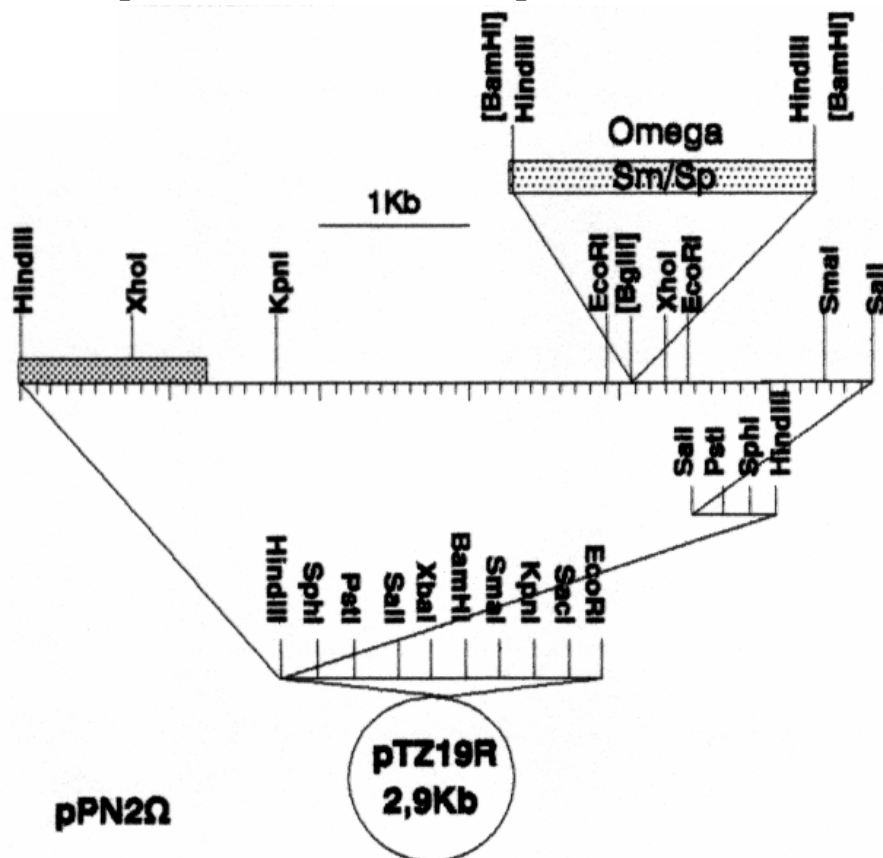


Figura 26. Mapa de restricción de pPN2Ω

3.2.3.7. Inserciones *sac* y *W* en *Azotobacter*

Las inserciones de pPN2 se introdujeron en el ADN de *Azotobacter* (estirpes UW136 y UW6r) por transformación seleccionando las resistencias a antibióticos correspondientes (kanamicina o espectinomycin). Posteriormente se comprobó la sensibilidad a ampicilina (marcador del vector, suicida en *Azotobacter*) para asegurar que se había producido una doble recombinación y no una integración del plásmido completo.

En el caso de las estirpes UW6r-*sac* (denominada AS264) y UW6r- Ω (denominada AS263) se estudió el crecimiento en medio sólido replicando colonias aisladas a cajas de medio mínimo suplementado con nitrato, nitrito o clorato + amonio. En la tabla XV se observa como no hay crecimiento en nitrato ni en nitrito pero sí en clorato.

Tabla XV. Crecimiento en medio mínimo suplementado con distintas fuentes de nitrógeno o clorato de UW6r, AS264 y AS263

ESTIRPE	CRECIMIENTO EN MEDIO SÓLIDO			
	NITRATO	NITRITO	CLORATO + AMONIO	AMONIO
UW6r	+	+	-	+
AS264 (UW6r- <i>sac</i>)	-	-	+	+
AS263 (UW6r- Ω)	-	-	+	+

En las estirpes UW136-*sac* (AS260) y UW136- Ω (AS259) se midieron actividades nitrato y nitrito reductasa. La tabla XVI muestra estos datos que confirman los de crecimiento e indican que la expresión de *nasA* y la de *nasB* se afectan simultáneamente con estas inserciones.

Tabla XVI. Actividades enzimáticas de UW136 con y sin inserciones *sac* y Ω

ESTIRPE	NITRATO REDUCTASA		NITRITO REDUCTASA	
	-NO ₃ ⁻	+NO ₃ ⁻	-NO ₃ ⁻	+NO ₃ ⁻
UW136	0,8	13,7	4,0	26,6
AS260 (UW136- <i>sac</i>)	0,7	0,7	2,0	2,0
AS259 (UW136- Ω)	0	0	1,5	2,1

Las actividades se expresan en miliunidades = nanomoles de nitrito producido o consumido por miligramo de proteína y por minuto.

3.2.4. Búsqueda de genes de *Azotobacter vinelandii* en la genoteca

En todos los casos la búsqueda se hizo por hibridación empleando como sonda el ADN clonado en pRM3 o pRM5. Para el marcaje, la hibridación y la identificación de clones positivos se siguió un método no radioactivo que se detalla en Materiales y Métodos.

3.2.4.1. Clonación de *nasAB*

Para la clonación de los genes del operón se empleó como sonda el ADN de *Azotobacter* clonado en pRM3. Se cortó el plásmido con la restrictasa *Sal* I y se sometió a electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión. Se cortó la banda de 6,7 kb y se marcó por procedimientos no radioactivos.

Se infectó la estirpe KW251 de *Escherichia coli* con parte de la genoteca de manera que se obtuvieron 3000 calvas de lisis repartidas en 10 cajas de Petri. El ADN de estas calvas se transfirió a filtros de nailon sobre los que se hizo la hibridación.

En un primer experimento se obtuvieron ocho posibles positivos. Con fagos obtenidos de las calvas correspondientes se infectó de nuevo la estirpe KW251 y se repitió en cada caso la hibridación aunque con menor número de calvas (100-200 en una sola caja por cada positivo). Se confirmaron cuatro de los positivos anteriores, los denominados λ nas3.1, λ nas3.4, λ nas3.7 y λ nas3.8. Se aisló ADN de cada uno de estos fagos, se cortó con *Eco* RI, *Cla* I y *Kpn* I, se sometió a electroforesis en agarosa al 0,8% y se transfirió a un filtro sobre el que se repitió la hibridación con la sonda de pRM3. El mismo filtro se rehibridó con el fragmento *Sal* I-*Eco* RI de 5,3 kb de pRM3

(ver figura 19). Los tamaños de las bandas que hibridaron con cada sonda se muestran en la tabla XVII.

Tabla XVII. Tamaño en kb de las bandas de los clones de la genoteca que hibridan con las sondas obtenidas a partir de pRM3

BACTERIÓFAGO	Eco RI	Cla I	Kpn I
λ nas3.1	7/0,3	7	11
λ nas3.4	<u>8</u>	<u>6,5</u>	-
λ nas3.7	7/ <u>2</u> /0,5	7/ <u>2,5</u>	<u>13</u>
λ nas3.8	7/ <u>1</u> /0,5	7/ <u>1,4</u>	<u>12</u>

Se subrayan las bandas que hibridaron con las dos sondas: *Sal* I, que lleva todo el ADN clonado en pRM3; y *Sal* I+Eco RI, que lleva sólo 2,5 kb de ADN de *Azotobacter* y la mitad de Tn5. Los números no subrayados indican los tamaños de las bandas que hibridaron sólo con la primera sonda.

El ADN de estos cuatro clones de la genoteca se utilizó también para transformar las diferentes estirpes mutantes de que disponíamos, tanto de ICR como de Tn5 (tabla XVIII).

Los datos obtenidos con las restricciones, las hibridaciones y las transformaciones permiten componer un mapa de la región cubierta por el ADN clonado en estos cuatro bacteriófagos (ver luego figura 28).

Puede observarse que no hay ningún clon que lleve simultáneamente los genes *nasA* y *nasB*. Por ello se llevó a cabo una nueva búsqueda en la genoteca mediante hibridación con la sonda *Sal* I de pRM3. En este segundo experimento se obtuvieron seis positivos de los que se confirmaron tres que se denominaron λ nas3.10, λ nas3.11 y λ nas3.12. Se aisló ADN de estos tres clones y se cortó con las restrictasas

Tabla XVIII. Transformaciones de los mutantes Nas⁻ y Nis⁻ con diferentes fragmentos de ADN

ESTIRPE TRANSFORMADA	pRM3	λ nas3.1	λ nas3.4	λ nas3.7	λ nas3.8
AS30 (<i>nasA</i>)	+	+	-	+	+
AS36 (<i>nasB</i>)	+	-	+	-	-
AS61	-	+	-	-	-
AS243 (<i>nas-1</i>)	-	-	-	-	-
AS244 (<i>nas-2, nasB</i>)	+	-	+	-	-
AS245 (<i>nas-3, nasB</i>)	-	-	+	-	-
AS246 (<i>nas-4</i>)	-	-	-	-	-
AS247 (<i>nas-5</i>)	-	-	-	-	-
AS256 (<i>nas-7</i>)	+	-	-	+	-
AS257 (<i>nas-8, nasA</i>)	+	+	-	+	+

+ indica crecimiento de transformantes en cajas con nitrato.
- indica no crecimiento.

Bam HI, *Eco* RI y *Sal* I. Se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, se transfirió a filtro y se hibridó con la sonda *Sal* I de pRM3 (figura 27). Los patrones de λ nas3.10 y 3.12 son idénticos. Se observa que pRM3 hibridó con 3 bandas *Eco* RI en todos los casos: dos bandas comunes de 0,5 y 7 kb (que también hibridaron en λ nas3.7 y 3.8) y una tercera banda de 6,5 kb para λ nas3.10 y 12 y de 6 kb para λ nas3.11. Estos datos indican que estos clones cubren toda la región *nasAB* ya que la tercera banda alarga por la "izquierda" la región ya clonada en λ nas3.7 y λ nas3.8 (ver de nuevo la figura 28).

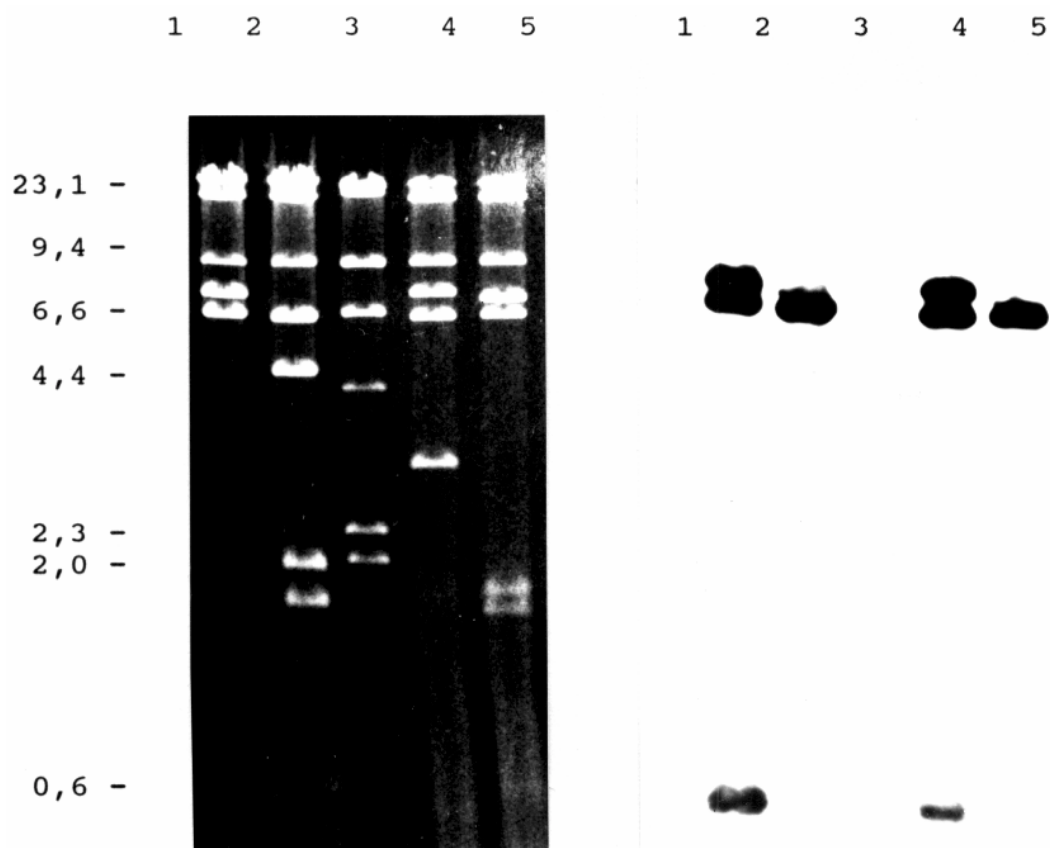


Figura 27. Hibridación con la sonda *Sal* I de pRM3 contra el ADN de λ nas3.10 y λ nas3.11

Se presenta la electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (izquierda) y la posterior hibridación (derecha). Carril 1: ADN de λ nas3.10 cortado con *Eco* RI; carril 2: ADN de λ nas3.10 cortado con *Sal* I; carril 3: ADN de λ cortado con *Hind* III (patrón de pesos moleculares, los tamaños en kb se indican al margen); carril 4: ADN de λ nas3.11 cortado con *Eco* RI; carril 5: ADN de λ nas3.11 cortado con *Sal* I. El ADN de λ nas3.12 daba exactamente el mismo patrón que el de λ nas3.10.

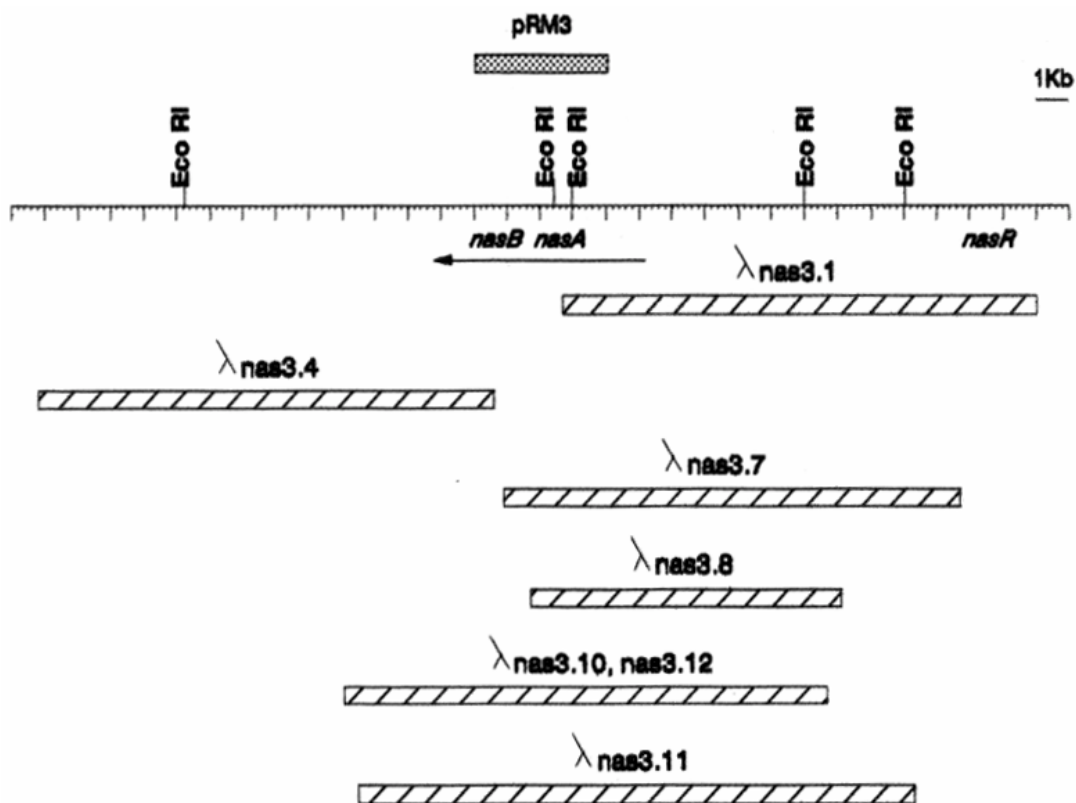


Figura 28. Esquema de la región cubierta por los clones obtenidos de la genoteca

3.2.4.2. Subclonación en plásmidos y definición del gen *nasR*

Algunos de los fragmentos de ADN aislados a partir de la genoteca se clonaron en el plásmido pTZ19R. Con esto se perseguía: 1.- tener el ADN en un vector de más fácil manejo, 2.- confirmar los datos de mapeo de la región obtenidos hasta el momento, 3.- mediante transformaciones con subclones, delimitar mejor la situación de los genes y

de las mutaciones y 4.-utilizarlos en experimentos de expresión de productos proteicos. A partir de λ nas3.4 se obtuvo el plásmido pRM8. A partir de λ nas3.1 se fabricaron pRM11, pRM12, pRM13 y pRM14. De pRM12 se obtuvieron los subclones pRM17 y pRM18. A partir de λ nas3.10 se construyeron pRM20 y pRM21. El contenido de estos plásmidos se detalla en la tabla XIX y en la figura 29. Estos plásmidos se fabricaron cortando el ADN de los bacteriófagos con la restrictasa correspondiente y ligando con pTZ19R cortado con el mismo enzima. Tras transformar la estirpe 71-18 de *Escherichia coli* se sembró en cajas de medio Luria con ampicilina y X-gal. Se seleccionaron las colonias blancas y los fragmentos clonados se identificaron por hibridación *in situ* con las sondas obtenidas de pRM3 o por cortes con enzimas de restricción de los plásmidos aislados.

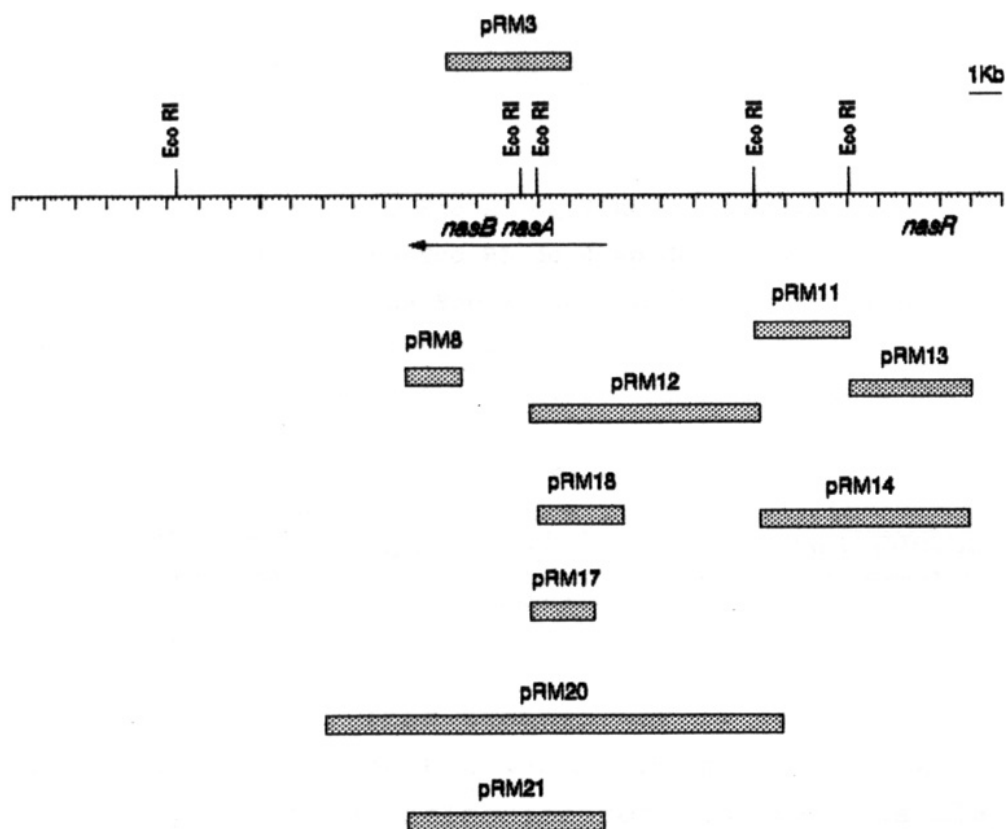


Figura 29. Esquema de la región cubierta por los plásmidos descritos en la tabla XIX. Cada plásmido se mapeó con enzimas de restricción como se indica posteriormente en el texto

Tabla XIX. Plásmidos obtenidos de la clonación de ADN de la genoteca en pTZ19R

PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN DEL FRAGMENTO CLONADO EN pTZ19R
pRM8	Fragmento <i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I de 2 kb de λ nas3.4
pRM11	Fragmento <i>Eco</i> RI de 3 kb de λ nas3.1
pRM12	Fragmento <i>Eco</i> RI de 7 kb de λ nas3.1
pRM13	Fragmento <i>Eco</i> RI de 4 kb de λ nas3.1
pRM14	Fragmentos <i>Eco</i> RI de 3 kb y de 4 kb de λ nas3.1
pRM17	pRM12 delecionado con <i>Kpn</i> I
pRM18	Fragmento <i>Eco</i> 47III/ <i>Eco</i> RI de 2,5 kb de pRM12 en <i>Sma</i> I/ <i>Eco</i> RI de pTZ19R
pRM20	Fragmento <i>Bam</i> HI de 15 kb de λ nas3.10
pRM21	Fragmento <i>Sal</i> I de 6,3 kb de λ nas3.10

Hay que advertir que el punto *Eco* RI del fragmento clonado en pRM8 y uno de los de pRM13 y pRM14, así como los *Bam* HI del fragmento de pRM20 no pertenecen al ADN de *Azotobacter* sino al del vector de la genoteca (ver mapa de λ GEM12 y construcción de la genoteca en Materiales y Métodos).

Con cada uno de estos plásmidos se transformaron las diferentes estirpes mutantes afectadas en la asimilación de nitrato con objeto de saber con qué fragmento se corregía cada mutación (tabla XX). De los datos de transformación con λ nas3.1, pRM13 y pRM14 se deduce que AS61 está afectado en un gen diferente a los anteriores. El dato más claro está en que pRM13, que lleva el fragmento *Eco* RI de 4 kb del extremo del ADN clonado en λ nas3.1, corrige por sí solo la mutación de AS61 (tabla XX). Al gen afectado se le denominó *nasR* (ver otros experimentos en el apartado 3.2.5 y Discusión).

Tabla XX. Transformaciones de los mutantes Nas⁻ y Nis⁻ con diferentes plásmidos

ESTIRPE	PLÁSMIDO CON QUE SE TRANSFORMÓ							
	pRM8	pRM11	pRM12	pRM13	pRM14	pRM17	pRM18	pRM20
AS30 (<i>nasA</i>)	-	-	+	-	-	+	+	+
AS36 (<i>nasB</i>)	+	-	-	-	-	-	-	+
AS61 (<i>nasR</i> [*])	-	-	-	+	+	-	-	-
AS243	-	-	-	-	-	-	-	-
AS244 (<i>nasB</i>)	+	-	-	-	-	-	-	+
AS245 (<i>nasB</i>)	+	-	-	-	-	-	-	+
AS246	-	-	-	-	-	-	-	-
AS247	-	-	-	-	-	-	-	-
AS256	-	-	-	-	-	-	-	+
AS257 (<i>nasA</i>)	-	-	+	-	-	+	+	+

+ indica crecimiento de los transformantes en cajas con nitrato.

- indica no crecimiento.

* *nasR* es un gen regulador que se define posteriormente.

Con la finalidad de acotar en lo posible la situación de los genes *nasAB* se utilizaron los plásmidos pRM8 y pRM12. El plásmido pRM8 se mapeó con varios enzimas de restricción (figura 30). Se encontró una diana única para *Sma* I en el centro de las dos kilobases clonadas. En este punto se introdujo el fragmento Ω . Este fragmento de 2 kb se obtuvo a partir de pHP45 Ω , cortándolo con *Sma* I, separando las bandas por electroforesis y extrayendo la banda correspondiente de la agarosa mediante un protocolo comercial ("geneclean"). Posteriormente se ligó a pRM8 cortado con *Sma* I. El plásmido obtenido, pRM8 Ω , se utilizó para transformar las estirpes UW136FUS10 y UW136FUS12 (ver apartado 3.2.3.5). Se seleccionó la resistencia a espectinomicina especificada por Ω y se comprobó el mantenimiento

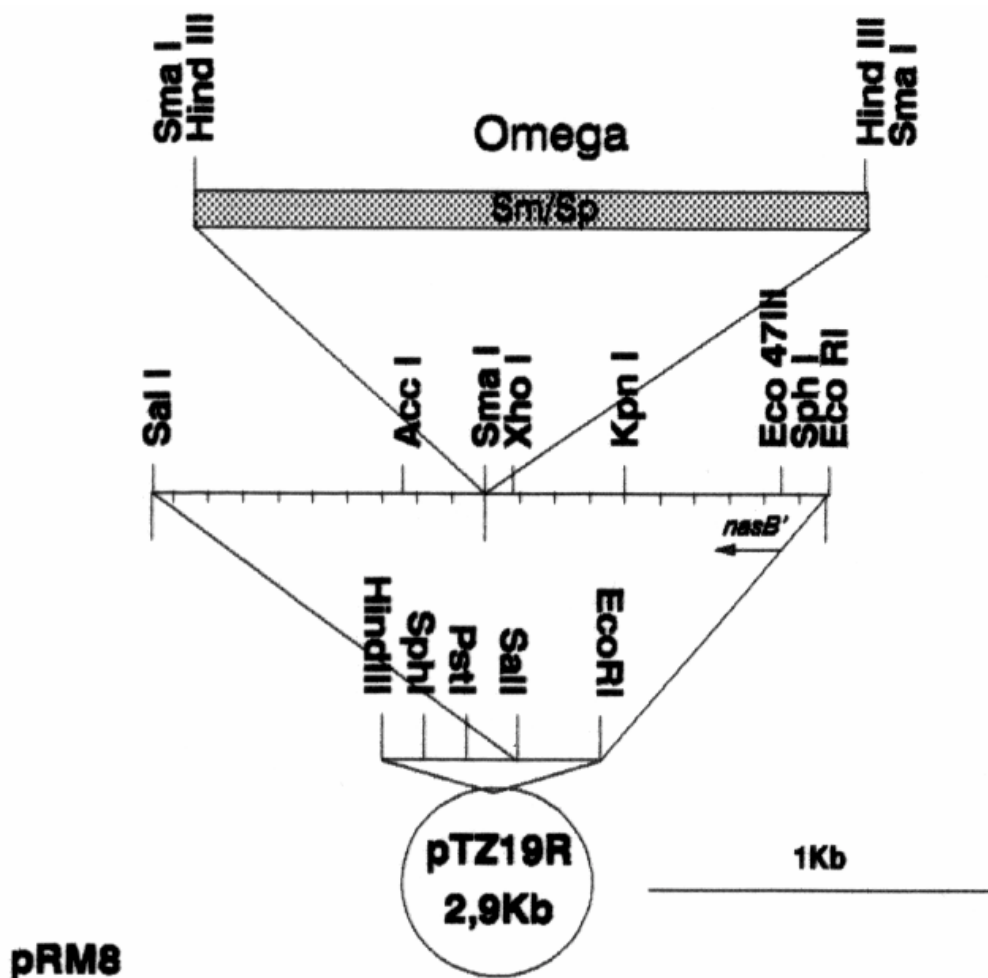


Figura 30. Mapa de restricción de pRM8 con indicación del punto donde se insertó Ω

de la resistencia a kanamicina aportada por Tn5 B20 y la no presencia de la resistencia a ampicilina del vector (pRM8). A estas nuevas estirpes se les midieron las actividades enzimáticas nitrato reductasa, nitrito reductasa y β -galactosidasa (tabla XXI). De estos datos se deduce que el punto donde se insertó Ω se encuentra en una región en que no impide la actividad de la nitrato reductasa, lo que permite acotar el final del gen *nasB*.

Tabla XXI. Actividades enzimáticas de estirpes de *Azotobacter vinelandii* con fusiones *lac* en el operón *nasAB* e inserción de Ω detrás de *nasB*

ESTIRPE	NITRATO REDUCTASA	NITRITO REDUCTASA	β -GALACTOSIDA- SA
UW136FUS10	0,2	8,8	350
UW136FUS12	18,2	1,0	307
UW136FUS10 Ω	0,3	8,5	405
UW136FUS12 Ω	16,1	0,5	380

Las actividades se midieron en cultivos que habían sido incubados 15 horas en presencia de nitrato.

Los datos de actividades nitrato y nitrito reductasa se dan en miliunidades de actividad específica.

Las actividades β -galactosidasa se expresan en unidades Miller.

A partir de pRM12 se obtuvieron los subclones pRM17 y pRM18, que se mapearon con endonucleasas de restricción (figura 31). En el punto *Kpn* I único en pRM18 se introdujo el elemento *kiss* (fragmento de ADN que confiere resistencia a Km y tiene tamaño parecido al de *sac*, descrito antes), que se obtuvo cortando pUC4kiss con el mismo enzima. Esta inserción se introdujo en el ADN de *Azotobacter* por el mismo procedimiento que en los casos anteriores y dio lugar a falta de actividad nitrato y nitrito reductasa, por lo que es probable que esa inserción estuviera dentro de *nasA*.

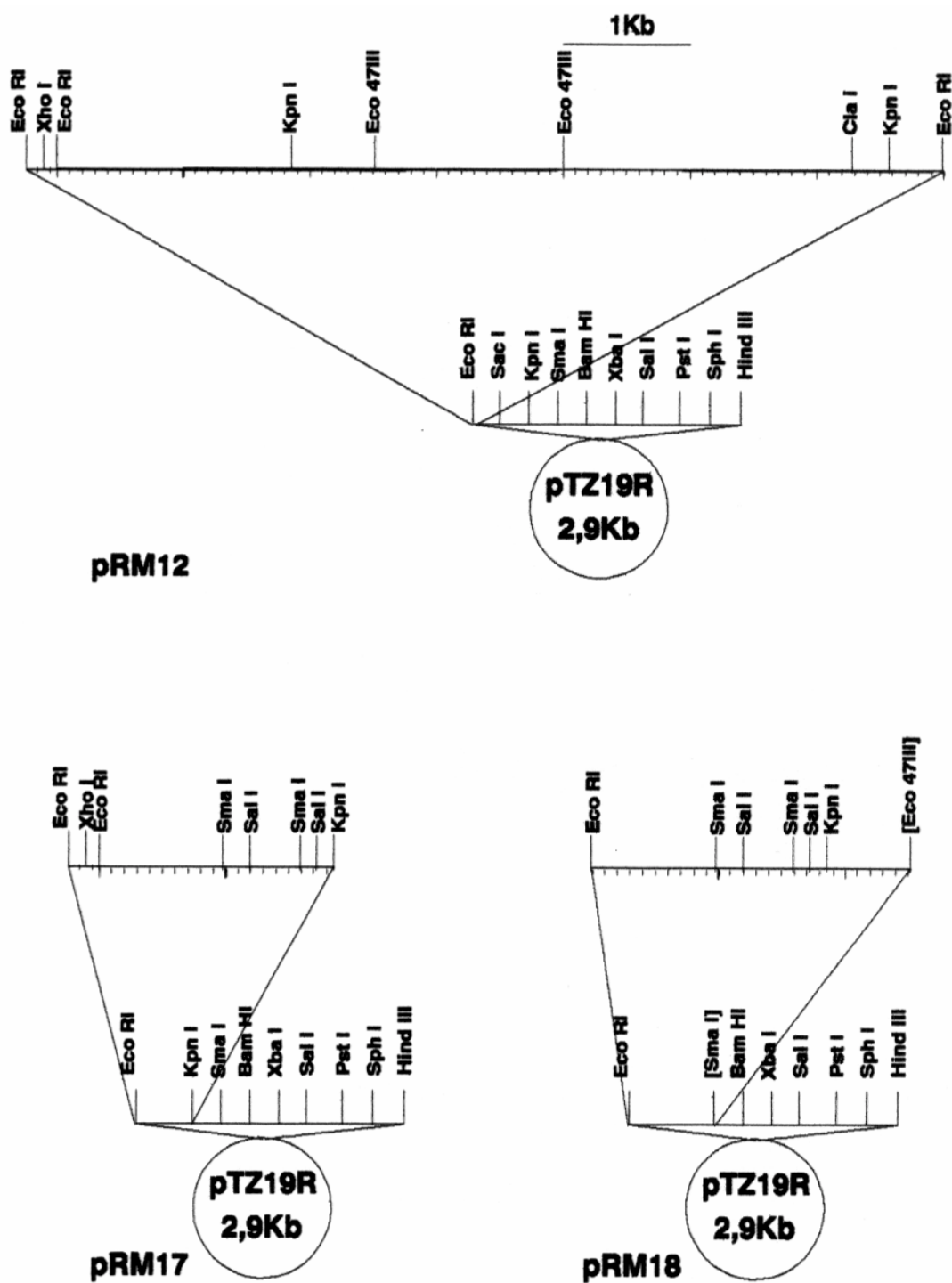


Figura 31. Mapas de restricción de pRM12, pRM17 y pRM18. Las dianas con [] no se regeneran en la construcción final

Los datos expuestos permiten componer un mapa de restricción detallado de la zona cubierta por pRM8, pRM3 y pRM12, donde se encuentra el operón *nasAB* (figura 32).

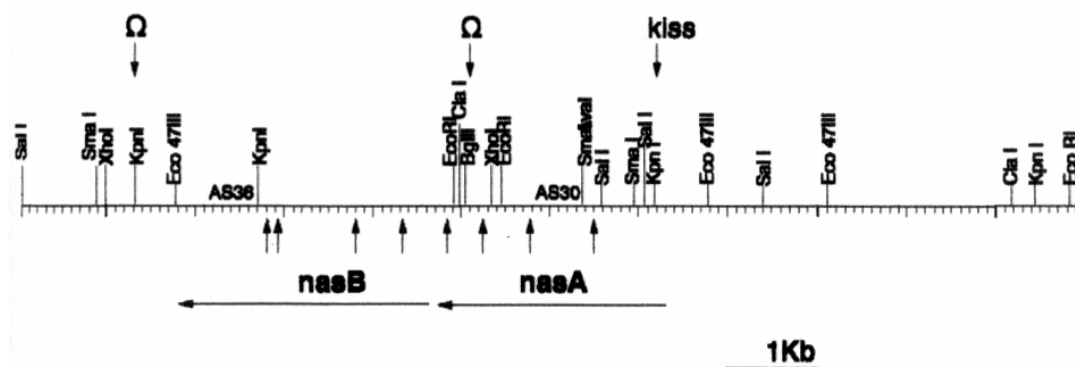


Figura 32. Mapa de restricción de la zona donde se encuentra *nasAB*. Además de los enzimas que se indican, se emplearon *HindIII* y *BamHI*, que no poseían diana alguna en esta zona

3.2.4.3. Búsqueda del gen mutado en AS253 (*nas-5*)

Se siguió un procedimiento similar al explicado para los genes *nasAB*. En este caso se utilizó como sonda el fragmento *Kpn I* clonado en pRM5, y se partió de 3000 calvas de lisis obtenidas sobre un césped de *E. coli* KW251 con los bacteriófagos de la genoteca.

La hibridación dio como resultado la obtención de tres positivos de los que sólo se recomprobó uno tras una nueva hibridación. El ADN de este bacteriófago se cortó con *Eco RI*, *Cla I* y *Kpn I* y se sometió a electroforesis en agarosa al 0,8% para posteriormente transferirlo a filtro y realizar una nueva hibridación con la misma sonda (figura 33). Se obtuvo hibridación con una banda *Eco RI* de 12 kb, una banda *Cla I* de 9 kb y una banda *Kpn I* de algo más de 1 kb.

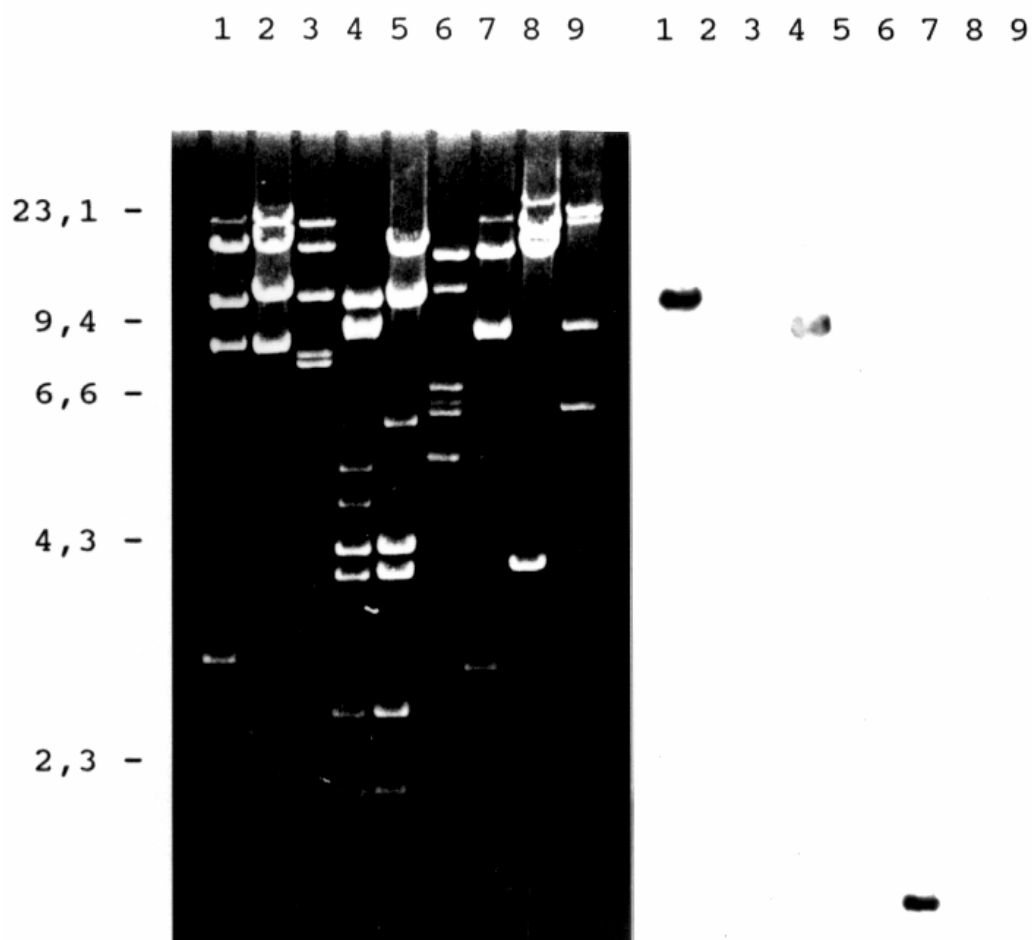


Figura 33. Electroforesis e hibridación con la sonda de pRM5 del ADN de λ nas5.1 cortado con varios enzimas de restricción

Se presenta el resultado de la electroforesis del ADN de λ nas5.1 en gel de agarosa al 0,8% (izquierda) y la posterior hibridación contra el ADN clonado en pRM5 (derecha). Carriles 1, 4 y 7: ADN de λ nas5.1 cortado con *Eco* RI, *Cla* I y *Kpn* I, respectivamente; carriles 2, 5 y 8: ADN de otro clon de la genoteca cortado con los mismos enzimas (no dio hibridación); carriles 3, 6 y 9: ADN de λ cortado con *Sma* I, *Bam* HI y *Hind* III, respectivamente (patrones de peso molecular, a la izquierda se indican algunos tamaños en kb).

El ADN de este clon se empleó también para transformar a la estirpe *nas-5* en su versión *Nif⁻*. Se obtuvieron multitud de transformantes capaces de crecer en medio mínimo suplementado con nitrato.

La banda de 12 kb *Eco* RI que hibridaba, se clonó en pTZ19R dando lugar al plásmido pRM9. Este plásmido también fue capaz de corregir por transformación la mutación *nas-5*.

3.2.4.4. Caracterización del ADN clonado en pRM9

La mutación *nas-5* no estaba ligada a la mutación *nas-3* (en *nasB*, presunto gen estructural del apoenzima nitrato reductasa) y sin embargo provocaba el mismo fenotipo. Era probable que esta mutación afectara a la síntesis del cofactor de molibdeno.

Para comprobar esta hipótesis se introdujo por transformación el plásmido pRM9 en varias estirpes de *Escherichia coli* con inserciones de Tn10d en genes implicados en la síntesis del cofactor de molibdeno, con la esperanza de observar complementación de alguna de estas mutaciones. Las estirpes empleadas fueron: VJS1778 (*chlA-250*), VJS1779 (*chlE251*), VJS1780 (*chlB252*) y VJS1784 (*chlG256*). Colonias aisladas de estas estirpes con y sin pRM9 se replicaron a cajas de medio mínimo suplementado con nitrato o con clorato y amonio, poniendo como testigo la estirpe silvestre K12, de la que las mutantes procedían, y se incubaron en anaerobiosis. No fue posible apreciar diferencias de crecimiento entre las estirpes con y sin plásmido.

Se empleó entonces otro sistema para tratar de detectar algún pequeño grado de complementación. Consistió en medir producción de nitrito tras incubación de las estirpes en un medio líquido con nitrato. En primer lugar se comprobó que tras incubación de la estirpe K12 de *E. coli* en medio Luria líquido suplementado con 8 g/l de nitrato potásico, sin agitación, a 30°C durante una noche, se obtenía una gran cantidad de nitrito en el medio de cultivo, detectable colorimétricamente por la adición de los reactivos

sulfanilamida y N-NEDA. Se hizo lo mismo con las estirpes mutantes con y sin pRM9. El nitrito aparecido en los cultivos de las estirpes mutantes era indetectable. Sin embargo la estirpe VJS1780 (*chlB*) con pRM9 produjo gran cantidad de nitrito en el medio de cultivo. En la tabla XXII trata de hacerse una cuantificación de estos datos.

Tabla XXII. Complementación de estirpes *chl* de *E. coli* con pRM9

ESTIRPE	PRODUCCIÓN DE NITRITO
K12	1500
VJS1778(<i>chlA</i>)	7,1
VJS1778(<i>chlA</i>)/pRM9	7,4
VJS1779(<i>chlE</i>)	8,0
VJS1779(<i>chlE</i>)/pRM9	7,9
VJS1780(<i>chlB</i>)	8,3
VJS1780(<i>chlB</i>)/pRM9	1462,6
VJS1784(<i>chlG</i>)	5,8
VJS1784(<i>chlG</i>)/pRM9	4,7

Los números indican nanomoles de nitrito por miligramo de proteína que se detectaron en un cultivo líquido de las estirpes correspondientes incubadas en medio Luria con nitrato (8g/l) durante 15 horas, sin agitación y a 30°C.

Como resumen aclaratorio de la utilización de cada uno de los plásmidos descritos en este apartado se presenta la tabla XXIII.

Tabla XXIII. Plásmidos obtenidos de la clonación de ADN de la genoteca en pTZ19R

PLÁSMIDO	UTILIZACIÓN
pRM8	Delimitación del final de <i>nasB</i> por inserción de Ω
pRM9	Complementación de <i>chlB</i> de <i>E. coli</i>
pRM11	Localización de la mutación de AS61 (<i>nasR</i>). No está en este fragmento.
pRM12	Clonación del promotor de <i>nasA</i> ; debe de estar aquí, aunque no se ha llegado a delimitar donde empieza <i>nasA</i> . Experimentos de expresión de productos proteicos (ver capítulo 3.3).
pRM13	Localización de la mutación en <i>nasR</i> . Se corrige con este fragmento.
pRM14	Igual que pRM13 pero lleva un fragmento mayor.
pRM17	Intento de delimitación del comienzo de <i>nasA</i> .
pRM18	Intento de delimitación del comienzo de <i>nasA</i> .
pRM20	Experimentos de expresión de <i>nasAB</i> (ver capítulo 3.3).
pRM21	Experimentos de expresión de <i>nasAB</i> (ver capítulo 3.3).

Todos los plásmidos sirvieron además para corregir las diferentes mutaciones y para mapear la región con endonucleasas de restricción. Ver también tabla XIX y figura 29.

3.2.5. Expresión de las fusiones en diferentes fondos genéticos

Las fusiones del operón *nasAB* con el gen de la β -galactosidasa descritas antes permitían realizar algunos experimentos encaminados a obtener datos sobre la regulación del mismo operón. Para ello se escogió las fusiones FUS10 y FUS12. Ambas están clonadas en la orientación de transcripción del operón. FUS10 carece de actividad nitrato reductasa; FUS12 posee actividad nitrato reductasa constitutiva.

En la tabla XIV se daban los datos de expresión de estas fusiones en un fondo, por lo demás, silvestre. En esta ocasión se introdujeron las fusiones en estirpes mutadas en los genes *ntrC*, *ntrA* o *nasR*. La tabla XXIII muestra los datos de actividades enzimáticas con estas estirpes. Puede observarse que la transcripción del operón se ve impedida en los tres fondos genéticos. La actividad nitrato reductasa en FUS12 es siempre constitutiva, confirmando que se debe al aporte, por parte de Tn5, de un promotor no regulado.

Tabla XXIV. Actividades enzimáticas de fusiones lac en el operón con diferentes fondos genéticos

ESTIRPE	NITRATO REDUCTASA		NITRITO REDUCTASA		β-GALACTOSIDASA	
	-NO ₃ ⁻	+NO ₃ ⁻	-NO ₃ ⁻	+NO ₃ ⁻	-NO ₃ ⁻	+NO ₃ ⁻
AS31FUS10(<i>ntrC</i>)	0,3	0,3	1,4	2,7	21,3	29,8
AS31FUS12(<i>ntrC</i>)	15,8	16,1	1,9	2,6	19,4	24,5
MV724FUS10(<i>ntrA</i>)	0,1	0,2	0,4	0,5	12	14
MV724FUS12(<i>ntrA</i>)	14,7	15,3	0,3	0,6	13	12,4
AS61FUS10(<i>nasR</i>)	0,2	0,2	1,1	3,9	18,9	19
AS61FUS12(<i>nasR</i>)	15,2	15,8	0,8	1,3	17	23

Se midieron actividades enzimáticas a cultivos de estas estirpes incubados 15 horas en un medio con o sin nitrato. Nitrato y nitrito reductasas se expresan en miliunidades por miligramo de proteína. β-galactosidasa se expresa en unidades Miller.

3.2.6. Discusión

3.2.6.1. Construcción de la genoteca y obtención de sondas

La construcción de una genoteca en el bacteriófago λ y la clonación en plásmidos de fragmentos de ADN contiguos a las mutaciones obtenidas en el apartado 3.1, tenían por finalidad el tener las herramientas necesarias para clonar genes implicados en la asimilación de nitrato en *Azotobacter vinelandii*.

El método empleado en la construcción de la genoteca evita la necesidad de fraccionar por tamaño los fragmentos de ADN genómico que se obtienen tras la digestión parcial con *Sau* 3A, ya que el relleno parcial de los extremos cohesivos impide la posibilidad de religamiento entre fragmentos y el tamaño se selecciona posteriormente en el empaquetamiento. Los únicos productos posibles tras el ligamiento son fragmentos únicos de ADN genómico con los dos brazos del vector. Así se evitan las pérdidas de ADN que todo procedimiento de fraccionamiento implica.

La obtención del plásmido pRM3 permitía afrontar la búsqueda, mediante hibridación contra la genoteca, de los genes presuntamente estructurales para la nitrato y la nitrito reductasa que anteriormente se había demostrado que estaban ligados. La transformación con pRM3 puso de manifiesto que este plásmido contenía información genética suficiente para corregir las mutaciones de fenotipo $Nis^- Nas^+$ y las $Nas^- Nis^+$ ligadas. Esto permitía utilizar el ADN de *Azotobacter* clonado en pRM3 (unas 4 kb) para demostrar la existencia de un operón entre los genes de la nitrato y la nitrito reductasa, así como para llevar a cabo algunos experimentos de regulación mediante la introducción de fusiones *lac*.

3.2.6.2. Operón *nasAB*

La introducción de fusiones con el gen de la β -galactosidasa de *E. coli* en diferentes posiciones dentro del fragmento clonado de *Azotobacter* y en las dos orientaciones posibles nos permitió determinar el sentido de transcripción, que resultó ser el mismo a lo largo de todo el fragmento y que iba en la dirección gen de la nitrito reductasa (*nasA*)-gen de la nitrato reductasa (*nasB*).

El hecho de que la actividad nitrato reductasa con algunas de estas fusiones fuera constitutiva apoyaba la existencia de una sola unidad transcripcional puesto que se debía a la introducción en el gen *nasA* de un promotor no regulado aportado por Tn5, de forma similar a lo ocurrido con el mutante AS258 (*nas-8*) (ver apartado 3.2.5). Las fusiones 6, 12 y 29 provocan fenotipo $Nas^c Nis^-$, y por tanto definen una zona claramente por delante del gen *nasB* y dentro del gen *nasA*. En esta zona existía una diana *Bgl* II que, en el derivado de pRM3 denominado pPN3, es única.

En esta diana única se introdujo el fragmento Ω . Esta inserción provoca interrupción de la transcripción en cualquier orientación en que se produzca puesto que lleva señales de parada de la misma en ambos extremos. Por tanto, si se introduce en un operón, dará lugar a mutaciones polares sobre los genes que se encuentren corriente abajo. Este era por tanto un experimento clave para la demostración de la existencia de una sola unidad transcripcional que agrupara a los genes *nasA* (nitrito reductasa) y *nasB* (nitrato reductasa). Los datos de la tabla XV indican que la expresión de ambos genes se afecta simultáneamente por la inserción en *nasA*, lo que demuestra la existencia del operón.

Las inserciones FUS6, 12, 29 y 41 así como la inserción *nas-8* dan lugar a expresión constitutiva de *nasB* por introducción del promotor constitutivo antes mencionado. Las inserciones FUS7, 12 y 42 provocan falta absoluta de expresión de *nasB* y bajada considerable de la expresión de *nasA*. Caben varias explicaciones a este hecho:

1.-Estas inserciones se encuentran en *nasA* pero no dan lugar a expresión constitutiva de *nasB* sino que simplemente interrumpen la transcripción. Berg *et al.* (1980), al describir la polaridad de las inserciones de Tn5 en el operón *lac* de *E. coli*, detectan dos tercios de mutaciones polares y un tercio en que hay expresión de los genes distales a partir de un promotor asociado al transposón. Este promotor se encuentra en una zona de 186 pb de ambos extremos de Tn5. Estos autores proponen varias hipótesis para explicar que no todas las inserciones den lugar a expresión de genes distales. Es posible que (a) venga determinado por la fase de lectura de la inserción o (b) que el promotor sólo se cree por unión de Tn5 a ciertas secuencias bacterianas.

2.-Las inserciones de los transposones con el gen *lacZ* se encuentran en *nasB*, pero la presencia de un promotor transcribiendo la cadena sin sentido del ADN da lugar a expresión incorrecta de *nasA*.

3.-Las inserciones están en un gen situado entre *nasA* y *nasB* que afecta a la expresión de ambos. Esta hipótesis es menos probable, y casi se puede descartar, puesto que se está produciendo transcripción desde el promotor del operón, según se deduce de los datos de actividad β -galactosidasa con la fusión 10, que es la que está en la orientación correcta (tabla XIV).

La mutación de la estirpe AS30, provocada con ICR y que mapea también en *nasA*, no da lugar a polaridad sobre *nasB*. Esto se explica porque este mutágeno produce mutaciones por desfase (Ames y Whitfield, 1966; Roth, 1974), lo que da lugar a aparición de codones sin sentido que interrumpen la traducción. Sin embargo la transcripción es normal y la traducción puede comenzar en el siguiente codón de iniciación si existe el sitio de unión de ribosomas.

A partir de la genoteca, se han clonado los genes *nasAB*, primero por trozos y luego en un solo clon (pRM20). Estos clones y subclones servirán como punto de partida para un proyecto, ya iniciado, de secuenciación de todo el operón.

El operón *nasAB* de *A. vinelandii* es el primero descrito en la literatura que incluya las dos reductasas. En hongos, aunque la nitrato y la nitrito reductasas están correguladas, los genes estructurales no forman parte de una unidad transcripcional (Kinghorn, 1989; Marzluf y Fu, 1989). En bacterias, el caso mejor conocido es el de los enzimas respiratorios nitrato y nitrito reductasas de *E. coli*. Los genes estructurales de estos enzimas mapean en sitios diferentes del cromosoma (Mac Donald *et al.*, 1985; Jayaraman *et al.*, 1987; Stewart, 1988). Los datos que se tienen de los enzimas asimilatorios de bacterias son más escasos. Cali *et al.* y Bender *et al.* observaron en *Klebsiella pneumoniae* y *K. aerogenes* respectivamente, que la mayoría de los mutantes Nas^- (incapaces de asimilar nitrato) son también Nis^- (no pueden utilizar el nitrito como única fuente de nitrógeno). Estos autores discuten que pudiera existir un operón que agrupara a ambas reductasas y en el cual el gen de la nitrito reductasa estuviera detrás del de la nitrato reductasa.

3.2.6.3.Regulación del operón

Se ha descrito que la asimilación del nitrato en *Azotobacter vinelandii* se encuentra bajo el control *ntr* (Santero *et al.*, 1986; Toukdarian y Kennedy, 1986). La hipótesis, a nuestro juicio muy probable, de que los genes *nasA* y *nasB* son los que rigen la síntesis de las apoenzimas nitrito reductasa y nitrato reductasa, implicaba que estos genes debían encontrarse regulados por los genes *ntr*. El estudio de la expresión de las fusiones 10 y 12 en un fondo $NtrA^-$ y $NtrC^-$ indica que el operón no se transcribe si los genes *ntrA* y *ntrC* están mutados.

Las fusiones en *nasA*, por ejemplo FUS12, tienen una expresión inducible por nitrato (tabla XIV), como es de esperar de los genes estructurales de la nitrato y la nitrito reductasas, según los datos de regulación conocidos (Luque *et al.*, 1987).

Las mutaciones que eliminan la actividad de la nitrato reductasa originan simultáneamente expresión de la nitrito reductasa en ausencia de nitrato (apartado 3.2). En el caso de las fusiones se observa que aquellas que provocan pérdida de actividad nitrato reductasa dan lugar a expresión constitutiva de la actividad β -galactosidasa. Todo esto indica que el enzima nitrato reductasa ejerce un efecto de regulación sobre el promotor de la nitrito reductasa y, por tanto, sobre su propio promotor, puesto que hemos demostrado la existencia de un operón que incluye a ambos genes.

Casos de autorregulación de la nitrato reductasa han sido propuestos en otros organismos. Uno de los primeros fue sugerido por Cove (1976) en el hongo *Aspergillus nidulans*. Tomsett y Garrett (1981) también presentaron pruebas de control autógeno para la nitrato reductasa de *Neurospora crassa*. Fu y Marzluf (1988) mostraron claramente

que las mutaciones en el gen *nit-3* (gen estructural del apoenzima nitrato reductasa) de *N. crassa* daban lugar a expresión constitutiva desde su propio promotor, y proponen que la nitrato reductasa está implicada en un control autógeno y que este control podría ejercerse por unión de la nitrato reductasa, en ausencia de nitrato, al producto de *nit-4*, efector positivo para la expresión de los genes de la nitrato reductasa y la nitrito reductasa en este organismo. Un cambio en la conformación de la nitrato reductasa causado por la unión del nitrato podría liberar al producto de *nit-4* y permitir que activara la expresión de *nit-3*. Estos autores demuestran también constitutividad de *nit-3* en un mutante *nit-1*, afectado en el cofactor de molibdeno pero con apoenzima normal; esto lo explican suponiendo que el apoenzima puede tener una estructura diferente a la del holoenzima lo que impediría su actividad autorreguladora. Esta explicación es válida para el caso de nuestros mutantes de *Azotobacter nas-1*, y *nas-5*, presuntamente afectados en el cofactor de molibdeno y que expresan constitutivamente el gen de la nitrito reductasa.

En el alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* hay pruebas claras de que la entrada de nitrito y la actividad nitrito reductasa están reguladas por la propia nitrato reductasa (Galván *et al.*, 1992).

La autorregulación ejercida por la nitrato reductasa se perfila como una característica muy generalizada que se da tanto en hongos y algas unicelulares como en bacterias. Pascal *et al.* (1982) observaron que en *E. coli* las fusiones *narC-lacZ* se expresan constitutivamente en los mutantes *chlA*, *B* y *E*. Atribuyen a la nitrato reductasa un efecto represor sobre su propia síntesis, para lo cual necesita del cofactor de molibdeno. En el mismo sentido se pueden interpretar los resultados obtenidos por distintos autores en los que la nitrito reductasa se expresa constitutivamente en los mutantes *chl* (Griffiths y Cole,

1987; Jackson *et al.*, 1981; Macdonald *et al.*, 1985; Newman y Cole, 1978). Cali *et al.* (1989) en *Klebsiella pneumoniae* y Bender y Friedrich (1990) en *K. aerogenes* observan constitutividad en la expresión de los genes de la nitrato reductasa. Cali *et al.*, además de considerar la hipótesis de la autorregulación, mencionan la hipótesis de la existencia de un inductor gratuito (trazas de nitrato no metabolizado por no existir actividad de reducción de nitrato) que mantendría inducida la expresión desde el promotor del gen la nitrato reductasa. En nuestro caso hay dos datos que permiten descartar esta hipótesis: 1.-La fusión número 12 (en *nasA*) no se expresa constitutivamente, a pesar de que, al no haber actividad nitrato reductasa, el nitrito podría actuar como inductor gratuito. 2.-Lo mismo sucede en el caso de la mutación no polar de ICR en *nasA* (estirpe AS30).

La mutación de AS61 (*nasR*) no mapea en el operón *nasAB* ni se complementa por los genes *ntr* (Luque Vázquez, 1987). Esta mutación afecta simultáneamente a las actividades nitrato y nitrito reductasas. Esto nos hizo pensar en que pudiera tratarse de un gen regulador del sistema. Esta hipótesis queda confirmada por los datos de actividad β -galactosidasa de las fusiones en el operón *nasAB* (tabla XXIV), que no se expresan en un fondo *nasR*. Este gen ha sido clonado a partir de la genoteca (λ *nas3.1*) en los plásmidos pRM13 y pRM14 y está siendo objeto de estudios más profundos.

Hasta ahora se han identificado tres elementos reguladores del operón *nasAB*: el sistema *ntr*, el gen *nasR*, y la propia nitrato reductasa. La determinación del modo en el que operan los distintos reguladores, la jerarquía de actuación y su integración en un modelo de regulación se plantea como el siguiente objetivo de nuestro grupo.

3.2.6.4. Clonación de un gen semejante a *chlB*

En el apartado 3.2 se discutió como la existencia de varios loci *nas* podía explicarse porque uno de ellos correspondiese al gen estructural del apoenzima nitrato reductasa y el resto a genes implicados en la síntesis del cofactor de molibdeno necesario para la actividad de este enzima. Hemos presentado datos que apoyan el que el gen *nasB* sea el gen estructural del apoenzima y por tanto el resto de los loci, *nas-1*, *nas-4* y *nas-5*, serían necesarios para la síntesis del cofactor. Los experimentos presentados en el apartado 3.3.4.7 ponen de manifiesto que el locus *nas-5* incluye a un gen de función semejante a la del gen *chlB* de *E. coli*. Según se vio en la Introducción, este gen es necesario para la síntesis de un cofactor activo y al parecer su función es catalizar la incorporación de una molécula de GMP a la molibdopterina para dar lugar a molibdopterina guanina dinucleótido (MGD), que es la forma presente en la nitrato reductasa de *E. coli* y otros molibdoenzimas procarióticos (Crawford y Campbell, 1990).

3.3. ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS PROTEICOS INDUCIBLES POR NITRATO EN A. VINELANDII

En estos experimentos se empleó el método de la electroforesis bidimensional de proteínas en geles de poliacrilamida. La identificación de las proteínas se hizo bien por marcaje con metionina con ^{35}S , bien por tinción con nitrato de plata. El objetivo era observar la inducción de productos proteicos relacionados con la asimilación de nitrato, primero en la estirpe silvestre y luego en las mutantes.

3.3.1. Patrón electroforético de la estirpe silvestre

En primer lugar se trató de poner de manifiesto los productos asociados a la asimilación de nitrato en la estirpe UW136 mediante marcaje radioactivo. Para determinar las condiciones más adecuadas, se cultivó esta estirpe en un medio libre de nitrógeno (fijando nitrógeno atmosférico), se añadió amonio o nitrato y se marcó en diferentes momentos tras esta adición.

En un primer experimento se cultivó la estirpe UW136 de *A. vinelandii* en medio mínimo de Burk hasta que alcanzó la fase exponencial. En ese momento se dividió el cultivo en tres partes. Una continuó incubándose sin cambios, a otra se le añadió 1 g/l de ClNH_4 y a la última 0,8 g/l de NO_3K . Después de 4, 8, 12 o 18 horas de incubación se añadió metionina radioactiva y se incubó una hora más antes de hacer los extractos de proteínas que posteriormente se sometieron a electroforesis bidimensional. En las autorradiografías las diferencias más evidentes entre unas condiciones de cultivo y otras correspondieron a productos Nif, tales como los bien caracterizados NIFH, NIFD y NIFK. Estos son los productos que aparecen mayoritariamente en el patrón de esta estirpe cultivada en medio

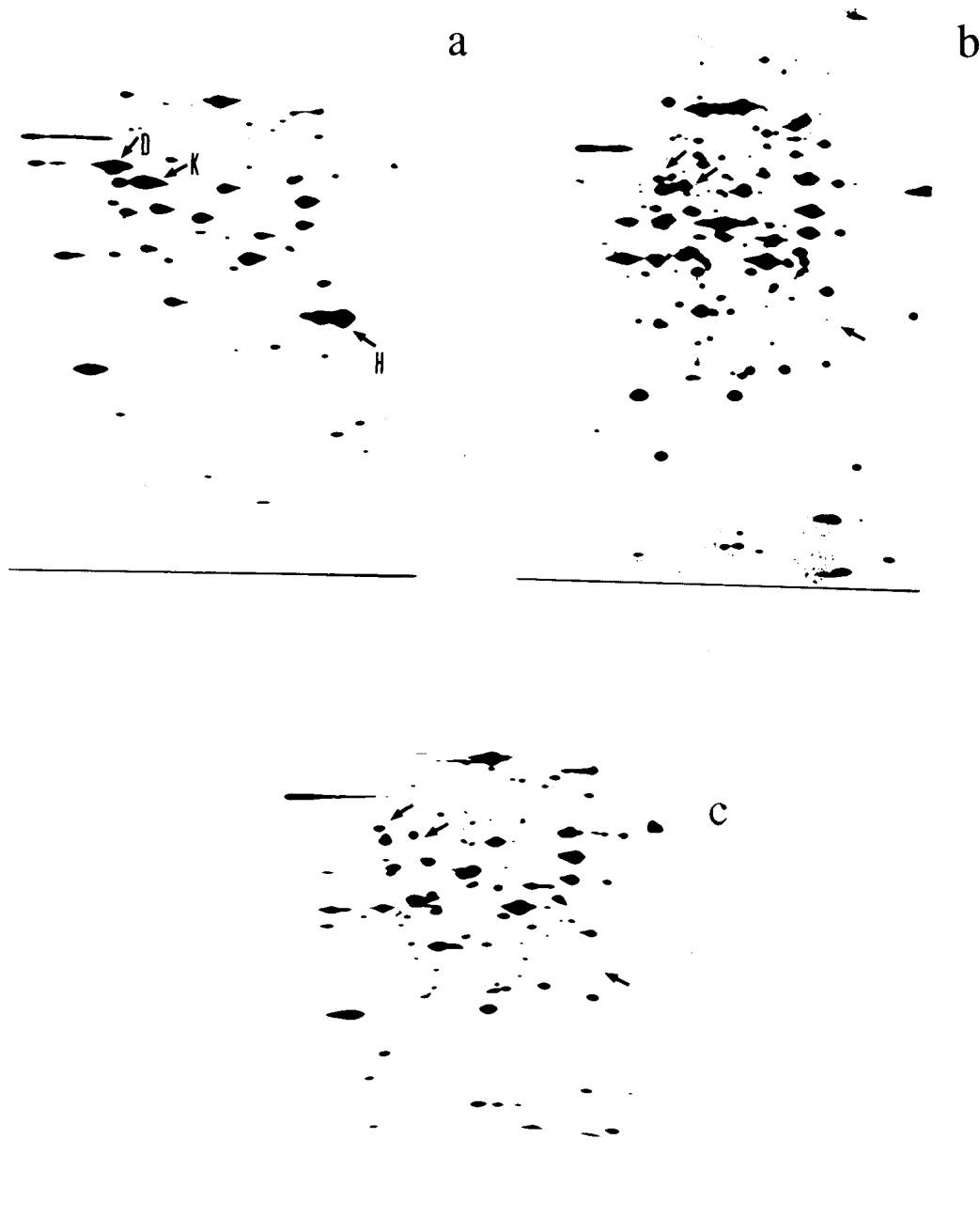


Figura 34. Autorradiografía del patrón electroforético bidimensional de la estirpe UW136 creciendo con dinitrógeno (a), amonio (b) o nitrato (c) y marcada tras 12 horas de incubación

Las flechas indican las posiciones de NIFH, D y K. Para cada gel la primera dimensión es el isoelectroenfoco (de izquierda a derecha, de pH 6,7 a 4,5) y la segunda dimensión separa por tamaños (de arriba a abajo, de mayor a menor). De igual modo se hicieron el resto de las electroforesis bidimensionales presentadas en este capítulo.

mínimo sin adición de nitrato ni amonio. En el caso de los cultivos a los que se añadió amonio la represión de productos Nif era ya total a las 4 horas de incubación. Para los cultivos con nitrato la represión no ocurrió hasta las 12 horas y a las 18 horas se observó una desrepresión quizás debida al agotamiento del nitrato del medio. La represión de los productos Nif en nitrato tras 12 horas indicaba que los enzimas nitrato y nitrito reductasa debían estar presentes y activos y por ello se pensó que estas eran condiciones adecuadas para observar los productos necesarios para la asimilación de nitrato. Sin embargo los pocos productos inducibles que se observaron en estas condiciones resultaron ser productos que se inducen también por amonio y por tanto no pertenecen al sistema asimilador de nitrato (figura 34).

En una segunda serie de experimentos se hizo el marcaje al poco tiempo de la adición de nitrato o amonio. Las condiciones iniciales fueron las mismas que en el párrafo anterior pero la metionina se añadió tras 0, 1 y 2 horas de incubación con nitrato, amonio o nada. En esta ocasión fue más fácil apreciar la aparición de productos en el patrón electroforético de la estirpe silvestre incubada con nitrato que no estaban en el patrón de la estirpe incubada con amonio o fijando nitrógeno, especialmente si el marcaje se realizaba en la primera hora de incubación (figura 35). Tras varias repeticiones del mismo experimento se observaron dos productos inducibles por nitrato, uno de ellos muy apreciable.

Mediante comparación con marcadores de peso molecular y medidas de pH a lo largo del gel utilizado en la primera dimensión, fue posible obtener unos valores aproximados de peso molecular y punto isoeléctrico de los dos polipéptidos inducibles por nitrato. El primero tenía un peso de unos 80 kDa y un punto isoeléctrico de 6,2. Este

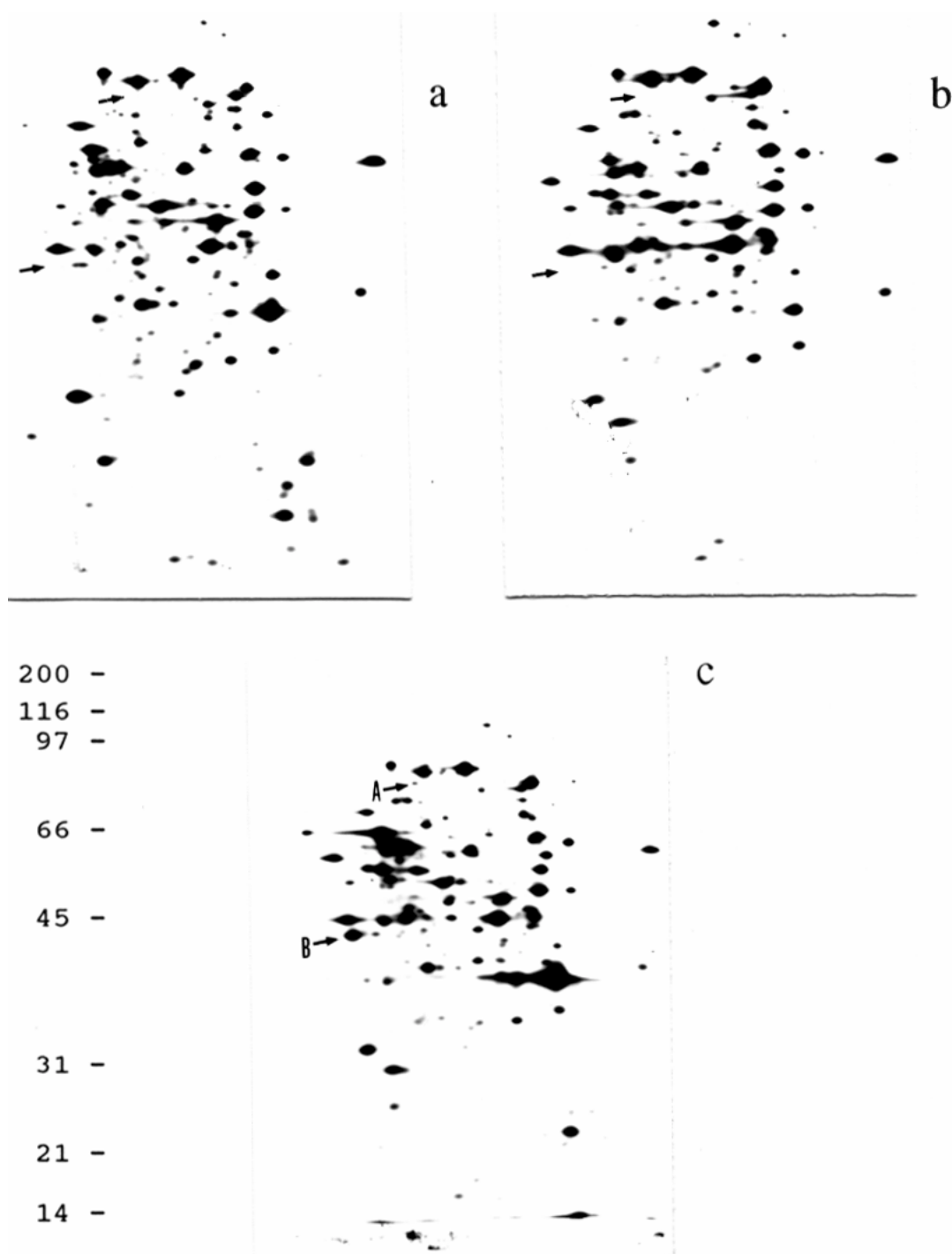


Figura 35. Autorradiografía del patrón electroforético de la estirpe UW136 creciendo en dinitrógeno(a), amonio(b) o nitrato(c).

El marcaje se realizó tras una hora de incubación. Las flechas señalan productos inducibles por nitrato. Al margen de la foto (c) se indican los patrones de peso molecular en kDa.

producto se observaba con dificultad en las autorradiografías debido al pequeño tamaño de la mancha y a la cercanía de otros polipéptidos que se encontraban en mayor cantidad. El segundo producto poseía un peso molecular de 40 kDa y un punto isoeléctrico de 6,4; se observaba con bastante facilidad por dar lugar, en estas condiciones, a una mancha bastante grande en las autorradiografías.

Se estudió también el patrón electroforético de la estirpe silvestre sin utilizar marcaje radioactivo, mediante tinción con nitrato de plata. En estos experimentos los extractos de proteínas se hicieron tras cultivar la estirpe UW136 durante 12 horas en un medio con amonio, con nitrato o fijando nitrógeno. Los resultados confirman la aparición, únicamente en presencia de nitrato, del polipéptido de 40 kDa. Sin embargo no es posible observar el polipéptido de 80 kDa.

3.3.2. Patrón de los mutantes *ntrA* y *ntrC*

Las estirpes MV511 (*ntrC*) y MV724 (*ntrA*) se sometieron al mismo proceso que la estirpe silvestre en las condiciones en que se inducían los productos descritos en el apartado anterior. El polipéptido de 80 kDa no apareció en el patrón de ninguna de las dos estirpes. El polipéptido de 40 kDa no se inducía en MV724 y se inducía poco en MV511 (figura 36).

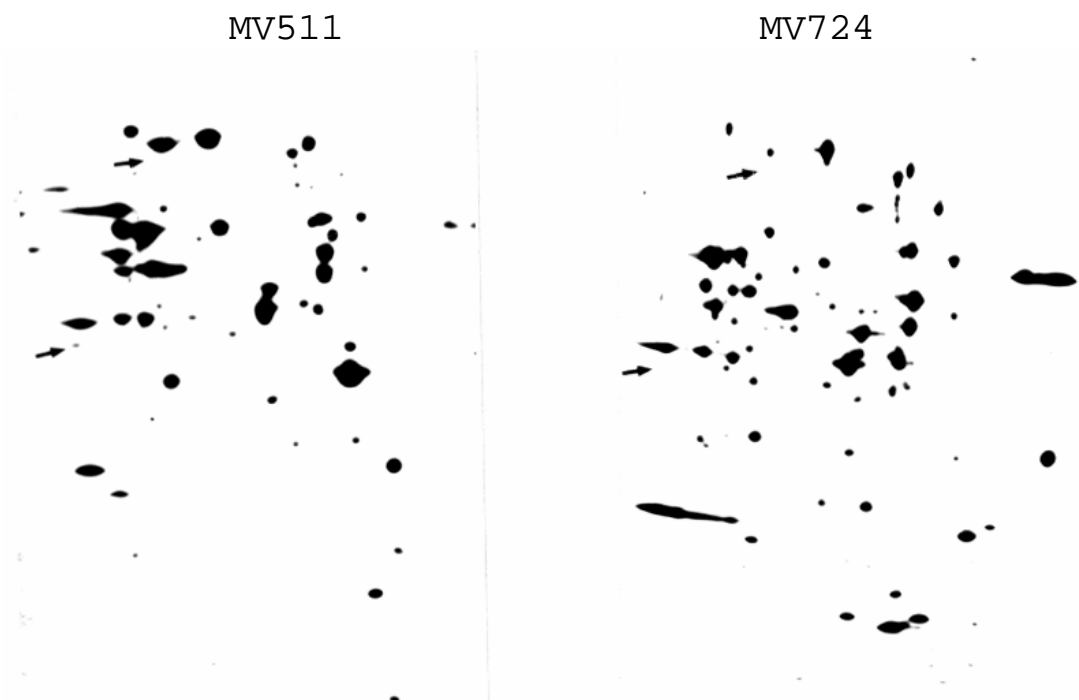


Figura 36. Patrón electroforético de las estirpes MV511 y MV724 creciendo en nitrato. Las flechas indican la posición de los productos inducibles por nitrato en la estirpe silvestre

3.3.3. Patrón electroforético de otros mutantes afectados en la asimilación de nitrato

Los mutantes de ICR AS236 (*nasA*), AS237 (*nasB*) y AS238 (*nasR*) se estudiaron de igual modo que los mutantes del apartado anterior. En la figura 37 se muestran los patrones de estas estirpes incubadas con y sin nitrato. Se observa que el producto de 80 kDa no aparece en AS236 ni en AS238. En cambio aparece en AS237 tanto con nitrato como

sin nitrato. Por su parte, el producto de 40 kDa aparece sólo en el patrón de la estirpe AS236 cultivada con nitrato.

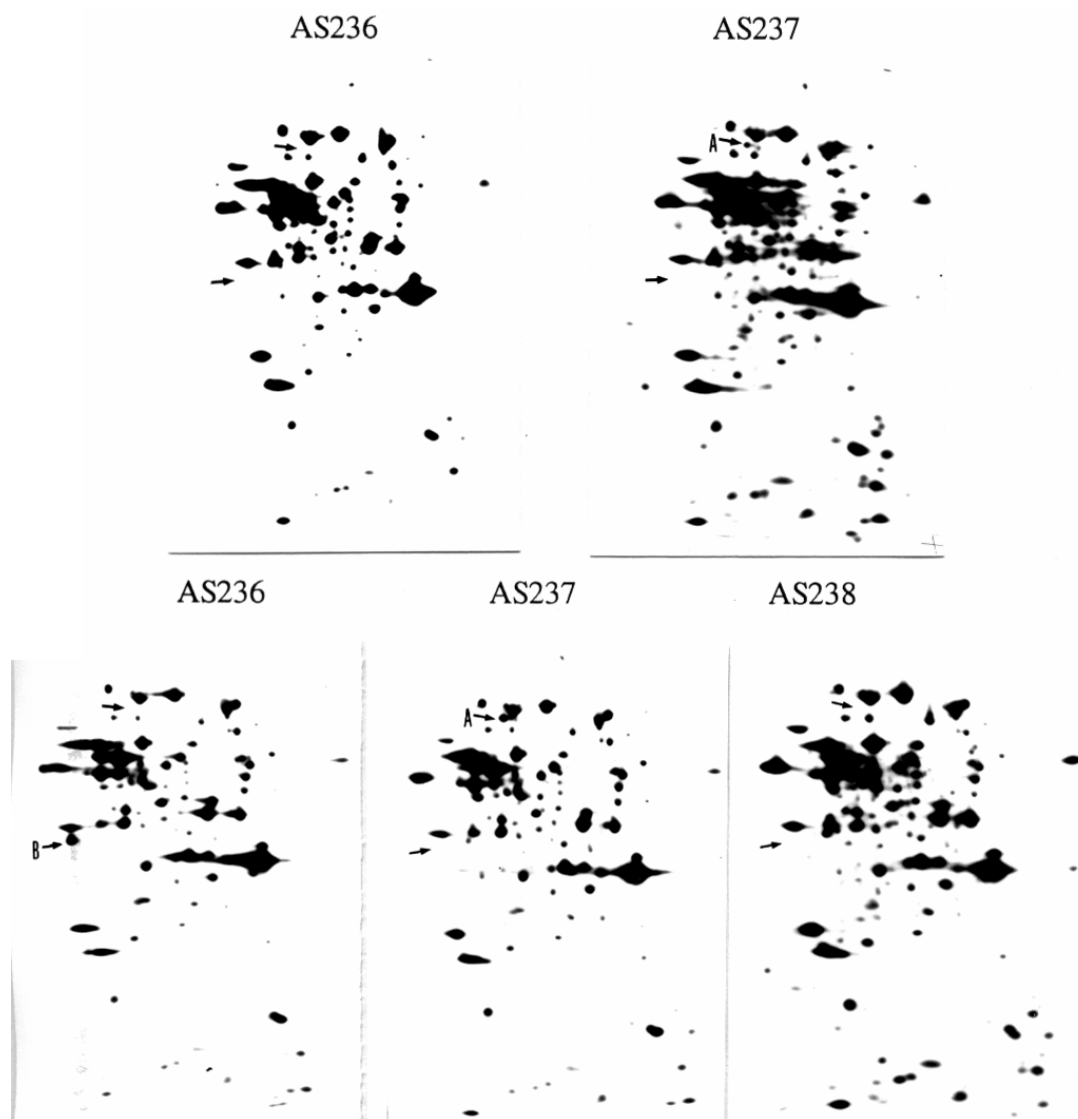


Figura 37. Autorradiografía del patrón electroforético de las estirpes AS236 (a), AS237 (b) y AS238 (c) creciendo sin nitrato (fotos superiores) o con nitrato (fotos inferiores).

Las flechas indican la posición de los productos inducibles por nitrato en la estirpe silvestre. Los marcajes radioactivos se hicieron tras una hora de incubación con nitrato (ver texto). Para el patrón de pesos moleculares ver figura 34.

Mediante tinción con plata, se estudió el patrón electroforético de los mutantes $Nas^- Nis^+$ obtenidos por mutagénesis con Tn5 (mutaciones *nas-1*, *nas-3=nasB*, *nas-4* y *nas-5*). El patrón era idéntico en todos los casos (figura 38). No aparecía el polipéptido de 40 kDa (el de 80 kDa no se observa mediante esta técnica ni siquiera en la estirpe silvestre según se explicó antes).

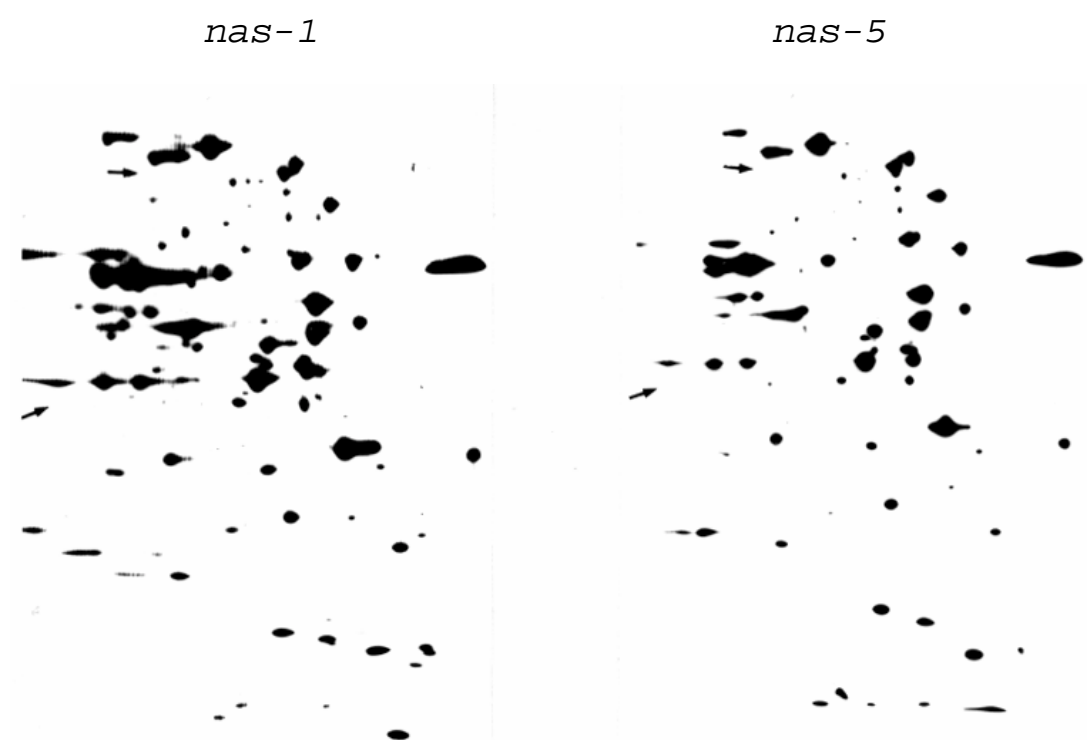


Figura 38. Patrón electroforético bidimensional de algunas de las estirpes $Nas^- Nis^+$ de Tn5 tras 12 horas de crecimiento en un medio con nitrato (las otras tenían el mismo patrón)

Las flechas indican la posición de las manchas inducibles por nitrato en la estirpe silvestre

3.3.4. Asociación de la actividad nitrato reductasa al polipéptido de 40 kDa

Con objeto de apoyar o desmentir la hipótesis de que el polipéptido de 40 kDa fuese un componente del enzima nitrato reductasa se trató de purificar parcialmente este enzima para luego observar si, entre las proteínas mayoritarias producto de esta purificación, se encontraba la que se había detectado en las electroforesis bidimensionales.

Se partió de un extracto inducido y activo de la estirpe silvestre y se sometió a electroforesis en minigel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes según se describe en Materiales y Métodos. Tras la electroforesis se cortó el gel en tiras de 1,5 mm de grosor. Cada tira se dividió en dos partes. Una de ellas se congeló y la otra se incubó en la mezcla de ensayo de la actividad nitrato reductasa. Se midió la producción de nitrito en cada una de las mezclas. Sólo se detectó nitrito en los ensayos correspondientes a tres tiras que estaban adyacentes en el gel. Se electroeluyó la proteína de la parte congelada de una de estas tiras. Las proteínas electroeluidas se sometieron a electroforesis bidimensional en minigeles. En la figura 39 se muestra el patrón electroforético del extracto proteico completo y el de las proteínas electroeluidas. La comparación entre ambos patrones demuestra la presencia de la proteína inducible de 40 kDa entre los siete polipéptidos mayoritarios obtenidos a partir de la banda activa del gel no desnaturizante.

a



b

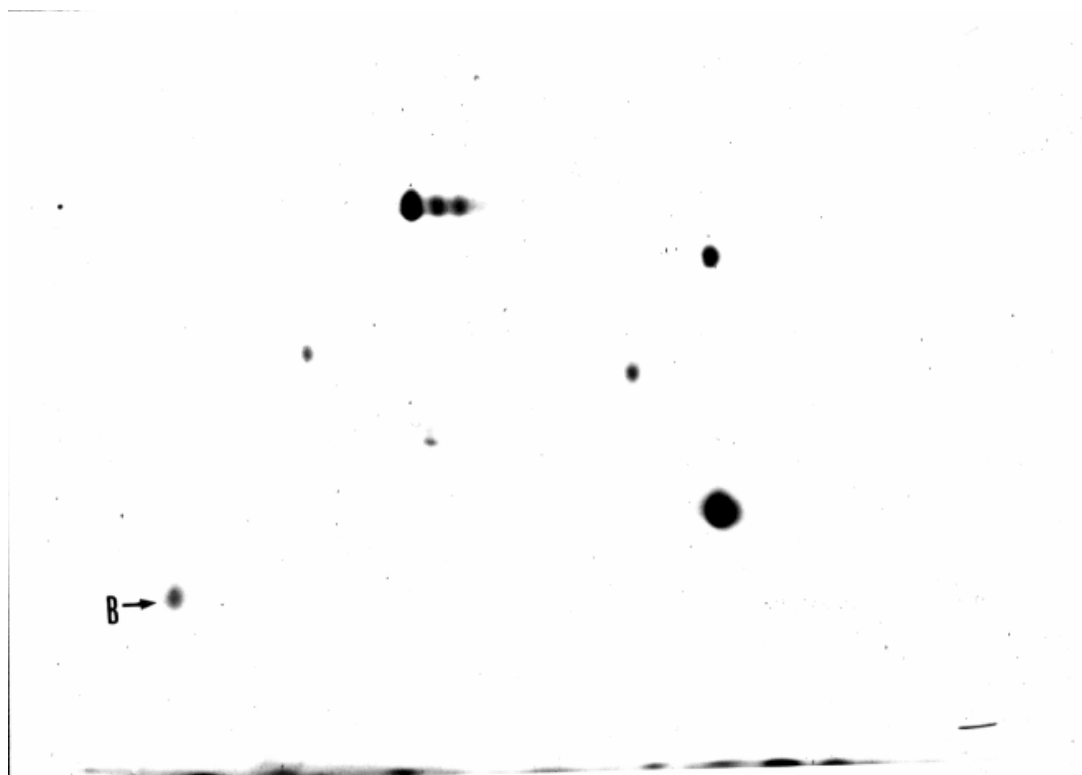


Figura 39. Electroforesis bidimensionales en minigeles. (a) Extracto completo de la estirpe silvestre. (b) Proteínas electroeluidas de un fragmento de gel con actividad nitrato reductasa. La flecha indica la proteína inducible de 40 kDa

3.3.5. Expresión de *nasAB* en *E. coli*

Para estos experimentos se empleó el sistema del promotor dependiente de ARN polimerasa de T7 y se marcaron radioactivamente los productos proteicos de interés (ver Materiales y Métodos). Se trató de observar los productos proteicos de *nasA* y *nasB* y para ello se emplearon los plásmidos pRM12, pRM20 y pRM21 (figura 40). El vector (pTZ19R) se empleó como testigo para observar el marcaje de la β -lactamasa, proteína que debía aparecer también a partir de los otros tres plásmidos.

En un primer experimento se empleó como receptor la estirpe NCM632 (NCM631/plySE) y, tras inducir con IPTG la expresión de la ARN polimerasa de T7 (cuyo gen está clonado bajo el P_{lac} , inducible por IPTG) sólo se obtuvo marcaje de la β -lactamasa de pTZ19R, mientras que con pRM12, pRM20 y pRM21 no se consiguió expresión dependiente de T7.

En un segundo experimento se empleó la estirpe NCM631/pIZ227. Este plásmido lleva el gen del represor de P_{lac} , promotor bajo el que está clonado el gen de la ARN polimerasa de T7 en NCM631, y por tanto mantiene unos niveles basales de ARN polimerasa de T7 muy bajos. En esta ocasión se consiguió el marcaje de la β -lactamasa en los tres plásmidos. Además se marcó una banda de unos 80 kDa con pRM20 y una banda de unos 70 kDa con pRM12 (figura 41).

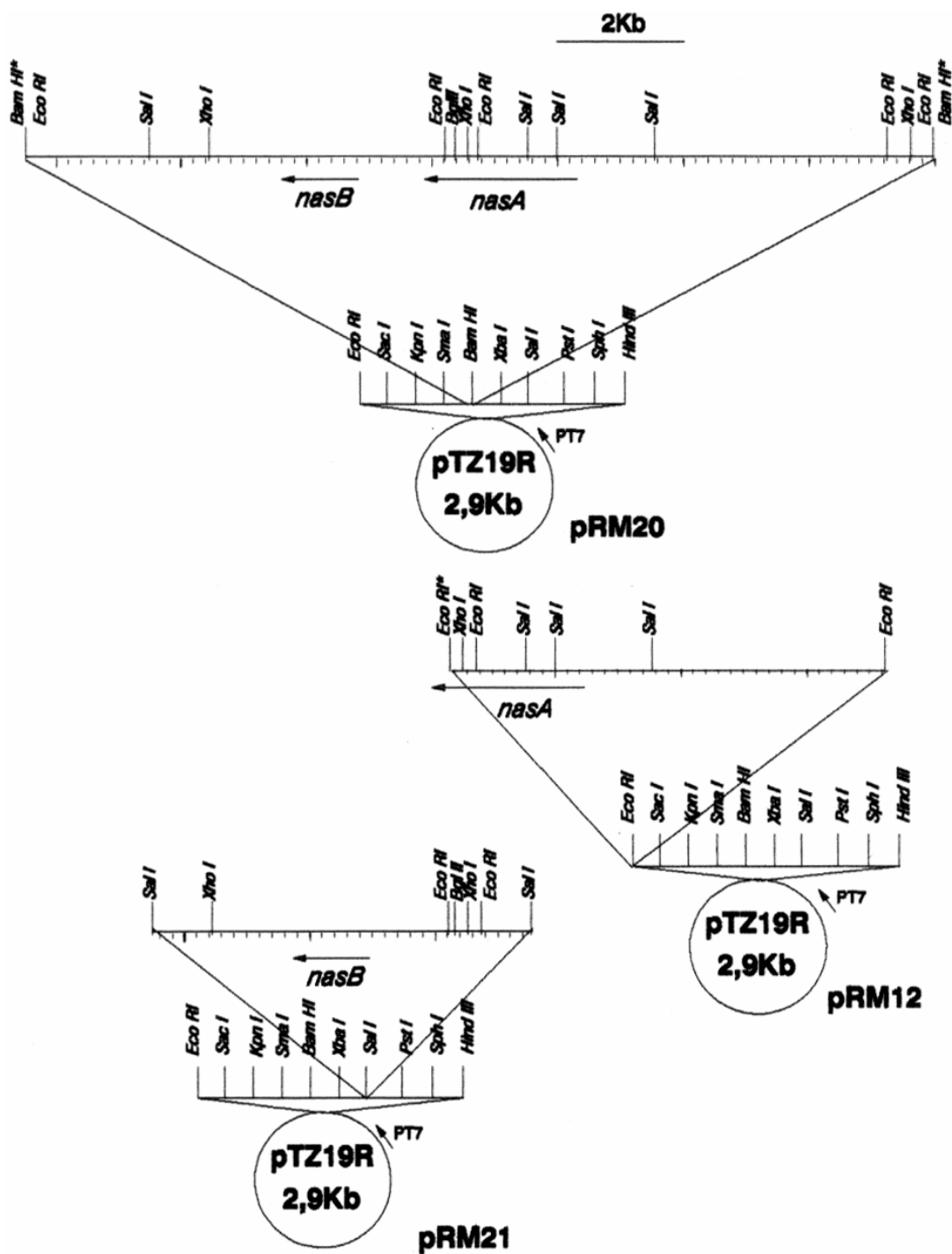


Figura 40. Mapas de restricción de los plásmidos pRM12, pRM20 y pRM21. Las dianas marcadas con * proceden del vector de la genoteca (λ GEM12), no del ADN de *A. vinelandii*

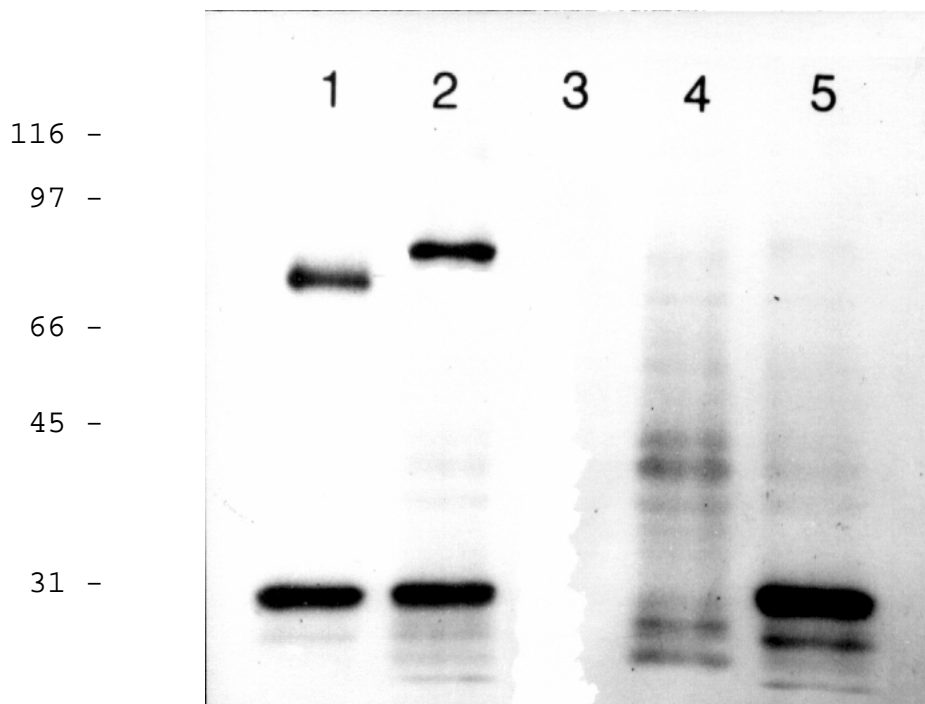


Figura 41. Expresión de *nasaA* por la ARN polimerasa de T7.

Cada carril contiene extractos proteicos preparados, marcados, sometidos a electroforesis y autorradiografiados según se indica en Materiales y Métodos y en el texto de este apartado. Los extractos procedían de las siguientes estirpes de *E. coli*: carril 1: NCM631/pIZ227/pRM12; carril 2: NCM631/pIZ227/pRM20; carril 3: vacío; carril 4: NCM631/pIZ227; carril 5: NCM631/pIZ227/pRM21. La banda de inferior tamaño que aparece marcada se corresponde con la β -lactamasa del vector (pTZ19R). Al margen se indica el patrón de pesos moleculares en kDa.

3.3.6. Discusión

En este apartado nos hemos centrado en la caracterización de productos proteicos implicados en la asimilación de nitrato en *Azotobacter vinelandii*. Estos deben ser productos minoritarios en el total de proteínas de la célula puesto que las electroforesis en poliacrilamida-SDS en una sola dimensión de extractos de la estirpe UW136 cultivada con diferentes fuentes de nitrógeno no permitieron apreciar la aparición de bandas inducibles por nitrato (datos no mostrados). Por ello se recurrió a la técnica de la electroforesis bidimensional, que en la primera dimensión separa las proteínas según su punto isoeléctrico y en la segunda por su peso molecular. Se trata de una técnica muy potente para el examen de muestras complejas de proteínas que permite resolver incluso 1500 proteínas en un solo gel.

Los experimentos realizados han mostrado la existencia de dos polipéptidos inducibles por nitrato, uno de ellos sólo se ha visto mediante marcaje radioactivo. Además de la posible limitación de la técnica, es posible que realmente no haya muchos productos que se induzcan con nitrato. De hecho en *Azotobacter vinelandii* sólo se ha demostrado la existencia de dos enzimas que requieren la adición de nitrato al medio de cultivo para manifestar su actividad; y estos son precisamente los que realizan los dos pasos de reducción del nitrato hasta amonio: la nitrato reductasa y la nitrito reductasa.

Sobre la función de estos dos polipéptidos, la hipótesis más probable es la de que estén implicados en la asimilación de nitrato como elementos estructurales de uno de los dos enzimas del sistema. Los experimentos con mutantes en los genes reguladores *ntrA*, *ntrC* y *nasR*, demuestran que es necesaria la integridad de los tres genes

para que se produzca la inducción normal de los dos polipéptidos, de manera paralela a lo que ocurre con las actividades enzimáticas de reducción de nitrato y de nitrito y a lo que ocurre con la expresión del operón *nasAB*, según veíamos en el capítulo 3.3. Es muy probable, por tanto, que los dos polipéptidos sean producto del propio operón *nasAB*.

La función de ambos polipéptidos se puede centrar aún más teniendo en cuenta los patrones electroforéticos de los mutantes AS236 (*nasA*) y AS237 (*nasB*). El primero de estos mutantes carece de actividad nitrito reductasa pero posee actividad nitrato reductasa normal, y en las electroforesis se ve que no induce el polipéptido de 80 kDa pero sí el de 40 kDa. Por su parte AS237 carece de actividad nitrato reductasa pero tiene actividad nitrito reductasa incluso en ausencia de inductor; paralelamente vemos que no induce el polipéptido de 40 kDa y en cambio presenta el polipéptido de 80 kDa incluso en ausencia de nitrato. Todos estos datos apoyan la hipótesis de que el polipéptido de 80 kDa sea producto del gen *nasA*, implicado específicamente en la reducción de nitrito, y que el polipéptido de 40 kDa sea el producto del gen *nasB*, implicado específicamente en el paso de reducción de nitrato hasta nitrito.

Un apoyo de la hipótesis enunciada para el polipéptido de 40 kDa está en el experimento que se presenta en el apartado 3.4.4. Entre los siete productos mayoritarios que se obtienen de una banda con actividad nitrato reductasa se encuentra el polipéptido mencionado, que es además el único de los siete que se había caracterizado anteriormente como inducible por nitrato.

Resulta en principio sorprendente que los cuatro mutantes $Nas^- Nis^+$ de Tn5 carezcan del polipéptido de 40 kDa cuando solamente uno de ellos tiene mutado el gen *nasB*.

Es posible que la unión al cofactor sea necesaria para mantener la estabilidad estructural del apoenzima y que por tanto, cuando falta el cofactor no sea posible detectar el apoenzima en geles. Existe al menos un antecedente de inestabilidad de un apoenzima en ausencia de su cofactor. Es el caso de otro molibdoenzima, la formiato deshidrogenasa N de *E. coli* (Giordano *et al.*, 1980; Terrier *et al.*, 1981). Los resultados de análisis inmunológicos demuestran que el apoenzima no se acumula ni cuando no se puede unir a su cofactor ni en el caso de los mutantes en otro gen que no tiene nada que ver con el estructural, el gen *fdhA* (necesario para la entrada o el metabolismo del selenio).

Los últimos experimentos presentados constituyen un apoyo muy fuerte a la hipótesis de que el polipéptido de 80 kDa, observado en las bidimensionales, sea efectivamente el producto del gen *nasA*, probable gen de la nitrito reductasa. El sistema del promotor dependiente de la ARN polimerasa de T7 permite la expresión específica de los genes clonados bajo el promotor adecuado. Sabíamos que pRM20 era portador de los genes *nasA* y *nasB*, pRM21 llevaba el gen *nasB* completo y el final de *nasA* y pRM12 llevaba una región contenida en pRM20 si bien le faltaba un fragmento del final de *nasA*. En los tres casos, la orientación en que habían sido clonados estos fragmentos permitía la expresión de *nasAB* desde el promotor dependiente de la ARN polimerasa de T7 de pTZ19R.

En el primer experimento no hubo marcaje de los productos de estos plásmidos. La expresión basal del gen de la ARN polimerasa de T7 debía ser suficiente para dar lugar a una producción, letal para *E. coli*, de proteínas de *A. vinelandii*, lo que obligaría a la pérdida o modificación de los plásmidos correspondientes (Ausubel *et al.*, 1991).

En el segundo experimento se mantuvo un nivel basal de ARN polimerasa de T7 mucho más bajo, lo que permitió la estabilidad de los plásmidos en *E. coli*. La inducción posterior con IPTG dio lugar a la aparición de un producto de 80 kDa a partir de pRM20. El plásmido pRM20 lleva un fragmento muy grande de ADN de *A. vinelandii*, que podría contener otros genes, además de *nasAB*, sin embargo la aparición de un producto de unos 70 kDa a partir de pRM12, al que le falta un fragmento del final de *nasA*, demuestra que el polipéptido de 80 kDa obtenido de pRM20 es el producto de *nasA*.

No fue posible sin embargo observar la expresión del producto de *nasB* ni la de otros posibles genes del operón. Es posible que *nasB* de lugar a una proteína muy inestable o bien muy tóxica para *E. coli* incluso con los bajos niveles de expresión que se esperan en NCM631/pIZ227 antes de añadir IPTG, lo que haría que el gen sufriera mutaciones para poder mantenerse en *Escherichia* (Ausubel *et al.*, 1991).

4 . CONCLUSIONES

1^a.-Los genes *nasA* y *nasB*, aislados a partir de una genoteca de *Azotobacter vinelandii*, son, presuntamente, los genes estructurales para los apoenzimas de la nitrito reductasa y de la nitrato reductasa. Ambos genes forman parte de una misma unidad transcripcional en la que *nasA* se transcribe antes que *nasB*.

2^a.-El operón *nasAB* está autorregulado: la nitrato reductasa, bien directamente, bien a través de un intermediario, reprime la transcripción del operón en ausencia de inductor.

3^a.-El gen *nasR* es un nuevo gen regulador necesario para la inducción del sistema asimilador de nitrato en *A. vinelandii*.

4^a.-Existen genes exclusivamente necesarios para la actividad del enzima nitrato reductasa diferentes a *nasB*. Uno de ellos se ha clonado y tiene una función semejante a la del gen *chlB* de *Escherichia coli*, implicado en la síntesis del cofactor de molibdeno, necesario para la actividad nitrato reductasa.

5^a.-Un polipéptido de 40 KDa y punto isoeléctrico 6,4 está implicado en el paso de reducción de nitrato a nitrito y es, probablemente, un producto del operón *nasAB*.

6^a.-Un polipéptido de 80 KDa y punto isoeléctrico 6,2 está implicado en la reducción del nitrito y es el producto del gen *nasA*.

5 . BIBLIOGRAFÍA

Abe, N., Y. Maruyama y K. Onodera, 1990. Analysis of nitrogenase reaction using monoclonal antibodies against α -subunit of component I of *A. vinelandii*. En: Nitrogen Fixation Developments in Plant and Soil Sciences. Vol. 48, pp. 37-42. Ed. M. Polsinelli, R. Materassi y M. Vincenzini. Kluwer Academic Publ.

Allison, C. y G.T. McFarlane, 1989. Dissimilatory nitrate reduction by *Propionibacterium acnes*. Appl. Environ. Microbiol., **55**: 2899-2903.

Ames, B.N. y H.J. Whitfield, 1966. Frameshift mutagenesis in *Salmonella*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **31**: 221-225.

Arai, H., Y. Igarashi y T. Kodama, 1991. Nitrite activates the transcription of the *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase and cytochrome c_{551} operon under anaerobic conditions. FEBS Letters, **228**: 227-228.

Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith y K. Struhl, 1989. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York.

Baker, K.P. y D.H. Boxer, 1991. Regulation of the *chIA* locus of *Escherichia coli* K12: involvement of molybdenum cofactor. Mol. Microbiol., **5**: 901-907.

Bali, A., G. Blanco, S. Hill y C. Kennedy, 1992. Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. Appl. Envir. Microbiol., **58**: 1711-1718.

Barea, J.M. y M.G. Brown, 1974. Effect of plant growth produced by *Azotobacter paspali* related to synthesis of

plant growth regulating substances. J. Appl. Bacteriol., **37**: 583-593.

Bender, R.A. y B. Friedrich, 1990. Regulation of assimilatory nitrate reductase formation in *Klebsiella aerogenes* W70. J. Bacteriol., **172**: 7256-7259.

Benoist, P. y J. Schwencke, 1990. Native agarose-polyacrylamide gel electrophoresis allowing the detection of aminopeptidase, dehydrogenase, and esterase activities at the nanogram level: enzymatic patterns in some *Frankia* strains. Anal. Biochem., **187**: 337-344.

Bishop, P.E., M.A. Supiano, W.J. Brill, 1977. Technique for isolating phage for *Azotobacter vinelandii*. Appl. Environ. Microbiol., **33**: 1007-1008.

Bishop, P.E., D.M.L. Jarlenski y D.R. Hetherington, 1980. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**: 7342-7346.

Bishop, P.E., M.E. Hawkins y R.R. Eady, 1986a. N₂-fixation in Mo-deficient continuous culture of a strain of *Azotobacter vinelandii* carrying a deletion of the structural genes for nitrogenase (*nifHDK*). Biochem. J., **238**: 437-442.

Bishop, P.E., R. Premakumar, D.R. Dean, M.R. Jacobson, J.R. Chisnell, 1986b. Nitrogen fixation for *Azotobacter vinelandii* strains having deletions in structural genes for nitrogenase. Science, **232**: 92-94.

Blanco Sicre, G., 1989. Construcción de un mapa de ligamiento de *Azotobacter vinelandii*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

Blanco, G., F. Ramos, J.R. Medina y M. Tortolero, 1990. A chromosomal linkage map of *Azotobacter vinelandii*. Mol. Gen. Genet., **224**: 241-247.

Blanco, G., J.C. Gutiérrez, F. Ramos y M. Tortolero, 1991a. Isolation and characterization of R-primes of *Azotobacter vinelandii*. FEMS Microbiol. Lett., **80**: 213-216.

Blanco, G., F. Ramos, J.R. Medina, J.C. Gutiérrez y M. Tortolero, 1991b. Conjugal retrotransfer of chromosomal markers in *Azotobacter vinelandii*. Current Microbiol., **22**: 241-246.

Blasco, F., C. Iobbi, G. Giordano, M. Chipaux y V. Bonnefoy, 1989. Nitrate reductase of *Escherichia coli*: completion of the nucleotide sequence of the nar operon and reassessment of the role of the a and b subunits in iron binding and electron transfer. Mol. Gen. Genet., **218**: 249-256.

Blasco, F., C. Iobbi, J. Ratouchniak, V. Bonnefoy y M. Chipaux, 1990. Nitrate reductases of *Escherichia coli*: Sequence of the second nitrate reductase and comparison with that encoded by the narGHJI operon. Mol. Gen. Genet., **222**: 104-111.

Blasco, F., F. Nunzi, J. Pommier, R. Brasseur, M. Chippaux y G. Giordano, 1992a. Formation of active heterologous nitrate reductases between nitrate reductases A and Z of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol., **6**: 209-219.

Blasco, F., J. Pommier, V. Augier, M. Chippaux y G. Giordano, 1992b. Involvement of the narJ o narW gene

product in the formation of active nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **6**: 221-230.

Blum, H., H. Beier y H.J. Gross, 1987. *Electrophoresis*, **8**: 93-99.

Bothe, H. y K.-P. Häger, 1981. Electron transport to assimilatory nitrate reductase in *Azotobacter vinelandii*. *Z. Naturforsch.*, **36**: 1030-1035.

Bravo, R., 1984. Two-dimensional gel electrophoresis: a guide for the beginner. En: *Two-dimensional gel electrophoresis of proteins*, pp. 3-37.

Brock, T.D. y M.T. Madigan, 1988. *Biology of microorganisms*. Ed. Prentice-Hall, New Jersey. pp. 572-631.

Bueno R., G. Pahel y B. Magasanik, 1985. Role of *glnB* and *glnD* products in regulation of the *glnALG* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **164**: 816-822.

Burger, G., J. Strauss, C. Scazzocchio y B.F. Lang, 1991a. *nirA*, the pathway-specific regulatory gene of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*, encodes a putative Gal4-type zinc finger protein and contains four introns in highly conserved regions. *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 5746-5755.

Burger, G., J. Tilburn y C. Scazzochio, 1991b. Molecular cloning and functional characterization of the pathway-specific regulatory gene *nirA*, which controls nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 795-802.

Cali, B.M., J.L. Micca y V. Stewart, 1989. Genetic regulation of nitrate assimilation in *Klebsiella*

pneumoniae M5al. J. Bacteriol., **171**: 2666-2672.

Candau, P., 1979. Purificación y propiedades de la ferredoxina-nitrato reductasa de la cianobacteria *Anacystis nidulans*. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.

Contreras de Vera, A., 1986. Análisis genético con transposones en *Azotobacter vinelandii*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

Contreras, A. y J. Casadesús, 1987. Tn10 mutagenesis in *Azotobacter vinelandii*. Mol. Gen. Genet., **209**: 276-282.

Contreras, A., M. Drummond, A. Bali, G. Blanco, E. García, G. Bush, Ch. Kennedy y M. Merrick, 1991a. The product of the nitrogen fixation regulatory gene *nfrX* of *Azotobacter vinelandii* is functionally and structurally homologous to the uridylyltransferase encoded by *glnD* in enteric bacteria. J. Bacteriol., **173**: 7741-7749.

Contreras, A., R. Maldonado y J. Casadesús, 1991b. Tn5 mutagenesis and insertion replacement in *Azotobacter vinelandii*. Plasmid, **25**: 76-80.

Cove, D.J., 1976. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*. Study of mutants altered in nitrate assimilation. Mol. Gen. Genet., **145**: 147-159.

Coyne, M.S., A. Arunakumari, B.A. Averill y J.M. Tiedje, 1989. Immunological identification and distribution of dissimilatory heme *cd*₁ and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. Appl. Environ. Microbiol., **55**: 2924-2931.

Crawford, N.M. y W.H. Campbell, 1990. Fertile fields.

Plant Cell, **2**: 829-835.

Chisnell, J.R., R. Premakumar y P.E. Bishop, 1988. Purification of a second alternative nitrogenase from a *nifHDK* deletion strain of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol., **170**: 27-33.

Choe, M. y W.S. Reznikoff, 1991. Anaerobically expressed *Escherichia coli* genes identified by operon fusion techniques. J. Bacteriol., **173**: 6139-6146.

Chung, C.T., S.L. Niemela y R.H. Miller, 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**: 2172-2175.

Davies, K.J.P., D. Lloyd y L. Boddy, 1989. The effect of oxygen on denitrification in *Paracoccus denitrificans* and *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol., **135**: 2445-2451.

DeMoss, J.A. y P.-Y. Hsu, 1991. NarK enhances nitrate uptake and nitrite excretion in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **173**: 3303-3310.

Doran, J.L. y W.J. Page, 1983. Heat sensitivity of *Azotobacter vinelandii* genetic transformation. J. Bacteriol., **155**: 159-168.

Drummond, M., J. Clements, M. Merrick y R. Dixon, 1983. Positive control and autogenous regulation of the *nifLA* promoter in *Klebsiella pneumoniae*. Nature, **301**: 302-307.

Dzandu, J.K., M.E. Deh, D.L. Barratt y G.E. Wise, 1984. Detection of erythrocyte membrane proteins, sialoglycoproteins, and lipids in the same polyacrylamide

gel using a double-staining technique. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**: 1733-1737.

Egan, S.M. y V. Stewart, 1990. Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *narX* deletion mutants of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol., **172**: 5020-5029.

Egan, S.M. y V. Stewart, 1991. Mutational analysis of nitrate regulatory gene *narL* in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol., **173**: 4424-4432.

Espin, G., A. Álvarez-Morales y M. Merrick, 1981. Complementation analysis of *glnA*-linked mutations which affect nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*. Mol. Gen. Genet., **184**: 213-217.

Espin, G., A. Álvarez-Morales, F. Cannon, R. Dixon y M. Merrick, 1982. Cloning of the *glnA*, *ntrB* y *ntrC* genes of *Klebsiella pneumoniae* and studies of their role in regulation of the nitrogen fixation (*nif*) gene cluster. Mol. Gen. Genet., **186**: 518-524.

Figurski, D.H. y D.R. Helinski, 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **76**: 1648-1652.

Fisher, R.J. y W.J. Brill, 1969. Mutants of *Azotobacter vinelandii* unable to fix nitrogen. Biochim. Biophys. Acta, **184**: 99-105.

Flores, E., J.L. Ramos, A. Herrero y M.G. Guerrero, 1983. Nitrate assimilation by cyanobacteria. En: Photosynthetic Prokaryotes: Cell Differentiation and Function (G.C. Papageorgiou y L. Parker, eds.), pp. 363-387. Elsevier,

Amsterdam.

Frischauf, A., H. Lehrach, A. Poustka y N. Murray, 1983.
J. Mol. Biol., **170**: 827.

Fu, Y.-H. y G.A. Marzluf, 1988. Metabolic control and autogenous regulation of *nit-3*, the nitrate reductase structural gene of *Neurospora crassa*. J. Bacteriol., **170**: 657-661.

Fu, Y.H., J.Y. Kressi y G.A. Marzluf, 1989. Isolation of *nit-4*, the minor nitrogen regulatory gene which mediates nitrate induction in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol., **171**: 4067-4070.

Fu, Y.-H. y G. Marzluf, 1990a. *nit-2*, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. Mol. Cell. Biol., **10**: 1056-1065.

Fu, Y.H. y G.A. Marzluf, 1990b. Site-directed mutagenesis of the "zinc finger" DNA-binding domain of the nitrogen-regulatory protein NIT2 of *Neurospora*. Mol. Microbiol., **4**: 1847-1852.

Galimand M., M. Gamper, A. Zimmermann y D. Haas, 1991. Positive FNR-like control of anaerobic arginine degradation and nitrate respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., **173**: 1598-1606.

Galván, A., J. Cárdenas y E. Fernández, 1992. Nitrate reductase regulates expression of nitrite uptake and nitrite reductase activities in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant. Physiol., **98**: 422-426.

Giordano, G., B.A. Haddock y D.H. Boxer, 1980. Molybdenum limited growth achieved either phenotypically or genotypically and its effect on the synthesis of formate dehydrogenase and nitrate reductase by *Escherichia coli* K-12. FEMS Microbiol. Lett., **8**: 229-235.

Glick, B.R., H.E. Brooks y J.J. Pasternak, 1985. Transformation of *Azotobacter vinelandii* with plasmid DNA. J. Bacteriol., **162**: 276-279.

González-López, J., V. Salmerón, M.V. Martínez-Toledo, F. Ballesteros y A. Ramos-Cormenzana, 1986. Production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* ATCC12837 in chemically defined media and dialyzed soil media. Soil. Biol. Biochem., **18**: 119-120.

Gordon, J.K. y M.R. Jacobson, 1983. Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* mutant strains with potential as bacterial fertilizer. Can. J. Microbiol., **29**: 973-978.

Griffiths, L. y J.A. Cole, 1987. Lack of redox control of the anaerobically-induced *nirB*⁺ gene of *Escherichia coli* K-12. Arch. Microbiol., **147**: 364-369.

Guerrero, M.G., J.M^a. 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.

Gussin, G.N., C.W. Ronson y F.M. Ausubel, 1986. Regulation of nitrogen fixation genes. Ann. Rev. Genet.,

20: 567-591.

Hales, B.J., E.E. Case, J.E. Morningstar, M.F. Dzeda y L.A. Mauterer, 1986. Isolation of a new V-containing nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*, **25**: 7251-7255.

Hamdi, Y.A., 1985. La fijación del nitrógeno en la explotación de los suelos. Boletín de suelos de la FAO, n° 49: 75-82.

Hames, B.D. y D. Rickwood, 1981. Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. IRL Press, Oxford-Washington.

Hattori, A., 1967. Adaptative formation of nitrate reducing system in *Anabaena cylindrica*. *Plant. Cell. Physiol.*, **3**: 371-377.

Hegazi, N.A., M. Edi, R.S. Farag y M. Monib, 1974. Asymbiotic nitrogen fixation in the rhizosphere of sugar cane planted under semi-arid conditions of Egipt. *Per. Ecol. Biol. Sci.* **16**: 23-37.

Hemschemeier, S., M. Grund, B. Keuntje y R. Eichenlaub, 1991. Isolation of *Escherichia coli* mutants defective in uptake of molybdate. *J. Bacteriol.*, **173**: 6499-6506.

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.

Herrero, A., E. Flores y M.G. Guerrero, 1985. Regulation of nitrate reductase cellular levels in the cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Synechocystis* sp. *FEMS Microbiol.*

Lett., **26**: 21-25.

Herrero, A. y M.G. Guerrero, 1986. Regulation of nitrite reductase in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. J. Gen. Microbiol., **132**: 2463-2468.

Hirschman, J., P.K. Wong, K. Sei, J. Keener y S. Kustu, 1985. Products of nitrogen regulatory genes *ntrA* y *ntrC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription *in vitro*: Evidence that the *ntrA* product is a sigma factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**: 7525-7529.

Hochstein, L.I. y G.A. Tomlinson, 1988. The enzymes associated with denitrification. Ann. Rev. Microbiol., **42**: 231-261.

Horan, N.J., T.R. Jarman y E.A. Dawes, 1983. Studies of some enzymes of aliginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. J. Gen. Microbiol., **129**: 2985-2990.

Horug, J.S., P.-K. Chang, J.J. Pestka y J.E. Linz, 1990. Development of a homologous transformation system for *Aspergillus parasiticus* with the gene encoding nitrate reductase. Mol. Gen. Genet., **224**: 294-296.

Ingle, J., 1968. Nucleic acid and protein synthesis associated with the induction of nitrate reductase activity in radish cotyledons. Biochem. J., **108**: 715-724.

Iobbi, C., C.L. Santini, V. Bonnefoy y G. Giordano, 1987. Biochemical and immunological evidence for a second nitrate reductase in *Escherichia coli* K12. Eur. J. Biochem., **168**: 451-459.

Iobbi-Nivol, C., C.L. Santini, F. Blasco y G. Giordano,

1990. Purification and further characterization of the second nitrate reductase of *Escherichia coli* K12. Eur. J. Biochem., **188**: 679-687.

Jackson, R.H., A. Cornish-Bowden y J.A. Cole, 1981. Prosthetic groups of the NADH-dependent nitrite reductase from *Escherichia coli* K-12. Biochem. J., **193**: 861-867.

Jarai, G. y G.A. Marzluf, 1991. Generation of new mutants of *nmr*, the negative-acting nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, by repeat induced mutation. Curr. Genet., **20**: 283-288.

Jayaraman, P.S., T.C. Peakman, S.W.J. Busby, R.V. Quincey y J.A. Cole, 1987. Location and sequence of the promotor of the gene for NADH-dependent nitrite reductase of *Escherichia coli* and its regulation by oxygen, the Fnr protein and nitrite. J. Mol. Microbiol., **196**: 781-788.

Joerger, R.D., R. Premakumar y P.E. Bishop, 1986. Tn5-induced mutants of *Azotobacter vinelandii* affected in nitrogen fixation under Mo-deficient and Mo-sufficient conditions. J. Bacteriol., **168**: 673-682.

Joerger, R.D., M.R. Jacobson y P.E. Bishop, 1989. Two *nifA*-like genes required for expression of alternative nitrogenases in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol., **171**: 1075-1086.

Johnson, J.L., N.R. Bastian y K.V. Rajagopalan, 1990. Molybdopterin guanine dinucleotide, a modified form of molybdopterin identified in the molybdenum cofactor of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter sphaeroides forma specialis denitrificans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**: 3190-3194.

Jones, R., P. Woodley y R. Robson, 1984. Cloning and organization of some genes for nitrogen fixation from *Azotobacter chroococcum* and their expression in *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.*, **197**: 318-327.

Jüngst, A., C. Braun y W.G. Zumft, 1991. Close linkage in *Pseudomonas stutzeri* of the structural genes for respiratory nitrite reductase and nitrous oxide reductase, and other essential genes for denitrification. *Mol. Gen. Genet.*, **225**: 241-248.

Kalman, L.V. y R.P. Gunsalus, 1990. Nitrate- and molybdenum-independent signal transduction mutations in *narX* that alter regulation of anaerobic respiratory genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **172**: 7049-7056.

Kamp, M.V., M.Ch. Silvestrini, M. Brunori, J.V. Beeumen, F.C. Hali y G.W. Canters, 1990. Involvement of the hydrophobic patch of azurin in the electron-transfer reactions with cytochrome c_{551} and nitrite reductase. *Eur J. Biochem.*, **194**: 109-118.

Karunakar, P.D. y T. Rajgopalan, 1936. *Azotobacter* inoculation of seeds of cereals-experiments with sorghum. *Proc. Econ. Biologists*, pp. 1-10.

Kennedy, C. y R.L. Robson, 1983. Activation of *nif* expression in *Azotobacter* by the *nifA* gene product of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*, **301**: 626-628.

Kennedy, C. y M.H. Drummond, 1985. The use of *nif* regulatory elements from *Klebsiella pneumoniae* to examine *nif* regulation in *Azotobacter vinelandii*. *J. Gen. Microbiol.*, **131**:1787-1795.

Kennedy, C., R. Gamal, R. Humphrey, J. Ramos, K. Brigle y

D. Dean, 1986. *nifH*, *nifM* and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*. Characterisation by Tn5 mutagenesis and isolation from pLAFR1 gene banks. *Mol. Gen. Genet.*, **205**: 318-325.

Kennedy, C. y A. Toukdarian, 1987. Genetics of azotobacters: Applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.*, **41**: 227-258.

Kennedy, C., A. Bali, G. Blanco, A. Contreras, M. Drummond, M. Merrick, J. Walmsley y P. Woodley, 1990. Regulation of expression of genes for three nitrogenases in *Azotobacter vinelandii*. En: Nitrogen Fixation Developments in Plant and Soil Sciences. Vol. 48, pp. 13-23. Ed. M. Polsinelli, R. Materassi y M. Vincenzini. Kluwer Academic Publ.

Krakow, J.S., 1975. On the role of sulfhydryl groups in the structure and function of *Azotobacter vinelandii* RNA polymerase. *Biochemistry*, **14**: 4522-4527.

Krstic, B., M. Saric, Z. Saric, 1990. Efficiency of *Azotobacter* strains depending on nitrogen level and sugar beet genotypes. En: Nitrogen Fixation Developments in Plant and Soil Sciences. Vol. 48, pp. 329-331. Ed. M. Polsinelli, R. Materassi y M. Vincenzini. Kluwer Academic Publ.

Kudla, B., M. Caddick, T. Langdon, N. Martínez-Rossi, C. Bennett, S. Sibley, W. Davies y H. Arst, 1990. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *EMBO J.*, **9**: 1355-1364.

Leonardo, M.R. y D.P. Clark, 1991. Locations of genes in

the *nar-adhE* region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. J. Bacteriol., **173**: 1574-1575.

Li, S.F. y J.A. DeMoss, 1987. Promoter region of the *nar* operon of *Escherichia coli*: nucleotide sequence and transcription initiation signals. J. Bacteriol., **169**: 4614-4620.

Li, S.F. y J.A. DeMoss, 1988. Location of sequences in the *nar* promoter of *Escherichia coli* required for regulation by Fnr and NarL. J. Biol. Chem., **263**: 13700-13705.

Lin, L.P. y H.L. Sadoff, 1968. Encystment and polymer production of *Azotobacter vinelandii* in the presence of β -hidroxibutirato. J. Bacteriol., **95**: 2336-2343.

Losada, M., M.G. Guerrero y J.M. Vega, 1981. The assimilatory reduction of nitrate. En: Biology of inorganic nitrogen and sulfur (H. Bothe y A. Trebst eds.), pp. 30-63. Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**: 265-275.

Luque Vázquez, F.J., 1987. Genética de la asimilación del nitrato en *Azotobacter vinelandii*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

Luque, F., E. Santero, J.R. Medina y M. Tortolero, 1987. An effective mutagenic method in *Azotobacter vinelandii*. Microbiología SEM, **3**: 45-48.

Luque, F., E. Santero, J.R. Medina y M. Tortolero, 1987. Mutants of *Azotobacter vinelandii* altered in the

regulation of nitrate assimilation. *Arch. Microbiol.*, **148**: 231-235.

Kinghorn, J.R., 1989. Genetic, biochemical, and structural organization of the *Aspergillus nidulans* *crnA-niiA-niaD* gene cluster. En: *Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation*. J.L. Wray y J.R. Kinghorn (eds.). Oxford Science Publications.

Macdonald, H., N.R. Pope y J.A. Cole, 1985. Isolation, characterization and complementation analysis of *nirB* mutants of *Escherichia coli* deficient only in NADH-dependent nitrite reductase activity. *J. Gen. Microbiol.*, **131**: 2771-2782.

Magasanik, B., 1982. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Ann. Rev. Genet.*, **16**: 135-168.

Maia, M., J.M. Sánchez y G.R. Vela, 1988. Plasmids of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **170**: 1984-1985.

Maldonado, R., A. Garzón, D. Dean y J. Casadesús, 1992. Gene dosage analysis in *Azotobacter vinelandii*. (Sometime a publicación).

Maniatis, T., E.F. Fritsh y J. Sambrook, 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.

Markwell, M.A.K., S.M. Haas, L.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.

Marzluf, G.A. y Y.-H. Fu, 1989. Genetics, regulation and molecular studies of nitrate assimilation in *Neurospora*

crassa. En: Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation. J.L. Wray y J.R. Kinghorn (eds.). Oxford Science Publications.

Martín Nieto, J., 1991. Aspectos bioquímicos y genéticos de la asimilación de nitrógeno inorgánico y su regulación en cianobacterias fijadoras de dinitrógeno. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.

McInerney, M.J., K.S. Holmes, P. Hoffman y D.V. Dervartanian, 1984. Respiratory mutants of *Azotobacter vinelandii* with elevated levels of cytochrome *d*. Eur. J. Biochem., **141**: 447-452.

Mérida, A., P. Candau y F.J. Florencio, 1991. Regulation of glutamine synthetase activity in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by the nitrogen source: effect of ammonium. J. Bacteriol., **173**: 4095-4100.

Merrick, M.J., 1988. Organisation and regulation of nitrogen fixation genes in *Klebsiella* y *Azotobacter*. En Nitrogen fixation: hundred years after. Proceedings of the 7th international congress on N₂ fixation. pp. 293-302. Colonia, Alemania.

Merrick, M., S. Hills, H. Hennecke, M. Hahn, R. Dixon y Ch. Kennedy, 1982. Represor properties of the *nifL* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. Mol. Gen. Genet., **185**: 75-81.

Mikami, B. y S. Ida, 1984. Purification and properties of ferredoxin-nitrate reductase from the cyanobacterium *Plectonema boryanum*, Biochim. Biophys. Acta, **791**: 294-304.

Mishra, A.K. y O. Wyss, 1968. Induced mutations in *Azotobacter* and isolation of an adenine requiring mutant. *Nucleus Calcutta*, **11**: 96-105.

Miyazaki, J., M. Juricek, K. Angelis, K.M. Schnorr, A. Kleinhofs y R.L. Warner, 1991. Characterization and sequence of a novel nitrate reductase from barley. *Mol. Gen. Genet.*, **228**: 329-334.

Monib, M., M. Saber, A.M. Gomaa y N.A. Hegazi, 1990. Enrichment of tomato sand cultures with composite inocula of associative dinitrogen fixers, P-dissolving bacilli and VAM. En: *Nitrogen Fixation Developments in Plant and Soil Sciences*. Vol. 48, pp. 317-319. Ed. M. Polsinelli, R. Materassi y M. Vincenzini. Kluwer Academic Publ.

Nagpal, P., S. Jafri, M.A. Reddy y H.K. Das, 1989. Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **171**: 3133-3138.

Newman, B.M. y J.A. Cole, 1978. The chromosomal location and pleiotropic effects of mutations in the *nirA*⁺ gene of *Escherichia coli* K-12: the essential role of *nirA*⁺ in nitrite reduction and in other anaerobic redox reactions. *J. Gen. Microbiol.*, **106**: 1-12.

Nussaume, L., M. Vincentz y M. Caboche, 1991. Constitutive nitrate reductase: a dominant conditional marker for plant genetics. *Plant J.*, **1**: 267-274.

O'Farrell, P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, **250**: 4007-4021.

O'Farrell, P.Z., H.M. Goodman y P.H. O'Farrell, 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic

as well as acidic proteins. *Cell*, **12**: 1133-1142.

Oelze, J., 1991. Diazotrophic mixed culture of *Azotobacter vinelandii* and *Rhodobacter capsulatus*. En: Nitrogen Fixation Developments in Plant and Soil Sciences. Vol. 48, pp. 509-512. Ed. M. Polsinelli, R. Materassi y M. Vincenzini. Kluwer Academic Publ.

Ohmori, K. y A. Hattori, 1970. Induction of nitrate and nitrite reductases in *Anabaena cylindrica*. *Plant Cell Physiol.*, **11**: 873-878.

Okamoto, P.M., Y.-H. Fu y G.A. Marzluf, 1991. *Nit-3*, the structural gene of nitrate reductase in *Neurospora crassa*: nucleotide sequence and regulation of mRNA synthesis and turnover. *Mol. Gen. Genet.*, **227**: 213-223.

Owen, D.J. y A.C. Ward, 1985. Transfer of transposable drug-resistance elements Tn5, Tn7 and Tn76 to *Azotobacter beijerinckii*: use of plasmid RP4, Tn76 as a suicide vector. *Plasmid*, **14**: 162-166.

Page, W.J. y H.L. Sadoff, 1976. Physiological factors affecting transformation of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **125**: 1080-1087.

Page, W.J. y M. vonTigerstrom, 1979. Optimal conditions for transformation of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **139**: 1058-1061.

Pascal, M.-C., J.F. Burini, J. Ratouchniak y M. Chippaux, 1982. Regulation of the nitrate reductase operon: effects of mutations in *chlA*, *B*, *D* and *E* genes. *Mol. Gen. Genet.*, **188**: 103-106.

Pelsy, F. y M. Gonneau, 1991. Genetic and biochemical analysis of intragenic complementation events among nitrate reductase apoenzyme-deficient mutants of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Genetics*, **127**: 199-204.

Ponteau, S., A. Spielmann, C. Meyer, M.-A. Grandbastien y M. Caboche, 1991. Effects of *Tnt1* tobacco retrotransposon insertion on target gene transcription. *Mol. Gen. Genet.*, **228**: 233-239.

Postgate, J., 1974. Prerequisites for biological nitrogen fixation in free-living heterotrophic bacteria. En: *The Biology of Nitrogen Fixation*. Editado por A. Quispel. pp. 663-686.

Postgate, J.R., C.D.P. Partridge, R.L. Robson, F.B. Simpson y M.G. Yates, 1982. A method for screening for hydrogenase negative mutants of *Azotobacter chroococcum*. *J. Gen. Microbiol.*, **128**: 905-908.

Ramos, J.L. y R.L. Robson, 1985. Isolation and properties of mutants of *Azotobacter chroococcum* defective in aerobic nitrogen fixation. *J. Gen. Microbiol.*, **131**: 1449-1458.

Reitzer, L. y B. Magasanik, 1987. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, aspartate, asparagine, L-alanine and D-alanine. En *Escherichia coli* and *Salmonella thyphimurium*, cellular and molecular biology (F.C. Neidhart ed.), pp. 302-320. American Society for Microbiology, Washington.

Richardson, D.J., A.G. McEwan, M.D. Page, J.B. Jackson y S.J. Ferguson, 1990. The identification of cytochromes involved in the transfer of electrons to the periplasmic NO_3^- reductase of *Rhodobacter capsulatus* and resolution of

a soluble NO_3^- -reductase-cytochrome-c₅₅₂ redox complex. Eur. J. Biochem., **194**: 263-270.

Robinson, A.C., B.K. Burgess y D.R. Dean, 1986. Activity, reconstitution and accumulation of nitrogenase components in *Azotobacter vinelandii* mutant strains containing defined deletions within the nitrogenase structural gene cluster. J. Bacteriol., **166**: 180-186.

Robson, R.L., 1979. Characterization of an oxygen-stable nitrogenase complex isolated from *Azotobacter chroococcum*. Biochem. J., **181**: 569-575.

Robson, R.L., J.A. Chesshyre, 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. Postgate, 1986. The alternative nitrogenase of *Azotobacter chroococcum* is a vanadium enzyme. Nature, **322**: 388-390.

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.

Rossmann, R., G. Sawers y A. Böck, 1991. Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate and pH: definition of the formate regulon. Mol. Microbiol., **5**: 2807-2814.

Roth, J.R., 1974. Frameshift mutations. Ann. Rev. Gen., **8**: 319-346.

Rubenchick, L.I., 1960. *Azotobacter* and its use in agriculture. Translated from Russian. Published for the National Science Foundation. Washington, D.C. U.S. Dept. of Commerce. Washington 25, D.C.

Ruppen, M.E., G. Garner y H.L. Sadoff, 1983. Protein turnover in *Azotobacter vinelandii* during encystment and germination. *J. Bacteriol.*, **156**: 1243-1248.

Sadoff, H.L., B. Shimei y S. Ellis, 1979. Characterization of *Azotobacter vinelandii* deoxyribonucleic acid and folded chromosomes. *J. Bacteriol.*, **138**: 871-877.

Sánchez-Fernández, R., S.E. Unkles, E.I. Campbell, J.A. Macro, E. Cerdá-Olmedo y J.R. Kinghorn, 1991. Transformation of the filamentous fungus *Gibberella fujikuroi* using the *Aspergillus niger niaD* gene encoding nitrate reductase. *Mol. Gen. Genet.*, **225**: 231-233.

Santero Santurino, E., 1986. Aislamiento y caracterización de mutantes del metabolismo del nitrógeno en *Azotobacter vinelandii*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

Santero, E., F. Luque, J.R. Medina y M. Tortolero, 1986. Isolation of *ntrA*-like mutants of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **166**: 541-544.

Santero, E., A. Toukdarian, R. Humphrey y Ch. Kennedy, 1988. Identification and characterization of two nitrogen fixation regulatory regions *nifA* and *nfrX* in *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter chroococcum*. *Mol Microbiol.*, **2**: 303-314.

Saric, M., Z. Saric, B. Krstic, 1990. Specific responses of *Azotobacter* strains and sugar beet genotypes. En:

Nitrogen Fixation Developments in Plant and Soil Sciences. Vol. 48, pp. 333-335. Ed. M. Polsinelli, R. Materassi y M. Vincenzini. Kluwer Academic Publ.

Sawers, R.G., 1991. Identification and molecular characterization of a transcriptional regulator from *Pseudomonas aeruginosa* PA01 exhibiting structural and functional similarity to the FNR protein of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **5**: 1469-1481.

Scherings, G., H. Haaker, H. Wassink y C. Veeger, 1983. On the formation of an oxygen-tolerant three component nitrogenase complex from *Azotobacter vinelandii*. *Eur. J. Biochem.*, **135**: 591-599.

Schmerder, B. y H. Borris, 1986. Induction of nitrate reductase by cytokinin and ethylene in *Agrostemma githago* L. embryos. *Planta* **169**: 539-593.

Schnorr, K.M., M.Suricek, Ch. Huang, D. Culley y A. Kleinhofs, 1991. Analysis of barley nitrate reductase cDNA and genomic clones. *Mol. Gen. Genet.*, **227**: 411-416.

Selvaraj, G. y V.N. Iyer, 1983. Suicide plasmid vehicles for insertion mutagenesis in *Rhizobium meliloti* and related bacteria. *J. Bacteriol.*, **156**: 1292-1300.

Smith, G.B. y J.M. Tiedje, 1992. Isolation and characterization of a nitrite reductase gene and its use as a probe for denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 376-384.

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

Solomonson, L.P. y M.J. Barber, 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **41**: 225-253.

Steinberg, N.A., J.S. Blum, L. Hochstein y R.S. Oremland, 1992. Nitrate is a preferred electron acceptor for growth of freshwater selenate-respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 426-428.

Stevens, S.E., Jr. y C. Van Baalen, 1974. Control of nitrate reductase in a blue-green alga. The effects of inhibitors, light and ammonia. *Arch. Biochem. Biophys.*, **161**: 146-152.

Stewart, V., 1988. Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in enterobacteria. *Microbiol. Rev.*, **52**: 190-232.

Stewart, V. y C.H. McGregor, 1982. Nitrate reductase in *Escherichia coli* K-12: Involvement of *chlC*, *chlE*, and *chlG* loci. *J. Bacteriol.*, **151**: 788-799.

Stewart, V. y J. Parales, 1988. Identification and expression of the *narL* and *narX* of the *nar* (nitrate reductase) locus in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **170**: 1589-1597.

Su, Ch.-J., A. da Cunha, C.M. Wernette, R.N. Reusch y H.L. Sadoff, 1987. Protein synthesis during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **169**:4451-4456.

Tabor, S. y Ch.C. Richardson, 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 1074-1078.

Terriere, C., G. Giordano, C.-L. Medani, D.H. Boxer, B.A. Haddock y E. Azoulay, 1981. Precursor forms of formate dehydrogenase in *chlA* and *chlB* mutants of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett., **11**: 287-293.

Thipayathasana, P., S. Sittipraneed y S. Pacca-uccaraleorikul, 1988. Enhancement of sugar cane growth by *Azotobacter vinelandii*(pCK3). En Nitrogen fixation: Hundred years after. Proceedings of the 7th international congress on N≡Nitrogen fixation, p. 799.

Thompson, B.J., E. Domingo y R.C. Warner, 1980. Pseudolysogeny of azotobacter phages. Virology, **102**: 267-277.

Tortolero, M., E. Santero y J. Casadesús, 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.

Tortolero, M., E. Santero, F. Luque, A. Contreras y J. Casadesús, 1987. En Avances en la biología de la fijación simbiótica del nitrógeno atmosférico, pp. 67-98.

Toukdarian, A., y Ch. Kennedy, 1986. Regulation of nitrogen metabolism in *Azotobacter vinelandii*: isolation of *ntr* and *glnA* genes and construction of *ntr* mutants. EMBO J., **5**: 399-407.

Toukdarian, A., G. Saunders, G. Selman-Sosa, E. Santero, P. Woodley y Ch. Kennedy, 1990. Molecular analysis of the *Azotobacter vinelandii* *glnA* gene encoding glutamine synthetase. J. Bacteriol., **172**: 6529-6539.

Unkles, S.E., K.L. Hawker, C. Grieve, E.I. Campbell, P. Montagne y J.R. Kinghorn, 1991. *crnA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**: 204-208.

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.

Vega Palas, M.A., 1991. *ntcA*: Un gen regulador de la asimilación de nitrógeno en la cianobacteria *Synechococcus*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

Vega-Palas, M.A., E. Flores y A. Herrero, 1992. NtcA from *Synechococcus* R2: a novel regulator for global nitrogen control. Mol.Microbiol. (en prensa).

Vega-Palas, M.A., F. Madueño, A. Herrero y E. Flores, 1990. Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. J. Bacteriol., **172**: 643-647.

VenKatesh, T.V., M.A. Reddy y H.K. Das, 1990. Cloning and characterization of the *Azotobacter vinelandii recA* gene and construction of a *recA* deletion mutant. Mol. Gen. Genet., **224**: 482-486.

Vila, R., J.A. Bárcena, A. Llobell y A. Paneque, 1977. Characterization of a membrane-bound nitrate reductase from *Azotobacter chroococcum*. Biochem. Biophys. Res. Com., **75**: 682-688.

Villalobos, A., J.M. Roldán, J. Rivas y J. Cárdenas, 1977. Assimilatory nitrate reductase from *Acinetobacter calcoaceticus*. Arch. Microbiol., **112**: 127-132.

Vincentz, M. y M. Caboche, 1991. Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. *EMBO J.*, **10**: 1027-1035.

Walmsley, J. y Ch. Kennedy, 1991. Temperature-dependent regulation by molybdenum and vanadium of expression of the structural genes encoding three nitrogenases in *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Envir. Microbiol.*, **57**: 622-624.

Woodard, L.M., A.R. Bielkie, J.F. Eisses y P.A. Ketchum, 1990. Occurrence of nitrate reductase and molybdopterin in *Xanthomonas maltophilia*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 3766-3771.

Yakunin, A.F., A.A. Tsygankov, I.N. Gogotov y M. Jha, 1990. Effect of Mo, V and W on the growth and nitrogenase synthesis in phototrophic bacteria. En: *Nitrogen Fixation Developments in Plant and Soil Sciences*. Vol. 48, pp. 583-584. Ed. M. Polsinelli, R. Materassi y M. Vincenzini. Kluwer Academic Publ.

Yates, M.G., 1977. Physiological aspects of nitrogen fixation. En: *Recent developments in nitrogen fixation*. Editado por W. Newton, J.R. Postgate y C. Rodríguez-Barrueco.

Yuan, G.-F., Y.-H. Fu y G.A. Marzluf, 1991. *nit-4*, a pathway-specific regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a protein with a putative binuclear zinc DNA-binding domain. *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 5735-5745.

Yuan, G.-F. y G.A. Marzluf, 1992. Molecular characterization of mutations of *nit-4*, the pathway-specific regulatory gene which controls nitrate assimilation in *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.*, **6**: 67-73.