

TD  
576

R. 9385



APROXIMACION GENETICO-BIOQUIMICA AL ESTUDIO DE ASIMILACION DE NITRATO EN LA CIANOBACTERIA Anacystis nidulans R2

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral al folio 134 número 40 del libro correspondiente.

Sevilla, 14 OCT. 1987

El Jefe del Negociado de Tesis,

*Alvaro Laffitte*

Trabajo presentado por el Licenciado Francisco Madueño Albi para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas



*Francisco Madueño Albi*

Sevilla, Octubre de 1987

DIRECTOR Y PONENTE

*Miguel García Guerrero*

Dr Miguel García Guerrero,  
Catedrático de Bioquímica y  
Biología Molecular

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en  
de la  
de esta Universidad desde el día  
hasta el día  
Sevilla de de 19  
EL DIRECTOR DE

A mi familia, en  
especial a mi padre.

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Deseo expresar mi agradecimiento al Profesor Manuel Losada Villasante por haberme acogido en su equipo de investigación.

Al Dr Miguel García Guerrero, Director de esta tesis, agradezco su ayuda y valiosa aportación de ideas, así como su dedicación e interés en mi formación científica.

A los Dres W.E. Borrias, G.A. Van Arkel y C.J. Kuhlemeier, del Departamento de Biología Molecular y Celular de la Universidad de Utrecht, les agradezco las facilidades dadas que hicieron posible mi estancia en su laboratorio, así como su ayuda y aporte de estirpes y plásmidos.

Agradezco a mis compañeros Tomás Coronil y el Dr José María Romero la amistad y el ambiente humano con el que me han rodeado. A Jose le agradezco, además, su ayuda en la obtención de alguno de los resultados que presento. Al Dr Aurelio Serrano le agradezco, entre otras cosas, que me facilitó ciertas proteínas, que él mismo había purificado, para algún experimento. Al Dr Pedro Candau le agradezco su sabiduría, de la que en bastantes ocasiones me he aprovechado. A los Dres Enrique Flores y Toñi Herrero les agradezco eso mismo, además de su participación directa en la obtención de algunos resultados y, lo que ha sido incluso más valioso, la continua labor de motivación que

han llevado a cabo conmigo. Al Dr Juan Luis Ramos quiero agradecer tanto su aportación al inicio de mi formación científica como el interés que ha mostrado continuamente en el desarrollo de mi trabajo. A los demás miembros del Departamento, presentes y pasados, les agradezco el trato cordial del que he sido objeto en todo momento.

A la gente del Departamento de Genética (Universidad de Sevilla) les agradezco la atención que me han prestado cada vez que he ido a darles la lata. A los de los Departamentos de Química-Física y Fisiología Animal (Universidad de Sevilla), y especialmente al Dr Rafael Andreu y a Miguel Escudero, les agradezco la prestación desinteresada de medios informáticos empleados en el tratamiento del texto. A Pepe Moreno, su ayuda en el material fotográfico.

A Kiko, Tere, Carlos y Filo les agradezco su constante apoyo y su inapreciable amistad que les ha llevado a tener que aguantar algún que otro "pato" durante la elaboración de esta tesis.

Por último, quiero expresar mi gratitud a las siguientes instituciones y entidades por su apoyo económico y material: Fundación Ramón Areces, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, Ministerio de Educación y Ciencia, Junta de Andalucía y EMBO.

## INDICE

Abreviaturas y símbolos .....	1
1. <u>INTRODUCCION</u> .....	2
1.1. LA ASIMILACION DE NITRATO EN CIANOBACTERIAS .	3
1.1.1. <u>Entrada de nitrato y nitrito en la célula</u> .....	3
1.1.2. <u>Reducción del nitrato</u> .....	6
1.1.3. <u>Asimilación del amonio</u> .....	9
1.2. REGULACION DE LA ASIMILACION DEL NITRATO EN CIANOBACTERIAS .....	11
1.2.1. <u>Regulación del transporte de nitrato</u> ...	11
1.2.2. <u>Control de la cantidad de enzima activo</u>	17
1.3. GENETICA DE LA ASIMILACION DEL NITRATO .....	20
1.4. GENETICA DE CIANOBACTERIAS .....	26
1.4.1. <u>Aislamiento de estirpes mutantes</u> .....	26
1.4.2. <u>Tranferencia genética en cianobacterias</u>	28
1.4.3. <u>Clonaje de genes en cianobacterias</u> .....	32
1.4.4. <u>Genética de la asimilación de nitrato en cianobacterias</u> .....	33
2. <u>MATERIALES Y METODOS</u> .....	36
2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	37
2.2. AISLAMIENTO DE ESTIRPES MUTANTES DE <u>Anacystis nidulans</u> R2 .....	44
2.2.1. <u>Mutagénesis por transposición de Tn901</u> .	44
2.2.2. <u>Mutagénesis con nitrosoguanidina</u> .....	45
2.2.3. <u>Purificación y selección de estirpes mutantes</u> .....	46
2.3. PREPARACION DE ADN .....	47
2.3.1. <u>Aislamiento de ADN de cianobacterias</u> ...	47
2.3.2. <u>Aislamiento de ADN plasmídico de E. coli</u>	48
2.4. TRANSFORMACION DE ESTIRPES MUTANTES DE <u>A. nidulans</u> R2 .....	50
2.5. ESTIMACION DE NIVELES CELULARES DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS .....	51
2.5.1. <u>Ensayos enzimaticos in situ</u> .....	51
2.5.1.1. <u>Permeabilización de membranas celulares</u> .....	51
2.5.1.2. <u>Actividad nitrato reductasa</u> .....	52
2.5.1.3. <u>Actividad nitrito reductasa</u> .....	54

2.5.1.4. Actividad glutamina sintetasa ....	56
2.5.2. <u>Ensayo in vitro de la actividad nitrato reductasa</u> .....	57
2.6. ESTIMACION DEL CONSUMO DE NITRATO Y DE NITRITO .....	59
2.7. ESTIMACION DE LA FIJACION FOTOSINTETICA DE CO <sub>2</sub> .....	60
2.8. ESTIMACION DE LA DENSIDAD CELULAR .....	61
2.9. METODOS ANALITICOS .....	62
2.9.1. <u>Determinación de nitrato</u> .....	62
2.9.2. <u>Determinación de nitrito</u> .....	62
2.9.3. <u>Determinación de amonio</u> .....	63
2.9.4. <u>Determinación de glutamina</u> .....	64
2.9.5. <u>Determinación de radioactividad de <sup>14</sup>C</u> .	64
2.9.6. <u>Determinación de clorofila</u> .....	65
2.9.7. <u>Determinación de proteína</u> .....	65
2.9.8. <u>Determinación de ADN</u> .....	66
2.9.9. <u>Determinaciones espectrofotométricas</u> ...	66
2.9.10. <u>Medidas de pH</u> .....	67
2.9.11. <u>Medidas de iluminación</u> .....	67
2.9.12. <u>Medida de flujo gaseoso</u> .....	67
2.10. REACTIVOS.....	69
3. <u>RESULTADOS</u> .....	69
3.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE ESTIRPES MUTANTES DE <u>Anacystis nidulans</u> R2 AFECTADAS EN LA ASIMILACION DE NITRATO.....	70
3.1.1. <u>Mutagénesis y selección de estirpes incapaces de asimilar nitrato</u> .....	70
3.1.2. <u>Clasificación de las estirpes mutantes</u> .	73
3.1.2.1. Niveles de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa .....	73
3.1.2.2. Transformación de las estirpe mutantes con los plásmidos pNR12, pNR63 y pNR193 .....	77
3.1.3. <u>Caracterización de los distintos tipos de mutantes</u> .....	79
3.1.3.1. Crecimiento de las estirpes A6, FM1, FM2, FM6, FM10 y FM16 en medios líquidos con distintas fuentes de nitrógeno .....	81
3.1.3.2. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre los niveles de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa de las estirpes A6, FM1, FM2, FM6, FM10 y FM16 .....	83
3.1.3.3. Niveles de actividad glutamina sintetasa en las estirpes A6, FM1, FM2, FM6, FM10 y FM16 .....	87

3.1.3.4. Consumo de nitrato y nitrito por las estirpes A6, FM1, FM2, FM6, FM10 y FM16 .....	89
3.2. CARACTERIZACION DE LA ESTIRPE MUTANTE FM16 DE <u>Anacystis nidulans R2</u> .....	91
3.2.1. <u>Aspectos fisiológicos y bioquímicos</u> ....	91
3.2.1.1. Caracterización del crecimiento de FM16 .....	92
3.2.1.2. Caracterización de la nitrato reductasa presente en FM16 .....	96
3.2.1.3. Consumo de nitrato por las estirpes A6 y FM16 en relación con el nivel de actividad nitrato reductasa .....	100
3.2.2. <u>Aspectos genéticos</u> .....	103
3.3. CARACTERIZACION DE LA ESTIRPE MUTANTE FM2 DE <u>Anacystis nidulans R2</u> .....	105
3.3.1. <u>Aspectos fisiológicos y bioquímicos</u> ....	105
3.3.1.1. Regulación por amonio de la síntesis de nitrato reductasa en estirpes carentes de actividad nitrito reductasa .....	105
3.3.1.2. Regulación por amonio del consumo de nitrato en FM2 .....	106
3.3.2. <u>Aspectos genéticos</u> .....	112
3.3.2.1. Transformación de las estirpes mutantes FM1, FM6 y FM10 con ADN de la estirpe FM2 .....	112
3.3.2.2. Regulación por amonio de la síntesis de nitrato reductasa en revertientes de FM2 .....	113
3.4. UTILIZACION DE ESTIRPES MUTANTES DE <u>Anacystis nidulans R2</u> EN ESTUDIOS DE LA ASIMILACION DE NITRATO .....	118
3.4.1. <u>Determinación de nitrato con células de la estirpe FM2</u> .....	118
3.4.2. <u>Utilización de la estirpe FM2 en el estudio cinético del consumo de nitrato por A. nidulans R2</u> .....	121
3.4.3. <u>Utilización de FM2 en el estudio del control de la utilización de nitrato por la fijación de CO<sub>2</sub></u> .....	127
3.4.3.1. Requerimiento por CO <sub>2</sub> para la utilización de nitrato en las estirpes A6 y FM2 .....	128
3.4.4. <u>Utilización de FM2 y FM10 en el estudio de las interacciones entre consumo de nitrato y de nitrito</u> .....	133
3.4.4.1. Efecto del nitrito sobre el consumo de nitrato .....	133
3.4.4.2. Efecto del nitrato sobre el consumo de nitrito .....	134

4. <u>DISCUSION</u> .....	143
5. <u>CONCLUSIONES</u> .....	162
6. <u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	164



## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ADN	ácido desoxirribonucléico
ADP	adenosín 5'-difosfato
ATP	adenosín 5'-trifosfato
DCCD	diciclohexilcarbodiimida
DLG	D,L-gliceraldehido
E	einstein
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
g	aceleración de la gravedad
HEPES	N-2-hidroxiethylpiperacina-N'-2-etanosulfonato
Km	constante de Michaelis
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico
MSX	L-metionina-D,L-sulfoximina
MTA	mezcla de bromuros de alquiltrimetilamonio
$\mu$	velocidad específica de crecimiento
NADP <sup>+</sup>	nicotinamida adenín dinucleótido fosfato
NADPH	nicotínamida dinucleótido fosfato reducido
NTG	N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina
PCC	colección de cultivos del Instituto Pasteur
p/v	peso/volumen
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecilsulfato sódico
TES	ácido N-Tris-(hidroximetil) metil-2-amino etano sulfónico
tg	tiempo de generación
Tricina	N-Tris (hidroximetil) metilglicina
Tris	trihidroximetilaminometano
U	unidad de actividad enzimática
v/v	volumen/volumen

## 1. INTRODUCCION

## 1.1. LA ASIMILACION DE NITRATO EN CIANOBACTERIAS

Aunque un considerable número de estirpes de cianobacterias presenta la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, el nitrato y el amonio son las fuentes de nitrógeno más ampliamente utilizadas por estos organismos (Flores et al., 1983b; Guerrero y Lara, 1987; Wolk, 1981). La asimilación de nitrato en cianobacterias comprende tres fases fundamentales: 1) la entrada del nitrato al interior de la célula; 2) la reducción del nitrato hasta el término de amonio; y 3) la incorporación del amonio resultante en esqueletos carbonados para dar lugar a los diversos compuestos orgánicos nitrogenados de la célula.

### 1.1.1. Entrada de nitrato y nitrito en la célula

Las cianobacterias no poseen vacuolas que permitan el almacenamiento de iones siendo el nitrato que entra en la célula transformado inmediatamente por reducción. Esto conlleva el que las cantidades de nitrato presentes en el interior de células de cianobacterias utilizando este anión sean demasiado bajas para su detección por los métodos empleados usualmente. La mayoría de los trabajos encaminados al estudio del transporte de nitrato en cianobacterias se han realizado estimando la desaparición del ión del medio externo, desaparición que no sólo refleja el

propio paso de entrada del nitrato, sino además su posterior metabolización (Flores et al., 1983a,b). No obstante, este sistema ha permitido obtener datos de interés acerca de las características del primer paso del proceso de asimilación del nitrato.

Durante cierto tiempo, la idea de la existencia de un sistema de transporte activo para el nitrato en cianobacterias se ha sustentado en evidencias indirectas. Así, la utilización de nitrato por diferentes estirpes de cianobacterias presenta un requerimiento de energía, inhibiéndose drásticamente por desacoplantes e inhibidores de ATPasas (Flores et al., 1983a,b; Ohmori et al., 1977; Rai et al., 1981). Este requerimiento energético no parece corresponder a la reducción intracelular de nitrato (Guerrero et al., 1981), habiéndose adscrito al estadio inicial de la entrada del ión en la célula (Flores et al., 1983a, b).

Recientemente, se ha obtenido evidencia directa indicativa de la existencia en cianobacterias de un sistema de transporte activo para la entrada del nitrato en la célula. Así, mediante el uso de técnicas combinadas de centrifugación a través de sílica y de cromatografía líquida de alta eficacia, se han medido concentraciones intracelulares de nitrato en células de Anacystis nidulans de hasta 0,4 mM para concentraciones extracelulares del anión de 50  $\mu$ M (Lara et al., 1987; Romero, 1986). Esta acumulación resulta tanto más

significativa si se tiene en cuenta la naturaleza aniónica del nitrato y el hecho de que, al igual que otros organismos, las cianobacterias generan un potencial de membrana negativo en el interior respecto al exterior celular (Paschinger, 1977; Pescheck et al., 1985; Zdrou y Tromballa, 1981), que se opone a la entrada de por simple difusión o transporte pasivo de nitrato y otros aniones.

En cuanto a la entrada de nitrito en cianobacterias, y más concretamente para el caso de A. nidulans, se ha propuesto la participación en dicho proceso de dos sistemas: uno de entrada pasiva de ácido nitroso ( $pK_a=3,4$ ), y otro de transporte activo (Flores, 1982; Flores et al., 1983a; 1987). El componente activo es sensible a la acción del desacoplante DCCD y muestra una alta afinidad por el nitrito, mientras que el pasivo es insensible al DCCD y tiene una afinidad por el nitrito más baja, similar a la de la nitrito reductasa, por dicho ión. La contribución relativa de ambos componentes depende del pH del medio, siendo el sistema activo el que prevalece a valores altos de pH (Flores et al., 1987).

El consumo de nitrato y el componente activo del de nitrito muestran propiedades comunes. Así, presentan una respuesta muy similar al pH del medio, afectándose ambos por amonio y  $CO_2$  de manera análoga (Flores et al., 1987). Además, el nitrato inhibe el

consumo de nitrito por células tratadas con volframio, incapaces de reducir nitrato, siendo la inhibición por nitrato mayor cuanto más importante es la contribución del sistema activo al consumo de nitrito (Flores, 1982). El conjunto de estas observaciones ha constituido la base para la propuesta de que en los procesos de consumo de nitrato y de nitrito participe un sistema de transporte común (Flores et al., 1987).

### 1.1.2. Reducción del nitrato

Una vez que el nitrato ha penetrado en la célula cianobacteriana, se metaboliza inmediatamente por reducción. Esta reducción tiene lugar previamente a la incorporación del nitrógeno a esqueletos carbonados, y resulta en la conversión del nitrato en amonio, la forma de nitrógeno inorgánico que posee el mismo estado de reducción que el nitrógeno orgánico.

Como en otros organismos, la reducción asimilatoria del nitrato hasta amonio en cianobacterias tiene lugar en dos pasos sucesivos. En primer lugar, el nitrato se reduce hasta nitrito, en un proceso que implica la transferencia de dos electrones, catalizado por la nitrato reductasa. A continuación, el nitrito resultante se reduce hasta amonio mediante una reacción de transferencia de seis electrones catalizada por la nitrito reductasa (Flores et al., 1983b; Guerrero et

al., 1981; Losada et al., 1981; Vennesland y Guerrero, 1979).

Se han purificado hasta homogeneidad las nitrato reductasas de las cianobacterias A. nidulans y Plectonema borianum, que se han caracterizado como proteínas de peso molecular 75000 y 83000-85000, respectivamente (Candau, 1979; Mikami e Ida, 1984). La Km para el nitrato de las enzimas de ambos organismos en el ensayo con metil viológeno es de 0,7 mM (Candau, 1979; Ida y Mikami, 1983), mientras que en Plectonema el valor de la misma en el ensayo con ferredoxina es de sólo 55  $\mu$ M (Ida y Mikami, 1983). Ambas enzimas poseen molibdeno, metal que se ha descrito como constituyente de todas las nitrato reductasas conocidas, y que parece desempeñar un papel esencial en su actividad catalítica, así como hierro (Candau, 1979; Mikami e Ida, 1984). Para la enzima de Plectonema se ha sugerido que el hierro se encuentra formando parte de centros [2Fe.2S] (Mikami e Ida, 1984).

En lo que se refiere a las nitrito reductasas de cianobacterias, se ha conseguido purificar y caracterizar parcialmente las enzimas de A. nidulans (Manzano, 1977) y Anabaena sp. PCC 7119 (Méndez y Vega, 1981). Para ambas se han determinado valores de Km para el nitrito comprendidos entre 70 y 100  $\mu$ M, estando constituídas por una única cadena polipeptídica. Ambas nitrito reductasas parecen contener hierro, habiéndose

propuesto la existencia de un grupo prostético del tipo sirohemo, típico de la nitrito reductasa de plantas superiores, en el enzima de Anabaena (Méndez y Vega, 1981).

Una característica importante que poseen tanto la nitrato reductasa como la nitrito reductasa de todas las cianobacterias estudiadas es la de utilizar ferredoxina reducida como donador fisiológico de electrones (Flores et al., 1983b; Manzano et al., 1976; Manzano et al., 1978; Mikami e Ida, 1984; Ortega et al., 1976). Este hecho, unido a que las enzimas se encuentran generalmente asociadas a membranas con actividad fotosintética (Candau et al., 1976; Hattori y Myers, 1967; Ida y Mikami, 1983; Manzano et al., 1976; Mikami e Ida, 1984; Ortega et al., 1976), sugiere que en cianobacterias exista una estrecha relación entre los procesos de generación fotosintética de poder reductor y reducción del nitrato. De hecho, existen diversas referencias acerca de la reducción de nitrato y/o nitrito asociada a fotosíntesis anoxigénica, en sistemas constituidos por células intactas o partículas conteniendo clorofila y ferredoxina, iluminadas en presencia de un donador de electrones adecuado para el fotosistema I (Guerrero et al., 1974; Hattori y Myers, 1967; Manzano et al., 1976; Ortega et al., 1976; Peschek, 1979). Asimismo, estudios llevados a cabo con membranas fotosintéticas (Candau et al., 1976; Ortega et al., 1976) y con células tratadas con MSX en ausencia



de  $\text{CO}_2$  (Flores et al., 1983a, b), indican que nitrato y nitrito actúan como reactivos de Hill, habiéndose determinado estequiometrías de 2 y 1,5 moles de oxígeno desprendidos por mol de nitrato o nitrito reducido, respectivamente. También se ha observado que en células permeabilizadas el nitrato y el nitrito amortiguan la fluorescencia de la clorofila, lo que indica que estos iones pueden actuar como aceptores de electrones del aparato fotosintético (Serrano et al., 1982). Por último, se ha descrito que cuando la fijación de  $\text{CO}_2$  funciona a máxima capacidad, esto es, saturación de luz y bicarbonato, la adición de nitrato a células intactas de A. nidulans induce una estimulación del desprendimiento de oxígeno, sin que se deprima la fijación de  $\text{CO}_2$ , lo que indica que, en condiciones fisiológicas, la asimilación de nitrato es un proceso fotosintético (Romero y Lara, 1987).

### 1.1.3. Asimilación del amonio

El amonio se asimila incorporándose a esqueletos carbonados. La asimilación primaria del amonio en cianobacterias tiene lugar fundamentalmente a través de la ruta glutamina sintetasa-glutamato sintasa (Flores et al., 1983b). En la reacción catalizada por la glutamina sintetasa, el amonio se incorpora primeramente en el grupo amido de la glutamina, desde donde se transfiere al  $\text{C}\alpha$  del  $\alpha$ -cetoglutarato, con la participación de la glutamato sintasa, para formar

glutamato. La formación neta de una molécula de glutamato requiere el gasto de dos equivalentes de reducción y una molécula de ATP. Tanto en cianobacterias unicelulares como en filamentosas fijadoras de nitrógeno, la ruta glutamina sintetasa-glutamato sintasa parece ser operativa independientemente de la fuente de nitrógeno que se utilice para el cultivo de las células (Flores et al. 1983b; Guerrero y Lara, 1987). En la cianobacteria Synechocystis PCC 6803 se han detectado niveles significativos de actividad glutamato deshidrogenasa, lo que podría indicar que esta ruta alternativa de asimilación de amonio sea funcional en esta cianobacteria (Florencio et al., 1987).

## 1.2. REGULACION DE LA ASIMILACION DEL NITRATO EN CIANOBACTERIAS

El proceso de asimilación de nitrato puede verse afectado por una amplia variedad de factores, tales como son la disponibilidad de los diferentes sustratos requeridos, incluyendo, entre otros, esqueletos carbonados, reductores adecuados o ATP, así como por determinados metabolitos con papel regulador. Este apartado se restringe, sin embargo, a la consideración de los efectos que, sobre la asimilación del nitrato, ejercen el propio nitrato, el ión amonio (producto final de la reducción del nitrato) y productos resultantes de la fijación del  $\text{CO}_2$ . Dentro de este marco se considerarán exclusivamente los efectos reguladores ejercidos sobre las primeras etapas del proceso de asimilación del nitrato, esto es, la entrada del sustrato en la célula y su reducción intracelular hasta amonio.

### 1.2.1. Regulación del transporte de nitrato

El transporte de nitrato se encuentra sometido a regulación por compuestos derivados de la asimilación del amonio así como por derivados de la fijación del  $\text{CO}_2$ , en procesos que parecen hallarse estrechamente relacionados.

Cuando suspensiones celulares de cianobacterias utilizando nitrato se suplementan con amonio a concentraciones tan bajas como 10-50  $\mu\text{M}$ , el consumo de nitrato se ve drásticamente inhibido (Flores et al., 1983b; Guerrero y Lara, 1987). Esta inhibición por amonio de la utilización de nitrato parece tener lugar a nivel de transporte del anión, ya que el amonio inhibe la acumulación de nitrato en células de A. nidulans (Lara et al., 1987; Romero, 1986).

El amonio ha de asimilarse para inhibir el transporte de nitrato. Así, cuando células de A. nidulans se tratan con inhibidores de glutamina sintetasa (MSX o 5-hidroxilisina) o de glutamato sintasa y otras glutamina-amido transferasas (azaserina) no se observa efecto negativo del amonio sobre el transporte de nitrato (Flores et al., 1980; 1983b; Lara et al., 1987; Romero, 1986). Aunque en condiciones normales el efecto inhibitor del amonio sobre el consumo de nitrato es muy drástico e inmediato, eso no es siempre así, pareciendo existir una cierta correlación entre el grado de inhibición y la velocidad de asimilación de amonio por las células (Flores et al., 1980; Romero et al., 1987). Así, la magnitud del efecto del amonio sobre el consumo de nitrato es variable, dependiendo, probablemente, del nivel celular de determinados derivados de la asimilación del amonio. En condiciones de utilización de nitrato, el consumo de dicho ión se encontraría también bajo el control ejercido por el amonio resultante de la

reducción del nitrato, como lo indica el hecho de que en ausencia de amonio añadido algunos inhibidores de la glutamina sintetasa estimulen la velocidad de consumo de nitrato (Flores et al., 1980; Guerrero y Lara, 1987; Romero et al., 1987).

El consumo de nitrato en cianobacterias presenta, además, una dependencia estricta por fijación de  $\text{CO}_2$ . La concentración de  $\text{CO}_2$  que permite una velocidad de consumo de nitrato mitad de la máxima ( $3,7 \mu\text{M}$ ) es muy cercana a la  $K_s$  para el  $\text{CO}_2$  del desprendimiento de oxígeno dependiente de  $\text{CO}_2$  ( $4 \mu\text{M}$ ) (Flores et al., 1983c). Por otra parte, la inhibición progresiva de la fijación de  $\text{CO}_2$  mediante el uso de concentraciones crecientes de D,L-gliceraldehido resulta en una disminución gradual de la velocidad de utilización de nitrato (Lara et al., 1984; Romero et al., 1985).

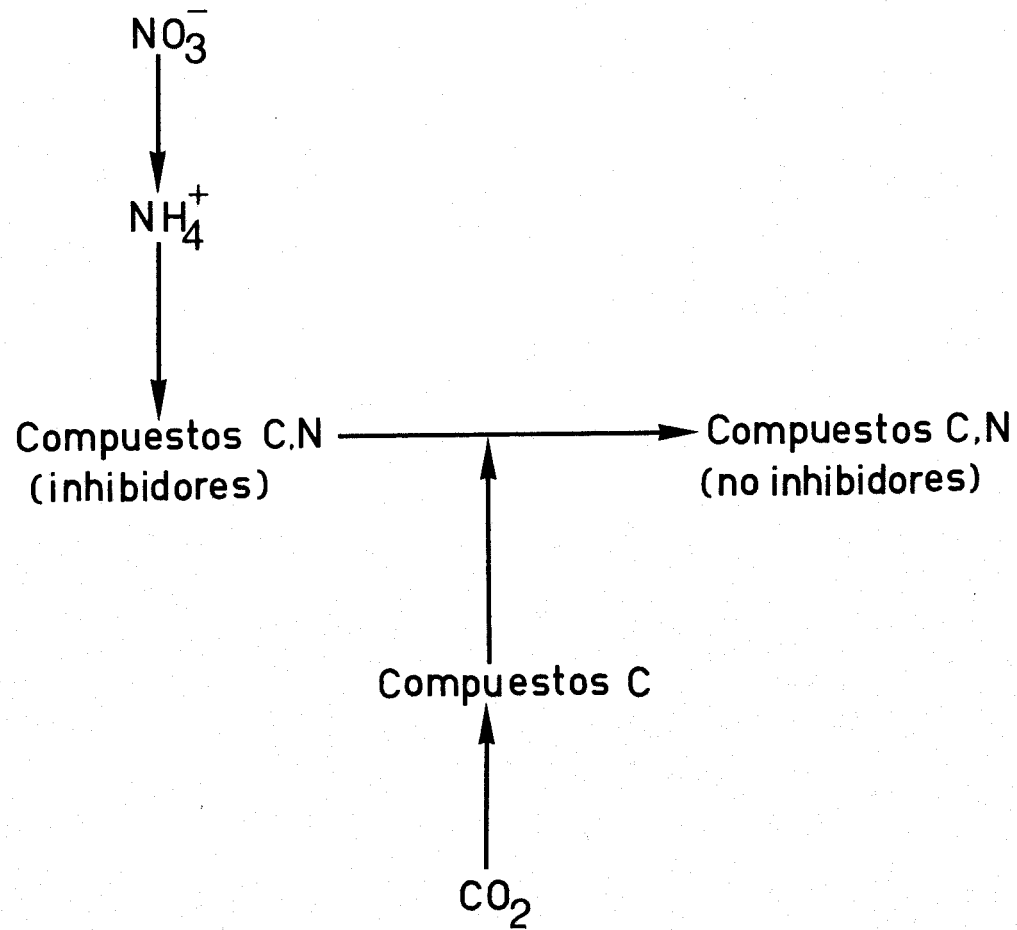
La dependencia del consumo de nitrato por  $\text{CO}_2$  se halla ligada íntimamente a la razón C/N preexistente en las células. Así, se ha mostrado que células deficientes en nitrógeno de A. nidulans y de una estirpe mutante de Agmenellum quadruplicatum incapaz de asimilar nitrito pueden consumir nitrato en ausencia de  $\text{CO}_2$  (Flores et al., 1983c; Stevens y Van Baalen, 1973). Al parecer, los carbohidratos acumulados en las células deficientes en nitrógeno pueden reemplazar a los

productos recientes de la fijación de  $\text{CO}_2$  en su efecto positivo sobre el consumo de nitrato.

Otras observaciones de interés para entender mejor la naturaleza de la dependencia por carbono del consumo de nitrato son las siguientes. El tratamiento de las células de A. nidulans con inhibidores de la ruta glutamina sintetasa-glutamato sintasa permite a dichas células consumir nitrato aún en ausencia de  $\text{CO}_2$  (Flores et al., 1983a,b) y las libera de la inhibición del consumo de nitrato causada por el DLG (Lara et al., 1984; Romero et al., 1985). Por otra parte, la correlación existente entre las velocidades de fijación de  $\text{CO}_2$  y de consumo de nitrato a diferentes intensidades luminosas desaparece cuando las células se tratan con MSX, alcanzando el consumo de nitrato la saturación por luz a intensidades mucho menores (Lara y Romero, 1986). Es decir, el hecho de impedir la asimilación de amonio, no sólo elimina la inhibición por amonio del consumo de nitrato, sino que también libera a dicho proceso de la dependencia por la fijación de  $\text{CO}_2$ .

Al igual que en la inhibición del consumo de nitrato por amonio, el control por  $\text{CO}_2$  de este proceso parece operar a nivel del transporte del ión al interior celular. De hecho, en A. nidulans, el DLG inhibe la acumulación de nitrato en el interior de las células, siendo este efecto impedido por tratamiento de las mismas con MSX (Lara et al., 1987; Romero, 1986).

Todos estos datos indican la existencia de una relación entre la dependencia por  $\text{CO}_2$  del consumo de nitrato y la inhibición de dicho proceso por amonio, y han sido interpretados en el marco de un modelo para la regulación del consumo de nitrato (Flores et al., 1983c; Guerrero y Lara, 1987; Romero et al., 1985) que implica la participación concertada de productos provenientes de la asimilación del nitrato vía amonio, así como de la fijación del  $\text{CO}_2$  (Esquema 1). De acuerdo con dicho modelo, el consumo de nitrato estaría gobernado por retroalimentación negativa ejercida por ciertos compuestos orgánicos resultantes de la asimilación del amonio. La concentración intracelular de esos metabolitos inhibidores se hallaría determinada, de un lado, por el suministro de amonio a partir del cual se generan, y de otro, por el de productos de la fijación del  $\text{CO}_2$ , los cuales se combinarían con los inhibidores derivados del amonio, eliminándolos, a la vez que generarían otros metabolitos orgánicos nitrogenados no inhibidores. Este sistema de regulación permitiría una modulación precisa de la utilización de nitrato, ejercida no sólo por la acumulación de sus propios productos, sino también a través de la disponibilidad de metabolitos carbonados.



Esquema 1. Modelo propuesto para la participación del amonio y del  $\text{CO}_2$  en el establecimiento de los niveles intracelulares de metabolitos inhibidores de la utilización de nitrato.



### 1.2.2. Control de la cantidad de enzima activo

El amonio ejerce también un efecto negativo sobre los niveles celulares de nitrato reductasa y nitrito reductasa, actuando como represor nutricional de la síntesis de dichas enzimas (Flores et al., 1983b; Herrero, 1983; Herrero et al., 1981; 1985). La existencia de represión por amonio de la nitrato reductasa, aparentemente a nivel transcripcional, se ha confirmado en las cianobacterias unicelulares no fijadoras de nitrógeno Agmenellum quadruplicatum, Anacystis nidulans y Synechocystis sp. PCC 6714 (Flores et al., 1983b; Herrero et al., 1981; Stevens y Van Baalen, 1974). En cianobacterias fijadoras de nitrógeno, la síntesis de la nitrato reductasa también se ve afectada negativamente por amonio. Además, y a diferencia de lo que ocurre en las cianobacterias no fijadoras, el nitrato se comporta como un inductor de la nitrato reductasa (Flores et al., 1983b; Hattori, 1962; Herrero et al., 1981; 1985; Ohmori y Hattori, 1970; Ramos y Guerrero, 1983).

Al igual que ocurre con la inhibición por amonio del consumo de nitrato, el efecto negativo sobre la síntesis de nitrato reductasa no parece ser causado por el mismo amonio, sino que requiere su asimilación. Esto se basa en la observación de que la MSX permite que tenga lugar síntesis de nitrato reductasa en

presencia de amonio, tanto en cianobacterias no fijadoras de nitrógeno como en fijadoras (Flores et al., 1983b; Herrero et al., 1981; Ramos y Guerrero, 1983; Ramos et al., 1982).

Aunque en el caso de las cianobacterias no fijadoras no se requiere como inductor al nitrato, éste tiene un efecto positivo sobre la actividad nitrato reductasa, que parece ejercerse a nivel post-transcripcional y que explicaría los mayores niveles de nitrato reductasa encontrados en células incubadas en nitrato respecto a células incubadas en ausencia de fuente de nitrógeno (Flores et al., 1983b; Herrero et al., 1981; 1984; 1985). Experimentos realizados con células de A. nidulans han mostrado la existencia de una inactivación de la nitrato reductasa en ausencia de fuente de nitrógeno combinado, promovida por la luz, que puede influir en las diferencias mencionadas, e indican que la estabilidad de la enzima activa es un factor decisivo en la determinación del nivel de actividad nitrato reductasa (Herrero et al., 1984).

Existe poca información disponible acerca de la regulación de la nitrito reductasa en cianobacterias. En A. nidulans y Anabaena sp. PCC 7119, la naturaleza de la fuente de nitrógeno afecta a los niveles de nitrito reductasa de manera análoga a como afecta a los de nitrato reductasa (Herrero, 1983;

Herrero y Guerrero, 1986; Méndez et al., 1981). En Anacystis, el efecto represor del amonio también se previene por MSX, y la acción positiva del nitrato no requiere su conversión previa en nitrito (Herrero, 1983; Herrero y Guerrero, 1986). Sin embargo, la nitrito reductasa de Anabaena parece inducirse por nitrito pero no por nitrato (Ohmori y Hattori, 1970).

### 1.3. GENETICA DE LA ASIMILACION DEL NITRATO

Este apartado trata de la genética de la asimilación del nitrato en organismos distintos a las cianobacterias, discutiéndose el caso particular de estas últimas en el apartado 1.4.4. Diferentes tipos de organismos presentan la capacidad de utilizar nitrato como fuente de nitrógeno, habiéndose obtenido mutantes afectados en el proceso de asimilación de nitrato en una variedad de grupos. Así, se ha descrito el aislamiento de tales mutantes en hongos (Birkett y Rowlands, 1981 ; Cove, 1978; Marzluf, 1981), bacterias (Santero et al., 1986; Sias e Ingraham, 1979; Stouthamer, 1967), algas (Shafer et al., 1961; Sosa et al., 1978) y plantas superiores (Kleinhofs et al., 1985; Wray, 1986).

Sin duda, el sistema de asimilación de nitrato mejor estudiado desde el punto de vista genético es el de hongos, concretamente el de las especies Aspergillus nidulans y Neurospora crassa. Los estudios llevados a cabo con estos organismos han conducido a la clara definición de un buen número de genes implicados en el proceso de asimilación de nitrato, así como de la función que los productos de dichos genes desempeñan (Tabla 1). Se han identificado y mapeado los genes responsables de la síntesis de las apoproteínas de las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa de

Tabla 1. Genes de Neurospora crassa y Aspergillus nidulans implicados en la asimilación de nitrato

Función propuesta	Locus	
	<u>Neurospora</u>	<u>Aspergillus</u>
gen estructural para la nitrato reductasa	<u>nit-3</u>	<u>niaD</u>
gen estructural para la nitrito reductasa	<u>nit-6</u>	<u>niiA</u>
síntesis del cofactor de molibdeno	<u>nit-1</u> <u>nit-7</u> <u>nit-8</u> <u>nit-9</u>	<u>cnxABC</u> <u>cnxE</u> <u>cnxF</u> <u>cnxG</u>
inducción por nitrato	<u>nit-4</u>	<u>nirA</u>
represión por amonio	<u>nit-2</u> <u>nmr-1</u>	<u>areA</u> <u>tamA</u>
transporte de nitrato (?)		<u>crnA</u>

Tomado de Brownlee y Arst, 1983, Marzluf, 1981 y Tomsett et al., 1981.

Neurospora y Aspergillus. Tales genes se hallan estrechamente ligados en Aspergillus mientras que no ocurre así con los de Neurospora (Marzluf, 1981). Parece claro, no obstante, que los genes de Neurospora poseen promotores independientes, aunque su regulación se lleve a cabo de modo paralelo (Arst et al., 1979). Existen además en ambas especies un buen número de genes implicados en la síntesis y el ensamblaje de un cofactor con molibdeno que forma parte de la nitrato reductasa (Cove, 1979; Marzluf, 1981; Scazzocchio, 1979). La síntesis de las enzimas nitrato y nitrito reductasa se encuentra sometida en estos organismos a dos tipos de control, siendo uno la inducción por nitrato y el otro la represión por amonio, que afecta además a la síntesis de otras muchas proteínas implicadas en el metabolismo del nitrógeno (Cove, 1979 ; Marzluf, 1981). Los genes responsables de estos dos efectos han sido identificados y se piensa que codifican para proteínas con acción positiva en la síntesis de las enzimas de la reducción del nitrato (Cove, 1979 ; Marzluf, 1981; Wiame et al., 1985). De hecho, se ha llegado a identificar en Neurospora un polipéptido con capacidad de unión al ADN, que se corresponde con el producto del gen nit-2, responsable de la represión por amonio (Grove y Marzluf, 1981). Superpuesto a estos sistemas de regulación se ha propuesto además, para ambos organismos, la existencia de un mecanismo adicional de control de la síntesis del sistema que implica la participación de la misma nitrato

reductasa. La base para la propuesta de esta regulación autógena, cuya existencia es aún motivo de controversia, la constituye la observación de que muchos mutantes carentes de actividad nitrato reductasa presentan síntesis constitutiva de nitrito reductasa y de material precipitable por anticuerpos contra la nitrato reductasa (Cove y Pateman, 1969; Tomsett y Garrett, 1981). En Aspergillus nidulans se ha comprobado además que la mutación en el gen crnA, que se halla estrechamente ligado a los genes niaD y niiA (genes estructurales de la nitrato reductasa y la nitrito reductasa, respectivamente), provoca un fenotipo de reducción de la capacidad de consumo de nitrato en conidiosporas y micelios jóvenes (Brownlee y Arst, 1981). Esos estudios suponen la primera referencia a una mutación que pudiera afectar al transporte de nitrato en un microorganismo. Por último, cabe comentar que en Neurospora se ha descrito la existencia de otro gen (denominado nmr-1) con carácter regulador. La mutación en nmr-1 provoca la síntesis desreprimida de nitrato reductasa incluso en presencia de glutamina (Tomsett et al., 1983). La glutamina se considera el metabolito que actúa como efector en la represión por amonio en este organismo (Grove y Marzluf, 1981; Wiame et al., 1985).

El conocimiento del sistema de asimilación de nitrato bajo el punto de vista genético no es tan completo en otros microorganismos. En la bacteria heterótrofa Pseudomonas aeruginosa se ha mostrado que

al menos cinco genes contribuyen al funcionamiento de la ruta de asimilación de nitrato. La mutación en uno de esos genes provoca simultáneamente la pérdida de la actividad nitrato reductasa y la incapacidad de crecer en medios con nitrato o nitrito como fuente de nitrógeno (Sias e Ingraham, 1979). De los cuatro genes restantes uno está relacionado con la síntesis de la nitrito reductasa y los otros tres con la de la nitrato reductasa (Sias e Ingraham, 1979; Sias et al., 1980). Por otra parte, en el alga verde Chlamydomonas reinhardtii se han identificado al menos seis genes implicados en la producción de la molécula activa de nitrato reductasa. Uno, o quizás dos genes, codificaría(n) la apoproteína de la nitrato reductasa. Un segundo gen se halla implicado en la regulación de la síntesis de la enzima y los cuatro genes restantes están relacionados con la producción del cofactor de molibdeno (Fernández y Matagne, 1984).

En plantas superiores la organización genética del sistema de asimilación de nitrato es, asimismo, poco conocida. Los mutantes afectados en el sistema pueden diferenciarse, esencialmente, en dos tipos: mutantes afectados en el gen o genes que codifica(n) para la apoproteína de la nitrato reductasa y mutantes afectados en genes implicados en la síntesis del cofactor de molibdeno (Kleinhofs et al., 1985; Wray, 1986). No se han identificado hasta el momento mutantes afectados en la actividad nitrito reductasa ni en la regulación del



sistema. En la especie Arabidopsis thaliana se ha descrito un mutante que pudiera estar afectado en el proceso de entrada del nitrato (Doddema y Telkamp, 1979).

#### 1.4. GENETICA DE CIANOBACTERIAS

La genética de las cianobacterias es un campo de desarrollo relativamente reciente. Así, por ejemplo, hasta los trabajos de Van Baalen (1965) y Allen (1968) no se habían desarrollado condiciones que permitiesen buena viabilidad de estos organismos en medios sólidos. El aislamiento de mutantes y el análisis genético de éstos han resultado problemáticos hasta hace poco, e incluso hoy en día presentan dificultades, puesto que sólo algunos de los métodos de análisis genético establecidos para otros microorganismos funcionan adecuadamente en este grupo.

##### 1.4.1. Aislamiento de estirpes mutantes

A pesar de las dificultades encontradas inicialmente, actualmente se dispone de una amplia variedad de estirpes mutantes de cianobacterias incluyendo, entre otros, resistentes a antibióticos y a otros compuestos tóxicos, mutantes afectados en procesos de diferenciación celular, en actividad fotosintética o en la composición de pigmentos, así como mutantes auxótrofos (Herdman, 1982).

Se conocen diferentes agentes mutagénicos activos en distintas estirpes de cianobacterias (Herdman, 1982). En Anacystis nidulans se han ensayado muy diversos tipos de mutágenos, tales como nitrosaminas

y agentes alquilantes, luz ultravioleta, rayos X, mitomicina C e hidroxilamina (Herdman, 1982); de todos ellos, el mutágeno de uso más común es, probablemente, la nitrosoguanidina, que resulta ser bastante efectivo en Anacystis.

Recientemente se ha descrito la utilización del transposón Tn901 como mutágeno en la estirpe Anacystis nidulans R2 (Tandeau de Marsac et al., 1982). La inducción de mutaciones por la inserción de un transposón en un gen presenta dos características de interés. Por un lado, origina mutaciones muy estables y, por otro, hace que el gen mutado quede marcado con el marcador de resistencia para el que codifica el transposón. Esta segunda característica es de gran utilidad en el clonaje de genes y, de hecho, ha facilitado la clonación de tres genes de A. nidulans R2, uno de ellos implicado en la síntesis de metionina (Tandeau de Marsac et al., 1982) y los otros dos en la asimilación de nitrato (Kuhlemeier et al., 1984a, b). La mutagénesis con Tn901 como mutágeno ha sido el método utilizado para la obtención de la serie de estirpes mutantes objeto de este trabajo.

#### 1.4.2. Transferencia genética en cianobacterias

El análisis genético de cualquier proceso bioquímico en un organismo requiere, además de la disponibilidad de mutantes afectados en distintos pasos del proceso en cuestión, la posibilidad de introducir material genético en los organismos bajo estudio. De ese modo, pueden llevarse a cabo estudios de las relaciones existentes entre las distintas mutaciones, mediante análisis de recombinación y complementación. La metodología para la transferencia genética en cianobacterias se encuentra aún bastante limitada. Así, no se han encontrado cianofagos capaces de llevar a cabo transducción, y no se han confirmado las escasas referencias a conjugación entre cianobacterias (Padhy y Sing, 1978; Stewart y Sing, 1975). Los métodos disponibles se limitan a la transferencia de vectores bifásicos desde Escherichia coli por conjugación (Flores et al., 1985; Wolk et al., 1984) y a la transformación (Porter, 1986).

La transformación no funciona en cianobacterias filamentosas, siendo ésto debido probablemente, en parte, a la notable actividad nucleasa extracelular que presentan la mayoría de las estirpes de cianobacterias filamentosas (Wolk y Kraus, 1982). Hasta la fecha, el único método disponible para la introducción de material genético en cianobacterias filamentosas consiste en la transferencia de genes desde E. coli, mediante

conjugación (Wolk et al., 1984). El método descrito implica la participación de varios plásmidos: uno híbrido derivado del plásmido pBR322 de E. coli (que incluye el sitio bom) conteniendo un replicón de Nostoc sp. PCC 7524, el plásmido de amplio espectro RP4, que aporta las funciones tra, y un plásmido auxiliar, que aporta el gen mob. La función conjunta de ~~éstos~~<sup>estos</sup> elementos posibilita la introducción en la célula cianobacteriana del plásmido híbrido, el cual se mantiene en ella de manera estable. Se ha descrito el funcionamiento de este método en 6 estirpes de cianobacterias filamentosas, entre las que se incluyen 3 heterótrofas facultativas (Flores y Wolk, 1985; Wolk et al., 1984).

La transformación es el método de transferencia de material genético que más frecuentemente se ha utilizado en cianobacterias unicelulares. El proceso se demostró por primera vez de manera convincente en Anacystis nidulans 602 (Synechococcus PCC 7943) por Shestakov y Khuyen (1970), utilizando marcadores de resistencia a antibióticos. Más tarde se ha descrito transformación en otras varias estirpes de cianobacterias unicelulares como son A. nidulans UTEX 625 (Synechococcus PCC 6301; Herdman y Carr, 1971), A. nidulans R2 (Synechococcus PCC 7942; Grigorieva y Shestakov, 1976), Agmenellum quadruplicatum PR6 (Synechococcus PCC 7002 ; Stevens y Porter, 1980), Aphanocapsa sp. (Synechocystis PCC 6714; Astier y Espardellier, 1976), Gloeocapsa alpicola (Synechocystis

PCC 6308; Devilly y Houghton, 1977), Synechocystis PCC 6803 (Grigorieva y Shestakov, 1982), y Eucapsis (Synechocystis PCC 6903) y Agmenellum quadruplicatum (Synechocystis PCC 73109; Stevens y Porter, 1986). Un sistema fisiológico, presente en la mayoría de las estirpes calificadas como transformables, permite la entrada de ADN en cianobacterias sin necesidad de tratamientos especiales. Solamente la transformación de Gloeocapasa alpicola requiere el tratamiento previo de las células con  $\text{CaCl}_2$  (Devilly y Houghton, 1977).

Aunque los primeros trabajos en este contexto trataban de la transformación con ADN cromosómico, en la que la producción de transformantes implica recombinación con el genoma de la célula receptora, recientemente gran parte de la atención se ha centrado en la transformación con plásmidos. Al poseer los plásmidos utilizados capacidad de autorreplicación, la introducción en las células de material genético incluido en estos elementos podría utilizarse para la fabricación de merodiploides, con el gran potencial de análisis genético que eso implica.

Los estudios de transformación con plásmidos en cianobacterias arrancan de los trabajos de Van den Hondel et al. (1980), que resultaron en la introducción del transposón Tn901 en el plásmido menor de A. nidulans R2. Esto supuso la creación del primer plásmido de cianobacteria con un marcador genético seleccionable,

dado que los plásmidos encontrados en cianobacterias hasta el momento son de naturaleza críptica (Lau y Doolittle, 1979; Lau et al., 1980; Simon, 1978; Van den Hondel et al., 1979). La estrategia más utilizada para obtener plásmidos de cianobacteria con marcadores seleccionables ha sido la fabricación de plásmidos híbridos compuestos por fragmentos de plásmidos de E. coli y de cianobacteria (Porter, 1986), capaces de replicarse en ambos organismos. La naturaleza híbrida de estos plásmidos permite llevar a cabo parte de las manipulaciones en E. coli y facilita la obtención de grandes cantidades de ADN plasmídico. Hasta que, recientemente, se describió la obtención de una serie de vectores plasmídicos híbridos funcionales en E. coli y Synechocystis PCC 6803 (Chauvat et al., 1986) todo el trabajo de transformación con plásmidos se había llevado a cabo en las estirpes Agmenellum quadruplicatum PCC 7002 y A. nidulans R2 PCC 7942. Este último organismo fue el que se eligió para la realización del trabajo que se presenta.

Se ha conseguido también en A. nidulans R2 la transferencia por conjugación de genes desde E. coli según el método descrito anteriormente para estirpes filamentosas. En este caso el plásmido que se transfiere es un derivado del pBR325 de E. coli que contiene un replicón de A. nidulans R2 y el sitio bom (Wolk et al., 1984). Por el momento no existen otras referencias a estudios en los que se emplee ese sistema

de transferencia genética en estirpes unicelulares.

#### 1.4.3. Clonaje de genes en cianobacterias

Unas de las razones obvias del énfasis puesto por los investigadores en el desarrollo de sistemas de vectores plasmídicos funcionales en cianobacterias reside en el interés de clonar genes de estos organismos. A pesar de que la primera referencia a la clonación de un gen de cianobacterias data de sólo seis años atrás (Fisher et al., 1981), hoy en día el número de genes cianobacterianos clonados asciende a algunas decenas, incluyéndose entre ellos genes que codifican para proteínas implicadas en muy diversos procesos, tales como asimilación de nitrógeno inorgánico, fotosíntesis y biosíntesis de aminoácidos (Curtis y Haselkorn, 1983; Fisher et al., 1981; Golden, 1986; Kuhlemeier et al., 1984a, b; Porter et al., 1986; Tandeau de Marsac et al., 1982). Asimismo, las estrategias utilizadas para clonar estos genes han sido muy diversas e incluyen la utilización de sondas heterólogas (Fisher et al., 1981), el empleo de sondas construídas en base a secuencias de aminoácidos conocidas (Pilot y Fox, 1984), la complementación de mutantes auxótrofos de cianobacterias (Kuhlemeier et al., 1984a), la complementación de funciones en mutantes auxótrofos de E. coli (Cangelosi et al., 1986; Porter et al., 1986) y la utilización de mutantes inducidos con transposición (Tandeau de Marsac et al., 1982).



Hay que señalar que, a pesar de disponer de esta amplia colección de genes clonados, aún no se ha confirmado la obtención de merodiploides cianobacterianos, por no disponerse de mutantes de estos organismos con fenotipo  $\text{Rec}^-$  (deficientes en recombinación). Este es un punto de gran relevancia para el desarrollo de la genética en este grupo de organismos, sobre el que se centran notables esfuerzos. De hecho, ya se dispone de genes clonados de cianobacterias capaces de complementar la función del gen recA en mutantes de E. coli (Borrias et al., 1985; Geoghegan y Houghton, 1987; Murphy et al., 1987; Owtrim y Coleman, 1987).

#### 1.4.4. Genética de la asimilación de nitrato en cianobacterias

El conocimiento de la organización genética del sistema de asimilación de nitrato en cianobacterias es muy pobre, como cabe esperar para un grupo de organismos en el que los métodos para el análisis genético se están desarrollando en la actualidad. Se ha descrito el aislamiento de numerosos mutantes afectados en el sistema de asimilación de nitrato en diferentes estirpes de cianobacterias (Herdman y Carr, 1972; Herdman et al., 1980; Kuhlemeier et al., 1984a, b; Singh y Sonie, 1977; Stevens y Van Baalen, 1970). El aislamiento de estos mutantes se ha visto favorecido por

el característico fenotipo de colonias amarillas que presentan en medio sólido con nitrato como fuente de nitrógeno. De hecho, el aislamiento de algunos de estos mutantes es el resultado de estudios emprendidos con otra finalidad, como es la de la optimización de condiciones de mutagénesis (Herdman y Carr, 1972; Herdman et al., 1980). Por otra parte, son escasos los estudios encaminados a la caracterización de este tipo de mutantes (Bagchi y Singh, 1984; Singh y Sonie, 1977; Singh et al., 1977; Stevens y Van Baalen, 1970; 1973; 1974), habiendo dado lugar algunos de ellos a resultados sin confirmación posterior (Bagchi y Singh, 1984).

Un significativo avance en los estudios de la genética del sistema de asimilación de nitrato en cianobacterias lo constituyen los trabajos de Kuhlemeier et al. (1984a, b) que han resultado en la clonación de tres genes de A. nidulans R2 implicados en la reducción de nitrato. La función específica que los productos de estos genes desempeñan en la producción de una molécula de nitrato reductasa activa se desconoce en la actualidad, ignorándose incluso si alguno de tales genes codifica para la apoproteína constituyente de la enzima. El trabajo llevado a cabo por Kuhlemeier con estos genes clonados ha sido pionero en la utilización de la transformación en cianobacterias para el análisis genético de un sistema.

En el presente trabajo se describen una serie de estudios encaminados a profundizar en el conocimiento de la genética del sistema de asimilación de nitrato en la cianobacteria A. nidulans R2. Se han aislado y caracterizado una serie de estirpes mutantes de A. nidulans R2 afectadas en el proceso de asimilación de nitrato, lo que ha permitido la definición de dos nuevos genes implicados en el funcionamiento del sistema. Los genes definidos poseen el interés adicional de que la mutación en cualquiera de ellos provoca una alteración en la regulación de la síntesis de componentes del sistema asimilador de nitrato. Asimismo, se han utilizado algunas de las estirpes mutantes obtenidas en el estudio de aspectos concretos del funcionamiento del sistema, especialmente del proceso de entrada de nitrato al interior celular.

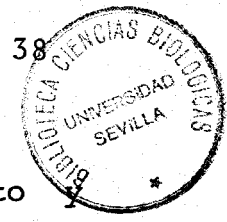
Parte de los resultados que aquí se exponen han sido ya publicados (Madueño et al, 1987a) o se encuentran en vías de publicación (Madueño et al., 1987b), habiendo sido también objeto de comunicaciones en congresos (Madueño y Guerrero, 1984; 1985a,b; 1986; Vega-Palas et al., 1987).

## 2. MATERIALES Y METODOS

## 2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

En la mayoría de los experimentos que integran este trabajo se ha utilizado como material biológico la estirpe A6 de la cianobacteria unicelular Anacystis nidulans R2 (Synechococcus elongatus PCC 7942, Rippka y Cohen-Bazire, 1983) y dieciocho estirpes mutantes de ella derivadas, cuyo aislamiento y caracterización son el objeto de este estudio. En los experimentos en que así se indica, se hizo uso de la estirpe M4<sup>-</sup> de A. nidulans R2 y de dos estirpes mutantes obtenidas a partir de ellas. La estirpe A6 es un derivado de A. nidulans R2 obtenido por transposición del transposón Tn901 en el plásmido nativo de A. nidulans R2 denominado pUH24 (Van den Hondel et al., 1980), lo que le confiere resistencia a bajos niveles de ampicilina en el medio (1-2 µg/ml). La estirpe M4<sup>-</sup> es otro derivado de A. nidulans R2 caracterizada por haber perdido el plásmido pUH24 (Kuhlemeier et al., 1983). Ni en el caso de A6 ni en el de M4<sup>-</sup> se ha visto, hasta el momento, que la alteración de la dotación plasmídica les confiera característica alguna que las haga distinguibles de su parental.

Para la purificación de los plásmidos con los que se llevaron a cabo las transformaciones se partió de las estirpes HB101[pNR12], HB101[pNR63] y HB101[pNR193] de Escherichia coli, derivadas de la estirpe HB101 (Kuhlemeier et al., 1984a, b). Los plásmidos pNR12, pNR63 y pNR193 contienen tres genes distintos de A.



nidulans R2 implicados en la reducción del nitrato y codifican resistencia a los antibióticos ampicilina y cloranfenicol. Las estirpes de cianobacterias A6 y M4<sup>-</sup> así como las de E. coli utilizadas, han sido cedidas por el profesor G.A. Van Arkel de la Universidad de Utrecht (Holanda).

Las cianobacterias se cultivaban fotoautotróficamente en condiciones asépticas en dos tipos de medios sintéticos. El que se utilizaba rutinariamente (que en lo sucesivo se denominará medio A, Herrero et al., 1981) contenía los siguientes nutrientes disueltos en un litro de agua destilada: MgSO<sub>4</sub>, 0,5 mmol; CaCl<sub>2</sub>, 0,1 mmol; NaCl, 2 mmol; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 4 μmol; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 mmol; NaHCO<sub>3</sub>, 10 mmol; 1 ml de disolución de Fe-EDTA; 1 ml de disolución de micronutrientes; y una cantidad adecuada del nutriente nitrogenado. El nutriente nitrogenado habitualmente utilizado era el amonio -en forma de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>- aunque ocasionalmente también se utilizó nitrato o nitrito (en las formas de KNO<sub>3</sub> y KNO<sub>2</sub>); estos nutrientes se hallaban presentes en el medio a concentraciones de 5 mmol, 20 mmol y 2 mmol por litro de agua destilada, respectivamente. La disolución de Fe-EDTA se preparaba según el procedimiento descrito por Arnon et al. (1974), como sigue. Se disuelven 16 g de EDTA y 10,4 g de KOH en 186 ml de agua y se mezclan con una disolución que contiene 13,7 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O en 364 ml de agua. A continuación se burbujea aire a través de la mezcla

resultante durante 6-12 h, con objeto de oxidar el hierro hasta la forma férrica. La disolución de micronutrientes contenía, por litro de agua destilada,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 46 mmol;  $\text{MnCl}_2$ , 9 mmol;  $\text{ZnSO}_4$ , 0,77 mmol; y  $\text{CuSO}_4$ , 0,32 mmol. El medio de cultivo conteniendo todos sus componentes, excepto el fosfato y el bicarbonato, se esterilizaba en autoclave, durante 20 min, a la presión de 2 atm ( $121^\circ\text{C}$ ). El fosfato y el bicarbonato se añadían en forma de disolución concentrada de esos compuestos, la cual se esterilizaba por separado, en las mismas condiciones, y se mezclaba con el resto del medio de cultivo, una vez enfriado hasta temperatura ambiente.

Habitualmente, un volumen de 35 ml de este medio, contenido en un tubo de 23 mm de diametro por 200 mm de largo se inoculaba, en condiciones asépticas, con una cantidad de células de la estirpe utilizada correspondiente a 1-15  $\mu\text{g}$  de clorofila, proveniente de otro cultivo en medio líquido o de uno realizado sobre medio sólido. Alternativamente, cuando se indica, se utilizaron frascos de fermentación de 200 ml conteniendo 150 ml de medio. La suspensión celular se incubaba en un baño termostatzado a  $39^\circ\text{C}$ , siendo iluminada de manera continua con lamparas fluorescentes que proporcionaban luz blanca con una intensidad de  $240 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  en la superficie del recipiente de cultivo. A veces, cuando el inóculo provenía de un cultivo en medio sólido, se reducía la intensidad luminosa con el objeto de evitar procesos de fotooxidación letal (Abeliovich y

Shilo, 1972). A través de la suspensión celular se burbujeaba aire estéril enriquecido con  $\text{CO}_2$  (en proporción de 95:5, v/v), que proporcionaba tanto agitación como un suplemento de la fuente de carbono necesaria para el crecimiento del cultivo.

El segundo de los medios sintéticos utilizados para el cultivo de las cianobacterias fue el denominado BG110 (Rippka et al., 1979), con ligeras modificaciones. Este medio contenía los siguientes nutrientes disueltos en un litro de agua destilada:  $\text{MgSO}_4$ , 0,3 mmol;  $\text{CaCl}_2$ , 0,22 mmol;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 4  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,23 mmol;  $\text{NaCO}_3$ , 2 mmol; ácido cítrico, 30  $\mu\text{mol}$ ; citrato de hierro y amonio, 6 mg; EDTA 3,4  $\mu\text{mol}$ ; 1 ml de la disolución de micronutrientes antes descrita, y la cantidad adecuada del nutriente nitrogenado. El nutriente nitrogenado que se utilizó en la mayoría de los casos era el amonio (en forma de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y a concentración 5 mM) aunque a veces también se utilizó el nitrato y el nitrito en las formas de  $\text{NaNO}_3$  (medio BG11) y  $\text{KNO}_2$ , a concentraciones 18 mM y 2 mM, respectivamente. Cuando el nitrato o el nitrito eran la fuente de nitrógeno en el medio, éste se suplementaba con 10 mmol de  $\text{NaCO}_3\text{H}$  por litro y cuando era amonio se suplementaba con 10 mmol de tampón TES, pH 7,5, por litro. El medio de cultivo conteniendo todos sus componentes se esterilizaba en las condiciones descritas para el medio A, salvo cuando la fuente de nitrógeno era amonio, en cuyo caso, este último y el tampón se preparaban aparte, en una disolución



concentrada que se esterilizaba por filtración (filtro Millipore tipo HA de 45  $\mu\text{m}$  de diametro de poro) y se mezclaba con el resto del medio, una vez que éste se había enfriado a temperatura ambiente. Cuando se utilizaba este medio, el cultivo se realizaba en matraces Erlenmeyer de 50 ó 100 ml de capacidad que contenían 20 ó 50 ml de la suspensión celular, respectivamente. Estos matraces se incubaban en una cámara termostaticada a 30°C, sometidos a agitación rotatoria continua (150 rpm) e iluminados superiormente con lámparas fluorescentes que proporcionaban luz blanca con una intensidad de 30  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Para el crecimiento sobre medio sólido de las cianobacterias se utilizaba medio BG110 (con las fuentes nitrogenadas que se indican) solidificado con agar (Bacto-agar Difco) al 1%. Para la preparación de 1 l de medio sólido se preparaban dos disoluciones de 500 ml cada una que contenían, una de ellas 10 g de agar y, la otra, los componentes minerales necesarios para la preparación 1 l de medio de cultivo, incluida la fuente de nitrógeno, salvo cuando ésta era amonio, en cuyo caso éste se preparaba aparte con el tampón en una disolución concentrada. Las disoluciones de agar y de componentes minerales se esterilizaban en autoclave, tal como se ha descrito para el medio A, y la disolución de amonio y tampón se esterilizaba por filtración. Las disoluciones de agar y de componentes minerales, junto con la de amonio en su caso, se mezclaban antes de llenar las

cajas de Petri, cuando se habían enfriado hasta una temperatura de aproximadamente 50°C. Las cajas de medio sólido sembradas con las células se incubaban, para permitir el crecimiento de estas, en una cámara termostatzada a 30°C, con iluminación continua de luz blanca proporcionada por tubos fluorescentes con una intensidad de 25  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . En estas condiciones, una célula crecía hasta formar una colonia visible en un periodo de tiempo de 5-7 días.

Las estirpes de E. coli se cultivaban en medio Luria (Miller, 1972). Dicho medio contenía, disuelto en 1 l de agua destilada, lo siguiente: Bacto-Triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; y NaCl, 170 mmol. El medio se esterilizaba, tras ajustar su pH con NaOH a 7,2, en autoclave, tal como se ha descrito para el medio A. El medio sólido se preparaba del mismo modo, pero añadiendo además a la disolución 15 g de Bacto-agar, antes de ajustar el pH. Los medios se suplementaban con ampicilina y cloranfenicol a concentraciones finales de 100 y 25  $\mu\text{g}$  por ml, respectivamente.

Para las adiciones de antibióticos a los medios de cultivo o suspensiones celulares, se preparaban disoluciones concentradas de los mismos que se esterilizaban por filtración (tal como se ha descrito para la disolución de amonio y TES) y que se añadían al medio cuando éste había alcanzado una temperatura no superior a 50°C.

Cuando, por razones experimentales, se requería transferir células de alguna estirpe de cianobacteria a un medio de cultivo que contuviese una fuente de nitrógeno distinta a la que se había utilizado para su crecimiento, las células se recogían por centrifugación o por filtración en filtros Millipore tipo HA de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, se lavaban exhaustivamente con el nuevo medio y se resuspendían en él a la concentración celular deseada.

Para los experimentos en que se estimaba el crecimiento de alguna estirpe de cianobacteria, la concentración celular inicial era la correspondiente a 0,5-1  $\mu\text{g}$  de clorofila por ml de medio. La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) se calculó de acuerdo con la expresión  $\mu = \ln(x_2 - x_1) : (t_2 - t_1)$  donde  $x_1$  es la densidad celular (estimada como concentración de clorofila), a tiempo  $t_1$ , y  $x_2$  la densidad celular a tiempo  $t_2$ . Las dimensiones de  $\mu$  son  $\text{tiempo}^{-1}$ . El tiempo de generación ( $t_g$ ) se determina según la expresión  $t_g = 0.693 : \mu$ .

## 2.2. AISLAMIENTO DE ESTIRPES MUTANTES DE Anacystis nidulans R2

### 2.2.1. Mutagénesis por transposición de Tn901

La mutagénesis con transposón de A. nidulans R2 se llevó a cabo como se ha descrito por Tandeau de Marsac et al. (1982). Se inocularon 50 ml de medio BG11 (nitrato como fuente de nitrógeno) suplementado con ampicilina ( $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) con células de la estirpe A6. Cuando la densidad del cultivo era de  $10^8$  células. $\text{ml}^{-1}$  las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 50 ml de medio BG11 suplementado con D-cicloserina ( $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), de modo que la densidad resultante fuese  $10^7$  células por ml de medio. Tras incubar en condiciones de cultivo durante 24h se recogieron las células por centrifugación, se lavaron con medio BG11 y se resuspendieron en 10 ml de ese medio. Finalmente, se sembraron cajas de medio BG11 sólido, con 0,1 ml de la suspensión celular sin diluir y de otras diluídas 10 y 100 veces con medio BG11. Tras un periodo de 5-7 días aparecían colonias bien definidas, algunas de las cuales eran de pequeño tamaño y color amarillento (las colonias normales tienen color verde azulado intenso). Estas colonias se seleccionaron como posibles mutantes afectados en la asimilación de nitrato.

### 2.2.2. Mutagénesis con nitrosoguanidina

Las células de un cultivo (35 ml, medio A con nitrato) de la estirpe M4<sup>-</sup>, en fase exponencial de crecimiento ( $5 \cdot 10^7$  células·ml<sup>-1</sup>), se recogieron por centrifugación (9750 x g, 10 min, temperatura ambiente) y se resuspendieron en 20 ml del mismo medio. A la suspensión celular resultante se le añadió NTG hasta una concentración de 25 µg·ml<sup>-1</sup>. Tras incubar a 40°C con iluminación (luz blanca proporcionada por tubos fluorescentes con intensidad 150 µE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> en la superficie de la vasija) y agitación ocasional durante 60 min, las células se recogieron por centrifugación (2000 x g, 10 min, temperatura ambiente) se lavaron tres veces con medio A con nitrato y se resuspendieron en 8,5 ml del mismo medio. Aproximadamente un 35% de las células sobrevivían a dicho tratamiento. Varios tubos conteniendo 10 ml de medio BG10 + amonio se inocularon con 0,5 ml de la suspensión celular resultante. Tras incubar durante 48 h a 30°C con iluminación y gaseo (como se indicó para el crecimiento en medio A) las células de los cultivos que mostraban crecimiento (entre  $5 \cdot 10^7$  y  $3 \cdot 10^8$  células · ml<sup>-1</sup> de medio) se recogieron por centrifugación (9750 x g, 10 min, temperatura ambiente), se lavaron con medio BG11 y se resuspendieron, a una densidad celular de  $5 \cdot 10^7$  células · ml<sup>-1</sup>, en de medio BG11. Cuando los cultivos, que se incubaron a 39°C con iluminación y gaseo, alcanzaron una densidad de aproximadamente  $3 \cdot 10^8$  células · ml<sup>-1</sup> se suplementaron

con ampicilina hasta una concentración de  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Tras incubar en las mismas condiciones durante 24 h, las células se recogieron por centrifugación ( $9750 \times g$ , 10 min, temperatura ambiente) y se resuspendieron en igual volumen del mismo medio suplementado con ampicilina. Después de incubar nuevamente durante 24 h, las células se recogieron por centrifugación ( $9750 \times g$ , 10 min, temperatura ambiente), se lavaron tres veces con medio BG110 y se resuspendieron en de dicho medio. Por último, se sembraron cajas de medio BG11 sólido con alicuotas de 0,1 ml de las suspensiones celulares resultantes. Para la selección de las colonias mutantes se siguió el mismo criterio descrito para la mutagénesis con transposón.

### 2.2.3. Purificación y selección de las estirpes mutantes

Antes de considerar las colonias elegidas como correspondientes a estirpes mutantes, éstas se sometían a un proceso de purificación. El procedimiento consistía en inocular con dichas colonias tubos conteniendo 1 ml de medio BG110 + amonio. Cuando, tras incubar varios días los tubos a  $30^{\circ}\text{C}$  con iluminación débil ( $25 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de luz blanca) y agitación ocasional, se observaba crecimiento, se hacían diluciones de las suspensiones celulares y se sembraban cajas de medio BG11 para obtener colonias aisladas. Las colonias amarillas que aparecían en dichas cajas se consideraban puras y las células de ellas procedentes se seleccionaban como estirpes mutantes.

Para decidir si una determinada estirpe se encontraba o no afectada en la asimilación de nitrato, el criterio seguido era que las células fuesen capaces de crecer en medio con amonio pero no en medio con nitrato.

### 2.3. PREPARACION DE ADN

#### 2.3.1. Aislamiento de ADN de cianobacterias

Las células se cultivaron en frascos conteniendo 150 ml de medio A con amonio hasta una densidad de  $10^9$  células·ml<sup>-1</sup> de medio. Las células se recogieron por centrifugación (9750 g x 10 min, 4°C), se lavaron dos veces con tampón Tris-HCl 50 mM suplementado con 50 mM EDTA y 0,15 M NaCl, pH 8,0, y se resuspendieron en un volumen de 4 ml de un tampón de la misma composición y pH pero que contenía además sacarosa al 20% (p/v). Tras incubar durante 30 min a 60°C las suspensiones se enfriaron hasta 37°C y, después de añadir lisozima (concentración final 2,5 mg·ml<sup>-1</sup>), se mantuvieron durante 60 min a esa temperatura. Se añadió proteinasa K y SDS (a concentraciones finales de 0,2 mg·ml<sup>-1</sup> y 1% (p/v), respectivamente), se incubó 2h a 50°C, y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Los lisados resultantes se extrajeron tres veces con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y tres veces con cloroformo (Maniatis et al., 1982). La

disolución se precipitó con etanol y acetato sódico (Maniatis et al., 1982), y el precipitado, recuperado por centrifugación (2000 x g, 15 min, 4°C) se lavó con etanol al 70% (v/v) y, finalmente, se disolvió en 0,5 ml de tampón Tris-HCl 1 mM suplementado con EDTA 1 mM, pH 8,0.

### 2.3.2. Aislamiento de ADN plasmídico de E. coli

Las estirpes con los plásmidos se cultivaron en 50 ml de medio selectivo (Luria, cloranfenicol y ampicilina) durante una noche. Con 15 ml del cultivo resultante se inocularon matraces, que contenían 1 l del mismo medio, que se incubaron hasta que la absorbancia a 590 de los cultivos alcanzó un valor de 0,5-0,7. En ese momento se añadió espectinomicina hasta una concentración final de 300  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y los cultivos se incubaron durante toda una noche. La extracción de ADN se llevo a cabo mediante el método de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly (1979), con ligeras modificaciones. Las células se recogieron por centrifugación (8000 x g, 15 min, 4°C) y se resuspendieron en 10 ml de una disolución que contenía: glucosa, 50 mM; EDTA, 10 mM; Tris-HCl, 25 mM, pH 8,0 ; y 2  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de lisozima (que se añadió a la disolución inmediatamente antes de utilizarse). Tras incubar durante 30 min a 0°C se añadieron 20 ml de una disolución que contenía NaOH 0,2 M y SDS al 1% (p/v), y la suspensión resultante se incubó nuevamente a 0°C



durante 5 min. Después de añadir 15 ml de una disolución, preenfriada en hielo, de acetato sódico 3 M, pH 4,8, y de mezclar varias veces invirtiendo el tubo, la suspensión se mantuvo a 0°C durante 60 min más. El lisado resultante se sometió a centrifugación (13000 x g, 30 min, 4°C) y el sobrenadante se precipitó con dos volúmenes de etanol, resuspendiéndose finalmente el precipitado en 6,5 ml de tampón TE (Tris-HCl 10 mM/ EDTA 1 mM, pH 8,0).

El ADN plasmídico se purificó mediante centrifugación en gradiente de CsCl y en presencia de bromuro de etidio (Davis et al., 1980) (1,59 g ml<sup>-1</sup> de CsCl y 300 µg . ml<sup>-1</sup> de bromuro de etidio). Tras centrifugar durante 13 h a 45000 rpm a 20°C en un rotor vertical Beckman tipo VTi, la banda de plásmido se extrajo de los gradientes mediante una aguja hipodérmica con la que se atravesaba la pared del tubo, el cual se iluminaba simultáneamente con luz ultravioleta para hacer visible el ADN. El bromuro de etidio presente en la solución se eliminó mediante extracciones con isopropanol saturado de una disolución acuosa de NaCl 5 M, Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8,5 (Davis et al., 1980) que se repitieron tantas veces como fue necesario hasta eliminar el color rosado de la disolución de ADN. Una vez limpia la solución de ADN, ésta se diluyó tres veces con agua y se precipitó con 6 volúmenes de etanol. El precipitado se lavó con etanol al 70% y, tras secarlo, se disolvió en tampón Tris-HCl 10 mM, EDTA 1

mM, pH8,0.

#### 2.4. TRANSFORMACION DE LAS ESTIRPES MUTANTES DE A. nidulans R2

Las transformaciones se llevaron a cabo esencialmente como han descrito Van den Hondel et al. (1980). Las células se cultivaban en medio A con amonio hasta una densidad de  $2,5 \cdot 10^8$  células  $\text{ml}^{-1}$  de medio, se recogían por centrifugación (9750 x g, 10 min, temperatura ambiente), se lavaban dos veces con medio A carente de fuente de nitrógeno y se resuspendían en el mismo medio, de modo que la densidad fuese de  $10^{10}$  células  $\cdot \text{ml}^{-1}$ . Alicuotas de 0,3 ml de dicha suspensión se suplementaban con alícuotas de las disoluciones de ADN extraído de cianobacteria (que contenían, al menos, 50  $\mu\text{g}$  de ADN) o de las disoluciones de plásmidos (conteniendo al menos 600 ng del plásmido en cuestión). Tras mantener la mezcla resultante durante 2 h en una cámara de cultivo a  $30^\circ\text{C}$  se sembraban cajas de medio sólido BG11 con alícuotas de 0,1 ml de las suspensiones celulares, sin diluir o diluídas convenientemente, para realizar conteos. Los transformantes se detectaban como colonias de aspecto normal. En todos los experimentos de transformación se llevaba en paralelo un control de células a las que no se añadía ADN.

## 2.5. ESTIMACION DE NIVELES CELULARES DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

### 2.5.1. Ensayos enzimáticos in situ

#### 2.5.1.1. Permeabilización de membranas celulares

Las células, recogidas por centrifugación (2000 x g, 10 min) o por filtración (en filtro Millipore HA de 0,45  $\mu$ m), se lavaban con tampón HEPES 50 mM, pH 7,3, y se resuspendían en el mismo tampón. Las membranas celulares se hacían permeables a los componentes de las mezclas de reacción para el ensayo in situ de las actividades enzimáticas mediante tratamientos con tolueno (solvente orgánico) o con MTA (detergente iónico).

El tratamiento con tolueno (Herrero et al., 1981) consistía en mezclar, mediante agitación vigorosa durante 2 min, 20  $\mu$ l de tolueno con una suspensión celular conteniendo de 5 a 10  $\mu$ g de clorofila en 1 ml de tampón o medio de cultivo. Una alícuota de la suspensión celular tratada con tolueno se utilizaba, inmediatamente después de la permeabilización, en el ensayo de la actividad enzimática.

Las membranas celulares se hacían permeables con MTA mediante una modificación del método descrito

por Herrero et al. (1984). A una suspensión de las células en tampón HEPES 50 mM, pH 7,3, se añadía una cantidad adecuada del detergente iónico y se agitaba vigorosamente durante 2-5 s. Como se desprende de los resultados expuestos en la Figura 1 en *A. nidulans* R2, la cantidad óptima de MTA, para el ensayo de la actividad nitrato reductasa, resultó ser 10  $\mu\text{g}$  MTA por  $\mu\text{g}$  clorofila. En el caso de la actividad nitrito reductasa, el uso de diferentes cantidades de MTA en el tratamiento no afecta notablemente los valores de actividad obtenidos. Así, la cantidad de 10  $\mu\text{g}$  MTA por  $\mu\text{g}$  de clorofila se consideró, por tanto, válida también para el ensayo de la actividad nitrito reductasa, siendo la que se utilizó para las determinaciones de dicha actividad.

#### 2.5.1.2. Actividad nitrato reductasa

Para estimar el nivel celular de actividad nitrato reductasa se añadía a una alícuota de la suspensión de células permeabilizadas (mediante pretratamiento con tolueno o MTA), conteniendo 3-15  $\mu\text{g}$  de clorofila, a la mezcla de ensayo para la determinación de esta actividad enzimática. La suspensión resultante contenía, en un volumen de 0,9 ml, además de las células, los siguientes componentes (Manzano et al., 1976): tampón  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 10,5, 100  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{KNO}_3$ , 20  $\mu\text{mol}$ ; y metilviológeno, 4  $\mu\text{mol}$ . La reacción se iniciaba añadiendo, a los 0,9 ml de la suspensión de células en

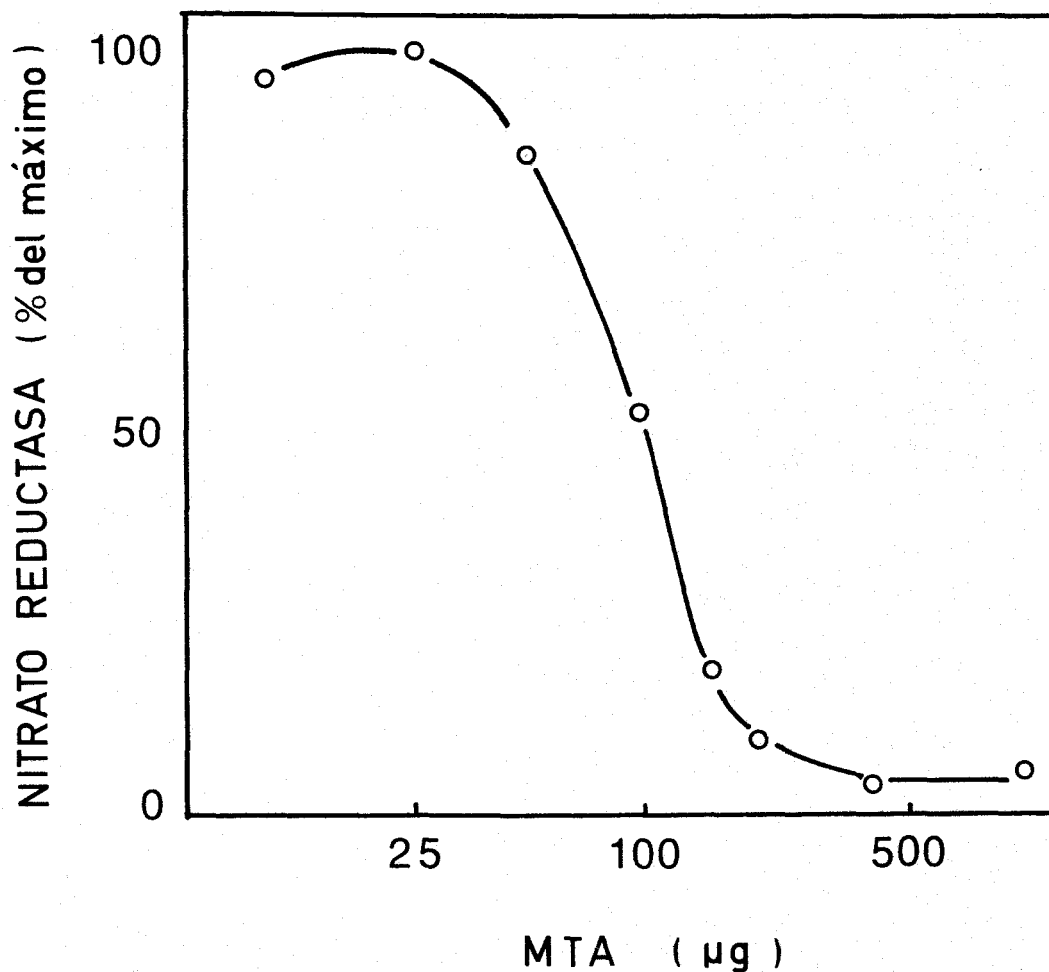


Figura 1. Efecto de la concentración de MTA sobre el ensayo in situ de la actividad nitrato reductasa de *A. nidulans* R2 estirpe A6.

Células cultivadas en medio con nitrato se recogieron por centrifugación, se lavaron con tampón HEPES 50 mM, pH 7, y se resuspendieron en el mismo tampón. La suspensión resultante se dividió en alícuotas que se suplementaron con distintas cantidades de MTA. Tras agitar, muestras de dichas alícuotas, que contenían 3 µg de clorofila, se utilizaron para el ensayo de actividad nitrato reductasa. El 100% de actividad corresponde a  $0,74 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  clorofila.

mezcla de ensayo, 0,1 ml de una disolución que contenía 100  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  por ml de  $\text{NaHCO}_3$  0,3 M, la cual se preparaba inmediatamente antes de su uso. La mezcla de reacción resultante se incubaba a  $30^\circ\text{C}$  durante 5 min, transcurridos los cuales la reacción se detenía por oxidación del ditionito mediante agitación vigorosa. Con objeto de precipitar el material insoluble, la mezcla de reacción se sometía a centrifugación (10000 x g, 2 min). La determinación del nitrito formado durante la reacción se llevaba a cabo en muestras de 0,5 ml del sobrenadante de dicha centrifugación suplementadas con 0,5 ml de una disolución de formaldehído al 0,5%. Este último compuesto se añadía al objeto de evitar las interferencias que algunos de los productos de la oxidación del ditionito presente en la mezcla de reacción pudiesen provocar en la posterior determinación de nitrito (Senn et al., 1976). Las cantidades de nitrito encontradas se corregían para el nitrito presente en un control paralelo en el que la alícuota de suspensión de células se añadía a la mezcla de ensayo una vez que el ditionito había sido oxidado. Una unidad de actividad enzimática corresponde a 1  $\mu\text{mol}$  de nitrito formado por min.

#### 2.5.1.3. Actividad nitrito reductasa

La actividad nitrito reductasa se determinaba siempre en células permeabilizadas mediante tratamiento con MTA. Se añadía una alícuota de una suspensión de células previamente tratadas con MTA, conteniendo 10-15

µg de clorofila, a un volumen adecuado de mezcla de ensayo para la determinación de actividad nitrito reductasa. La suspensión así obtenida contenía, en un volumen de 0,9 ml, (Herrero y Guerrero, 1986): tampón MOPS-NaOH, pH 7,2, 25 µmol;  $\text{KNO}_2$ , 500 nmol; y metilviológeno, 5 µmol. La reacción se iniciaba añadiendo a esos 0,9 ml de suspensión de células en mezcla de ensayo, 0,1 ml de una disolución que contenía 200 µmol de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  por ml de  $\text{NaHCO}_3$  0,3 M, y que se había preparado inmediatamente antes de su empleo. La mezcla de reacción resultante se incubaba, a 30°C, durante 10 min, transcurridos los cuales la reacción se detenía por oxidación del ditionito mediante agitación vigorosa. Para eliminar el material insoluble, la mezcla se procesaba tal como se ha descrito en el apartado anterior para la determinación de nitrato reductasa. La determinación de nitrito se llevaba a cabo en muestras constituidas por 0,1 ml del sobrenadante suplementadas con 0,5 ml de una disolución de formaldehído al 0,5% (v/v) y 0,4 ml de agua. Las cantidades de nitrito encontradas se comparaban entonces con la presente en un control en el que la alícuota de la suspensión de células se había añadido a la mezcla de ensayo tras la oxidación del ditionito, estimándose así la cantidad de nitrito desaparecida durante el ensayo de actividad. Una unidad de actividad enzimática corresponde a 1 µmol de nitrito desaparecido por min.

#### 2.5.1.4. Actividad glutamina sintetasa

La actividad biosintética de la glutamina sintetasa se estimó según el método descrito por Florencio et al. (1984). Las células de una muestra conteniendo 25  $\mu\text{g}$  de clorofila se recogieron por centrifugación (10000 x g, 1 min) y el sedimento se resuspendió en 0,8 ml de una mezcla de ensayo que contenía: tampón HEPES-NaOH, pH 7,0, 40  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{MgCl}_2$ , 80  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 80  $\mu\text{mol}$ ; y glutamato monosódico, 80  $\mu\text{mol}$ . Tras añadir 20  $\mu\text{l}$  de MTA al 1,25% (p/v) y agitar durante 10 s, la reacción se iniciaba por la adición de 0,2 ml de ATP 60 mM. La reacción se interrumpía tras 15 min de incubación a 30°C, por adición de 0,6 volúmenes de HCl 1 M. Tras centrifugar a 10000 x g durante 2 min para eliminar los restos celulares se añadía 0,1 ml del sobrenadante a 2,4 ml de tampón fosfato 50 mM, pH 7,5. La determinación de glutamina se llevaba a cabo en alícuotas de la disolución resultante. Las cantidades de glutamina encontradas se comparaban entonces con la presente en un control consistente en una alícuota de la mezcla de reacción en la que se detenía la reacción inmediatamente después de añadir el ATP. Una unidad de actividad enzimática equivale a 1  $\mu\text{mol}$  de glutamina formada por min.



### 2.5.2. Ensayo in vitro de la actividad nitrato reductasa

Este tipo de ensayos se llevo a cabo utilizando ferredoxina reducida como donador de electrones y extractos celulares como fuente de enzima. Para la preparación de extractos, las células de una suspensión conteniendo 300-400  $\mu\text{g}$  de clorofila se recogieron por filtración, se lavaron extensivamente con tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8,5, y se resuspendieron en 2,2 ml de dicho tampón. La suspensión se sometió a un tratamiento de ultrasonidos utilizando un sonicador BRANSON mod. B-12, a 70 W, durante 3 min, alternando periodos de sonicación de 30 s con otros de igual duración sin tratamiento, con el fin de mantener la temperatura en un margen de 2-4°C. La suspensión así obtenida se sometió a centrifugación con el fin de eliminar los restos celulares. El sobrenadante de esta centrifugación constituía el extracto crudo para los ensayos.

La actividad ferredoxina-nitrato reductasa se determinó por un procedimiento similar al descrito por Manzano et al. (1976), utilizando el sistema NADPH/ferredoxina-NADP<sup>+</sup>-oxidoreductasa como reductor de la ferredoxina. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: tampón Tris-HCl, pH 8,5, 100  $\mu\text{mol}$ ; KNO<sub>3</sub>, 20  $\mu\text{mol}$ ; ferredoxina, 0,25 mg; ferredoxina-NADP<sup>+</sup>-oxidoreductasa, 30  $\mu\text{g}$  (tanto la

ferredoxina como la ferredoxina-NADP<sup>+</sup>-oxidoreductasa eran de Anabaena sp. PCC7119 y fueron cedidas por el Dr. Aurelio Serrano); NADPH, 1,2  $\mu$ mol; y una cantidad de extracto celular que contenía alrededor de 1 mg de proteína. La reacción se comenzaba por la adición de KNO<sub>3</sub>, y, tras dejarla transcurrir durante 35 min a 30°C, se detenía añadiendo 0,1 ml de acetato bórico 1M y 2 ml de etanol absoluto frío. Tras mantener la mezcla a 0°C durante 5 min, ésta se sometía a centrifugación (10000 x g, 2 min). La cantidad de nitrito formada se determinaba espectrofotométricamente en 1 ml del sobrenadante resultante de esa centrifugación y se corregía con la absorbancia de un control, procesado en forma análoga, en el cual el nitrato se añadía inmediatamente antes de parar la reacción.

## 2.6. ESTIMACION DEL CONSUMO DE NITRATO Y DE NITRITO

La utilización de nitrato y nitrito por células de cianobacterias se estimó, generalmente, siguiendo la desaparición de estos iones del medio de ensayo.

Las células se recogían por filtración, se lavaban exhaustivamente sobre el mismo filtro con tampón Tricina-NaOH/KOH 25 mM, pH 8,3, y se resuspendían, a no ser que se indique otra cosa, en 4 ml del mismo tampón, de modo que la concentración de clorofila resultante fuese de  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ . La suspensión celular resultante se disponía en un matraz erlenmeyer de 14 ml, abierto al aire, que se incubaba, con agitación continua, a la luz ( $160 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) en un baño termostaticado a  $40^{\circ}\text{C}$ . Los ensayos se comenzaban por la adición del sustrato nitrogenado:  $\text{KNO}_3$  o  $\text{KNO}_2$  a concentración final de 0,25 mM (a no ser que se indique algo distinto). A distintos tiempos de incubación se tomaban alícuotas de la suspensión celular para la medida de la concentración de nitrato o nitrito presente. La determinación de nitrato se llevaba a cabo utilizando el sobrenadante que resultaba de someter a las muestras a centrifugación ( $10000 \times g$ , 5 min). Para la determinación de nitrito, las alícuotas, de 0,1 ó 0,2 ml de volumen, se añadían a tubos conteniendo 0,9 ó 0,8 ml de agua, respectivamente, que inmediatamente se suplementaban con los reactivos de determinación de nitrito. Tras agitar, los tubos con las

muestras se centrifugaban (2000 x g, 10 min) para sedimentar los restos celulares.

En algunas de las ocasiones en que se utilizaba la estirpe mutante FM2 (que, como se muestra en el apartado 3.4.1., excreta al medio en forma de nitrito el nitrato que consume con una estequiometría de 1:1), el consumo de nitrato se estimaba siguiendo el aumento con el tiempo de la concentración de nitrito en el medio de ensayo, del mismo modo que se ha descrito para el consumo de nitrito.

## 2.7. ESTIMACION DE LA FIJACION FOTOSINTETICA DE CO<sub>2</sub>

La fijación fotosintética de CO<sub>2</sub> se estimó midiendo la incorporación de <sup>14</sup>C suministrado como [<sup>14</sup>C]bicarbonato a compuestos orgánicos estables en ácido tal como lo han descrito Romero et al. (1985).

Los experimentos se llevaron a cabo a 40°C, en tubos de ensayo abiertos, con agitación e iluminación (160 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) continuas. El medio de ensayo contenía en un volumen de 1 ml: tampón Tricina-NaOH/KOH, pH 8,3, 25 μmol; [<sup>14</sup>C]NaHCO<sub>3</sub>, 10 μmol (actividad específica 8 Ci·mol<sup>-1</sup>); y una cantidad de células equivalente a 10 μg de clorofila. La reacción se iniciaba iluminando y añadiendo simultáneamente [<sup>14</sup>C]NaHCO<sub>3</sub>. A intervalos regulares de tiempo se tomaban alícuotas de 20 μl, que se disponían en viales de centelleo conteniendo 80 μl de

HCl 0,5 M. La mezcla se secaba con una lámpara de infrarrojos a fin de eliminar el carbono inorgánico marcado no fijado por las células, y, después de añadir 0,5 ml de agua, se analizaba el  $^{14}\text{C}$  incorporado.

## 2.8. ESTIMACION DE LA DENSIDAD CELULAR

Para la estimación de la densidad celular de los cultivos de cianobacterias se realizaban conteos de células utilizando la cámara de Petroff-Hausser o bien se contabilizaba el número de colonias que, tras 5-7 días de incubación, aparecían en cajas de medio sólido BG11 sembradas con alícuotas convenientemente diluídas del cultivo en cuestión. Hay que tener en cuenta que, en este segundo caso, lo que en realidad se estimaba era el número de células presentes en el cultivo capaces de formar colonias, que se corresponde con 50%-90% del total de las células. Cuando la densidad celular se refiere a  $\mu\text{g}$  clorofila. $\text{ml}^{-1}$  se ha de considerar que 1  $\mu\text{g}$  de clorofila equivale, en las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo, a aproximadamente  $5 \cdot 10^7$  células.

## 2.9. METODOS ANALITICOS

### 2.9.1. Determinación de nitrato

El nitrato se determinaba por absorbancia a 210 nm en disolución ácida (Cawse, 1967). Un volumen de 0,75 ml de muestra, conteniendo entre 0 y 125 nmol de nitrato, se suplementaba con 0,05 ml de ácido amido-sulfúrico al 10% (p/v). Tras incubar unos 2 min a temperatura ambiente y agitar vigorosamente, se añadían 0,2 ml de ácido perclórico al 20% (p/v). La concentración de nitrato se estimaba midiendo la absorbancia (a 210 nm) de la disolución resultante y empleando un coeficiente de extinción milimolar de 7,4 (Guerrero, 1985). El tratamiento con ácido amido-sulfúrico eliminaba cualquier pequeña cantidad de nitrito que pudiera encontrarse en la disolución y que también podría absorber la luz ultravioleta.

### 2.9.2. Determinación de nitrito

El nitrito se determinaba mediante la reacción de diazotación de Griess-Ilosway según el procedimiento descrito por Snell y Snell (1949). El método de determinación consistía en añadir a 1 ml de muestra conteniendo entre 0 y 30 nmol de nitrito, 1 ml de una disolución de sulfanilamida al 1% (p/v) en HCl 2,4 M y 1 ml de una disolución de cloruro de N-(1-Naftil)etilendiamonio al 0,02% (p/v) en agua. Tras

agitar la mezcla resultante, y esperar durante 10 min se determinaba espectrofotométricamente la concentración del complejo coloreado formado, utilizando un coeficiente de extinción milimolar a 540 nm de 55.

### 2.9.3. Determinación de amonio

El amonio se determinó enzimáticamente midiendo la oxidación de NADPH catalizada por la glutamato deshidrogenasa en la reacción de síntesis de glutamato a partir de  $\alpha$ -cetoglutarato y amonio, con cantidades limitantes de este último (Bergmeyer, 1974). La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: tampón trietanolamina, pH 8,0, 100  $\mu$ mol;  $\alpha$ -cetoglutarato, 10  $\mu$ mol; ADP, 1,2  $\mu$ mol; NADPH, 0,20-0,25  $\mu$ mol; y una alícuota de la muestra. La reacción se iniciaba por la adición de 5  $\mu$ l de una preparación de glutamato deshidrogenasa (6 U) de muy bajo contenido en amonio y se desarrollaba durante 15 min a temperatura ambiente. La concentración de NADPH en la mezcla de reacción, antes y después de desarrollarse ésta, se determinaba espectrofotométricamente a 340 nm, usando un coeficiente de extinción milimolar de 6,2. Los valores de oxidación de NADPH en presencia de amonio añadido se corregían con los blancos a los que no se añadía amonio.

#### 2.9.4. Determinación de glutamina

La glutamina formada en el ensayo de la actividad biosintética de la glutamina sintetasa se determinaba mediante cromatografía líquida de alta eficacia, tras derivatización de las muestras con o-ftaldialdehído, por el procedimiento de Martin et al. (1982) según la modificación de Florencio et al. (1984). Muestras de 20  $\mu$ l se trataban durante 90 s con 20  $\mu$ l de una mezcla derivatizante que contenía: tampón borato sodico, pH 10, 7,2  $\mu$ mol; o-ftaldialdehído, 0,8  $\mu$ mol; metanol, 0,8  $\mu$ l; y  $\beta$ -mercaptoetanol 0,08  $\mu$ l. Alícuotas de 30  $\mu$ l se analizaron mediante cromatografía en fase reversa empleando una columna Novapak C18 de 25 cm de longitud por 4 mm de diametro, utilizando como eluyente tampón fosfato 20 mM, pH 6,5, metanol 22% (v/v), tetrahidrofurano 2% (v/v), con un flujo de 1 ml/min. La detección y cuantificación se llevo a cabo fluorimétricamente empleando una longitud de onda de excitación de 338 nm y de emisión de 425 nm.

#### 2.9.5. Determinación de radioactividad de $^{14}\text{C}$

La determinación de radioactividad de  $^{14}\text{C}$  se realizó en un contador de centelleo líquido Beckman modelo 2800. Las muestras, colocadas en viales de centelleo de 7 ml, y tratadas como se indica en el apartado 2.7., se mezclaban con 5 ml de solución centelleadora (cocktail 2200, Scharlau). El contador se



calibró por el método del número H (Beckman, 1982) estimando la eficiencia en el contaje de una serie de muestras que contenían la misma cantidad de  $^{14}\text{C}$  y cantidades variables de tetracloruro de carbono, un agente amortiguador de centelleo. Los valores obtenidos se corregían con blancos a los que no se añadía  $^{14}\text{C}$ .

#### 2.9.6. Determinación de clorofila

El contenido celular en clorofila se determinaba espectrofotométricamente en extractos metanólicos (Mackinney, 1941). Las células de una alícuota (0,25-1 ml) de suspensión celular se recogían mediante centrifugación (10000 x g, 2 min) y se resuspendían en 1 ml de metanol. Tras agitar vigorosamente, la preparación volvía a centrifugarse para sedimentar los restos celulares y se determinaba la absorbancia a 665 nm del sobrenadante. La concentración de clorofila se calculaba utilizando un coeficiente de extinción milimolar de 74,46.

#### 2.9.7. Determinación de proteína

La determinación de proteína se llevó a cabo en extractos celulares (vease apartado 2.5.2.) utilizando el método de Lowry, según la modificación de Markwell et al. (1978), empleándose seroalbúmina bovina como patrón.

#### 2.9.8. Determinación de ADN

La cantidad de ADN se estimó, según describen Maniatis et al. (1982), a partir de la fluorescencia inducida por luz ultravioleta emitida por las moléculas de bromuro de etidio intercaladas en el ADN. Para ello, alícuotas de las disoluciones en cuestión se sometieron a electroforesis en geles horizontales de agarosa (de concentración 7%, p/v) en las que también se incluyeron distintas muestras conteniendo cantidades conocidas de ADN del fago  $\lambda$ . Una vez desarrollada la electroforesis, los geles se sumergían en una disolución de bromuro de etidio durante 30 min para permitir que éste se fijase al ADN, tras lo cual se fotografiaban mientras se sometían a iluminación con luz de 302 nm de longitud de onda. La cantidad de ADN en la muestra problema se estimaba por comparación de su fluorescencia con la de las muestras patrones.

#### 2.9.9. Determinaciones espectrofotométricas

Las determinaciones espectrofotométricas se han realizado empleando un espectrofotómetro PYE Unicam SP 1750 UV dotado de salida digital.

#### 2.9.10. Medidas del pH

El pH de las disoluciones se determinaba con un pH-metro Radiometer modelo PHM 82 provisto de salida digital.

#### 2.9.11. Medidas de iluminacion

La densidad de flujo de radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm) expresada en  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , al que en esta memoria se denomina "intensidad luminosa" por razones prácticas, se estimó con un medidor-integrador Li-cor quantum/radiometer/photometer, provisto con una célula sensora de fotones LI-190 SB.

#### 2.9.12. Medida de flujo gaseoso

Para preparar la mezcla de aire y  $\text{CO}_2$  en las proporciones adecuadas se utilizó un caudalímetro L'air Liquide (Francia) modelo Dynaval 56 para el aire y un medidor Gilmont (U.S.A.) modelo R-3234-1 para el  $\text{CO}_2$ .

#### 2.10. REACTIVOS

ADP, ampicilina, D-cicloserina, cloranfenicol, DLG, lisozima, MTA, TES y Tricina se adquirieron a Sigma Chemical Co., St. Louis (U.S.A.); Bacto-agar, extracto de levadura y Triptona eran productos de Difco,

Michigan (U.S.A.); CsCl y NADPH procedían de Boehringer, Mannheim (R.F.A.); metilviológeno de Serva, Heidelberg (R.F.A.); Cocktail 2200 de Scharlau, Barcelona (España); y  $[^{14}\text{C}]\text{NaHCO}_3$  de Amersham (Reino Unido). Todos los demás productos procedían de Merck (R.F.A.), de Sigma o de Scharlau y eran de grado analítico.

Todas las disoluciones acuosas se realizaron con agua destilada que se obtenía mediante un destilador de vidrio DRA.

El anhídrido carbónico era de alta pureza y fue suministrado por la Sociedad Española del Oxígeno (SEO).

### 3. RESULTADOS

### 3.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE ESTIRPES MUTANTES DE Anacystis nidulans R2 AFECTADAS EN LA ASIMILACION DE NITRATO

En este apartado se describe la obtención de una serie de estirpes mutantes de la cianobacteria A. nidulans R2 afectadas en el proceso de asimilación de nitrato. Asimismo, se recogen resultados correspondientes a una caracterización preliminar de las mismas, llevada a cabo con el objeto de establecer las bases para la clasificación de las distintas estirpes en función de su fenotipo y genotipo.

#### 3.1.1. Mutagénesis y selección de estirpes incapaces de asimilar nitrato

Como se ha comentado en la Introducción, el método elegido para la inducción de las mutaciones fué el de mutagénesis con transposón. Por ello, la estirpe de A. nidulans R2 utilizada como parental ha sido la denominada A6, que contiene el transposón Tn901 introducido en el plásmido pUH24. Así pues, A6 es la estirpe considerada como tipo silvestre en la práctica totalidad de los experimentos realizados a lo largo de este estudio.

Para el aislamiento de estirpes mutantes, a las mutagénesis con transposón de la estirpe A6 seguían

tratamientos de enriquecimiento con D-cicloserina. Las suspensiones celulares obtenidas se sembraban en cajas de medio sólido con nitrato (BG11), seleccionándose aquellas colonias que presentaban escaso crecimiento (menor tamaño y color amarillento). Por último se ensayaba el crecimiento de esas colonias en medios sólidos BG11 (conteniendo nitrato), BG110 (sin fuente de nitrógeno) suplementado con nitrito y, BG110 suplementado con amonio.

Tras diversas series de mutagénesis se seleccionaron un total de 18 estirpes incapaces de utilizar nitrato (estirpes FM1 a FM18). En la Tabla 2 se recogen datos de estimación de crecimiento de estas estirpes en medios sólidos conteniendo nitrato, nitrito o amonio como fuentes de nitrógeno. Puede observarse que todas las estirpes crecen bien en medio con amonio como fuente nitrogenada y que, salvo FM2, también lo hacen en medio con nitrito. En el caso en que el nitrato es la fuente de nitrógeno, la generalidad de las estirpes mutantes muestra incapacidad de crecimiento, excepto FM16 que crece escasamente, aunque en forma apreciable, en dicho medio. El crecimiento residual en medios con nitrato, observado para todas las estirpes mutantes, parece deberse a la presencia en dichos medios de trazas de amonio provenientes del citrato férrico amónico (ver Materiales y Métodos) y/o presentes en el agar.



Tabla 2. Crecimiento de la estirpe A6 de A.nidulans R2 y distintas estirpes mutantes sobre medios sólidos con distintas fuentes de nitrógeno inorgánico

Estirpe	Grado de crecimiento		
	nitrato	nitrito	amonio
A6 (silvestre)	++	++	++
FM1	+/-	++	++
FM2	+/-	+/-	++
FM3	+/-	++	++
FM4	+/-	++	++
FM5	+/-	++	++
FM6	+/-	++	++
FM7	+/-	++	++
FM8	+/-	++	++
FM9	+/-	++	++
FM10	+/-	++	++
FM11	+/-	++	++
FM12	+/-	++	++
FM13	+/-	++	++
FM14	+/-	++	++
FM15	+/-	++	++
FM16	+	++	++
FM17	+/-	++	++
FM18	+/-	++	++

Células de la estirpe silvestre y distintas estirpes mutantes cultivadas en medio sólido con amonio como única fuente de nitrógeno (BG110+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) se sembraron en placas de medio sólido con distintas fuentes nitrogenadas (NaNO<sub>3</sub>, 18 mM; KNO<sub>2</sub>, 2 mM; o NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM). Los datos de la Tabla reflejan el crecimiento observado al cabo de 5 días. +/- : crecimiento residual; + : crecimiento apreciable aunque escaso; ++ : crecimiento vigoroso.



### 3.1.2. Clasificación de las estirpes mutantes

Con el objeto de definir tipos dentro de la colección de estirpes mutantes cuyo aislamiento se ha descrito, se llevaron a cabo una serie de estudios que incluían la determinación de actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa en las distintas estirpes, así como la realización de ensayos de transformación de las mismas con plásmidos conteniendo genes de A. nidulans R2 implicados en el proceso de asimilación de nitrato. Los resultados de estos estudios y las conclusiones que de ellos se han derivado se exponen a continuación.

#### 3.1.2.1. Niveles de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa

Las estirpes bajo estudio se cultivaban rutinariamente en medios con amonio (única fuente nitrogenada utilizable por todas ellas). En esta situación, los niveles de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa son muy bajos, por hallarse reprimida su síntesis, por lo que se hizo necesario establecer condiciones en las que se manifestaran dichas actividades, pudiendo evaluarse y compararse con las de la estirpe silvestre. A este fin, se verificó, en células de la estirpe silvestre, el desarrollo de las actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa en respuesta a la transferencia desde medios con amonio a

medios con nitrato como fuente nitrogenada. Como puede observarse en la Figura 2, en esas condiciones se registra efectivamente un aumento espectacular de ambas actividades enzimáticas, alcanzándose en ambos casos el máximo de actividad específica en un periodo de tiempo de unas 3-4 horas.

La Tabla 3 muestra los valores obtenidos en las determinaciones de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa en la estirpe silvestre y en las estirpes mutantes que, tras su cultivo en medio con amonio, se incubaron en medio con nitrato como fuente de nitrógeno durante 3 horas para permitir el desarrollo de dichas actividades. Atendiendo a los valores obtenidos, pueden diferenciarse tres grupos entre las estirpes mutantes. Así, mientras la estirpe FM16 presenta niveles apreciables de ambas actividades enzimáticas, FM2 carece de actividad nitrito reductasa, siendo el resto de las estirpes defectivas en actividad nitrato reductasa. En general, los niveles de nitrato reductasa o nitrito reductasa presentes en las estirpes mutantes en las que estas actividades son detectables suelen ser inferiores a los de la estirpe silvestre. Esto podría, en principio, explicarse considerando que durante el periodo de incubación en medio con nitrato, sólo la estirpe silvestre puede utilizar esta fuente nitrogenada, mientras que las estirpes mutantes se encuentran en una situación de deficiencia en nitrógeno. De hecho, la transferencia de células de la estirpe silvestre

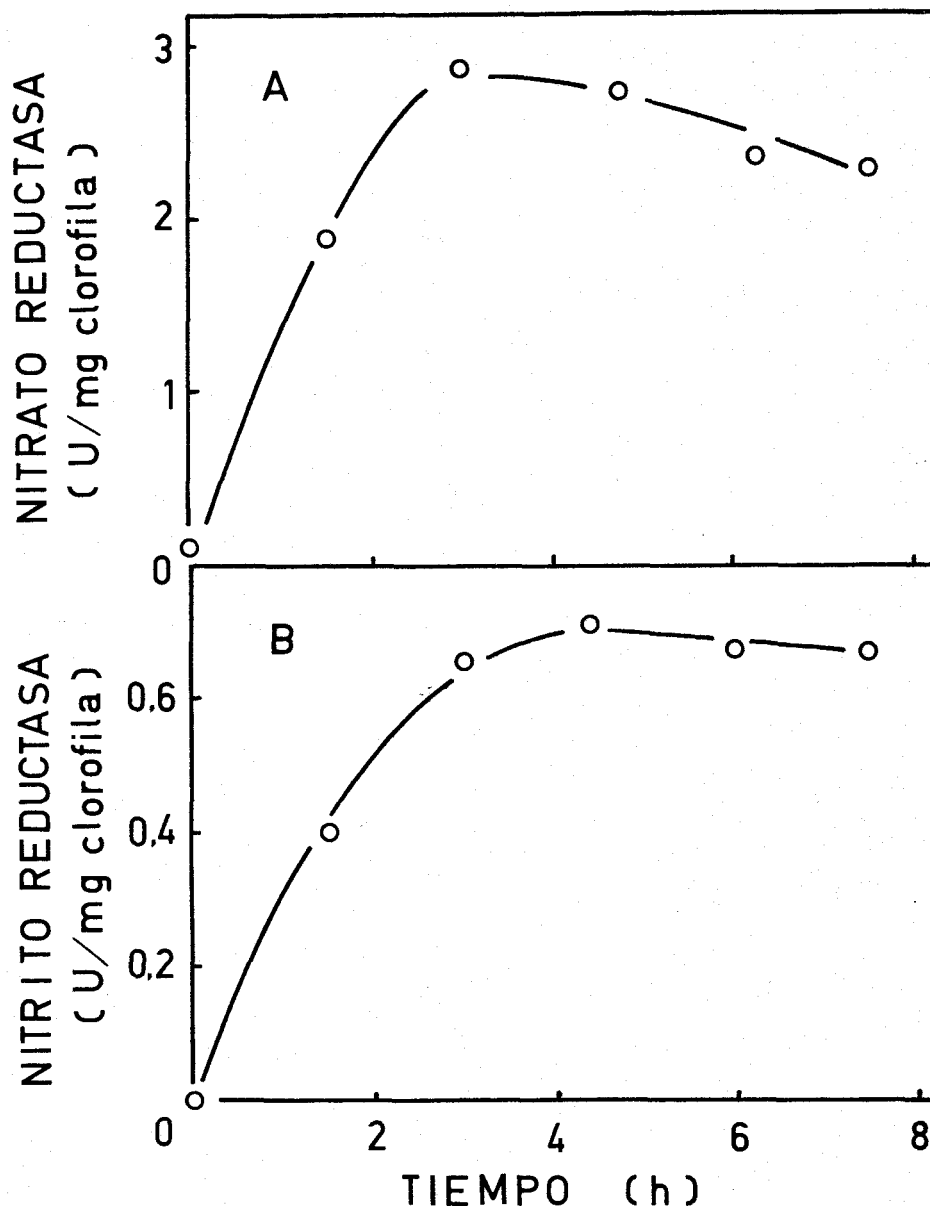


Figura 2. Desarrollo de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa en células de *A. nidulans* R2 estirpe A6 en respuesta a la transferencia de medio con amonio a medio con nitrato.

Células de *A. nidulans* R2 estirpe A6 cultivadas en medio con amonio se transfirieron a medio con nitrato a una concentración celular correspondiente a  $6 \mu\text{g}$  clorofila  $\text{ml}^{-1}$ . La suspensión resultante se incubó en condiciones de cultivo. A los tiempos que se indica se tomaron muestras de la suspensión en las que se determinó actividad nitrato reductasa (A) y nitrito reductasa (B), permeabilizando con MTA, y contenido en clorofila.

Tabla 3. Niveles de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa en A. nidulans R2 estirpe A6 y distintas estirpes mutantes

Estirpe	Nitrato reductasa	Nitrito reductasa
	( U.mg clorofila <sup>-1</sup> )	
A6 (silvestre)	2,2	0,9
FM1	0,0	0,6
FM2	1,0	0,0
FM3	0,0	0,5
FM4	0,0	0,5
FM5	0,0	0,4
FM6	0,0	0,4
FM7	0,0	0,3
FM8	0,0	0,4
FM9	0,0	0,2
FM10	0,0	0,4
FM11	0,0	0,3
FM12	0,0	0,5
FM13	0,0	0,4
FM14	0,0	0,4
FM15	0,0	0,3
FM16	0,4	1,3
FM17	0,0	0,5
FM18	0,0	0,3

Celulas de A. nidulans R2 estirpe A6 y de las estirpes mutantes de ella derivadas cultivadas en medio con amonio se transfirieron a medio con nitrato como única fuente nitrogenada. Las suspensiones resultantes (con una densidad celular correspondiente a 6  $\mu\text{g}$  clorofila. $\text{ml}^{-1}$ ) se incubaron durante 3 h en condiciones de cultivo, transcurridas las cuales se procedió a la determinación de las actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa (en células permeabilizadas con MTA) y del contenido en clorofila de alícuotas de cada uno de los cultivos.

cultivadas con amonio a medio sin fuente de nitrógeno se traduce en un menor desarrollo de actividad, alcanzándose, después de 3 horas, valores de 1,1 U·mg clorofila<sup>-1</sup> y de 0,47 U·mg clorofila<sup>-1</sup> para nitrato reductasa y nitrito reductasa, respectivamente.

### 3.1.2.2. Transformación de las estirpes mutantes con los plásmidos pNR12, pNR63 y pNR193

Recientemente se ha logrado el clonaje de tres genes de A. nidulans R2 implicados en la asimilación de nitrato (Kuhlemeier et al., 1983a, b). La disponibilidad de los plásmidos que contienen dichos genes (pNR12, pNR63 y pNR193) ha permitido llevar a cabo una serie de ensayos de transformación encaminados a diferenciar tipos entre las estirpes de A. nidulans R2 incapaces de asimilar nitrato. En estos ensayos se estudiaba la capacidad de la estirpe mutante en cuestión de revertir con alta frecuencia al fenotipo silvestre en lo referente a capacidad de crecer con nitrato, como consecuencia de su transformación por alguno de los tres plásmidos antes citados.

Al objeto de disponer de datos con los que poder comparar la frecuencia de reversión al fenotipo silvestre que se inducía por transformación con los plásmidos, se determinaron previamente las frecuencias con que las distintas estirpes mutantes revertían al fenotipo silvestre de manera espontánea (Tabla 4).

Tabla 4. Reversión espontánea al fenotipo silvestre de estirpes mutantes de A. nidulans R2

Estirpe	Frecuencia de reversión (revertientes · células viables <sup>-1</sup> )
FM1	$2,5 \cdot 10^{-7}$
FM2	$2,0 \cdot 10^{-8}$
FM3	$<1,8 \cdot 10^{-9}$
FM4	$8,3 \cdot 10^{-7}$
FM5	$<1,4 \cdot 10^{-9}$
FM6	$<8,1 \cdot 10^{-10}$
FM7	$<1,7 \cdot 10^{-9}$
FM8	$<1,7 \cdot 10^{-9}$
FM9	$1,1 \cdot 10^{-8}$
FM10	$<1,4 \cdot 10^{-9}$
FM11	$<1,0 \cdot 10^{-9}$
FM12	$3,0 \cdot 10^{-8}$
FM13	$<2,3 \cdot 10^{-9}$
FM14	$<2,0 \cdot 10^{-9}$
FM15	$<4,3 \cdot 10^{-9}$
FM17	$3,3 \cdot 10^{-8}$
FM18	$<3,2 \cdot 10^{-10}$

Un elevado número de células de cada estirpe mutante (al menos  $2 \cdot 10^8$ ) se sembró en cajas de medio sólido con nitrato como fuente de nitrógeno. Los valores de la tabla son el resultado de dividir el número de revertientes obtenidos por el de células viables.

Los resultados de los experimentos de transformación con plásmidos que se recogen en la Tabla 5, permitieron diferenciar tres tipos dentro del grupo de estirpes que carecían de la actividad nitrato reductasa. Así, las estirpes FM1 y FM12 eran transformadas al fenotipo silvestre por el plásmido pNR193 y no por ninguno de los otros dos, las estirpes FM3, FM6, FM13, FM14, FM17 y FM18 lo eran por el plásmido pNR12, y FM4, FM5, FM7, FM8, FM9, FM10, FM11 y FM15 por el plásmido pNR63. No se observó transformación al fenotipo silvestre de la estirpe FM2 por ninguno de los plásmidos, lo cual no es del todo sorprendente, teniendo en cuenta la diferencia existente entre su fenotipo (carencia de actividad nitrito reductasa) y el de las estirpes en que se registraba transformación (todas ellas carentes de nitrato reductasa). En el caso de FM16, los ensayos de transformación no pudieron llevarse a cabo, puesto que, como se comentó anteriormente (apartado 3.1.1.) esta estirpe presenta un relativo grado de crecimiento sobre medio sólido con nitrato.

### 3.1.3. Caracterización de los distintos tipos de mutantes

Una vez diferenciados cinco diferentes tipos dentro de la colección de mutantes, se procedió a llevar a cabo una caracterización mas detallada de los mismos. Para ello, se seleccionó un representante de cada uno de

Tabla 5. Transformación de estirpes mutantes de A. nidulans R2 con plásmidos conteniendo genes de A. nidulans R2 implicados en la asimilación de nitrato

Estirpe	Plásmido		
	pNR12	pNR63	pNR193
FM1	-	-	+
FM2	-	-	-
FM3	+	-	-
FM4	-	+	-
FM5	-	+	-
FM6	+	-	-
FM7	-	+	-
FM8	-	+	-
FM9	-	+	-
FM10	-	+	-
FM11	-	+	n.d.
FM12	-	-	+
FM13	+	-	-
FM14	+	-	-
FM15	-	+	-
FM17	+	-	-
FM18	+	-	-

Células de las estirpes mutantes indicadas se cultivaron en medio con amonio hasta alcanzar fase exponencial. En ese momento, alícuotas de aproximadamente  $5 \cdot 10^8$  células en 0,3 ml de medio sin fuente de nitrógeno se suplementaron con al menos 600 ng de ADN del plásmido indicado. El signo + indica una frecuencia de transformación al fenotipo silvestre igual o mayor a  $10^{-5}$  mientras que el signo - significa una frecuencia similar a la de reversion espontánea. n.d. : no determinado.



estos tipos, a saber: las estirpes FM1, FM6 y FM10, como representantes de los tres tipos diferenciados entre las estirpes carentes de nitrato reductasa, la estirpe FM2, carente de nitrito reductasa, y la estirpe FM16, incapaz de utilizar nitrato, a pesar de presentar actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa. Los resultados que se exponen a continuación se refieren, por tanto, a estas cinco estirpes.

### 3.1.3.1. Crecimiento de las estirpes A6, FM1, FM2, FM6, FM10 y FM16 en medios líquidos con distintas fuentes de nitrógeno inorgánico

La primera característica evaluada fue el crecimiento de las estirpes sobre medio líquido con nitrato, nitrito o amonio como única fuente de nitrógeno. Los resultados de los experimentos correspondientes se muestran en la Tabla 6. Como puede verse, los datos concuerdan en términos cualitativos con los mostrados en la Tabla 2, correspondiente al crecimiento en medio sólido de los distintos mutantes. Sólo hay diferencias apreciables para el caso de FM16 ya que, aunque presentaba cierto grado de crecimiento en medio sólido con nitrato (Tabla 2), no se registró crecimiento alguno en medio líquido conteniendo esa fuente nitrogenada (Tabla 6). Este aspecto se discute más ampliamente en el apartado 3.2.1.

Tabla 6. Crecimiento de las estirpes A6, FM1, FM2, FM6, FM10 y FM16 de A. nidulans R2 en medios líquidos con distintas fuentes de nitrógeno

Estirpe	Velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ )		
	nitrato	nitrito	amonio
A6 (silvestre)	0,17	0,19	0,22
FM1	0,00	0,17	0,17
FM2	0,00	0,00	0,20
FM6	0,00	0,16	0,18
FM10	0,00	0,20	0,20
FM16	0,02	0,20	0,20

Células de las distintas estirpes, que se habían cultivado en medio con amonio, se transfirieron a medios con  $KNO_3$  (20 mM),  $KNO_2$  (2 mM) o  $(NH_4)_2SO_4$  (2,5 mM) como fuente nitrogenada. Las suspensiones celulares resultantes se incubaron en condiciones de cultivo, tomándose, a distintos tiempos, alícuotas en las que se determinó el contenido en clorofila.

3.1.3.2. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre los niveles de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa de las estirpes A6, FM1, FM2, FM6, FM10 y FM16

Se ha estudiado el efecto que la incubación en medios con distintas fuentes nitrogenadas tiene sobre el desarrollo de las actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa de las distintas estirpes tipo. Para ello, células cultivadas en amonio se transfirieron a medios sin fuente de nitrógeno o conteniendo nitrato, nitrito o amonio. Tras incubar las células en esas condiciones durante 5 h, para permitir la síntesis de las enzimas en cuestión, se determinó el nivel de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa.

En la Tabla 7 se muestran los valores obtenidos en las determinaciones de actividad nitrato reductasa de las distintas estirpes. Como cabía esperar, la respuesta de la estirpe silvestre A6 a la incubación en distintas fuentes nitrogenadas es análoga a la que muestran otras estirpes de cianobacterias unicelulares con las que se encuentra estrechamente emparentada (Anacystis nidulans PCC 6301 y Synechocystis sp. PCC 6714, Herrero et al., 1981; 1985). En las estirpes FM1, FM6 y FM10 la actividad nitrato reductasa resultó prácticamente indetectable en todas las condiciones. A diferencia de lo que ocurre en la estirpe

Tabla 7. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el nivel de actividad nitrato reductasa de las estirpes A6, FM1, FM2, FM6, FM10 y FM16 de A. nidulans R2

Estirpe	Fuente nitrogenada			
	ninguna	nitrato	nitrito	amonio
	Nitrato reductasa (U.mg clorofila <sup>-1</sup> )			
A6 (silvestre)	1,3	2,3	1,4	0,1
FM1	0,0	0,0	0,0	0,0
FM2	1,3	1,2	1,4	1,9
FM6	0,0	0,0	0,0	0,0
FM10	0,0	0,0	0,0	0,0
FM16	0,4	0,4	0,3	0,5

A partir de células de las distintas estirpes cultivadas en medio con amonio se prepararon suspensiones, con una concentración celular correspondiente a 6  $\mu\text{g}$  clorofila  $\cdot \text{ml}^{-1}$ , en medios sin fuente de nitrógeno o con  $\text{KNO}_3$  (20 mM),  $\text{KNO}_2$  (2 mM) o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (5 mM). Tras incubar durante 5 h en condiciones de cultivo se tomaron alícuotas de las suspensiones celulares en las que se determinó la actividad nitrato reductasa (tras permeabilizar con tolueno) y el contenido en clorofila.

silvestre, los niveles de actividad nitrato reductasa en las estirpes FM2 y FM16 eran altos en presencia de amonio. Los niveles de actividad de la estirpe FM16 en medios sin amonio eran, en todos los casos, menores que los presentados por la estirpe silvestre, siendo los valores en FM16 del orden del 12-20% de los de la estirpe silvestre en medio con nitrato.

En la Tabla 8 se recogen los valores obtenidos en las determinaciones de la actividad nitrito reductasa en las estirpes mutantes y en la estirpe silvestre. De nuevo, como ocurría con la actividad nitrato reductasa, el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad nitrito reductasa en la estirpe silvestre es similar al que se da en otras estirpes de cianobacterias unicelulares (Anacystis nidulans PCC 6301 y Synechocystis sp. PCC 6714, Herrero et al., 1981; 1985). Salvo la estirpe FM2, en la que no se detectó actividad nitrito reductasa en ninguna de las condiciones ensayadas, el resto de las estirpes presentaban niveles de actividad comparables a los de la estirpe silvestre, afectándose la expresión de dicha actividad por la naturaleza de la fuente de nitrógeno en estas estirpes del mismo modo que en la silvestre. El comportamiento de FM16 merece mención especial. Por una parte, en presencia de nitrato o nitrito, los niveles de actividad nitrito reductasa son más elevados en FM16 que en la estirpe silvestre. Por otro, al igual que las demás estirpes, el efecto represor del amonio sobre la nitrito

Tabla 8. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el nivel de actividad nitrito reductasa de las estirpes A6, FM1, FM2, FM6, FM10 y FM16 de A. nidulans R2

Estirpe	Fuente nitrogenada			
	ninguna	nitrateo	nitrito	amonio
	Nitrito reductasa (U·mg clorofila <sup>-1</sup> )			
A6 (silvestre)	0,9	1,2	1,3	0,0
FM1	0,5	0,5	1,3	0,0
FM2	0,0	0,0	0,0	0,0
FM6	0,5	0,6	1,0	0,0
FM10	0,6	0,5	0,5	0,0
FM16	0,6	3,3	3,0	0,0

Las condiciones fueron las mismas que las de la Tabla 7. La actividad nitrito reductasa se determinó tras permeabilizar las células con MTA.

reductasa es manifiesto en FM16 (Tabla 8), lo que contrasta con el comportamiento de la nitrato reductasa en este organismo cuyo nivel no disminuye en presencia de amonio.

En resumen, se distinguen tres tipos de comportamiento. Primero, el de las estirpes FM1, FM6 y FM10, que carecen de actividad nitrato reductasa pero presentan niveles de actividad nitrito reductasa comparables a los de la estirpe silvestre y sujetos a regulación normal por fuente de nitrógeno. Segundo, el de la estirpe FM2, que carece de actividad nitrito reductasa y expresa de manera constitutiva la actividad nitrato reductasa. Tercero, el de la estirpe FM16, que presenta bajos niveles de actividad nitrato reductasa, la cual se comporta como constitutiva, y niveles normales o algo elevados de actividad nitrito reductasa, cuya expresión se ajusta al patrón de regulación de la estirpe silvestre. Cabe señalar que fenotipos como los que presentan las estirpes FM2 y FM16 no se habían descrito hasta el momento en cianobacterias.

#### 3.1.3.3. Niveles de actividad glutamina sintetasa en las estirpes A6, FM1, FM2, FM6, FM10 y FM16

Se ha determinado el nivel de actividad glutamina sintetasa en células de las estirpes mutantes y de la silvestre. Los resultados de tales determinaciones se muestran en la Tabla 9, donde puede observarse que los valores obtenidos para las distintas

Tabla 9. Niveles de actividad glutamina sintetasa en las estirpes A6, FM1, FM2, FM6, FM10 y FM16 de A. nidulans R2

Estirpe	Glutamina sintetasa ( U·mg clorofila <sup>-1</sup> )
A6 (silvestre)	0,36
FM1	0,52
FM2	0,50
FM6	0,42
FM10	0,32
FM16	0,48

Células de las distintas estirpes cultivadas en medio con amonio se transfirieron a medio fresco con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 mM, ajustándose la densidad celular a la correspondiente a  $6 \mu\text{g clorofila}\cdot\text{ml}^{-1}$ , y se incubaron durante 5 h. Transcurrido ese tiempo, se tomaron muestras de las suspensiones celulares en las que se determinó la actividad glutamina sintetasa y el contenido en clorofila.



estirpes son comparables entre sí. Este resultado tiene una especial significación para el caso de las estirpes FM2 y FM16, que presentan alteraciones en la regulación de la síntesis de enzimas del sistema de asimilación de nitrato, en lo que respecta a la respuesta al amonio. Este comportamiento atípico podría deberse a alteraciones en su actividad glutamina sintetasa, implicada en el efecto represor del amonio (Flores et al., 1983b; Guerrero y Lara, 1987), hipótesis que puede excluirse en base a los resultados obtenidos.

#### 3.1.3.4. Consumo de nitrato y nitrito por las estirpes A6, FM1, FM2, FM6, FM10 y FM16

Se ha determinado también la capacidad que presentan las estirpes tipo de consumir nitrato o nitrito. Como puede verse en los resultados que se presentan en la Tabla 10, salvo FM2, todas las estirpes son capaces de consumir nitrito con una velocidad comparable a la que presenta la estirpe silvestre. Por otra parte, ninguna de las estirpes mutantes, con la excepción de FM2, es capaz de consumir nitrato. El hecho de que FM16 no muestre actividad detectable de consumo de nitrato está de acuerdo con la dificultad de dicha estirpe para crecer en medios con nitrato como fuente nitrogenada, a pesar de presentar niveles significativos de nitrato y nitrito reductasas (apartados 3.1.2.1. y 3.1.3.2.). Este punto se analiza con mayor detalle en el siguiente apartado.

Tabla 10. Consumo de nitrato y de nitrito por las estirpes A6, FM1, FM2, FM6, FM10 y FM16 de A. nidulans R2

Estirpe	Consumo de nitrato ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg clorofila}^{-1}$ )	Consumo de nitrito
A6 (silvestre)	0,3	0,2
FM1	0,0	0,2
FM2	0,4	0,0
FM6	0,0	0,2
FM10	0,0	0,2
FM16	0,0	0,2

Células de las estirpes indicadas cultivadas en medio con amonio se transfirieron a medio sin fuente de nitrógeno, ajustándose la concentración celular en estas suspensiones a la correspondiente a  $10 \mu\text{g clorofila}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Tras incubar durante 3 h se ensayó el consumo de nitrato y de nitrito en alícuotas de las suspensiones celulares.

### 3.2. CARACTERIZACION DE LA ESTIRPE MUTANTE FM16 DE Anacystis nidulans R2

Las estirpes mutantes FM2 y FM16 presentan considerable interés por mostrar fenotipos peculiares, no descritos previamente en cianobacterias. Por esta razón parte del trabajo desarrollado se ha dirigido a profundizar en la caracterización de las mismas. A continuación se recogen los resultados obtenidos en lo referente a la estirpe FM16.

#### 3.2.1. Aspectos fisiológicos y bioquímicos

En este apartado se recogen los resultados de una serie de experimentos realizados con la finalidad de esclarecer el tipo de lesión bioquímica que afecta a la estirpe FM16 originando su peculiar fenotipo. A lo largo de este estudio se ha prestado especial atención al hecho, aparentemente contradictorio, de que FM16 muestre escasa capacidad de crecimiento en medio con nitrato, a pesar de presentar niveles apreciables de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa.

### 3.2.1.1. Caracterización del crecimiento de FM16

Como se ha mostrado anteriormente (apartado 3.1.1. y 3.1.3.) FM16 crece perfectamente en medios con nitrito o amonio como únicas fuentes de nitrógeno. Esta estirpe presenta además niveles celulares de actividad nitrito reductasa y glutamina sintetasa muy similares a los de la estirpe silvestre (apartados 3.1.2.1. y 3.1.3.3.). Por otra parte, las células de FM16 incubadas en medio líquido con nitrato no excretan al medio nitrito ni amonio, lo que apoya la idea de que el funcionamiento in vivo de nitrito reductasa y glutamina sintetasa debe ser normal. Estas observaciones indican que la alteración que sufre la estirpe FM16 afectando al sistema de asimilación del nitrato debe situarse en procesos previos a la reducción del nitrito, a saber, entrada o reducción del nitrato.

Una de las posibilidades consideradas fue que alguno de los elementos del sistema de asimilación de nitrato de la estirpe FM16 fuese de naturaleza termosensible. Para contrastar dicha idea se llevaron a cabo estudios de crecimiento de la estirpe sobre medio con nitrato como fuente de nitrógeno a las temperaturas de 40°C (temperatura óptima para el crecimiento de A. nidulans R2) y 30°C (no se tuvieron en cuenta temperaturas inferiores a 30°C, puesto que incluso la estirpe silvestre presenta una velocidad de crecimiento

muy baja en esas condiciones). Como puede observarse en la Tabla 11, el descenso de la temperatura de incubación no se traducía en mejora apreciable del crecimiento de la estirpe FM16 en medio con nitrato como fuente nitrogenada. El resultado obtenido no apoya, pues, la idea de que la incapacidad de la estirpe FM16 para utilizar nitrato como fuente nitrogenada se deba a termosensibilidad por parte de algún elemento de su sistema asimilador.

Otra posibilidad que se consideró fue que el sistema asimilador de nitrato en la estirpe FM16 tuviese menor afinidad por el nitrato que el de la estirpe silvestre. Para contrastar dicha idea se estudió si el aumento en la concentración de nitrato del medio de cultivo se traducía en incremento de la velocidad de crecimiento de FM16. La Figura 3 ilustra el resultado de uno de estos experimentos. Aunque FM16 no mostraba crecimiento apreciable cuando la concentración de nitrato en el medio de cultivo era de 4 mM, un aumento del nitrato a 40 mM se traducía en la manifestación de una moderada capacidad de crecimiento ( $t_g = 64$  h). Por otra parte, en el caso de la estirpe silvestre ( $t_g = 4$  h) este incremento de concentración de nitrato no se traducía en aumento alguno de su velocidad de crecimiento. El resultado obtenido indica que el sistema de asimilación de nitrato presente en FM16 muestra una aparente menor afinidad por el nitrato que el sistema de la estirpe silvestre.

Tabla 11. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las estirpes A6 y FM16 en medio líquido con nitrato como fuente nitrogenada

Estirpe	Velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ )	
	30 °C	40 °C
A6 (silvestre)	0,07	0,11
FM16	0,02	0,02

Células de la estirpe silvestre y la mutante FM16 cultivadas en medio con amonio se transfirieron a medio con  $KNO_3$  20 mM como fuente de nitrógeno e incubaron en condiciones de cultivo a 30 °C ó 40 °C. A distintos tiempos se tomaron muestras en las que se determinó el contenido en clorofila.

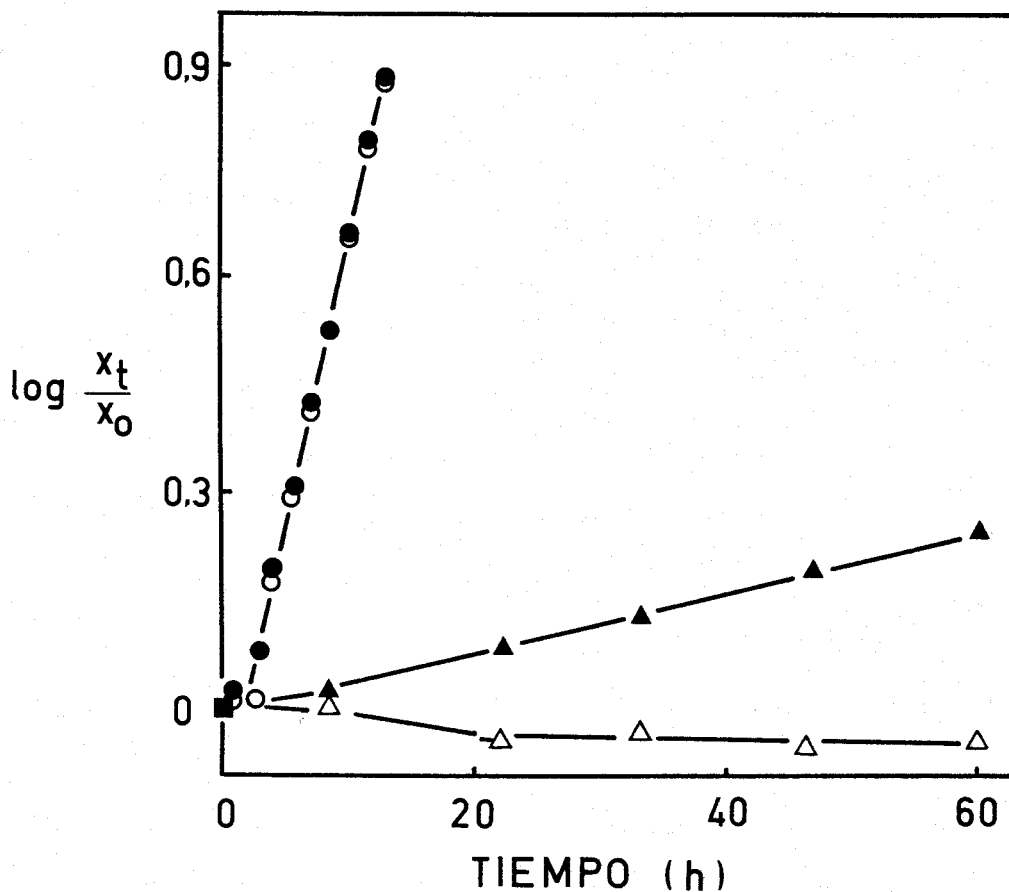


Figura 3. Efecto de la concentración de nitrato sobre el crecimiento de FM16 en medio líquido con nitrato como única fuente de nitrógeno.

Células de la estirpe silvestre A6 (círculos) y la mutante FM16 (triángulos) cultivadas en medio con amonio se transfirieron a medio con nitrato, a concentración 4 mM (○,△) o 40 mM (●,▲), como única fuente de nitrógeno, incubándose las suspensiones en condiciones de cultivo. A los tiempos indicados se tomaron muestras en las que se determinó el contenido en clorofila.

### 3.2.1.2. Caracterización de la nitrato reductasa presente en FM16

Como se comentó en el apartado anterior, la lesión bioquímica que afecta a la estirpe FM16 ha de localizarse en los primeros pasos de la asimilación del nitrato (entrada o reducción). Por ello, se planteó la cuestión de si la nitrato reductasa cuya actividad se detectaba en la estirpe FM16 poseía las mismas características que la enzima de la estirpe silvestre, o si se trataba, por el contrario, de una nitrato reductasa afectada significativamente en alguna de sus propiedades catalíticas, lo que podría dar cuenta de la incapacidad de utilizar nitrato por la estirpe mutante FM16.

Aunque la actividad nitrato reductasa de la estirpe FM16 puede detectarse empleando metil viológeno reducido como donador de electrones, la enzima podría presentar deficiencias en la utilización de ferredoxina, el donador fisiológico de electrones para la reacción de reducción de nitrato a nitrito. Para contrastar esta hipótesis se procedió a realizar un ensayo comparativo de actividad nitrato reductasa en extractos de las estirpes silvestre y FM16, utilizando ferredoxina reducida como donador de electrones. En los mismos extractos se ensayó también la actividad con metil viológeno como donador de electrones. Como se muestra en



la Tabla 12, tanto con ferredoxina como con metil viológeno, la estirpe FM16 presentaba niveles de actividad nitrato reductasa del orden de la mitad de los encontrados en la estirpe silvestre. Para ambas estirpes los valores de la razón entre las actividades con ferredoxina y con metil viológeno eran similares, encontrándose de 20 a 30 veces más actividad dependiente de metilviológeno que de ferredoxina, lo que concuerda con lo previamente descrito para Anacystis nidulans PCC 6301 (Candau, 1979). La enzima de la estirpe mutante FM16 debe ser, pues, capaz de funcionar efectivamente en condiciones fisiológicas en lo que se refiere a su capacidad de emplear la ferredoxina reducida como donador de electrones.

Otra posibilidad que se tuvo en cuenta fue que la enzima de la estirpe mutante FM16 pudiera estar alterada en su afinidad por el nitrato, de manera que ésta fuese menor que la de la enzima de la estirpe silvestre, lo que podría explicar la disminuída afinidad por el nitrato observada para el sistema asimilador de FM16. Para aclarar esta cuestión se determinaron los valores de  $K_m$  para el nitrato de las enzimas de las dos estirpes. Los resultados de estos experimentos se ilustran en las representaciones de la Figura 4. Los datos indican una afinidad para el nitrato muy similar para ambas enzimas, siendo en ambos casos el valor de la correspondiente  $K_m$  próximo a 2 mM.

Tabla 12. Actividad nitrato reductasa en extractos de las estirpes A6 y FM16 de A. nidulans R2 con ferredoxina o metil viológeno como donador de electrones

Estirpe	Donador de electrones	
	ferredoxina	metil viológeno
	Actividad específica (U·mg proteína <sup>-1</sup> )	
A6 (silvestre)	1,1	32,2
FM16	0,5	17,0

Las determinaciones de actividad se llevaron a cabo en extractos crudos de células que, tras cultivo en medio con amonio, se incubaron durante 3 h en medio carente de fuente de nitrógeno, habiéndose ajustado la densidad celular a la correspondiente a 10 µg clorofila ml<sup>-1</sup>.

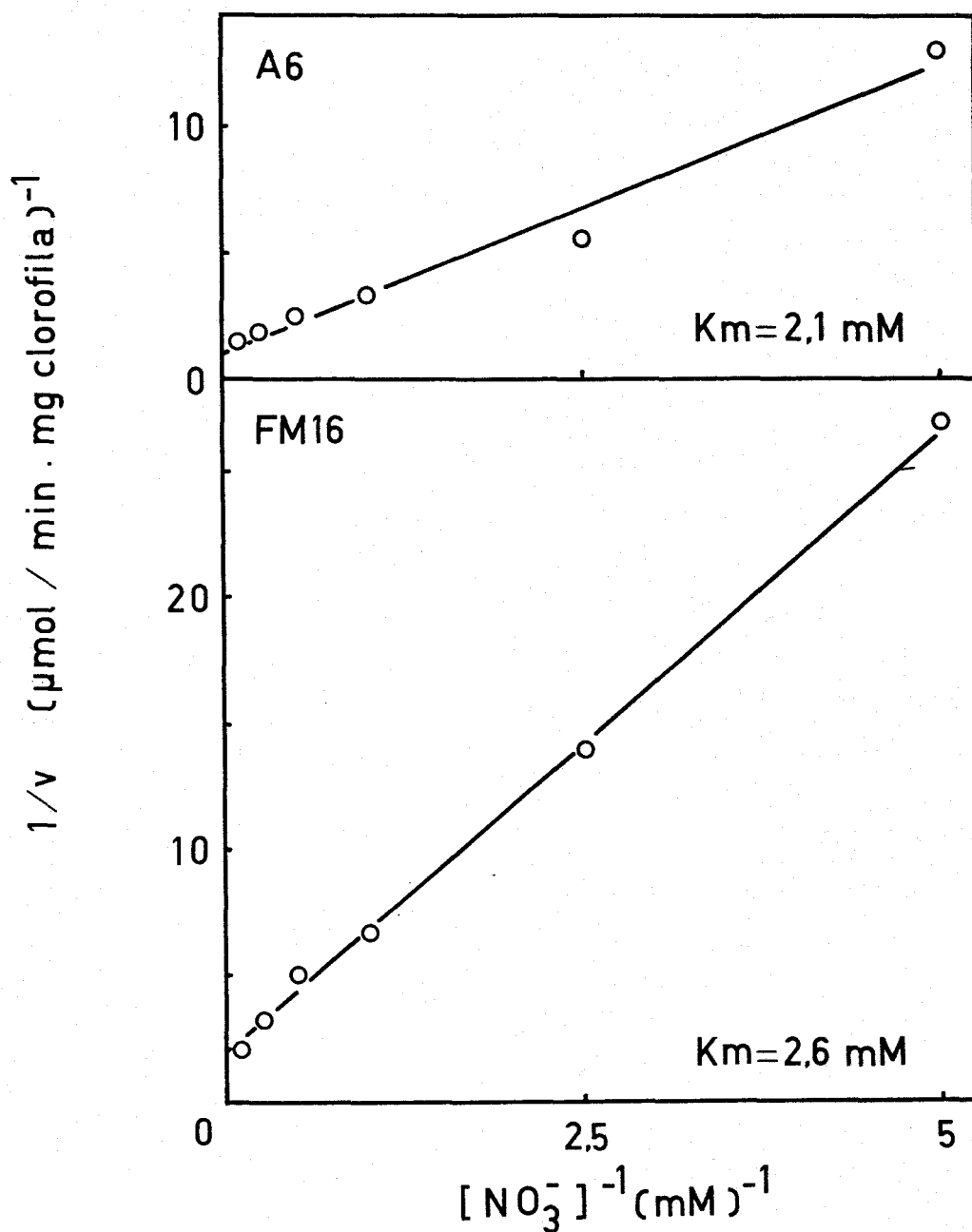


Figura 4. Representación de Lineweaver-Burk del efecto de la concentración de nitrato sobre la actividad nitrato reductasa de las estirpes A6 y FM16 de *A. nidulans* R2.

Células cultivadas en medio con amonio se transfirieron a medio carente de fuente de nitrógeno, ajustándose la densidad celular a la correspondiente a  $10 \mu\text{g clorofila} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Las suspensiones celulares así obtenidas se incubaron durante 3 h antes de realizar las determinaciones. La mezcla de ensayo utilizada fue la que se describe en Materiales y Métodos, siendo la concentración de nitrato la indicada en cada caso en la figura. En los ensayos se utilizaron células permeabilizadas con tolueno a concentraciones correspondientes a  $30 \mu\text{g clorofila} \cdot \text{ml}^{-1}$  para la estirpe A6 y  $37,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  para FM16. El tiempo de ensayo fue 3 min.

Los resultados expuestos en este apartado indican que la incapacidad de la estirpe mutante FM16 de consumir nitrato normalmente no es adscribible a una alteración de las propiedades catalíticas de la nitrato reductasa presente en dicha estirpe.

### 3.2.1.3. Consumo de nitrato por las estirpes A6 y FM16 en relación con el nivel de actividad nitrato reductasa

Habiéndose llegado a la conclusión de que no es una alteración de las propiedades catalíticas de la nitrato reductasa de FM16 la causa de la incapacidad mostrada por dicha estirpe de crecer en medio con nitrato, se planteó la cuestión de si podía ser el bajo nivel de la enzima presente en las células de FM16 lo que limitase la utilización de nitrato y, por tanto, el crecimiento celular.

Para contrastar dicha idea, la aproximación seguida fue la de conseguir células de la estirpe silvestre con distintos niveles de actividad nitrato reductasa, procurando no alterar su capacidad de transportar nitrato al interior celular. Para preparar células con distintos niveles de actividad nitrato reductasa se aprovechó la capacidad que presenta el wolframio de incorporarse en la nitrato reductasa de A. nidulans sustituyendo al molibdeno y originando moléculas inactivas de la enzima (Candau, 1979). El

tratamiento con volframio parece ser altamente específico en sus efectos, ya que sólo afecta aparentemente a molibdo proteínas, siendo las escasas proteínas de este grupo que se han identificado enzimas que catalizan reacciones redox, sin que se hayan descrito sistemas de transporte que contengan molibdeno. En la Figura 5 se ilustran los resultados de un experimento en el que se determinó la capacidad de consumo de nitrato por células de la estirpe silvestre A6 presentando diferentes niveles de actividad nitrato reductasa. Estas células se obtuvieron a partir de cultivos en amonio que se incubaron durante un prolongado periodo de tiempo (40 h) en medios con nitrato, carentes de molibdeno añadido y suplementados con distintas concentraciones de volframato. En la misma gráfica se representan también los valores de actividad nitrato reductasa y de consumo de nitrato correspondientes a células de la estirpe mutante FM16. Células de la estirpe silvestre con niveles de actividad nitrato reductasa equivalentes e incluso menores al de la estirpe mutante FM16 muestran velocidades significativas de consumo de nitrato. Parece pues que la actividad nitrato reductasa presente en FM16 debería permitirle un nivel de consumo de nitrato muy superior al que dicha estirpe de hecho presenta. Así, la limitación en el consumo de nitrato que presenta FM16 no es explicable simplemente en términos de su bajo nivel de actividad nitrato reductasa, sino que debe existir alguna limitación adicional.

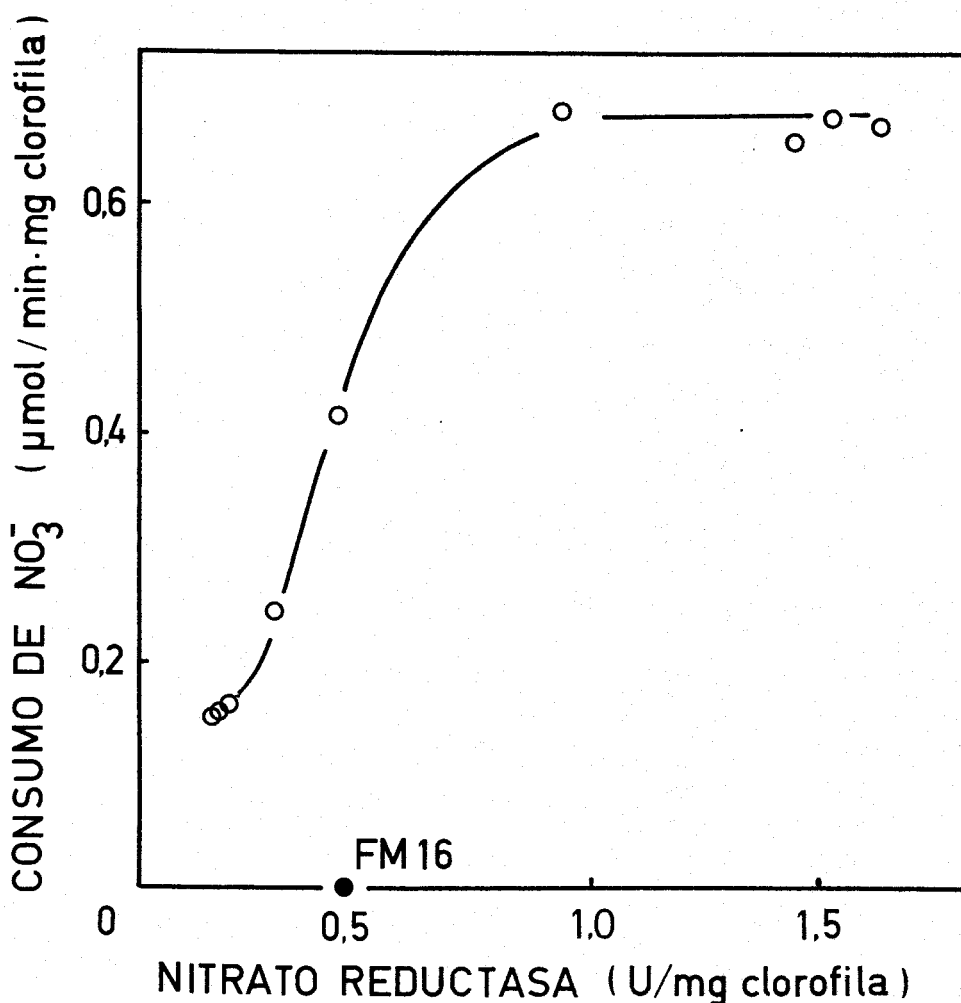


Figura 5. Relación entre actividad nitrato reductasa y capacidad de consumo de nitrato en la estirpe A6 de A. nidulans R2. Comparación con la estirpe FM16.

Células de la estirpe A6 cultivadas en medio con amonio sin molibdeno añadido se utilizaron para inocular medios con  $\text{KNO}_3$  20 mM y distintas concentraciones de  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  (entre 0 y 10 mM). Tras su cultivo durante 40 h, las células se transfirieron a medio con  $\text{KNO}_2$  1 mM como única fuente de nitrógeno y se incubaron durante 5 h. A continuación, se determinó en dichas células la velocidad de consumo de nitrato y la actividad nitrato reductasa, permeabilizando con tolueno. Para las determinaciones en la estirpe FM16, las células, cultivadas en medio con amonio, se incubaron en medio con  $\text{KNO}_2$  1 mM como fuente de nitrógeno durante 5 h.

### 3.2.2. Aspectos genéticos

Como ya se comentó en el apartado 3.1.2.2., la capacidad de FM16 para crecer residualmente sobre medio sólido con nitrato ha impedido poder llevar a cabo en esta estirpe los estudios de transformación con los plásmidos que contenían genes de A. nidulans R2 implicados en la reducción del nitrato.

Para poder decidir si la mutación de FM16 afectaba a alguno de los tres genes clonados, pudiendo, por tanto, considerarse a FM16 como perteneciente a alguno de los tres tipos distinguibles entre las estirpes carentes de nitrato reductasa, se siguió la estrategia de comprobar si ADN de la estirpe FM16 era capaz de transformar al fenotipo silvestre a los mutantes FM1, FM6 y FM10, representantes de los tres tipos en cuestión. Dichas transformaciones tenían lugar con una frecuencia elevada (Figura 6), por lo que puede considerarse que la(s) mutación(es) en FM16 afecta(n) a gen(es) distinto(s) a aquellos representados por las mutaciones de FM1, FM6 y FM10. El ADN de FM16 también transformaba al fenotipo silvestre a la estirpe FM2 (con una frecuencia de  $10^{-6}$  transformantes/viables frente a una frecuencia de reversión espontánea de FM2 igual a  $2 \cdot 10^{-8}$ ), lo que apoya la idea de que las mutaciones de FM2 y FM16 se localicen en genes distintos.

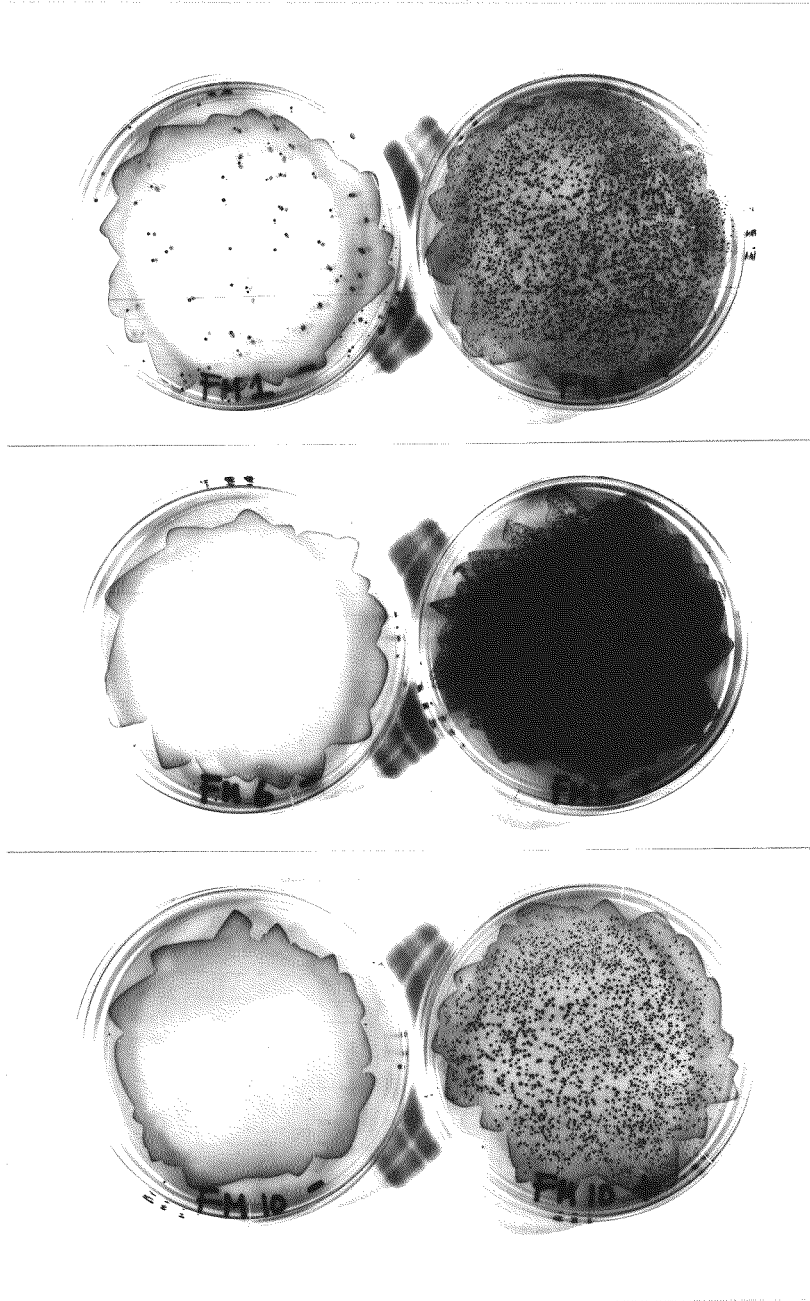


Figura 6. Transformación de las estirpes FM1 , FM6 y FM10 de A. nidulans R2 con ADN de la estirpe FM16.

Células de las estirpes indicadas se transformaron con 50 ug de ADN extraído de la estirpe FM16, según se describe en Materiales y Métodos. La fotografía muestra el crecimiento en placas de medio sólido con nitrato como única fuente de nitrógeno de una misma cantidad de células incubadas en ausencia (izquierda) o presencia (derecha) de ADN de FM16.



### 3.3. CARACTERIZACION DE LA ESTIRPE MUTANTE FM2 DE Anacystis nidulans R2

#### 3.1. Aspectos fisiológicos y bioquímicos

De acuerdo con lo anteriormente descrito, la estirpe FM2 se caracteriza especialmente por carecer de actividad nitrito reductasa y por no sufrir el efecto represor del amonio sobre la síntesis de la nitrato reductasa. Sobre esta segunda característica, la alteración de la regulación por amonio, es sobre la que se centran los experimentos que se describen en este apartado.

#### 3.3.1.1. Regulación por amonio de la síntesis de nitrato reductasa en estirpes carentes de actividad nitrito reductasa

Una cuestión que surge al considerar el fenotipo de la estirpe FM2 es si la ausencia del efecto regulador del amonio sobre la síntesis de nitrato reductasa es consecuencia directa de la carencia de actividad nitrito reductasa que presenta esta estirpe. Para resolver esta cuestión, se procedió al aislamiento de nuevas estirpes mutantes de A. nidulans R2 carentes de actividad nitrito reductasa, en las cuales se estudió la regulación por amonio de la síntesis de nitrato reductasa. Como estirpe silvestre para la obtención de

estos mutantes se utilizó la denominada M4<sup>-</sup>, una estirpe derivada de A. nidulans R2 que ha perdido el plásmido pequeño (pUH24), lo cual no provoca ninguna alteración fenotípica detectable. En este caso, para inducir las mutaciones, se utilizó el conocido mutágeno químico N-metil-N'-nitrosoguanidina, empleándose la ampicilina como antibiótico en la contraselección. Se obtuvieron dos estirpes mutantes independientes, que se denominaron APE2 y APE4, que no crecían con nitrato o nitrito, pero sí con amonio como fuente de nitrógeno. La determinación de los niveles de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa en dichas estirpes (Tabla 13) reveló que ambas mostraban niveles normales de nitrato reductasa, mientras que no pudo detectarse actividad nitrito reductasa en ninguna de ellas. Cuando se estudió el efecto del amonio sobre la síntesis de nitrato reductasa en las estirpes APE2, APE4 y FM2 (Tabla 14) pudo verse que, al contrario que en FM2, el amonio ejerce en APE2 y APE4 el efecto inhibitor de la síntesis de nitrato reductasa característico de la estirpe silvestre. Hay que concluir, por tanto, que no toda mutación que implica carencia de nitrito reductasa en A. nidulans R2 se traduce en síntesis constitutiva de nitrato reductasa.

#### 3.3.1.2. Regulación por amonio del consumo de nitrato en FM2

Puesto que el carácter regulatorio de la mutación de FM2 hace que en esta estirpe la síntesis de

Tabla 13. Niveles de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa en la estirpe parental M4- y en las estirpes mutantes derivadas APE2 y APE4

Estirpe	Nitrato reductasa	Nitrito reductasa
	( U·mg clorofila <sup>-1</sup> )	
M4 (silvestre)	0,73	0,72
APE2	1,17	0,01
APE4	0,54	0,05

Células cultivadas en medio BG110 + NH<sub>4</sub>Cl 5 mM a 30°C se transfirieron a medio BG110 (sin fuente de nitrógeno), ajustándose la densidad celular a la correspondiente a 3,5 µg clorofila·ml<sup>-1</sup>. Tras incubar durante 19 h se determinó, en alícuotas de las suspensiones celulares, el contenido en clorofila y las actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa tras permeabilizar con MTA.

Tabla 14. Efecto del amonio sobre el nivel de actividad nitrato reductasa de las estirpes mutantes carentes de nitrito reductasa FM2, APE2 y APE4

Estirpe	Fuente nitrogenada	
	ninguna	amonio
	Nitrato reductasa (U·mg clorofila <sup>-1</sup> )	
FM2	0,5	1,6
APE2	1,7	0,0
APE4	0,7	0,0

Células de las distintas estirpes, cultivadas en medio con amonio, se transfirieron a medio carente de fuente de nitrógeno o con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 mM, ajustándose la densidad celular de las suspensiones a valores correspondientes a 3,5-5  $\mu\text{g}$  clorofila·ml<sup>-1</sup>. Tras incubar durante 5,5 h se determinó en alícuotas de las suspensiones celulares el contenido en clorofila y la actividad nitrato reductasa, tras permeabilizar con tolueno.

nitrato reductasa tenga lugar incluso en células cultivadas en presencia de amonio, resultaba de interés estudiar si dichas células presentaban capacidad de consumo de nitrato, lo que debe implicar la presencia de un sistema operativo para el transporte de nitrato. En la Tabla 15 se presentan datos que muestran que mientras la actividad de consumo de nitrato es indetectable en células de la estirpe silvestre cultivadas en medio con amonio, las células de la estirpe mutante FM2 cultivadas en las mismas condiciones presentan niveles de dicha actividad equivalentes, e incluso algo superiores, al de células incubadas en medio carente de fuente de nitrógeno. Hay que concluir, por tanto, que, al igual que ocurre con la actividad nitrato reductasa, la actividad de transporte de nitrato en la estirpe FM2 no se encuentra sometida a represión por amonio.

Como se recoge en la Introducción, además del efecto de represión de la síntesis de las proteínas implicadas en la reducción del nitrato, el amonio ejerce un efecto inhibitor a corto plazo sobre el consumo de nitrato en A. nidulans. Dado que FM2 no está sujeto al efecto regulador del amonio sobre la síntesis de las enzimas del sistema asimilador de nitrato, resultaba de interés estudiar si la mutación liberaba a su vez del efecto regulador a corto plazo del amonio. Como se deduce de los resultados expuestos en la Figura 7, la mutación de FM2 no afecta a la regulación por amonio a

Tabla 15. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el consumo de nitrato por las estirpes A6 y FM2 de A. nidulans R2

Estirpe	Fuente nitrogenada	
	ninguna	amonio
	Consumo de nitrato ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ clorofila}^{-1}$ )	
A6 (silvestre)	0,5	0,0
FM2	0,4	0,5

Células cultivadas en medio con amonio se transfirieron a medio carente de fuente de nitrógeno o con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 mM, ajustándose la densidad celular a la correspondiente a  $10\ \mu\text{g}\text{ clorofila}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Tras 3 h de incubación se ensayó el consumo de nitrato en alícuotas de las distintas suspensiones celulares.

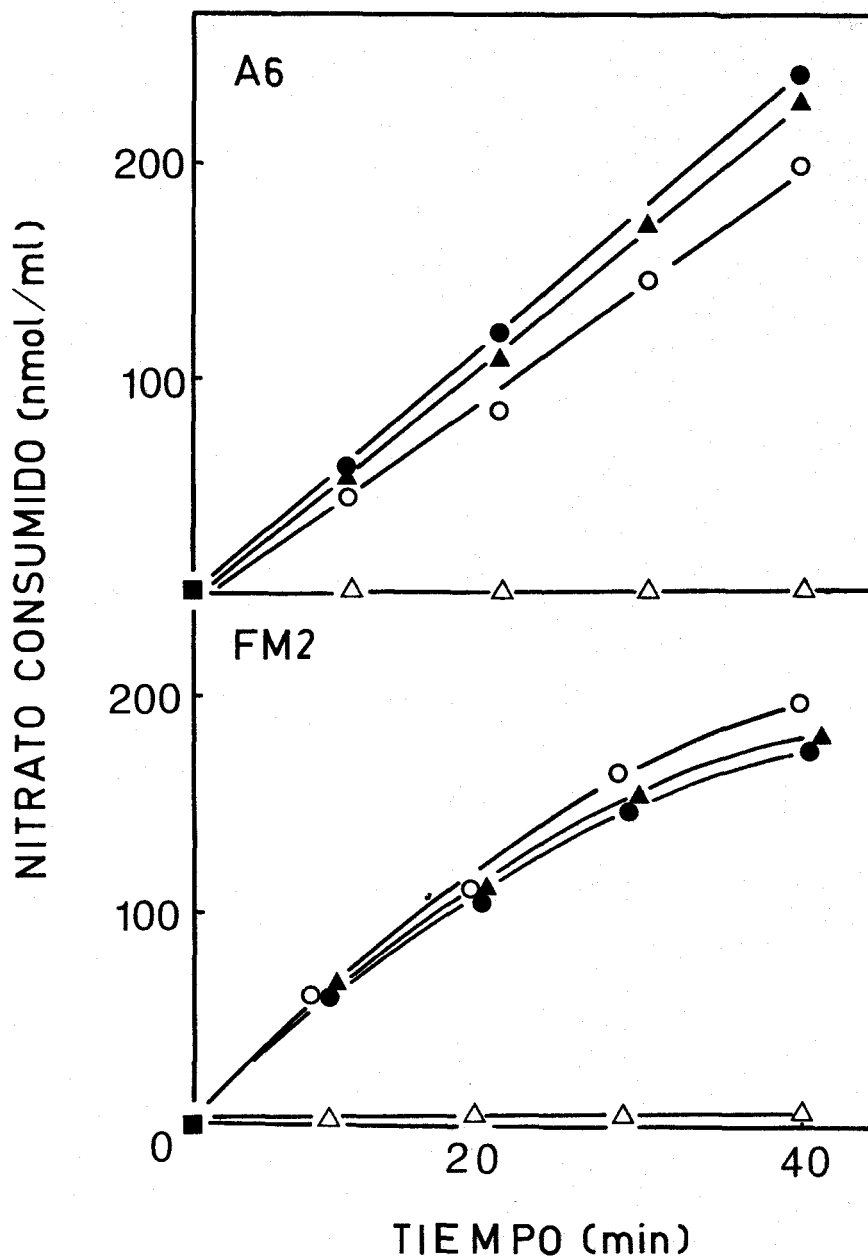


Figura 7. Inhibición por amonio del consumo de nitrato y prevención de dicho efecto por MSX en las estirpes A6 y FM2 de *A. nidulans* R2.

Células cultivadas en medio con amonio se transfirieron a medio carente de fuente de nitrógeno, ajustándose la densidad celular a la correspondiente a  $10 \mu\text{g}$  clorofila  $\cdot \text{ml}^{-1}$ . Tras 3 h de incubación se procedió a ensayar el consumo de nitrato en suspensiones celulares que contenían  $10 \mu\text{g}$  clorofila  $\cdot \text{ml}^{-1}$ . Los ensayos se iniciaron con la adición de  $\text{KNO}_3$  (concentración final  $0,25 \text{ mM}$ ) tras incubar las suspensiones a la luz en ausencia o presencia (símbolos llenos) de MSX  $1 \text{ mM}$  durante 15 min. En los ensayos correspondientes se añadió  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (concentración final  $0,25 \text{ mM}$ , triángulos) inmediatamente antes de añadir el nitrato.

ese nivel, siendo el comportamiento de dicha estirpe mutante completamente análogo al de la estirpe silvestre. Así, el amonio inhibe el consumo de nitrato de manera inmediata en ambas estirpes, no observándose dicho efecto inhibitor cuando la enzima glutamina sintetasa se inactivaba por pretratamiento de las células con MSX. Estos resultados indican que los efectos reguladores del amonio, a corto y a largo plazo, no se encuentran estrictamente ligados.

### 3.3.2. Aspectos genéticos

#### 3.3.2.1. Transformación de las estirpes mutantes FM1, FM6 y FM10 con ADN de la estirpe FM2

Como ya se comentó cuando se trataron los estudios de transformación con plásmidos conteniendo genes de A. nidulans R2 implicados en la asimilación de nitrato, la estirpe FM2 no pudo ser transformada al fenotipo silvestre por ninguno de los tres plásmidos ensayados (apartado 3.1.2.2.). Los resultados indican pues que la mutación que sufre la estirpe FM2 afecta a un gen distinto a los clonados en estos tres plásmidos.

Para verificar esta propuesta se han llevado a cabo otros ensayos de transformación con la estirpe FM2. En estos tests, análogos a los descritos en el apartado 3.2.2. para la estirpe FM16, se ensayó la capacidad del ADN aislado de FM2 para transformar al fenotipo



silvestre a las estirpes mutantes FM1, FM6 y FM10, representantes de los tres grupos de complementación en cuestión. Las frecuencias con que se daban estas transformaciones se recogen en la Tabla 16. Puede observarse que el ADN aislado de la estirpe FM2 transformaba al fenotipo silvestre a las estirpes FM1, FM6 y FM10. También se observa que dicho ADN no transformó a la propia estirpe FM2, introducida en el experimento como control. Estos resultados confirman la idea de que la mutación de FM2 probablemente afecta a un gen de A. nidulans R2 implicado en la asimilación de nitrato distinto a los hasta ahora descritos.

#### 3.3.2.2. Regulación por amonio de la síntesis de nitrato reductasa en revertientes de FM2

Dado que el fenotipo mostrado por la estirpe mutante FM2 presenta dos características en principio no relacionadas entre sí (ver apartado 3.3.1.1.), se planteaba la cuestión de si dicho fenotipo se debía a una única mutación o si, por el contrario, se trataba de mutaciones en genes distintos.

Para resolver esta cuestión se procedió a estudiar la regulación por amonio de la síntesis de nitrato reductasa en estirpes derivadas de FM2, bien por mutación espontánea, bien por transformación con ADN de FM16, seleccionadas como estirpes que habían recuperado la capacidad de crecer en nitrato. Como se observa en la

Tabla 16. Transformación al fenotipo silvestre de las estirpes FM1, FM2, FM6 y FM10 de A. nidulans R2 con ADN de la estirpe FM2

Estirpe receptora	Frecuencia de transformación (revertientes·viabiles <sup>-1</sup> )
FM1	$2,1 \cdot 10^{-6}$
FM2	$1,3 \cdot 10^{-8}$
FM6	$1,2 \cdot 10^{-5}$
FM10	$1,7 \cdot 10^{-5}$

Aproximadamente  $3 \cdot 10^9$  células de las estirpes indicadas se transformaron con aproximadamente 50  $\mu$ g de ADN extraído de células de la estirpe mutante FM2. Los valores resultan de dividir el número de transformantes por el número de viabiles (células capaces de generar colonias).

Tabla 17, tales estirpes (dos revertientes espontáneos y dos transformantes) presentaban, como cabía esperar, niveles de actividad nitrito reductasa comparables a los de la estirpe silvestre. La Tabla 18 muestra los valores de los niveles de actividad nitrato reductasa de la estirpe mutante FM2 y las estirpes revertientes, derivadas de ella, cultivadas en medio con amonio o incubadas en medio sin fuente de nitrógeno. Se observa que, mientras en la estirpe FM2 el nivel de actividad nitrato reductasa presente en células cultivadas en amonio es equivalente al de las células incubadas en medio carente de fuente de nitrógeno, en las estirpes revertientes el nivel en amonio es muy inferior al de las células incubadas en medio carente de fuente de nitrógeno (como ocurría en la estirpe silvestre, ver Tabla 7). Es decir, las estirpes derivadas de FM2 que se seleccionaron por recuperar la capacidad de utilizar nitrato para el crecimiento, recuperaron el carácter, no seleccionado, de presentar un patrón de regulación de síntesis de la nitrato reductasa análogo al de la estirpe silvestre. Estos resultados apoyan fuertemente la idea de que las dos características que constituyen el fenotipo de la estirpe mutante FM2 son el resultado de una mutación simple.

Tabla 17. Niveles de actividad nitrito reductasa en la estirpe A6 y en revertientes de la estirpe mutante FM2

Estirpe	Nitrito reductasa (U·mg clorofila <sup>-1</sup> )
A6 (silvestre)	1,32
mutante espontáneo 1	1,26
mutante espontáneo 2	1,22
transformante 1	1,29
transformante 2	1,53

Células de las distintas estirpes cultivadas en medio con amonio se transfirieron a medio carente de fuente de nitrógeno, ajustándose la densidad<sub>1</sub> celular a la correspondiente a 6 µg clorofila·ml<sup>-1</sup>. Tras incubar durante 5 h se tomaron alícuotas de las suspensiones celulares, en las que se determinó la actividad nitrito reductasa, tras permeabilizar con MTA y el contenido en clorofila.

Tabla 18. Efecto del amonio sobre el nivel de actividad nitrato reductasa en la estirpe mutante FM2 y revertientes de dicha estirpe

Estirpe	Fuente nitrogenada	
	ninguna	amonio
	Nitrato reductasa (U·mg clorofila <sup>-1</sup> )	
FM2 (parental)	0,8	0,8
mutante espontáneo 1	0,6	0,1
mutante espontáneo 2	0,5	0,1
transformante 1	1,0	0,1
transformante 2	0,9	0,1

Células crecidas en medio BG110 + NH<sub>4</sub>Cl 5 mM a 30 °C se transfirieron a medio BG110 (sin fuente de nitrógeno) o a BG110 + NH<sub>4</sub>Cl 5mM. Tras incubar durante 20 h se determinó, en alícuotas de las suspensiones celulares, el contenido en clorofila y la actividad nitrato reductasa, tras permeabilizar con tolueno.

### 3.4. UTILIZACION DE ESTIRPES MUTANTES DE Anacystis nidulans R2 EN ESTUDIOS DE LA ASIMILACION DEL NITRATO

#### 3.4.1. Determinación de nitrato con células de la estirpe FM2

La particularidad de la estirpe FM2 de carecer de actividad nitrato reductasa implica que el nitrato consumido por las células de esta estirpe sólo puede ser reducido hasta el término de nitrito, el cual se excreta al medio. Como muestra la Figura 8, esto ocurre con una estequiometría prácticamente igual a uno (1 nmol de nitrito excretado por nmol de nitrato consumido).

Esta propiedad de la estirpe FM2 de excretar al medio en forma de nitrito el nitrato que consume puede emplearse para la determinación de la concentración de nitrato en soluciones. Para ello basta con añadir una cantidad adecuada de la solución problema a una suspensión de células de la estirpe FM2 en un tampón adecuado. Tras incubar a la luz y con agitación durante un tiempo suficiente (idealmente a 40°C) se determina la concentración de nitrito en el medio, que corresponde a la inicial de nitrato en la suspensión. En la Tabla 19 se exponen los resultados de un análisis de nitrato utilizando distintas cantidades de dicho compuesto. Como puede observarse, el método permite la

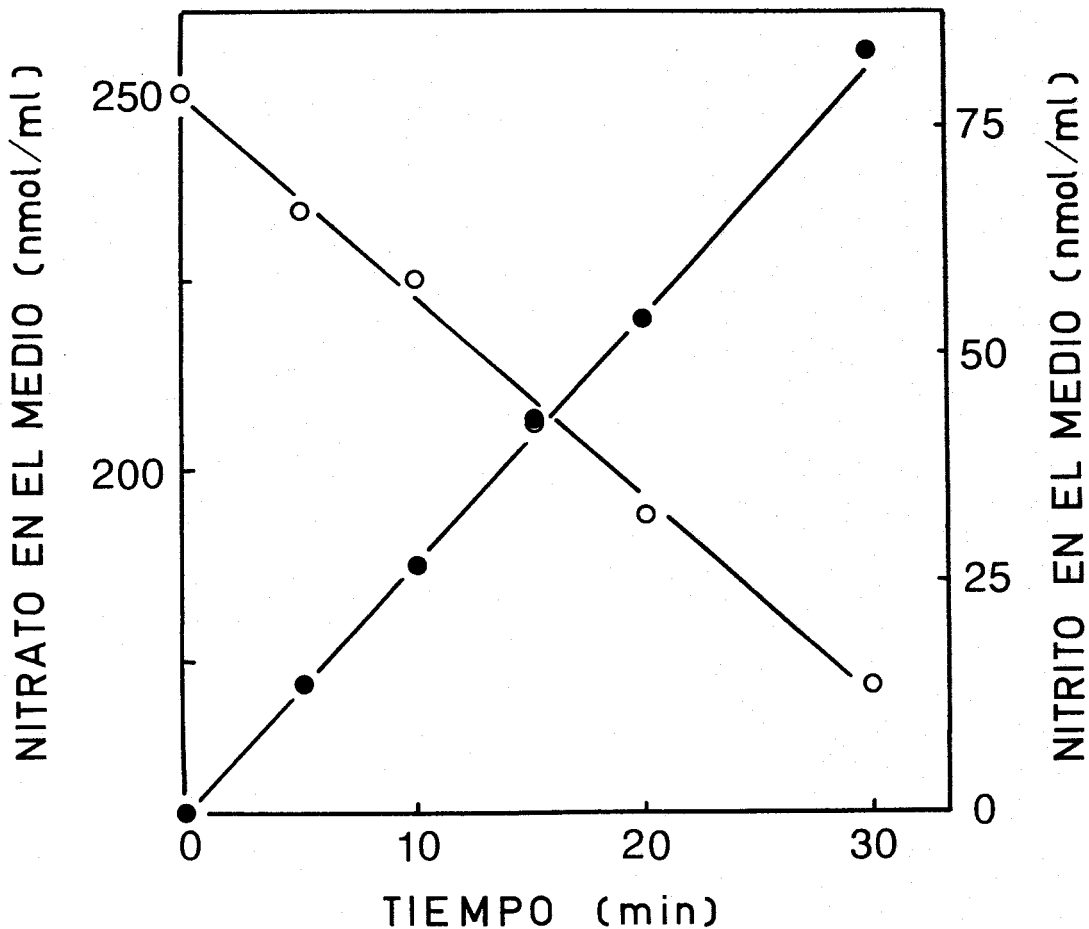


Figura 8. Consumo de nitrato y excreción de nitrito por la estirpe FM2 de *A. nidulans* R2.

Células cultivadas en medio con amonio se incubaron en medio con nitrato como fuente de nitrógeno durante 3 h. El ensayo se realizó utilizando una suspensión celular que contenía  $10 \mu\text{g} \text{clorofila} \cdot \text{ml}^{-1}$  y se comenzó con la adición de nitrato. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas en las que se determinó nitrato y nitrito, tras retirar las células por centrifugación.

Tabla 19. Determinación de nitrato con células de la estirpe mutante FM2

$\text{NO}_3^-$ añadido (nmol)	$\text{NO}_3^-$ estimado (nmol)
1,25	1,33
2,50	2,84
5,00	4,79
10,00	10,12
15,00	15,39
25,00	25,93
50,00	51,30
75,00	76,00
100,00	98,66

A distintas vasijas conteniendo una suspensión de células (10  $\mu\text{g}$  clorofila) de la estirpe FM2 (provenientes de un cultivo en medio con amonio) en tampón Tricina-NaOH/KOH 25 mM, pH 8,3, se añadieron las cantidades de  $\text{KNO}_3$  que se indican. Tras incubarse 30 min a 40 °C con iluminación y agitación, se determinó nitrito en las suspensiones. El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 1 ml.



detección de muy bajas cantidades de nitrato manteniendo su efectividad en el intervalo ensayado de 1,25 a 100 nmol de nitrato.

#### 3.4.2. Utilización de FM2 en el estudio cinético del consumo de nitrato

La particularidad de la estirpe mutante FM2, discutida en el apartado precedente, de que el nitrato consumido pueda estimarse nitrito excretado al medio, ofrece la posibilidad de ensayar el consumo de nitrato para cualquier concentración inicial del mismo, por alta que ésta sea. La disponibilidad de una estirpe con estas características ha permitido estudiar en A. nidulans el efecto de la concentración de nitrato sobre su propio consumo. En la Figura 9 se ilustra tal efecto en experimentos realizados con la estirpe mutante FM2. La dependencia del consumo de nitrato por su concentración se manifiesta en forma de curva con dos diferentes fases, cuya inflexión se sitúa en un valor de concentración de nitrato próximo a 1 mM. La representación de estos datos según la ecuación de inversos de Lineweaver-Burk (Figura 10) de nuevo pone de manifiesto una cinética bifásica. Estos resultados sugieren la existencia en el consumo de nitrato por A. nidulans, de dos diferentes componentes cinéticos, uno de ellos de alta afinidad, con una  $K_m$  de orden micromolar, y un segundo componente de baja afinidad, con  $K_m$  de orden milimolar. Estas experiencias se

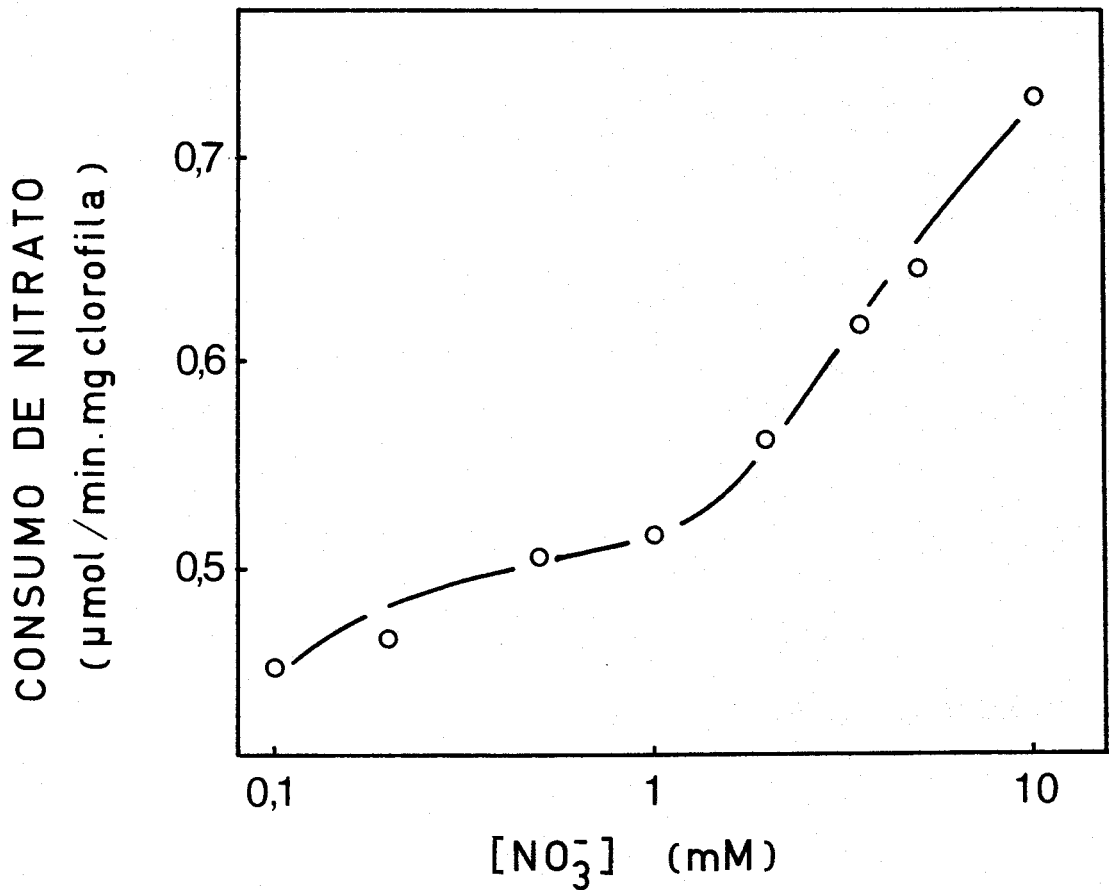


Figura 9. Efecto de la concentración de nitrato sobre la velocidad de consumo de dicho ión por la estirpe mutante FM2.

Células cultivadas en medio con amonio se transfirieron a medio carente de fuente de nitrógeno, ajustándose la densidad celular a la correspondiente a 10 µg clorofila·ml<sup>-1</sup>, y se incubaron durante 3 h. Los ensayos de consumo de nitrato sa llevaron a cabo en suspensiones celulares que contenían 9 µg clorofila·ml<sup>-1</sup>. La velocidad de consumo de nitrato se calculó a partir de la cantidad de nitrito producido por las células en 8 min.

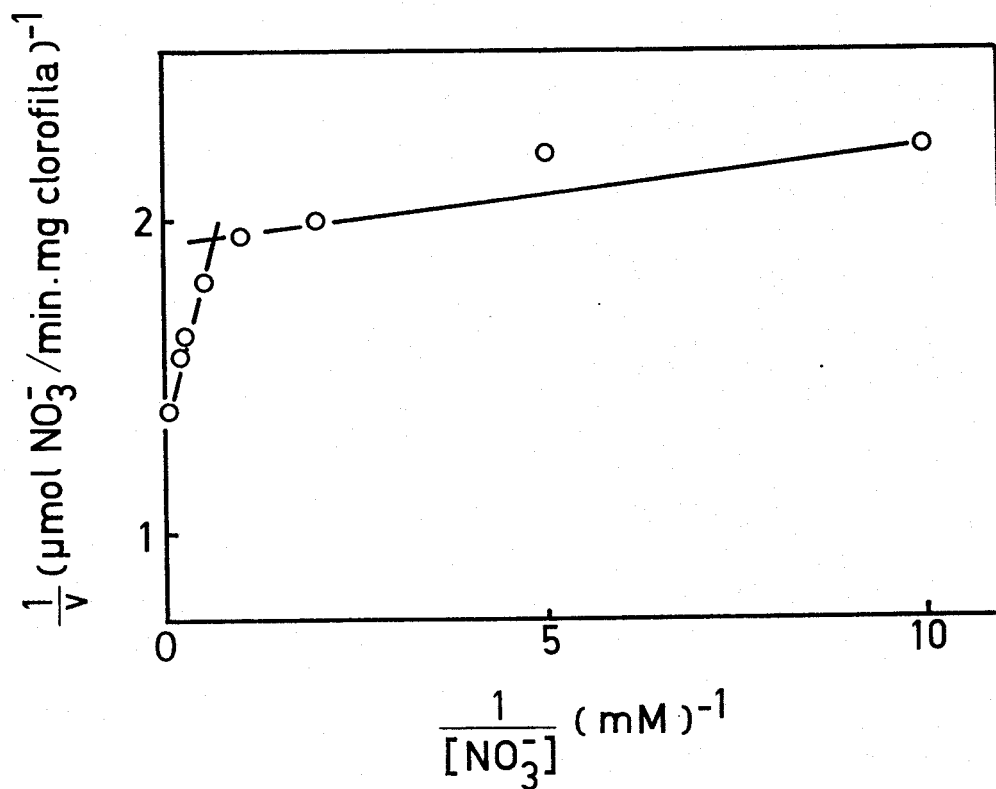


Figura 10. Representación de inversos (Lineweaver-Burk) del efecto de la concentración de nitrato sobre la velocidad de consumo de dicho ión por células de la estirpe FM2 de *A. nidulans* R2.

Las condiciones fueron las mismas que las de la Figura 9.

llevaron a cabo con células de la estirpe mutante FM2 de A. nidulans R2 cultivadas en medio con amonio e incubadas durante 3 h en medio carente de fuente de nitrógeno. La cinética bifásica observada para el consumo de nitrato podría quizás derivarse de la particular situación de deficiencia en nitrógeno de las células utilizadas. Sin embargo, el mismo comportamiento se observó también para células de la estirpe FM2 crecidas en medio con amonio cuando se ensayaron directamente, sin incubación previa en medio sin fuente de nitrógeno (Fig.11).

Dado que el componente de baja afinidad se hace patente sólo a altas concentraciones de nitrato, pudiendo su cinética de saturación reflejar la de la nitrato reductasa ( $K_m$  para el nitrato aproximadamente 2 mM), parecía razonable pensar que se correspondiera con una entrada pasiva del nitrato en la célula. Al objeto de contrastar esta hipótesis, se estudió el efecto que sobre el consumo de nitrato a alta concentración del ión presentan el DCCD y el amonio. Estos compuestos inhiben en A. nidulans el consumo de nitrato a baja concentración del ión. Aunque la inhibición causada por el DCCD se ha adscrito al bloqueo que provoca en la síntesis y utilización de ATP y la causada por el amonio a un efecto regulador, en ambos casos se ha propuesto que el blanco de la inhibición es el transporte activo del nitrato al interior celular (Flores et al., 1983a; Romero, 1986). Como puede observarse en la Tabla 20, el consumo de nitrato a alta concentración del ión se ve

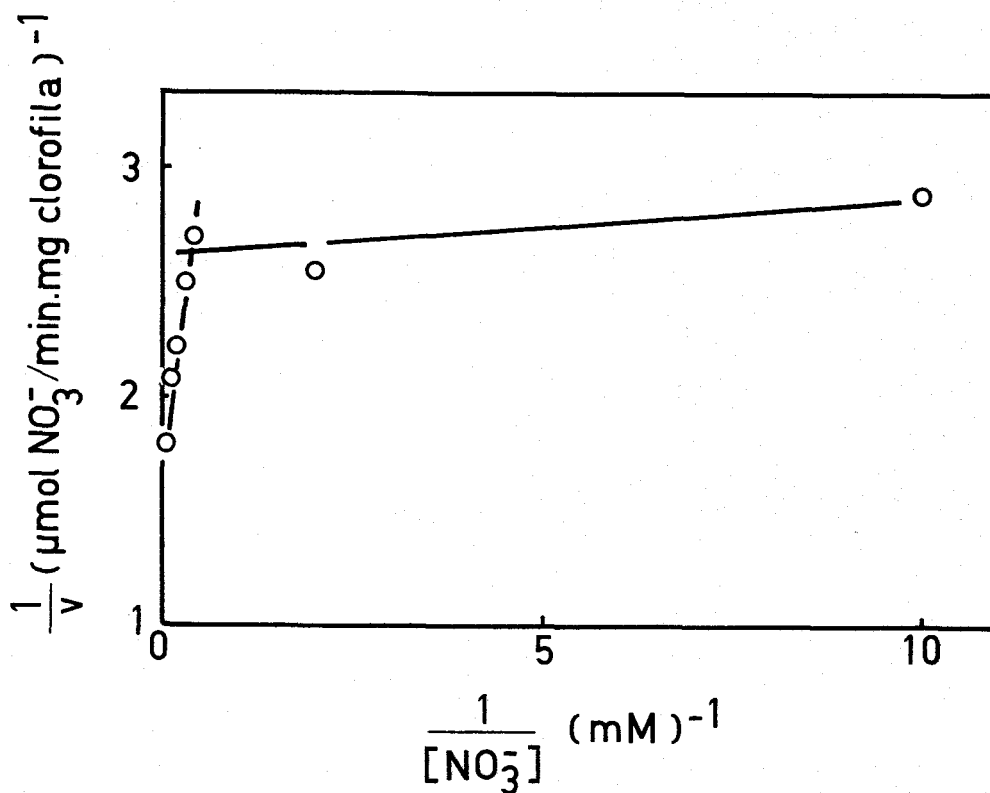


Figura 11. Representación de inversos (Lineweaver-Burk) del efecto de la concentración de nitrato sobre la velocidad de consumo de dicho ión por células de la estirpe FM2 cultivadas en amonio.

Para los ensayos de consumo se utilizaron células de la estirpe FM2 cultivadas en amonio. Las determinaciones se llevaron a cabo en suspensiones celulares que contenían  $2,5 \mu\text{g clorofila} \cdot \text{ml}^{-1}$  calculándose las velocidades de consumo de nitrato a partir del nitrito producido por las células en 10 min.

Tabla 20. Efectos de amonio y DCCD sobre el consumo de nitrato por la estirpe FM2 de A. nidulans R2

NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> en el ensayo (mM)	Adición		
	ninguna	amonio	DCCD
	Consumo de nitrato ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ clorofila}^{-1}$ )		
0,25	0,26	0,00	0,00
20,00	0,40	0,00	0,00

Células cultivadas en medio con amonio se transfirieron a medio carente de fuente de nitrógeno, ajustándose la densidad celular a la correspondiente a  $10\ \mu\text{g}\text{ clorofila}\cdot\text{ml}^{-1}$ , y se incubaron durante 3 h. Los ensayos de consumo de nitrato, que se llevaron a cabo en suspensiones que contenían  $10\ \mu\text{g}\text{ clorofila}\cdot\text{ml}^{-1}$ , se iniciaron, tras una incubación de 10 min en oscuridad, en ausencia o presencia de DCCD a concentración  $5\ \mu\text{M}$ , añadiendo el  $\text{KNO}_3$  y encendiendo la luz. El amonio, presente a concentración  $0,25\ \text{mM}$  donde se indica, se añadió justo antes del nitrato.

afectado por amonio y DCCD de igual modo que cuando dicho consumo tiene lugar en condiciones de baja concentración de nitrato. (El DCCD se utilizó a concentraciones que no afectan a otros aspectos del metabolismo de A. nidulans tales como el consumo de nitrito a pH neutro o la actividad nitrato reductasa, Flores et al., 1983a). Los resultados obtenidos no parecen, por tanto, apoyar la idea de que el componente de baja afinidad observado para el consumo de nitrato por A. nidulans refleje una entrada pasiva de dicho ión al interior de la célula.

#### 3.4.3. Utilización de FM2 en el estudio del control de la utilización de nitrato por la fijación de CO<sub>2</sub>

La estirpe mutante FM2 carece de nitrito reductasa, siendo por ello incapaz de producir amonio a partir del nitrato que consume. De acuerdo con el modelo propuesto para la regulación del consumo de nitrato por compuestos derivados de la asimilación del amonio y de la fijación de CO<sub>2</sub> (apartado 1.2.1.) , en el que el papel positivo del CO<sub>2</sub> se adscribe a la capacidad de productos de su fijación para eliminar derivados del amonio inhibidores de la utilización del nitrato, cabría esperar que la dependencia del consumo de nitrato por fijación de CO<sub>2</sub> estuviese reducida en la estirpe FM2. Los experimentos que se describen en este apartado se han dirigido a clarificar este punto.

### 3.4.3.1. Requerimiento por $\text{CO}_2$ para la utilización de nitrato en las estirpes A6 y FM2

Se planteó en primer término si la estirpe mutante requería  $\text{CO}_2$  para consumir nitrato. Con este fin, se llevaron a cabo ensayos de consumo de nitrato en vasijas cerradas en las que suspensiones celulares se burbujeaban con aire o con aire normal pasado a través de una solución concentrada de KOH, al objeto de eliminar el  $\text{CO}_2$  presente. Como se desprende de los resultados del experimento que se ilustra en la Tabla 21, en ausencia de  $\text{CO}_2$ , FM2, al igual que la estirpe silvestre, es incapaz de consumir nitrato.

Se planteó a continuación si el requerimiento por  $\text{CO}_2$  para el consumo de nitrato en la estirpe mutante era diferente al de la estirpe silvestre. Para responder a este punto se emplearon dos aproximaciones experimentales distintas. La primera de ellas consistió en estudiar el efecto que sobre el consumo de nitrato tenía la adición de bicarbonato al ensayo. Como se observa en la Figura 12, la presencia de  $\text{NaHCO}_3$ , a concentración 10 mM, en el ensayo de consumo de nitrato se tradujo en un incremento sensible de la velocidad de dicho consumo por células de la estirpe silvestre. Esta observación concuerda plenamente con otras realizadas previamente para A. nidulans (Flores, 1982). Ese efecto positivo sobre el consumo de nitrato no tuvo lugar cuando la estirpe ensayada fue la mutante FM2. En este



Tabla 21. Efecto de la ausencia de CO<sub>2</sub> sobre el consumo de nitrato por las estirpes A6 y FM2 de A. nidulans R2

Estirpe	+CO <sub>2</sub>	-CO <sub>2</sub>
	Consumo de nitrato ( $\mu\text{mol min}^{-1} \cdot \text{mg clorofila}^{-1}$ )	
A6 (silvestre)	0,30	0,0
FM2	0,26	0,0

Células cultivadas en medio con amonio se incubaron durante 3 h en medio carente de fuente de nitrógeno (la suspensión celular contenía  $10 \mu\text{g clorofila} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Los ensayos se realizaron en vasijas cerradas, conectadas con el exterior a través de dos agujas hipodérmicas. Una de ellas se utilizaba para burbujear, a través de la suspensión celular (que contenía  $10 \mu\text{g clorofila} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), aire o aire pasado por una suspensión concentrada de KOH para eliminar el CO<sub>2</sub>. La otra aguja servía como salida de gases así como para la toma de muestras. Los ensayos se iniciaron iluminando y añadiendo KNO<sub>3</sub> (concentración final 0,25 mM), tras haber mantenido las suspensiones burbujéandose en oscuridad durante 30 min.

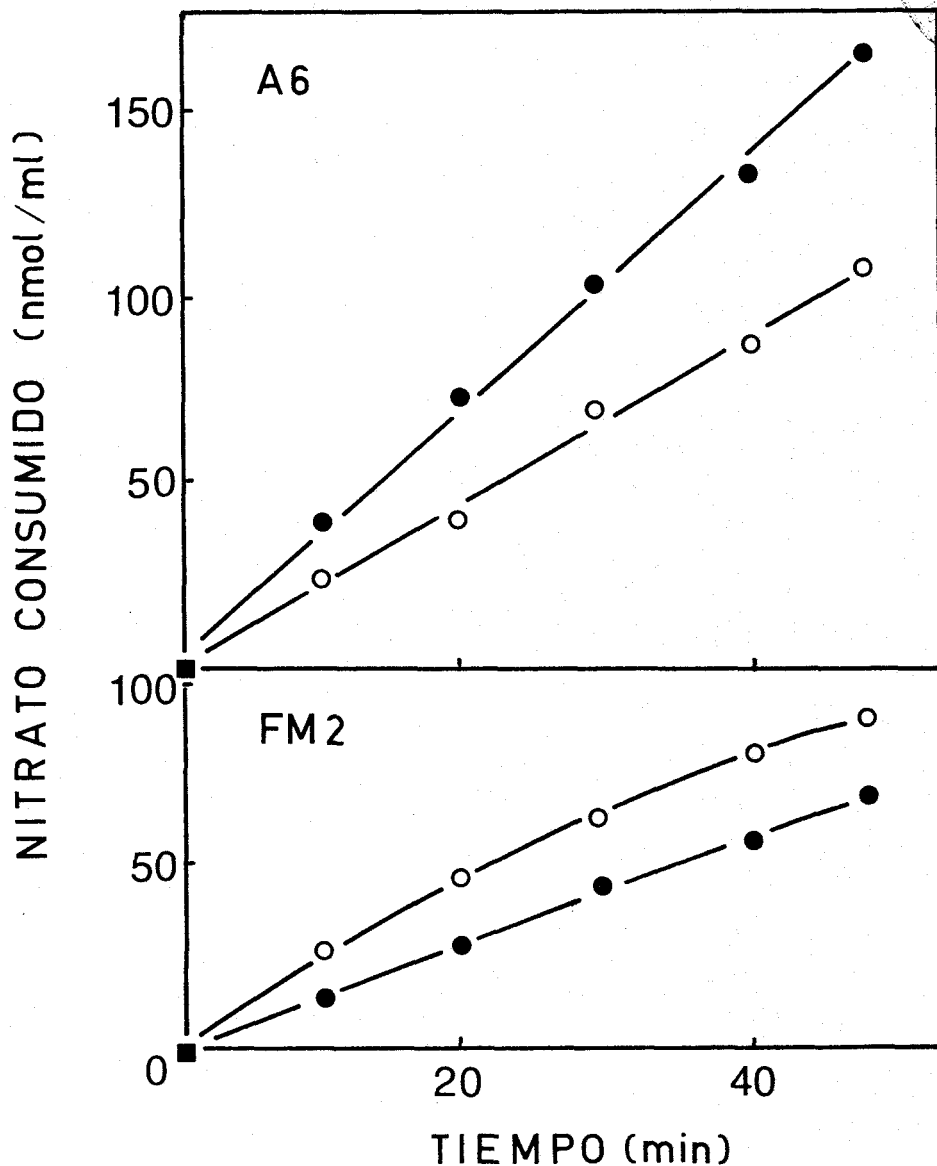


Figura 12. Efecto del bicarbonato sobre el consumo de nitrato en las estirpes A6 y FM2 de *A. nidulans* R2.

Las células se cultivaron en medio con amonio y se transfirieron a medio sin fuente de nitrógeno ajustándose la densidad celular a la correspondiente a  $10 \mu\text{g}$  clorofila  $\cdot \text{ml}^{-1}$ . Tras incubar durante 3 h se realizaron los ensayos en suspensiones celulares que contenían  $10 \mu\text{g}$  clorofila  $\cdot \text{ml}^{-1}$  suplementadas (círculos llenos) o no con  $\text{NaHCO}_3$  (concentración final  $10 \text{ mM}$ ). Los ensayos se iniciaron por adición de  $\text{KNO}_3$  (concentración final  $0,25 \text{ mM}$ ).

caso, la adición de bicarbonato no sólo no provocó aumento alguno de la velocidad de consumo de nitrato, sino que causó una moderada inhibición del mismo. El efecto negativo del  $\text{CO}_2$  en este caso podría adscribirse a una competencia entre la utilización de nitrato y la fijación de  $\text{CO}_2$  por poder asimilatorio.

Por otra parte se estudió el efecto del D,L-gliceraldehído (DLG) sobre el consumo de nitrato en las estirpes silvestre y FM2. El DLG actúa en cianobacterias como un inhibidor de la asimilación del  $\text{CO}_2$  por el ciclo reductivo de las pentosas fosfato y, como tal, inhibe también la utilización de nitrato en A. nidulans (Lara et al., 1984; Romero et al., 1985). Como se observa en la Figura 13, la estirpe FM2 es notablemente menos sensible que la silvestre al efecto inhibidor del DLG sobre el consumo de nitrato. La menor sensibilidad del consumo de nitrato por la estirpe FM2 al DLG no se debe a que este compuesto inhiba en menor grado la fijación de  $\text{CO}_2$  en esta estirpe que en la silvestre (Tabla 22).

Los resultados expuestos en este apartado indican que el requerimiento por  $\text{CO}_2$  para el consumo de nitrato, aunque patente, se encuentra sensiblemente disminuído en la estirpe FM2 con respecto a la estirpe silvestre.

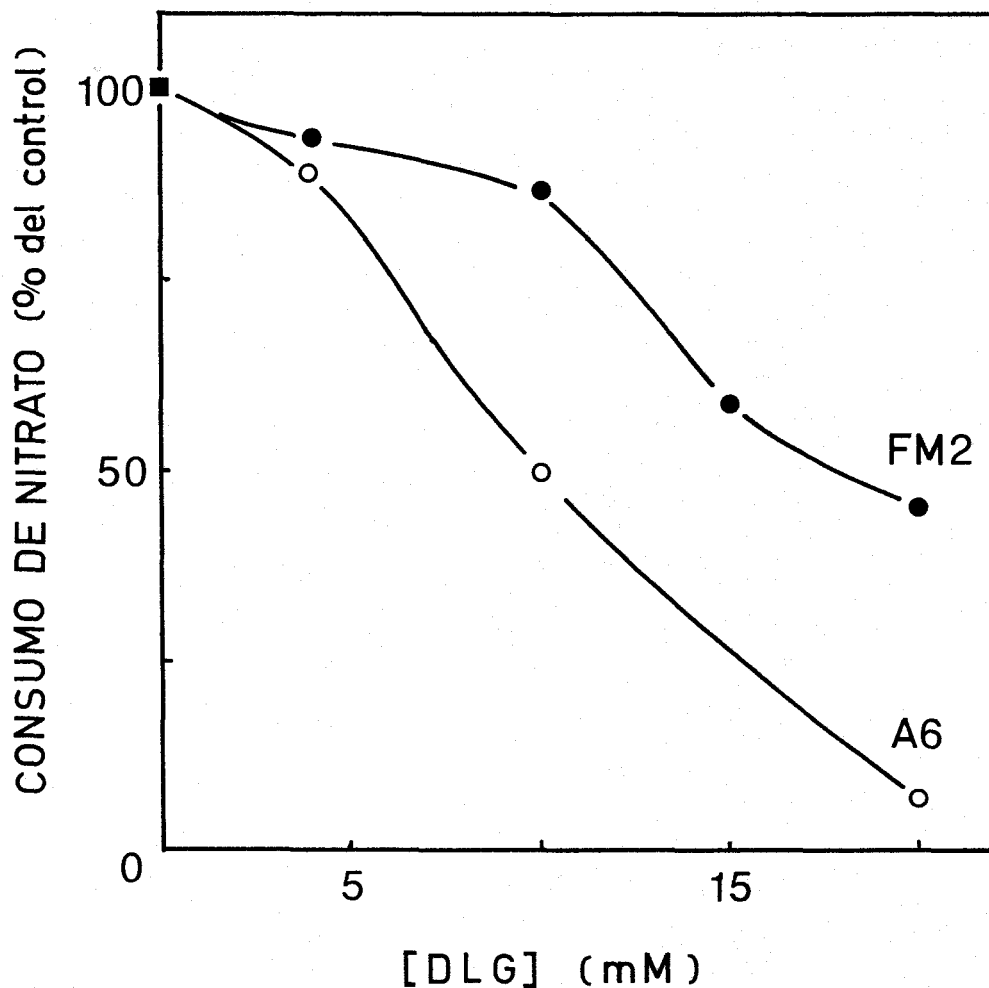


Figura 13. Efecto del DLG sobre el consumo de nitrato en las estirpes A6 y FM2 de A. nidulans R2.

Células cultivadas en medio con amonio se incubaron en medio carente de fuente de nitrógeno durante 3 h (contenido en clorofila de la suspensión celular  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Los ensayos de consumo, en los que se utilizaron suspensiones celulares conteniendo  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  clorofila, se iniciaron por iluminación y adición de  $\text{KNO}_3$  (concentración final  $0,25 \text{ mM}$ ), tras incubar las suspensiones 15 min en la oscuridad en presencia de la concentración de DLG indicada.

Tabla 22. Inhibición por DLG de la fijación de CO<sub>2</sub> en las estirpes A6 y FM2 de A. nidulans R2

Estirpe	Inhibición (%)	
	DLG 10 mM	DLG 20 mM
A6 (silvestre)	26,9	59,6
FM2	21,1	58,1

Células cultivadas en medio con amonio se transfirieron a medio carente de fuente de nitrógeno, ajustándose la densidad celular a la correspondiente a  $10 \mu\text{g}$  clorofila  $\cdot \text{ml}^{-1}$ . Tras incubar durante 3 h, se estimó la velocidad de fijación de CO<sub>2</sub> en suspensiones celulares iluminadas que contenían  $10^{14} \mu\text{g}$  clorofila  $\text{ml}^{-1}$ , determinando la incorporación de <sup>14</sup>C procedente de [<sup>14</sup>C]NaHCO<sub>3</sub>. Las suspensiones se pretrataron durante 15 min, en oscuridad, en presencia de las concentraciones de DLG que se indican. Las velocidades de fijación de CO<sub>2</sub> de las suspensiones control, a las que no se añadió DLG, fueron:  $5,4_1 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg clorofila}^{-1}$  (A6) y  $3,9 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg clorofila}^{-1}$  (FM2).

#### 3.4.4. Utilización de FM2 y FM10 en el estudio de interacciones entre consumo de nitrato y de nitrito

La disponibilidad de estirpes mutantes de A. nidulans R2 carentes de actividad nitrato reductasa o nitrito reductasa, ha permitido estudiar la posible competencia entre el nitrato y el nitrito por su entrada en la célula en un sistema en el que quedan excluidas posibles interacciones a nivel de los procesos de reducción. Los experimentos que se describen a continuación ilustran este aspecto.

##### 3.4.4.1. Efecto del nitrito sobre el consumo de nitrato

Para estudiar el posible efecto del nitrito sobre el consumo de nitrato por A. nidulans R2 se empleó la estirpe FM2, incapaz de reducir nitrito. Es de interés comentar que en el experimento que se cita a continuación, así como en el resto de los descritos en el apartado 3.4.4., el pH en los ensayos de consumo, o de fijación de CO<sub>2</sub> en su caso, se mantuvo en un valor igual a 9,6. A esos valores de pH la contribución de la entrada pasiva del ión al consumo de nitrito parece ser prácticamente nula y la entrada del nitrito en la célula tiene lugar en su mayor parte a través del sistema de transporte activo (Flores et al., 1987).

En la Tabla 23 se muestra que la presencia de nitrito en el ensayo de consumo de nitrato inhibía dicho consumo. Asimismo se observa que la inhibición aumentaba con la concentración de nitrito empleada, llegando a alcanzar un valor de más del 70% cuando la concentración de nitrito era 1 mM. El nitrito a concentraciones no muy elevadas ejerce efectos tóxicos sobre procesos fotosintéticos, por lo que se ha estudiado si la inhibición observada es un reflejo de tal efecto. En la Figura 14 se muestra que el nitrito a las concentraciones utilizadas no ejerce efecto inhibitorio alguno sobre la fijación fotosintética de  $\text{CO}_2$ .

Los resultados obtenidos indican pues que el nitrito inhibe el consumo de nitrato, no pudiendo explicarse dicha inhibición por una competencia por poder reductor entre la reducción de nitrato y la de nitrito, ni tampoco por un efecto inespecífico del nitrito. La interacción competitiva podría así tener lugar a nivel de la entrada de ambas iones en la célula.

#### 3.4.4.2. Efecto del nitrato sobre el consumo de nitrito

La estirpe mutante empleada en los experimentos que se describen en este apartado fue FM10, que carece de la actividad nitrato reductasa. Para estos experimentos, las células empleadas en los ensayos se habían pretratado con MSX. Este tratamiento, que, como

Tabla 23. Inhibición por nitrito del consumo de nitrato por la estirpe FM2 de A. nidulans R2

Nitrito añadido (mM)	Consumo de nitrato ( $\mu\text{mol min}^{-1} \cdot \text{mg clorofila}^{-1}$ )
0,0	0,34
0,2	0,25
0,5	0,13
1,0	0,09

Células cultivadas en medio con amonio se incubaron durante 3 h en medio carente de fuente de nitrógeno (la suspensión celular contenía  $10 \mu\text{g clorofila} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Los ensayos se iniciaron por adición de  $\text{KNO}_3$ , a concentración final  $0,1 \text{ mM}$ , a células suspendidas en tampón glicina-NaOH  $25 \text{ mM}$ , pH  $9,6$  (las suspensiones contenían  $10 \mu\text{g clorofila} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), suplementadas con  $\text{KNO}_2$  a las concentraciones indicadas.



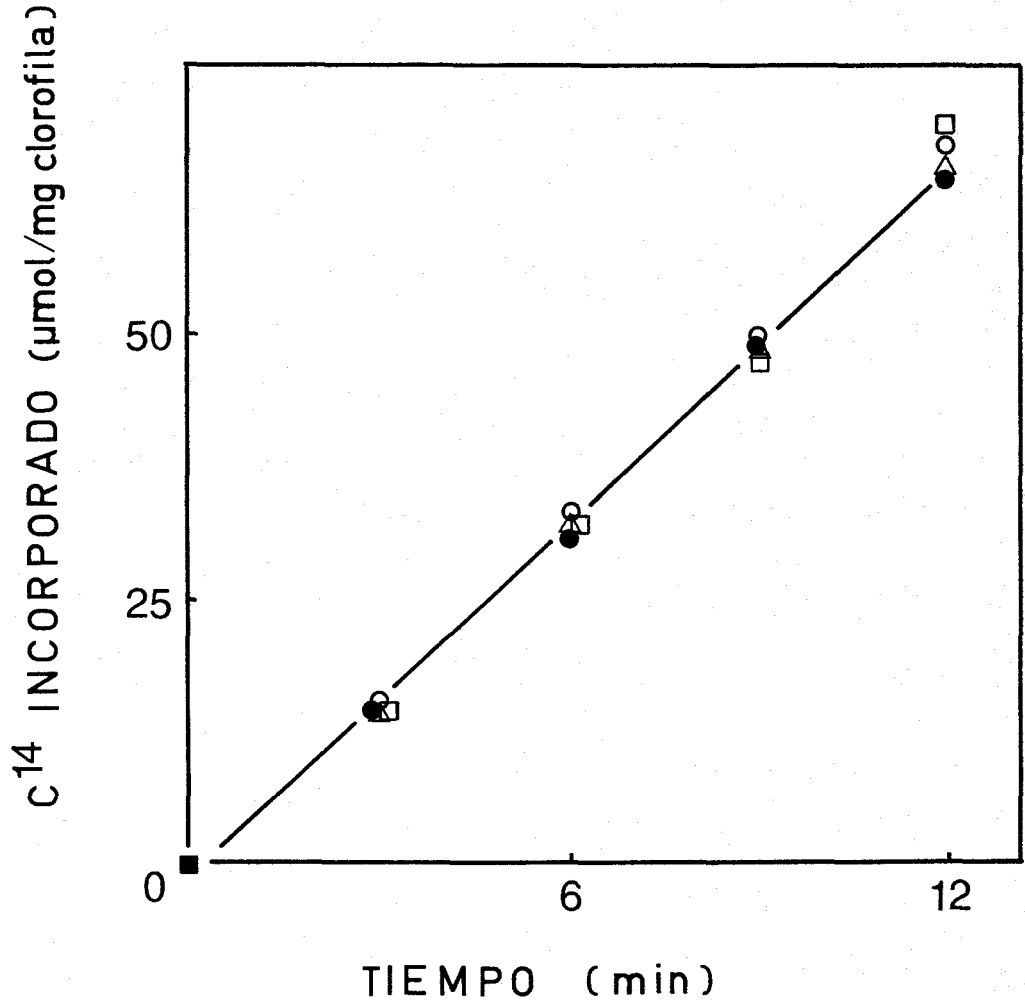


Figura 14. Efecto del nitrito sobre la fijación fotosintética de  $\text{CO}_2$  por la estirpe FM2 de *A. nidulans* R2.

Células cultivadas en medio con amonio se transfirieron a medio carente de fuente de nitrógeno (densidad celular equivalente a  $10 \mu\text{g}$  clorofila  $\cdot \text{ml}^{-1}$ ) y se incubaron durante 3 h. La fijación de  $\text{CO}_2$  se estimó en suspensiones celulares que contenían  $10 \mu\text{g}$  clorofila  $\cdot \text{ml}^{-1}$ , midiendo la incorporación de  $^{14}\text{C}$ , procedente de  $[^{14}\text{C}]\text{NaCO}_3\text{H}$ . Los ensayos se realizaron en ausencia (O) o en presencia de  $\text{KNO}_2$  a concentraciones 0,2 mM ( $\Delta$ ), 0,5 mM ( $\square$ ) y 1 mM ( $\bullet$ ).

se ha comentado, implica la inactivación de la glutamina sintetasa, tenía como objeto el que en las células utilizadas en los ensayos no tuviese lugar asimilación del amonio resultante de la reducción de nitrito. De este modo se pretendía evitar interferencias con procesos posteriores a aquel bajo estudio.

Los resultados expuestos en la Tabla 24 muestran que el nitrato causa una efectiva inhibición del consumo de nitrito cuando está presente en el ensayo a concentraciones no superiores a las que se utilizan para el crecimiento de este organismo. Cuando la concentración de nitrato en el ensayo era 20 mM se obtuvieron inhibiciones del consumo de nitrito del orden del 90%. Se ha estudiado también el efecto que el nitrato ejerce sobre la reducción, mediada por la nitrito reductasa, de nitrito a amonio. Como se observa en la Tabla 25, concentraciones de nitrato de hasta 50 mM no tuvieron efecto negativo alguno sobre la reducción de nitrito catalizada por la nitrito reductasa. Los datos presentados indican que el nitrato inhibe el consumo de nitrito en A. nidulans R2 y que dicha inhibición no se debe a competencia por poder reductor entre la utilización de dichos iones ni tampoco a inhibición de la nitrito reductasa.

Se ha determinado el tipo de inhibición que ejerce el nitrato sobre el consumo de nitrito. Con este objeto se ha estudiado, en células de la estirpe mutante

Tabla 24. Inhibición por nitrato del consumo de nitrito por la estirpe FM10 de A. nidulans R2

Nitrato añadido (mM)	Consumo de nitrito ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ clorofila}^{-1}$ )
0,0	0,52
0,2	0,13
2,0	0,09
20,0	0,04

Células cultivadas en medio con nitrito como fuente de nitrógeno (suspendidas en tampón Tricina-NaOH 50 mM, pH 8,1, a razón de  $10\ \mu\text{g}\text{ clorofila}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) se trataron con MSX 1 mM en la luz, a  $40^{\circ}\text{C}$ , durante 15 min. Posteriormente, se transfirieron a tampón glicina-NaOH 25 mM, pH 9,6, donde se llevaron a cabo los ensayos de consumo, los cuales se comenzaron añadiendo  $\text{KNO}_2$ , a concentración final 0,1 mM, inmediatamente después de la adición del  $\text{KNO}_3$ .

Tabla 25. Efecto del nitrato sobre la actividad nitrito reductasa de la estirpe FM10 de A. nidulans R2

$\text{NO}_3^-$ (mM)	Nitrito reductasa ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ clorofila}^{-1}$ )
0,0	0,82
0,5	0,87
5,0	0,81
50,0	0,80

Las células utilizadas en el experimento se cultivaron en medio con nitrito como fuente de nitrógeno. Las condiciones para los ensayos de la actividad enzimática fueron esencialmente las mismas descritas en Materiales y Métodos, salvo que la concentración de nitrito en la mezcla de ensayo fue de 0,4 mM.

FM10 pretratadas con MSX, la relación existente entre la velocidad de consumo de nitrito y la concentración de éste en el ensayo, tanto en ausencia como en presencia de nitrato a concentración 0,25 mM. El análisis de los valores obtenidos mediante la representación de inversos de Lineweaver-Burk (Figura 15) indica que la inhibición por nitrato del consumo de nitrito es de tipo competitivo. El valor calculado de  $K_i$  para el nitrato fue de 24  $\mu\text{M}$ , muy próximo al valor de la  $K_s$  del nitrito para el consumo de nitrito, que fue de 22  $\mu\text{M}$  (Figura 15)

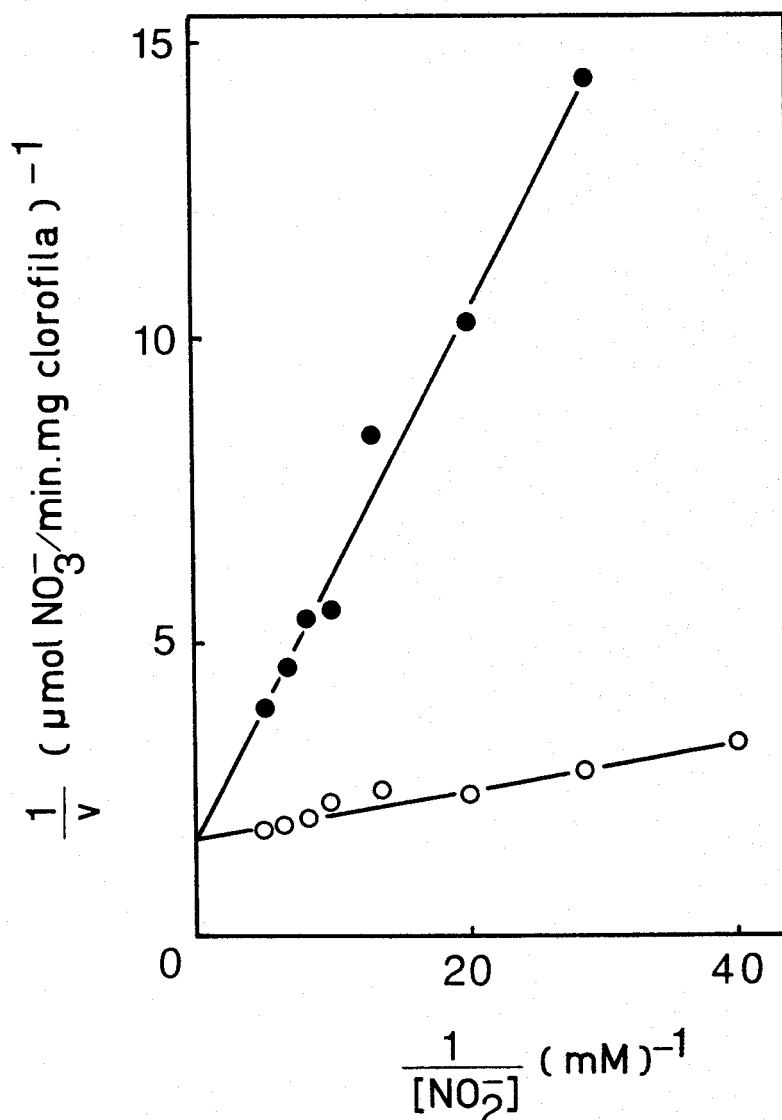


Figura 15. Representación de inversos (Lineweaver-Burk) del efecto de la concentración de nitrito sobre su consumo por la estirpe mutante FM10 de A. nidulans R2 en ausencia (O) o presencia (●) de KNO<sub>3</sub> 0,25 mM.

Células cultivadas en medio con nitrito como fuente nitrogenada se trataron con MSX tal como se indica en la Tabla 23. Para los ensayos se utilizaron suspensiones celulares que contenían  $9 \mu\text{g clorofila}\cdot\text{ml}^{-1}$  de tampón glicina-NaOH 25 mM pH 9,6. Las velocidades de consumo de nitrito se calcularon a partir de la cantidad de nitrito desaparecido en 3 min a partir del comienzo del ensayo por la adición de las células.

#### 4. DISCUSSION

La obtención de una serie de estirpes mutantes de Anacystis nidulans R2 afectadas en la utilización de nitrato, así como la caracterización de las mismas, constituye una parte esencial del trabajo desarrollado. Se han aislado un total de 18 estirpes incapaces de utilizar eficientemente nitrato como fuente nitrogenada. Atendiendo a los niveles celulares de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa que presentan las diferentes estirpes, han podido diferenciarse tres grupos (apartado 3.1.2.1.). Uno es el representado por la estirpe FM16, que presenta niveles significativos de ambas actividades enzimáticas. La estirpe FM2, que presenta actividad nitrato reductasa pero no nitrito reductasa, define al segundo grupo, incluyendo el tercero a las dieciséis estirpes restantes que presentan actividad nitrito reductasa pero no nitrato reductasa. Mediante estudios de transformación con tres plásmidos conteniendo cada uno un gen diferente de A. nidulans R2 implicado en la reducción de nitrato (Kuhlemeier et al., 1984a,b), se ha constatado que todos los mutantes del tercer grupo se hallan afectados en alguno de esos tres genes (apartado 3.1.2.2.). Las estirpes mutantes FM2 y FM16, además de presentar características fenotípicas que las hacen diferentes del resto, son también diferenciables desde el punto de vista genético, ya que ADN aislado de dichas estirpes transforma al fenotipo silvestre a representantes de los demás tipos de mutantes (apartados 3.2.2. y 3.3.2.1.). En el caso de



FM2 se ha constatado, además, la incapacidad de los tres plásmidos antes mencionados para transformar dicha estirpe al fenotipo silvestre.

Resulta de interés comentar que, con alta probabilidad, las transformaciones observadas dependían de recombinación. La ocurrencia de transformación al fenotipo silvestre de las estirpes mutantes por ADN de FM2 o FM16 depende, obviamente, de recombinación puesto que el gen introducido no se encuentra situado en elementos con capacidad de autorreplicación. Aún en el caso de la transformación de estirpes mutantes con genes clonados en plásmidos replicables en A. nidulans R2, no puede descartarse la posibilidad de que la recuperación del fenotipo silvestre tras la transformación se deba a recombinación entre el ADN clonado y el cromosoma de la estirpe receptora. De hecho, se ha descrito que la transformación al fenotipo silvestre de mutantes carentes de actividad nitrato reductasa se da con igual frecuencia tanto si el vector en el que se encuentra clonado el ADN transformante posee capacidad de autorreplicación en la cianobacteria como si no (Kuhlemeier et al. 1984a). La posibilidad de verificar inequívocamente el requerimiento de recombinación para las transformaciones requeriría disponer de una estirpe de A. nidulans R2 deficiente en recombinación. Sin embargo, aunque se ha descrito el aislamiento de mutantes de cianobacterias sensibles a luz ultravioleta (Zhevner y Shestakov, 1972) e incluso el clonaje de genes

capaces de desempeñar en E. coli ciertas funciones propias del gen recA (Borrias et al., 1985; Geoghegan y Houghton, 1987; Murphy et al., 1987; Owttrim y Coleman, 1987), no se dispone en la actualidad de estirpe alguna de cianobacteria con fenotipo  $Rec^-$  (deficiente en recombinación).

Los resultados de transformación al fenotipo silvestre de una estirpe mutante con ADN cromosómico de otra estirpe mutante (apartados 3.2.2. y 3.3.2.1.), se han considerado indicativos de que las correspondientes mutaciones afectan a genes distintos. Podría considerarse, sin embargo, la posibilidad de que alguno de los casos de transformación al fenotipo silvestre sea consecuencia de recombinación intragénica. Para ello, las mutaciones en las dos estirpes deberían hallarse situadas en sitios suficientemente distanciados de un mismo gen, requiriéndose además la ocurrencia de recombinación en sitios muy específicos, acontecimiento que no es muy probable. De hecho, los valores de las frecuencias con que el ADN de FM2 o FM16 transformaba al fenotipo silvestre a los restantes tipos de mutantes son similares, lo que, para el caso de recombinación intragénica, sólo sería esperable si las estirpes receptoras se hallasen a su vez afectadas en el mismo gen, no siendo éste el caso. Puesto que, además, las frecuencias de estas transformaciones no eran especialmente bajas, parece razonable interpretar los

resultados obtenidos como indicativos de que FM2 y FM16 son estirpes mutadas en genes distintos entre sí y, a su vez, distintos a aquellos en los que se localizan las mutaciones de las restantes estirpes.

Resulta llamativo el hecho de que todas las estirpes mutantes obtenidas carentes de actividad nitrato reductasa pertenezcan a alguno de los tres tipos de mutantes descritos por Kuhlemeier et al. (1984a, b). Ha de considerarse, sin embargo, que los métodos empleados tanto para la inducción de mutaciones como para la selección de las estirpes mutantes fueron los mismos en ambos casos. Así, al igual que en los trabajos de Kuhlemeier et al. (1984a), se seleccionaron como presuntos mutantes a estirpes provenientes de colonias que en medio sólido BG11 presentaban un tamaño menor que el normal y color amarillento. Posiblemente, la base de que entre las estirpes así seleccionadas se encuentren con alta frecuencia mutantes afectados en la asimilación de nitrato radique en que el medio sólido contiene amonio en muy baja concentración aunque, aparentemente, suficiente para permitir que células de una estirpe que no puede asimilar nitrato (fuente de nitrógeno del medio BG11) formen pequeñas colonias que adquirirían color amarillento al agotarse el amonio (Allen, 1969). De hecho, se han empleado métodos con una base similar para la selección de mutantes auxótrofos en diversos microorganismos (Gotto et al., 1979; Kelly y Sunshine, 1967). No parece probable que este método de

selección excluya la detección de alguna posible mutación particular que afecte a la asimilación de nitrato ni que, por tanto, favorezca la de algún tipo de mutante deficiente en la asimilación de nitrato.

En lo referente al método de inducción de mutaciones empleado en este trabajo, al igual que hicieran Kuhlemeier et al. (1984a), se empleó el transposón Tn901 como agente mutagénico. Es bien conocido que la inserción de transposones no ocurre en un sitio al azar dentro de la molécula de ADN blanco, sino que existen lugares preferenciales de inserción que se han denominado "puntos calientes" ("hot spots", Gridley y Reed, 1985; Kleckner, 1981), lo que podría reflejarse en la producción favorecida de determinadas mutaciones. Para la mutagénesis se partía de células en las que el transposón se hallaba presente, por lo que no puede diferenciarse directamente el que la correspondiente mutación se origine por inserción del transposón o espontáneamente. Como se discutirá más adelante, el fenotipo de la estirpe FM16, novedoso respecto a los hasta ahora descritos, se explica mejor como resultante de una mutación de tipo puntual que de la inserción de un transposón.

De los dos nuevos tipos de mutantes descritos en este trabajo (FM2 y FM16), FM2 es la estirpe que presenta un fenotipo más claro, habiendo sido mejor estudiada desde el punto de vista genético. Su fenotipo

es particularmente interesante, puesto que además de carecer de la actividad nitrito reductasa presenta desregulación de la síntesis de los componentes del sistema de utilización de nitrato (apartados 3.1.3.2. y 3.3.1.2.). A diferencia de lo que ocurre en la estirpe silvestre (Herrero et al., 1981; Romero, 1986) células de FM2 cultivadas en medio con amonio presentan plena capacidad de transportar nitrato al interior de la célula y reducirlo hasta nitrito (apartado 3.3.1.2.). Así pues, la síntesis de nitrato reductasa y de proteínas implicadas en el transporte de nitrato no se encuentra sujeta a represión por amonio en esta estirpe. La regulación por amonio de la actividad del sistema de transporte de nitrato se presenta, sin embargo, absolutamente normal en FM2. Esto implica que en la respuesta al amonio de la síntesis de proteínas implicadas en la asimilación de nitrato participa el producto de un gen que aparentemente no interviene en la regulación por amonio de la actividad del sistema de transporte de nitrato. Por otra parte, no puede excluirse la existencia de elementos comunes a ambos procesos de regulación, como lo sugiere la liberación por MSX del efecto del amonio sobre ambos procesos metabólicos (Flores et al., 1980; Herrero et al., 1981). Puesto que el fenotipo de la estirpe FM2 parece ser el resultado de una mutación simple (apartado 3.3.2.2.) debe considerarse la posible existencia de una relación entre la carencia de actividad nitrito reductasa y la desregulación de la síntesis de elementos del sistema de

utilización de nitrato observados en esta estirpe. La forma más simple de explicar estos hechos es a través de la participación de una proteína reguladora con acción negativa, activada por amonio, en la síntesis de proteínas implicadas en la asimilación de nitrato. Si el gen que codifica dicha proteína formase una única unidad transcripcional con el gen estructural de la nitrito reductasa, una mutación polar podría afectar la síntesis de ambas proteínas simultáneamente. El que la mutación de FM2 estuviese, en efecto, causada por la inserción de Tn901 favorecería la hipótesis propuesta, ya que la mutación con transposones resulta con frecuencia en una mutación polar o/y en la pérdida absoluta de función de la proteína afectada (Grindley y Reed, 1985; Kleckner, 1981). La proteína reguladora podría ser incluso la misma nitrito reductasa, lo cual no se contradice necesariamente con el hecho de que otros mutantes carentes de nitrito reductasa (APE2 y APE4) presenten una regulación normal de la síntesis de la nitrato reductasa (apartado 3.3.1.1.). Las mutaciones en estas últimas estirpes no tienen por qué afectar al mismo gen que en la estirpe FM2 ni poseer carácter polar, siendo de hecho muy probable que sean mutaciones puntuales, ya que se indujeron mediante tratamiento con nitrosoguanidina. Modelos en los que una proteína con función catalítica participa en el control de la síntesis de la ruta metabólica de la que forma parte se han propuesto para diversos sistemas y, en particular, para los de asimilación de nitrato de



hongos y del alga verde Chlamydomonas (Cove y Pateman, 1981; Fernández y Cárdenas, 1982; Tomsett y Garrett, 1981).

La propiedad de la estirpe mutante FM16 de crecer, aunque pobremente, sobre medio sólido con nitrato como fuente nitrogenada ha dificultado notablemente su análisis genético. Los únicos resultados de que se dispone sobre el genotipo de FM16, mostrando que su ADN puede transformar al fenotipo silvestre al resto de los mutantes aislados (apartado 3.2.2.), sugieren que FM16 porta una mutación en un nuevo gen. El fenotipo de esta estirpe así lo hace pensar, puesto que es notablemente distinto al de los otros cuatro tipos de mutantes disponibles. La estirpe FM16 presenta niveles normales (o acaso algo elevados) de nitrito reductasa, cuya síntesis sigue un patrón de regulación normal, y niveles bajos (aunque no despreciables) de nitrato reductasa, que se sintetiza de manera constitutiva (apartado 3.1.3.2.).

Aunque los niveles de nitrato reductasa observados en FM16 parecen ser suficientes como para permitirle una capacidad de consumo de nitrato no inferior al 50% de la de la estirpe silvestre, la estirpe mutante no presenta actividad detectable de consumo de nitrato a concentraciones bajas del ión, siendo prácticamente incapaz de crecer sobre medios con nitrato como fuente de nitrógeno cuando el ión se halla

presente a baja concentración (3.2.1.1. y 3.2.1.3.). Una hipótesis atractiva para explicar estas dos últimas observaciones es la de que FM16 sea una estirpe con escasa o nula capacidad de transporte de nitrato. Esto estaría de acuerdo con el hecho de que la velocidad de crecimiento de esta estirpe sobre medios con nitrato como fuente de nitrógeno aumenta con la concentración de dicho ión en el medio, lo que, por otra parte, no ocurre en la estirpe silvestre. Puesto que esa menor afinidad aparente por el nitrato no parece atribuible a defectos en la reducción del nitrato ni en pasos posteriores de su asimilación (apartados 3.2.1.1. y 3.2.1.2.), resulta lógico considerar que el paso afectado sea previo a la reducción. Caso de confirmarse esta hipótesis, FM16 constituiría una evidencia concluyente para A. nidulans de la implicación de proteínas en el transporte de nitrato al interior celular. Aunque para numerosos organismos, incluyendo bacterias (Betlach et al., 1981; Flores et al., 1983a; Revilla et al., 1985; Thayer y Huffaker, 1982), hongos (Brownlee y Arst, 1983; Goldsmith et al., 1973; Schloemer y Garret, 1974), algas (Cresswell y Syrett, 1979; Eppley y Rogers, 1970; Florencio y Vega, 1982; Fuggi et al., 1984; Serra et al., 1978) y plantas superiores (Wray, 1986) se ha propuesto la implicación de un sistema de transporte en la entrada del nitrato en la célula, sólo en el caso del hongo Aspergillus nidulans (Brownlee y Arst, 1983) y de la planta Arabidopsis (Oostidiër-Braaksma y Fenestra, 1973) se han descrito mutantes presuntamente afectados



en dicho sistema.

El segundo aspecto de interés en el fenotipo de FM16 es el referente a la regulación de la síntesis de las enzimas implicadas en la reducción de nitrato, estando alterada la de la nitrato reductasa aunque no la de la nitrito reductasa (apartado 3.1.3.1.)

Para poder aclarar las bases genéticas del fenotipo de FM16 sería importante verificar si dicho fenotipo es, efectivamente, el resultado de una única mutación. En el supuesto de que el fenotipo de FM16 fuese debido a una mutación simple existen diversas posibilidades para explicar el fenotipo de la estirpe. Una de las explicaciones más simples sería que la mutación afectase al promotor del gen de la nitrato reductasa, provocando una transcripción constitutiva de bajo nivel. La escasa capacidad de transporte de nitrato de FM16 podría explicarse en términos de que los genes con la información para las proteínas implicadas en el transporte formasen parte de la misma unidad transcripcional que la nitrato reductasa. Una explicación alternativa sería que la mutación afectase al gen de una proteína reguladora, de modo que ésta se comportase reconociendo los promotores de los diferentes genes de las proteínas del sistema asimilador del nitrato con distinta afinidad. De hecho, similarmente, algunas mutaciones en el gen areA ("amonium repression") de Aspergillus nidulans generan mutantes con fenotipos

complejos que recuerdan al de FM16 (Marzluff, 1981; Wiame, 1985). Se cree que el locus areA contiene la información para una proteína que actúa como un elemento de control positivo en la síntesis de varios enzimas relacionados con el metabolismo del nitrógeno en Aspergillus (Marzluff, 1981; Wiame, 1985). Ya se discutió anteriormente que, aunque en la obtención de los mutantes objeto de este trabajo se empleó el transposón Tn901 como agente mutagénico, no puede descartarse a priori el que algunas de las estirpes mutantes seleccionadas se hubiesen originado por mutación espontánea. Las dos alternativas propuestas para explicar el comportamiento de la estirpe mutante FM16 resultan mucho más plausibles, de hecho, si la mutación que afecta a esta estirpe tuviese carácter puntual, no siendo consecuencia de la inserción de un transposón.

Como se comentó anteriormente, los dieciséis mutantes aislados carentes de actividad nitrato reductasa pertenecen a tipos previamente descritos (Kuhlemeier et al, 1984a, 1984b), por lo que no han sido objeto de caracterización exhaustiva en este estudio. Resulta, no obstante, de interés comentar algunos aspectos en relación a ellos. El hecho de que mutaciones en tres genes aparentemente distintos originen fenotipos tan similares se puede entender si se tiene en cuenta que en otros organismos se ha descrito un buen número de genes implicados en la producción de la

molécula activa de nitrato reductasa. Así, además del gen estructural, existen genes implicados en la fabricación del cofactor de molibdeno que está presente en las nitrato reductasas conocidas (Cove, 1978; Fernández y Matagne, 1984; Marzluff, 1981). Aunque los ejemplos citados corresponden a nitrato reductasas eucarióticas, diferentes y más complejas que la de A. nidulans, los resultados que aquí se presentan y los de Kuhlemeier et al. (1984a, b) indican que la fabricación de la enzima activa de este microorganismo es también un proceso que reviste cierta complejidad, en el que participarían productos de al menos tres diferentes genes.

Además de posibilitar los estudios genéticos del sistema afectado, el disponer de estirpes mutantes permite profundizar en el conocimiento de la operatividad del sistema en cuestión, puesto que algunos mutantes se prestan a desarrollar con ellos estudios que no pueden ser llevados a cabo con la estirpe silvestre. En este sentido, una buena parte del trabajo ha consistido en la utilización de algunas de las estirpes mutantes obtenidas para el estudio de ciertos aspectos del proceso de asimilación de nitrato en A. nidulans.

La estirpe mutante que ha resultado de mayor utilidad en este cometido ha sido FM2. Carente de la actividad nitrito reductasa, esta estirpe es capaz de consumir nitrato y reducirlo sólo hasta nitrito, siendo

el nitrito así producido excretado al medio con una estequiometría de un mol de nitrito producido por mol de nitrato consumido. Esta propiedad se ha utilizado, de hecho, para desarrollar un método analítico de determinación de nitrato en medios complejos (apartado 3.4.1.). Aunque se han descrito numerosos métodos químicos para la determinación de nitrato, la mayoría de ellos no son muy satisfactorios, puesto que se hallan sujetos a interferencias o son difíciles de utilizar (Barker y Volk, 1964; Cawse, 1967; Szekely, 1967; Thayer y Huffaker, 1980; Varner et al., 1953). De hecho se han propuesto como alternativa diversos métodos biológicos basados en la reducción enzimática del nitrato a nitrito, seguida de la posterior determinación del nitrito producido (Flores, 1977; Hamano et al., 1983; Relimpio et al., 1971). Este tipo de métodos presenta las ventajas de alta sensibilidad y escasez de interferencias propias de la determinación de nitrito, así como la de alta especificidad y eficiencia en la reducción de nitrato, típicas de las reacciones enzimáticas, superiores a las de los métodos químicos que incluyen esa reacción entre sus pasos (Morris y Riley, 1963). El método desarrollado permite estimar con precisión, en un volumen de reacción de 1 ml, cantidades de nitrato tan bajas como 1 nmol y posee la ventaja sobre otros métodos biológicos basados en la reducción enzimática del nitrato de no requerir la purificación de proteína alguna como paso previo a su utilización.

Por otra parte, la disponibilidad de un sistema como el de FM2, en el que el consumo de nitrato pueda determinarse a partir del nitrito producido, ha permitido llevar a cabo estimaciones del consumo de nitrato por A. nidulans en presencia de elevadas concentraciones del ión (apartado 3.4.2.), irrealizables con la estirpe silvestre en la que el consumo de nitrato ha de estimarse a través de su desaparición del medio. La relación entre velocidad de consumo de nitrato y concentración del ión corresponde a una cinética bifásica, que denota la participación en el consumo de nitrato de dos componentes con distinta afinidad por el sustrato. La  $K_m$  del componente de alta afinidad se encuentra en el orden micromolar, siendo pues similar a la previamente descrita para el consumo de nitrato por A. nidulans, que se ha propuesto corresponde a la de un sistema de transporte activo con alta afinidad por el nitrato (Flores et al., 1983; Tischner y Schmidt, 1984). El componente de baja afinidad muestra una  $K_m$  en el orden milimolar, siendo esta la primera vez que se pone de manifiesto en A. nidulans. Este componente cinético de baja afinidad podría ser consecuencia de una entrada pasiva del ión, correspondiendo la  $K_m$  para él determinada a la de la propia nitrato reductasa (apartado 3.2.1.2.). El efecto negativo que sobre el consumo de nitrato a alta concentración de sustrato ejercen compuestos como amonio y DCCD -inhibidores del transporte activo de nitrato en A. nidulans sin afectar notablemente la actividad de la nitrato reductasa

(Flores et al., 1980; 1983a; Romero, 1986)- no apoyan, sin embargo, esta hipótesis. De hecho, los resultados indican más bien que ambos componentes corresponden a sistemas activos sujetos a regulación por amonio. La existencia de cinéticas bifásicas en el consumo de nitrato no es exclusiva de A. nidulans, habiéndose descrito descrito para diversos organismos, tales como plantas superiores (Wray, 1986), algas (Fuggi et al., 1984; Serra et al., 1978; Zevenboom y Mur, 1979) y bacterias (Thayer y Huffaker, 1982). En general, ese tipo de cinética se ha considerado indicativo de la existencia de dos sistemas para la entrada del ión a la célula. Para algunos de los casos citados se han encontrado condiciones en las que opera sólo uno de los sistemas (Fuggi et al., 1984; Serra et al., 1978).


Se ha utilizado también la estirpe FM2 para estudiar cómo la interrupción de la ruta de reducción del nitrato a amonio afecta a la dependencia que presenta el consumo de nitrato por fijación de  $\text{CO}_2$  (apartado 3.4.3.). Como se ha comentado en la Introducción, en nuestro laboratorio se ha propuesto un modelo de regulación de la utilización de nitrato para explicar los fundamentos de la citada dependencia (apartado 1.2.1., Flores et al., 1983c; Guerrero y Lara, 1987; Romero et al., 1985). Estas experiencias con FM2 trataban, en parte, de verificar si el comportamiento de esta estirpe mutante con respecto a la fijación de  $\text{CO}_2$  se ajustaba a dicho modelo. El requerimiento por  $\text{CO}_2$  en

el modelo propuesto se basa en la necesidad de eliminar metabolitos orgánicos nitrogenados derivados de la asimilación de amonio. Ya que FM2 no puede generar amonio a partir del nitrato que consume, sería esperable que en dicha estirpe la dependencia por  $\text{CO}_2$  para el consumo de nitrato desapareciese o disminuyese. De hecho, este último es el caso, ya que la dependencia por  $\text{CO}_2$  en esta estirpe se halla sensiblemente relajada con respecto a la silvestre. El hecho de que, aunque disminuída, la dependencia siga existiendo puede adscribirse a que, aunque incapaz de generar amonio a partir de nitrato, en este organismo siguen existiendo otras vías de generación intracelular de amonio, tales como la degradación de proteínas o la fotorrespiración. En cianobacterias el amonio de generación interna se recicla a través de la glutamina sintetasa, pudiendo suponer una fracción no despreciable (hasta un 10% en A. nidulans) del amonio que continuamente se asimila por dicha ruta (Bergman, 1984; Boussiba et al., 1984).

Por último, se ha empleado la estirpe FM2, en conjunción con la estirpe FM10 (carente de actividad nitrato reductasa), en el estudio de la interrelación de los consumos de nitrato y de nitrito en A. nidulans R2 (apartado 3.4.4.). Como se comentó en la Introducción, en base a estudios de competencia entre nitrato y nitrito para su utilización por células de A. nidulans, tanto normales como deficientes en actividad nitrato reductasa por tratamiento con volframio se había

propuesto la existencia de elementos comunes al transporte de nitrato y de nitrito en A. nidulans (Flores, 1982). La disponibilidad de estirpes mutantes carentes de la capacidad de reducir nitrato o nitrito ha permitido llevar a cabo estudios de competencia entre nitrato y nitrito para su utilización por células en las que se excluye la posibilidad de que la citada competencia tenga lugar a nivel de reducción. Así, se ha visto que el nitrito, a concentraciones que no interfieren con otros procesos tales como la fijación de  $\text{CO}_2$ , inhibe el consumo de nitrato en la estirpe mutante FM2, incapaz de reducir y, por tanto, consumir nitrito. Recíprocamente, el nitrato inhibe el consumo de nitrito en una estirpe incapaz de reducir nitrato. En este último caso, la inhibición por nitrato no parece deberse a efectos sobre la nitrito reductasa, correspondiendo su cinética a la de una inhibición competitiva. Puesto que en ninguno de los casos la inhibición puede deberse a la competencias por poder reductor para la reducción asimilatoria del compuesto inhibidor, los resultados obtenidos de nuevo son altamente indicativos de que la inhibición se ejerce a nivel de la entrada del correspondiente ión en la célula. El que la cinética de la inhibición por nitrato del consumo de nitrito corresponda a la de un modelo competitivo supone un fuerte apoyo a la hipótesis de que los transportes de ambos iones compartan algún elemento común. Estos resultados contrastan con los obtenidos en hongos y bacterias fotosintéticas. En Neurospora, el nitrito se





comporta como inhibidor no competitivo del consumo de nitrato (Schloemer y Garret, 1974a) mientras que el nitrato no afecta al consumo de nitrito (Schloemer y Garret, 1974b). En Rhodospseudomonas el nitrato interfiere con el consumo de nitrito, habiéndose propuesto la existencia de mecanismos distintos para el consumo de ambos iones sobre la base del diferente comportamiento observado para dichos procesos (Caballero et al., 1986). Por otra parte, para el alga verde Chlamydomonas se ha descrito que la cinética de la inhibición que el nitrato ejerce sobre el consumo de nitrito se ajusta a un modelo parcialmente competitivo (Córdoba et al., 1986), mientras que en las diatomeas Phaeodactylum y Ditylimum el nitrato parece inhibir competitivamente el consumo de nitrito (Bilbao et al., 1981; Eppley y Coastsworth, 1968), habiéndose propuesto para Phaeodactylum que el consumo de ambos iones podría tener lugar mediante el mismo mecanismo (Cresswell y Syrett, 1982). Así pues, parecen existir similitudes entre los sistemas de entrada de nitrato y nitrito no sólo en cianobacterias sino también en otros microorganismos fotosintéticos como algas verdes y diatomeas.

Las estirpes mutantes descritas en este trabajo han resultado, pues, útiles herramientas en el estudio de diversos aspectos de la asimilación del nitrato en cianobacterias.

## 5. CONCLUSIONES

1. Se han aislado 18 estirpes mutantes de Anacystis nidulans R2 incapaces de utilizar nitrato como fuente de nitrógeno, habiéndose establecido que las diferentes mutaciones afectan a cinco genes distintos.
2. Las mutaciones responsables de los fenotipos de las estirpes FM2 y FM16 afectan a sendos genes que no se habían descrito previamente. Ambas mutaciones, además de causar la pérdida de la actividad nitrito reductasa en el caso de FM2, y la disminución de los niveles de las actividades de reducción y consumo de nitrato en FM16, provocan la expresión constitutiva de actividad nitrato reductasa.
3. Se ha puesto a punto un método para la determinación de nitrato, que emplea la estirpe FM2 para llevar a cabo la reducción estequiométrica de nitrato a nitrito.
4. En el consumo de nitrato por Anacystis nidulans R2 participan dos elementos, distinguibles cinéticamente en la estirpe FM2, que muestran distinta afinidad por el nitrato. Ambos componentes muestran requerimiento energético para su actividad y se inhiben por amonio.
5. La incapacidad de la estirpe mutante FM2 para generar amonio a partir de nitrato, resultante de su carencia de actividad nitrito reductasa, se traduce en una atenuación del efecto positivo del anhídrido carbónico sobre el consumo de nitrato.

6. En mutantes de Anacystis nidulans R2 carentes de actividad nitrato reductasa, el nitrato inhibe competitivamente el consumo de nitrito, actuando a su vez el nitrito como inhibidor del consumo de nitrato en mutantes carentes de actividad nitrito reductasa. Esta inhibición recíproca parece tener lugar a nivel de transporte del sustrato al interior celular, indicando que el mismo sistema sea responsable de la entrada en la célula de ambos iones nitrogenados.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Abeliovich A. y Shilo M. 1972. Photooxidative death in the blue-green algae. *J. Bacteriol.* 111: 682-689.
- Allen M.M. 1968. Simple conditions for the growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Phycol.* 4: 1-4.
- Allen M.M. y Smith A.S. 1969. Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.* 69: 114-120.
- Arnon D.I., McSwain B.D., Tsujimoto H.Y. y Keishiro W. 1974. Photochemical activity and components of membrane preparations from the blue-green algae I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin. *Biochim. Biophys. Acta.* 357: 231-245.
- Arst H.N. Jr., Rand K.N. y Bailey C.R. 1979. Do the tightly linked structural genes for nitrate reductase in Aspergillus nidulans form an operon?. Evidence for insertional translocation which separates them. *Mol. Gen. Genet.* 174: 89-100.
- Astier C. y Espardelier S. 1976. Mise en evidence d'un systeme de trasfert genetique chez une cyanophycee de genre Aphanocapsa. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 282: 795-797.
- Bagchi S.N. y Singh H.N. 1984. Genetic control of nitrate reduction in the cyanobacterium Nostoc muscorum. *Mol. Gen. Genet.* 193: 82-84.
- Barker A.V. y Volk R.J. 1964. Determination of ammonium amide amido and nitrate nitrogen in plants by a modified Kjeldahl method. *Anal. Chem.* 36: 439-441.
- Beckman. 1982. *Liquid Scintillation Systems: LS5800 series*, pp. 5.1-5.15.
- Bergman B. 1984. Photorespiratory ammonium release by the cyanobacterium Anabaena cylindrica in the presence of methionine sulfoximine. *Arch. Microbiol.* 137: 21-25.
- Bergmeyer H.U. 1974. *Methoden der Enzymatischen Analyse*, 2<sup>a</sup> ed. Verlag Chemie, Weinheim.
- Betlach M.R., Tiedje J.M. y Firestone R.B. 1981. Assimilatory nitrate uptake in Pseudomonas fluorescens studied using nitrogen-13. *Arch. Microbiol.* 129: 135-140.
- Bilbao M.M., Gabas J.M. y Serra J.L. 1981. Inhibition of nitrite uptake in the diatom Phaeodactylum tricorutum by nitrate, ammonium ions and some L-amino acids. *Biochem. Soc. Transactions.* 9:776-477.

- Birkett J.A. y Rowlands R.T. 1981. Chlorate resistance and nitrate assimilation in industrial strains of Penicillium chrisogenum. J. Gen. Microbiol. 123: 281-285.
- Birnboim H.C. y Doly J.A. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523.
- Borrias W.E., De Vrieze G. y Van Arkel G.A. 1985. In search of the recA gene of the cyanobacterium Anacystis nidulans R2. V International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes, Grindelwald. Abstracts, p. 329.
- Boussiba S., Liu X-Q. y Gibson J. 1984. Endogenous ammonia production by Anacystis nidulans R2 induced by methionine sulfoximine. Arch. Microbiol. 138: 217-219.
- Brownlee A.G. y Arst H.N Jr. 1983. Nitrate uptake in Aspergillus nidulans and involvement of the third gene of the nitrate assimilation gene cluster. J. Bacteriol. 155: 1138-1146.
- Caballero J.C., Moreno-Vivián C., Castillo F. y Cárdenas J. 1986. Nitrite uptake system in photosynthetic bacterium Rhodospseudomonas capsulata ElF1. Biochim. Biophys. Acta. 964: 16-23.
- Candau P. 1979. Purificación y propiedades de la ferredoxina-nitrato reductasa de la cianobacteria Anacystis nidulans. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- Candau P., Manzano C. y Losada M. 1976. Bioconversion of light energy into chemical energy through reduction with water of nitrate to ammonia. Nature. 262: 715-717.
- Cangelosi G.A., Joseph C.M., Rosen J.J. y Meeks J.C. 1986. Cloning and expression of a Nostoc sp. leucine biosynthetic gene in Escherichia coli. Arch. Microbiol. 145: 315-321.
- Cawse P.A. 1967. The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrophotometry. Analyst. 92: 311-315.
- Chauvat F., De Vries L., Van der Ende A. y Van Arkel G.A. 1986. A host vector system for gene cloning in the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803. Mol. Gen. Genet. 204: 185-191
- Córdoba A., Cárdenas J. y Fernández E. 1986. Kinetic evaluation of nitrite uptake and reduction by Chlamydomonas reinhardtii. Plant. Physiol. 82:904-908.

- Cove D.J. 1978. Molecular genetics of nitrate and nitrite reductases. En: "Recent aspects of nitrogen metabolism in plants", ed. por Hewitt E.J. y Cutting C.U., pp. 289-297. Academic Press, London.
- Cove D.J. 1979. Genetics studies of nitrate assimilation in Aspergillus nidulans. Biol. Rev. 54: 291-327.
- Cove D.J. y Pateman J.A. 1969. Autorregulation of the synthesis of nitrate reductase in Aspergillus nidulans. J. Bacteriol. 97: 1374-13378.
- Cresswell R.C. y Syrett P.J. 1979. Ammonium inhibition of nitrate uptake by the diatom Phaeodactylum tricorutum. Plant. Sci. Lett. 14: 321-325.
- Cresswell R.C. y Syrett P.J. 1982. The uptake of nitrate by the diatom Phaeodactylum: interactions between nitrite and nitrate. J. Exp. Bot. 33: 1111-1121.
- Curtis S.E. y Haselkorn R. 1983. Isolation and sequence of the gene for the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from the cyanobacterium Anabaena 7120. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 80: 1835-1839.
- Davis R.W., Botstein D. y Roth J.R. 1980. "Advanced bacterial genetics". Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Deville C.I. y Houghton J.A. 1977. A study of genetic transformation in Gloeocapsa alpicola. J. Gen. Microbiol. 98: 277-280.
- Doddema H. y Telkamp G.P. 1979. Uptake of nitrate by mutants of Arabidopsis thaliana disturbed in uptake or reduction of nitrate. Physiol. Plant. 45: 332-338.
- Eppley R.W. y Coastworth J.L. 1968. Uptake of nitrate and nitrite by Ditylum brightwellii. Kinetics and mechanisms. J. Phycol. 4: 151-156.
- Eppley R.W. y Rogers J.N. 1970. Inorganic nitrogen assimilation of Ditylum brightwellii, a marine diatom. J. Phycol. 6: 344-351.
- Fernández E. y Cárdenas J. 1982. Regulation of the nitrate-reducing system enzymes in wild-type and mutant strains of Chlamydomonas reinhardtii. Mol. Gen. Genet. 186: 164-169.
- Fernández E. y Matagne R.F. 1984. Genetic analysis of nitrate reductase-deficient mutants in Chlamydomonas reinhardtii. Curr. Genet. 8: 635-640.



Fisher R., Tuly R. y Haselkorn R. 1981. A cloned cyanobacterial gene for glutamine synthetase functions in Escherichia coli, but the enzyme is not adenylated. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 78: 3393-3397.

Florencio F.J., Marqués S. y Candau P. 1984. Determinación mediante HPLC de las actividades glutamina sintetasa y glutamato sintasa en la cianobacteria unicelular Anacystis nidulans. XI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica, Tenerife. Resúmenes, 1.18.

Florencio F.J., Marqués S. y Candau P. 1987. Regulation by ammonia of glutamine synthetase from unicellular cyanobacteria. En: "Inorganic nitrogen metabolism", ed. por Ulrich W.R., Aparicio P.J., Syrett P.J. y Castillo F., pp. 144-147. Springer Verlag, Berlin.

Florencio F.J. y Vega J.M. 1982. Regulation of the assimilation of nitrate in Chlamydomonas reinhardtii. Phytochem. 21: 1195-1200.

Flores E. 1977. Método enzimático de determinación de nitrato con la nitrato reductasa de Anacystis nidulans. Estudios fisiológicos de la asimilación de nitrato por esta alga verde-azulada. Tesis de Licenciatura, Universidad de Sevilla.

Flores, E. 1982. Utilización de nitrato por la cianobacteria Anacystis nidulans. Mecanismo y regulación. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.

Flores E., Guerrero M.G. y Losada M. 1980. Short-term ammonium-inhibition of nitrate utilization by Anacystis nidulans and other cyanobacteria. Arch. Microbiol. 128: 134-144.

Flores E., Guerrero M.G. y Losada M. 1983a. Photosynthetic nature of nitrate uptake and reduction in the cyanobacterium Anacystis nidulans. Biochim. Biophys. Acta. 722: 408-416.

Flores E., Herrero A. y Guerrero M.G. 1987. Nitrite uptake and its regulation in the cyanobacterium Anacystis nidulans. Biochim. Biophys. Acta. 896: 103-108.

Flores E., Ramos J.L., Herrero A. y Guerrero M.G. 1983b. Nitrate assimilation by cyanobacteria. En: "Photosynthetic prokaryotes: cell differentiation and function", ed. por Papageorgiou G.C. y Packer L., pp. 363-387. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.

Flores E., Romero J.M., Guerrero M.G. y Losada M. 1983c. Regulatory interaction of photosynthetic nitrate assimilation and carbon dioxide fixation in the cyanobacterium Anacystis nidulans. Biochim. Biophys. Acta. 725: 529-532.

Flores E. y Wolk C.P. 1985. Identification of facultatively heterotrophic, N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria able to receive plasmid vectors from Escherichia coli by conjugation. J. Bacteriol. 162: 1339-1341.

Fuggi A., Vona V., Di Martino Rigano V., Di Martino C. Martello A. y Rigano C. 1984. Evidence for two transport systems for nitrate uptake in the acidophilic thermophilic alga Cyanidium caldarium. Arch. Microbiol. 137: 281-285.

Geoghegan C.M. y Houghton J.A. 1987. Molecular cloning and isolation of a cyanobacterial gene which increases the UV and methyl methane-sulphonate survival of recA strains of E. coli K12. J. Gen. Microbiol. 133: 119-126.

Golden S.S., Brusslan J. y Haselkorn R. 1986. Expression of a family of psbA genes encoding a photosystem II polypeptide in the cyanobacterium Anacystis nidulans R2. EMBO. J. 22789-2798.

Goldsmith J., Livoni J.P., Norberg C.L. y Segel I.H. 1973. Regulation of nitrate uptake in Penicillium chrysogenum by ammonium ion. Plant. Physiol. 52: 362-367.

Gotto J.W., Tabita F.R. y Van Baalen C. 1979. Mutants of Anabaena strain CA altered in their ability to grow under nitrogen fixing conditions. J. Bacteriol. 140: 327-332.

Grigorieva G. y Shestakov S. 1976. Application of the genetic transformation method for taxonomic analysis of unicellular blue-green algae. En: Proc. 2nd Int. Photosynthetic Prokariotes, ed. por Codd G.A. y Stewart W.D.P., pp. 220-222. University of Dundee, Dundee.

Grigorieva G. y Shestakov S. 1982. Transformation in the cyanobacterium Synechocystis sp. 6803. FEMS. Microbiol. Lett. 13: 367-370.

Grindley D.F. y Reed R.R. 1985. Transpositional recombination in prokariotes. Ann. Rev. Biochem. 54: 863-896.

Grove G. y Marzluf G.A. 1981. Identification of the product of the major regulatory gene of the nitrogen control circuit of Neurospora crassa as a nuclear DNA-binding protein. J. Biol. Chem. 256: 463-470.

- Guerrero M.G. 1985. Assimilatory nitrate reduction. En: "Techniques in bioproductivity and photosynthesis", ed. por Coomb J., Hall D.O., Long S.P. y Scurlock J.M.O., pp. 165-172. Pergamon Press, Oxford.
- Guerrero M.G. y Lara C. 1987. Assimilation of inorganic nitrogen. En: "The Cyanobacteria", ed. por Fay P. y Van Baalen C., pp. 163-186. Elsevier, Amsterdam.
- Guerrero M.G., Manzano C. y Losada M. 1974. Nitrate photoreduction by a cell-free preparation of Anacystis nidulans. Plant. Sci. Lett. 3: 273-278.
- Guerrero M.G., Vega J.M. y Losada M. 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. Ann. Rev. Plant. Physiol. 32: 169-204.
- Hamano T., Mitsuhashi Y., Tanaka K., Matsuki Y., Oji Y. y Okamoto S. 1983. Application of nitrate reductase for the determination of nitrate in meat and fishery products. Agric. Biol. Chem. 47: 2427-2433.
- Hattori A. 1962. Adaptive formation of nitrate reducing system in Anabaena cylindrica. Plant Cell Physiol. 3: 371-377.
- Hattori A. y Myers J. 1967. Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of Anabaena cylindrica. II. Reduction of nitrate to nitrite. Plant Cell Physiol. 8: 327-337.
- Herdman M. 1982. Evolution and properties of the genome. En: "The biology of cyanobacteria", ed. por Carr N.G. y Whitton B.A., pp. 261-305. Blackwell, Oxford.
- Herdman M. y Carr N.G. 1971. Recombination in Anacystis nidulans mediated by an extracellular DNA/RNA complex. J. Gen. Microbiol. 68: XIV.
- Herdman M. y Carr N.G. 1972. The isolation and characterization of mutant strains of the blue-green alga Anacystis nidulans. J. Gen. Microbiol. 70: 213-220.
- Herdman M., Delaney S.F. y Carr N.G. 1980. Mutation of the cyanobacterium Anacystis nidulans (Synechococcus PCC 6301): improved conditions for the isolation of auxotrophs. Arch. Microbiol. 124: 177-184.
- Herrero A. 1983. Regulación de los niveles celulares de los enzimas del sistema de reducción del nitrato en cianobacterias. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- Herrero A., Flores E. y Guerrero M.G. 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., Flores E. y Guerrero M.G. 1984. Regulation of the nitrate reductase level in Anacystis nidulans: activity decay under nitrogen stress. Arch. Biochem. Biophys. 454-459.
- Herrero A. Flores E. y Guerrero M.G. 1985. Regulation of nitrate reductase cellular levels in the cyanobacteria Anabaena variabilis and Synechocystis sp. FEMS Microbiol. Lett. 26: 21-25.
- Herrero A. y Guerrero M.G. 1986. Regulation of nitrite reductase in the cyanobacterium Anacystis nidulans. J. Gen. Microbiol. 132: 2463-2468.
- Ida S. y Mikami B. 1983. Purification and characterization of assimilatory nitrate reductase from the cyanobacterium Plectonema boryanum. Plant Cell Physiol. 24: 649-658.
- Kelly B. L. y Sunshine M.G. 1967. Association of temperate phage P2 with the production of histidine negative segregants by Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28: 237-243.
- Kleckner N. 1981. Transposable elements in prokariotes. Ann. Rev. Genet. 15: 341-404.
- Kleinhofs A., Warner R.L. y Narayanan K.R. 1985. Current progress towards an understanding of the genetics and molecular biology of nitrate reductase in higher plants. Oxford Surv. Plant Mol. & Cell Biol. 2: 91-121.
- Kuhlemeier C.J., Logtenberg T., Stoorvogel W., Van Heugten H.A.A., Borrias W.E. y Van Arkel G.A. 1984a. Cloning of nitrate reductase genes from the cyanobacterium Anacystis nidulans. J. Bacteriol. 159: 36-41.
- Kuhlemeier C.J., Teeuwssen V.J.P., Janssen M.J.T. y Van Arkel G.A. 1984b. Cloning of a third nitrate reductase gene from the cyanobacterium Anacystis nidulans R2 using a shuttle gene library. Gene. 31: 109-116.
- Kuhlemeier C.J., Thomas A.A.M., Van der Ende A., Van Leen R.W., Borrias W.E., Van den Hondel C.A.M.J.J. y Van Arkel G.A. 1983. A host-vector system for the gene cloning in the cyanobacterium Anacystis nidulans R2. Plasmid. 10: 156-163.
- Lara C. y Romero J.M. 1986. Distinctive light and CO<sub>2</sub> fixation requirements of nitrate and ammonium utilization by the cyanobacterium Anacystis nidulans. Plant Physiol. 81: 686-688.



Lara C., Romero J.M., Flores E., Guerrero M.G. y Losada M. 1984. Regulation of nitrate utilization by CO<sub>2</sub> fixation products in the cyanobacterium Anacystis nidulans. En: "Advances in photosynthesis research", vol II, ed. por Sybesma C, pp. 715-718. Martinus Nijhoff/Dr. Junk, The Hague.

Lara C., Romero J.M. y Guerrero M.G. 1987. Regulated nitrate transport in the cyanobacterium Anacystis nidulans. J. Bacteriol. 169: 4376-4378.

Lau R.H. y Doolittle W.F. 1979. Covalently closed circular DNAs in closely related unicellular cyanobacteria. J. Bacteriol. 137: 200-202.

Lau R.H., Sapienza C. y Doolittle W.F. 1980. Cyanobacterial plasmids: their widespread occurrence and the existence of homology between plasmids in the same and different species. Mol. Gen. Genet. 178: 203-211.

Losada M., Guerrero M.G. y Vega J.M. 1981. The assimilatory reduction of nitrate. En: "Biology of inorganic nitrogen and sulfur", ed. por Bothe H. y Trebst A., pp. 30-63. Springer-Verlag, Berlin.

Mackinney G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem. 140: 315-322.

Madueño F., Borrias W.E., Van Arkel G.A. y Guerrero M.G. 1987b. Isolation and characterization of Anacystis nidulans R2 mutants affected in nitrate assimilation: establishment of two new types. Enviado para su publicación a Mol. Gen. Genet.

Madueño F., Flores E. y Guerrero M.G. 1987a. Competition between nitrate and nitrite uptake in the cyanobacterium Anacystis nidulans. Biochim. Biophys. Acta. 896: 109-112.

Madueño F. y Guerrero M.G. 1984. Aislamiento y caracterización de mutantes de la cianobacteria Anacystis nidulans R2 afectados en la utilización de nitrato. XI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica, Tenerife. Resúmenes, 5.15.

Madueño F. y Guerrero M.G. 1985a. Utilización de nitrato y nitrito por estirpes mutantes de la cianobacteria Anacystis nidulans R2. Competencia entre ambos iones nitrogenados. XII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica, Valencia. Resúmenes, 336.

Madueño F. y Guerrero M.G. 1985b. Efecto de la asimilación de CO<sub>2</sub> sobre la utilización de nitrato en una estirpe mutante de la cianobacteria Anacystis nidulans R2 carente de la actividad nitrito reductasa. XII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica, Valencia. Resúmenes, 337.

Madueño F. y Guerrero M.G. 1986. Characterization of mutant strains of the cyanobacterium Anacystis nidulans R2 affected in nitrate assimilation. Advanced Course on Inorganic Nitrogen Metabolism, Jarandilla de la Vera. Resúmenes, M.10.

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

Manzano C. 1977. La reducción fotosintética del nitrato en el alga verde-azulada Anacystis nidulans. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.

Manzano C., Candau P., Gómez-Moreno C., Relimpio A.M. y Losada M. 1976. Ferredoxin-dependent photosynthetic reduction of nitrate and nitrite by particles of Anacystis nidulans. Mol. Cell. Biochem. 10: 161-169.

Manzano C., Candau P. y Guerrero M.G. 1978. Affinity chromatography of Anacystis nidulans ferredoxin-nitrate reductase and NADP reductase on reduced ferredoxin-sepharose. Anal. Biochem. 90: 408-412.

Markwell, M.A.K., Haas S.M., Bieber L.L. y Tolbert N.E. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal. Biochem. 87: 206-210.

Martin F., Suzuki A. y Hirel B. 1982. A new high-performance liquid chromatography assay for glutamine synthetase and glutamate synthase in plant tissues. Anal. Biochem. 125: 24-29.

Marzluff G.A. 1981. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. Microbiol. Rev. 45: 437-461.

Méndez J.M., Herrero A. y Vega J.M. 1981. Characterization and catalytic properties of nitrite reductase from Anabaena sp. 7119. Z. Pflanzenphysiol. 103: 305-315.

Méndez J.M. y Vega J.M. 1981. Purification and molecular properties of nitrite reductase from Anabaena sp. 7119. Physiol. Plant. 52: 7-14.

Mikami B. e Ida S. 1984. Purification and properties of ferredoxin-nitrate reductase from the cyanobacterium Plectonema boryanum. Biochim. Biophys. Acta. 971: 294-304.

Miller J.H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

- Morris A.W. y Riley J.P. 1963. The determination of nitrate in sea-water. *Anal. Chim. Acta.* 29: 272-279.
- Murphy R.D., Bryant D.A., Porter R.D. y Tandeau de Marsac N. 1987. Molecular cloning and characterization of the recA gene from the cyanobacterium Synechococcus sp. strain PCC 7002. *J. Bacteriol.* 169: 2739-2747.
- Ohmori M. y Hattori A. 1970. Effect on nitrate on nitrogen fixation by the blue-green alga Anabaena cylindrica. *Plant Cell Physiol.* 13: 589-599.
- Ohmori M., Ohmori K. y Strotmann H. 1977. Inhibition of nitrate uptake by ammonium in a blue-green alga, Anabaena cylindrica. *Arch. Microbiol.* 144: 225-229.
- Oostindiër-Braaksma F.J. y Fenestra W.J. 1973. Isolation and characterization of chlorate-resistant mutants of Arabidopsis thaliana. *Mut. Res.* 19: 175-185.
- Ortega T., Castillo F. y Cárdenas J. 1976. Photolysis of water coupled to nitrate reduction by Nostoc muscorum subcellular particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 885-891.
- Owtrim G.W. y Coleman J.R. 1987. Molecular cloning of a recA-like gene from the cyanobacterium Anabaena variabilis. *J. Bacteriol.* 169: 1824-1829.
- Padhy R.N. y Singh P.K. 1978. Genetical studies on the heterocyst and nitrogen fixation of the blue-green alga Nostoc muscorum. *Mol. Gen. Genet.* 162: 203-211.
- Paschinger H. 1977. Induced sodium uptake by Anacystis nidulans. *Arch. Microbiol.* 113: 285-291.
- Peschek G.A. 1979. Anaerobic hydrogenase activity in Anacystis nidulans. H<sub>2</sub>-dependent photoreduction and related reactions. *Biochim. Biophys. Acta.* 548: 187-202.
- Peschek G.A., Czerny T., Schmetterer G. y Nitschmann W.H. 1985. Transmembrane proton electrochemical gradients in dark aerobic and anaerobic cells of the cyanobacterium (blue-green alga) Anacystis nidulans. *Plant Physiol.* 79: 278-284.
- Pilot T.J. y Fox J.L. 1984. Cloning and sequencing of the genes encoding the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of C-phycoyanin from the cyanobacterium Agmenellum quadruplicatum. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 81: 6983-6987.
- Porter R.D. 1986. Transformation in cyanobacteria. *CRC. Crit. Rev. Microbiol.* 13: 111-132.

- Porter R.D., Buzby J.S., Pilon A., Fields P.I., Dubbs J.M. y Stevens S.S. Jr. 1986. Genes from the cyanobacterium Agmenellum quadruplicatum isolated by complementation: characterization and production of merodiplois. *Gene*. 41: 294-260.
- Rai A.K., Kashyap A.P. y Gupta S.L. 1981. ATP dependent uptake of nitrate in Nostoc muscorum and inhibition by ammonium ions. *Biochim. Biophys. Acta*. 674: 78-86.
- Ramos J.L. y Guerrero M.G. 1983. Involvement of ammonium metabolism in the nitrate inhibition of nitrogen fixation in Anabaena sp. strain ATCC 33047. *Arch. Microbiol.* 136: 81-83.
- Ramos J.L., Guerrero M.G. y Losada M. 1982. Photoproduction of ammonia from nitrate by Anacystis nidulans cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 679: 323-330.
- Relimpio A.M., Guerrero, M.G., Paneque A. y Losada M. 1971. Determination of nitrate with nitrate reductase from spinach leaves. *Z. Pflanzenphysiol.* 66.s.: 290-293.
- Revilla E., Llobel A. y Paneque. 1985. The assimilatory nitrate uptake in Azotobacter chroococcum. Induction by nitrate and by cyanate. *J. Plant Physiol.* 118: 165-176.
- Rippka R. y Cohen-Bazire G. 1983. The cyanobacteriales: a legitimate order based on the type strain Cyanobacterium stanieri?. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 134: 21-36.
- Rippka R., Dervelles J., Waterbury J.B., Herdman M. y Stanier R.Y.. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 1-61.
- Romero J.M. 1986. Interrelaciones entre los metabolismos fotosintéticos de carbono y nitrógeno en la cianobacteria Anacystis nidulans. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- Romero J.M., Coronil T., Lara C. y Guerrero M.G. 1987. Modulation of nitrate uptake in Anacystis nidulans by the balance between ammonium asimilation and CO<sub>2</sub> fixation. *Arch. Biochem. Biophys.* 256: 578-584.
- Romero J.M. y Lara C. 1987. Photosynthetic assimilation of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> by intact cells of the cyanobacterium Anacystis nidulans. *Plant Physiol.* 83: 208-212.
- Romero J.M., Lara C. y Guerrero M.G. 1985. Dependence of nitrate utilization upon active CO<sub>2</sub> fixation in Anacystis nidulans: a regulatory aspect of the interactions between photosynthetic carbon and nitrogen metabolism. *Arch. Biochim. Biophys.* 237: 396-401.



- Santero E., Luque F., Medina J.R. y Tortolero M. 1986. Isolation of ntrA-like mutants of Azotobacter vinelandii. J. Bacteriol. 166: 541-544.
- Scazzochio C. 1980. The genetics of molybdenum-containing enzymes. En: "Molybdenum and molybdenum-containing enzymes", ed. por Coughland M., pp. 487-515. Pergamon Press, Oxford, New York.
- Schloemer R.H. y Garrett R.H. 1974a. Nitrate transport system in Neurospora crassa. J. Bacteriol. 118: 259-269.
- Schloemer R.H. y Garrett R.H. 1974b. Uptake of nitrite by Neurospora crassa. J. Bacteriol. 118: 270-274.
- Senn D.R., Carr P.W. y Klatt L.N. 1976. Minimization of sodium dithionite-derived interference in nitrate reductase-methylviologen reactions. Anal. Biochem. 75: 464-471.
- Serra J.L., Llama M. y Cadenas E. 1978. Nitrate utilization by the diatom Skeletonema costatum. Plant Physiol. 62: 987-990.
- Serrano A., Rivas J. y Losada M. 1982. Changes in fluorescence spectra by nitrate and nitrite in a blue-green alga. Photochem. Photobiophys. 4: 257-264.
- Shafer J. Jr., Baker J.E. y Thompson J.F. 1961. A Chlorella mutant lacking nitrate reductase. Amer. J. Bot. 48: 896-899.
- Shestakov S.V. y Khuyen N.T. 1970. Evidence for genetic transformation in blue-green alga Anacystis nidulans. Mol. Gen. Genet. 107: 372-375.
- Sias S.R. e Ingraham J.L. 1979. Isolation and analysis of mutants of Pseudomonas aeruginosa unable to assimilate nitrate. Arch. Microbiol. 122: 263-270.
- Sias S.R., Stouthamer A.H. e Ingraham J.L. 1980. The assimilatory and dissimilatory nitrate reductases of Pseudomonas aeruginosa are encoded by different genes. J. Gen. Microbiol. 118: 229-234.
- Simon R.D. 1978. Survey of extrachromosomal DNA found in filamentous cyanobacteria. J. Bacteriol. 136: 414-418.
- Singh H.N. y Sonie K.C. 1977. Isolation and characterization of chlorate-resistant mutants of the blue-green alga Nostoc muscorum. Mut. Res. 43: 205-212.
- Singh H.N., Sonie K.C. y Singh H.R. 1977. Nitrate regulation of heterocyst differentiation and nitrogen fixation in a chlorate-resistant mutant of the blue-green alga Nostoc muscorum. Mut. Res. 42: 447-452.

- Snell G.J. y Snell C.T. 1949. Colorimetric methods of analysis. Van Nostrand, New York.
- Sosa F.M., Ortega T. y Barea J.L. 1978. Mutants from Chlamydomonas reinhardtii affected in their nitrate assimilation capability. *Plant Sci. Lett.* 11: 51-58.
- Stevens S.E. Jr. y Porter R.D. 1980. Transformation in Agmenellum quadruplicatum. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 77: 6052-6056.
- Stevens S.E. Jr. y Porter R.D. 1986. Heterospecific transformation among cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 167: 1074-1076.
- Stevens S.E. Jr. y Van Baalen C. 1970. Growth characteristics of selected mutants of a coccoid blue-green alga. *Arch. Mikrobiol.* 72: 1-8.
- Stevens S.E. Jr. y Van Baalen C. 1973. Characteristics of nitrate reduction in a mutant of the blue-green alga Agmenellum quadruplicatum. *Plant Physiol.* 51: 350-356.
- Stevens S.E. Jr. y Van Baalen C. 1974. Control of nitrate reductase in a blue-green alga. The effects of inhibitors, blue light, and ammonia. *Arch. Biochim. Biophys.* 161: 146-152.
- Stewart W.D.P. y Singh H.N. 1975. Transfer of nitrogen-fixing (nif) genes in the blue-green alga Nostoc muscorum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62: 62-69.
- Stouthamer A.H. 1967. Nitrate reduction in Aerobacter aerogens. Isolation and properties of mutant strains blocked in nitrate assimilation and resistant against chlorate. *Arch. Mikrobiol.* 56: 68-75.
- Szekely E. 1967. Spectrophotometric determination of nitrate with p-diaminophenylsulphone and diphenylamine-p-diaminodiphenylsulphone. *Talanta.* 14: 941-950.
- Tandeau de Marsac N., Borrias W.E., Kuhlemeier C.J., Castets A.M., Van Arkel G.A. y Van den Hondel C.A.M.J.J. 1982. A new approach for molecular cloning in cyanobacteria: cloning of an Anacystis nidulans met gene using Tn901 induced mutants. *Gene.* 20: 111-119.
- Thayer J.R. y Huffaker R.C. 1980. Determination of nitrate and nitrite by high-pressure liquid chromatography: comparison with other methods for nitrate determination. *Anal. Biochem.* 102: 110-119.

- Thayer J.R. y Huffaker R.C. 1982. Kinetic evaluation, using  $^{13}\text{N}$ , reveals two assimilatory transport systems in Klebsiella pneumoniae. J. Bacteriol. 149: 198-202.
- Tischner R. y Schmidt A. 1984. Light mediated regulation of nitrate assimilation in Synechococcus leopoliensis. Arch. Microbiol. 137: 151-154.
- Tomsett A.B., Dun-Coleman N.S. y Garrett R.H. 1981. The regulation of nitrate assimilation in Neurospora crassa. The isolation and genetic analysis of nmr-1 mutants. Mol. Gen. Genet. 182: 229-233.
- Tomsett A.B. y Garrett R.H. 1981. Biochemical analysis of mutants defective in nitrate assimilation in Neurospora crassa: evidence for autogenous control of nitrate reductase. Mol. Gen. Genet. 184: 183-190.
- Van Baalen C. 1965. Quantitative surface plating of coccoid blue-green algae. J. Phycol. 1: 19-22.
- Van den Hondel C.A.M.J.J., Keegstra W., Borrias W.E. y Van Arkel G.A. 1979. Homology of plasmids in strains of unicellular cyanobacteria. Plasmid. 2: 323-333.
- Van den Hondel C.A.M.J.J., Verbeek S., Van der Ende A., Weisbeek P.J., Borrias W.E. y Van Arkel G.A. 1980. Introduction of transposon Tn901 into a plasmid of Anacystis nidulans: preparation for cloning in cyanobacteria. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 77: 1570-1574.
- Varner J.E., Bulen W.A., Vanecko S. y Burrell R.C. 1953. Determination of ammonium, amide, nitrite and nitrate nitrogen in plant extracts. Anal. Chem. 25: 1528-1529.
- Vega-Palas M., Flores E., Madueño F. y Herrero A. Aislamiento de mutantes de la cianobacteria Synechococcus sp. incapaces de asimilar nitrato: descripción de un nuevo fenotipo. XIV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica, Málaga. Resúmenes.
- Venessland B. y Guerrero M.G. 1979. Reduction of nitrate and nitrite. En: "Encyclopedia of plant physiology, New Series", ed. por Gibbs M. y Latzko E., vol. 6, pp. 425-444. Springer, Berlin.
- Wiame J.M., Grenson M. y Arst H.N. Jr. 1985. Nitrogen catabolite repression in yeast and filamentous fungi. Adv. Microb. Physiol. 26: 1-87.
- Wolk C.P. 1981. The cyanobacteria. En: "The biochemistry of plants", ed. por Stumpf P.K. y Conn E.E., vol. 1, pp. 659-686. Academic Press, New York.

Wolk C.P. y Kraus J. 1982. Two approaches to obtain low, extracellular deoxiribonuclease activity in cultures of heterocyst forming cyanobacteria. Arch. Microbiol. 131: 302-307.

Wolk C.P., Vonshak A., Kehoe P. y Elhai J. 1984. Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from Escherichia coli to nitrogen-fixing cyanobacteria. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 81: 1561-1565.

Wray J.L. 1986. The molecular genetics of higher plant nitrate assimilation. En: "A genetic approach to plant biochemistry", ed. por Blonstein A.D. y King P.J., pp. 101-157. Springer Verlag, Viena.

Zdrou I. y Tromballa H.W. 1981. Active transport of chloride by Anacystis nidulans. Arch. Microbiol. 129: 325-330.

Zevenboom W. y Mur L.R. 1979. Influence of growth rate on short-term and steady-state nitrate uptake by nitrate-limited Oscillatoria agardhii. FEMS Microbiol. Lett. 6: 209-212.

Zhevner V.D. y Shestakov S. 1972. Studies on the ultraviolet-sensitive mutants of blue-green alga Synechocystis aquatilis Sanv. Arch. Microbiol. 86: 349-360.

# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. Francisco Macchero Alfi titulada "Aproximación genético-bioquímica al estudio de la acumulación de nitrato en la cianobacteria Anacystis nidulans R2" acordó otorgarle la calificación de APTO "CUM LAUDE" (UNANIMIDAD)

Sevilla, 6 de Noviembre 1987

El Vocal,



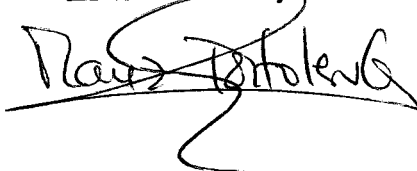
El Presidente



El Vocal,



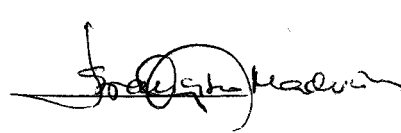
El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672376