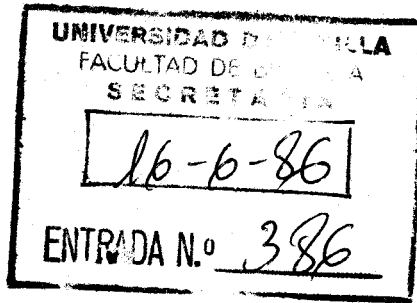


R. 4497



REGULACION DE LA ACTIVIDAD NITROGENASA  
DE *Azotobacter chroococcum*.

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

*Cejudo*

Sevilla, Junio de 1986

DIRECTOR

Dr. Antonio Paneque Guerrero  
Profesor de Investigación  
del C.S.I.C.

PONENTE

Prof. Manuel Losada Villasante  
Catedrático de Bioquímica

TD.124

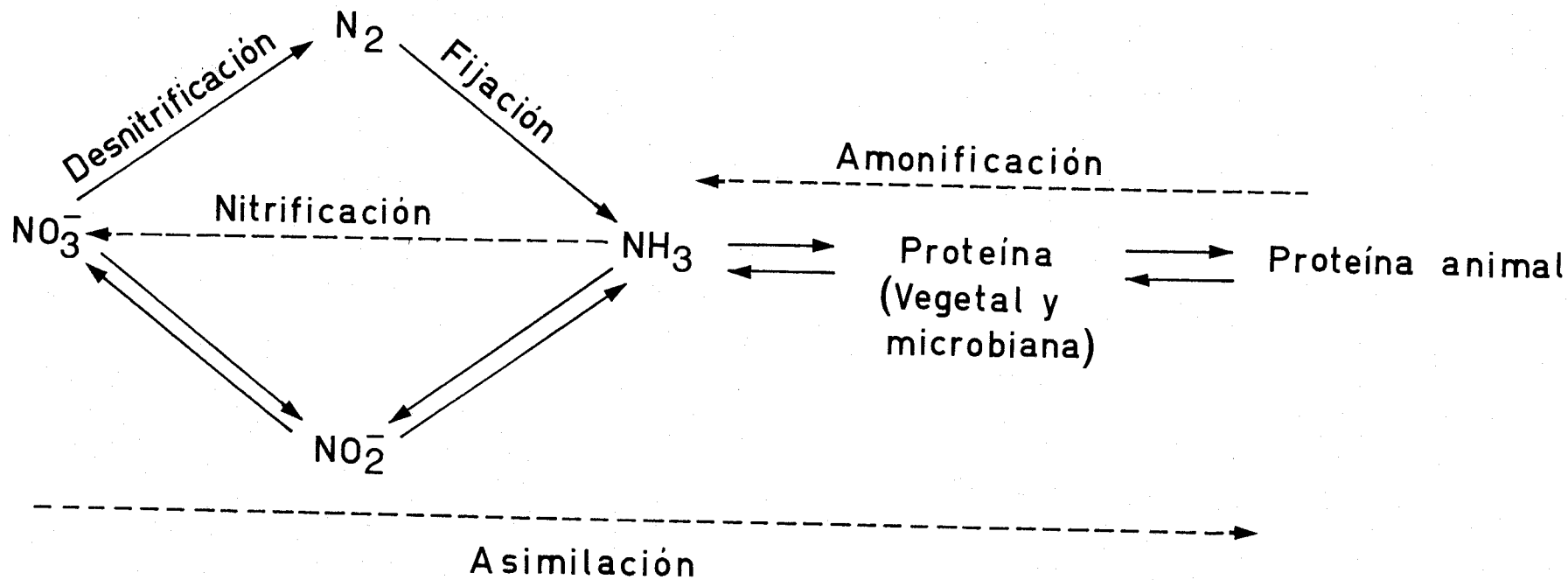
1.- INTRODUCCION.

### 1.1.- EL CICLO DEL NITROGENO.

El nitrógeno es un elemento de enorme importancia como constituyente de la materia viva, en la que forma parte de moléculas tan esenciales como las proteínas y los ácidos nucleicos. Además de ser un constituyente de la materia orgánica, el nitrógeno se encuentra en la naturaleza principalmente en forma de  $N_2$ , nitrato, nitrito y amonio.

Las interconversiones que los seres vivos realizan entre cada uno de estos compuestos, se resumen en el esquema I, en el que se representa el ciclo del nitrógeno.

El nitrógeno constituyente de la materia orgánica, no es accesible a los organismos que participan en el ciclo. Los procesos de putrefacción y descomposición traen como consecuencia la liberación del nitrógeno contenido en la materia orgánica en forma de amonio. A este proceso se le denomina amonificación. La oxidación del amonio hasta nitrato es el proceso de la nitrificación que realizan las bacterias nitrificantes. El nitrato, en condiciones anaeróbicas o microaeróbicas, puede ser reducido a  $N_2$  en un proceso al que se denomina desnitrificación y que es llevado a cabo por las bacterias desnitrificantes. Este proceso implica una pérdida neta de nitrógeno a la atmósfera en forma de  $N_2$ . El proceso de la fijación de nitrógeno, en el que el  $N_2$  es reducido a amonio, es pues de importancia capital para la vida, en cuanto que supone el único proceso mediante el que se puede reciclar y utilizar el  $N_2$  presente en la at



Esquema I. Ciclo del nitrógeno.

mósfera, que una vez reducido a amonio por los organismos fijadores, es asimilado. La otra forma de nitrógeno asimilable es el nitrato. La asimilación de este ión implica su reducción hasta nitrito y amonio y es una capacidad ampliamente distribuida entre los diferentes grupos de organismos, con la excepción de los animales.

En términos generales ( Postgate, 1982a), el ciclo del nitrógeno resulta en la movilización de  $3 \times 10^9$  toneladas de nitrógeno al año, de las cuales,  $2 \times 10^8$  toneladas ( aproximadamente un 10% ) pasa a la atmósfera en forma de  $N_2$  o  $N_2O$  como consecuencia de la desnitrificación, este nitrógeno es incluido de nuevo en el ciclo mediante la fijación de  $N_2$ , que por este motivo, como ya se ha mencionado, resulta un proceso fundamental para la vida en el planeta.

#### 1.2.- LOS ORGANISMOS FIJADORES DE NITROGENO. *Azotobacter*.

La fijación de nitrógeno es un proceso que llevan a cabo exclusivamente organismos procariotas. Hasta el momento, no se ha encontrado que ningún organismo eucariota, ni siquiera entre las levaduras y hongos inferiores, tenga la capacidad de fijar nitrógeno ( Postgate, 1980 ). Yamada y Sakaguchi ( 1980 ), describieron fijación de  $N_2$  por un alga verde, resultado que no ha podido ser reproducido en otros laboratorios ( Postgate, 1982b).

La fijación de nitrógeno ocurre en microorganismos de vida libre, así como en microorganismos que viven en simbiosis con plantas superiores. Además de entre los microorganismos qui-

miotrofos, existen fijadores de nitrógeno entre los organismos fototrofos. En general, dos condiciones son esenciales para permitir la fijación de nitrógeno; de un lado, es necesario un ambiente anaeróbico, ya sea porque el organismo en cuestión vive diazotróficamente en anaerobiosis, o porque sea capaz de proporcionar un ambiente anaeróbico a la nitrogenasa - la enzima que cataliza la reducción del  $N_2$  -, y de otro, la ausencia de fuentes de nitrógeno reducido, principalmente, amonio.

*Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter vinelandii*, las dos especies con las que se ha realizado este trabajo, pertenecen a la familia *Azotobacteraceae* (Thompson y Skerman, 1979). Son bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre que también pueden utilizar nitrato, nitrito o amonio como fuente de nitrógeno.

Una característica fundamental de estas bacterias es que son diazotrofas, es decir, son capaces de utilizar  $N_2$  como única fuente de nitrógeno, y aerobias estrictas, aún cuando, como ya hemos dicho anteriormente, la fijación de nitrógeno es un proceso que se inhibe irreversiblemente por oxígeno. Por lo demás, su cultivo requiere una fuente de carbono asimilable, son, pues, bacterias heterótrofas.

Todas las bacterias de la familia *Azotobacteriaceae* poseen actividad hidrogenasa de consumo (Postgate, 1981). La presencia de esta actividad enzimática en estos microorganismos tiene una gran importancia desde el punto de vista ener-

gético, pues una proporción que oscila entre el 25-60% de la actividad nitrogenasa *in vivo* se emplea en producir  $H_2$  ( Yates *et al.*, 1981 ), que implicaría una pérdida neta de poder reductor. El  $H_2$  puede ser reducido en estas bacterias mediante la hidrogenasa de consumo. De hecho, se ha descrito actividad nitrogenasa dependiente de  $H_2$  como única fuente de energía y poder reductor en *Azotobacter chroococcum* ( Walker y Yates, 1978; Yates y Walker, 1980 ).

En *Azotobacter vinelandii* se ha comprobado que el  $H_2$  puede ceder sus electrones a la cadena respiratoria ( Laane *et al.*, 1979 ). En la oxidación de  $H_2$  por *A. vinelandii* están directamente implicados los citocromos *b*, *c* y *d*. ( Wong y Maier, 1984 ).

Dado que en otras bacterias fijadoras de nitrógeno con hidrogenasa de consumo activa, como *Rhizobium japonicum*, se ha demostrado fijación de  $CO_2$  dependiente de  $H_2$  ( Hanus *et al.*, 1979), se ha intentado obtener crecimiento autotrófico de *Azotobacter*; los resultados han sido negativos. Recientemente se ha descrito ( Wong y Maier, 1985 ), que *A. vinelandii* puede utilizar, para el crecimiento, manosa como fuente de carbono sólo en presencia de  $H_2$ , pero es incapaz de crecer con tan sólo uno de los dos sustratos.

### 1.3.- LA FIJACION DE NITROGENO.

#### 1.3.1.- Orígenes.

Resulta difícil datar con exactitud la aparición de la nitrogenasa en la historia de la vida en la tierra. La capacidad de fijación de nitrógeno está restringida a organismos procariotas, que se consideran los más primitivos, y, más aún, la diazotrofia es muy común entre los organismos quimiotrofos y anaerobios estrictos, que se consideran, a su vez, los más primitivos entre los procariotas. Por otro lado, la nitrogenasa está asociada a otras proteínas que se suponen de aparición temprana, tales como la hidrogenasa o las ferredoxinas.

Los datos geoquímicos indican que, si bien la atmósfera era anaerobia en esta época, el amonio era un compuesto abundante en el ambiente, de modo que los primeros organismos anaerobios tuvieron abundante nitrógeno fijado como para necesitar de la nitrogenasa. Así pues, Postgate ( 1982a ) propone que la utilidad primera de la enzima pudo ser destoxificar el ambiente de sustancias tales como el cianuro o el cianógeno, que, siendo tóxicas para la vida, son sustratos de la nitrogenasa y también constituyentes abundantes en el ambiente de ese periodo.

La otra posibilidad, defendida posteriormente por el propio Postgate, es que la aparición de la nitrogenasa fuese más reciente y ocurriera cuando compuestos como el amonio y



el nitrato empezaron a ser limitantes, situación que debió producirse cuando el oxígeno era ya un constituyente permanente de la atmósfera. Este punto de vista encuentra apoyo en hechos conocidos actualmente, como son que las proteínas de las nitrogenasas de varios microorganismos son intercambiables entre sí, así como por la similitud de secuencias del ADN que las codifica y, por tanto, de sus aminoácidos, hechos que sugieren que son proteínas de reciente aparición.

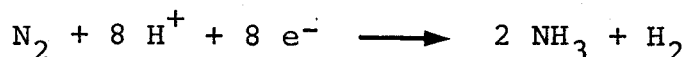
Este aspecto de la fijación de nitrógeno es probablemente el más especulativo. El resto de aspectos relacionados con este proceso, que trataremos a continuación, y que permanecían muy desconocidos hasta los 50, han sido motivo de numerosos trabajos en los últimos años que han permitido una mayor comprensión del citado proceso.

### 1.3.2.- Enzimología de la fijación de nitrógeno.

Como ya se ha mencionado, la enzima que cataliza la reducción de  $N_2$  es la nitrogenasa. El mecanismo de acción es similar en enzimas provenientes de organismos con características fisiológicas tan distintas como las de *Chlostridium pasteurianum*, anaerobio estricto; *Klebsiella pneumoniae*, anaerobio facultativo o *Azotobacter vinelandii*, aerobio estricto ( Eady y Postgate, 1974 ).

Se requieren 6 electrones para la reducción de  $N_2$  a amoníaco; sin embargo, como la reacción va siempre asociada a la

reducción de  $H^+$ , se podría decir que la reacción realmente implica 8 electrones ( Smith *et al*, 1981 ).



Un estudio detallado del mecanismo de acción, así como de las propiedades fisico-químicas de la enzima, ha sido posible tan sólo a partir de 1960, cuando Carnahan *et al*, trabajando con extractos crudos de *Chlostridium pasteurianum* obser- varon que la nitrogenasa era extremadamente sensible al oxíge- no. Desde entonces, se han obtenido preparaciones de nitroge- nasa pura de diferentes microorganismos ( Eady, 1980 ). En concreto, los dos componentes de la nitrogenasa de *A. chroococcum* fueron purificados por Yates y Planqué ( 1975 ). Estos auto- res observan que los dos componentes de la enzima son muy sensibles al oxígeno, el mayor de ellos, la MoFe-proteína, tie- ne un peso molecular de 227.000 daltons y contiene  $1,9 \pm 0,3$  átomos de molibdeno,  $23 \pm 2$  átomos de hierro,  $20 \pm 2$  de azú- fre ácido-lábil, y consiste en un tetrámero de subunidades con peso molecular de 60.000 daltons aproximadamente. El otro componente, la Fe-proteína, tiene un peso molecular de 64.000, 4 átomos de hierro y 4 de azufre ácido-lábil, estando constituida por dos subunidades de peso molecular 30.800 cada una.

Los dos componentes de la nitrogenasa de *A. vinelandii* fueron purificados hasta homogeneidad por Shah y Brill ( 1973 ). Posteriormente ( Swisher *et al*, 1975; Swisher *et al*, 1977 ), se ha comprobado que su componente mayor, la MoFe-proteína,

tiene un peso molecular de 245.000 y 4 subunidades de 61.000 de peso molecular cada una, dotándola de una estructura  $\alpha_2\beta_2$ . El componente menor, la Fe-proteína, es un dímero de peso molecular 60.500 y dos subunidades idénticas de peso molecular de aproximadamente 30.000. Así pues, en cuanto a su estructura, la nitrogenasa de ambas especies de *Azotobacter* es similar a la descrita para otros microorganismos y puede decirse, en general, que dicha enzima consta de dos componentes fácilmente separables, uno de ellos, la MoFe-proteína, es un tetrámero de tipo  $\alpha_2\beta_2$  con peso molecular de alrededor de 220.000, que contiene, como indica su nombre, molibdeno e hierro. El otro es la llamada Fe-proteína, un dímero de tipo  $\gamma_2$  de peso molecular de alrededor de 60.000 y que contiene hierro ( Haaker y Veeger, 1984; Mortenson y Thorneley, 1979; Richards, 1979 ).

Hay que hacer notar que *A. vinelandii* es, hasta el momento, el único microorganismo en el que se ha descrito un sistema de fijación de nitrógeno alternativo al descrito anteriormente. Este sistema alternativo se expresa en condiciones de deficiencia de molibdeno ( Bishop *et al*, 1980; Bishop *et al*, 1982 ).

En cuanto al mecanismo de acción de la nitrogenasa, hay evidencia para postular un esquema resumido según el cual, el donador de electrones reduce primero a la Fe-proteína, produciéndose entonces un ensamblaje de ésta con la MoFe-proteína y el Mg-ATP . A continuación tiene lugar la transferencia de electrones desde la Fe-proteína a la MoFe-proteína acoplada a la hi-

drólisis de ATP para, posteriormente, originar la cesión de electrones desde la MoFe-proteína al sustrato ( Mortenson y Thorneley, 1979 ). En condiciones óptimas de consumen dos moléculas de ATP por cada electrón que se transfiere desde el donador hasta el  $N_2$  ( Haaker y Veeger, 1984 ).

El donador fisiológico de electrones a la nitrogenasa ha sido estudiado recientemente en *A. vinelandii* ( Klugkist *et al*, 1986a ). Existe una fuerte correlación entre el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria y la actividad nitrogenasa. Por otro lado, Laane *et al* ( 1980 ), observaron que para detectar actividad es necesario un potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) suficientemente negativo. El donador de electrones para la nitrogenasa en *A. vinelandii* parece ser la flavodoxina. Esta idea siempre ha contado con el argumento en contra de que esta proteína también está presente en células cultivadas en presencia de amonio y por tanto, carentes de nitrogenasa. Klugkist *et al*, ( 1986b ), han diferenciado dos tipos de flavodoxina en células de *A. vinelandii* cultivadas diazotróficamente, de éstas dos, la que ellos denominan de tipo II, diez veces más abundante en células cultivadas con  $N_2$  que con amonio, parece ser la donadora de electrones a la nitrogenasa en esta bacteria.

### 1.3.3.- Regulación de la fijación de nitrógeno.

Como hemos visto en el apartado anterior, la nitrogenasa es una enzima que, en su funcionamiento, consume mucho ATP, ( unas 16 moléculas por molécula de  $N_2$  reducida ), así como po

der reductor. Resulta, por tanto, un proceso energéticamente muy costoso para la célula y no es de extrañar que la regulación a la que está sometido sea particularmente intensa.

La regulación de la nitrogenasa ocurre en dos niveles: por una parte, la concentración de enzima presente en cada momento en la célula está controlada tanto por la represión de su síntesis como por la degradación de la enzima existente; por otro lado, la actividad de la enzima también está regulada ( Eady, 1981 ). Los dos niveles de regulación de la nitrogenasa se distinguen entre sí por el tiempo en el que se manifiestan; así, mientras la regulación de la actividad ocurre en un plazo de tiempo corto, la regulación de la concentración de enzima es un proceso mucho más lento.

#### 1.3.3.1.- Regulación de la actividad nitrogenasa.

Varios factores afectan a la actividad nitrogenasa; de ellos, el más estudiado en los diferentes microorganismos fijadores de nitrógeno es el efecto del amonio, producto de la reacción catalizada por la enzima. El efecto inhibitor del amonio sobre la actividad nitrogenasa ha sido estudiado en microorganismos tales como las bacterias fotosintéticas de la familia *Rhodospirillaceae* ( Zumft *et al*, 1981; Ludden *et al*, 1984 ), *A. vinelandii* ( Laane *et al*, 1980; Klugkist y Haaker, 1984 ), *A. chroococcum* ( Eady, 1981; Postgate, 1982 ) y cianobacterias, como *Anabaena cylindrica* ( Murry *et al*, 1983 ).

En *Chlostridium pasteurianum* ( Daesch y Mortenson, 1972 ), *K. pneumoniae* ( Tubb y Postgate, 1973 ) y bacteroides de *Rhizobium leguminosarum* ( Laane et al, 1980 ), el amonio no muestra ningún efecto inhibitor sobre la actividad nitrogenasa.

Las bacterias fotosintéticas de la familia *Rhodospirillaceae* son, sin duda, los microorganismos de los que más información se dispone acerca del efecto inhibitor del amonio. En 1978, Zumft y Castillo denominaron a este efecto " apagado/encendido " ( switch off/on ), término con el que es conocido en la literatura. A pesar de la rápida y drástica inhibición de actividad nitrogenasa que se produce con la adición de pequeñas cantidades de amonio *in vivo*, éste no tiene ningún efecto sobre la actividad cuando es añadido a extractos libres de células, lo que parece descartar que el amonio ejerza su efecto *per se* sobre la enzima. El efecto del amonio sobre la actividad nitrogenasa *in vivo* es reversible, cesando una vez que el ión ha sido agotado del medio. Estudios en los que se han utilizado inhibidores de la asimilación del ión, principalmente la L-metionina-D,L-sulfoximina ( MSX ), inhibidor de la glutamina sintetasa, han sustentado la hipótesis de que la inhibición de la actividad nitrogenasa provocada por el amonio se debe a productos derivados de su asimilación, esta propuesta se ha hecho para *Rhodopseudomonas palustris* ( Alef et al, 1981 ), *Rhodospirillum rubrum* ( Sweet y Burris, 1981 ) o *Rhodopseudomonas capsulata* ( Michalski et al, 1983 ). En concordancia con estos resultados, un mutante de *Rhodopseudomonas capsulata* carente de glutamina sintetasa, no sufre inhibición de la nitro

genasa por amonio, inhibición que sí se produce cuando el mutante es complementado con un plásmido portador de dicho gen ( Scolnick *et al*, 1983 ).

En estas bacterias se ha establecido que la inhibición promovida por el amonio se debe a la modificación de la Fe-proteína de la nitrogenasa. Este proceso se conoce muy bien en *Rhodospirillum rubrum* debido al trabajo desarrollado por el grupo de Ludden. Estos autores describieron, en primer lugar, que el grupo que modifica la Fe-proteína contiene adenina ( Nordlund y Ludden, 1983 ). Posteriormente han descrito su naturaleza completa: se trata de una adenosina difosforibosa que se une, mediante la ribosa, a un N guanidino de un residuo de arginina de la Fe-proteína ( Pope *et al*, 1985a; Pope *et al*, 1985b ).

Esta modificación ha sido puesta de manifiesto en otras bacterias fotosintéticas como *Rhodopseudomonas capsulata* ( Jouanneau *et al*, 1983 ) o *Chromatium vinosum* ( Gotto y Yoch, 1985 ). La recuperación de la actividad ocurre cuando se separa el grupo modificante de la Fe-proteína, con lo que ésta pasa a su forma activa. Esta función la realiza en *Rhodospirillum rubrum* la enzima activante ( Triplett *et al*, 1982 ), en un proceso que depende de la presencia de ATP y un catión divalente, siendo el  $Mn^{++}$  el más eficiente ( Nordlund y Noren, 1984 ).

En cianobacterias, el efecto del amonio sobre la actividad nitrogenasa está menos claro. Se ha descrito represión de la síntesis debido al ión en varias cianobacterias, por

ejemplo en *Anabaena cycadeae* ( Singh *et al*, 1983 ). Hay menos información acerca del efecto a corto plazo del amonio sobre la actividad nitrogenasa, en este contexto, Murry *et al*, (1983), han descrito una drástica inhibición provocada por el ión en *Anabaena cylindrica* cuando el cultivo está en fase lineal del crecimiento y existe limitación de luz.

En organismos no fotosintéticos se dispone también de poca información. Muy recientemente, se ha descrito modificación de la Fe-proteína de la nitrogenasa como consecuencia de la inhibición por amonio en *Azospirillum brasilense* ( Hartmann *et al*, 1986 ).

En las bacterias del género *Azotobacter*, el grado de inhibición del amonio sobre la actividad nitrogenasa varía entre un 15% y un 90%, tanto en *Azotobacter vinelandii*, como en *Azotobacter chroococcum* ( Eady, 1981; Postgate, 1982 ).

En *A. vinelandii*, Klugkist y Haaker ( 1984 ), explicaron la variabilidad de los resultados en base a que el efecto del amonio sobre la nitrogenasa depende de varios factores. Uno de ellos es la tensión de oxígeno en la que se incuban las células; cuando hay limitación de oxígeno, el grado de inhibición promovido por el amonio es mayor. Otro factor es el pH; a pH ácido la inhibición por amonio es mayor que a pH básico; por último, otro factor que influye es la tasa respiratoria de las células.

En cuanto al mecanismo por el que se produce la inhibi



ción, Laane *et al* ( 1980 ), describieron que el amonio disminuye el componente eléctrico ( $\Delta\Psi$ ) del gradiente electroquímico de protones, lo que específicamente inhibiría el flujo de equivalentes de reducción a la nitrogenasa. La disminución del  $\Delta\Psi$  también promueve inhibición de la nitrogenasa en *Rhodopseudomonas sphaeroides*, sin embargo, el amonio no altera el  $\Delta\Psi$  en esta bacteria, indicando que debe existir otro mecanismo mediante el que el ión inhiba a la enzima ( Haaker *et al*, 1982 ).

Además del efecto del amonio, se ha estudiado el efecto de otros compuestos nitrogenados sobre la nitrogenasa; así, por ejemplo, se ha descrito inhibición de la nitrogenasa por glutamina en *Rhodopseudomonas capsulata* ( Michalski *et al*, 1983) o por asparragina, glutamina y urea en *Rhodopseudomonas palustris* ( Zumft y Castillo, 1978 ). No se ha descrito efecto similar al que acabamos de describir producido por otros compuestos nitrogenados como el nitrato ( Postgate, 1982 ).

Otro compuesto que afecta notablemente a la actividad nitrogenasa es el oxígeno. Los dos componentes de la nitrogenasa, sobre todo la Fe-proteína, se inactivan rápida e irreversiblemente por oxígeno ( Robson y Postgate, 1980 ). Esta es la razón por la que el proceso de la fijación de nitrógeno es llevado a cabo principalmente por organismos anaerobios o por organismos facultativos, pero en anaerobiosis o microaerobiosis. *Azotobacter* constituye una excepción notable a este hecho pues es una bacteria aerobia estricta. Las cianobacterias filamentosas son otra excepción ya que realizan foto-

síntesis oxigénica. En estos organismos la fijación de nitrógeno no ocurre en células especializadas, llamadas heterocistos, en las que la tensión de oxígeno es muy baja.

*Azotobacter* es, probablemente, el microorganismo en el que más se ha estudiado el problema del oxígeno respecto de la fijación de nitrógeno debido a su carácter de bacteria aerobia estricta. Varias revisiones han aparecido en los últimos años que se ocupan de este problema ( Robson y Postgate, 1980; Postgate, 1982; Arp y Zumft, 1983; Bergersen, 1984 ).

A pesar de que los dos componentes purificados de la nitrogenasa de *A. chroococcum* son muy sensibles al oxígeno; en extractos libres de células de esta bacteria, la enzima es relativamente estable al aire ( Robson, 1979 ). Por otro lado; Dalton y Postgate ( 1969 ), describieron que una alta aireación inhibía el crecimiento de *A. chroococcum* cultivado diazotróficamente, sin embargo, esto no ocurría cuando el cultivo se realizaba en presencia de amonio. Del mismo modo, sólo en condiciones de diazotrofia aumenta la sensibilidad al oxígeno en cultivos sometidos a deficiencia de carbono. La actividad nitrogenasa se inhibe más fácilmente por  $O_2$  en células de *A. chroococcum* cuya tasa respiratoria es baja ( Drozd y Postgate, 1970a). Estos resultados indican que, si bien *A. chroococcum* puede vivir diazotróficamente en aerobiosis, el exceso de oxígeno afecta a su nitrogenasa, es decir, estas bacterias han adquirido la capacidad de fijar nitrógeno en  $pO_2$  no permisivas para otros microorganismos.

Los dos mecanismos principales de protección de la nitrogenasa frente al oxígeno en *Azotobacter* son la protección respiratoria y el cambio conformacional ( Robson y Postgate, 1980; Postgate, 1982 ).

La hipótesis del cambio conformacional fue propuesta en principio para explicar el fenómeno de inactivación/reactivación observada *in vivo* en respuesta a aumentos drásticos, o pulsos, de  $pO_2$ . Este mecanismo ha sido estudiado tanto en *A. chroococcum* ( Robson, 1979 ), como en *A. vinelandii* ( Haaker y Veeger, 1977; Sherings *et al*, 1977; Sherings *et al*, 1983 ). En ambos casos se trata de una proteína que, si bien con características diferentes, caso del peso molecular, tienen en común el hecho de poseer centros 2Fe-2S. En ambas especies el  $Mg^{++}$  es necesario para que se produzca el cambio conformacional. La formación del complejo proteína Fe/S-nitrogenasa, protege a ésta frente al oxígeno, aunque es inactiva. Se ha propuesto ( Sherings *et al*, 1983 ), que la protección ocurre debido a la oxidación de la Fe-proteína por la proteína Fe/S que está formando un complejo con la nitrogenasa. La activación de la nitrogenasa se produciría mediante la reducción del complejo seguida por la disgregación.

El otro mecanismo de defensa de la nitrogenasa frente al oxígeno es el de la protección respiratoria. Este mecanismo es posible en *Azotobacter* gracias a la naturaleza de su cadena respiratoria; ésta tiene dos brazos terminales, uno constituido por el citocromo *d*, en el cual no existe un sitio de formación de ATP, y otro constituido por los citocromos  $c_4$ ,  $c_5$ ,  $o$  y  $a_1$

en el que sí se sintetiza ATP ( Downs y Jones, 1975 ). Estudios con mutantes de *A. vinelandii*, en los que la parte de la cadena respiratoria constituida por los citocromos  $c_4$ ,  $c_5$ ,  $o$  y  $a_1$ , no es funcional, han puesto de relieve que esta parte de la cadena respiratoria es especialmente importante en condiciones de limitación de oxígeno, en las que la eficiencia de la formación de ATP es mayor que cuando funciona el brazo de la cadena constituido por el citocromo  $d$ , lo que ocurre con tensiones de oxígeno no limitantes ( McInerney *et al*, 1982 ).

Nueva evidencia del mecanismo de protección respiratoria se ha obtenido recientemente con el aislamiento de mutantes de *A. chroococcum* afectados en el ciclo de Krebs, denominados Fos<sup>-</sup>, cuya actividad nitrogenasa es inusualmente sensible a oxígeno ( Ramos y Robson, 1985a; Ramos y Robson, 1985b ). Otros factores que pueden estar implicados en la protección de la nitrogenasa frente al oxígeno, tales como el contenido en lípidos, no parecen tener mucha influencia en *Azotobacter* ( Arp y Zumft, 1983 ).

#### 1.3.3.2.- Regulación de la síntesis de la nitrogenasa. Genética de la fijación de nitrógeno.

Anteriormente hemos visto que la regulación de la nitrogenasa por amonio se ejerce a dos niveles. En el apartado anterior hemos discutido la regulación sobre la actividad nitrogenasa, en este apartado vamos a hablar de la regulación de la síntesis de la enzima.

Además del amonio; otros compuestos nitrogenados, como el nitrato y aminoácidos, y el oxígeno, son inhibidores de la síntesis de la nitrogenasa ( Eady, 1980; Postgate, 1982; Bothe *et al*, 1983 ).

Además de los polipéptidos de la nitrogenasa, otras proteínas codificadas por genes del operón *nif*, necesarias para la fijación de nitrógeno, no se sintetizan en presencia de los compuestos inhibidores. Vamos a exponer ahora, resumidamente, la organización y regulación del operón *nif*.

La mayor parte de los estudios sobre la genética de la fijación de nitrógeno se han realizado en *K. pneumoniae*, enterobacteria en la que son aplicables gran parte de las técnicas desarrolladas para *E. coli*, lo que ha facilitado enormemente este trabajo. En los últimos años se ha avanzado en el trabajo con otros microorganismos en los que los estudios genéticos son más difíciles. Entre estos organismos está *Azotobacter*. Una de las principales razones por las que resulta difícil el trabajo genético en esta bacteria, es el elevado número de copias del cromosoma detectado tanto en *A. vinelandii* ( Sadoff *et al*, 1979 ), como en *A. chroococcum* ( Robson *et al*, 1984 ), lo que dificulta notablemente la obtención de mutantes.

En *K. pneumoniae*, todos los genes específicos para la expresión de actividad nitrogenasa están situados cerca del operón de la histidina, y agrupados bajo el nombre de operón *nif*. El tamaño de este operón es de 24 Kb y está constituido por 17 genes organizados en 8 unidades de transcripción ( Kennedy y Robson, 1983b). Aún no se sabe la función de los productos de

todos los genes del operón *nif*. Se conoce que *nif HDK* codifica para los polipéptidos que constituyen la nitrogenasa; los genes *nif F* y *nif J*, codifican para proteínas transportadoras de electrones; los genes *nif B*, *nif E* y *nif N* se cree que están implicados en la síntesis del cofactor de molibdeno ( FeMoCo ); *nif V* también debe estar implicado en la síntesis de este cofactor. *Nif Q* parece ser necesario para la asimilación de molibdeno cuando éste se encuentra a baja concentración en el medio. Las funciones de *nif S*, *nif U*, *nif X* y *nif Y* no se han determinado aún aunque se piensa que *nif S* y *nif U* deben estar implicados en la maduración de los productos de *nif K* y *nif D* ( Drummond, 1984 ).

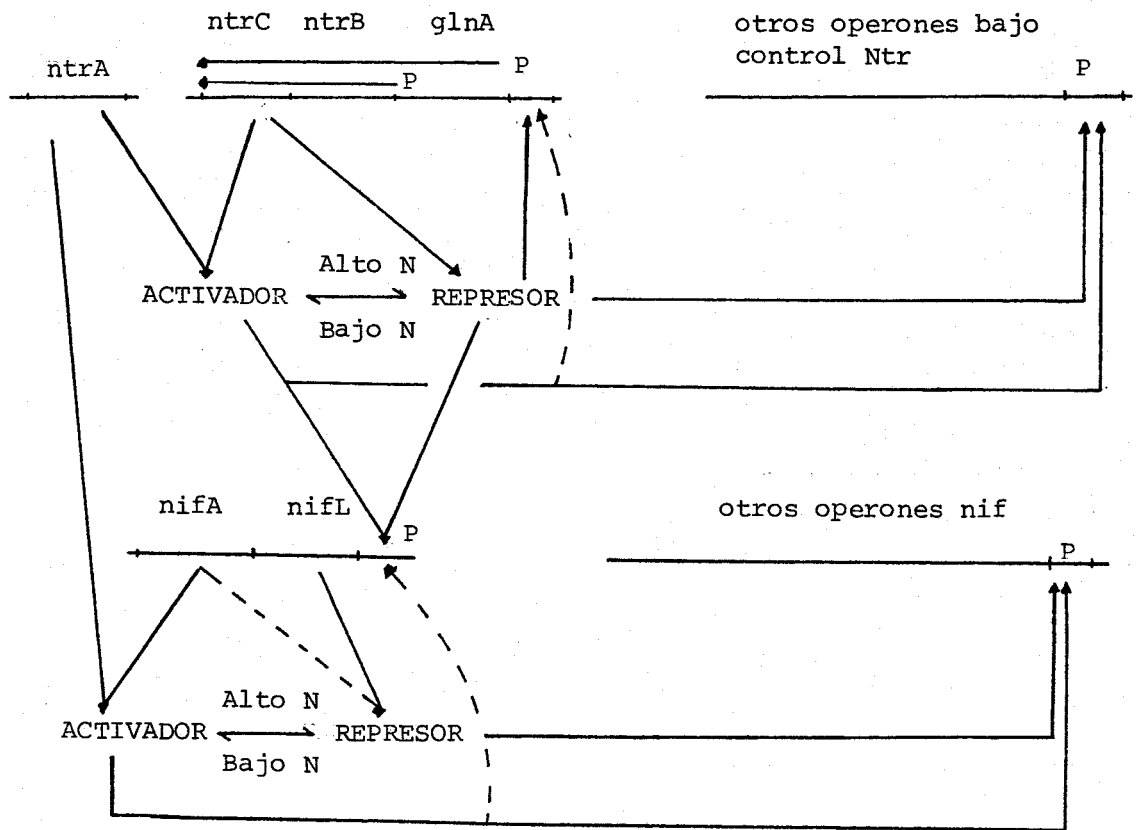
La regulación de la expresión de los genes *nif* se realiza a dos niveles: por un lado, los productos de los genes *nif LA* son responsables de la síntesis ( *nif A* es activador ) o represión ( *nif L* es represor ) del resto de los genes *nif*; por otro lado, el sistema *Ntr* está implicado en la propia regulación de *nif LA* y, por tanto, del resto de los operones *nif* ( Drummond *et al*, 1983 ).

*Nif A* codifica para un activador de la transcripción esencial para la expresión de todos los operones *nif*, excepto *nif LA*. El producto de *nif L*, en cambio, es represor de síntesis en respuesta a agentes inhibidores como el amonio o el oxígeno. Cuando la concentración de amonio es alta, la transcripción de *nif LA* es reprimida, esta represión está mediada por el sistema *Ntr*, sistema que, además de la fijación de nitrógeno, controla en *K. pneumoniae* la expresión de genes im-

plicados en la asimilación de otras fuentes de nitrógeno, tales como histidina, prolina o arginina ( Merrick, 1983 ).

El sistema *Ntr* comprende tres genes, *ntr A*, *ntrB* y *ntrC*. *NtrB* y *ntrC* forman un operón con *glnA*, gen que codifica para la glutamina sintetasa. *NtrA* no está ligado a estos genes. El producto de *ntrC* es bifuncional, ya que regula negativamente su propio promotor, positivamente el promotor de *nifLA* y puede manifestar ambos efectos sobre el promotor de *glnA*, dependiendo de la concentración de amonio. Los productos *ntrC* y *nifA* son muy similares funcional y estructuralmente, y ambos requieren el producto de *ntrA* para funcionar como activadores. Del mismo modo, tanto *ntrB* como *nifL*, tienen grandes similitudes, y ejercen su función represora mediante unión a la proteína activadora en vez de al ADN. El sistema de regulación que se representa en el esquema II ha sido propuesto por Merrick, 1983.

En *Azotobacter*, aunque no se dispone de la información con la que se cuenta en *K. pneumoniae*, ya se empiezan a tener datos tanto sobre la organización de los genes *nif*, como sobre su regulación. Los experimentos de transferencia interespecífica de genes entre *Azotobacter* y *Klebsiella*, han puesto de manifiesto que la regulación por amonio es bastante similar en ambas bacterias ( Robson *et al*, 1983 ). Así, *nifA* de *K. pneumoniae*, transferido a mutantes Nif de *Azotobacter*, en un vector que permite su expresión constitutiva, restituye el fenotipo Nif, cuando los mutantes están afectados en genes reguladores ( Kennedy y Robson, 1983a ).



Esquema II. Regulación de la expresión de los genes *nif*.



Para la identificación de genes *nif* en *Azotobacter*, las dos estrategias seguidas han sido la hibridización ADN-ADN y al complementación de diversos mutantes *nif* de *K.pneumoniae* con plásmidos conteniendo genes de *Azotobacter*. Estos experimentos han puesto de manifiesto la existencia de los genes *nif HDK* en *A. chroococcum*, así como la de *nifMVS* ( Jones *et al*, 1984 ). Mediante el mismo tipo de análisis se ha descrito homología de secuencias de ADN de *A. chroococcum* con *nif LEM*, *nif UX* y *nif NE*. Sin embargo, no se ha encontrado homología con los genes *nif QBAL* ni *nif J* ( Kennedy *et al*, 1985 ). Estos autores describen la existencia de un segundo gen *nifH*, (*nifH\**), siendo la homología entre ambos de un 88%. En cuanto a genes reguladores, aún no se han encontrado ni en *A.vinelandii* ni en *A. chroococcum*, genes que complementen mutantes *nifA* de *K. pneumoniae*. Se ha detectado, en cambio, complementación de mutantes *ntrC* y *ntrA* de *E.coli* con cósmidos de *A. vinelandii*. Se han construido mutantes *ntrA* de *A. vinelandii* incapaces de crecer diazotróficamente, lo que sugiere que en esta bacteria *ntrA* es necesario para la fijación de nitrógeno. Los mutantes *ntrC* crecen en  $N_2$  y tienen actividad nitrogenasa, sin embargo, carecen de actividad nitrato reductasa, lo que sugiere que *ntrC* no se requiere para la fijación de nitrógeno en *A. vinelandii*, en contra de lo que ocurre en *K. pneumoniae* ( Kennedy *et al*, 1985 ).

#### 1.4.- LA ASIMILACION DEL NITRATO.

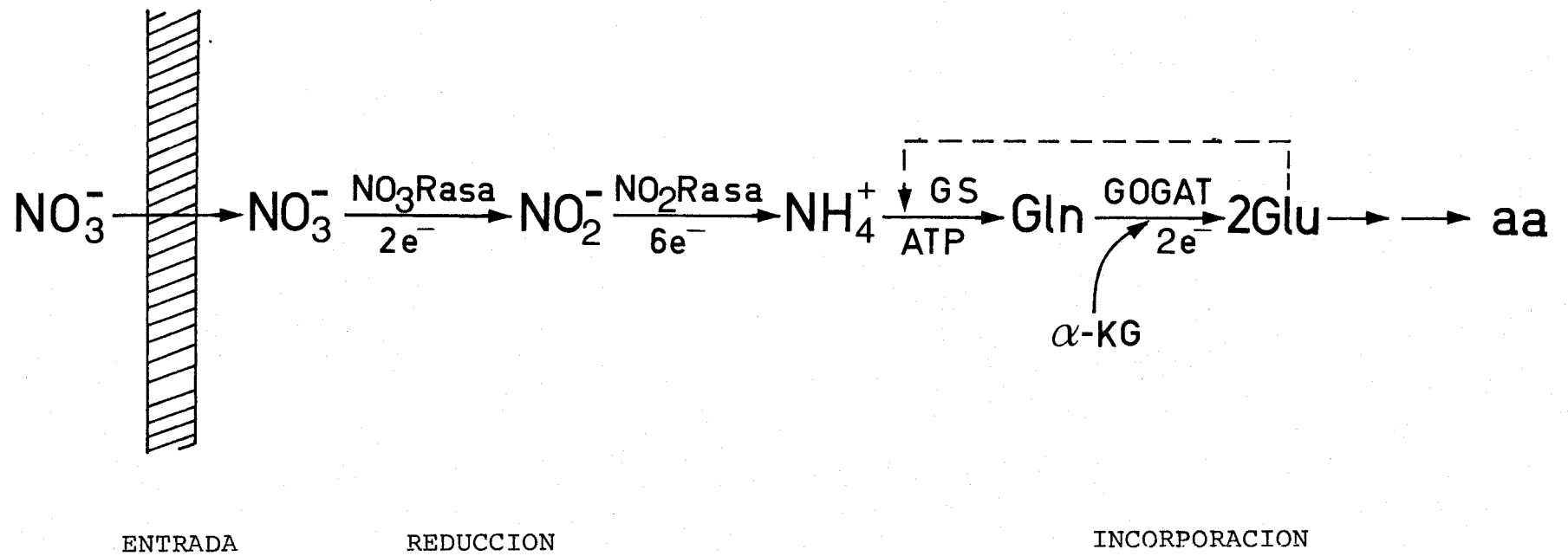
Hemos visto hasta este momento diferentes aspectos de la fijación de nitrógeno. *Azotobacter*, además de fijar  $N_2$ , puede utilizar amonio, nitrato o nitrito como fuentes de nitrógeno. Vamos a referirnos ahora a algunas de las características de asimilación del nitrato.

En microorganismos no vacuolados, como es el caso de *Azotobacter*, se pueden distinguir tres etapas fundamentales en la asimilación del nitrato; a saber, entrada del ión al interior celular, su reducción hasta amonio y la incorporación de éste en esqueletos carbonados. Estas tres etapas están recogidas en el esquema III.

##### 1.4.1.- Transporte al interior celular.

Existen escasos estudios publicados sobre el transporte de nitrato en microorganismos, esto se debe a la dificultad de estudiar este proceso aisladamente, debido a la rápida reducción del ión una vez éste se encuentra en el interior celular.

Se dispone de datos que ponen de manifiesto la existencia de sistemas de transporte activo de nitrato en organismos capaces de acumular el ión, tales como la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* ( Creswell y Syrett, 1981 ), o el hongo *Neurospora crassa* ( Schloemer y Garrett, 1974 ). La naturaleza activa del transporte de nitrato también ha sido probada en algas verdes ( Eisele y Ullrich, 1977; Tischner y Lorenzen, 1979 ).



Esquema III. Asimilación del nitrato en *A. chroococcum*.

Agentes desacoplantes como la cianil-p-trifluorometoxifenilhidrazona ( FCCP ) o el inhibidor de ATPasas diciclohexilcarbodiimida ( DCCD ), a concentraciones a las que no afectan al sistema reductor de nitrato, impiden el consumo del ión. Estos resultados han sugerido la participación de un sistema de transporte activo para el nitrato en las cianobacterias *Anacystis nidulans* ( Flores *et al*, 1983a ), *Anabaena cylindrica* ( Ohmori *et al*, 1977 ) o *Nostoc muscorum* ( Rai *et al*, 1981 ).

En bacterias quimiotróficas, usando nitrato marcado con  $N^{13}$ , se ha demostrado la naturaleza del transporte del ión en *K. pneumoniae* ( Thayer y Huffaker, 1982 ) y *Pseudomonas fluorescens* ( Betlach *et al*, 1981 ). En *A. chroococcum*, resultados obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que el transporte de nitrato es activo y dependiente del gradiente electroquímico de protones ( Revilla *et al*, 1986 ).

#### 1.4.2.- Reducción de nitrato a amonio.

La reducción de nitrato hasta amonio implica la transferencia de 8 electrones. Esta transferencia ocurre en dos etapas, una primera en la que el nitrato se reduce hasta nitrito que implica 2 electrones y está catalizada por la nitrato reductasa ; la segunda etapa, en la que se transfieren 6 electrones, consiste en la reducción de nitrito hasta amonio, reacción catalizada por la nitrito reductasa ( Losada *et al*, 1981; Guerrero *et al*, 1981 ).

La nitrato reductasa de *A. chroococcum* ha sido parcialmente caracterizada ( Guerrero *et al*, 1973 ). Se trata de una

proteína soluble de 100 Kdaltons de peso molecular, con molibdeno como cofactor e incapaz de utilizar los piridín nucleótidos como donadores de electrones. Se ha conseguido reducción de nitrato con la nitrato reductasa de este microorganismo, utilizando la ferredoxina, también de esta bacteria, reducida por un sistema de cloroplastos de espinaca iluminados, o bien por NADPH con  $\text{NADP}^+$  reductasa de espinaca, como fuente de poder reductor ( Tortolero *et al*, 1975 ). Otros donadores efectivos de electrones a la nitrato reductasa de este microorganismo son las flavinas:FMN y riboflavina reducida ( Llobell *et al*, 1980 ).

El segundo paso de la reducción de nitrato, la reducción de nitrito a amonio, está catalizado por la nitrito reductasa. Esta enzima, en *A. chroococcum*, es una metaloproteína dependiente de FAD, con peso molecular de 67.000 daltons, que utiliza NADH como donador de electrones ( Vega *et al*, 1973 ).

#### 1.4.3.- Incorporación de amonio a esqueletos carbonados.

El amonio producido como consecuencia de la asimilación de nitrato, de la reducción de nitrógeno o el que es transportado directamente del exterior celular, debe ser incorporado a esqueletos carbonados para pasar a formar parte del material celular.

La incorporación de amonio a esqueletos carbonados ocurre principalmente por dos rutas; una de ellas la constituye la enzima glutamato deshidrogenasa ( GDH ), que cataliza la aminación reductiva del 2-oxoglutarato por amonio. La otra ruta está cons-

tituida por dos enzimas , la glutamina sintetasa ( GS ), que cataliza la formación de glutamina a partir de glutamato y amonio en una reacción que consume ATP, y la glutamato sintasa (GOGAT ), que cataliza la transferencia del grupo amido de la glutamina a una molécula de 2-oxoglutarato para formar dos moléculas de glutamato ( Mi<sup>flin</sup> y Lea, 1976; Tyler, 1978 ), como se presenta en el esquema III.

Además de estas dos rutas, existen otras de menor importancia que ocurren sólo en determinadas condiciones, tal es el caso de la ruta constituida por la alanina deshidrogenasa (ADH) en *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1 ( Moreno-Vivián *et al*, 1983).

Está bien documentado en diversos organismos, que la ruta principal de asimilación de amonio es la catalizada por las enzimas GS/GOGAT, estando involucrada la GDH sólo en determinadas circunstancias, principalmente cuando el amonio no es un nutriente limitante, dada la baja afinidad de esta enzima por el amonio en la mayoría de los organismos estudiados ( Mi<sup>flin</sup> y Lea, 1976; Tyler, 1978 ). En *A. chroococcum*, Bárcena ( 1980 ), puso de manifiesto que la única vía de asimilación de amonio es la GS/GOGAT.

#### 1.4.4.- Regulación de la asimilación de nitrato.

Dado que los niveles de nitrito reductasa son generalmente mayores que los de nitrato reductasa en la mayoría de los organismos estudiados, la reducción de nitrato a nitrito, debe ser el paso más crítico en la regulación de la asimila-

ción de nitrato ( Guerrero *et al*, 1981; Losada *et al*, 1981 ). De hecho, numerosos estudios llevados a cabo en diferentes organismos, han demostrado que los niveles de nitrato reductasa presentes en la célula dependen de la fluctuación de diversos factores tales como la temperatura, luz, pH, CO<sub>2</sub>, fuente de nitrógeno y otros ( Guerrero *et al*, 1981; Losada *et al*, 1981 ). En particular, el amonio, producto final de la reducción de nitrato es un destacado antagonista de la asimilación de este ión en prácticamente todos los organismos estudiados ( Guerrero *et al*, 1981; Losada *et al*, 1981; Castillo y Cárdenas, 1982; Flores *et al*, 1983b ).

Como en el caso de la regulación por amonio de la fijación de nitrógeno, la regulación de la asimilación de nitrato, también se puede considerar que ocurre en dos niveles. Por un lado, inhibe el consumo del ión, sin afectar los niveles de nitrato reductasa y nitrito reductasa, efecto que se manifiesta a corto plazo y que se ha descrito en microorganismos tales como la cianobacteria *Anacystis nidulans* ( Flores *et al*, 1980 ), la bacteria fotosintética *Rhodospseudomonas capsulata* ( Jackson *et al*, 1981; Alef, 1984 ), el alga verde *Chlamydomonas reinhardii* ( Florencio y Vega, 1983a) o la bacteria quimiotrófica *A. chroococcum* ( Revilla, 1983 ). Por otro lado, a más largo plazo, afecta a los niveles de las enzimas de la reducción de nitrato, efecto que también ha sido descrito en diverso tipo de organismos, entre ellos, las cianobacterias *Anacystis nidulans*, *Anabaena* 7119 y *Nostoc* 6719 ( Herrero *et al*, 1981 ), el alga verde *Chlamydomonas reinhardii* ( Florencio y Vega, 1983b)

y la bacteria *A. chroococcum* ( Revilla *et al*, 1985 ).

El amonio ejerce la inhibición sobre el consumo de nitrato mediante productos derivados de su asimilación en todos los organismos citados anteriormente con la excepción de *Chlamydomonas reinhardtii* ( Florencio y Vega, 1982 ), ya que células de esta alga tratadas con MSX siguen presentando el efecto inhibitor del amonio sobre el consumo de nitrato. La acción de los presuntos metabolitos inhibidores estaría centrada sobre la entrada del ión, ya que en los tiempos en los que se observa la inhibición del consumo, no se observa efecto alguno sobre las enzimas encargadas de la reducción del nitrato.

Acercas de los niveles de actividad nitrato reductasa, se ha propuesto que el nitrato ejerce un papel de inductor de la síntesis de la enzima en diversos organismos, sin embargo, se observa presencia de nitrato reductasa en ausencia de nitrato en algunas algas verdes ( Herrera *et al*, 1972; Sosa *et al*, 1978) o en algas rojas ( Rigano y Violante, 1973 ). En organismos no fijadores de nitrógeno, como la cianobacteria *Anacystis nidulans*, la síntesis de la enzima es reprimida por amonio, mientras su síntesis ocurre en ausencia de amonio, esté o no el nitrato presente ( Herrero *et al*, 1981 ). Este efecto represor del amonio sobre la síntesis de la enzima, parece mediado también por productos de su asimilación.

En *A. chroococcum*, bacteria fijadora de nitrógeno, el nitrato es necesario como inductor de la nitrato reductasa, aunque puede ser sustituido por un análogo suyo no metabolizable



como el cianato ( Revilla *et al*, 1985 ). En esta bacteria la represión por amonio está también mediada por productos de su asimilación , más que por el ión *per se*.

En este trabajo se ha estudiado la regulación de la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* por compuestos nitrogenados tales como amonio, nitrato y nitrito. Para ello, en primer lugar, se ha puesto a punto un ensayo de actividad nitrogenasa *in vivo* que ha permitido estudiar el efecto de estos compuestos a tiempo corto. El estudio de la regulación de la actividad nitrogenasa por nitrato y nitrito ha requerido la obtención de células que exhiben, de forma transitoria, la capacidad de fijar  $N_2$  y de asimilar nitrato simultáneamente. Este tipo de células ha permitido poner de manifiesto la relación que existe entre ambos procesos en cuanto a su regulación por amonio. Se ha estudiado también la influencia de la fuente de carbono y de algunos inhibidores metabólicos sobre la actividad nitrogenasa y su regulación. Por último, se presenta evidencia experimental que sugiere que la inhibición de la actividad nitrogenasa y la represión de su síntesis por amonio, son procesos independientes en *Azotobacter*.

Parte de los resultados que aquí se presentan han sido ya publicados ( Cejudo *et al*, 1984; Cejudo y Paneque, 1986; Revilla *et al*, 1986 ), o han sido objeto de comunicaciones a Congresos.

## 2. MATERIALES Y METODOS

## 2.1.- MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO

### 2.1.1.- Organismos y plásmidos.

Los organismos utilizados en este trabajo se presentan en la tabla I. La mayor parte del trabajo experimental se ha realizado con *Azotobacter chroococcum* ATCC 4412. Donde se indica en el texto, se empleó la cepa MCD1 de *Azotobacter chroococcum*, incapaz de asimilar nitrato o nitrito. En experimentos de transferencia de plásmidos y de utilización de mutantes, se hizo uso de *Azotobacter vinelandii*, especie que ofrece más facilidades para este tipo de trabajo que *A. chroococcum*.

*A. chroococcum* ATCC 4412 procede de la colección de la Universidad de Valencia. El resto de las cepas utilizadas en este trabajo, tanto de *Azotobacter* como de *Escherichia coli* o *Klebsiella pneumoniae*, proceden de la Unidad de Fijación de Nitrógeno de la Universidad de Sussex en Brighton, Inglaterra.

Los plásmidos utilizados se presentan en la tabla II, donde se indica su genotipo significativo para los objetivos de este trabajo.

### 2.1.2.- Condiciones de cultivo.

Los cultivos de *Azotobacter* se hicieron en tubos de vidrio cilíndricos con base cónica de 200 mm de altura y 40 mm de diámetro con boca estrecha de 20 mm. En estos tubos se ponían 100 ml de medio de cultivo sin fosfato, se cerraban con algodón hidrófobo y se esterilizaban. El inóculo se rea-

Tabla I. Organismos utilizados en este trabajo

Especie	Cepa	Fenotipo o Genotipo
<i>A. chroococcum</i>	ATCC 4412	Silvestre
"	MCD1	" , Sm <sup>r</sup> , Nal <sup>r</sup>
"	NCIB 8003	"
<i>A. vinelandii</i>	UWr	Rif <sup>r</sup>
"	UW48	<i>nif H::Tn5</i>
<i>E. coli</i>	5K	
"	HB101	Sm <sup>r</sup>
"	ED8767	
<i>K. pneumoniae</i> *		

\* Las cepas de *K. pneumoniae* se presentan en la Tabla XXV.

Tabla II. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Genotipo o Fenotipo de interés	Referencia
pRK2013	Tra, Km <sup>r</sup>	1
pCK3	<i>nif</i> A <sup>a</sup> , IncP, Tc <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	2
pLV10	<i>nif</i> HDK <sup>b</sup> , Tc <sup>r</sup>	P. Bishop (sin publicar)
pJC1	<i>nif</i> HDKY <sup>a</sup> , Tc <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pJC2	<i>nif</i> HDKY <sup>a</sup> , Tc <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	" "
pSA30	<i>nif</i> HDKY <sup>a</sup> , Tc <sup>r</sup>	3
pRK2501	Mob <sup>+</sup> , IncP, Km <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	4

Las referencias incluidas en esta tabla son:

- 1.- Figurski y Helinski (1979)
- 2.- Kennedy y Drummond (1985)
- 3.- Cannon *et al.* (1979)
- 4.- Kann *et al.* (1979)

a: Genes procedentes de *K. pneumoniae*

b: Genes procedente de *A. vinelandii*

lizaba con el volumen adecuado de un cultivo previo ( entre 0,5 y 1 ml ). Esta suspensión celular se incubaba en un baño de agua cuya temperatura se mantenía a 30°C mediante un termostato de inmersión TECTRON-100 marca SELECTA. A esta suspensión celular se le suministraba el oxígeno y el dinitrógeno necesarios para el crecimiento burbujeando aire estéril ( 200 ml/min ) mediante una varilla de vidrio.

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 25 ml de capacidad con 5 ml de medio de cultivo y tapados con algodón graso. La inoculación se hacía directamente a partir de una colonia aislada en medio sólido. La suspensión celular se incubaba en un cultivador NEW BRUNSWICK, SCIENTIFIC Co, modelo G-25 con una agitación constante de 150 rpm.

Las cepas de *K. pneumoniae* se cultivaron en tubos de plástico de 7 ml de capacidad con 5 ml de medio, para conseguir condiciones de anaerobiosis, en el agitador descrito anteriormente. Los cultivos de estas cepas en condiciones de anaerobiosis en medio sólido se realizaron en una cámara en la que se reemplazaba el aire por argón.

### 2.1.3.- Composición de los medios de cultivo.

Para *Azotobacter* se han utilizado los siguientes medios :

Medio Burk simplificado que contenía en 1 l de agua destilada los siguientes compuestos:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,8 mmoles; NaCl, 3,4 mmoles;  $CaCl_2$ , 0,34 mmoles;  $NaMO_4$ , 0,012 mmoles; sacaro-

sa, 14 moles; tampón fosfato potásico, pH 7,5, 20 mmoles;  $\text{FeSO}_4$ , 0,5 mmoles y EDTA, 0,5 mmoles; estos dos productos se añadían de una solución preparada según Arnon *et al* ( 1974 ). A este medio le denominaremos abreviadamente BS. Cuando se añadían fuentes de nitrógeno combinado, éstas eran:  $\text{KNO}_3$ , 8 mmoles o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 mmoles. Para preparar medio sólido se añadía agar al 2%. El tampón fosfato se esterilizaba aparte y se añadía al resto del medio de cultivo una vez frío para evitar la precipitación del hierro en forma de sal férrica.

Cuando en vez de sacarosa se utilizó otra fuente de carbono, se procedía exactamente igual que se ha descrito en el párrafo anterior, pero sustituyendo la sacarosa por la fuente de carbono correspondiente, excepto en los casos en los que se añadía succinato, malato, 2-oxoglutarato o fumarato. Estos compuestos se prepararon en tampón Hepes 1 M ajustando el pH a 7,5 con KOH y se esterilizaban por filtración. La concentración final de estos ácidos en el medio de cultivo era de 10 mM.

Medio rico para *Azotobacter* ( RM ), este medio se preparaba añadiendo a 1 l de agua destilada 10 ml de una solución salina que contenía  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 64 g/l;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 16 g/l y  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 14,2 g/l; 1 ml de una disolución que contenía  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 203 g/l y  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 4,41 g/l, y 1 ml de una disolución que contenía  $\text{NaMO}_4$ , 2 g/l;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5g/l y HCl concentrado, 2 ml/l. Este medio contenía, además, sacarosa, 10 g; bactotripton, 2 g y extracto de levadura 1 g. Para preparar medio sólido se añadía agar al 1,8%.

Para *E. coli* se ha utilizado medio Luria ( LB ) cuyo contenido en 1 l de agua destilada era: bacto triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g y NaCl, 10 g. El pH se ajustaba a 7,0 con NaOH 1 N. El medio sólido contenía, además, agar al 1,5%.

Para *K. pneumoniae* se ha utilizado un medio que en 1 l de agua destilada contenía  $MgSO_4$ , 0,1 g;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 25 mg;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 25 mg;  $K_2HPO_4$ , 12,06 g;  $KH_2PO_4$ , 3,4 g y glucosa, 20 g. El medio sólido contenía, además, agar al 1,5%. El fosfato se esterilizaba aparte y se añadía al medio una vez frío.

La esterilización de todos los medios y materiales se hizo en un autoclave marca SELECTA, modelo 437-G, a 2 atm de presión y 121°C durante 20 min.

Cuando los medios requirieron antibióticos, aminoácidos o ácidos orgánicos, éstos se esterilizaron por filtración a través de un filtro estéril Millex-GS, marca MILLIPORE de 0,22  $\mu m$  de diámetro de poro. Los antibióticos para *Azotobacter* se añadían a las siguientes concentraciones: rifampicina, 20  $\mu g/ml$ ; tetraciclina, 2  $\mu g/ml$  y kanamicina, 2  $\mu g/ml$ . Para *E. coli* los antibióticos y concentraciones utilizados fueron: tetraciclina, 10  $\mu g/ml$  y kanamicina, 20  $\mu g/ml$ .

#### 2.1.4.- Establecimiento de la deficiencia de nitrógeno.

Para establecer condiciones de deficiencia de nitrógeno, las células de *A. chroococcum* se resuspendían en medio libre de nitrógeno combinado y se incubaban en tubos como los



descritos en 2.1.2. para su cultivo, pero tapados con un tapón de goma con una varilla de vidrio por la que se burbujeaba una mezcla de argón:oxígeno ( 79%:21% ) a un flujo de 200 ml/min y una varilla que permitía la salida de gases. Estas incubaciones se hacían normalmente en condiciones no asépticas.

#### 2.1.5.- Mantenimiento de los organismos. Preparación de inóculos de *Azotobacter*.

Las estirpes silvestres de *A. chroococcum* y *A. vinelandii* se mantenían en tubos de agar inclinado que contenían medio BS, a 0-4°C.

Cada dos semanas, aproximadamente, se iniciaban los inóculos a partir de las células de estos tubos. En condiciones asépticas se tomaba una cierta cantidad de biomasa, se resuspendía en 100 ml de medio líquido y se dejaba crecer 1 ó 2 días. De este cultivo se tomaba 1 ml con el que se inoculaban 100 ml de medio fresco. Transcurridas unas 12 h, esta suspensión se tomaba como inóculo de partida.

El mantenimiento de las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* se realizaba cultivando en medio sólido cada mes aproximadamente. Para iniciar cultivos líquidos de ambas especies se partía de colonias aisladas en placas no más viejas de una semana.

La presencia de posibles contaminantes se comprobaba frecuentemente observando muestras de los cultivos al microscopio o comprobando el fenotipo cuando era posible.

## 2.2. - RECOGIDA DE CELULAS

Para las determinaciones de actividad y consumo de iones, las células de *Azotobacter* se recogieron en fase exponencial del crecimiento ( D.O.<sub>560</sub> = 0,5-0,7 ) por centrifugación a 9000 x g durante 10 min en una centrífuga SORVALL RC-2B a 4 ó 5 °C. Posteriormente se lavaron dos veces con medio BS. A continuación las células se resuspendían en el mismo medio a una densidad celular de unos 70 µg de proteína/ml. Cuando el experimento lo requería, se sustituía el medio BS por tampón MOPS-KOH, 50 mM, pH 7.5. En estos casos, al resuspender las células, el tampón se suplementaba con sacarosa al 1%.

La recogida de células para determinaciones específicas, como las actividades enzimáticas o para los experimentos de conjugación , se especificará en cada caso.

## 2.3.- ESTIMACION DE LOS NIVELES CELULARES DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

En este trabajo hemos determinado los niveles celulares de las enzimas nitrato reductasa, nitrito reductasa, glutamina sintetasa y nitrogenasa. Excepto en el caso de la actividad nitrogenasa, que se determinó *in vivo*, el resto de las actividades se determinaron *in situ*, es decir, en células cuyas membranas se han hecho permeables a sustancias de bajo peso molecular. Este tipo de tratamiento permite estimar los niveles enzimáticos inmediatamente después de expo-

ner las células a distintas condiciones experimentales.

### 2.3.1.- Permeabilización de las células con MTAB.

La permeabilización de las membranas celulares con el detergente iónico MTAB no requería pretratamiento de las células sino que el detergente se añadía directamente a la mezcla de ensayo de la actividad considerada. La concentración de detergente utilizada fue de 20  $\mu\text{g/ml}$  para el ensayo de las actividadel nitrato reductasa y nitrito reductasa y de 100  $\mu\text{g/ml}$  para la glutamina sintetasa. El procedimiento consistía en añadir una alícuota de una suspensión de células no permeabilizadas al volumen correspondiente de la mezcla de ensayo de que se tratara que, además de los componentes habituales, contenía el MTAB. Antes de iniciar el ensayo enzimático, se homogeneizaba la suspensión por agitación violenta durante 2-5 sg.

### 2.3.2.- Ensayo de la actividad nitrato reductasa.

Para el ensayo de la actividad nitrato reductasa, una alícuota de 10 ml de la suspensión celular se centrifugó a 9.000 x  $g$  durante 5 min a una temperatura de 0-4°C. El sedimento se lavó con tampón MOPS-KOH, 25 mM, pH 7,5, y, después de centrifugar como antes, las células se resuspendieron en 1 ml de una solución de MOPS-KOH, 0,125 mM, pH 7,5, y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 0,25 mM.

El ensayo se llevaba a cabo al aire en tubos de ensayo reforzados de 10 ml de capacidad según el método descrito por

Guerrero *et al*, ( 1973 ). La mezcla de ensayo contenía, en un volumen final de 1 ml, lo siguiente: Tris-HCl, pH 7,5, 100  $\mu$ moles;  $\text{KNO}_3$ , 10  $\mu$ moles; metilviológeno, 0,2  $\mu$ moles;  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , 0,8 mg disuelto en 0,1 ml de Tris-ClH, 0,5 M, pH 7,5, y MTAB, 20  $\mu$ g. A esta mezcla se añadía una cantidad adecuada ( normalmente 0,2 ml ) de la suspensión celular descrita anteriormente. La reacción se inició añadiendo  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  y, tras incubar a 30°C durante 3 min, se detuvo agitando fuertemente la mezcla en un aparato vibrador Super-mixer hasta la desaparición del color azul del metilviológeno reducido. Para cada ensayo se hizo un blanco que contenía todos los componentes excepto el ditionito.

El nitrito formado en la reacción se determinó según se describe en el apartado 2.10.2. Antes de medir la D.O.<sub>540</sub>, se centrifugaban las muestras para eliminar la turbidez.

Una Unidad de actividad enzimática corresponde a 1  $\mu$ mol de nitrito formado por minuto.

La disolución de ditionito sódico se preparaba inmediatamente antes de usarse.

### 2.3.3.- Ensayo de la actividad nitrito reductasa.

El ensayo se realizó según el método descrito por Vega *et al*, ( 1973 ), con algunas modificaciones. La suspensión celular se preparó como se describe para el caso de la nitrato reductasa. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: Tris-HCl, pH 7,5, 100  $\mu$ moles;  $\text{KNO}_2$ , 20  $\mu$ moles,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , 2,6 mg disueltos en 0,1 ml de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,29 M; MTAB, 20  $\mu$ g y una cantidad

adecuada de la suspensión celular ( normalmente 0,2 ml ). Para cada ensayo se preparaba un blanco con todos los componentes menos el ditionito.

El ensayo se realizaba con la adición de ditionito. La mezcla se incubaba durante 10 min a 30°C al cabo de los cuales la reacción se detenía por agitación vigorosa.

El nitrito desaparecido se determinó como se indica en el apartado 2.10.2..

Una Unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la desaparición de 1  $\mu$ mol de nitrito por minuto.

#### 2.3.4.- Ensayo de la actividad glutamina sintetasa.

El ensayo se llevó a cabo determinando la actividad transferasa según Shapiro y Stadtman ( 1970 ), mediante el procedimiento descrito por Kleiner ( 1975 ), ligeramente modificado. La reacción se llevó a cabo en tubos de vidrio reforzados de 10 ml de capacidad. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: MOPS-KOH, pH 7,5, 100  $\mu$ moles; glutamina, 25  $\mu$ moles; ADP, 0,5  $\mu$ moles;  $MnCl_2$ , 0,3  $\mu$ moles;  $NH_2OH \cdot HCl$ , 25  $\mu$ moles; MTAB, 100  $\mu$ g y una cantidad adecuada de la suspensión celular. Cuando se determinó la actividad dependiente de  $Mg^{++}$ , se añañían 60  $\mu$ moles de  $MgCl_2$ .

La mezcla de reacción se incubaba a 30°C durante 10 ó 15 min y la reacción se paraba por la adición de 2 ml de la mezcla reveladora descrita en el apartado 2.10.3..

Una Unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\gamma$ -glutamil-hidroxamato por minuto.

#### 2.3.5.- Ensayo de la actividad nitrogenasa.

Como hemos dicho anteriormente, la actividad nitrogenasa se determinó *in vivo*. La técnica empleada fue la de reducción de acetileno descrita por Stewart *et al*, ( 1967 ).

El ensayo de la actividad nitrogenasa de las células de *Azotobacter* se ha utilizado para dos fines a lo largo de este trabajo. Cuando lo que se determinó fue el nivel de actividad en un cultivo, se tomaba una alícuota de 2 ml de la suspensión celular en un matraz Erlenmeyer de 10 ml de capacidad cerrado con un tapón de goma de la firma Arthur H. Thomas, Co. y se le inyectó acetileno hasta el 10%. Estas muestras se incubaron en un baño Warburg, marca BRAUM, con una agitación de 100 oscilaciones por minuto y a una temperatura de 30°C. A los 15 y 25 min se extraían muestras de 0,5 ml de la fase gaseosa con jeringas de polipropileno de 1 ml. La producción de etileno por la suspensión celular es lineal antes de transcurridos 10 min desde el inicio del ensayo.

El etileno producido se determinó según se describe en el apartado 2.10.5..

Cuando el experimento requería estudiar la producción de etileno durante un periodo que, según los casos, oscilaba entre 60 y 120 min, las células se recogían por centrifugación a 9.000 x g

durante 5 min a 0-4°C, se lavaban con medio libre de fuente de nitrógeno combinado y se resuspendían en el mismo medio hasta una densidad celular entre 60 y 90 µg de proteína/ml, de esta suspensión se tomaba una muestra de 2, 10 ó 20 ml que se ponía en matraces Erlenmeyer de 10, 25 ó 50 ml de capacidad, respectivamente, cerrados con tapones de goma ( Arthur H. Thomas, Co ). Las muestras se mantenían en agitación en las condiciones antes descritas durante 15 min antes de añadir el acetileno.

Para la determinación de etileno se procedía como se ha indicado anteriormente.

Cuando el experimento lo requería, el medio de cultivo era sustituido por tampón MOPS-KOH, 50 mM, pH 7,5, suplementado con sacarosa al 1% ( p/v ).

La actividad nitrogenasa de las cepas de *K. pneumoniae* se determinó directamente en los cultivos de estas bacterias, añadiendo acetileno a la fase gaseosa de los mismos y analizando la producción de etileno 30 min después.

#### 2.4.- ESTIMACION DEL CONSUMO DE LOS IONES MINORGANICOS NITROGENADOS.

La utilización de nitrato, nitrito y amonio se determinó siguiendo la desaparición de estos iones del medio en el que estaban suspendidas las células de *Azotobacter*.

En todos los casos se utilizaron matraces Erlenmeyer de 25 ó 50 ml de capacidad con 10 ó 20 ml de la suspensión celular, respectivamente, a una concentración de proteína de 60-80 µg/ml.

El medio en el que se resuspendían las células era normalmente BS. Donde se indica, se utilizó MOPS-KOH, 50 mM, pH 7,5 suplementado con sacarosa al 1% ( p/v ). Los ensayos se realizaron con los matraces abiertos al aire sometidos a una agitación de 100 oscilaciones/min a 30°C. El experimento se iniciaba añadiendo el ión deseado a una concentración de 0,1-0,5 mM. De la suspensión celular se tomaban alícuotas de 1ml cada cierto tiempo. Las células eran separadas del medio por filtración inmediata utilizando un sistema de filtración MILLIPORE tipo HA de 12 orificios con un papel de filtro GLASS MICROFIBRE ( GF/C ) de WHATMAN. La concentración de nitrato, nitrito o amonio en los filtrados se determinaba al concluir el experimento.

La suspensión celular se preincubaba durante 15 min con agitación antes de añadir el ión.

Cuando interesaba utilizar células con la capacidad de asimilación de amonio bloqueada, la suspensión celular se trataba con el oportuno inhibidor - durante el tiempo que se indica en cada caso - antes de iniciar el ensayo de consumo.

La adición de otros inhibidores y compuestos se describe en los experimentos específicos.

## 2.5.- ESTIMACION DE LA ACTIVIDAD NITROGENASA Y DEL CONSUMO DE IONES INORGANICOS NITROGENADOS SIMULTANEAMENTE.

En determinados experimentos presentados en este trabajo, se estudiaba el efecto de nitrato, nitrito o amonio sobre la actividad nitrogenasa. En estos experimentos se necesitaba



estudiar, simultáneamente, la actividad nitrogenasa y el consumo de los iones. En estos casos cada muestra se tenía duplicada y exactamente en las mismas condiciones, es decir, los matraces estaban cerrados con tapones de goma y contenían acetileno al 10% ( v/v ). A las dos muestras se le añadía el ión de que se tratara al mismo tiempo y a la misma concentración. Mientras de uno de los matraces sólo se tomaban muestras de la fase gaseosa para determinar etileno, procediéndose como se describe en 2.3.5., del otro matraz se tomaban muestras de la suspensión celular, para determinar el consumo del ión, utilizando en este caso una jeringa de polipropileno de 2 ml y procediendo, por lo demás, como se indica en el apartado 2.4..

## 2.6.- EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS.

### 2.6.1.- Transferencia de plásmidos por conjugación.

La conjugación ha sido el método empleado para transferir los plásmidos pJC1, pJC2, pCK3 y pLV10 ; a distintas cepas de *A. vinelandii*. La cepa donadora de estos plásmidos ha sido en todos los casos *E. coli* 5K, por lo que la transferencia era interespecífica. El plásmido utilizado como " ayudador " en la transferencia ha sido, en todos los casos, pRK 2013.

Para realizar el experimento se cultivaban todas las cepas implicadas, la receptora, la donadora y la que contiene el plásmido pRK 2013, en medio rico líquido ( RM para *A. vinelandii* y LB para *E. coli* ) suplementado con los antibióticos adecuados. En fase exponencial del crecimiento, se recogen las cé

lulas por centrifugación en una microcentrífuga EPPENDORF, modelo 5414 a  $9.980 \times g$  durante 2 min a temperatura ambiente. Se lavaban dos veces con 1 ml de PEM (  $K_2HPO_4$ , 5 mM;  $Na_2$ -EDTA, 0,1 mM;  $MgCl_2$ , 0,5 mM, pH 8,0 ) y se resuspendían en 0,5 ml de esta solución. A continuación se mezclaban 50  $\mu$ l de las suspensiones celulares de cada una de estas cepas. La mezcla se depositaba sobre medio RM sólido, suplementado con glucosa al 1% (p/v) y se incubaba a  $30^\circ C$  durante 24 h. Esta biomasa se recogía, se resuspendía en PEM y, utilizando las disoluciones adecuadas, se sembraba en medio RM sólido suplementado con los antibióticos adecuados para permitir el crecimiento de los transconjugantes exclusivamente. Posteriormente, se realizaban dos cultivos sucesivos en el mismo medio, aislando colonias, para evitar la posibilidad de tener contaminación con las cepas utilizadas en el experimento, que no son transconjugantes reales.

#### 2.6.2.- Transferencia de plásmidos por transformación.

Una vez contruidos los plásmidos pJC 1 y pJC 2, se transformó con ellos *E. coli* 5K. La transformación se realizó por el método del  $CaCl_2$  tal y como describen Maniatis *et al*, (1982).

Para preparar células de *E. coli* 5K competentes, se cultivaba esta cepa en medio LB líquido a  $37^\circ C$ , con agitación ( ver apartado 2.1.2. ), hasta  $D.O._{550} = 0,5$ . El cultivo se enfría en hielo durante 10 min y se recogen las células por centrifugación a  $4.000 \times g$  durante 5 min a  $4^\circ C$ . Las células se resuspenden en la mitad del volumen inicial de una solución de  $CaCl_2$ , 50 mM y Tris-HCl, 10 mM, pH 8,0, estéril y fría. Esta suspensión ce-

lular se dejaba 15 min en hielo y después se centrifugaba a 4.000 x g durante 5 min a 4°C. Las células se resuspendían en 1/15 del volumen original de la solución de CaCl<sub>2</sub> descrita antes. Durante todo el proceso se utilizaron pipetas frías.

La transformación se realizó mezclando 80 µl de células competentes con 5-10 µl de la suspensión de ADN. Esta mezcla se mantenía en frío durante 20-30 min, posteriormente se transferían a un baño a 42°C donde se mantenían 2 min y, por último, se transferían a un matraz con 5 ml de medio LB y se incubaban durante unas 10 h en condiciones de cultivo.

Las células resultantes se recogían por centrifugación en una microcentrífuga Eppendorf, se resuspendían en medio LB, y se sembraban en el mismo medio sólido suplementado con los antibióticos adecuados para seleccionar las células transformadas.

## 2.7.- AISLAMIENTO DE ADN.

### 2.7.1.- Preparación de ADN para el análisis de plásmidos de *A. chroococcum*.

La preparación de ADN para el análisis de los plásmidos de *A. chroococcum* se hizo según el método descrito por Robson *et al*, ( 1984 ).

Se cultivaron los microorganismos en medio BS líquido. En fase exponencial del crecimiento ( D.O.<sub>560</sub> = 0,8 ), se toma-

ron 1,5 ml del cultivo y se le añadieron 0,5 ml de PEM ( descrito en 2.6.1. ); las células se recogieron por centrifugación a 4.000 x g durante 10 min en una centrífuga de mesa HERAEUS modelo LABOFUGE a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió en 50 µl de una disolución de Tris-ClH, 50 mM y Na<sub>2</sub>EDTA, 20 mM, pH 8,0. Se agitaba vigorosamente y se le añadían 0,95 ml de tampón de lisis, que contenía en 95 ml, SDS, 1 g y Na<sub>2</sub>EDTA, 1,77 g. El pH se había ajustado a 12,6 con NaOH, 2,5 M. Se mezclaba con agitación muy suave y se incubaba a 34°C durante 25 min. Tras esta incubación se le añadían 170 µl de una disolución salina que se obtiene mezclando 60 ml de Tris-HCl, 2 M, pH 8,0 con 110 ml de NaCl ( 0,32 mg/ml ). Se agitaba suavemente y se incubaba en frío durante 15 min para precipitar el ADN desnaturalizado, las proteínas y el SDS. Esta mezcla se centrifugaba en frío a 4.000 x g durante 10 min. Se tomaba el sobrenadante en tubos de microcentrífuga Eppendorf conteniendo 770 µl de una solución de acetato sódico 0,2 M en 90% ( v/v ) de etanol. Se mezclaba por inversión. El ADN se precipitó por incubación durante 2-3 h a -70°C. El ADN se recogía por centrifugación en una microcentrífuga Eppendorf durante 15 min en frío. Tras secar suficientemente el tubo, el ADN se disolvía cuidadosamente en 20 µl de una solución que contenía Tris-HCl, 10 mM; Na<sub>2</sub>EDTA, 50 mM y NaCl, 50 mM, pH 8,0.

#### 2.7.2.- Preparación de ADN para la digestión con endonucleasas de restricción.

Para el análisis de los plásmidos pJC 1 y pJC 2 median-

te digestión con enzimas de restricción. El ADN de estos plásmidos se aisló siguiendo el método de lisis alcalina descrito por Maniatis *et al*, ( 1982 ).

Las cepas portadoras de los plásmidos se cultivaban en 5 ml de medio LB líquido suplementado con el antibiótico de que se tratase. Tras 10-12 h, se toman 5 ml de este cultivo y se separan las células por centrifugación en una microcentrífuga Eppendorf durante 1 min. El precipitado se resuspendía en 100  $\mu$ l de una solución fría que contenía: glucosa, 50 mM; Na<sub>2</sub>-EDTA, 10 mM y Tris-HCl, 25 mM, pH 8,0. Después de incubar durante 5 min a temperatura ambiente, se añadían 200  $\mu$ l de una solución que contenía NaOH, 0,2 N y SDS 1%, preparada antes de utilizarse. Se mezclaba suavemente y se incubaba en hielo durante 5 min se añadían 150  $\mu$ l de acetato potásico, pH 4,8, que se preparaba añadiendo 11,5 ml de ácido acético glacial y 28 ml de agua a 60 ml de acetato potásico 5 M. Se agitaba suavemente durante unos 10 seg y se incubaba en hielo durante 5 min. La mezcla se centrifugaba en una microcentrífuga Eppendorf durante 5 min en frío. El sobrenadante se recogía y se le añadía un volumen igual de fenol-cloroformo ( 50% de fenol, 48% de cloroformo y 2% de alcohol isoamílico ). Se agitaba vigorosamente, se centrifugaba en una microcentrífuga Eppendorf durante 2 min y se tomaba el sobrenadante. A éste se le añadía un volumen doble de etanol a temperatura ambiente. Después de centrifugar durante 5 min, se desechaba el sobrenadante y al sedimento se añadía 1 ml de etanol al 70%, se agitaba y se centrifugaba de nuevo. El precipitado se secaba sometiéndolo al vacío. El ADN resultante se resuspendía en 50  $\mu$ l de una solución de Tris-HCl, 50 mM

y Na<sub>2</sub>-EDTA, 20 mM, pH 8,0, conteniendo ARNasa ( 20 µg/ml ) libre de ADNasa.

#### 2.8.- DIGESTION CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.

A 10 µl de la muestra de ADN preparada como se indica en el apartado 2.7.2., se le añadía 1,2 µl de un tampón Tris-acetato, 33 mM, pH 7,9, que contenía: acetato potásico, 64 mM; acetato de magnesio, 10 mM, ditiotreitól, 0,5 mM y espermidina, 4 mM. A esta mezcla se le añadía 1 U de la enzima de restricción de que se tratara y se incubaba durante 2 h a la temperatura adecuada para la enzima.

#### 2.9.- LIGAMIENTO DE LOS FRAGMENTOS DE ADN.

El ligamiento de los fragmentos de ADN se realizó según el método descrito por Maniatis *et al*, ( 1982 ).

Se hacía una mezcla de reacción que contenía 1,5 µl de tampón de ligamiento constituido por Tris-HCl, 670 mM, pH 7,2; Na<sub>2</sub>-EDTA, 10 mM; MgCl<sub>2</sub>, 100 mM; ditiotreitól, 100 mM y ATP, 1 mM; 2 µl de la disolución del ADN vector; 2,5 µl de la del ADN que se iba a clonar; 0,2 µl de ligasa de T4 y 9 µl de H<sub>2</sub>O. Esta mezcla se dejaba estar a 15°C durante una noche. Con el ADN resultante se realizó la transformación de *E. coli* 5K, como se indica en el apartado 2.6.2..

## 2.10.- METODOS ANALITICOS.

### 2.10.1.- Determinación de nitrato.

El nitrato se determinó por absorbencia a 210 nm en disolución ácida, según el método descrito por Cawse ( 1967 ). A un volumen de 0,5 ml de muestra, conteniendo entre 0 y 400 nmoles de nitrato, se añadía 0,5 ml de ácido amidosulfúrico al 2% ( p/v ). Tras incubar 2 min a temperatura ambiente y agitar vigorosamente, se añadían 1,5 ml de ácido perclórico al 6,65%. Transcurridos 25 min a temperatura ambiente, se estimaba la concentración de nitrato midiendo la absorbencia de la disolución a 210 nm. Se empleó un coeficiente de extinción  $E_{1\text{cm}}^{1\text{mM}} = 6,4$ . El tratamiento con ácido amidosulfúrico elimina posibles contaminantes de nitrito presentes en la muestra que absorben también la luz ultravioleta en medio ácido.

### 2.10.2.- Determinación de nitrito.

El nitrito se determinó mediante la reacción de diazotación de Griess-Illesway, según el procedimiento descrito por Snell y Snell ( 1949 ). A 1 ml de muestra conteniendo entre 0-40 nmoles de nitrito, se añadía 1 ml de disolución de sulfanilamida al 1% ( p/v ) en HCl 2,4 N y 1 ml de una disolución de N-(1-naftil)etilendiamina diclorhidrato al 0,02% ( p/v ) en agua. Transcurridos 10 min a temperatura ambiente, se determinaba espectrofotométricamente la concentración del complejo coloreado utilizando un coeficiente de extinción a 540 nm  $E_{1\text{cm}}^{1\text{mM}} = 55$ .

### 2.10.3.- Determinación de $\gamma$ -glutamil-hidroxamato.

El  $\gamma$ -glutamil-hidroxamato se determinó por la reacción con  $\text{FeCl}_3$  en medio ácido, según Shapiro y Stadtman ( 1970 ). A 1 ml de la muestra que contenía el  $\gamma$ -glutamil-hidroxamato, se añadían 2 ml de un reactivo que, en 1 l, contenía: HCl al 37% ( v/v ), 7,73 ml; ácido tricloroacético al 20% ( v/v ), 60,24 ml;  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 33,33 g. La concentración del producto formado se determinó espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción a 500 nm de  $E_{1\text{cm}}^{1\text{mM}} = 3$ .

### 2.10.4.- Determinación de amonio.

El ión amonio se determinó enzimáticamente midiendo la oxidación de NADPH catalizada por la glutamato deshidrogenasa en la reacción de síntesis de glutamato a partir de 2-oxoglutarato y amonio, con cantidades limitantes de éste último ( Bergmeyer, 1974 ). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml, lo siguiente: Tris-tricina, pH 8,0, 250  $\mu\text{moles}$ ; 2-oxoglutarato, 10  $\mu\text{moles}$ ; ADP, 1,2  $\mu\text{moles}$ ; NADPH, 0,2-0,25  $\mu\text{moles}$  y la muestra en la que se quería determinar el amonio, que debía contener entre 0-80 nmoles del ión. La reacción, que se iniciaba con la adición de 20  $\mu\text{l}$  de una preparación de glutamato deshidrogenasa ( 7-10 U de enzima ), se dejaba desarrollarse durante 30 min a temperatura ambiente. La concentración de NADPH se determinaba espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción a 340 nm de  $E_{1\text{cm}}^{1\text{mM}} = 6,2$ . La oxidación de NADPH no relacionada con el amonio se corregía con blancos en ausencia del ión.



#### 2.10.5.- Determinación de etileno.

El etileno se determinó por cromatografía de gases empleando un cromatógrafo de gases PYE UNICAM 204, equipado con un detector de ionización de llama y una columna PORAPAK N. La temperatura del detector fue de 150°C, la de la columna de 80°C y la del inyector de 150°C. La señal de salida se recogía por un integrador PYE UNICAM DP 88 (MINIGRATOR). El contenido en etileno de las muestras gaseosas se determinó por comparación con patrones de composición conocida.

#### 2.10.6.- Determinación de alginato.

El alginato en el medio de cultivo se determinó según el método descrito por Jartman *et al*, ( 1978 ). Se tomaban 30 ml de cultivo al que se añadían NaCl, 5 M y Na<sub>2</sub>-EDTA, 0,5 M, 0,6 ml y se centrifugaban a 24.000 x g durante 20 min en frío. A 20 ml del sobrenadante, se le añadían 40 ml de alcohol isopropílico. Esta mezcla se agitaba y tras esperar 10 min, el precipitado obtenido se filtraba a través de un filtro GLASS MICROFIBRE PAPER ( GF/C ) de WHATMAN, que previamente había sido pesado, y se lavaba con unos 100 ml con una mezcla de alcohol isopropílico: agua ( 3:1 ). El filtro se secaba posteriormente en una estufa KOWELL a 80°C durante 24 h y se volvía a pesar. De la diferencia de pesos se obtenía la concentración de alginato.

## 2.10.7.- Determinación de la razón C/N.

Se centrifugaban entre 20-50 ml de cultivo a 9.000 x g durante 10 min a 0-4°C. El precipitado se lavaba con agua destilada y se centrifugaba de nuevo, operación que se repetía dos veces más. Tras este tratamiento, el precipitado resultante se traspasaba a un tubo de vidrio reforzado que se secaba en una estufa KOWELL a 80°C durante 3 días. Después de este tiempo, el tubo se colocaba en un desecador donde se enfrió hasta temperatura ambiente. Una vez frío, el material seco se pesaba en contenedores de estaño para la determinación de carbono ( C ) y nitrógeno ( N ). A continuación, las muestras así obtenidas se disponían en un revólver de un analizados CARLO ERBA STRUMENTAZIONE 1106 conectado a un integrador HEWLETT-PACKARD 3390A. Las muestras debían pesar entre 500 y 1500 µg y los contenedores de estaño eran lavados previamente con cloroformo y acetona para eliminar posibles residuos orgánicos, secándose a continuación en una estufa a 80°C.

Los análisis, que se efectuaron por triplicado, se hicieron utilizando los siguientes compuestos como patrones:

<u>Patrón</u>	<u>Proporción teórica ( % )</u>		
	C	N	H
Ciclohexanona 2,4- dinitro- fenilhidrazona	51,79	20,14	5,07
Sulfanilamida	41,84	16,27	4,68

En cada tanda de análisis se colocaron los dos patrones, también en una cantidad entre 500 y 1500 µg, en contenedores in

dependientes, empleándose como blanco un contenedor vacío.

#### 2.10.8.- Determinación del consumo de oxígeno.

El consumo de oxígeno se determinó en una unidad de electrodo de oxígeno HANSATECH conectada a un registrador PHILIPS PM 8251. La suspensión celular que se colocaba en la cámara de la unidad contenía 20-30  $\mu\text{g}$  de proteína/ml. Antes de cada ensayo el electrodo se calibraba utilizando agua recién destilada saturada de aire para determinar el 100% de oxígeno y la misma agua más unos cristales de ditionito para el 0%.

#### 2.10.9.- Determinación de proteína.

La determinación de proteína se llevó a cabo por el método de Lowry *et al*, ( 1951 ), con las modificaciones de Markwell *et al*, ( 1978 ), utilizando ovoalbúmina como patrón.

#### 2.10.10.- Análisis de ADN por electroforesis en gel de agarosa.

2.10.10.1.- Análisis del contenido en plásmidos de varias cepas de *A. chroococcum*.

Del ADN aislado como se describe en el apartado 2.7.1., se tomó una alícuota y se le añadió un volumen igual de solución F-SUDS compuesta por: Ficoll 400, 10%;  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , 0,1 M; SDS, 2%; azul de bromofenol y tampón Tris-acetato ( TAE ) constituido por 0,04 M de Tris-acetato y EDTA 1 mM, pH 8,0.

La muestra así preparada se sometía a electroforesis horizontal a 80 V durante 18 h a 3°C en gel de agarosa ( Sigma, tipo I ) al 0,7% ( p/v ), de 11,5x18,5 cm de tamaño, sumergido en tampón TAE.

Tras la electroforesis, el ácido nucleico en el gel, se teñía con bromuro de etidio ( 0,25 µg/ml ) durante 1 h. Tras des<sup>teñir</sup> en agua, se visualizaban las bandas iluminando con luz ultravioleta de onda corta.

#### 2.10.10.2.- Análisis de los fragmentos de ADN obtenidos tras la digestión con endonucleasas de restricción.

Una alícuota de las muestras de ADN obtenidas como se indica en 2.8. se mezclaba con el mismo volumen de F-SUDS, descrito en 2.10.10.1. y se sometía a electroforesis horizontal tal como se indica en el apartado anterior pero los geles contenían agarosa al 0,8% ( p/v ) y el voltaje utilizado fue de 30-40 v durante una noche , a temperatura ambiente. Como patrones se utilizaban una muestra de ADN constituida por fragmentos de tamaño conocido, obtenido comercialmente, y ADN del fago λ, también obtenido comercialmente, digerido previamente con la enzima *Hind* III.

Una vez realizada la electroforesis, la tinción de las bandas se realizó como se describe en el apartado anterior.

## 2.11.- TECNICAS EXPERIMENTALES.

### 2.11.1.- Determinaciones espectrofotométricas.

Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro BAUSCH-LOMB, modelo Spectronic 100 o PYE UNICAM SP-8-150 UV/VIS de doble haz.

### 2.11.2.- Medidas de pH.

El pH de las disoluciones se determinó con un medidor de pH BECKMAN, modelo Expandomatic SS 2 o RADIOMETER pHM 82.

### 2.11.3.- Medidas de flujos gaseosos.

El flujo de los gases utilizados se ha medido con un medidor de flujo marca FISCHER AND PORTER, FP 1/8-12-6-5/36, con flotador de zafiro.

## REACTIVOS

ADP, L-glutamato deshidrogenasa ( tipo II de hígado de vaca ), MOPS, MSX, MSF, DON, tricina, ovoalbúmina, Hepes, tetraciclina, kanamicina y rifampicina, eran de Sigma Chemical Co., St Louis ( EEUU ). El NADPH era de Boehringer, Mannheim ( R.F.A. ). Las enzimas de restricción y la ligasa de T4 eran de Boehringer o de Bethesda Research Laboratories ( EEUU ). Para los medios sólidos se utilizó Bacto-agar Difco, la bacto triptona y el extracto de levadura también eran de Difco. La azaserina y el metilviológeno eran de SERVA, Heidelberg ( R. F.A. ). El resto de los productos utilizados procedían de Merck, Darmstadt ( R.F.A. ), o de Sigma, St.Louis ( EEUU ).

El agua destilada se obtuvo mediante un destilador de vidrio DRA. Los gases utilizados eran de alta pureza y fueron suministrados por la S.E.O.

### **3. RESULTADOS**

3.1. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO Y ENSAYO OPTIMAS PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD NITROGENASA DE *A. chroococcum* ATCC 4412.

3.1.1. Efecto de las condiciones de cultivo sobre los niveles de actividad nitrogenasa en *A. chroococcum* ATCC 4412.

Los niveles de actividad nitrogenasa que se detectan en los cultivos de *A. chroococcum* ATCC 4412 dependen de las condiciones en las que se realizan esos cultivos. Se presentan aquí los resultados obtenidos en el estudio de la influencia de la fuente de nitrógeno presente en el medio y de la forma de suministrar aire, y por tanto, oxígeno, al cultivo sobre los niveles de dicha actividad.

La tabla III muestra la capacidad de crecimiento de *A. chroococcum* ATCC 4412 en medio BS sólido, en presencia de diversas fuentes de nitrógeno combinado bajo una atmósfera de Ar: O<sub>2</sub> ( 79%:21% ) carente, por tanto, de N<sub>2</sub>. Se observa que esta bacteria tan sólo puede utilizar como fuente de nitrógeno combinado las sales nitrato potásico y acetato amónico, y los aminoácidos glutamina y asparragina, siendo incapaz de utilizar el resto de los aminoácidos estudiados. Es muy probable que el crecimiento observado en presencia de glutamina y asparragina sea debido al amonio presente en las disoluciones de estos aminoácidos, que se produce por hidrólisis del grupo amido de ambos. Los aminoácidos glicina e histidina resultaron inhibidores para el crecimiento. La otra fuente de nitrógeno que resultó inhi



Tabla III. Crecimiento de *A. chroococcum* ATCC 4412 en medio BS sólido suplementado con diversas fuentes de nitrógeno y en presencia de una atmósfera de Ar:O<sub>2</sub>

Fuente de nitrógeno	Crecimiento
Ninguna	+
Arginina	+
Alanina	+
Fenilalanina	+
Leucina	+
Serina	+
Triptófano	+
Metionina	+
Asparragina	++
Prolina	+
NaNO <sub>2</sub>	-
KNO <sub>3</sub>	+++
Glutamato	+
Glutamina	++
Histidina	-
NH <sub>4</sub> OOCCH <sub>3</sub>	+++
Treonina	+
Glicina	-

Todos los compuestos nitrogenados se esterilizaron por filtración. Se realizó un cultivo de *A. chroococcum* ATCC 4412 en medio BS líquido del que se puso una alícuota del mismo volumen en placas conteniendo medio con las distintas fuentes de nitrógeno. Estas placas se incubaron durante 4 días a 30°C en cámaras herméticamente cerradas en las que se reemplazó la atmósfera aérea normal por una mezcla de Ar:O<sub>2</sub> (79%:21%). Los aminoácidos se añadieron a concentración final de 1 mg/ml; el KNO<sub>3</sub> y el NH<sub>4</sub>O<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>, a 10 mM y el NaNO<sub>2</sub> a 1 mM.

bidora del crecimiento fue el  $\text{NaNO}_2$  ( 1 mM ). Este hecho no resulta sorprendente pues se han descrito efectos negativos del nitrito sobre varios aspectos del metabolismo celular en diversos organismos ( Larsson y Andersson, 1981; Purczeld *et al*, 1978).

En la tabla IV se muestran los niveles de actividad nitrogenasa observados en presencia de las fuentes de nitrógeno utilizables por *A. chroococcum* ATCC 4412 . Se observa que únicamente en presencia de dinitrógeno se alcanzan altos niveles de actividad nitrogenasa.

Finalmente, se ha estudiado la influencia de la forma de suministrar aire al cultivo sobre la evolución y los niveles de la actividad nitrogenasa. La Figura 1 muestra que la actividad es tres veces mayor cuando al cultivo se le burbujea aire estéril ( a un flujo de 300-400 ml/min ), que cuando se mantiene en agitación ( 150 rpm ). Por lo demás, la evolución de actividad a lo largo del crecimiento es similar en ambos casos y muestra un máximo a  $\text{D.O}_{560} = 0,5$  para el cultivo con agitación, mientras en el cultivo al que se burbujea aire, el máximo de actividad se mantiene durante más tiempo (  $\text{D.O}_{560} = 0,5 = 0,1$  ). En ambos casos, tras el máximo, se observa un descenso de actividad hasta hacerse prácticamente indetectable. Si a estas células las sometemos a una aireación intensa, la actividad nitrogenasa resulta detectable de nuevo ( resultados no mostrados ), esto sugiere que, cuando el cultivo alcanza una alta densidad celular, el oxígeno empieza a ser limitante y causa el descenso de los niveles de actividad nitrogenasa.

Tabla IV. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el nivel celular de actividad nitrogenasa en *A. chroococcum* ATCC 4412

Fuente de nitrógeno	Actividad nitrogenasa (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /min·mg proteína)
N <sub>2</sub> (aire)	183
KNO <sub>3</sub> (10 mM)	5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (5 mM)	0

Células procedentes de un cultivo realizado en medio BS se cultivaron en medios con las fuentes de nitrógeno indicadas. En fase exponencial del crecimiento se tomaron alícuotas de 2 ml en las que se determinó la actividad nitrogenasa.

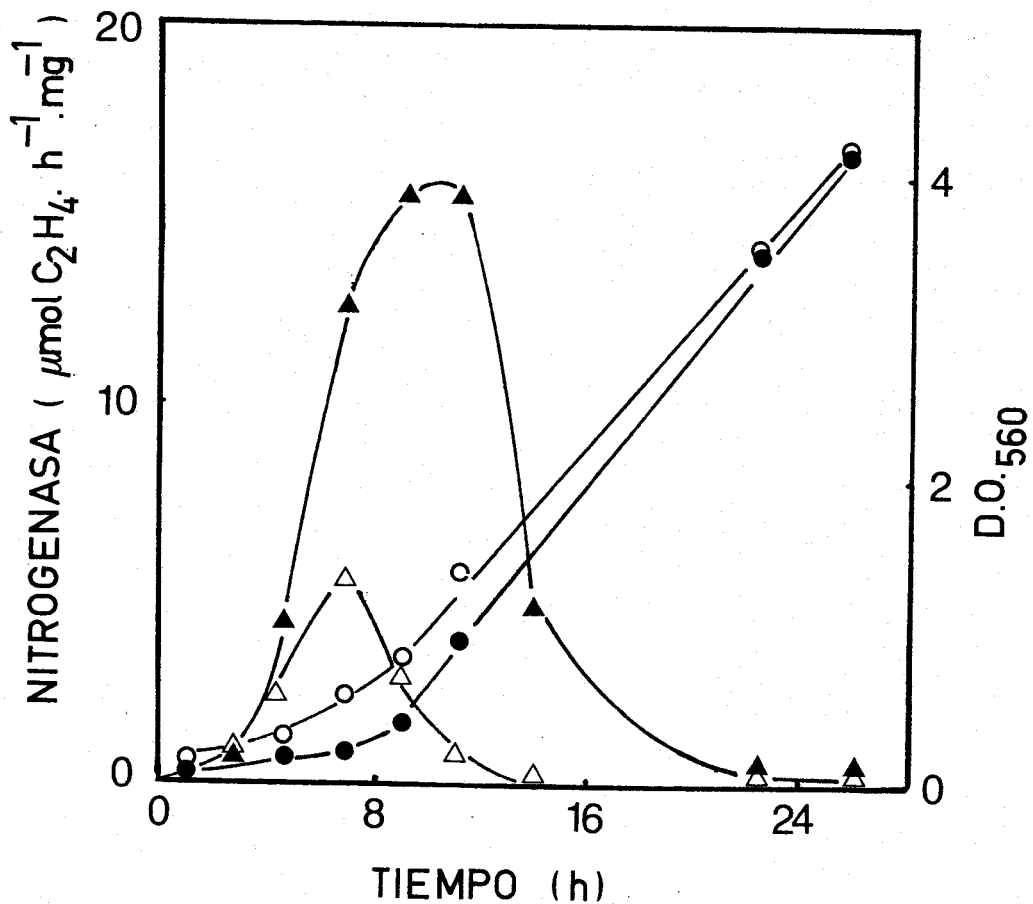


Figura 1. Efecto de las condiciones de cultivo de *A. chroococcum* ATCC 4412 sobre la evolución de la actividad nitrogenasa. Los símbolos abiertos representan la actividad nitrogenasa (Δ) y el crecimiento (o), determinado como aumento de la D.O. 560, en un cultivo de *A. chroococcum* ATCC 4412 en medio BS al que se suministró aire mediante agitación (150 rpm). Los símbolos cerrados expresan actividad nitrogenasa (▲) y crecimiento (●) cuando el aire se suministró mediante burbujeo.

### 3.1.2. Determinación de las condiciones óptimas para el ensayo de la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412.

En el apartado anterior hemos visto la gran incidencia que tiene la  $pO_2$  del cultivo sobre los niveles y el comportamiento de la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412.

Los experimentos en los que se ha estudiado la regulación de esta actividad, requerían una producción de etileno lineal durante al menos 2 horas. Como el matraz en el que se realiza el ensayo está cerrado, hemos estudiado las condiciones óptimas de modo que la  $pO_2$  sea lo suficientemente elevada para que el oxígeno no sea limitante en el tiempo de duración del ensayo, y que, al mismo tiempo, no resulte inhibidora de la propia actividad.

En primer lugar, se ha fijado la densidad celular de la muestra para el ensayo. Hemos elegido una concentración de proteína en torno a 70  $\mu\text{g/ml}$ , que es la concentración con la que se observa el máximo de actividad en el cultivo ( Figura 1 ).

Un factor que, como hemos dicho, resulta muy crítico en el ensayo de la actividad nitrogenasa, es la  $pO_2$  ( Drozd y Postgate, 1970a). Dado que la  $pO_2$  óptima para el ensayo es, a su vez, dependiente de las condiciones en las que se realiza el cultivo ( Drozd y Postgate, 1970b ), nosotros hemos establecido la óptima para nuestras condiciones. Otro factor que influye en el ensayo de la actividad es la agitación a la que se somete la mezcla de reacción, ya que repercute en la velocidad de disolu

ción del oxígeno en el medio. También se ha estudiado la influencia del medio líquido en el que se resuspenden las células sobre la actividad nitrogenasa. En la Tabla V se presenta la actividad nitrogenasa obtenida con células resuspendidas en diferentes medios, todos ellos a pH 7,5 y suplementados con sacarosa al 1% ( p/v ), así como en medio de cultivo BS, ya descrito en Materiales y Métodos, cuyo pH es también 7,5. El tampón MOPS-KOH, 50 mM, pH 7,5 y el medio BS, resultaron ser los más adecuados..

La agitación óptima para el ensayo resultó ser de 100 oscilaciones por minuto ( Tabla VI ).

La Figura 2 muestra el efecto de la  $pO_2$  sobre el ensayo de la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412. Para todas las  $pO_2$  se utilizó la agitación de 100 oscilaciones por minuto y la muestra contenía 60  $\mu$ g de proteína/ml. En estas condiciones la  $pO_2$  más adecuada resultó ser del 20%.

Estas condiciones de ensayo permiten una producción de etileno que es lineal practicamente desde el comienzo del mismo y que se mantiene durante al menos 2 horas.

Tabla V. Efecto de la naturaleza del medio en el que se resuspenden las células sobre el ensayo de la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412.

Medio	Actividad nitrogenasa (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /min.mg proteína)
MOPS-KOH, 50 mM, pH 7,5	110
Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5	30
Fosfato 50 mM, pH 7,5	50
Medio BS	133

Células cultivadas en medio BS libre de nitrógeno se recogieron por centrifugación, se lavaron una vez con el medio correspondiente y se resuspendieron en el mismo medio a una densidad celular de 70 µg de proteína/ml. Todos los medios contenían sacarosa al 1% (p/v). La actividad nitrogenasa se determinó como se describe en Materiales y Métodos.

Tabla VI. Efectos de la agitación sobre la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412

Agitación (oscilaciones·min <sup>-1</sup> )	Actividad nitrogenasa (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /min·mg proteína)
70	114
85	140
100	151
150	5

Células cultivadas en medio BS se recogieron por centrifugación, se lavaron una vez con medio BS y se resuspendieron en el mismo medio a una densidad celular de 60 µg de proteína/ml. El ensayo de la actividad nitrogenasa se realizó con las agitaciones indicadas.



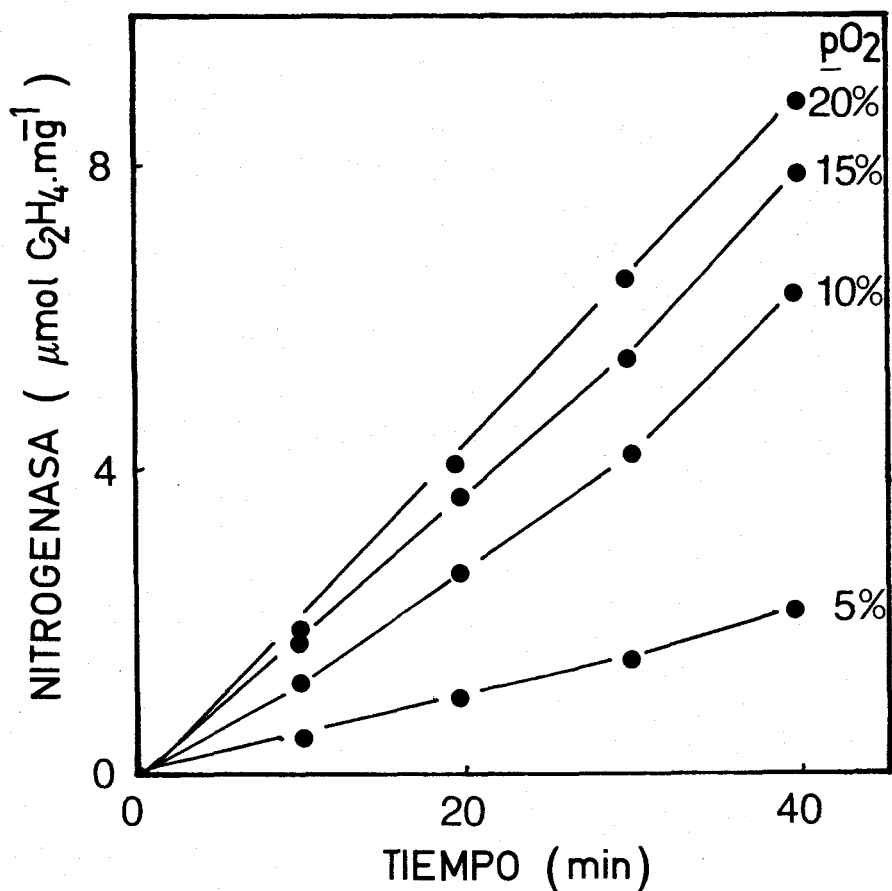


Figura 2. Efecto de la  $pO_2$  sobre la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412.

El ensayo de la actividad nitrogenasa se realizó como se describe en el apartado 2.3.5. de Materiales y Métodos. La atmósfera normal de los matraces Erlenmeyer se reemplazó por una mezcla de Ar:O<sub>2</sub>, en la que la  $pO_2$  era la indicada en cada caso. Las suspensiones celulares contenían 60 μg de proteína/ml.

### 3.2. REGULACION DE LA FIJACION DE NITROGENO EN *Azotobacter*.

Una característica esencial de cualquier organismo es la capacidad de regular sus procesos bioquímicos en respuesta a cambios en las condiciones ambientales y nutricionales.

Ya vimos en Introducción que el proceso de la fijación de nitrógeno resulta extremadamente costoso para los microorganismos que lo realizan, tanto por la demanda de ATP como por el requerimiento de poder reductor. No es de extrañar, por tanto, que la actividad y la síntesis de la nitrogenasa estén sometidas a una regulación muy precisa.

En este apartado se presentan resultados acerca del papel que juega el amonio, producto de la reducción del nitrógeno, en la regulación de la actividad nitrogenasa de *Azotobacter chroococcum*.

#### 3.2.1. Papel del amonio en la regulación de la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412.

##### 3.2.1.1. Efecto del amonio sobre los niveles celulares de nitrogenasa.

La tabla IV del apartado anterior muestra que *A. chroococcum* ATCC 4412 cultivado en medio con amonio como fuente de nitrógeno, carece de actividad nitrogenasa.

### 3.2.1.2. Efecto del amonio sobre la actividad nitrogenasa.

Además del efecto descrito anteriormente, que afecta a los niveles celulares de actividad nitrogenasa y al que se denomina efecto a largo plazo, o sobre la síntesis de la enzima, el amonio ejerce un segundo efecto sobre la nitrogenasa. Este efecto se manifiesta muy poco después de añadir el ión a la suspensión celular y afecta a la actividad enzimática ( Figura 3 ). El experimento que se presenta en esta figura permite observar también las dos características fundamentales de esta inhibición; en primer lugar, ésta depende del consumo del ión y, en segundo lugar, la inhibición tiene carácter reversible, ya que la actividad se recupera una vez que el amonio ha sido consumido.

El grupo de experimentos que se describe a continuación se ha realizado con el objeto de estudiar el mecanismo por el que ocurre la inhibición de actividad nitrogenasa que acabamos de describir.

### 3.2.1.3. Efecto de diversos inhibidores de la ruta GS/GOGAT sobre la inhibición por amonio de la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412.

Para dilucidar si el amonio inhibe la actividad nitrogenasa *per se* o a través de productos derivados de su asimilación, una aproximación experimental empleada ha consistido en utilizar células en las que la asimilación del amonio ha sido bloq

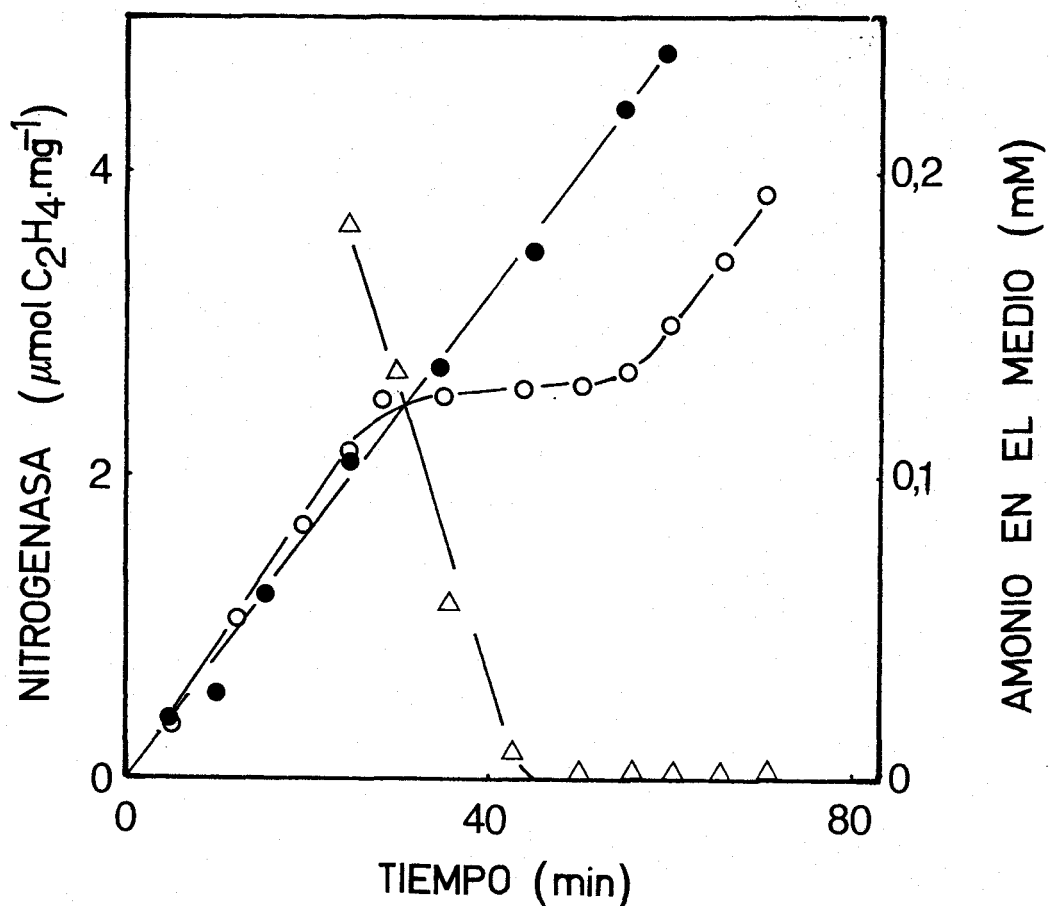


Figura 3. Inhibición de la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412 por  $\text{NH}_4^+$  y su reversión una vez consumido el ión.

El experimento se realizó como se describe en Materiales y Métodos, apartado 2.5. A dos de las muestras se añadió  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.3 mM, en una de ellas se determinó la actividad nitrogenasa (○) y en la otra el consumo de amonio (Δ). Paralelamente se determinó la actividad en un control sin adiciones (●).

queada por tratamiento con inhibidores de alguna de las enzimas implicadas en dicha asimilación.

De las diferentes rutas para la asimilación del amonio que se han descrito ( Mi<sup>fl</sup>in y Lea, 1976; Tyler, 1978 ), en *A. chroococcum* ATCC 4412 tan sólo se ha detectado la constituida por las enzimas glutamina sintetasa/glutamato sintasa, abreviadamente GS/GOGAT ( Bárcena, 1980 ).

En este trabajo se han utilizado diversos inhibidores de ambas enzimas. Uno de estos ha sido la L-metionina-D,L-sulfoximina ( MSX ), que es un inhibidor competitivo de la glutamina sintetasa ( Meister, 1980 ), cuya efectividad ha sido descrita en diversos microorganismos ( Brenchley, 1973; Gordon y Brill, 1974 ).

La Tabla VII muestra el efecto de distintas concentraciones de MSX sobre la actividad glutamina sintetasa de *A. chroococcum* ATCC 4412. Se observa que tras 40 min de tratamiento, la inhibición de la actividad es total cuando la concentración de MSX es de 5 mM.

La adición de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( 5 mM ) a una suspensión de células tratadas con MSX, y, por tanto, con la glutamina sintetasa inactiva, no tiene ningún efecto inhibitor sobre la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412 ( Figura 4 ).

La segunda reacción de la ruta GS/GOGAT consiste en la transferencia del grupo amido de la glutamina al 2-oxoglutarato para formar glutamato, reacción catalizada por la glutamato sintasa. Se han descrito inhibidores de esta enzima, entre ellos,

Tabla VII. Efecto de distintas concentraciones de MSX sobre la actividad glutamina sintetasa de *A. chroococcum* ATCC 4412

MSX (mM)	Actividad glutamina sintetasa (%)
0	100
0,05	60
0,5	37
1	19
5	0

Células cultivadas en medio BS se recogieron por centrifugación, se lavaron con medio fresco y se resuspendieron en el mismo medio suplementado con las concentraciones de MSX que se indican. La actividad glutamina sintetasa se determinó tras 40 min de incubación en estas condiciones, con agitación. La actividad de la suspensión sin MSX (18,5 mU/mg de proteína) se considera 100%.

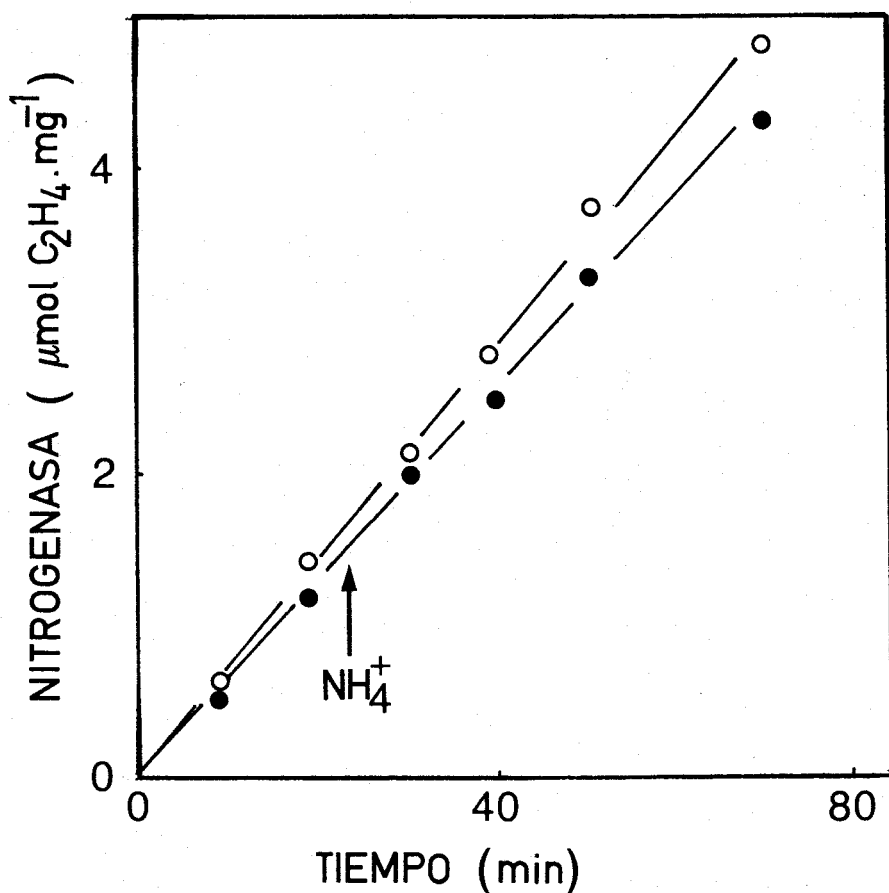


Figura 4. Efecto del amonio sobre la actividad nitrogenasa de células de *A. chroococcum* ATCC 4412 pretratadas con MSX.

Antes de iniciar el ensayo de actividad nitrogenasa, las células fueron incubadas en presencia de MSX, 5 mM, con agitación durante 15 min. A una de las muestras se añadió NH<sub>4</sub>Cl, 5mM, al tiempo indicado en la figura (○). Paralelamente se determinó la actividad nitrogenasa en un control sin adiciones (●).

la azaserina ( Prusiner y Stadtman, 1973 ) y la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina ( DON ). Otros inhibidores de esta enzima lo son también de la glutamina sintetasa, este es el caso de la metionina sulfona ( MSF ) ( Brenchley, 1973 ).

Se ha estudiado el efecto del amonio sobre la actividad nitrogenasa de células pretratadas con una concentración 5 mM de estos inhibidores, durante 15 min. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla VIII en la que se observa que el pretratamiento con cualquiera de éstos, protege a la nitrogenasa de la inhibición por amonio. Estos resultados confirman los obtenidos con MSX y muestran que el amonio tiene que ser asimilado para ejercer la inhibición de la actividad nitrogenasa en *A. chroococcum* ATCC 4412.

Ya se ha descrito anteriormente que la inhibición de la actividad nitrogenasa por amonio es reversible ( Figura 3 ). En células de *A. chroococcum* ATCC 4412, cuya actividad nitrogenasa ha sido inhibida por amonio, el tratamiento con estos inhibidores debe provocar, al impedir la asimilación del ión, una situación en la célula semejante a la que se produce cuando el amonio se consume totalmente. La figura 5 muestra, para el caso de la MSX, que la adición del inhibidor produce una rápida reversión de la actividad nitrogenasa, previamente inhibida por amonio. El tiempo que tarda en producirse la reversión, unos 20 minutos, es el que se requiere para que la MSX promueva un alto grado de inhibición de la glutamina sintetasa. Experimentos similares a éste se han realizado con los inhibidores azaserina, DON y MSF. Los resultados obtenidos se resumen



Tabla VIII. Protección con inhibidores de la ruta GS/GOGAT de la inhibición por amonio de la actividad nitrogenasa de *A. choroococcum* ATCC 4412

Tratamiento	Actividad nitrogenasa (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /min·mg proteína)
Azaserina	66
Azaserina + NH <sub>4</sub> Cl	56
MSF	112
MSF + NH <sub>4</sub> Cl	112
DON	53
DON + NH <sub>4</sub> Cl	53

Las condiciones experimentales son las descritas en la Figura 4. Los inhibidores fueron añadidos a concentración de 5 mM. El NH<sub>4</sub>Cl, también 5 mM, se añadió 20 min después de haberse iniciado los ensayos.

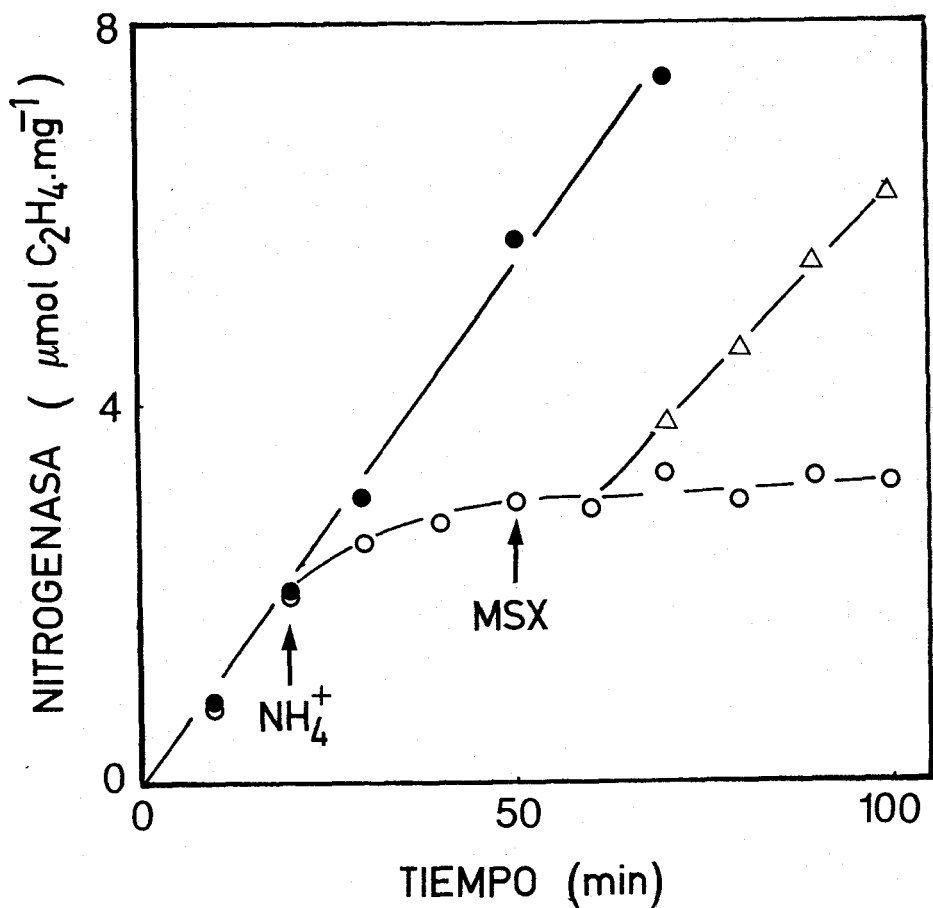


Figura 5. Reversión por MSX del efecto inhibitor del amonio sobre la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412.

El experimento se realizó con tres muestras de la suspensión celular (72 μg de proteína/ml). A los tiempos indicados se añadió NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM, (○) o NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM, y MSX, 5 mM, (Δ). Paralelamente se determinó la actividad en el control sin adiciones (●).

en la Tabla IX. Cabe destacar que la recuperación de la actividad no es en ningún caso del 100% y que la azaserina es sensiblemente menos efectiva que el resto de los inhibidores estudiados.

#### 3.2.1.4. Efecto de los inhibidores de la ruta GS/GOGAT sobre el consumo de amonio en *A. chroococcum* ATCC 4412.

Los resultados mostrados anteriormente sugieren que la inhibición de la actividad nitrogenasa por amonio a tiempo corto requiere, no sólo la entrada del ión al interior celular, sino su asimilación. Sin embargo, este efecto inhibitorio ha sido explicado por Laane *et al* ( 1980 ), en base a que el amonio, dada su naturaleza catiónica, provocaría una disminución del potencial de membrana que sería la responsable de la inhibición de la actividad nitrogenasa en *A. vinelandii*.

A la luz de esta propuesta es interesante estudiar el efecto de los inhibidores de la ruta GS/GOGAT sobre el consumo de amonio en *A. chroococcum* ATCC 4412 para tratar de discernir si estos inhibidores afectan sólo a la asimilación del ión o también a su entrada al interior celular. En la Figura 6 se observa que la adición de MSX, 5 mM, no sólo inhibe el consumo de amonio, sino que tras un tiempo corto, tiene lugar la excreción del ión al medio extracelular. Se ha estudiado también el efecto de otros compuestos nitrogenados sobre el consumo de amonio en esta bacteria. La Tabla X muestra que, al igual que la MSX, la MSF es un inhibidor efectivo del consumo de amonio,

Tabla IX. Reversión de la inhibición por amonio de la nitrógenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412 con varios inhibidores de la ruta GS/GOGAT

Inhibidor	Reversión (%)
Ninguno	0
MSX	63
MSF	70
Azaserina	20
DON	60

Las condiciones experimentales son las descritas en la Figura 5. En cada caso se considera 100% de actividad la tasa de producción de etileno anterior a la adición del amonio. Tanto los inhibidores como el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  fueron añadidos a concentración de 5 mM.

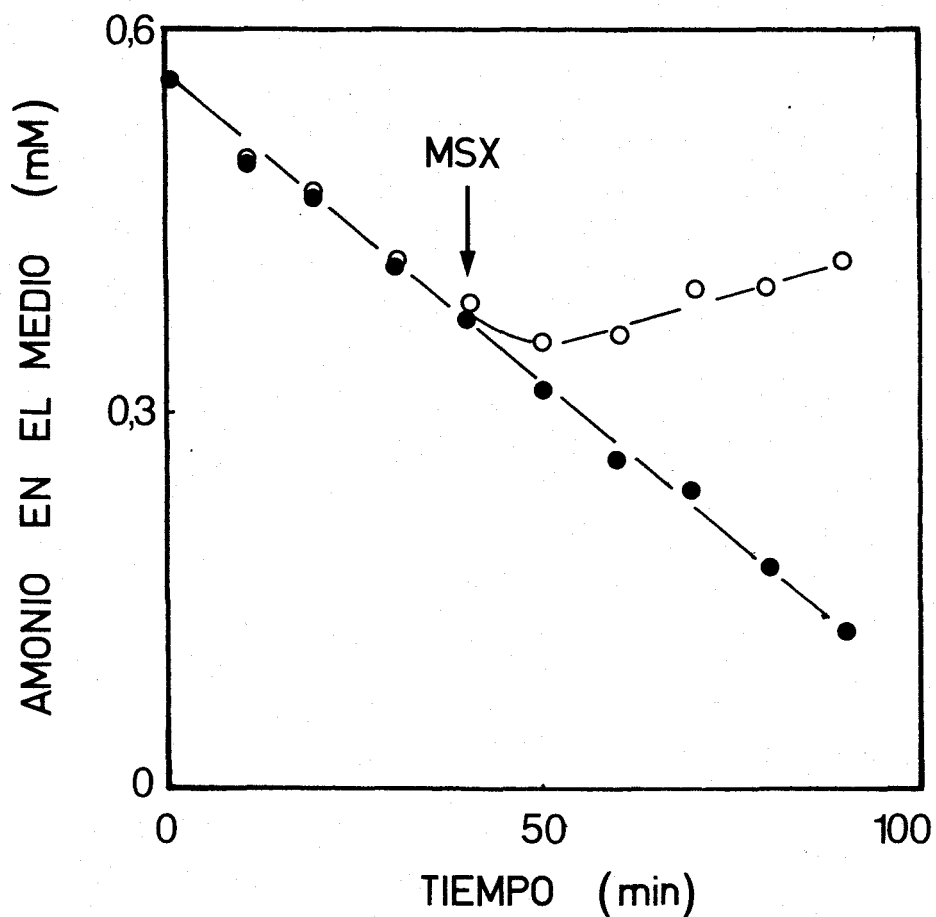


Figura 6. Efecto de la adición de MSX sobre el consumo de amonio por células de *A. chroococcum*. ATCC 4412.

El experimento se inició por la adición de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . El consumo de amonio se determinó como se indica en el apartado 2.4 de Materiales y Métodos en una suspensión sin adiciones (●) o con la adición de MSX, 5 mM, (○) cuando indica la flecha. La suspensión celular contenía 70  $\mu\text{g}$  de proteína/ml.

Tabla X. Efecto de diferentes compuestos nitrogenados sobre el consumo de amonio por *A. chroococcum* ATCC 4412

Compuesto añadido	Consumo de amonio (%)
Ninguno	100
MSX	0
MSF	0
Azaserina	61
Glutamina	77
Glicilglicina	100

Las condiciones experimentales son las descritas en la Figura 6. Los compuestos MSX, MSF, DON, azaserina y glicilglicina se añadieron a una concentración de 5 mM, la glutamina a 10 mM. Se considera una tasa de consumo del 100% a la determinada en cada caso antes de añadir el compuesto nitrogenado.

mientras que la azaserina tan sólo lo inhibe parcialmente. Este hecho puede explicar la menor eficiencia de la azaserina en la reversión de la actividad nitrogenasa una vez inhibida ésta por amonio, que es únicamente del 20%, siendo las reversiones promovidas por MSX y MSF del 70% aproximadamente ( Tabla IX ).

Otros compuestos nitrogenados, como la glutamina o la glicilglicina, que no son inhibidores de la glutamina sintetasa, tienen escaso efecto inhibitor sobre el consumo de amonio.

La posibilidad de que estos inhibidores de la ruta GS/GOGAT y otros compuestos nitrogenados análogos de la glutamina, inhiban la propia entrada del amonio al interior celular ha sido propuesta por Jayakumar y Barnes ( 1984 ), para *A. vinelandii*. La misma propuesta ha sido hecha en *Anabaena flos-aquae* para el caso concreto de la MSX ( Turpin *et al*, 1984 ). Estas propuestas abren la posibilidad de que la falta de efecto inhibitor del amonio sobre la nitrogenasa en células tratadas con estos inhibidores se deba a que el ión no sea transportado al interior celular más que a su no asimilación.

Para aclarar este punto, se buscaron condiciones que demostraran la existencia de amonio en el interior celular en células tratadas con el inhibidor MSX. Ya vimos en el experimento que se muestra en la Figura 6, que, como consecuencia del tratamiento con MSX, se observa un aumento de la concentración de amonio en el medio extracelular. Los datos que se presentan en las Figuras 7 y 8, demuestran que el amonio excretado se debe a la fijación de N<sub>2</sub>. Así, si a células de *A. chrooco-*

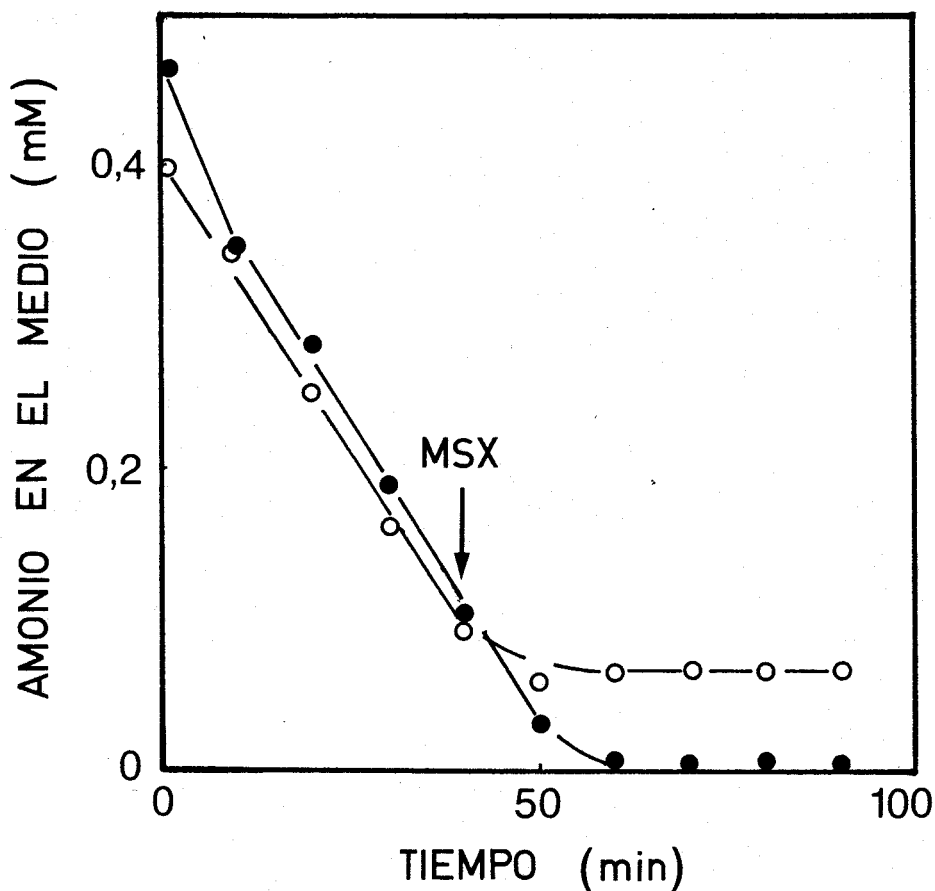


Figura 7. Efecto de la adición de MSX sobre el consumo de amonio por células de *A. chroococcum* ATCC 4412 en presencia de una atmósfera de Ar:O<sub>2</sub>.

Células cultivadas en medio BS se recogieron por centrifugación, se lavaron con tampón MOPS-KOH, 50 mM, pH=7,5 y se resuspendieron en el mismo tampón suplementado con sacarosa 1% (p/v). Los ensayos se realizaron en matraces Erlenmeyer cerrados herméticamente en los que la atmósfera normal se reemplazó por una mezcla de Ar:O<sub>2</sub> (79%:21%) y se iniciaron por la adición de NH<sub>4</sub>Cl. El consumo se determinó en una muestra sin adiciones (●) o con la adición de MSX, 5 mM, (○), donde se indica con la flecha. La suspensión celular contenía 70 µg de proteína/ml.



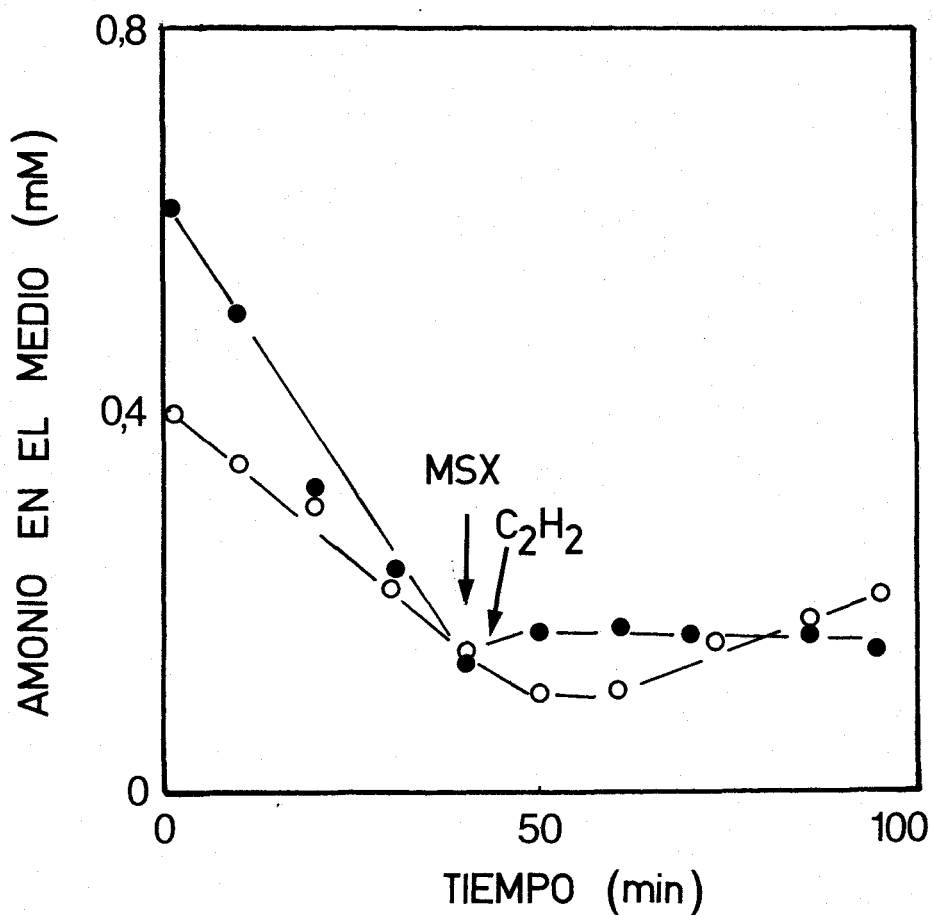


Figura 8. Efecto del acetileno sobre la excreción de amonio al medio por células de *A. chroococcum* ATCC 4412 tratadas con MSX.

El experimento se realizó en matraces Erlenmeyer como se indica en la figura anterior. Donde indican las flechas a ambas muestras se les añadió MSX, 5 mM, sin acetileno (o), o con acetileno, 10% (v/v), (●). La suspensión celular contenía 70 µg de proteína/ml.

*ccum* ATCC 4412 consumiendo amonio, se les añade MSX, y el experimento se realiza con una atmósfera de Ar:O<sub>2</sub> ( 79%:21% ), libre de nitrógeno, el consumo de amonio se inhibe, pero la concentración extracelular de amonio no aumenta ( Figura 7 ). Si el experimento se realiza con una atmósfera normal, es decir, en presencia de N<sub>2</sub>, pero al añadir MSX, se añade también acetileno, 10% ( v/v ), que inhibe la fijación de nitrógeno, tampoco se observa aumento en la concentración extracelular de amonio.

A partir de estos datos, cabe deducir que en las células tratadas con MSX, se estaría reduciendo N<sub>2</sub> hasta amonio mediante la nitrogenasa, y éste, al no poder ser asimilado, se acumularía en el interior celular, sin inhibir la actividad nitrógenasa, y posteriormente se empezaría a excretar al medio extracelular.

### 3.2.1.5. Efecto de la metilamina sobre la actividad nitrogenasa.

La metilamina es un análogo del amonio que, debido a la posibilidad de ser marcado con <sup>14</sup>C, se ha utilizado mucho en estudios de transporte de amonio en diferentes microorganismos ( Kleiner, 1985 ).

Recientemente, estudios llevados a cabo por diferentes grupos en *A. vinelandii*, han puesto de manifiesto que la metilamina no se acumula como tal en el interior celular, sino que es transformada por la glutamina sintetasa para dar  $\gamma$ -glutamilo

metilamida, que no puede seguir siendo metabolizada y se acumula ( Barnes *et al*, 1983; Moore y Gordon, 1984 ). Estos resultados ponen en duda la posibilidad de estudiar el transporte de amonio utilizando este análogo, dado que el  $^{14}\text{C}$  acumulado en el interior celular corresponde mayoritariamente a la  $\gamma$ -glutamilmetilamida y no a la metilamina. En otros microorganismos también se ha observado acumulación de este compuesto, tal es el caso de *Rhizobium* ( Guber y Kashket, 1983 ) o *Rhodospseudomonas capsulata* ( Yoch *et al*, 1983 ).

*A. vinelandii*, por tanto, no puede utilizar metilamina como fuente de nitrógeno. La Figura 9 muestra que *A. chroococcum* ATCC 4412 es también incapaz de crecer en presencia de metilamina como única fuente de nitrógeno.

La tabla XI muestra el escaso efecto inhibitorio de la metilamina sobre la actividad nitrogenasa, ya que son necesarias concentraciones elevadas del ión ( 10-20 mM ) para lograr una inhibición del 25% aproximadamente.

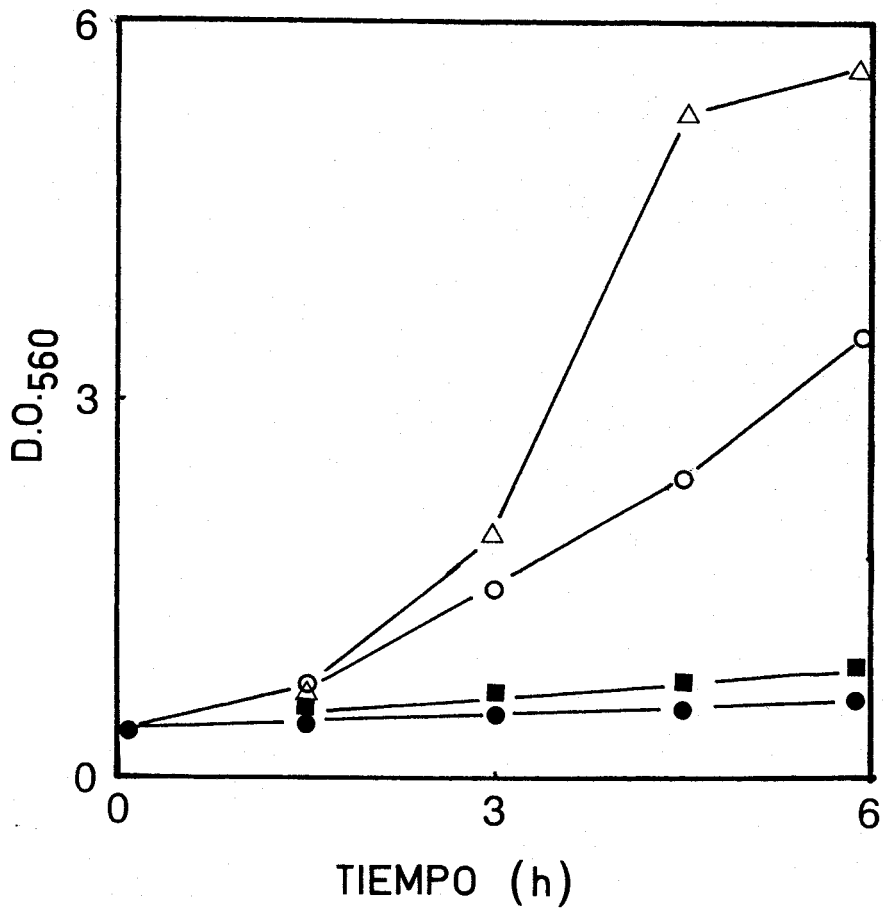


Figura 9. Crecimiento de *A. chroococcum* ATCC 4412 con NH<sub>4</sub>Cl o metilamina como fuente de nitrógeno.

Células procedentes de un cultivo realizado diazotróficamente se inocularon en medio BS sin suplementar (o) o suplementado con NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM, (Δ) a los que se burbujeaba aire estéril, o bien, una mezcla de Ar:O<sub>2</sub> (79%:21%) sin suplementar (■) o suplementado con NH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-HCl, 10 mM, (●).

Tabla XI. Efecto de la metilamina sobre la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412

Metilamina (mM)	Actividad nitrogenasa (%)
0	100
1	100
5	100
10	80
20	72

Células cultivadas en medio BS se recogieron por centrifugación, se lavaron con medio fresco y se resuspendieron en el mismo medio a una densidad celular de 65  $\mu\text{g}$  de proteína  $\text{ml}^{-1}$ . A los 30 min de iniciado el ensayo se añadió la metilamina a las concentraciones indicadas. Se considera 100% de actividad, la tasa de producción de etileno anterior a la adición de la metilamina.

### 3.2.2. Regulación de la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412 por nitrato.

Los resultados presentados en el apartado 3.2.1., en los que se describe el efecto inhibitorio del amonio sobre la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412, sugieren que el ión no ejerce la inhibición *per se*, sino que requiere ser asimilado mediante la participación de las enzimas GS/GOGAT y que son productos derivados de esta asimilación los responsables de la inhibición.

Estos datos permiten formular una hipótesis según la cual altos niveles celulares de metabolitos carbono-nitrógeno, estado al que se llegaría como consecuencia de la asimilación de amonio, darían lugar a una situación inhibitoria de la actividad nitrogenasa, mientras que condiciones en las que los niveles de estos metabolitos sean bajos, implicarían un estado no inhibitorio de la actividad.

Como se describe en Introducción, *A. chroococcum* es una bacteria que además de  $N_2$ , puede utilizar nitrato, nitrito ( si es añadido a baja concentración ) y amonio como fuentes de nitrógeno.

El nitrato, al igual que el amonio, inhibe la síntesis de nitrogenasa. Por otro lado, el nitrato es inductor de la síntesis de nitrato reductasa y nitrito reductasa, necesarias para su propia asimilación en *A. chroococcum* ATCC 4412 ( Revilla *et al*, 1985 ). Así pues, una característica importante de

la fijación de nitrógeno en *A. chroococcum*, es que es incompatible con la asimilación de nitrato, de modo que células cultivadas diazotróficamente, carecen de las reductasas de nitrato y nitrito y, por el contrario, células cultivadas en presencia de nitrato, carecen de actividad nitrogenasa.

Si el amonio ejerce la inhibición de la actividad nitrogenasa mediante productos de su asimilación, el nitrato, que es reducido a nitrito y amonio para ser asimilado, también debe ejercer inhibición sobre la actividad nitrogenasa.

Para el estudio del efecto del nitrato sobre la actividad nitrogenasa es necesario encontrar condiciones experimentales en las que las células de *A. chroococcum* ATCC 4412 tengan, simultáneamente, capacidad de asimilar nitrato y de fijar nitrógeno. En este apartado se presentan resultados referentes al establecimiento de estas condiciones experimentales y el posterior estudio de la regulación de la actividad nitrogenasa por nitrato y nitrito.

#### 3.2.2.1. Obtención de células de *A. chroococcum* ATCC 4412 con capacidad de fijar $N_2$ y de consumir nitrato simultáneamente.

Se han puesto a punto dos métodos de obtención de células con actividad nitrogenasa que simultáneamente exhiben capacidad de consumo de nitrato. El primero de ellos consiste en incubar en presencia de  $KNO_3$ , 10 mM, células de *A. chroococcum*

ATCC 4412 cultivadas diazotróficamente. En la tabla XII se observa que a la progresiva disminución de los niveles de actividad nitrogenasa ( 55% de la actividad inicial a las 3 horas de incubación ) acompaña la inducción de la capacidad de consumo de nitrato ( 66,2 nmoles de nitrato/min. mg de proteína tras 3 horas ). Así pues, mediante la incubación durante un periodo de 2-3 h en las condiciones descritas, se obtienen células en las que ambas actividades son fácilmente detectables.

El segundo método utilizado consiste en incubar células de *A. chroococcum* ATCC 4412, que han sido cultivadas en presencia de  $\text{KNO}_3$ , en medio libre de nitrógeno combinado. La Figura 10 muestra la evolución de ambas actividades. Se observa que la inducción de la actividad nitrogenasa va acompañada por un descenso de la capacidad de consumo de nitrato. Con este procedimiento basta una incubación de unos 30 minutos para obtener células en las que ambas actividades son fácilmente detectables.

3.2.2.2. Efecto del nitrato sobre la actividad nitrogenasa de células de *A. chroococcum* ATCC 4412 con capacidad de consumo de nitrato y actividad nitrogenasa simultáneamente.

La Figura 11 muestra que la adición de  $\text{KNO}_3$ , 5 mM, a una suspensión de células de *A. chroococcum* ATCC 4412 cultivadas en medio BS libre de nitrógeno combinado y, por tanto, incapaz de asimilar nitrato, no ejerce efecto inhibitor alguno



Tabla XII. Efecto del nitrato sobre los niveles de actividad nitrogenasa y de consumo de nitrato de *A. chroococcum* ATCC 4412 cultivadas diazotróficamente

Tiempo (h)	Consumo de nitrato (nmol NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /min·mg proteína)	Actividad nitrogenasa (%)
0	0	100
1	0	82
2	37,5	53
3	66,5	55

Células cultivadas en medio BS se recogieron por centrifugación, se lavaron con medio fresco, se resuspendieron en el mismo medio suplementado con KNO<sub>3</sub> (5 mM) y se incubaron en condiciones de cultivo. A los tiempos indicados se determinaron la actividad nitrogenasa y la tasa de consumo de nitrato. 100% de actividad nitrogenasa corresponde a 220 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/min mg de proteína.

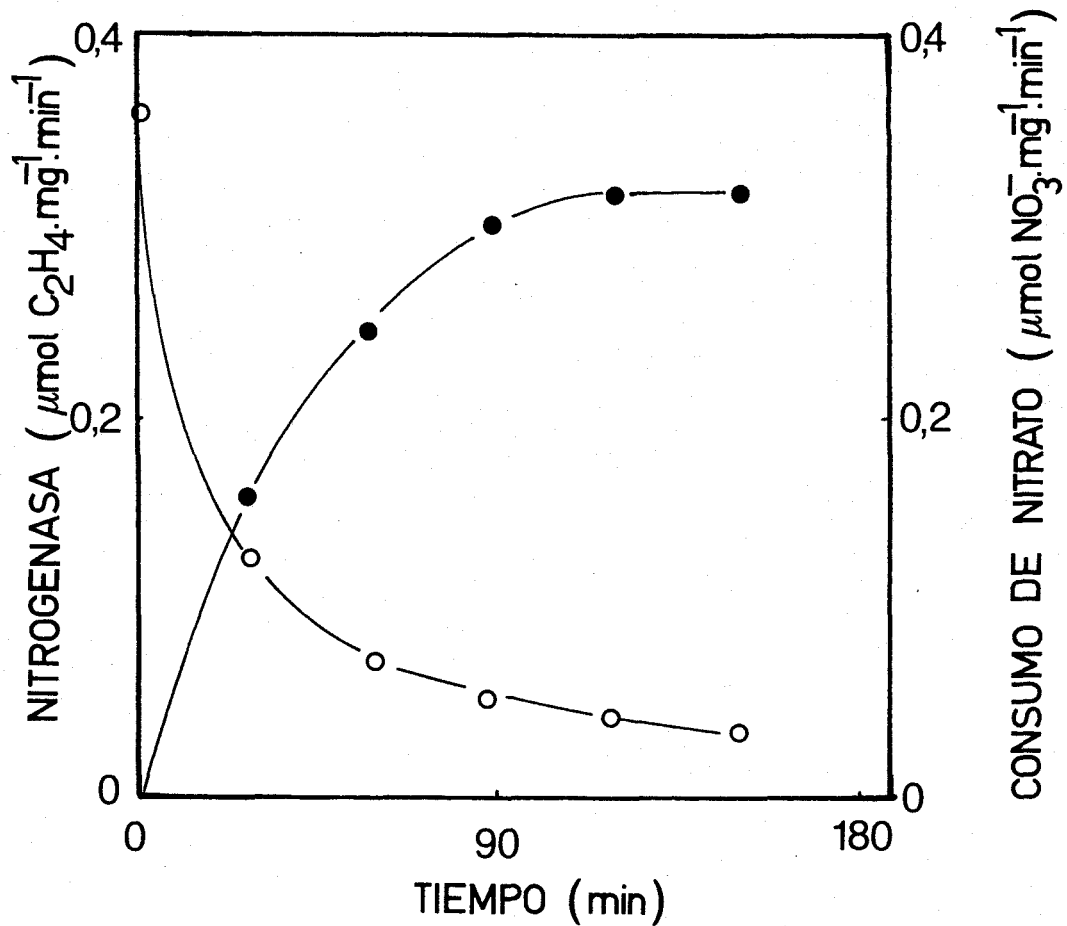


Figura 10. Desrepresión de la actividad nitrogenasa y represión de la capacidad de consumo de nitrato en células de *Azotobacter chroococcum* ATCC 4412.

Células cultivadas en medio BS suplementado con  $\text{KNO}_3$  se recogieron por centrifugación, se lavaron con medio fresco libre de nitrógeno, se resuspendieron en el mismo medio y se incubaron en condiciones de cultivo. A los tiempos indicados se tomaron muestras a las que se determinó actividad nitrogenasa (●) y consumo de nitrato (○).

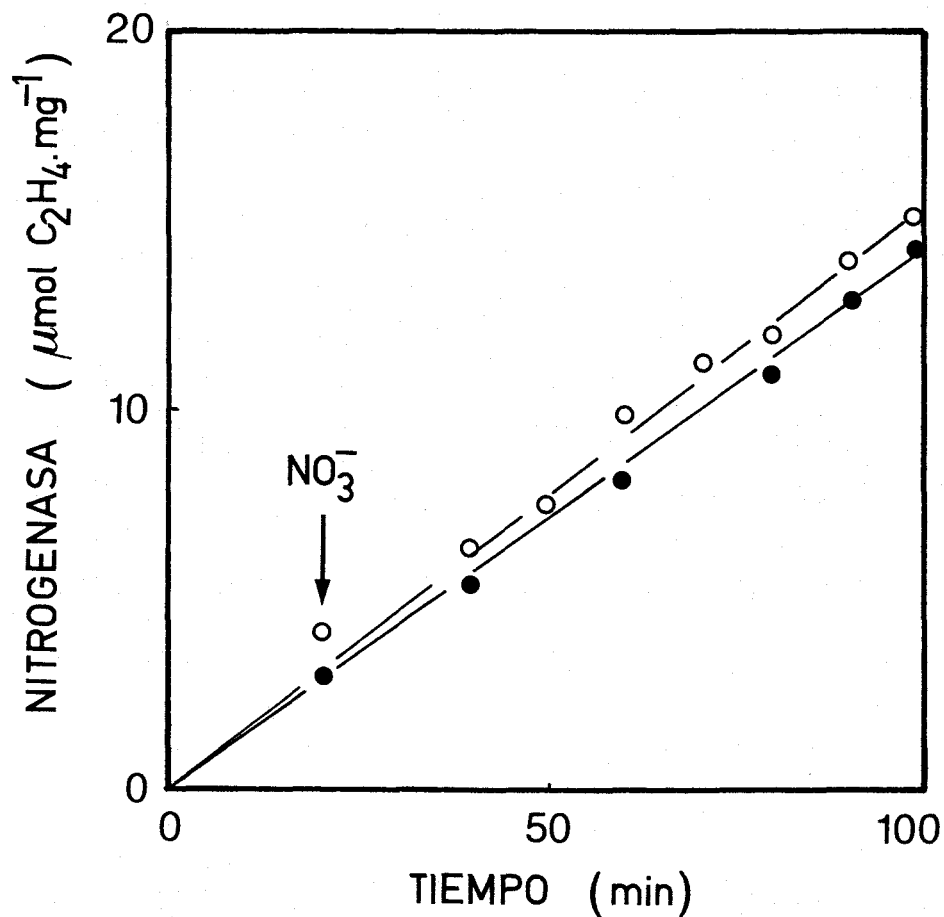


Figura 11. Efecto del nitrato sobre la actividad nitrogenasa de células de *A. chroococcum* ATCC 4412 cultivadas diazotróficamente.

En el momento que indica la flecha se añadió  $\text{KNO}_3$ , 5 mM, (o) a una suspensión de células conteniendo 60  $\mu\text{g}$  de proteína/ml. Paralelamente se determinó la actividad en otra muestra de la misma suspensión sin adiciones (●).

sobre la actividad nitrogenasa. Por el contrario, la Figura 12 muestra que el  $\text{KNO}_3$  añadido a una concentración mucho menor, 0,22 mM, produce una rápida inhibición de la actividad nitrogenasa, cuando las células tienen capacidad de asimilar el ión. Esta inhibición, que no llega a ser tan drástica como la que promueve el amonio, tiene, sin embargo, las dos propiedades más características de la inhibición producida por este ión, es decir, depende de la asimilación del nitrato y cesa una vez el ión ha sido consumido.

Estos resultados suponen un fuerte apoyo para la hipótesis de que el amonio ejerce la inhibición de la actividad nitrogenasa a través de su metabolización. Nuevo apoyo experimental para esta idea se obtiene del experimento que se muestra en la Figura 13 en la que se observa que el nitrato no ejerce inhibición alguna sobre la actividad nitrogenasa de células de *A. chroococcum* ATCC 4412 pretratadas con MSX. Es interesante resaltar que en estas células, el consumo y reducción de nitrato no se ven afectados ya que la aparición de amonio en el medio extracelular, como consecuencia de la incapacidad de las células de asimilarlo, ocurre de forma estequiométrica con la desaparición de nitrato del medio. ( Figura 14 ).

3.2.2.3. Efecto del nitrito sobre la actividad nitrogenasa de células de *A. chroococcum* ATCC 4412 con capacidad de consumo de nitrato y actividad nitrogenasa simultáneamente.

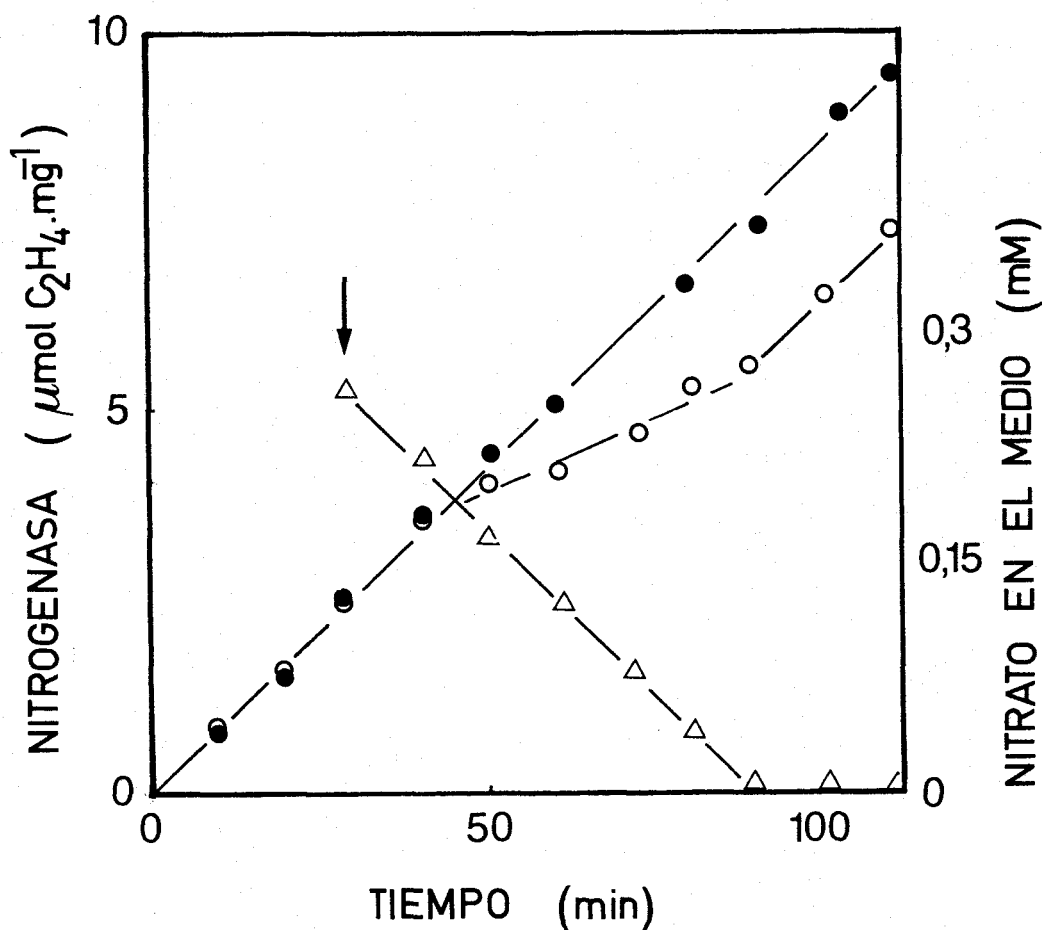


Figura 12. Efecto inhibitor del nitrato sobre la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412 con actividad nitrogenasa y capacidad de consumo de nitrato. Reversión del efecto una vez consumido el ión.

De una suspensión de células con actividad nitrogenasa y capacidad de consumo de nitrato se tomaron tres muestras en matraces Erlenmeyer cerrados para el ensayo de actividad nitrogenasa en ausencia (●) o presencia de  $\text{KNO}_3$ , 0,22 mM, (○), añadiendo cuando indica la flecha. También se determinó el consumo de nitrato (Δ).

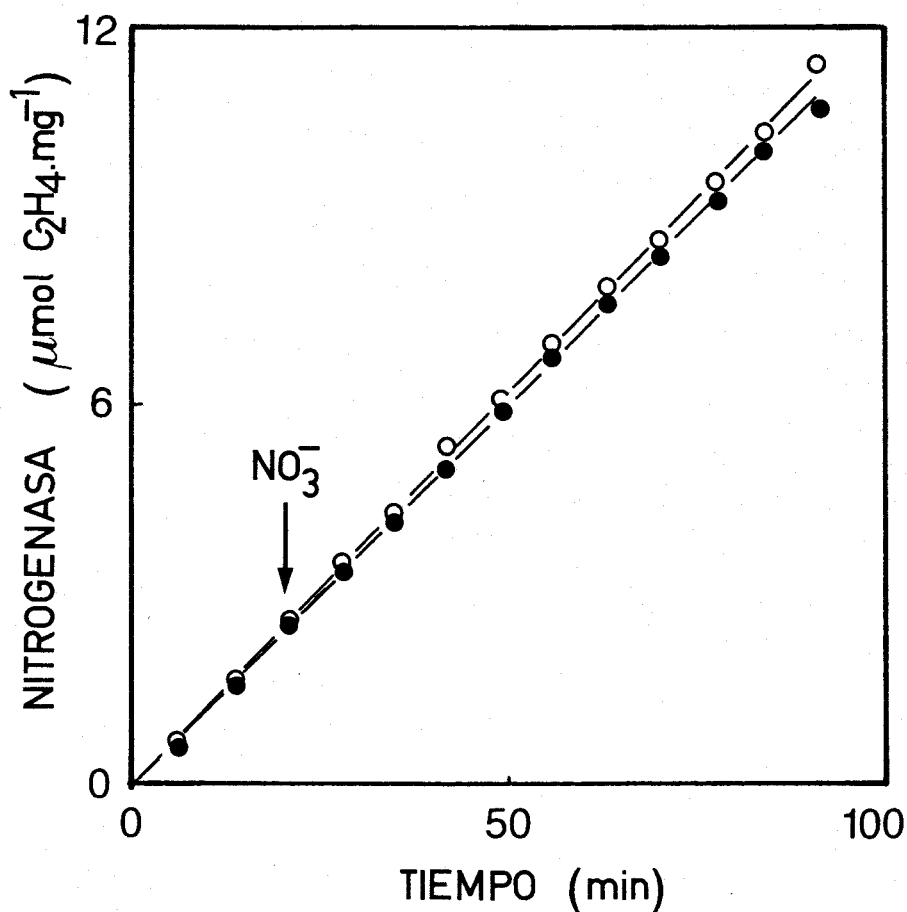


Figura 13. Protección con MSX de la inhibición de la actividad nitrogenasa por nitrato en células de *A. chroococcum* ATCC 4412.

El experimento se realizó como se describe en la Figura 12 pero las células se incubaron con MSX, 5 mM, durante 15 min antes de iniciarse el ensayo. La actividad nitrogenasa se determinó en ausencia (●), o en presencia de KNO<sub>3</sub>, 0,25 mM,(○), que se añadió cuando indica la flecha.

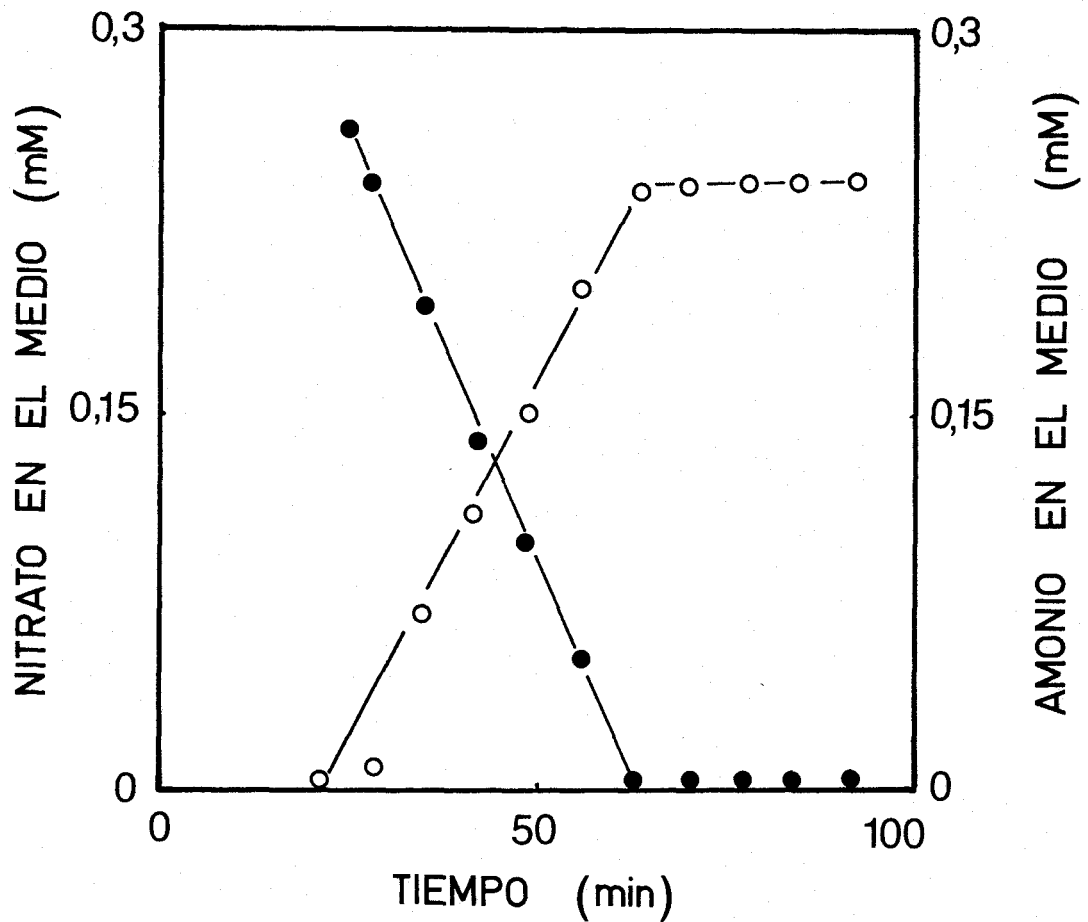


Figura 14. Consumo de nitrato y excreción de amonio al medio externo por células de *A. chroococcum* ATCC 4412 pretratadas con MSX.

Este es el mismo experimento que se describe en la Figura 13 pero en vez de actividad nitrogenasa, se muestra el consumo de nitrato (●) y la producción de amonio al medio extracelular (○).

Los resultados expuestos en el apartado anterior sugieren que el nitrito, que es el compuesto intermedio en la reducción del nitrato hasta amonio, debe de comportarse exactamente igual que el nitrato en cuanto a su efecto inhibidor de la actividad nitrogenasa.

En la Figura 15 se muestra que la adición de  $\text{KNO}_2$ , 0,2 mM, a células de *A. chroococcum* ATCC 4412 cultivadas en ausencia de fuente de nitrógeno combinado y, por tanto, incapaces de asimilar nitrito, no tiene ningún efecto sobre la actividad nitrogenasa. Este experimento, además de ilustrar, como en el caso del nitrato, que en células incapaces de asimilar el ión la actividad nitrogenasa no se afecta por éste, muestra que el nitrito, a las concentraciones utilizadas ( 0,2 mM como máximo ), no tiene ningún efecto negativo sobre el microorganismo que afecte a la actividad nitrogenasa. A concentraciones mayores ( Tabla III, apartado 3.1.1. ), resulta inhibidor para el crecimiento de *A. chroococcum* ATCC 4412; se conocen, también, otros efectos negativos del nitrito sobre distintos procesos metabólicos en varios organismos ( Larsson y Andersson, 1981; Purczeld *et al*, 1978 ).

— La Figura 16 muestra de nuevo que, como en el caso del nitrato, el nitrito, cuando es asimilado, inhibe la actividad nitrogenasa, siendo esta inhibición reversible ya que cesa una vez el ión ha sido agotado del medio. Las Figuras 17 y 18 ilustran, respectivamente, la protección de la actividad nitrogenasa contra la inhibición por nitrito en células pretratadas con MSX, y la excreción al medio extracelular del amonio que



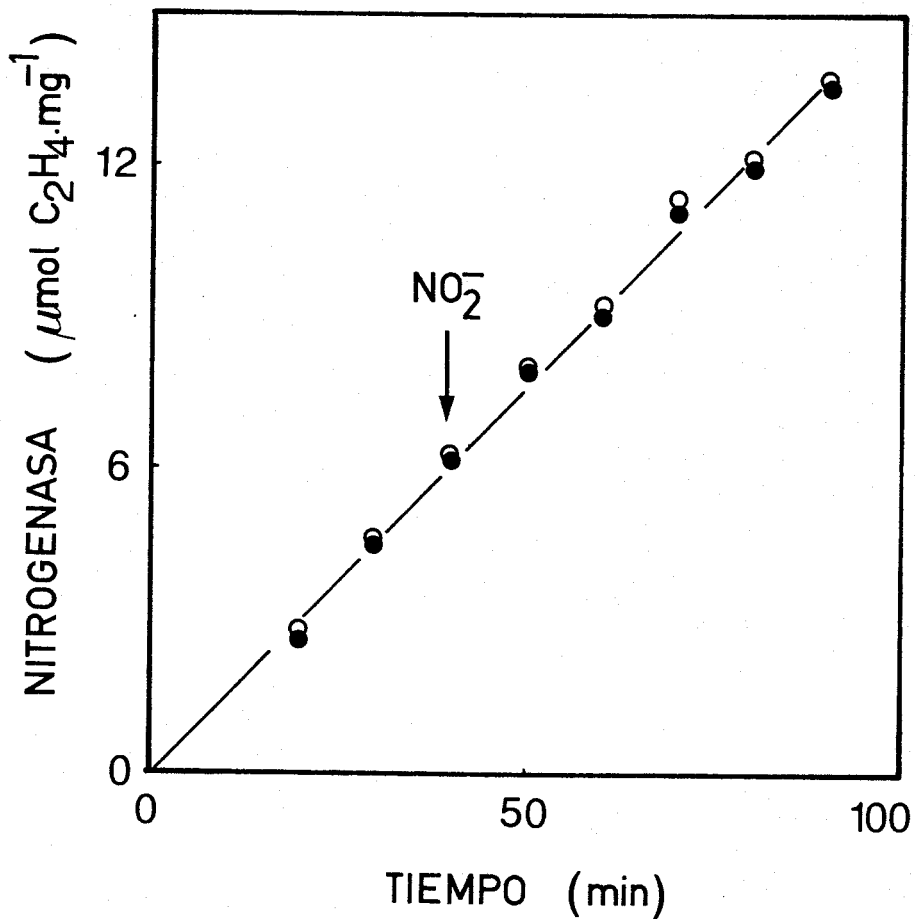


Figura 15. Efecto del nitrito sobre la actividad nitrogenasa de células de *A. chroococcum* ATCC 4412 cultivadas diazotróficamente.

En el momento que indica la flecha se añadió  $\text{KNO}_2$ , 0,2 mM (○) a una suspensión celular conteniendo 60  $\mu\text{g}$  de proteína/ml. Paralelamente se determinó la actividad en un control sin adiciones (●).

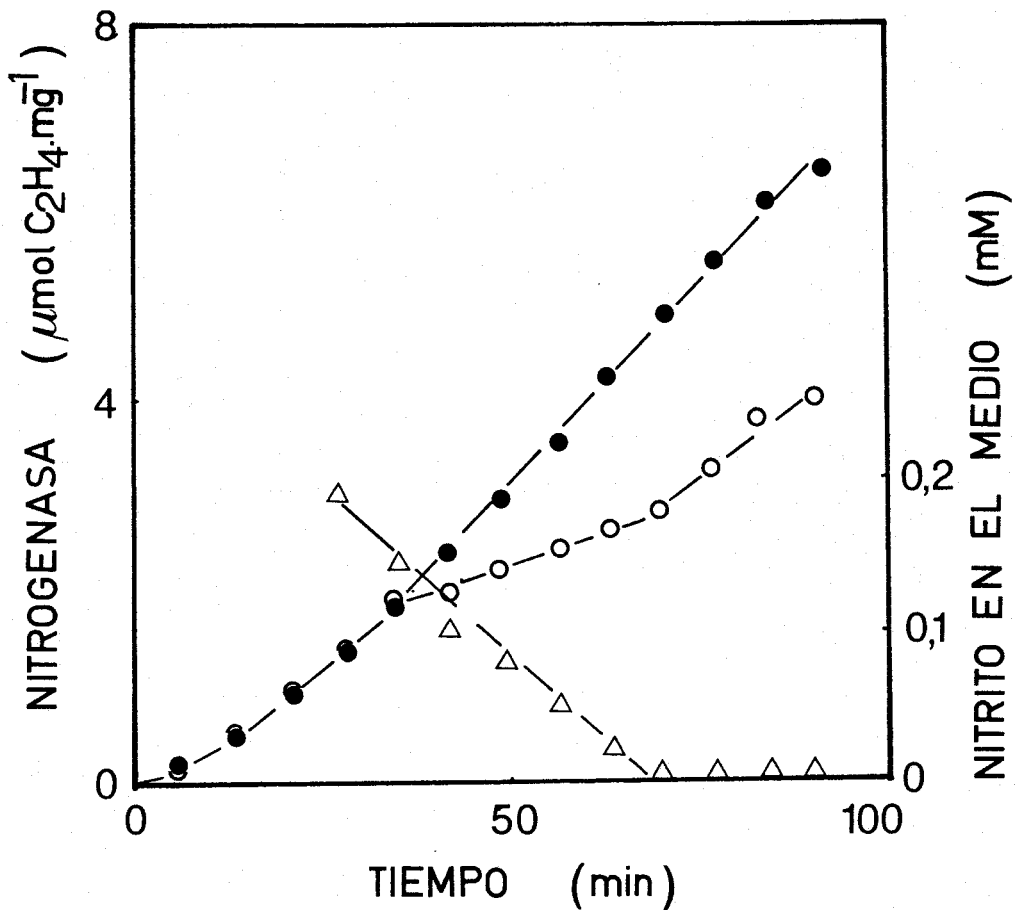


Figura 16. Efecto inhibitor del nitrito sobre la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412 con actividad nitrogenasa y capacidad de consumo de nitrito. Reversión del efecto una vez consumido el ión.

De una suspensión de células con actividad nitrogenasa y capacidad de consumo de nitrito se tomaron tres muestras en matraces Erlenmeyer cerrados para el ensayo de actividad nitrogenasa en ausencia (●) o presencia de  $\text{KNO}_2$ , 0,2 mM, (○). También se determinó el consumo de nitrito (Δ).

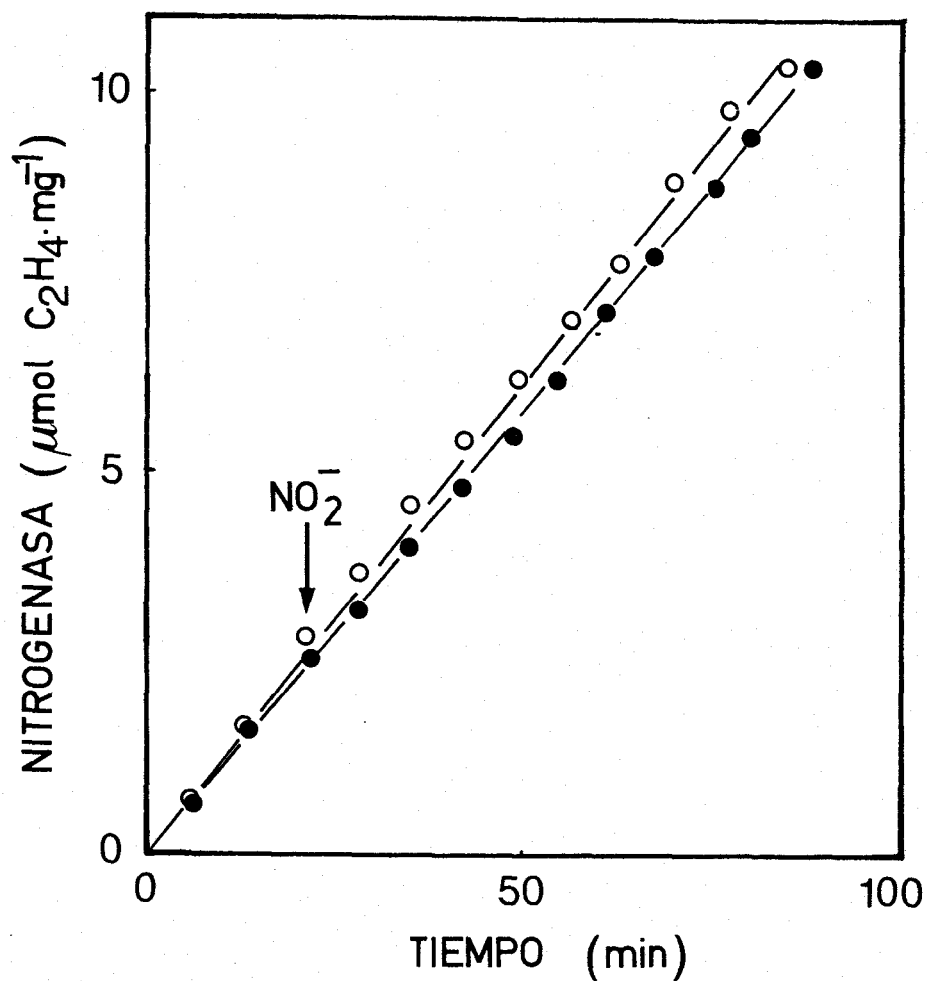


Figura 17. Protección por MSX de la inhibición de la actividad nitrogenasa por nitrito en células de *A. chroococcum* ATCC 4412. El experimento es idéntico al que se muestra en la Figura 13. La actividad nitrogenasa se determinó en ausencia (●), o en presencia de  $\text{KNO}_2$ , 2mM (○), que se añadió cuando indica la flecha.

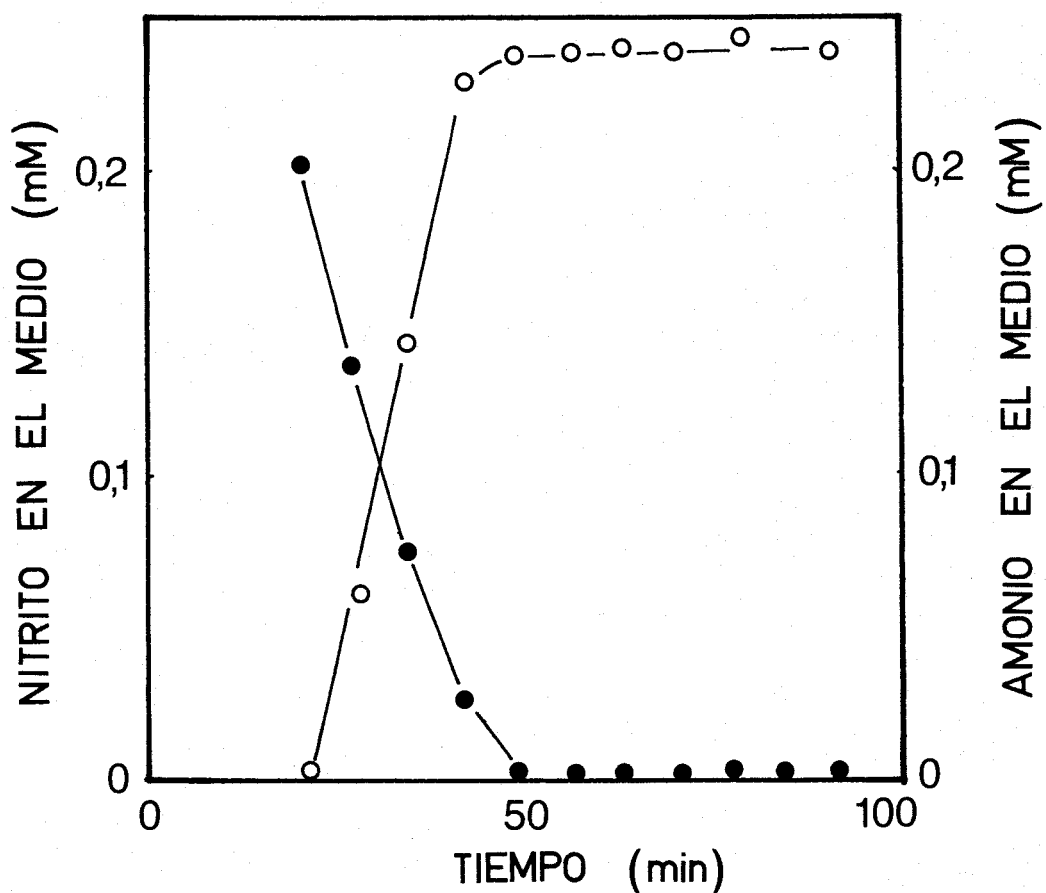


Figura 18. Consumo de nitrato y excreción de amonio en el medio externo por células de *A. chroococcum* ATCC 4412.

Este es el mismo experimento que se describe en la Figura 17 pero en vez de actividad nitrogenasa, se muestra el consumo de nitrito (●) y la producción de amonio al medio extracelular (○).

se produce como consecuencia de la reducción del nitrito. La entrada del anión al interior celular y su posterior reducción, como en el caso del nitrato, no se afectan negativamente por el tratamiento con MSX.

El efecto del nitrato sobre la nitrogenasa, que hemos descrito en este apartado, ocurre en un plazo de tiempo corto desde la adición del ión y es, además, reversible. Estas dos características sugieren que el efecto inhibitorio es sobre la actividad enzimática y no una consecuencia de la represión de la síntesis de la enzima. Para confirmar esta idea, se ha estudiado el efecto del nitrato sobre la actividad nitrogenasa en células de *A. chroococcum* ATCC 4412 con capacidad de asimilar nitrato y actividad nitrogenasa simultáneamente, pero tratadas con rifampicina ( 100 µg/ml ), un inhibidor de la síntesis de ARNm, que impide, por tanto, la síntesis de proteína en esta bacteria. En estas condiciones, el nitrato ejerce también inhibición de la actividad nitrogenasa ( Figura 19 ). Al estar la síntesis proteica inhibida por la presencia de la rifampicina, el efecto del nitrato debe ejercerse sobre la actividad de la enzima existente en la célula. Resultados similares se obtienen para el caso del nitrito ( no mostrado ).

3.2.2.4. El grado de inhibición que producen nitrato y nitrito sobre la actividad nitrogenasa depende de la velocidad de consumo de dichos iones.

El grado de inhibición de la actividad nitrogenasa por

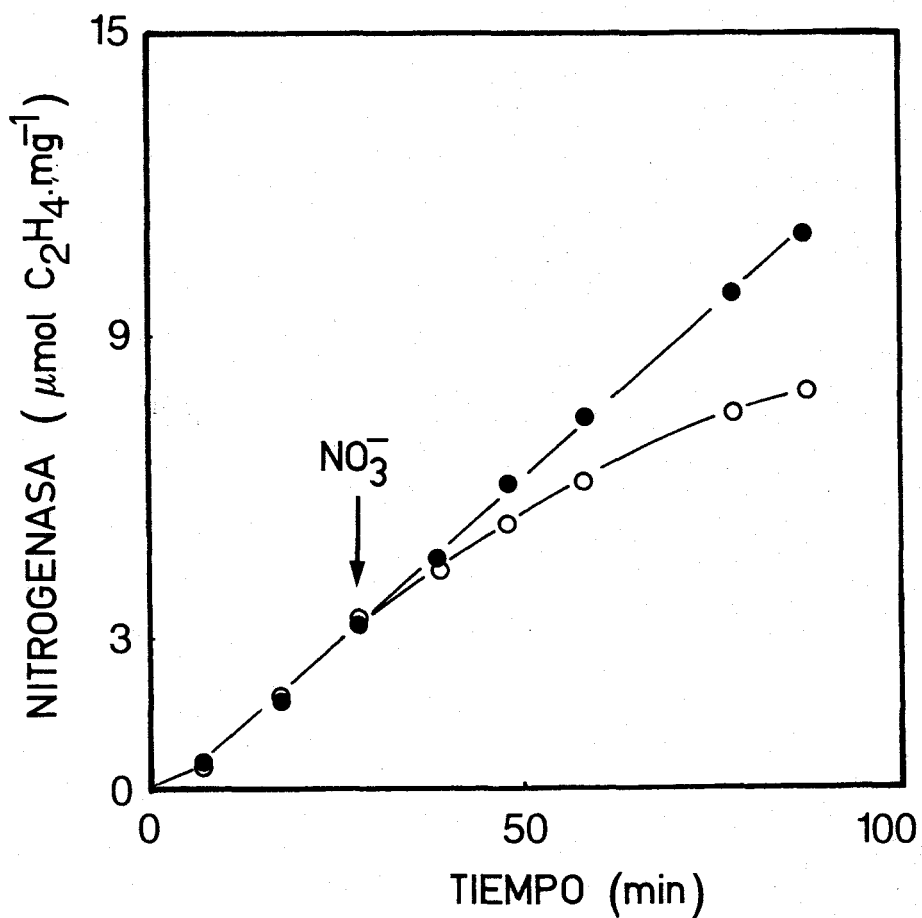


Figura 19. Efecto del nitrato sobre la actividad nitrogenasa de células de *A. chroococcum* ATCC 4412 con actividad nitrogenasa y capacidad de consumo de nitrato en presencia de rifampicina.

La suspensión celular contenía 100 µg de rifampicina/ml. La nitrogenasa se determinó en ausencia (●) o presencia de  $\text{KNO}_3$ , 0,3 mM, (○), que se añadió cuando indica la flecha.

amonio en *A. chroococcum* ATCC 4412 es siempre cercano al 100%, sin embargo, el grado de inhibición obtenido con nitrato o nitrito es inferior.

De acuerdo con la hipótesis que hemos formulado para explicar nuestros resultados, según la cual la inhibición de la actividad nitrogenasa depende de la acumulación de metabolitos carbono-nitrógeno inhibidores, y, dado que se pueden obtener células de *A. chroococcum* ATCC 4412 con diferentes tasas de consumo de nitrato y nitrito, cabe esperar que el grado de inhibición de la actividad nitrogenasa se correlacione positivamente con la tasa de consumo de ambos iones.

Las diferentes tasas de consumo de nitrato y nitrito se obtuvieron mediante incubaciones más o menos prolongadas en las condiciones detalladas en el apartado 3.2.2.1.. La Figura 20 muestra que, efectivamente, existe una correlación positiva entre el grado de inhibición provocado por nitrato o nitrito con la tasa de consumo de ambos iones. El coeficiente de correlación obtenido ( $r$ ) es de 0,922. Otro aspecto interesante a resaltar de la Figura 20 es que, como cabía esperar, los datos obtenidos para el caso del nitrato se ajustan a la misma recta que los obtenidos para el nitrito.

3.2.2.5. *A. chroococcum* MCD1, una cepa incapaz de asimilar nitrato.

*A. chroococcum* ATCC 4412, la cepa con la que se han realizado todos los experimentos descritos hasta el momento, es

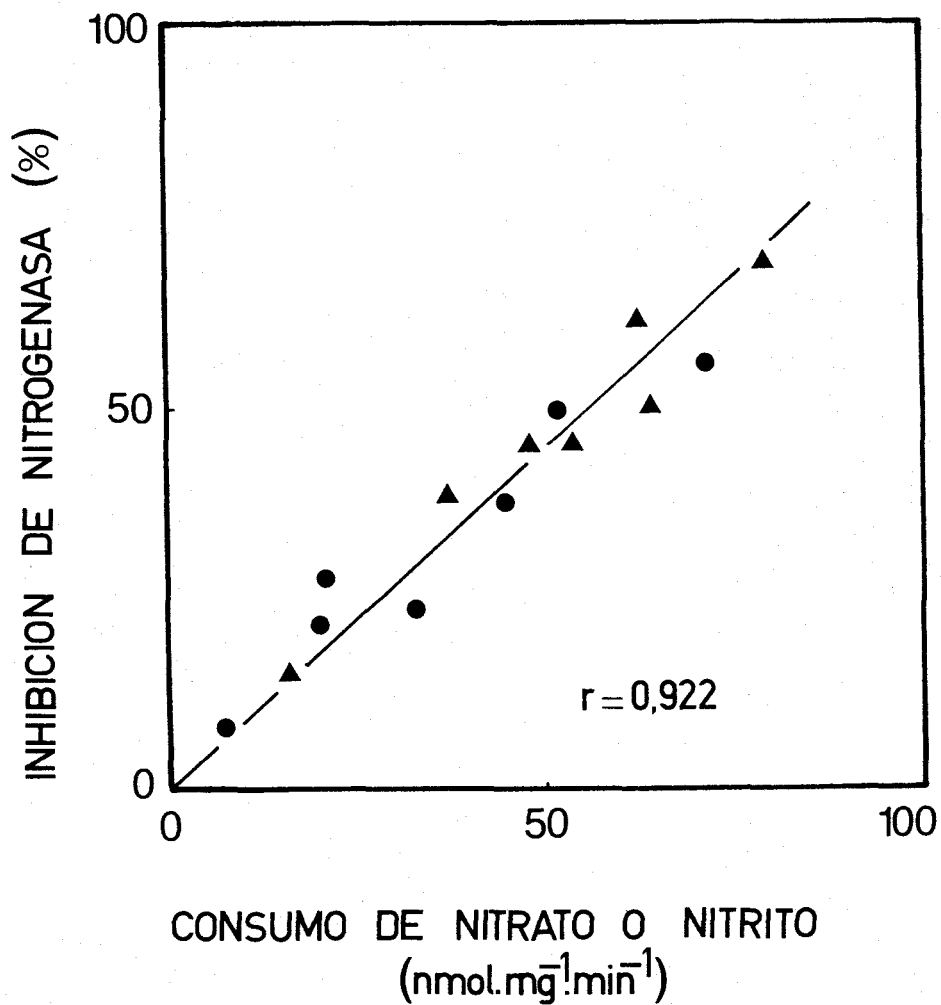


Figura 20. Correlación entre la tasa de consumo de nitrato o nitrito y el grado de inhibición de la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412.

Datos obtenidos de experimentos como los que se describen en la Figura 12 para el nitrato (●) y 16 para el nitrito (▲).



capaz, como hemos visto, de utilizar nitrato como fuente de nitrógeno.

En la Unidad de Fijación de Nitrógeno de Brighton, se ha aislado la cepa MCD1 de *A. chroococcum* curando 4 de los 6 plásmidos que contiene *A. chroococcum* NCIB 8003 ( Robson *et al.*, 1984). El análisis de los plásmidos de las tres cepas, ATCC 4412, MCD1 y NCIB 8003 ( Figura 21 ), demostró que, efectivamente, MCD1 tan sólo conserva dos de los plásmidos de NCIB 8003. Se observa también que las cepas ATCC 4412 y NCIB 8003 tienen los mismos plásmidos con la excepción del de 10 MDal de tamaño, ausente en la cepa NCIB 8003. Dado que el contenido en plásmidos es una propiedad muy característica de las cepas de *A. chroococcum*, y que el plásmido de 10 MDal es muy inestable, se puede afirmar que ATCC 4412 y NCIB 8003 son la misma cepa.

*A. chroococcum* MCD1 tiene la característica peculiar de no utilizar nitrato como fuente de nitrógeno, razón por la que se ha utilizado en este estudio.

Se ha tratado de inducir el sistema de asimilación de nitrato en *A. chroococcum* MCD1 mediante cultivos sucesivos de esta cepa en medio BS suplementado con  $\text{KNO}_3$ . La Tabla XIII muestra los resultados obtenidos en el análisis de diversas actividades enzimáticas y procesos relacionados con la asimilación de nitrógeno en *A. chroococcum* MCD1. En primer lugar, se observa que los niveles de actividad nitrogenasa son similares tanto en presencia como en ausencia de nitrato en el medio de cultivo. Estos niveles de actividad son también similares a

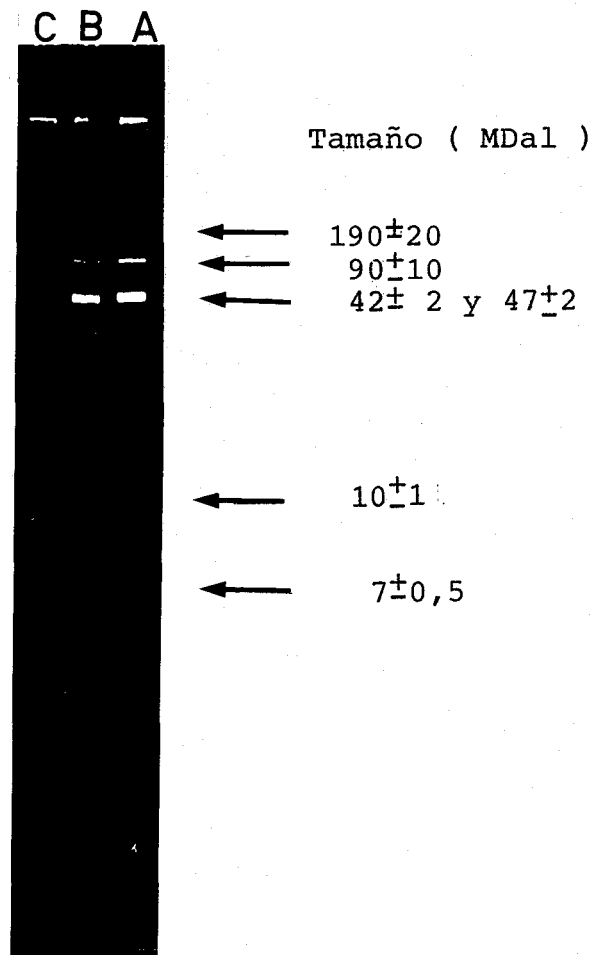


Figura 21. Plásmidos contenidos en las cepas de *A. chroococ-*  
*ccum* ATCC 4412 (A), NCIB 8003 (B) y MCD1 (C).

La preparación del ADN para el análisis de estos plásmidos se hizo como se describe en el apartado 2.7.1. de Materiales y Métodos.

Tabla XIII. Efecto del nitrato sobre los niveles de actividad nitrogenasa, nitrato reductasa, nitrito reductasa y tasa de consumo de nitrato y nitrito en células de *A. chroococcum* MCD1.

Medio de cultivo	Activ. nitrogenasa ( nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /min.mg prot )	NO <sub>3</sub> Rasa ( mU/mg prot )	NO <sub>2</sub> Rasa ( mU/mg prot )	Consumo de	
				NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ( nmol/min.mg prot.)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ( nmol/min.mg prot.)
BS	114	1,2	6	0	0
BS +KNO <sub>3</sub>	166	1,7	13	0	0

Se utilizaron células cultivadas en los medios indicados. La determinación de las distintas actividades se realizó como se indica en Materiales y Métodos.

los que se detectan en *A. chroococcum* ATCC 4412. Por otra parte, los niveles de actividad nitrito reductasa y nitrato reductasa son mucho menores que los encontrados en la cepa ATCC 4412, no detectándose consumo alguno de nitrato o nitrito en MCD1.

Como cabía esperar a la luz de los resultados expuestos, *A. chroococcum* MCD1 no crece en medio BS suplementado con  $\text{KNO}_3$  al que se le burbujea una mezcla de  $\text{Ar}:\text{O}_2$  ( 79%:21% ) ( resultado no mostrado ), lo que indica que el crecimiento observado en medio BS suplementado con  $\text{KNO}_3$ , en presencia de aire, se debe a la fijación de  $\text{N}_2$ .

### 3.2.2.6. Efecto del amonio y del nitrato sobre la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* MCD1.

La actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* MCD1 sufre inhibición a corto plazo por amonio. Esta inhibición tiene las mismas características ya descritas para *A. chroococcum* ATCC 4412, es decir, es reversible, cesando cuando el amonio se ha agotado del medio ( Figura 22 ), y no se produce en células pretratadas con MSX ( resultado no mostrado ).

En *A. chroococcum* MCD1, ni el nitrato ni el nitrito ejercen inhibición alguna sobre la actividad nitrogenasa ( Figura 23 ). Estos resultados concuerdan con los presentados anteriormente para *A. chroococcum* ATCC 4412 y corroboran la propuesta de que el nitrato requiere ser asimilado para ejercer la inhibición sobre la actividad nitrogenasa.

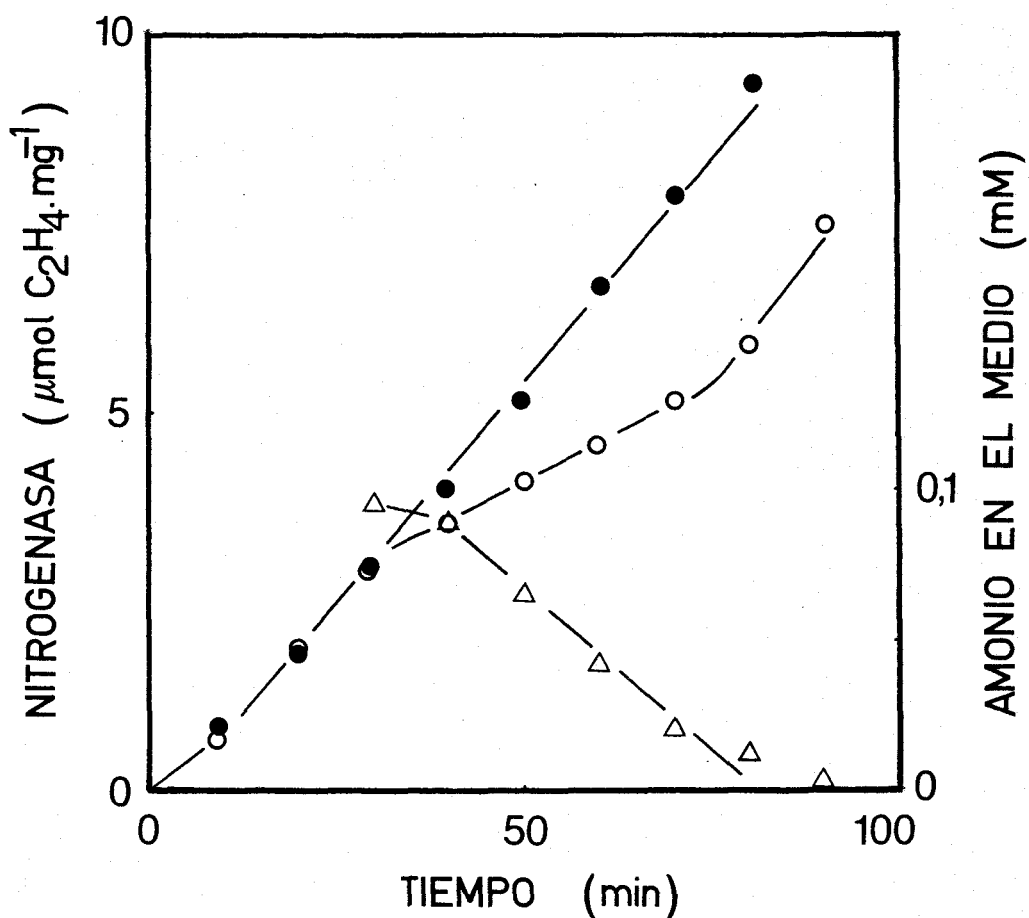


Figura 22. Inhibición de la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* MCD1 por  $\text{NH}_4^+$  y su reversión una vez consumido el ión. El experimento se realizó como se describe en la Figura 3 para *A. chroococcum* ATCC 4412. La actividad nitrogenasa se determinó en ausencia (●) o presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,1 mM (○). También se determinó el consumo de amonio (Δ). La suspensión celular contenía 70 µg de proteína/ml.

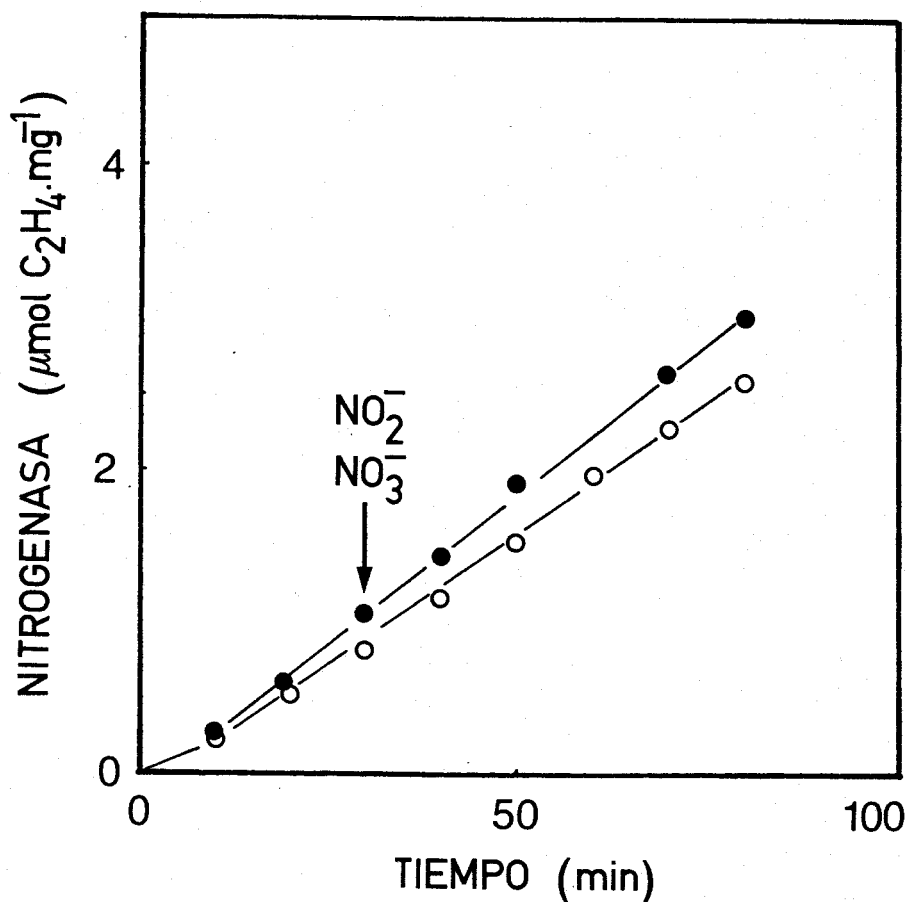


Figura 23. Efecto del nitrato y del nitrito sobre la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* MCD1.

Células cultivadas en medio BS suplementado con  $\text{KNO}_3$  se recogieron por centrifugación, se lavaron con medio fresco libre de nitrógeno y se resuspendieron en el mismo medio a una concentración de  $60 \mu\text{g}$  de proteína/ml. Cuando indica la flecha se añadió  $\text{KNO}_3$ ,  $0,2 \text{ mM}$  (○), o  $\text{KNO}_2$ ,  $0,2 \text{ mM}$  (●).

3.2.3. Efecto de la deficiencia de nitrógeno sobre la actividad nitrogenasa y su regulación en *A. chroococcum* ATCC 4412.

En este apartado se presentan resultados obtenidos con células de *A. chroococcum* ATCC 4412 que habían sido previamente incubadas en ausencia de cualquier fuente de nitrógeno durante aproximadamente 6 h ( ver Material y Métodos, apartado 2.1. 4. )

3.2.3.1. Influencia de la deficiencia de nitrógeno sobre los niveles de actividad nitrogenasa y de consumo de nitrato.

Como ya hemos visto, *A. chroococcum* ATCC 4412 puede cultivarse tanto diazotróficamente como en presencia de nitrato. En este estudio se han impuesto condiciones de deficiencia de nitrógeno en células provenientes de ambos tipos de cultivo.

Cuando células cultivadas diazotróficamente se someten a deficiencia de nitrógeno, no se observa un cambio drástico en los niveles de actividad nitrogenasa. Si se parte de células cultivadas en presencia de  $\text{KNO}_3$ , la deficiencia de nitrógeno promueve la inducción de actividad nitrogenasa, inducción que ocurre también cuando estas células se incuban en ausencia de nitrato con una atmósfera de aire. Este resultado indica que la inducción de la actividad nitrogenasa no requiere del sustrato de la enzima, como se ha descrito por otros autores ( Postgate, 1982 ).

Se ha estudiado también el efecto de la deficiencia de

nitrógeno sobre los niveles de las enzimas de la asimilación de nitrato y la tasa de consumo del ión. La Tabla XIV muestra que la incubación de células de *A. chroococcum* ATCC 4412 en condiciones de deficiencia de nitrógeno durante 6 h no afecta significativamente los niveles de nitrato reductasa o nitrito reductasa. Sin embargo, la capacidad de consumo de nitrato, sí resulta afectada como consecuencia de la deficiencia ( Figura 24 ). Estos resultados indican que la deficiencia de nitrógeno, en lo concerniente a los procesos descritos, tiene las mismas consecuencias que se observan cuando células cultivadas en presencia de nitrato se incuban en ausencia del ión con una atmósfera de aire. Cabe resaltar, sin embargo, que mientras la tasa de consumo de nitrato desciende drásticamente como consecuencia de la deficiencia de nitrógeno, los niveles celulares de nitrato reductasa no varían en la misma proporción.

### 3.2.3.2. Influencia de la deficiencia de nitrógeno sobre algunos parámetros indicadores del balance carbono:nitrógeno.

Para establecer si las células de *A. chroococcum* ATCC 4412 tienen alterado el balance carbono:nitrógeno como consecuencia de la incubación en condiciones de deficiencia de nitrógeno, hemos estudiado algunos procesos y parámetros celulares indicadores de dicho balance.

El parámetro que más claramente determina la deficiencia de nitrógeno es la razón carbono/nitrógeno ( C/N ), ya que, como consecuencia de la incubación de las células en estas con



Tabla XIV. Efecto de la deficiencia en nitrógeno sobre los niveles celulares de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa en *A. chroococcum* ATCC 4412

Tipo de células	Nitrato reductasa	Nitrito reductasa
	(mU/mg proteína)	
Células normales	42	79
Células deficientes en nitrógeno	42	95

Se cultivaron células en medio BS suplementado con  $\text{KNO}_3$ . En fase exponencial del crecimiento se determinó las actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa en una alícuota de este cultivo. El resto de las células se incubaron en condiciones de deficiencia de nitrógeno durante 6 h tras las cuales se determinaron de nuevo ambas actividades.

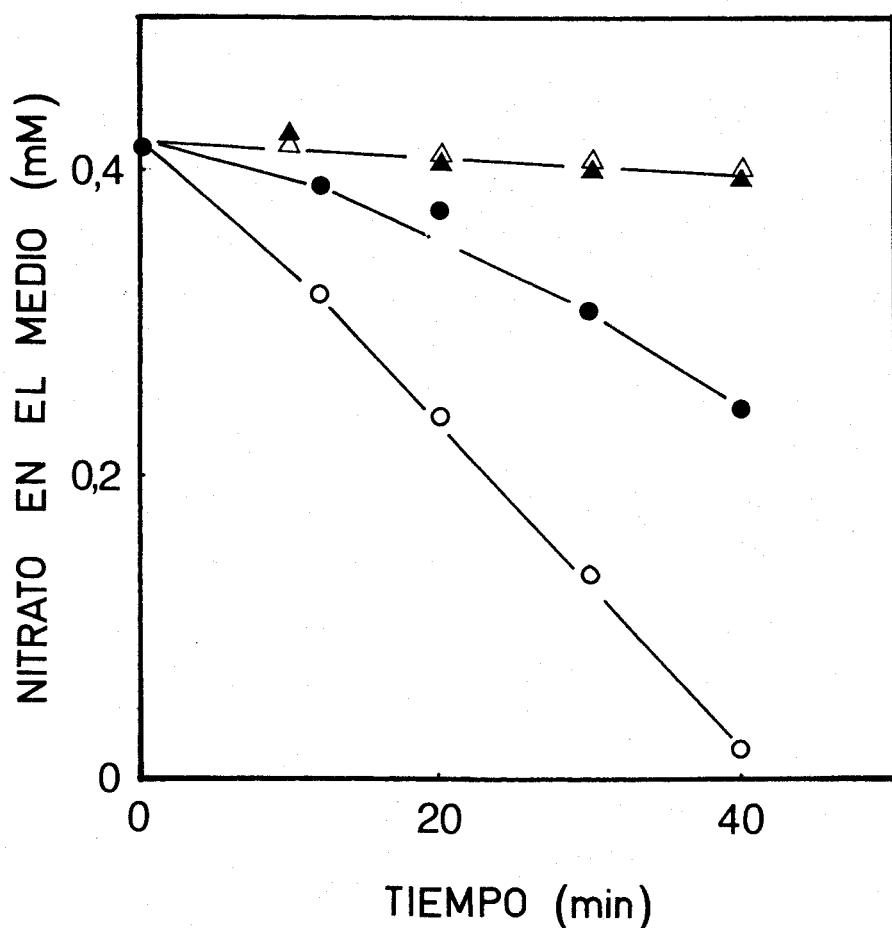


Figura 24. Efecto de la incubación en deficiencia de nitrógeno sobre la capacidad de consumo de nitrato por células de *A. chromococcum* ATCC 4412.

Células cultivadas en medio BS suplementado con  $\text{KNO}_3$  se recogieron por centrifugación, se lavaron con medio libre de nitrógeno y se resuspendieron en el mismo medio. A una muestra de la suspensión celular se le determinó la tasa de consumo de nitrato (○). El resto de la suspensión celular se incubó en condiciones de deficiencia de nitrógeno y se determinó el consumo de nitrato 2h. (●), 4h. (▲) y 6h. (Δ) después. En todos los casos la muestra en la que se determinó la tasa de consumo de nitrato, contenía 60  $\mu\text{g}$  de proteína/ml.

diciones se debe de manifestar acumulación de carbono respecto al nitrógeno. La Tabla XV muestra que esta razón aumenta de forma significativa durante la incubación en condiciones de deficiencia de nitrógeno.

Otra situación característica que se produce en condiciones de deficiencia de nitrógeno es el aumento de la producción de ácido algínico. El ácido algínico es un copolímero consistente en bloques homopoliméricos de ácido manurónico y ácido gulurónico ( Pindar y Buck, 1975 ). Existen determinadas condiciones de cultivo que implican un aumento de la producción de ácido algínico en *A. vinelandii*. Una de ellas es la limitación de fosfato ( Horan *et al*, 1981 ). Otra situación que conlleva aumento de la producción de alginato en *A. vinelandii* es la limitación de nitrógeno o bien condiciones de exceso de carbono ( Jartman *et al*, 1978 ). Se ha encontrado, en efecto, que la deficiencia de nitrógeno tiene como consecuencia en *A. chroococcum* ATCC 4412, un aumento de la concentración de alginato en el medio externo ( Tabla XVI ), indicativa, por tanto, de una situación de exceso de carbono en esta bacteria.

Por último, otro dato que sugiere una situación rica en carbono lo proporciona el consumo de oxígeno por células de *A. chroococcum* ATCC 4412 en ausencia de fuente de carbono externa y, por tanto, dependiente de sustratos intracelulares. Las células sometidas a deficiencia de nitrógeno durante 6 h muestran una tasa respiratoria dependiente de metabolitos internos tres veces mayor que la observada en células normales ( de 48,5 a 171 nmol O<sub>2</sub>/min. mg de proteína ).

Tabla XV. Efecto de la deficiencia de nitrógeno sobre la razón C/N en *A. chroococcum* ATCC 4412

---

Incubación en medio sin fuente de nitrógeno (h)	C/N
0	3,98
2	4,70
4	5,18

---

Células cultivadas en medio BS se incubaron en condiciones de deficiencia de nitrógeno. A los tiempos indicados se de terminó la razón C/N como se describe en Materiales y Métodos.

Tabla XVI. Efecto de la deficiencia de nitrógeno sobre la producción de alginato por *A. chroococcum* ATCC 4412

---

Incubación en medio sin fuente de nitrógeno (h)	Alginato (mg/mg proteína)
0	--
2	1,35
4	4,33
6	5,14

---

Células cultivadas en medio BS se incubaron en condiciones de deficiencia de nitrógeno. A los tiempos indicados se determinó la concentración de alginato en el medio extracelular tal y como se describe en Materiales y Métodos.

3.2.3.3. Efecto del amonio sobre la actividad nitrogenasa de células de *A. chroococcum* ATCC 4412 sometidas a deficiencia de nitrógeno.

Las células sometidas a deficiencia de nitrógeno tienen un exceso de carbono respecto a las células normales, según se desprende de los resultados expuestos en el apartado anterior. En términos del efecto del amonio sobre la nitrogenasa, son unas condiciones en las que la inhibición estará muy poco favorecida.

Cuando se añade  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2 mM, a una suspensión celular de *A. chroococcum* ATCC 4412, previamente sometida a deficiencia de nitrógeno durante 6 h, se observa una inhibición de tan sólo un 18% respecto del control durante los 40 min posteriores a la adición del amonio; sin embargo, la inhibición alcanza niveles normales una vez transcurrido este periodo de tiempo ( Figura 25 ). Esta cinética de inhibición de la actividad nitrogenasa se puede explicar admitiendo que, debido al exceso de carbono de estas células, la asimilación del amonio, en primer lugar restablece el balance carbono:nitrógeno, y, posteriormente, sería posible la acumulación de metabolitos inhibidores.

Una explicación alternativa para esta inhibición del amonio podría encontrarse en el hecho de que la tasa de consumo del ión fuese menor en las células deficientes en nitrógeno que en células normales. Esta explicación se descarta, pues, como se observa en la Figura 26, la tasa de consumo de amonio es similar en ambos tipos de células.

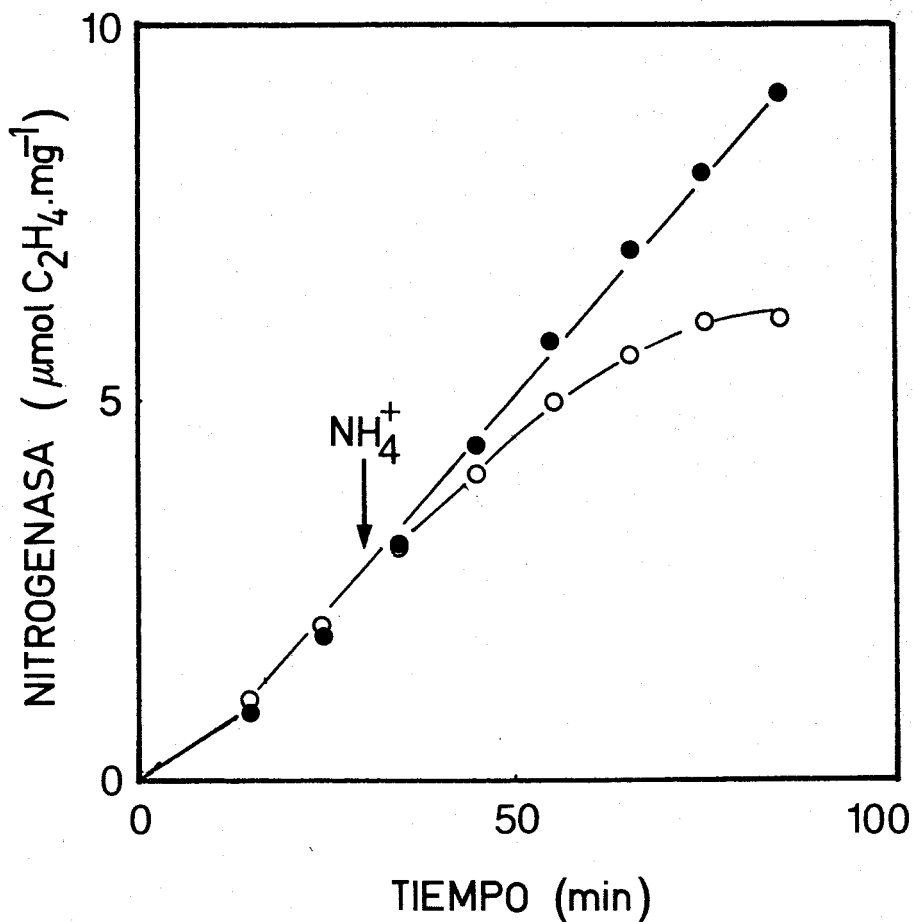


Figura 25. Efecto del amonio sobre la actividad nitrogenasa de células de *A. chroococcum* ATCC 4412 deficientes en nitrógeno. El experimento se llevó a cabo con células previamente sometidas a deficiencia de nitrógeno durante 6h. La suspensión celular contenía 60 μg de proteína/ml. La actividad nitrogenasa se determinó en ausencia (●) y en presencia de NH<sub>4</sub>Cl, 2mM (○), que se añadió cuando se indica con la flecha.

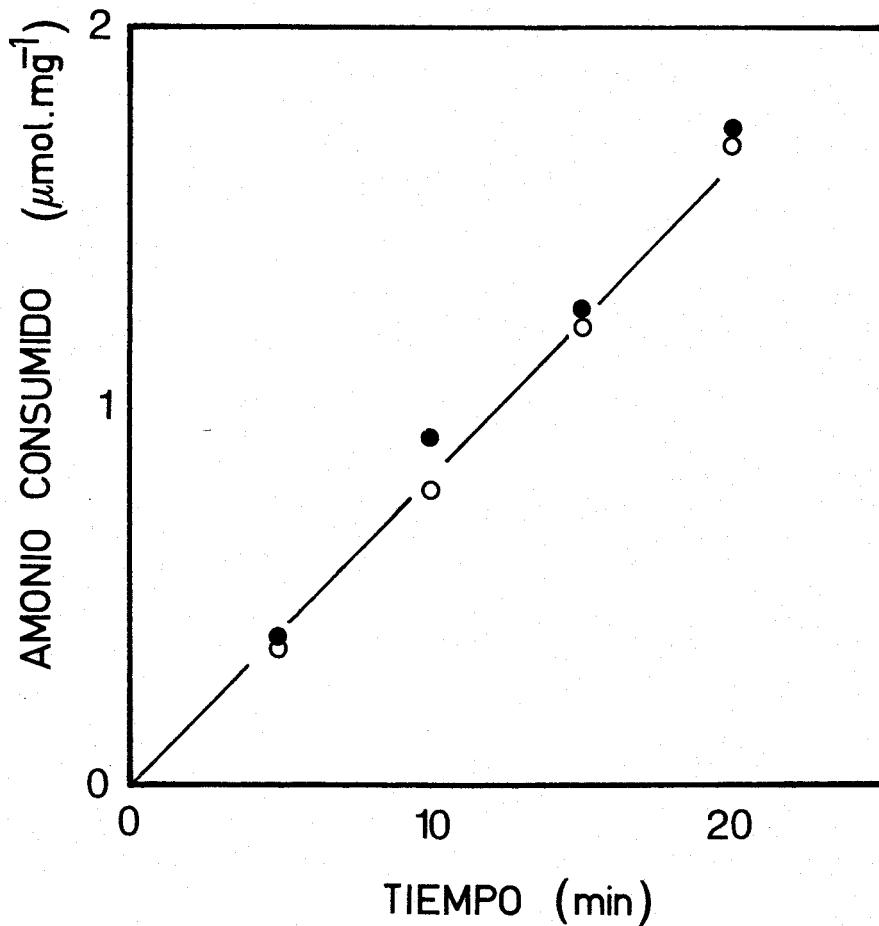


Figura 26. Consumo de amonio en células de *A. chroococcum* ATCC 4412 normales y sometidas a deficiencia de nitrógeno durante 6h.

Células cultivadas en medio BS se recogieron por centrifugación, se lavaron y se resuspendieron de nuevo en BS. A una muestra de esta suspensión se le determinó la tasa de consumo de amonio (●), el resto se incubó en condiciones de deficiencia de nitrógeno durante 6h. tras las cuales las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con medio BS y se resuspendieron de nuevo en BS para el ensayo de consumo de amonio (○). En ambos casos la suspensión celular contenía 60 μg de proteína/ml.



En la Tabla XIV ( apartado 3.2.3.2. ), se observa que la razón C/N de las células de *A. chroococcum* ATCC 4412 aumenta conforme avanza la incubación en condiciones de deficiencia de nitrógeno. A la luz de este y otros resultados que indican que la deficiencia de nitrógeno en la célula se va acentuando de forma progresiva, cabe esperar que el efecto inhibitor del amonio sea menor conforme aumenta la deficiencia de nitrógeno.

En la Figura 27 se observa que el amonio va perdiendo capacidad inhibitora cuando la situación de deficiencia se acentúa. Tenemos, pues, un sistema en el que, como ocurría con la inhibición a corto plazo promovida por nitrato o nitrito, el efecto es modulable. En el caso de los iones lo era por el propio consumo de nitrato o nitrito; en este caso, en el que la tasa de consumo de amonio no varía, se debe al hecho de que el balance carbono:nitrógeno es diferente del que existe en células normales.

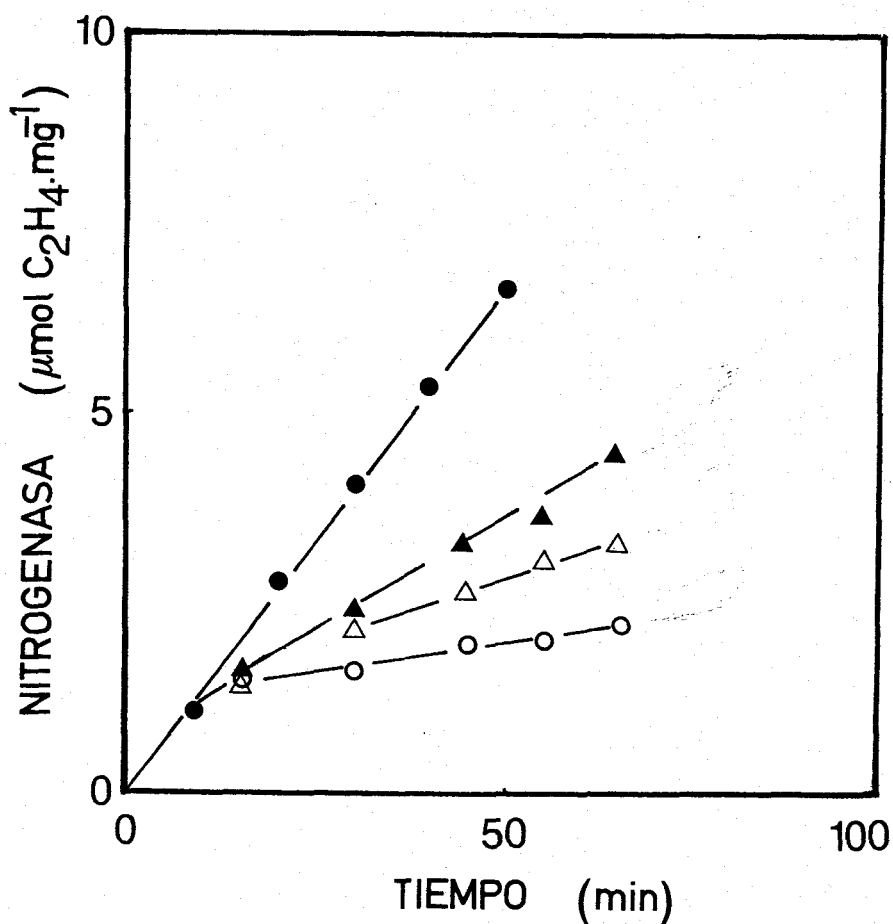


Figura 27. Efecto de la incubación en deficiencia de nitrógeno sobre el grado de inhibición por amonio de la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412.

Células cultivadas en medio BS se recogieron por centrifugación, se lavaron y se resuspendieron de nuevo en BS. A una muestra se le determinó la actividad nitrogenasa en ausencia (●) y en presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2mM (◻). El resto de la suspensión se incubó en deficiencia de nitrógeno y se repitió la determinación anterior 2h (Δ) y 4h (▲) después. Todas las determinaciones se realizaron con una concentración de proteína de 60μg/ml.

### 3.3. INTERRELACION ENTRE LA ASIMILACION DE NITRATO Y LA FIJACION DE NITROGENO EN *A. chroococcum* ATCC 4412.

Como ocurre en otros microorganismos, en *A. chroococcum*, la fijación de nitrógeno y la asimilación de nitrato son procesos mutuamente excluyentes.

En presencia de amonio, los dos procesos se inhiben. Sobre ambos procesos, la inhibición promovida por el amonio se ejerce a dos niveles: efecto a largo y corto plazo. También se ejerce a dos niveles el efecto del nitrato sobre la fijación de nitrógeno.

En este apartado se presentan resultados acerca de la similitud existente en la regulación por amonio de la fijación de nitrógeno y la asimilación de nitrato, utilizando células de *A. chroococcum* ATCC 4412 capaces de realizar ambos procesos simultáneamente.

#### 3.3.1. Efecto del nitrato sobre la síntesis de la nitrogenasa.

Los resultados presentados anteriormente demostraban que la inhibición que promueve el nitrato sobre la actividad nitrogenasa se debe a productos derivados de su asimilación.

La Figura 28 muestra que la adición de MSX a una suspensión celular de *A. chroococcum* ATCC 4412 cultivado en presencia de nitrato y, por tanto, sin actividad nitrogenasa, se traduce en una inducción de esta actividad, inducción que es de-

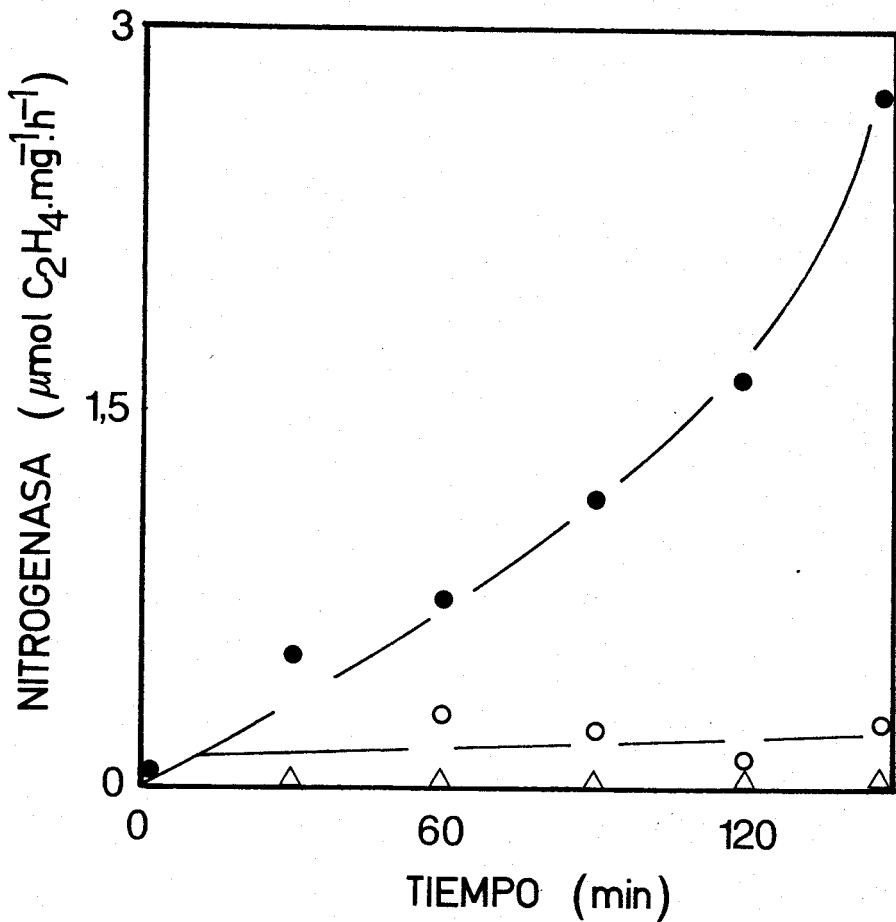


Figura 28. Inducción de la actividad nitrogenasa por tratamiento con MSX en células de *A. chroocoeum* ATCC 4412 cultivadas con nitrato.

Células cultivadas en medio BS suplementado con  $\text{KNO}_3$  se recogieron por centrifugación, se lavaron con medio BS conteniendo también  $\text{KNO}_3$  y se resuspendieron en el mismo medio en presencia de MSX, 1mM (●); MSX, 1mM, y rifampicina (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), (Δ), o sin adiciones (○).

pendiente de síntesis de proteína, ya que no ocurre cuando el experimento se realiza en presencia de rifampicina ( 100 µg/ml). Este resultado sugiere que el nitrato ejerce la represión de la síntesis de la nitrogenasa mediante productos derivados de su asimilación, al igual que ocurre con el efecto sobre la actividad de la enzima.

El tratamiento con MSX, 1 mM, no tiene efecto negativo alguno sobre el consumo de nitrato en la escala de tiempo ( 8 horas ) que consideramos. La adición de una concentración mayor del inhibidor, 5 mM, si ejerce cierta inhibición sobre el consumo de nitrato ( Figura 29 ).

Tenemos, pues, una situación en la que el nitrato actúa sobre el mismo proceso a dos niveles y en los dos mediante la acumulación de metabolitos inhibidores procedentes de su asimilación.

### 3.3.2. Similitud del efecto del amonio a corto plazo sobre la actividad nitrogenasa y el consumo de nitrato.

El efecto a corto plazo del amonio sobre la actividad nitrogenasa tiene muchas características en común con el efecto del ión sobre el consumo de nitrato. Estas características se pueden resumir en los siguientes puntos:

A.- La adición de pequeñas cantidades de amonio a una suspensión celular de *A. chroococcum* ATCC 4412 consumiendo nitrato, promueve una inhibición rápida de dicho consumo. Esta inhibi-

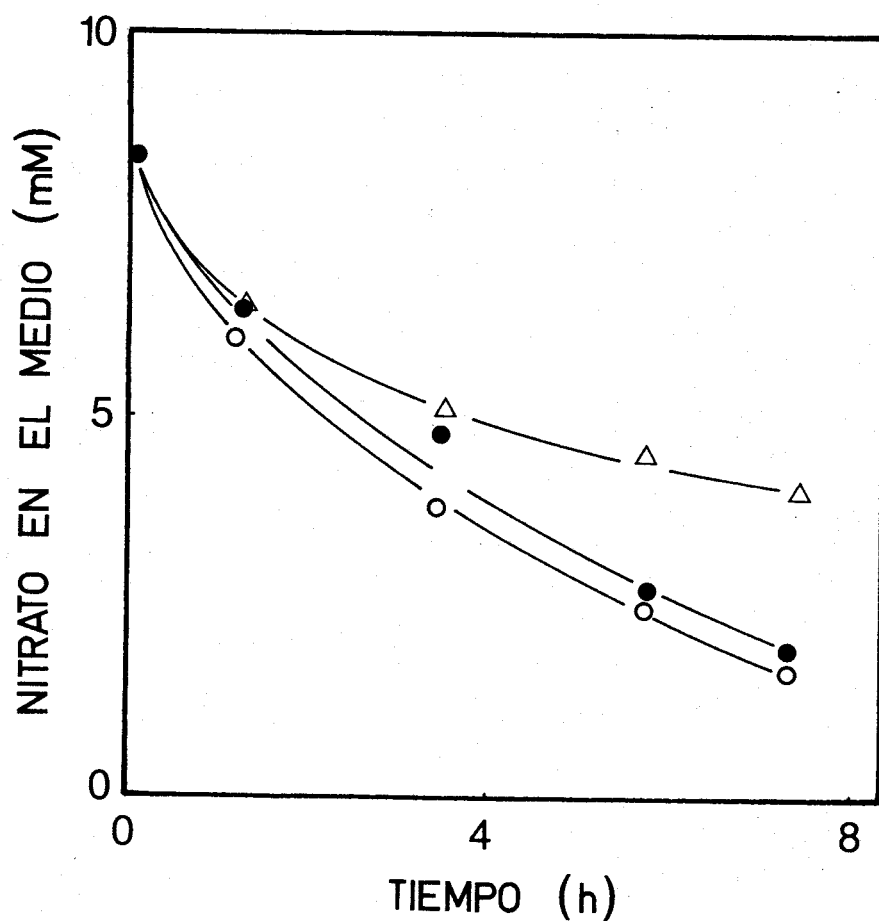


Figura 29. Efecto de la adición de MSX sobre el consumo de nitrato en *A. chroococcum* ATCC 4412.

Células cultivadas en medio BS suplementado con  $\text{KNO}_3$ , se recogieron por centrifugación, se lavaron con medio fresco, se re-suspendieron en el mismo medio en presencia de MSX, 5mM ( $\Delta$ ), MSX, 1mM ( $\bullet$ ), o sin adiciones ( $\circ$ ) y se incubaron en condiciones de cultivo. A los tiempos indicados se determinó la concentración de nitrato en cada uno de los medios tras separar las células por filtración.

ción, que depende del propio consumo de amonio, es reversible ( Figura 30 ).

B.- Cuando el mismo experimento se realiza con células de *A. chroococcum* ATCC 4412 pretratadas con MSX, no se observa efecto inhibitor alguno del amonio sobre el consumo de nitrato ( Revilla, 1983 ).

C.- Además de los dos puntos presentados anteriormente, en este trabajo se ha estudiado la reversión del consumo de nitrato, después de ser inhibido por amonio, por diversos inhibidores de la asimilación de este ión, resultados que se presentan en la Tabla XVII. La comparación de estos resultados con los presentados en la Tabla IX, en la que se muestra el mismo estudio pero referido a la actividad nitrogenasa, muestra que, en los dos casos, la MSX y la MSF resultan muy eficientes en la reversión de ambos procesos, mientras la azaserina es el inhibidor menos eficiente.

Todos estos resultados sugieren que el modo de acción del amonio sobre ambos procesos es el mismo.

### 3.3.3. Efecto del amonio sobre el consumo de nitrato y sobre la actividad nitrogenasa de células de *A. chroococcum* ATCC 4412 que poseen ambas actividades simultáneamente.

Ya se ha descrito ( apartado 3.2.2.1. ) que se pueden conseguir células de *A. chroococcum* ATCC 4412 que posean simultáneamente tanto actividad nitrogenasa como capacidad de

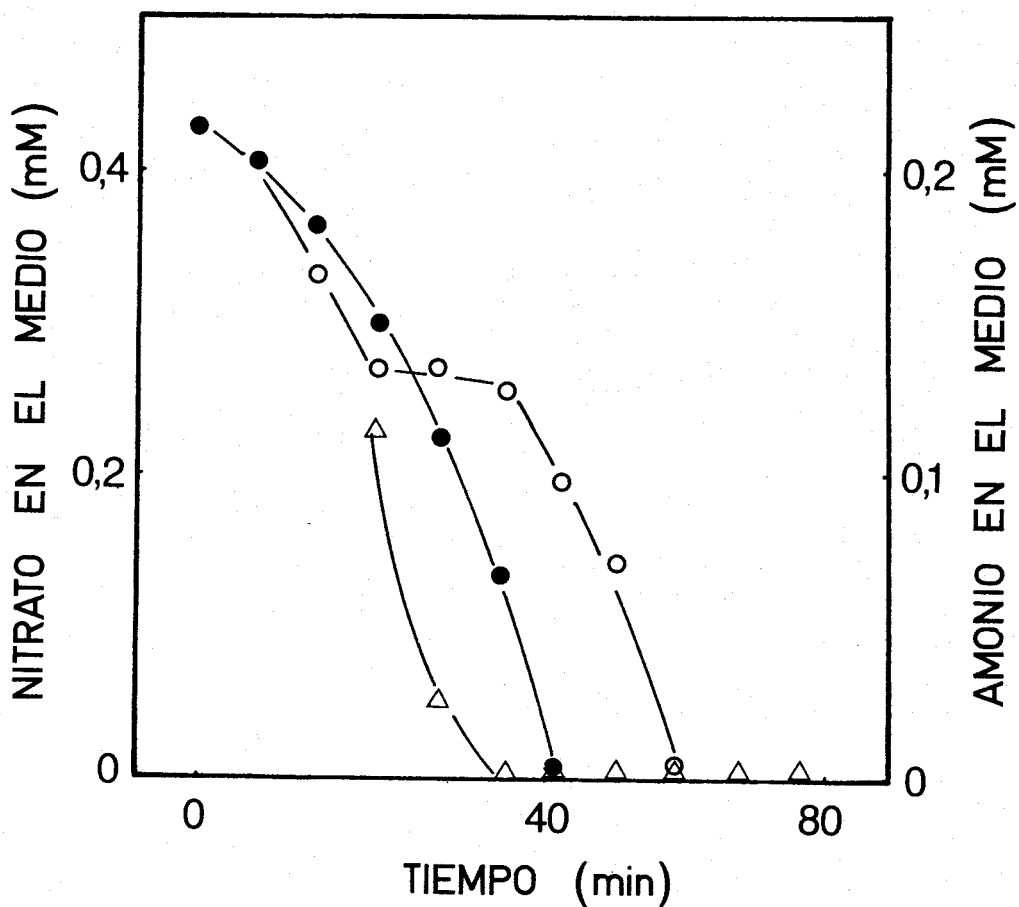


Figura 30. Inhibición de la utilización de nitrato por la adición de amonio y su reversión una vez consumido el amonio.

El experimento se inició por la adición de  $\text{KNO}_3$ , 0,4mM. El consumo de nitrato se determinó en ausencia (●) o en presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,15mM (○). También se determinó el consumo de amonio (△). La suspensión celular contenía 80  $\mu\text{g}$  de proteína/ml.



Tabla XVII. Reversión de la inhibición por amonio del consumo de nitrato con varios inhibidores de la ruta GS/GOGAT

Consumo inicial de nitrato (nmol/min·mg prot.)	Adiciones	Consumo final de nitrato (nmol/min·mg prot.)
74	NH <sub>4</sub> Cl	0
66	NH <sub>4</sub> Cl, MSX	89
74	NH <sub>4</sub> Cl, azaserina	0
109	NH <sub>4</sub> Cl, MSF	126

Los experimentos se iniciaron por la adición de KNO<sub>3</sub>, 0,5 mM. A los 15 min se añadió NH<sub>4</sub>Cl, 2 mM y a los 30 min el inhibidor de la ruta GS/GOGAT indicado a concentración de 5 mM. El consumo inicial es el que se determina antes de la adición del NH<sub>4</sub>Cl y el consumo final el que se determina tras la adición de los inhibidores.

consumo de nitrato.

La Figura 31 muestra que la adición de amonio, 0,3 mM, a una suspensión celular con actividad nitrogenasa y consumo de nitrato provoca una drástica inhibición de ambos procesos. La inhibición cesa, en ambos casos, cuando el amonio se ha agotado del medio, tal y como ocurre cuando se estudian los dos procesos por separado. Hay que hacer notar, sin embargo, que, si bien el consumo de nitrato se recupera completamente ( Figura 31B ), la actividad nitrogenasa tiene una pobre recuperación ( Figura 31A ).

Teniendo en cuenta el efecto a corto plazo del nitrato sobre la actividad nitrogenasa ( apartado 3.2.2.2. ), la escasa recuperación de dicha actividad observada en la Figura 31A, podría ser debida al consumo de nitrato que tiene lugar una vez consumido el amonio, hecho que indica, como cabía esperar, que la actividad nitrogenasa es más sensible a la inhibición que el consumo de nitrato.

Para demostrar que la escasa recuperación de la actividad nitrogenasa que se produce una vez consumido el amonio, se debe al consumo de nitrato, se diseñaron los experimentos que se muestran a continuación. En primer lugar, cuando se añade amonio a células con ambas actividades, pero el experimento se realiza en ausencia de nitrato, la recuperación de la actividad nitrogenasa, una vez agotado el amonio, es normal ( Figura 32 ). Si el experimento se realiza en presencia de una concentración de nitrato tal que se agote inmediatamente después

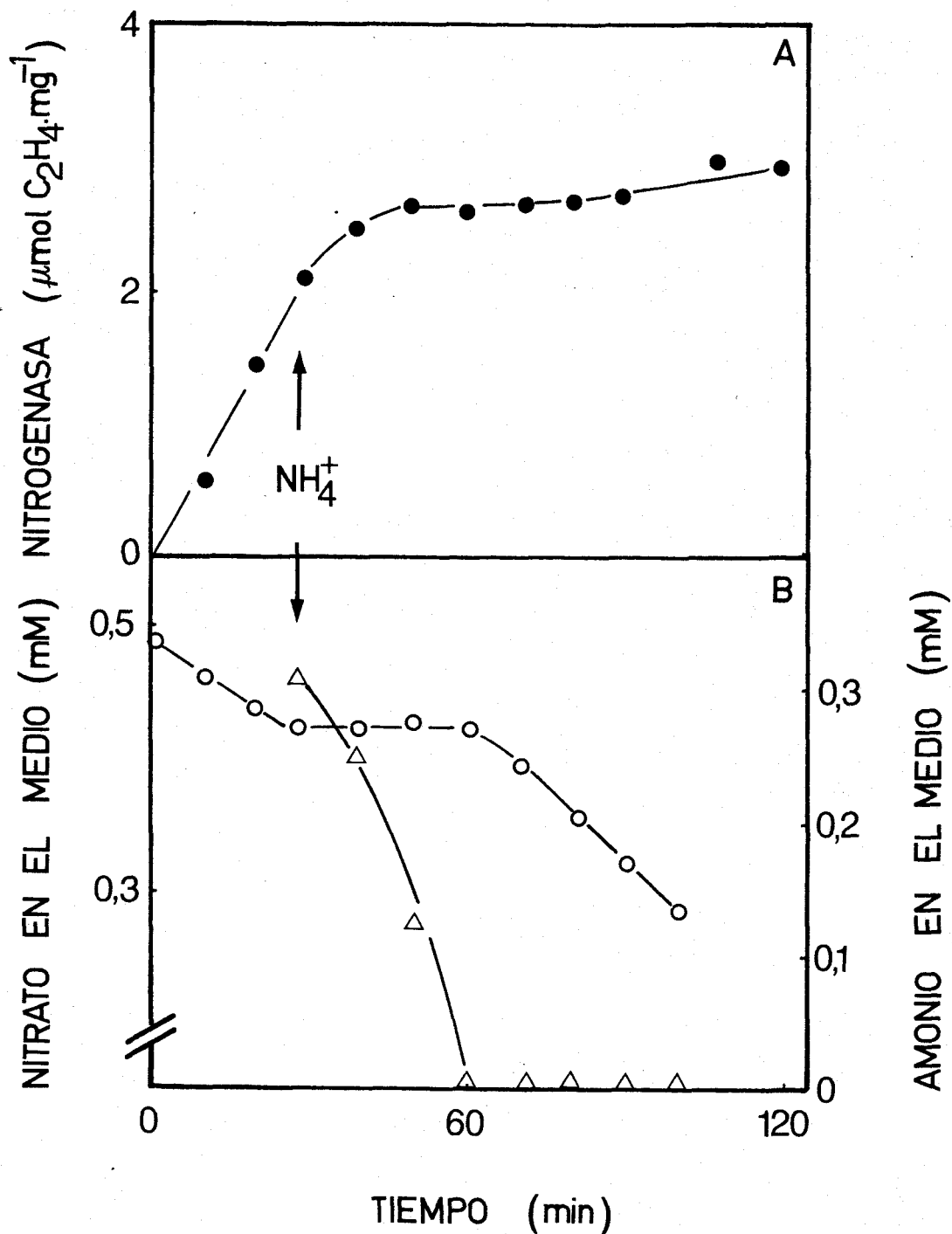


Figura 31. Inhibición simultánea de la actividad nitrogenasa y el consumo de nitrato por amonio en células de *A. chroococcum* ATCC 4412.

El experimento se llevó a cabo con células con actividad nitrogenasa y capacidad de consumo de nitrato. Muestras de 20 ml de esta suspensión celular, conteniendo 80  $\mu\text{g}$  de proteína/ml, se dispusieron en matraces de 50 ml cerrados con tapones de goma. El ensayo se inició con la adición de acetileno, 10% (v/v), y  $\text{KNO}_3$ , 0,5 mM. En una de las muestras se determinó la actividad nitrogenasa ( $\bullet$ ) y en la otra consumo de nitrato ( $\circ$ ). Al mismo tiempo se añadió a ambas  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,3 mM, cuyo consumo también se determinó ( $\Delta$ ).

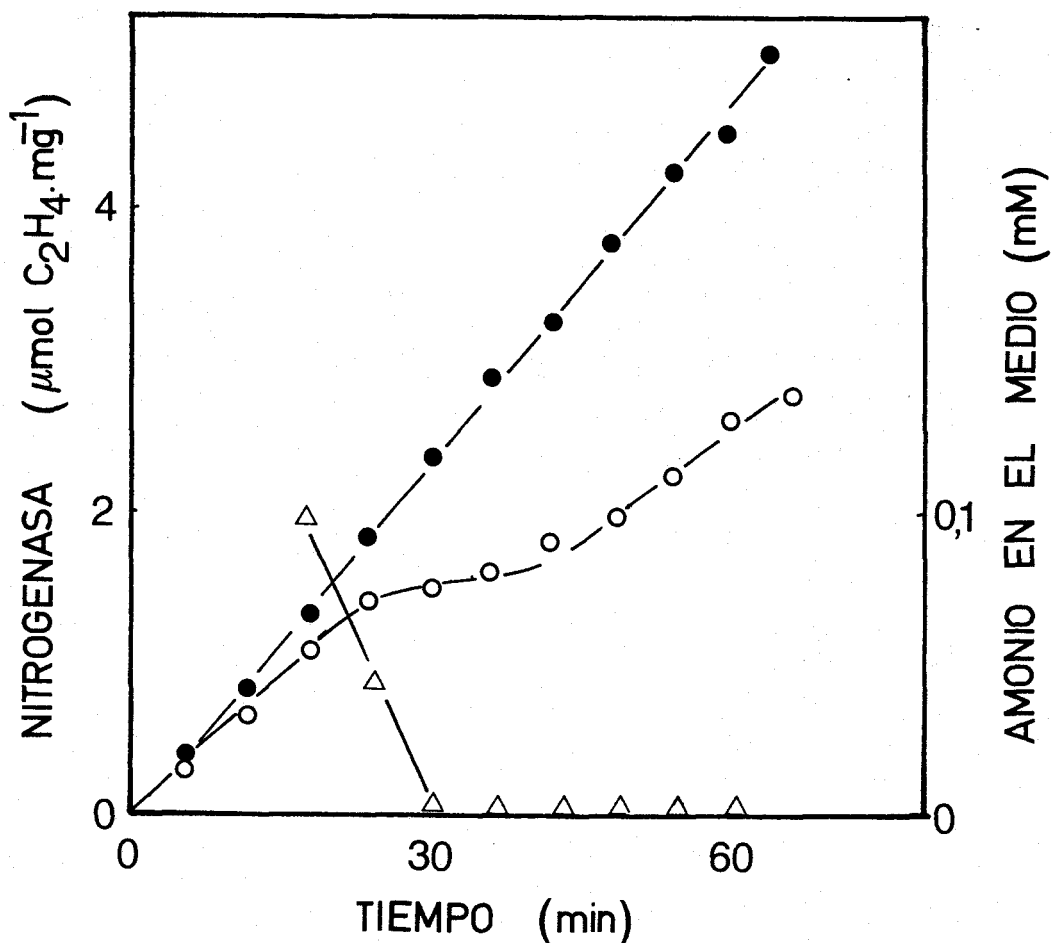


Figura 32. Efecto del amonio sobre la actividad nitrogenasa de células de *A. chroococcum* ATCC 4412 con capacidad de consumo de nitrato y actividad nitrogenasa simultáneamente.

La actividad nitrogenasa se determinó en ausencia (●) o presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,1 mM (○). También se determinó el consumo de amonio (Δ).

de consumido el amonio, la recuperación de actividad nitrogenasa es también normal ( Figura 33 ).

Cuando el experimento se realiza añadiendo MSX una vez producida la inhibición por amonio, de modo que cuando éste se agote las células sean incapaces de asimilar el nitrato presente en el medio ( Figura 34 ), se observa una recuperación normal de la actividad nitrogenasa. El nitrato en este caso es reducido por las células y expulsado al medio en forma de amonio.

Todos estos resultados demuestran que el consumo de nitrato y la actividad nitrogenasa se inhiben simultáneamente como consecuencia de la asimilación de amonio. Una vez agotado el amonio, el nivel de metabolitos inhibidores descendería, ya que es dependiente del consumo de nitrato. Esta situación que no resulta inhibidora del propio consumo de nitrato, sí es parcialmente inhibidora de la actividad nitrogenasa.

#### 3.3.4. El efecto del amonio sobre la actividad nitrogenasa es diferenciable del efecto sobre la síntesis.

La asimilación del amonio o del nitrato produce en *A. chroococcum* ATCC 4412 dos efectos sobre la fijación de  $N_2$ , uno, que se manifiesta en un periodo de tiempo corto, sobre la actividad nitrogenasa, y otro, que se manifiesta a más largo plazo, que consiste en la represión de la síntesis de la enzima. Ambos procesos, aunque dependientes de una señal común, el au

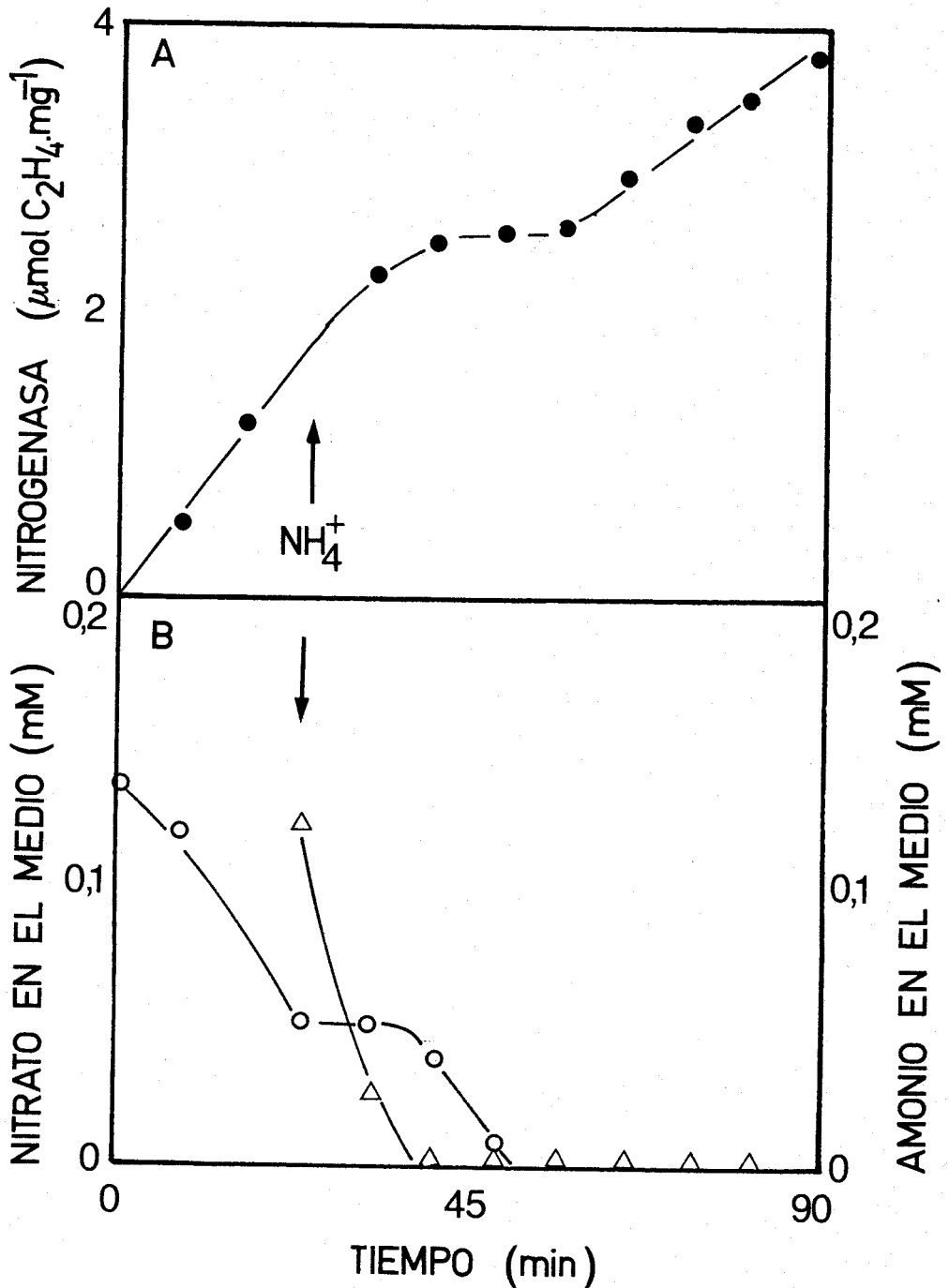


Figura 33. Inhibición de la actividad nitrogenasa y del consumo de nitrato por amonio y recuperación de la actividad nitrogenasa una vez agotados el nitrato y el amonio.

Las condiciones experimentales son las descritas en la Figura 33 excepto que la concentración de  $\text{KNO}_3$  utilizada fue de 0,15 mM. Se determinó la actividad nitrogenasa (●) y el consumo de nitrato (○). Cuando indica la flecha se añadió  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,15 mM, a ambas muestras y se determinó su consumo (△).

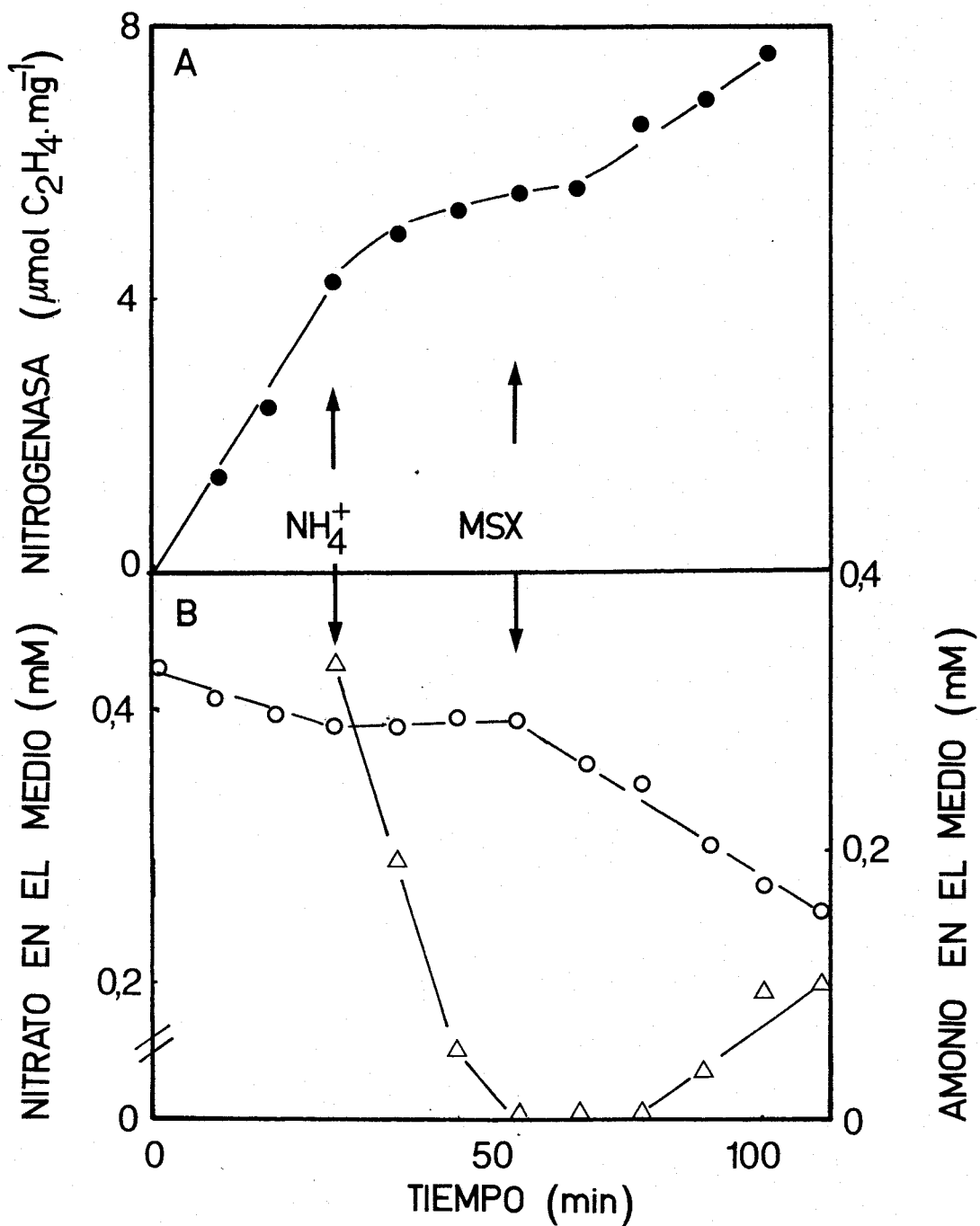


Figura 34. Reversión por MSX de la actividad nitrogenasa y el consumo de nitrato inhibidos por amonio en *A. chroococcum* ATCC 4412.

Las condiciones experimentales son las de la Figura 31. A los tiempos indicados se añadió  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,3 mM, y MSX, 5 mM. Se determinó la actividad nitrogenasa ( $\bullet$ ), el consumo de nitrato ( $\circ$ ) y de amonio ( $\Delta$ ).

mento de determinados metabolitos, se pueden considerar distintos.

En este apartado se presentan datos que corroboran este punto de vista y que suponen una separación clara de ambos efectos. Estos experimentos, dado que han requerido la transferencia del plásmido pCK3, se han realizado con *A. vinelandii*.

El plásmido pCK3 es del grupo de incompatibilidad P, derivado de pRK290 y pMC73A, tiene un tamaño de 27 Kb y confiere a la bacteria resistencia a la tetraciclina ( Kennedy y Drummond, 1985 ). La presencia de este plásmido en *A. vinelandii*, al igual que la de pCK1, promueve la presencia constitutiva del producto del gen *nifA* de *K. pneumoniae* ( Kennedy y Robson, 1983a).

El producto del gen *nifA* de *K. pneumoniae* es activador de la expresión del resto de los genes *nif* de *A. vinelandii*. En efecto, la Tabla XVIII muestra que la cepa UWr de *A. vinelandii* a la que se ha transferido el plásmido pCK3, UWr(pCK3), cultivado en presencia de amonio, tiene aproximadamente el 50% de la actividad nitrogenasa que se observa en ausencia del ión, mientras que la cepa sin plásmido carece de actividad en presencia de amonio. Así pues, ya que el amonio no reprime la síntesis de la nitrogenasa en UWr(pCK3), esta cepa es muy interesante para estudiar si el efecto sobre la actividad se produce aún cuando la síntesis de la enzima no se reprime. La Figura 35 muestra que el amonio ejerce inhibición a corto plazo sobre la actividad nitrogenasa en UWr(pCK3). Esta inhibición también se produce en *A. vinelandii* UWr ( no mostrada ).



Tabla XVIII. Efecto del amonio sobre los niveles de actividad nitrogenasa de *A. vinelandii* UWr y *A. vinelandii* UWr(pCK3).

Medio de cultivo	Actividad nitrogenasa ( nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /min.mg protefna )	
	UWr	UWr(pCK3)
BS	80	58
BS + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	30

Se cultivaron las células en matraces de 25 ml de capacidad conteniendo 5 ml de los medios indicados. Tras 12 h de cultivo se determinó la actividad nitrogenasa en el cultivo cerrando el matraz con un tapón de goma y añadiendo acetileno al 10% ( v/v ).

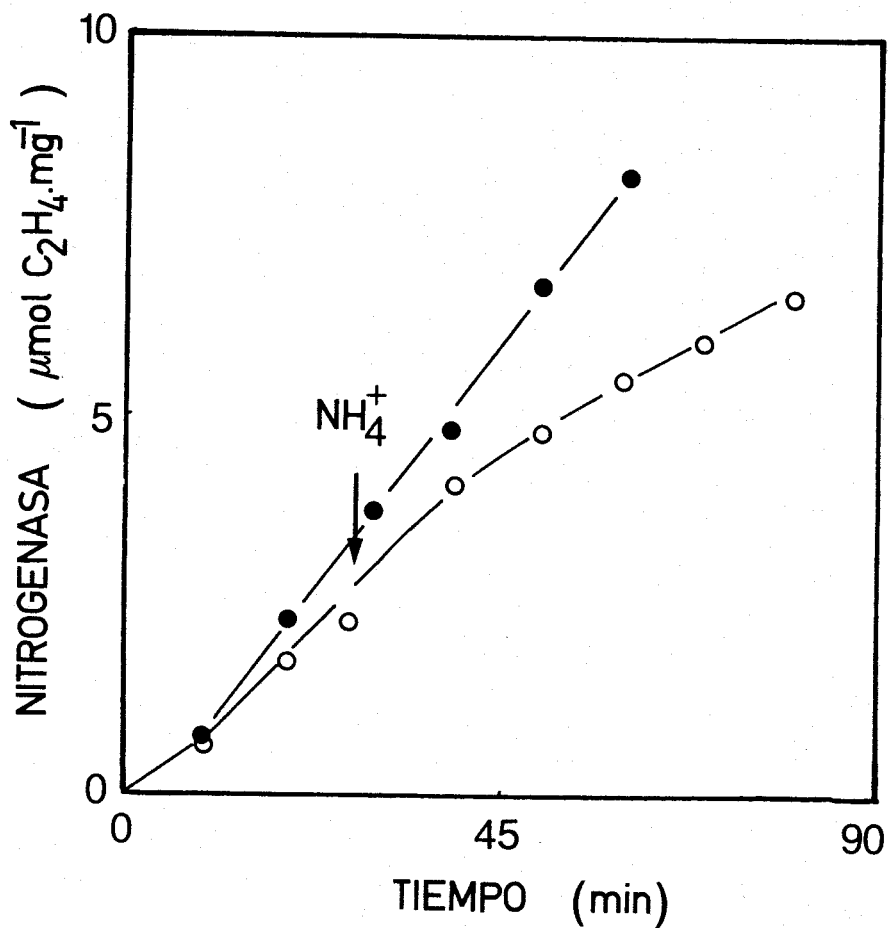


Figura 35. Efecto del amonio sobre la actividad nitrogenasa de *A. vinelandii* UWr(pCK3) .

Células cultivadas en medio BS se recogieron por centrifugación, se lavaron con medio medio fresco y se resuspendieron en el mismo medio. Se determinó la actividad nitrogenasa en ausencia (●) y presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,6 mM, (○), que se añadió cuando se indica con la flecha.

Estos resultados demuestran que los dos efectos del amonio sobre la fijación de nitrógeno, que tienen un origen común en los derivados de su asimilación, son independientes en *Azotobacter*, ya que en UWr(pCK3), cepa en la que la síntesis de la enzima no se reprime por el ión, sí se produce la inhibición de la actividad nitrogenasa por el amonio.

No se pudieron llevar a cabo estudios de la regulación de la actividad nitrogenasa por nitrato en UWr(pCK3) porque la presencia del plásmido en esta bacteria impide la asimilación de nitrato ( Figura 36. ) o nitrito ( no mostrado ).

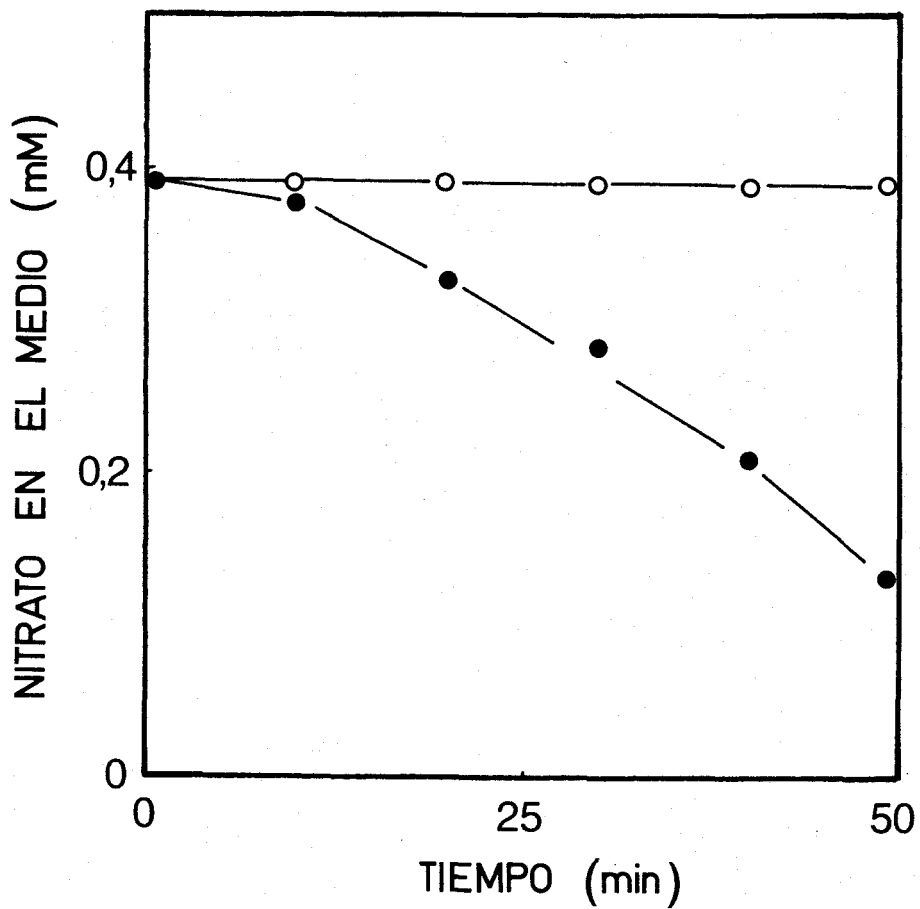


Figura 36. Efecto del plásmido pCK3 sobre el consumo de nitrato en *A. vinelandii* UWr.

El ensayo se inició con la adición de  $\text{KNO}_3$ , 0,4 mM, a suspensiones celulares conteniendo 80  $\mu\text{g}$  de proteína/ml de *A. vinelandii* UWr (●) o *A. vinelandii* UWr (pCK3) (○).

### 3.4. INFLUENCIA DE LA FUENTE DE CARBONO Y ENERGIA SOBRE LA ACTIVIDAD NITROGENASA Y SU REGULACION EN *A. chroococcum* ATCC 4412.

En *A. chroococcum*, la fuente de carbono, además de servir para la síntesis de los esqueletos carbonados necesarios para el metabolismo del microorganismo, es su fuente de energía.

El proceso de la fijación de  $N_2$ , extremadamente costoso para la célula desde el punto de vista energético, es dependiente de la presencia en el medio de una fuente utilizable de carbono y energía.

Consideramos, por tanto, la fuente de carbono en sus dos aspectos; por una parte, en cuanto que los metabolitos carbonados y el equilibrio que estos mantienen con metabolitos carbono-nitrogenados es, como se ha puesto de manifiesto en este trabajo, muy importante para la regulación de la actividad nitrogenasa, y, de otro, la total dependencia de la actividad de un aporte adecuado de energía.

#### 3.4.1. Utilización de diferentes fuentes de carbono por *A. chroococcum* ATCC 4412.

En este apartado se presentan resultados acerca de la utilización por parte de *A. chroococcum* ATCC 4412 de diferentes intermediarios del ciclo de Krebs. Para ello se ha determinado la tasa respiratoria dependiente de estos sustratos.

La Tabla XIX muestra que *A. chroococcum* ATCC 4412 cultivado en presencia de sacarosa como fuente de carbono, no puede utilizar ninguno de los intermediarios estudiados: succinato, malato, fumarato o 2-oxoglutarato.

La utilización de estos sustratos es inducible mediante incubación de las células en presencia de cada uno de ellos. La Figura 37 muestra la inducción de la utilización de succinato, estas células muestran también capacidad de utilizar malato aún con mayor velocidad que succinato, y, en menor medida, fumarato y 2-oxoglutarato ( Tabla XX ). También se observa en esta Tabla, que cuando la incubación con succinato se hace en presencia de sacarosa, se obtienen prácticamente los mismos resultados, con la diferencia de que la tasa respiratoria dependiente de sacarosa es mayor.

#### 3.4.2. Dependencia de la actividad nitrogenasa de una fuente de carbono utilizable.

La actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412 es detectable tan sólo si se añade una fuente de carbono que pueda ser utilizada por la bacteria en el ensayo.

En la Tabla XXI se muestra la actividad nitrogenasa observada en presencia de distintas fuentes de carbono con células capaces o no de utilizar tales sustratos. En primer lugar, se observa que células cultivadas en presencia de saca-

Tabla XIX. Efecto de diferentes sustratos carbonados sobre la tasa respiratoria de células de *A. chroococcum* ATCC 4412 cultivadas con sacarosa como fuente de carbono.

Sustrato añadido	Tasa respiratoria ( nmol/min.mg protefna )
Ninguno	46
Sacarosa	728
Succinato	46
Malato	57
Fumarato	46
2-oxoglutarato	28

Células cultivadas en BS se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con medio fresco carente de fuente de carbono y se resuspendieron en el mismo medio hasta una densidad celular de 20  $\mu\text{g}$  de proteína/ml. De esta suspensión celular se tomaban alícuotas para la determinación de la tasa respiratoria en un electrodo de oxígeno. Los sustratos carbonados se añadían una vez la muestra en la cámara del electrodo a las siguientes concentraciones: sacarosa, 27 mM y el resto de los sustratos a 10 mM.

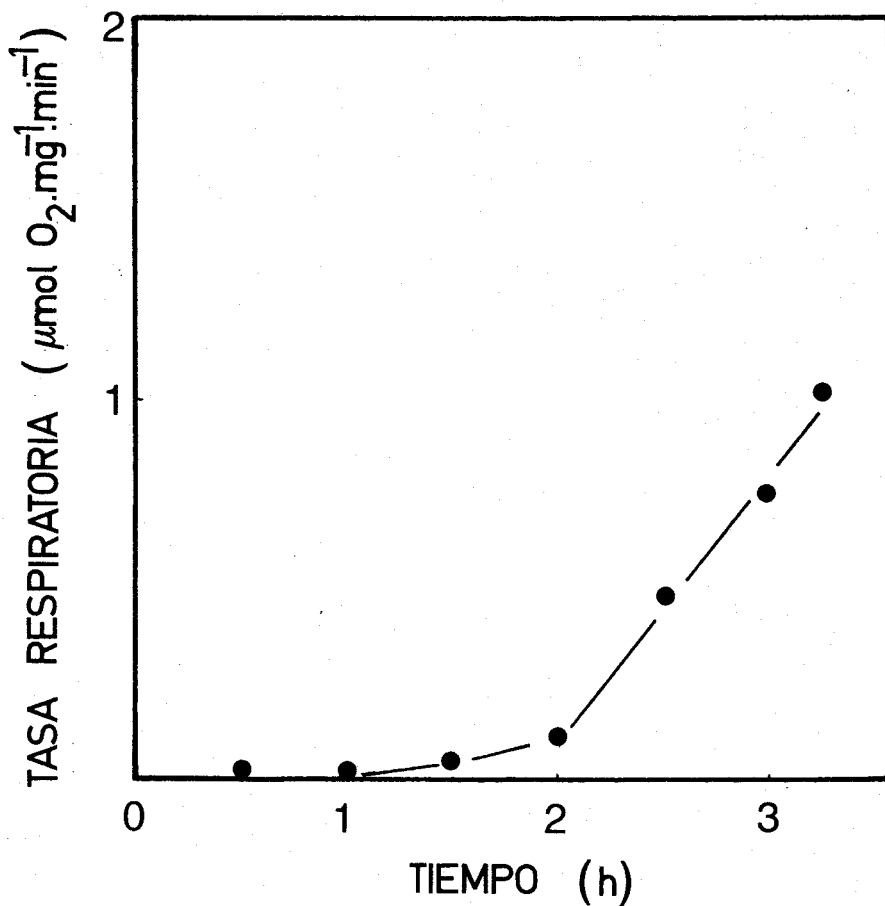


Figura 37. Inducción de la tasa respiratoria dependiente de succinato en *A. chroococcum* ATCC 4412.

Células cultivadas en medio BS se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces en medio carente de sacarosa y se resuspendieron en medio fresco en el que la sacarosa se substituyó por succinato sódico, 10 mM. A los tiempos indicados se determinó la tasa respiratoria en muestras de esta suspensión celular como se describe en Materiales y Métodos.



Tabla XX. Efecto de diferentes sustratos carbonados sobre la la tasa respiratoria de células de *A. chroococcum* ATCC 4412 incubadas en presencia de succinato o succinato y sacarosa.

Medio de incubación	Fuente de carbono en el ensayo	Tasa respiratoria (nmol/min.mg protefna )
Succinato	Ninguna	65
	Sacarosa	147
	Fumarato	538
	Succinato	1564
	Malato	2347
	2-oxoglutarato	274
Sacarosa y succinato	Ninguna	293
	Sacarosa	566
	Succinato	1446
	Malato	2137
	2-oxoglutarato	503

Células cultivadas en medio BS se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con medio fresco libre de fuente de carbono, se resuspendieron en el mismo medio suplementado con sacarosa, 1% (p/v), o sacarosa, 1% (p/v) y succinato, 10 mM, y se incubaron durante tres horas en condiciones de cultivo. Tras esta incubación se determinó la tasa respiratoria en presencia de las fuentes de carbono indicadas, como se describe en la Tabla XIX.

Tabla XXI. Influencia de la fuente de carbono del ensayo sobre la actividad nitrogenasa de células de *A. chroococcum* ATCC 4412 procedentes de medios con diferentes fuentes de carbono.

Medio de incubación	Fuente de carbono en el ensayo	Activ. nitrogenasa (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /min.mg prot.)
Sacarosa	Sacarosa	105
	Succinato	0
	Malato	0
Succinato	Sacarosa	-
	Succinato	73
	Malato	73
Sacarosa y succinato	Sacarosa	108
	Succinato	76
	Malato	72
	Sacarosa y succinato " y malato	91 83

Células cultivadas en BS se incubaron durante 3 h con sacarosa, succinato o sacarosa y succinato. Posteriormente, las células se recogieron, se lavaron dos veces con medio libre de fuente de carbono y se resuspendieron en el mismo medio suplementado con las fuentes de carbono que se indican, para la determinación de la actividad nitrogenasa. Las concentraciones de los sustratos carbonados fueron: sacarosa, 27 mM, y el resto, 10 mM.

rosa, incapaces de utilizar malato o succinato como fuente de carbono, carecen de actividad nitrogenasa dependiente de algunos de estos sustratos, actividad que sí se observa en células capaces de utilizarlos.

3.4.3. Efecto del ácido malónico y de agentes que afectan al potencial de membrana sobre la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412.

Se ha estudiado el efecto de diferentes inhibidores del aporte energético al metabolismo celular sobre la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412.

Uno de estos agentes ha sido el malonato. Este compuesto es un análogo estructural del succinato que inhibe competitivamente la succinato deshidrogenasa ( Veeger *et al*, 1969 ), enzima que cataliza la reducción de succinato a fumarato en el ciclo de Krebs.

El ácido malónico tan sólo es un inhibidor efectivo en células capaces de utilizar succinato ( Tabla XXII) y carecen de efecto en células cultivadas con sacarosa ( resultado no mostrado ). En células cuya tasa respiratoria ha sido inhibida por ácido malónico, la actividad nitrogenasa que se observa es mucho menor que la observada en células cuya tasa respiratoria no ha sido inhibida ( Figura 38 ).

Se ha estudiado también el efecto sobre la actividad ni-

Tabla XXII. Efecto del ácido malónico sobre la tasa respiratoria dependiente de succinato en *A. chroococcum* ATCC 4412.

Acido Malónico (mM)	Tasa respiratoria (nmol O <sub>2</sub> /min.mg de proteína)
-	3200
50	2400
100	1600

A células incubadas en presencia de succinato durante 3 h se les añadió ácido malónico a las concentraciones indica  
das. Tras 20 min de incubación se determinó la tasa respira  
ria.

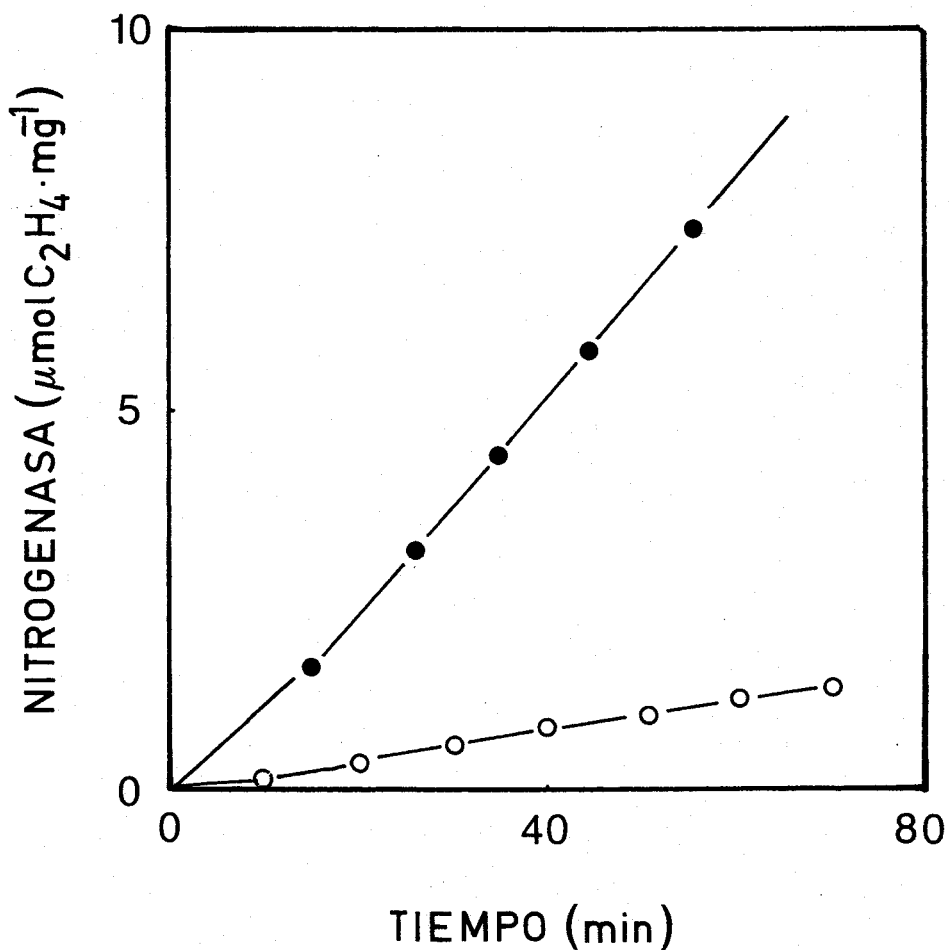


Figura 38. Efecto del ácido malónico sobre la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412.

Células en las que se había inducido la capacidad de utilizar succinato como sustrato respiratorio se recogieron por centrifugación, se lavaron con medio que contenía succinato como fuente de carbono y se resuspendieron en el mismo medio. A una muestra de esta suspensión celular se añadió ácido malónico, 50 mM, 20 min antes de iniciar el ensayo (○). También se determinó la actividad nitrogenasa en ausencia del inhibidor (●).

trogenasa de agentes que disminuyen el potencial de membrana, tales como el tetrafenilfosfonio ( TPP ) o el ionóforo valinomicina en presencia de alta concentración extracelular de KCl ( Presman, 1976 ). La Tabla XXIII muestra que la inhibición de la nitrogenasa es del 100% con una concentración de TPP de 200  $\mu$ M, mientras que en el caso de la valinomicina, la inhibición de la nitrogenasa aumenta al aumentar la concentración de KCl, siendo del 100% en presencia de 150 mM de  $K^+$ .

3.4.4. Efecto del amonio sobre la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412 en presencia de diferentes fuentes de carbono.

El grado de inhibición que ejerce el amonio sobre la actividad nitrogenasa depende de la fuente de carbono en la que han sido cultivadas las células.

En la Tabla XXIV se observa que en células procedentes de un cultivo con sacarosa y succinato como fuente de carbono, el grado de inhibición que produce el amonio, que oscila en torno al 50%, es menor que el observado en células procedentes de succinato o sacarosa, en las que el grado de inhibición es superior al 90%, cualquiera que sea la fuente de carbono presente en el ensayo.

El menor grado de inhibición podría explicarse asumiendo que estas células tengan mayor nivel intracelular de metabolitos carbonados que las incubadas en presencia de una sola

Tabla XXIII. Efecto de agentes que destruyen el potencial de membrana sobre la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412.

Agente	Actividad nitrogenasa ( nmolC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /min.mg proteína )
-	118
TPP ( 200 μM )	0
Valinomicina, 5 μM + [K <sup>+</sup> ], 37 mM	118
" " + " , 80 mM	44
" " + " , 150 mM	0

Células cultivadas en medio BS se recogieron por centrifugación, se lavaron con tampón MOPS-KOH, 50 mM, pH 7,5 y se resuspendieron en el mismo tampón suplementado con sacarosa 1% ( p/v ) a una densidad celular de 60 μg de proteína/ml. La actividad nitrogenasa se ensayó en cada caso en ausencia y en presencia de los agentes indicados.

Tabla XXIV. Efecto de la fuente de carbono sobre la inhibición de la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* ATCC 4412.

Medio de incubación	Fuente de carbono en el ensayo	Inhibición de la actividad nitrogenasa ( % ).
Sacarosa	Sacarosa	>90
	Succinato	-
	Malato	-
Succinato	sacarosa	>90
	Succinato	>90
	Malato	>90
Sacarosa y succinato	Sacarosa	86
	Succinato	48
	Malato	60
	Sacarosa y succinato	52
	" y succinato	57

Las condiciones experimentales son las descritas en la Tabla XXI. A los 33 min del inicio de cada ensayo de actividad nitrogenasa se añadió  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 5 mM. Se considera 100% de actividad a la tasa de producción de etileno anterior a la adición de amonio.



fuelle de carbono, siendo ésla una siluación metabólica similar a la que se produce como consecuencia de la deficiencia de nitrógeno. La tasa respiratoria dependiente de metabolitos intracelulares es mayor en células procedentes de cultivos con sacarosa y succinato como fuentes de carbono que en células procedentes de sacarosa o succinato, lo cual apoya la idea presentada anteriormente. Sin embargo, esta idea requiere de mayor apoyo experimental.

### 3.5. CONSTRUCCION Y CARACTERIZACION DE PLASMIDOS PORTADORES DE LOS GENES *nifHDK* de *K. pneumoniae*.

En este último apartado de la sección de Resultados se describe la construcción y caracterización de los plásmidos pJC1 y pJC2 portadores del operón *nifHDK* en las dos orientaciones posibles.

A lo largo de este trabajo nos hemos venido refiriendo a un doble efecto del amonio sobre la fijación de nitrógeno; el efecto a largo plazo, observado en prácticamente todos los organismos fijadores de nitrógeno, y el efecto sobre la actividad nitrogenasa o efecto a corto plazo, que se da en numerosos microorganismos, entre los que se cuentan *Azotobacter* y las bacterias fotosintéticas de la familia *Rhodospirillaceae*, pero que no se da en *Rhizobium leguminosarum* ( Laane *et al*, 1980 ), ni en organismos que fijan nitrógeno sólo en condiciones fermentativas tales como *Chlostridium* o *Klebsiella* ( Daesch y Mortenson, 1972; Tubb y Postgate, 1973 ).

El hecho de que en *K. pneumoniae*, a diferencia de lo que ocurre en *Azotobacter*, no se produzca el efecto a corto plazo del amonio sobre la actividad nitrogenasa, hacía particularmente interesante para el estudio de este efecto, la construcción de cepas de *A. vinelandii* con nitrogenasa de *K. pneumoniae*, objeto para el que se han construido los plásmidos portadores de los genes *nifHDK* de *K. pneumoniae*, que codifican para los polipéptidos constituyentes de la nitrogenasa ( ver

Introducción, apartado 1.3.3.2. ).

La expresión de los genes *nif<sup>H</sup>DK* de *K. pneumoniae* en *A. vinelandii* había sido estudiada previamente. Cannon y Postgate ( 1977 ), describieron expresión de estos genes procedentes de *K. pneumoniae* en *A. vinelandii*; sin embargo, posteriormente, los mismos autores publicaron que tales resultados no podían reproducirse ( Cannon y Postgate, 1983 ). Recientemente, ( Kennedy y Drummond, 1985 ), mediante la utilización de fusiones *lac*, han llegado a la conclusión de que el operón *nif<sup>H</sup>DK* de *K. pneumoniae* no se transcribe en *A. vinelandii*.

A pesar de estos antecedentes, se ha creído conveniente realizar un nuevo intento de expresión de *nif<sup>H</sup>DK* proveniente de *K. pneumoniae* en *A. vinelandii*. Para ello, se han clonado estos genes en el vector de amplio espectro, pRK2501. La construcción y caracterización de estos plásmidos se presentan en este apartado.

### 3.5.1. Construcción de los plásmidos pJC1 y pJC2 portadores de los genes *nif<sup>H</sup>DK* de *K. pneumoniae*.

Se utilizó como fuente de los genes *nif<sup>H</sup>DK* el plásmido pSA30, un derivado de pACYC184 que contiene un fragmento *EcoRI* de 6,9 Kb portador de los genes *nif<sup>H</sup>DK* de *K. pneumoniae* ( Cannon *et al*, 1979 ). Dado que este vector no es adecuado para la transferencia de genes a *Azotobacter*, se subclonó el fragmento *EcoRI* de 6,9 Kb de interés en el vector pRK2501, cuya utili-

dad para la transferencia de genes a *Azotobacter* ha sido ya pro  
bada ( por ejemplo, Ramos y Robson, 1985b ). pRK2501 es un plásmido del grupo de incompatibilidad P que contiene un único sitio de corte para *EcoRI*.

La estrategia utilizada para la obtención del plásmido recombinante es la siguiente. En primer lugar, se buscó una en  
zima de restricción que tuviera un único sitio de corte en pACYC184 y ningún sitio en el fragmento de 6,9 Kb que se iba a clonar. De las enzimas probadas se encontró que *ScaI* reunía ambas propiedades. Posteriormente se hizo doble digestión del ADN de pSA30 con las enzimas *EcoRI* y *ScaI*. De esta digestión se obtuvieron tres tipos de fragmentos, de los que sólo el frag  
mento de 6,9 Kb que se iba a clonar tenía ambos extremos cohe  
sivos *EcoRI*, los otros dos fragmentos tenían una terminación *EcoRI* y la otra *ScaI*. El vector pRK2501 se sometió a digestión con la enzima *EcoRI* y se trató con fosfatasa alcalina para pre  
venir recircularización del ADN del vector. Se hizo ligamien  
to con los fragmentos resultantes de ambas digestiones. En es  
ta reacción de ligamiento se forman básicamente tres tipos de moléculas circulares: el fragmento de 6,9 Kb circularizado con  
sigo mismo, que no es seleccionable porque carece de resistencia a antibióticos, pRK2501 recircularizado y pRK2501 con el fragmento de 6,9 Kb en el que estamos interesados ( Figura 39 ).

Con el ADN resultante del ligamiento se transformó *E. coli* 5K y se seleccionó en medio rico suplementado con kanamicina ( pRK2501 confiere resistencia a kanamicina y tetraciclina ).

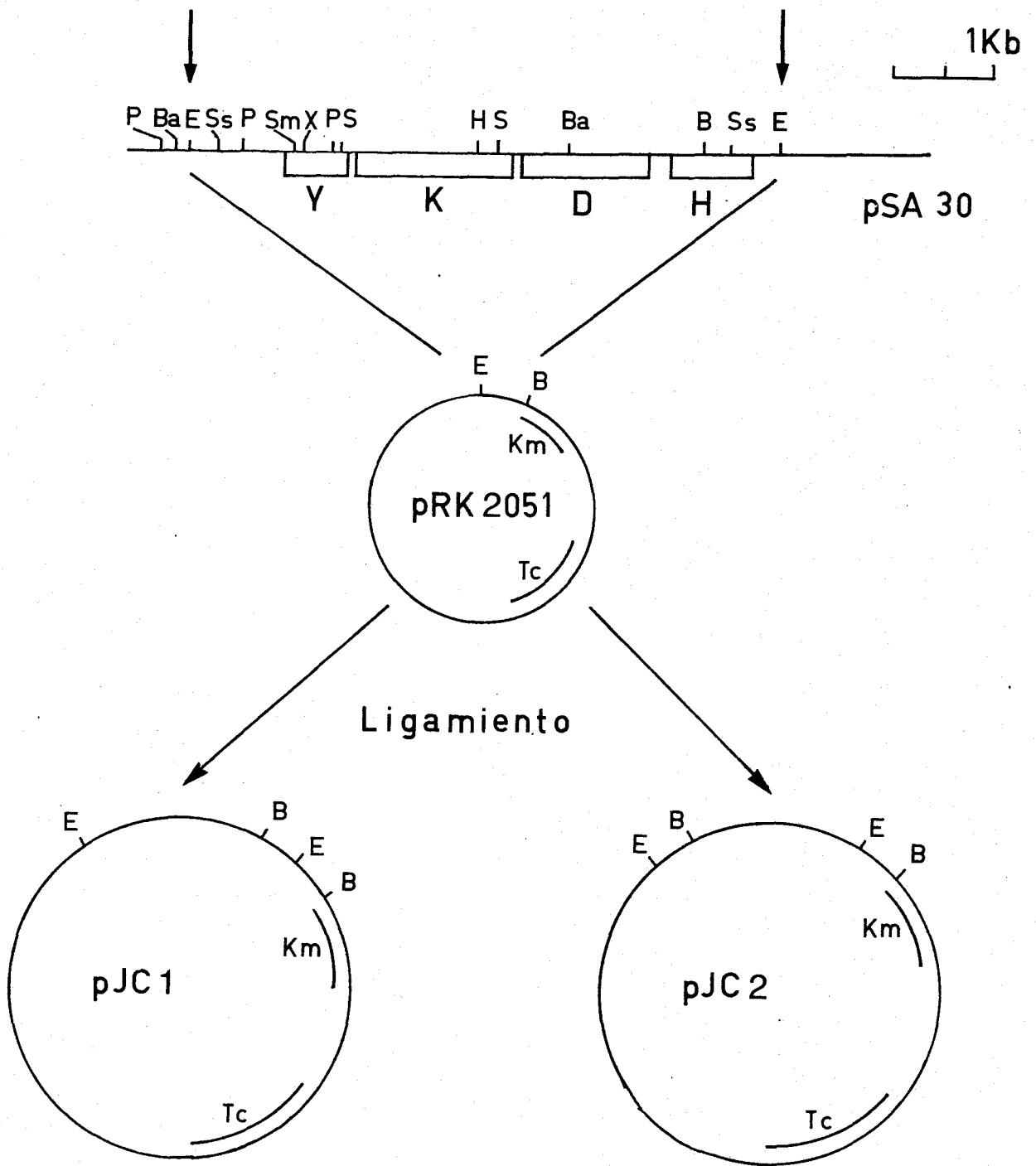


Figura 39. Cronstrucción de los plásmidos pJC1 y pJC2.

Los símbolos de las enzimas de restricción son: P, *Pst*I; B, *Bgl*III; E, *Eco*RI; Ss, *Sst*II; Sm, *Sma*I; X, *Xma*III; S, *Sal*I; H, *Hind*III; Ba, *Bam*HI.

De entre las colonias que aparecieron, presumiblemente portadoras del plásmido recombinante o bien de pRK2501 recircularizado, se sembraron 50 en medio rico suplementado con kanamicina y el antibiótico no seleccionado, tetraciclina. Todas ellas resultaron resistentes a ambos antibióticos. 10 de estas colonias se cultivaron en medio líquido para el estudio de sus plásmidos. Tras su aislamiento, la digestión de estos plásmidos con *EcoRI* y posterior electroforesis mostró en 9 de las 10 colonias estudiadas un fragmento de 7 Kb y otro de 11 Kb, mientras sólo una presentaba el fragmento de 11 Kb correspondiente a pRK2501 ( Figura 40 ).

En los plásmidos recombinantes se estudió la orientación en la que se había insertado el fragmento de 6,9 Kb. Para ello se utilizó la enzima *BglIII* que tiene un sitio de corte asimétrico en el inserto y un único sitio de corte en pRK2501 a 1 Kb aproximadamente del sitio *EcoRI* ( Figura 39 ). De la digestión con *BglIII* se esperaban, si efectivamente se han conseguido las dos orientaciones, una distribución de fragmentos de 16 Kb y 2 Kb para una orientación y 11 Kb:7 Kb para la orientación contraria. La Figura 41 muestra la distribución 16:2 en las líneas 5, 6, 7 y 10, y la distribución 11:7 en la línea 3 del gel. El plásmido cuya orientación producía una orientación 16:2 se designó pJC1, mientras al que producía orientación 11:7 se le designó pJC2.

Una vez construidos ambos plásmidos se procedió a su caracterización en cuanto a su capacidad para complementar mutantes tanto de *K. pneumoniae* como de *A. vinelandii* afectados en

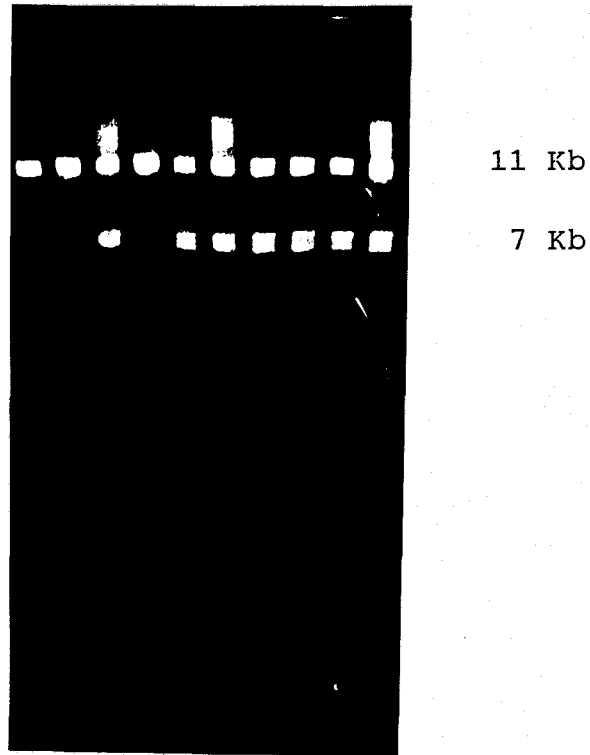


Figura 40. Distribución de los fragmentos obtenidos tras la digestión con *EcoRI* del ADN de los plásmidos seleccionados resultantes del ligamiento.

El aislamiento del ADN y las condiciones en las que se realizó la digestión se describen en Materiales y Métodos. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 0,8% ( p/v ) y el voltaje utilizado fue de 40 V.

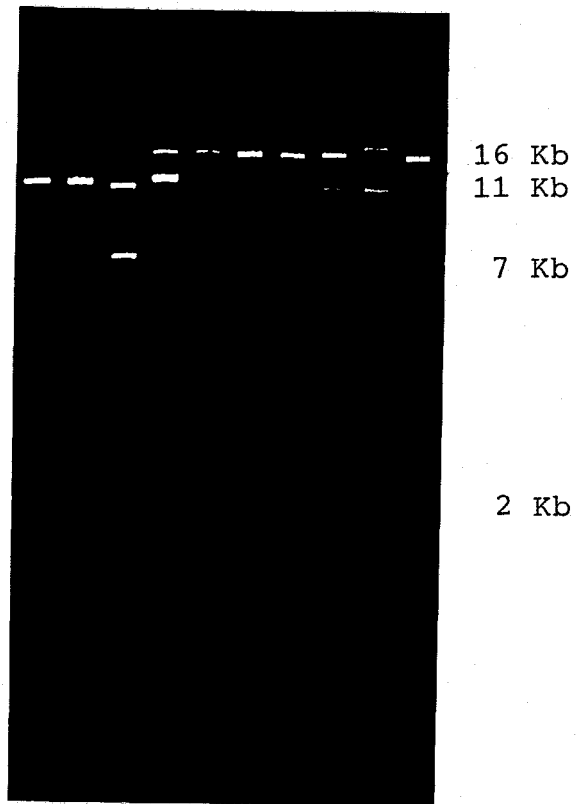


Figura 41. Distribución de los fragmentos obtenidos tras digestión de los plásmidos recombinantes con *Bgl*II.

Las condiciones experimentales son las descritas en la Figura 40.



alguno de los genes presentes en dichos plásmidos.

### 3.5.2. Caracterización de los plásmidos pJC1 y pJC2.

Las cepas de *K. pneumoniae* utilizadas se presentan en la Tabla XXV. La transferencia de los plásmidos se realizó por conjugación seleccionando a los transconjugantes en medio rico suplementado con antibióticos. Posteriormente se estudió si había complementación tanto para crecimiento en condiciones diazotróficas como para actividad nitrogenasa (reducción de acetileno). Ambos plásmidos resultaron ser parcialmente inhibidores para el crecimiento de la cepa silvestre. pJC2 produjo bajo nivel de complementación en UNF 1150 (mutante *nif H*) y UNF 824 (mutante *nif D*), y ambos plásmidos complementaron a CK 2901 (mutante *nif D*) (Tabla XXVI). No se observó complementación de UNF 1149 (mutante *nif K*) ni de UNF 2018 (mutante *nif J*) que se utilizó como control pues el gen *nif J* está contenido en los plásmidos. En el resto de los casos, señalados con (R) en la tabla XXVI, el crecimiento observado era debido probablemente a recombinación, dado que, en vez de un crecimiento uniforme, aparecían colonias aisladas.

En la cepa silvestre, la presencia de los plásmidos no producía inhibición alguna de la actividad nitrogenasa. Se encontraron niveles de complementación de dicha actividad entre el 4-15% en los mutantes UNF 1149 (mutante *nif K*), UNF 1150 (mutante *nif H*), CK 2901 (mutante *nif D*) y UNF 824 (mutante *nif D*) (Tabla XXVI). Todos los cuales, excepto CK 2901,

Tabla XXV. Cepas de *K. pneumoniae* utilizadas en este trabajo

Cepa	Alelo <i>nif</i> afectado	Otros marcadores de interés.	Referencia
KP 50231			
CK 3171	<i>nifK</i> 2317		1,2
UNF 1149	<i>nifK</i> 2189::Tn7	<i>hisD2</i>	3
UNF 1150	<i>nifH</i> 2191::Tn7		3
CK 2601	<i>nifH</i> 2260		1,2
CK 2901	<i>nifD</i> 2290		1,2
UNF 824	<i>nifD</i> 2563::Tn5		3
UNF 2108	<i>nifJ</i> 2408	<i>hisD2</i>	3

Las referencias incluidas en esta Tabla son:

- 1.- Dixon *et al*, ( 1977 ).
- 2.- Kennedy ( 1977 )
- 3.- Merrick *et al*, ( 1978 ).

Tabla XXVI. Complementación de mutantes de *K. pneumoniae* con los plásmidos pJC1 y pJC2.

Cepa	Genotipo	Act. nitrogenasa ( % )	Crecimiento con N <sub>2</sub>
KP 50231		100	+++
KP 50231(pJC1)		100	++
KP 50231(pJC1)		100	++
UNF 1149	<i>nifK</i>	0	+
UNF 1149(pJC1)	"	5	+
UNF 1149(pJC2)	"	7	+
CK 3171	<i>nifK</i>	2	-
CK 3171(pJC1)	"	2	(R)
CK 3171(pJC2)	"	2	(R)
UNF 1150	<i>nifH</i>	0	-
UNF 1150(pJC1)	"	4	(R)
UNF 1150(pJC2)	"	6	+
CK 2601	<i>nifH</i>	0	-
CK 2601(pJC1)	"	0	(R)
CK 2601(pJC2)	"	0	(R)
CK 2901	<i>nifD</i>	0	-
CK 2901(pJC1)	"	4	+
CK 2901(pJC2)	"	6	+
UNF 824	<i>nifD</i>	0	-
UNF 824(pJC1)	"	3	(R)
UNF 824(pJC2)	"	15	+
UNF 2108	<i>nifJ</i>	6	+
UNF 2108(pJC1)	"	2	+
UNF 2108(pJC2)	"	4	+

son mutantes obtenidos mediante transposición. Como cabía esperar, no se encontró complementación alguna de UNF 2108 ( mutante *nif J* ) utilizado como control. El hecho de que se observara complementación precisamente en los mutantes obtenidos mediante transposición y no en las cepas con mutación puntual , con excepción de CK 2901, hace pensar que en CK 2601 y CK 3171, la mutación puntual origina polipéptidos defectuosos que al reconstituir la enzima completa con los polipéptidos codificados por el plásmido, dan lugar a una nitrogenasa inactiva, mientras que en los mutantes obtenidos con transposición, que deben de carecer de esos polipéptidos, la actividad observada depende tan solo de la enzima codificada por el plásmido.

Ambos plásmidos fueron transferidos también a *A. vinelandii* UWr, así como al mutante UWr48 (*nifH::Tn5* ). La Tabla XXVII muestra que los plásmidos resultan prácticamente sin efecto inhibitor sobre el crecimiento y la actividad nitrogenasa en la cepa silvestre, sin embargo, no restauran ninguna de las dos capacidades en la cepa UWr48, que, en cambio, si es complementada por el plásmido pLV10, portador de los genes *nif HDK* del propio *A. vinelandii* que se utilizó como control.

Estos resultados suponen una nueva evidencia de la imposibilidad de expresar el operón *nif HDK* de *K. pneumoniae* en *A. vinelandii*

Tabla XXVII. Complementación de *A. vinelandii* UW48 con los plásmidos pJC1, pJC2 y pLV10.

Cepa	Genotipo	Act.nitrogenasa ( % )	Crecimiento con N <sub>2</sub>
UWr		100	+++
UWr (pJC1)		96	++
UWr (pJC2)		102	++
UW48	<i>nifH</i>	0	-
UW48 (pJC1)	"	0	-
UW48 (pJC2)	"	0	-
UW48 (pLV10)	"	93	++

El crecimiento se estudió en medio sólido libre de nitrógeno combinado en una atmósfera de aire. La actividad nitrogenasa se determinó en cultivos realizados con urea, 2 mM, como fuente de nitrógeno. Se considera 100% de actividad la de la cepa silvestre sin plásmido.

#### 4. DISCUSSION

En este trabajo se ha estudiado la regulación de la actividad nitrogenasa en *Azotobacter* que, como ya se ha indicado, es una bacteria fijadora de nitrógeno, heterótrofa y aerobia estricta.

La determinación de la actividad nitrogenasa a lo largo de todo el estudio se ha realizado siempre *in vivo*, utilizando acetileno como sustrato y midiendo por cromatografía de gases el etileno producido como consecuencia de dicha actividad, método rutinariamente utilizado por la mayoría de los autores.

En primer lugar, era imprescindible determinar unas condiciones de ensayo óptimas que permitieran poca variabilidad en las determinaciones. En este contexto, la  $pO_2$  utilizada para el cultivo de esta bacteria, así como para el propio ensayo de la actividad nitrogenasa, resultan muy importantes. Drozd y Postgate ( 1970b ), describieron que la  $pO_2$  óptima en el ensayo de la actividad para *A. chroococcum* y *A. vinelandii* depende de la utilizada para el cultivo, y que, en cualquier caso, es menor que la  $pO_2$  atmosférica. Nuestros resultados ( apartado 3.1.2. ), muestran que en un cultivo de *A. chroococcum* en el que el aporte de oxígeno se hace mediante burbujeo con aire, la actividad nitrogenasa que se observa es 3 veces mayor que la determinada en un cultivo sometido a agitación ( 150 rpm ). En nuestras condiciones de ensayo, en las que la densidad celular de la muestra era ajustada previamen

te a 60-70  $\mu\text{g}$  de proteína/ml, y la agitación se mantenía a 100 oscilaciones/min, la  $p\text{O}_2$  más adecuada para la actividad nitrogenasa era la atmosférica. Aunque estos resultados están en contradicción con los descritos por Drozd y Postgate ( 1970a y b ), no son inesperados, pues, como hemos dicho, la  $p\text{O}_2$  del ensayo está íntimamente relacionada con la agitación a la que se someta la muestra, la densidad celular de ésta y las condiciones en las que se realiza el cultivo, y, por tanto, han de establecerse para cada caso concreto.

Una vez establecidas las condiciones adecuadas para el cultivo de las células, así como para el ensayo *in vivo* de la actividad nitrogenasa ( apartado 3.1. de Resultados ), se pudieron llevar a cabo los estudios de regulación de dicha actividad que se discuten a continuación.

La regulación de la actividad nitrogenasa por amonio ha sido un fenómeno muy estudiado en diferentes microorganismos ( ver apartado 1.3.3. de Introducción ). En resumen, los datos descritos en la literatura previos al comienzo de este trabajo indican, en primer lugar, que los objetivos de la regulación de la nitrogenasa por el ión son tanto la actividad como la síntesis de la enzima ( Eady, 1981 ), y, en segundo lugar, que, si bien en la mayoría de los microorganismos fijadores ocurren ambos efectos, el efecto sobre la actividad no se da en bacterias fermentadoras como *Chlostridium*,



o que fijan nitrógeno en anaerobiosis, como *K. pneumoniae* ( Daesch y Mortenson, 1972; Tubb y Postgate, 1973 ). En cuanto al mecanismo de la inhibición por amonio, mientras en las bacterias de la familia *Rhodospirillaceae* está bien documentado que la inhibición no la promueve el ión *per se* sino alguno(s) producto(s) derivado(s) de su asimilación; en *A. vinelandii*, por el contrario, Laane *et al* ( 1980 ), han propuesto que la inhibición es causada por el propio catión, cuya entrada al interior celular destruiría el potencial de membrana, disminuyendo el flujo de electrones hasta la enzima.

En *A. chroococcum*, nosotros hemos observado que, efectivamente, la adición de amonio en pequeñas concentraciones al ensayo de actividad nitrogenasa origina una drástica inhibición de la misma, inhibición que tiene como características fundamentales, el ser estrictamente dependiente del consumo del ión y el ser reversible, ya que cesa una vez que el amonio ha sido agotado del medio. Para el estudio del mecanismo por el que se produce esta inhibición en *A. chroococcum* diseñamos varias aproximaciones experimentales que permitieran discernir entre las dos hipótesis de partida planteadas; a saber, el efecto inhibidor se debe a productos derivados de la asimilación del amonio o el ión inhibe la actividad nitrogenasa *per se*.

En primer lugar, cabe destacar que, efectivamente, agentes que disipan el potencial de membrana, ejercen una drástica inhibición de la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum*. Uno de estos agentes, el tetrafenilfosfonio ( TPP ), causa una

inhibición total de la actividad nitrogenasa cuando es añadido a concentración de 200  $\mu\text{M}$  ( apartado 3.4.3 de Resultados ). Laane *et al* ( 1980 ), han descrito que una disminución de 16 mV ( 106 mV en ausencia de amonio frente a 90 mV en presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,1 mM ), causa un 90% de inhibición de la actividad nitrogenasa de *A. vinelandii*. Nuestros resultados con el ionóforo valinomicina muestran que es posible obtener grados de inhibición de la actividad nitrogenasa intermedios aumentando la concentración de  $\text{K}^+$  en el exterior celular. Es tos resultados sugieren que un cambio de sólo 16 mV no es suficiente para promover una inhibición tan drástica de la actividad nitrogenasa de esta bacteria.

Si bien nosotros no hemos realizado medidas directas del potencial de membrana de *A. chroococcum*, es poco probable que el amonio pueda ejercer una inhibición del potencial de membrana similar a la que ejerce el TPP. La inhibición de la actividad nitrogenasa debida a la presencia de TPP y valinomicina- $\text{K}^+$  habla en favor del requerimiento de un estado energétizado de la membrana para la acción catalítica de la enzima. De hecho, Haaker y Veeger ( 1977 ), han propuesto que este estado energétizado es necesario para transformar la flavodoxina en su forma hidroquinona con objeto de conseguir un potencial redox suficientemente bajo para reducir a la nitrogenasa. También en favor de un estado energétizado adecuado está el hecho de que la actividad nitrogenasa es in detectable en ausencia de una fuente asimilable de carbono

( y energía ), cuando se inhibe su utilización con ácido malónico en células adaptadas a la utilización de succinato, situación en la que la actividad nitrogenasa es menos del 20% de la encontrada en ausencia del inhibidor ( Figura 37 ).

Otro acercamiento experimental utilizado ha consistido en la utilización de metilamina. La metilamina es un análogo del amonio particularmente interesante para este estudio por varias razones. En primer lugar, parece claro que se transporta al interior celular por el mismo sistema que el amonio ( Gordon y Moore, 1981; Barnes *et al*, 1983 ). En segundo lugar, su pKa ( 10,47 ) es próximo al pKa del amonio ( 9,27 ), lo que hace que el comportamiento iónico de ambos, y, por tanto, su efecto sobre el potencial de membrana sea muy similar. Por último, otra característica que lo hace interesante es que no puede ser metabolizado por *Azotobacter*. En *A. vinelandii* se ha descrito que tan sólo sirve como sustrato de la glutamina sintetasa, reacción en la que se produce  $\gamma$ -glutamilmetilamida, un análogo de la glutamina ( Barnes *et al*, 1983; Moore y Gordon, 1984 ). En *A. chroococcum* ( apartado 3.2.1.5. de Resultados ), el metilamonio, que tampoco sirve como fuente de nitrógeno, ejerce una escasa inhibición de la actividad nitrogenasa, incluso a concentraciones de 20 mM. Estos datos sugieren la necesidad de la metabolización del ión para observar inhibición de la actividad nitrogenasa.

Para comprobar la conclusión anterior, hemos utilizado

inhibidores de la asimilación del amonio. Estudios anteriores al que ahora presentamos, han demostrado que la ruta de asimilación de amonio que opera en *A. chroococcum* es la catalizada por las enzimas GS/GOGAT ( Bárcenas, 1980 ). Por otro lado, nosotros hemos observado que en presencia de MSX, 5 mM, que inhibe efectivamente la actividad glutamina sintetasa de esta bacteria, el crecimiento del cultivo cesa ( resultado no mostrado ), hecho que sugiere que no existe ruta alternativa para la asimilación de amonio por estos microorganismos. En células de *A. chroococcum* tratadas con MSX, DON, MSF o azaserina, todos ellos inhibidores de la ruta GS/GOGAT, en las que se observa una actividad nitrogenasa similar a la obtenida en células no tratadas, el amonio no ejerce efecto inhibitor alguno sobre dicha actividad ( apartado 3.2.1.3. de Resultados ). Aún más, la adición de los inhibidores de la asimilación del amonio a una suspensión celular en la que la actividad nitrogenasa ha sido previamente inhibida por amonio, produce una recuperación apreciable de la actividad en todos los casos excepto en el de la azaserina, resultados que apoyan la idea de que el amonio debe ser metabolizado para ejercer su efecto inhibitor.

La utilización de estos inhibidores ha sido criticada por algunos autores en base a resultados que indican que la adición de MSX afecta directamente al transporte de amonio al interior celular. Esta propuesta ha sido hecha por Turpin *et al* ( 1984 ), que han observado que en *Anabaena flos aquae*

el tratamiento con MSX tan sólo protege a la actividad nitrogenasa de la inhibición por amonio cuando el pH del medio es lo suficientemente ácido como para que no exista entrada pasiva de amoniaco, que, dada su naturaleza no iónica, puede difundir libremente al interior celular donde, a pesar de la presencia de MSX, promueve inhibición de la nitrogenasa.

En *A. vinelandii*, Jayakumar y Barnes ( 1984 ), han propuesto que el transporte de amonio se inhibe por glutamina o alguno de sus análogos, entre los que se encuentran DON y MSX. Nuestros resultados muestran que, efectivamente, la adición de MSX produce inhibición del consumo de amonio; sin embargo, en contraste con las observaciones de estos autores, nosotros no hemos observado ningún efecto inhibitorio de la glutamina o el análogo de ésta, la glicilglicina, sobre el consumo de amonio. Estos resultados indican que, para causar inhibición de dicho proceso los análogos de la glutamina precisan ser inhibidores efectivos de la glutamina sintetasa o de la GOGAT; lo que hace pensar que el consumo de amonio, o su desaparición del medio extracelular, cesa como consecuencia de la acumulación del ión que debe producirse en el interior celular debido a la inhibición de su asimilación. De hecho, en presencia de MSX, no sólo se inhibe el consumo de amonio, sino que este ión aparece en el medio extracelular entre 20-30 min después de añadido el inhibidor ( apartado 3.2.1.4. de Resultados ). Por tanto, en células de *A. chroococcum* tratadas con MSX debe existir una alta concentración de amonio en el interior celular, ya que en estas células, en las que hay actividad nitrogenasa,

el amonio que se produce en la fijación de  $N_2$  no se puede asi  
milar. En el apartado 3.2.1.4. se demuestra que el amonio ex  
pulsado como consecuencia del tratamiento con MSX tiene su  
origen en la fijación de  $N_2$ , que es posible a pesar de la pr  
sumiblemente alta concentración intracelular del ión.

Todas las líneas de evidencia discutidas hasta este mo  
mento favorecen la hipótesis de que la inhibición por amonio  
de la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* requiere la asi  
milación del ión, y estaría mediada por compuestos constitui-  
dos por carbono y nitrógeno entre los que se encuentran, por  
ejemplo, los aminoácidos. De estos compuestos, uno de los prin-  
cipales candidatos sería la glutamina, producto de la glutami-  
na sintetasa y primer metabolito carbono nitrogenado que se  
forma en la asimilación del amonio. Aunque la glutamina ha si  
do propuesto como metabolito inhibidor por algunos autores  
en bacterias fotosintéticas ( Yoch *et al*, 1983; Michalsky *et*  
*al*, 1983 ), no parece un buen candidato en el caso de *A. chroo*  
*coccum*, pues en presencia de metilamina, que provoca acumulación  
del análogo de la glutamina, la  $\gamma$ -glutamilmetilamida ( Barnes  
*et al*, 1983; Moore y Gordon, 1984; Jayakumar y Barnes, 1984 ),  
no se observa inhibición apreciable de la nitrogenasa. Este  
análogo, por el contrario, sí ejerce inhibición de la nitroge-  
nasa en *Rhodopseudomonas capsulata* ( Yoch *et al*, 1983 ). Por  
otro lado, tanto el efecto de la glutamina como el de otros  
aminoácidos, posibles candidatos a ejercer la inhibición de la  
actividad nitrogenasa, es muy difícil de estudiar en *A. chroo*

*cocum*, dada la incapacidad de esta bacteria para asimilar estos compuestos ( Tabla III ), como han descrito Drozd *et al* ( 1972 ), para los casos del glutamato, aspartato y glutamina.

Una nueva línea experimental diseñada para estudiar el mecanismo de inhibición de la actividad nitrogenasa ha sido la utilización de nitrato y nitrito en el estudio de la regulación de dicha actividad enzimática. La asimilación de nitrato y la fijación de nitrógeno son dos procesos mutuamente excluyentes en *A. chroococum*, como se desprende de los resultados aquí presentados, y de los publicados por otros autores ( Postgate, 1982 ). Diversos grupos de trabajo han sugerido que la represión de la síntesis de la nitrogenasa por nitrato se debe a la metabolización del propio nitrato, que dará lugar a amonio, siendo, en último término, metabolitos derivados de la incorporación de éste a esqueletos carbonados, los responsables de la represión. Este es el caso en *A. chroococum* ( Drozd *et al*, 1972 ), *K. pneumoniae* ( Tubb y Postgate, 1973; Shanmugam *et al*, 1978 ) o *Anabaena* ( Ramos y Guerrero, 1983 ). Estos estudios recogen el efecto inhibitor del nitrato sobre la síntesis de la enzima, sin embargo, no hay ningún precedente en el que se describa un efecto del nitrato, similar al que ejerce el amonio, sobre la actividad nitrogenasa ( Postgate, 1982 ).

De igual forma que la metabolización del nitrato promueve la represión de síntesis de la enzima y, dado

que el amonio inhibe la actividad nitrogenasa, cabía esperar un efecto inhibitor del nitrato sobre dicha actividad.

*A. chroococcum* es un microorganismo especialmente adecuado para emprender este estudio porque, además de capacidad para fijar  $N_2$ , puede utilizar nitrato como fuente de nitrógeno para el crecimiento. Cuando se añaden bajas concentraciones de nitrato o nitrito ( en torno a 0,3 mM ) a células de *A. chroococcum* que han sido cultivadas diazotróficamente, no se observa efecto inhibitor alguno sobre la actividad. Tampoco tiene lugar el consumo de los iones, ya que las células así cultivadas, carecen de la capacidad de asimilarlos. Por otro lado, cuando esta bacteria se cultiva con nitrato, carece de actividad nitrogenasa.

Se pueden conseguir en *A. chroococcum*, situaciones metabólicas ( apartado 3.2.2.1. de Resultados ) en las que coexisten capacidad de consumo de nitrato y actividad nitrogenasa. En estas condiciones, tanto nitrato como nitrito, son inhibidores efectivos de dicha actividad. Esta inhibición tiene, esencialmente, las mismas características que la producida por el amonio; cabe resaltar entre ellas, la dependencia de la inhibición del consumo del ión y su reversibilidad, ya que cesa una vez agotado el nitrato del medio. Ambas características sugieren que el efecto inhibitor de nitrato y nitrito sobre la actividad nitrogenasa se debe a la asimilación del amonio formado en la reducción intracelular de aquellos aniones.



Además de esta posibilidad, el efecto inhibitor del nitrato y nitrito podría interpretarse en otros términos. Así se puede argumentar que ambos iones afectan *per se* a la enzima. De hecho, la literatura recoge numerosos trabajos realizados en diferentes microorganismos en los que se describe este tipo de efecto. En concreto, en bacteroides de *Rhizobium* está descrito que el nitrito inhibe la actividad nitrogenasa ( Trinchant y Rigaud, 1982 ), inhibición que ocurre tanto en extractos crudos de los bacteroides ( Kennedy *et al*, 1975 ), como en preparaciones purificadas de la enzima ( Trinchant y Rigaud, 1980 ). Estos resultados indican claramente que el nitrito afecta *per se* a la enzima, siendo esta inhibición independiente de la reducción del ión a amonio. Además, el nitrato, que por si mismo no parece tener efecto inhibitor sobre la nitrogenasa de estos microorganismos, ejerce inhibición mediante su reducción a nitrito, tal como sugieren los estudios realizados con mutantes de estos bacteroides deficientes en nitrato reductasa ( Pagan *et al*, 1977 ). No sólo en *Rhizobium* está descrito este efecto, también ocurre en *Chlostridium pasteurianum* ( Meyer, 1981 ), *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodospseudomonas palustris* y *Azotobacter vinelandii* ( Castillo y Cárdenas, 1982 ). En otros organismos como *K. pneumoniae* la situación es más confusa, ya que, frente a la idea generalizada de que el nitrato inhibe la síntesis de la nitrogenasa mediante su asimilación a través de amonio, para el caso de su efecto sobre la actividad, Hom *et al* ( 1980 ), han mostrado inhibición por nitrato y nitrito en mutantes de esta bacteria en los que el amonio no afec

ta a la nitrogenasa, lo que descarta la metabolización de estos iones para promover la inhibición de la actividad enzimática.

Nuestros resultados en *A. chroococcum* descartan la posibilidad de que la inhibición por nitrato y nitrito, presentada en este trabajo sea debida a la acción *per se* de ambos iones sobre la enzima. En primer lugar, ninguno de los dos iones a las concentraciones utilizadas, ejercen inhibición alguna sobre la actividad nitrogenasa cuando no son asimilables por la célula; en segundo lugar, el efecto que aquí presentamos es reversible, mientras que en algunos de los casos citados anteriormente, la inhibición que se describe es irreversible.

Otra alternativa a tener en cuenta es que la inhibición de la actividad nitrogenasa en presencia de nitrato o nitrito se deba a competencia por poder reductor. La reducción de nitrato requiere 8 electrones, mientras que la de nitrito requiere 6 ( Losada *et al*, 1981; Guerrero *et al*, 1981 ). Por otro lado, la fijación de  $N_2$  es un proceso que también demanda poder reductor ( Smith *et al*, 1981 ). Una molécula de  $N_2$  requiere 6 electrones para reducirse y producir 2 moléculas de amonio; también la reducción de acetileno, sustrato que hemos utilizado en este estudio, , requiere 2 electrones. La posibilidad de la competencia por poder reductor para explicar la inhibición de nitrato y nitrito, parece también poco probable, pues en células tratadas con MSX ( apartado 3.2.2. ),

en las que tanto el nitrato como el nitrito carecen de efecto inhibitor sobre la actividad nitrogenasa, ambos iones son reducidos hasta amonio, que, en estas condiciones es excretado al exterior celular en forma estequiométrica con su consumo. Esta situación, en la que hay reducción conjunta de acetileno y nitrato o nitrito, demuestra que en células de *A. chroococcum* existe poder reductor suficiente para satisfacer ambos procesos.

Es interesante indicar que el efecto inhibitor de nitrato y nitrito ocurre también en células tratadas con rifamicina, en las que la síntesis de proteína está inhibida. Estos resultados permiten descartar que el efecto de ambos iones sea debido a la represión que éstos ejercen sobre la síntesis de la nitrogenasa, siendo la enzima existente en la célula, el objeto de la inhibición.

Parece, por cuanto llevamos discutido, que el mecanismo de inhibición de la nitrogenasa que se propone en este trabajo, en el que nitrato y nitrito serían reducidos a amonio, cuya asimilación provocaría acúmulo de los metabolitos responsables de la inhibición de la nitrogenasa, es el que mejor explica los resultados presentados en el apartado 3.2.2. en el que se describe y caracteriza la inhibición por nitrato y nitrito de la actividad nitrogenasa. Los experimentos realizados con la cepa MCD1 de *A. chroococcum*, incapaz de asimilar nitrato o nitrito, aún habiendo sido cultivada en medio suplementado con  $\text{KNO}_3$ , en los que no se observa efecto inhibitor alguno de ambos iones sobre la actividad nitrogenasa co-

rroboran la hipótesis formulada para explicar los resultados obtenidos con *A. chroococcum* ATCC 4412.

Un aspecto de la inhibición de la actividad nitrogenasa por nitrato y nitrito a resaltar, es que siempre es menor que la observada como consecuencia de la adición de amonio. Admitiendo, como se desprende de nuestra argumentación anterior, que los tres iones ejercen la inhibición a través de compuestos derivados de su asimilación, una posibilidad para explicar el menor grado de inhibición de nitrato y nitrito, es que la asimilación de estos iones promueva menor acúmulo de metabolitos inhibidores que la asimilación del amonio. La velocidad de desaparición de amonio del medio extracelular en los experimentos realizados oscila entre 90 y 100 nmoles  $\text{NH}_4^+$ .  $\text{min}^{-1}$ .mg de proteína $^{-1}$ , que provocan una inhibición de la actividad nitrogenasa generalmente superior al 90%; sin embargo, la tasa de consumo de nitrato o nitrito observada en células de *A. chroococcum* que también tienen actividad nitrogenasa es siempre menor que la observada para el amonio. Por ejemplo, el consumo de nitrato que se presenta en la Figura 12 es de 65 nmol.  $\text{min}^{-1}$ .mg de proteína $^{-1}$ . Estos datos sugieren que la asimilación de nitrógeno, y, por tanto, la capacidad de la célula para formar metabolitos inhibidores, es mayor en presencia de amonio que en presencia de nitrato o nitrito. Existe la posibilidad de que el paso limitante en la formación de los metabolitos sea la propia incorporación de amonio a esqueletos carbonados, catalizada en esta bacteria por la glutamina sintetasa, de modo que, aunque se observe

una mayor desaparición de amonio que de nitrato o nitrito, la tasa de formación de glutamina sea la misma con cualquiera de los tres iones. Esta posibilidad puede descartarse en virtud de que en *A. vinelandii*, la metilamina transportada al interior celular es rápidamente convertida en  $\gamma$ -glutamilmetilamida ( Barnes *et al*, 1983; Moore y Gordon, 1984 ). De hecho, Moore y Gordon ( 1984 ), afirman que la tasa de formación de  $\gamma$ -glutamilmetilamida es igual que la tasa de desaparición de metilamina.

Un fuerte apoyo a la hipótesis de que la inhibición de la nitrogenasa por nitrato está promovida por productos derivados de la asimilación del amonio, se consiguió con células de *A. chroococcum* con diferentes tasas de consumo de nitrato o nitrito. Estas células se preparan incubando durante distintos periodos de tiempo en presencia de  $\text{KNO}_3$  células cultivadas diazotróficamente o, alternativamente, incubando en condiciones de diazotrofia durante un periodo más o menos prolongado, células cultivadas en presencia de nitrato. Como cabía esperar, el grado de inhibición promovido por el consumo de nitrato o nitrito se correlaciona positivamente con la tasa de consumo de ambos iones ( Figura 20 ).

Esta correlación permite concluir que la inhibición de la nitrogenasa en respuesta a los niveles de metabolitos nitrogenados no es un efecto todo o nada, como se desprende del efecto del amonio sobre dicha actividad, que fue denominado por Zumft y Castillo ( 1978 ), apagado/encendido

( switch off/on ), sino que es una inhibición gradual en la que la actividad nitrogenasa está sometida a una fina regulación en respuesta a pequeños cambios en los niveles de los presuntos metabolitos inhibidores.

Todos los resultados que hemos discutido hasta este momento se resumen en un modelo en el que se podrían distinguir dos situaciones metabólicas en la célula, una que llamamos " pobre " en nitrógeno, que se daría en células cultivadas diazotróficamente y, aún más drásticamente, en células tratadas con MSX, que permite actividad nitrogenasa; y la otra, que se produciría cuando las células están consumiendo amonio, nitrato o nitrito, que llamamos " rica " en nitrógeno y que se traduce en una inhibición de la actividad nitrogenasa. La magnitud de esta inhibición, como hemos visto, es variable.

Las argumentaciones expuestas para explicar el mecanismo de inhibición de la nitrogenasa lo han sido desde el punto de vista del nitrógeno. Abordar este problema de una manera más completa implicaría tener en cuenta también el metabolismo del carbono en relación a la actividad nitrogenasa.

Los resultados presentados en esta memoria ( apartado 3.4.2. ) muestran que la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* es estrictamente dependiente de una fuente de carbono asimilable en el ensayo. Aunque otros autores han descrito

actividad nitrogenasa dependiente de  $H_2$  en ausencia de fuente de carbono en esta bacteria ( Walker y Yates, 1978; Yates y Walker, 1980 ), nosotros no hemos conseguido detectar actividad con  $H_2$  como fuente de poder reductor y energía, a pesar de que *A. chroococcum* ATCC 4412 y la estirpe MCD1 exhiben un nivel elevado de actividad hidrogenasa de consumo ( datos no mostrados ).

Cuando se someten células de *A. chroococcum* a deficiencia de nitrógeno mediante incubación en atmósfera de  $Ar(79\%): O_2(21\%)$ , se provoca una situación que podría denominarse " rica " en carbono, o, lo que es lo mismo, " pobre " en nitrógeno, situación expresada por los valores de la razón C/N encontrados ( Tabla XV , apartado 3.2.3.2 ). Estas células constituyen, por tanto, un buen sistema para estudiar la regulación de la nitrogenasa en condiciones de exceso de metabolitos carbonados.

En primer lugar, cabe destacar que los niveles de actividad nitrogenasa encontrados en estas condiciones son muy similares a los que se detectan en células normales. Cuando se añade amonio a células deficientes en nitrógeno ( Figura 25 ), la inhibición de la actividad nitrogenasa es escasa ( 20% aproximadamente ) y tarda unos 40-50 min en ser tan acusada como la observada en células normales, aún cuando el consumo de amonio es similar en ambos tipos de células. Además, la inhibición que promueve el amonio es menor conforme aumenta la situación de deficiencia de nitrógeno en las células.

Dado que estas diferencias en el efecto inhibitor del amonio no pueden adscribirse a diferentes tasas de consumo del ión, estos resultados sugieren que el amonio consumido por células deficientes en nitrógeno se emplea en restablecer el equilibrio celular entre el carbono y el nitrógeno, tras lo cual, el subsiguiente consumo de amonio provocaría el acúmulo de metabolitos inhibidores responsables del alto grado de inhibición, lo que, según nuestros resultados, ocurriría 40-50 min después de la adición del ión.

Otro aspecto que hemos tratado en este trabajo es la interrelación existente en *A. chroococcum* entre el metabolismo del nitrato y la fijación de nitrógeno. Como ya hemos mencionado, ambos procesos son excluyentes en esta bacteria (Tubb y Postgate, 1973; Eady, 1981; Postgate, 1982). El nitrato juega un doble papel; por un lado, su presencia es necesaria para inducir la síntesis de las enzimas implicadas en su asimilación, nitrato reductasa y nitrito reductasa (Revilla *et al*, 1985), por otro lado, reprime la síntesis de la nitrogenasa y otras proteínas implicadas en la fijación de nitrógeno (Tubb y Postgate, 1973). El tratamiento de las células con MSX las libera del efecto represor del nitrato sobre la síntesis de la nitrogenasa (apartado 3.3.1. de Resultados), lo que sugiere que, como ocurre con el efecto del nitrato sobre la actividad, el ión debe metabolizarse para ejercer la represión. Por tanto, al igual que el amonio, el nitrato ejerce su efecto sobre la fijación de nitrógeno a dos niveles, la síntesis y la actividad de



la enzima.

El amonio, producto tanto de la fijación de  $N_2$  como de la reducción de nitrato, ejerce efecto represor sobre ambos procesos, es decir, evita la expresión de los genes *nif* necesarios para la fijación de nitrógeno y reprime la síntesis de las enzimas implicadas en la asimilación del nitrato.

Ya hemos discutido anteriormente el efecto que el amonio ejerce sobre la actividad nitrogenasa a corto plazo. Es conocido, por otra parte, el efecto a corto plazo del amonio sobre el consumo de nitrato en numerosos microorganismos capaces de asimilar el ión; sirvan como ejemplo los casos de *Anacystis nidulans* ( Flores *et al*, 1982 ), *Rhodopseudomonas capsulata* ( Jackson *et al*, 1982 ), *Chlamydomonas reinhardtii* ( Florencio y Vega, 1982 ). En *A. chroococcum*, este efecto también ha sido descrito ( Revilla, 1983; apartado 3.3.2. de Resultados ).

*A. chroococcum* es un microorganismo muy interesante para realizar un estudio comparado de la regulación de ambos procesos por amonio por su doble capacidad de asimilar nitrato y fijar  $N_2$ . Para estos fines, se pueden conseguir situaciones experimentales en que la utilización de ambas fuentes de nitrógeno tenga lugar de forma simultánea en las células.

Ya hemos visto que las características de la inhibi-

ción por amonio de la actividad nitrogenasa son muy similares a las de la inhibición del consumo de nitrato. Los resultados presentados en el apartado 3.3.3. muestran que en células de *A. chroococcum* que exhiben los dos procesos, la adición de amonio provoca la inhibición simultánea de ambos. De los resultados expuestos, cabe resaltar que, mientras la recuperación del consumo de nitrato observada tras agotarse el amonio del medio, es normal y alcanza niveles incluso superiores a los existentes antes de la adición de amonio, la recuperación de la actividad nitrogenasa es mucho menor, alcanzándose aproximadamente el 10% de la actividad anterior a la adición del amonio. En este apartado se demuestra que la escasa recuperación se debe al consumo del nitrato, si bien, la actividad es aún menor que la que cabría esperar dada la tasa de consumo de este ión. Esto puede deberse a que, en esta situación, el nivel intracelular de metabolitos inhibidores es mayor, pues el consumo de nitrato, con su aporte de dichos compuestos, no permite la dilución de los previamente acumulados en la célula como consecuencia de la asimilación del amonio.

De los datos presentados, se puede concluir que la actividad nitrogenasa es el proceso más sensible a estos presuntos metabolitos inhibidores, ya que tan sólo se observa una actividad normal en presencia de  $N_2$ . La asimilación de nitrato, que afecta a la actividad nitrogenasa, no afecta al consumo del propio ión, si bien hay que tener en cuenta que en células tratadas con MSX, la tasa de consumo de nitrato es

es mayor que en células normales ( Revilla, 1983 ), lo que in  
dica la existencia de un mecanismo de autorregulación del con  
sumo de este ión. Por último, la asimilación de amonio, que  
proporciona una situación más " rica " en nitrógeno, inhibe  
a ambos procesos.

Además del efecto inhibitor que el amonio y el nitrato  
ajercen sobre la actividad nitrogenasa, ambos iones reprimen  
la síntesis de la enzima. Tanto la inhibición de la actividad  
como la represión de la síntesis parecen mediados por metabo-  
litos derivados de la asimilación de estos iones que encontrar  
ían su objetivo en la nitrogenasa preformada en la célula y  
en el operón *nif*, constituido por genes cuyos productos, en-  
tre ellos, la propia nitrogenasa, son necesarios para que ten  
ga lugar la fijación de  $N_2$ . Estos dos efectos son distingui-  
bles experimentalmente por el tiempo en que se manifiestan:  
a corto plazo la inhibición de la actividad y a largo plazo,  
la represión de la síntesis de la enzima. En células de *Azoto*  
*bacter* es difícil probar la independencia de los dos efec-  
tos, es decir, si puede darse uno sin que ocurra el otro, pues  
los dos tienen el mismo origen, la asimilación del amonio. Los  
experimentos que discutimos a continuación fueron diseñados pa-  
ra probar la independencia de ambos efectos en esta bacteria.

Hemos utilizado dos aproximaciones experimentales dife-  
rentes. Por un lado, se ha transferido el plásmido pCK3 a *A.*  
*venelandii*, promoviendo en esta bacteria la expresión constitu-

tiva del gen *nif A* de *K. pneumoniae* y, por tanto, síntesis constitutiva de nitrogenasa ( Kennedy y Robson, 1983a ). La segunda aproximación ha consistido en intentar la expresión de los genes *nifHDK* de *K. pneumoniae* en mutantes Nif afectados en algunos de estos genes de *A. vinelandii*. Estas cepas permitirían estudiar si la ausencia de efecto del amonio sobre la actividad nitrogenasa de *K. pneumoniae* se debe a la propia enzima de esta bacteria o bien a que *K. pneumoniae* carece de la maquinaria celular necesaria para ejercer tal inhibición, maquinaria existente en *A. vinelandii*.

Como hemos expuesto en Introducción, la expresión de los genes *nif* en *K. pneumoniae* se activa por el producto del gen *nifA* y se reprime por el del gen *nifL*. En *Azotobacter*, aunque aún no se ha encontrado un gen equivalente a *nifA* ( Kennedy *et al*, 1985 ), si se ha observado que el producto de este gen de *K. pneumoniae* activa los genes *nif* ( Kennedy y Robson, 1983a ).

Nosotros hemos transferido pCK3, plásmido que contiene *nifA* de *K. pneumoniae*, a *A. vinelandii*, promoviendo así niveles del producto de este gen altos en esta bacteria para cualquier situación nutricional. Como se muestra en el apartado 3.3.4., cultivos de esta cepa realizados con amonio como fuente de nitrógeno, presentan actividad nitrogenasa, lo que indica síntesis de la enzima aún en condiciones represivas. La adición de amonio a células de *A. vinelandii* UW(r(pCK3),

promueve inhibición a corto plazo de la actividad, aún cuando en esta cepa existe síntesis de nitrogenasa, es decir, se observa el efecto a corto plazo en ausencia del efecto a largo plazo.

Cabe preguntarse cómo es posible detectar actividad nitrogenasa en cultivos realizados en presencia de amonio si éste inhibe dicha actividad. Como se muestra en el apartado 3.3.4., la inhibición de la actividad nitrogenasa promovida por amonio no es total, esta podría ser la explicación de que en cultivos de *A. vinelandii* UWr(pCK3) realizados en presencia de amonio se encuentre aproximadamente el 50% de la actividad observada en ausencia del ión.

Además de probar la separación de los efectos represor de síntesis e inhibidor de actividad nitrogenasa, la cepa UWr (pCK3) produjo resultados interesantes referentes a la asimilación del nitrato. Cuando esta cepa se cultiva en condiciones inductoras del sistema de asimilación de nitrato ( presencia de nitrato y ausencia de amonio ), carece de nitrato reductasa y de nitrito reductasa y, por tanto, es incapaz de asimilar cualquiera de los dos iones. Este resultado muestra una interferencia negativa por parte de productos de genes *nif* sobre la regulación de la síntesis de las enzimas implicadas en la asimilación del nitrato.

En cuanto a la expresión del operón *nifHDK* de *K. pneumoniae* en *Azotobacter*, existen datos en la literatura ( ya men-

cionados en el apartado 3.5 de Resultados ), que indican que tal expresión no se produce por la imposibilidad de iniciar transcripción a partir del promotor de dicho operón ( Kennedy y Drummond, 1985 ). Nosotros hemos intentado de nuevo tal expresión mediante la transferencia de los genes *nifHDK* a *A. vinelandii* utilizando como vector el plásmido pRK2501 ( apartado 3.5 de Resultados ). Este plásmido tiene un inicio de transcripción propia a partir del sitio *EcoRI*, lugar en el que está insertado el fragmento de ADN portador de los genes en cuya transcripción estamos interesados, con la esperanza de que este inicio de transcripción permitiera la de los genes contenidos en el inserto en una de sus dos orientaciones .

La incapacidad de ambos plásmidos pJC1 y pJC2 para complementar al mutante *nifD*, UW48, tanto para actividad nitrogenasa como para crecimiento diazotrófico, corrobora la imposibilidad de expresar los genes *nifHDK* de *K. pneumoniae* en *A. vinelandii*.

## 6. BIBLIOGRAFIA

ALEF, K. (1984). Light dependent ammonium inhibition of nitrate assimilation in *Rhodospseudomonas capsulata* AD2. Z. Naturforsch 39c: 85-89.

ALEF, K., ARP, J.D. y ZUMFT, W.G. (1981). Nitrogenase switch-off by ammonia in *Rhodospseudomonas palustris*: Loss under nitrogen deficiency and independence from the adenylylation state of glutamine synthetase. Arch. Microbiol. 130:138-142.

ARNON, D.I., McSWAIN, B.D., TSUJIMOTO, H.Y. y KEISHIRO, W. (1974). Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll  $\alpha$  and removal of phycocyanin. Biochem. Biophys. Acta. 357: 221-245.

ARP, D.J. y ZUMFT, W.G. (1983). Regulation and control of nitrogenase activity. En: "The Chemical-Biochemical-Genetic Interface". pp. 149-179. (A. Muller y W.E. Newton, Eds.) Plenum Press, New York.

BARCENA, J.A. (1980). Enzimas de la asimilación de amonio en la bacteria *A. chroococcum*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

BARNES, Jr., E.M., ZIMNIAK, P. y JAYAKUMAR, A. (1983). Role of glutamine synthetase in the uptake and metabolism of methylammonium by *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 156: 752-757.

BERGERSEN, F.J. (1984). Oxygen and the physiology of diazotrophic microorganisms. En "Advances in nitrogen fixation research". (C. Veeger y W.E. Newton, Eds). pp. 171-180. Nijhoff/Junk publishers. Wageningen.

BERGMEYER, H.U. (1974). Methoden der enzymatischen analyse. 2nd; ed., Verlag Chemic, 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.

BISHOP, P.E., JARLENSKI, D.M.L. y HETHERINGTON, D.R. (1980). Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 7342-7346.

BISHOP, P.E., JARLENSKI, D.M.L. y HETHERINGTON, D.R. (1982). Expression of an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 150: 1244-1251.

BOTHE, H., YATES, M.G. y CANNON, F.C. (1983). Physiology, Biochemistry and Genetics of dinitrogen fixation. En: "Encyclopedia of Plant Physiology, "New Series", vol. 15. (A. Läuchli y R.L. Bielecki, Eds.).pp. 241-285. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg.

BRENCHLEY, J.E. (1973). Effect of methionine sulfoximine and methionine sulfone on glutamate synthesis in *Klebsiella aerogenes*. J. Bacteriol. 114: 666-673.

CANNON, F.C. y POSTGATE, J.R. (1976). Expression of *Klebsiella* nitrogen fixation genes (*nif*) in *Azotobacter*. Nature 260:271-272.

CANNON, F.C., RIEDEL, G.E. y AUSUBEL, F.M. (1979). Overlapping sequences of *Klebsiella pneumoniae nif* DNA cloned and characterized. Molec. Gen. Genet. 174: 59-66.

CANNON, F. y POSTGATE J. (1983). Expression of *Klebsiella* nitrogen fixation in *Azotobacter*- a caution. Nature 306:17.

CARNAHAN, J.E., MORTENSON, L.E., MOWER, H.F. y CASTLE, J.E. (1960). Nitrogen fixation in cell free extracts of *Clostridium pasteurianum*. Biochem. Biophys. Acta. 44: 1520-1535.

- CASTILLO, F. y CARDENAS, J. (1982). Nitrite inhibition of bacterial dinitrogen fixation. *Z. Naturforsch.* 37c: 784-786.
- CASTILLO, F. y CARDENAS, J. (1983). Nitrate reduction by photosynthetic purple bacteria. *Photosynthesis Res.* 3: 3-18.
- CAWSE, P.A. (1967). The determination of nitrate in soil solution by ultraviolet spectrophotometry. *Analyst.* 92: 311-315.
- CEJUDO, F.J., DE LA TORRE, A. y PANEQUE, A. (1984). Short-term ammonium inhibition of nitrogen fixation in *Azotobacter*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123: 431-437.
- CEJUDO, F.C. y PANEQUE, A. (1986). Short-term nitrate (nitrite) inhibition of nitrogen fixation in *Azotobacter chroococcum*. *J. Bacteriol.* 165: 240-243.
- CRESSWELL, R.C. Y SYRETT, P.J. (1981). Uptake of nitrate by the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *J. Exp. Bot.* 32: 19-25.
- DAESCH, G. y MORTENSON, L.E. (1972). Effect of ammonia on the synthesis and function of the  $N_2$ -fixing enzyme system in *Chlostridium pasteurianum*. *J. Bacteriol.* 110: 103-109.
- DALTON, H. y POSTGATE, J.R. (1969). Effect of oxygen on growth of *Azotobacter chroococum* in batch and continuous cultures. *J. Gen. Microbiol.* 54: 463-473.
- DIXON, R., KENNEDY, C., KONDOROSI, A., KRISHNAPILLAI, V. y MERRICK, M. (1977). Complementation analysis of *Klebsiella pneumoniae* mutants defective in nitrogen fixation. *Molec. Gen. Genet.* 157: 189-198.
- DOWNS, A.J. y JONES, C.W. (1975). Respiration-linked proton translocation in *Azotobacter vinelandii*. *FEBS Lett.* 60: 42-46.
- DROZD, J. Y POSTGATE, J.R. (1970a). Interference by oxygen in the acetylene-reduction test for aerobic nitrogen-fixing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 60: 427-429.

DROZD, J. y POSTGATE, J.R. (1970b). Effects of oxygen on acetylene reduction, cytochrome content and respiration activity of *Azotobacter chroococcum*. J. Gen. Microbiol. 63: 63-73.

DROZD, J.W., TUBB, R.S. y POSTGATE, J.R. (1972). A chemostat study of the effect of fixed nitrogen sources on nitrogen fixation, membranes and free aminoacids in *Azotobacter chroococcum*. J. Gen. Microbiol. 73: 221-232.

DRUMMOND, M.H. (1984). The nitrogen fixation genes of *Klebsiella pneumoniae*. Microbial Sciences. 1: 29-33.

DRUMMOND, M. CLEMENTS, J., MERRICK, M. y DIXON, R. (1983). Positive control and autogenous regulation of the *nifLA* promoter in *Klebsiella pneumoniae*. Nature, 301: 302-307.

EADY, R.R. (1980). Isolation and characterization of various nitrogenases. En: "Methods in enzymology. Vol.69 pt.C. (A. San Pietro, Ed.) pp. 751-771. Academic Press. London, New York.

EADY, R.R. (1981). Regulation of nitrogenase activity" En: "Current perspectives in nitrogen fixation" (A.H. Gibson y W.E. Newton, Eds.) pp.172-181. Australian Academy of Science. Camberra.

EADY, R.R. y POSTGATE, J.R. (1974). Nitrogenase. Nature, 249: 805-810.

EISELE, R. y ULLRICH, W.R. (1977). Effect of glucose and CO<sub>2</sub> on nitrate uptake and coupled OH<sup>-</sup> flux in *Ankistrodesmus braunii*. Plant. Physiol. 59: 18-21.

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

FLORENCIO, F.J. y VEGA, J.M. (1982). Regulation of the assimilation of nitrate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* 21: 1195-1200.

FLORENCIO, F.J. y VEGA, J.M. (1983a). Utilization of nitrate, nitrite and ammonium by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 158: 288-293.

FLORENCIO, F.J. y VEGA, J.M. (1983b). Regulation of the synthesis of the NAD(P)H-nitrate reductase complex in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Z. Pflanzenphysiol.* 111:223-232.

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

FLORES, E., GUERRERO, M.G. y LOSADA, M. (1983a). Photosynthetic nature of nitrate uptake and reduction in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochem. Biophys. Acta.* 722: 408-416.

FLORES, E., RAMOS, J.L., HERRERO, A. y GUERRERO, M.G. (1983b). Nitrate assimilation by cyanobacteria. En: " Photosynthetic prokariotes: cell differentiation and function". pp. 363-387. (Papageorgiou, G.C. and Packer, L. Eds) Elsevier Science Publishing Co.; Inc.

GOBER, J.W. y KASHKET, E.R. (1983). Methylammonium uptake by *Rhizobium* sp. strain 32H1. *J. Bacteriol.* 153: 1196-1201.

GORDON, J.K. y BRILL, W.J. (1974). Derepression of nitrogenase synthesis in the presence of excess  $\text{NH}_4^+$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59: 967-971.

GORDON, J.K. y MOORE, R.A. (1981). Ammonium and methylammonium transport by the nitrogen-fixing bacterium *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 148: 435-442.

GOTTO, J.W. y YOCH, D.C. (1985). Regulation of nitrogenase activity by covalent modification in *Chromatium vinosum*. Arch. Microbiol. 141: 40-43.

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

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.

HAAKER, H., LAANE, C., HELLINGWERF, K., HOUWER, B., KONINGS, W.N. y VEEGER, C. (1982). Short-term regulation of the nitrogenase activity in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Eur. J. Biochem. 127: 639-645.

HAAKER, H. y VEEGER, C. (1977). Involvement of the cytoplasmic membrane in nitrogen fixation by *Azotobacter vinelandii*. Eur. J. Biochem. 77: 1-10.

HAAKER, H. y VEEGER, C. (1984). Enzimology of nitrogen fixation. Trends in Biochem. Sci. 9: 188-192.

HANUS, F.J., MAIER, R.S. y EVANS, H.J. (1979). Autotrophic growth of H<sub>2</sub>-uptake-positive strains of *Rhizobium japonicum* in an atmosphere supplied with hydrogen gas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1788-1792.

HARTMANN, A., FU, H. y BURRIS, R.H. (1986). Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. J. Bacteriol. 165: 864-870.

HERRERA, J., PANEQUE, A., MALDONADO, J.M., BAREA, J.L. y LOSADA, M. (1972). Regulation by ammonia of nitrate reductase synthesis and activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48: 996-1003.

HERRERO, A., FLORES, E. y GUERRERO, M.G. (1981). Regulation of the nitrate reductase levels in the cyanobacteria *Anacystis nidulans*, *Anabaena*, sp strain 7119 and *Nostoc* sp. strain 6719. *J. Bacteriol.* 145: 175-180.

HOM, S.M.S., HENNECKE, H. y SHANMUGAM, K.T. (1980). Regulation of nitrogenase biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae*: effect of nitrate. *J. Gen. Microbiol.* 117: 169-179.

HORAN, N.J., JATMAN, T.R. y DAWES, E.A. (1981). Effects of carbon source and inorganic phosphate concentration on the production of alginic acid by a mutant of *Azotobacter vinelandii* and on the enzymes involved in its biosynthesis. *J. Gen. Microbiol.* 127: 185-191.

JACKSON, M.A., JACKSON, J.B. y FERGUSON, S.J. (1981). Direct observation with an electrode of uncoupler-sensitive assimilatory nitrate uptake by *Rhodospseudomonas capsulata*. *FEBS. Lett.* 136: 275-278.

JARTMAN, T.R., DEAVIN, L., SLOCOMBE, S. y RIGHELATO, R.C. (1978). Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *J. Gen. Microbiol.* 107: 59-64.

JAYAKUMAR, A. y BARNES, Jr.E.M. (1984). The role of glutamine in regulation of ammonium transport in *Azotobacter vinelandii*. *Arch. Biochem. Biophys.* 231: 95-101.

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

JOUANNEAU, Y., MEYER, C.M. y VIGNAIS, P.M. (1983). Regulation of nitrogenase activity through iron protein interconversion in to an active and inactive form in *Rhodospseudomonas capsulata*. *Biochem. Biophys. Acta.* 749: 318-328.

KANN, M., KOLTER, R., THOMAS, C., FIGURSKI, D., MEYER, R., RE-NAULT, E. y HELINSKI, D.R. (1979). Plasmid cloning vehicles derived from plasmids ColE1, RK6 and RK2. *Methods Enzymol.* 68: 268-342.

KENNEDY, C. (1977). Linkage map of the nitrogen fixation genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Molec. Gen. Genet.* 157: 199-204.

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

KENNEDY, I.R., RIGAUD, J. y TRINCHANT, J.C. (1975). Nitrate reductase from bacteroids of *Rhizobium japonicum*: enzyme characteristics and posible interaction with nitrogen fixation. *Biochem. Biophys. Acta.* 397: 24-35.

KENNEDY, C. y ROBSON, R.L. (1983a). Activation of *nif* gene expression in *Azotobacter* by the *nifA* gene product of *K. pneumoniae*. *Nature.* 301: 626-628.

KENNEDY, C. y ROBSON, R.L. (1983b). Nitrogen fixation: interactions among *nif* genes and their products. En "Mobility and recognition in cell biology". (Sund y Veeger, Eds). pp.335-356. Walter de Gruyter and Co, Berlin-New York.

KENNEDY, C., ROBSON, R.L., JONES, R., WOODLEY, P., EVANS, D., BISHOP, P., EADY, R., GAMAL, R., HUMPHREY, R., RAMOS, J.L., DEAN, D., BRIGLE, K., TOUKDARIAN, A. y POSTGATE, J. (1985). Genetic and physical characterization of *nif* and *ntr* genes in *Azotobacter chroococcum* and *A. vinelandii*. En: "Nitrogen fixation research

progress". (H.J. Evans, P.J. Bottomley y W.E. Newton, Eds.). pp. 469-476. Martinus Nijhoff Publishers. Wageningen.

KLEINER, D. (1975). Ammonium uptake by nitrogen fixing bacteria *Azotobacter vinelandii*. Arch. Microbiol. 104: 163-169.

KLEINER, D. (1985). Bacterial ammonium transport. FEMS Microbiol. Rev. 32: 87-100.

KLUGKIST, J. y HAAKER, M. (1984). Inhibition of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 157: 148-151.

KLUGKIST, J., HAAKER, H. y VEEGER, C. (1986a). Studies on the mechanism of electron transport to nitrogenase in *Azotobacter vinelandii*. Eur. J. Biochem. 155: 41-46.

KLUGKIST, J., VOORBERG, J., HAAKER, H. y VEEGER, C. (1986b). Characterization of three different flavodoxins from *A. vinelandii*. Eur. J. Biochem. 155: 33-40.

LAANE, C., HAAKER, H. y VEEGER, C. (1979). On the efficiency of oxidative phosphorylation in membrane vesicles of *Azotobacter vinelandii* and of *Rhizobium leguminosarum* bacteroids. Eur. J. Biochem. 97: 369-377.

LAANE, C., KRONE, W., KONINGS, W., HAAKER, H. y VEEGER, C. (1980). Short-term effect of ammonium chloride on nitrogen fixation by *Azotobacter vinelandii* and by bacterioids of *Rhizobium leguminosarum*. Eur. J. Biochem. 103: 39-46.

LARSSON, C.M. y ANDERSSON, M. (1981). Uptake and photoreduction of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$  in *Scenedesmus*: interactions with  $\text{CO}_2$  fixation. En: "Photosynthesis". (G. Akoyonoglou, Ed.). vol.4. pp.741-750. Balabm International Science Services. Philadelphia.



LLOBELL, A., BARCENA, J.A., VILA, R. y PANEQUE, A. (1980). Flavin mediated photoreduction of nitrate by nitrate reductase from *Azotobacter chroococcum*. Z. Pflanzenphysiol. 98: 271-276.

LOSADA, M., GUERRERO, M.G. y VEGA, J.M. (1981). The assimilatory reduction of nitrate. En "Biology of inorganic nitrogen and sulfur" (H. Bothe y A. Trebst, Eds.). pp. 30-63. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, M.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.L. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagents. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

LUDDEN, P.W., MURRELL, S.A., POPE, M., KANEMOTO, R., DOWLING, T.E., SAARI, L.L. y TRIPLETT, E. (1984). Regulation of nitrogen fixation in photosynthetic bacteria. En: "Advances in nitrogen fixation" (C. Veeger y W.E. Newton, Eds.). pp. 181-187. Nijhoff/Junk Publishers, Wageningen.

MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. y SAMBROOK, J. (1982). "Molecular cloning, a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.

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.

McINERNEY, M.C., HOLMES, K.S. y DER VARTANIAN, D.U. (1982). Effect of O<sub>2</sub> limitation on growth and respiration of the wild type and ascorbate-tetramethyl-p-phenylendiamine-oxidase-negative mutant strain of *Azotobacter vinelandii*. J. Biochem. Biomembr. 14: 451-456.

MEISTER, A. (1980). Catalic mechanism of glutamine synthetase;

overview of glutamine metabolism. En: "Glutamine: metabolism, enzymology and regulation". (J. Mora y R. Palacios, Eds.).pp. 1-40. Academic Press, New York.

MERRICK, M.J. (1983). Nitrogen control of the *nif* regulon in *K: pneumoniae*: involvement of the *NtrA* gene and analogies between *NtrC* and *nifA*. EMBO Journal. 2: 39-44.

MERRICK, M., FILSER, M., KENNEDY, C. y DIXON, R. (1978). Polarity of mutations induced by insertion of transposons Tn5, Tn7 and Tn10 into the *nif* genes cluster of *Klebsiella pneumoniae*. Molec. Gen. Genet. 165: 103-111.

MEYER, J. (1981). Comparison of carbon monoxide, nitric oxide and nitrite as inhibitors of the nitrogenase from *Chlostridium pasteurianum*. Arch. Biochem. Biophys. 210: 246-256.

MICHALSKI, W.P., NICHOLAS, D.J.D. y VIGNAIS, P.M. (1983). <sup>14</sup>C-labelling of glutamine synthetase and Fe-protein of nitrogenase in toluene-treated cells of *Rhodopseudomonas capsulata*. Biochem. Biophys. Acta. 743: 136-148.

MIFLIN, B.J. y LEA, P.J. (1976). The path of ammonia assimilation in the plant kingdom. Trends Biochem. Sci. 1: 103-106.

MOORE, R.A. y GORDON, J.K. (1984). Metabolism of methylammonium by *Azotobacter vinelandii*. Arch. Microbiol. 140: 193-197.

MORENO-VIVIAN, C., CEJUDO, F.J., CARDENAS, J. y CASTILLO, F. (1983). Ammonia assimilation pathways in *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1. Arch. Microbiol. 136: 141-151.

MORTENSON, L.E. y THORNELEY, R.N. (1979). Structure and function of nitrogenase. Ann. Rev. Biochem. 48: 387-418.

MURRY, M.A., JENSEN, D.B. y BENEMANN, J.R. (1983). Role of ammonia in regulation of nitrogenase synthesis and activity in *Anabaena cylindrica*. Biochem. Biophys. Acta. 756:13-19.

NORDLUND, S. y LUDDEN, P.W. (1983). Incorporation of adenine into the modifying group of inactive iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. Biochem. J. 209:881-884.

NORDLUND, S. y NOREN, A. (1984). Dependence on divalent cations of the activation of inactive Fe-protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. Biochem. Biophys. Acta. 791: 21-27.

OHMORI, M., OHMORI, K. y STROTMANN, M. (1977). Inhibition of nitrate uptake by ammonia in a blue-green alga *Anabaena cylindrica*. Arch. Microbiol. 114: 225-229.

PAGAN, J.D., SCOWCROFT, W.R., DUDMAN, W.F. y GIBSON, A.M. (1977). Nitrogen fixation in nitrate reductase-deficient mutants of cultured Rhizobia. J. Bacteriol. 129: 718-723.

PEDROSA, F.O., DOBEREINER, J. y YATES, M.G. (1980). Hydrogen-dependent growth and autotrophic carbon dioxide fixation in *Derxia*. J. Gen. Microbiol. 119: 547-551.

PINDAR, D.F. y BUCK, C. (1975). The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. Biochem. J. 152: 617-622.

POPE, M.R., MURRELL, S.A. y LUDDEN, P.W. (1985a). Covalent modification of the iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum* by adenosine diphosphorylation of a specific arginine residue. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 82: 3173-3177.

POPE, M.R., MURRELL, S.A. y LUDDEN, P.W. (1985b). Purification and properties of the heat-released nucleotide modifying group from the inactive iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. Biochemistry 24: 2374-2380.

POSTGATE, J.R. (1980). The nitrogen economy of marine and land environments. En: "Food Chains and human nutrition". (Sir Kenneth Blaxter, Ed.) pp 161-184. London Applied Science Publishers.

POSTGATE, J.R. (1981). Microbiology of the free-living nitrogen-fixing bacteria, excluding cyanobacteria. En: "Current perspectives in nitrogen fixation" (A. H. Gibson, y E. W. Newton, Eds.). pp. 217-228. Australian Academy of Science. Camberra.

POSTGATE, J.R. (1982a). "The fundamentals of nitrogen fixation". Cambridge University Press.

POSTGATE, J.R. (1982b). Biological nitrogen fixation: fundamentals. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 296: 375-385.

PRESSMAN, B.C. (1976). Biological applications of ionophores. Ann. Rev. Biochem. 45: 501-530.

PRUSINER, S. y STADTMAN, E.R. (1973). En: "The enzymes of glutamine metabolism." Academic Press, New York.

PURCZELD, P., CHON, C.J., PORTIS Jr., A.R., HELDT, H.W. y HERBER, U. (1978). The mechanism of the control of carbon fixation by the pH in the chloroplast stroma. Studies with nitrite-mediated proton transfer across the envelope. Biochem. Biophys. Acta. 501: 488-498.

RAI, A.K., KASHIAP, A.K. y GUPTA, S.L. (1981). ATP-dependent uptake of nitrate in *Nostoc muscorum* and inhibition by ammonium ions. Biochem. Biophys. Acta. 674: 78-86.

RAMOS, J.L., y GUERRERO, M.G. (1983). Involvement of ammonium metabolism inhibition of nitrogen fixation in *Anabaena* sp. strain ATCC 33047. Arch. Microbiol. 136: 81-83.

RAMOS, J.L. y ROBSON, R.L. (1985a). Isolation and properties of

mutants of *A. chroococcum* defective in aerobic nitrogen fixation. J. Gen. Microbiol. 131: 1449-1458.

RAMOS, J.L. y ROBSON, R.L. (1985b). Lesions in cytrate synthase that affect aerobic nitrogen fixation by *A. chroococcum*. J. Bacteriol. 162: 746-751.

REVILLA, E. (1983). Transporte y asimilación de nitrato en la bacteria aerobia *Azotobacter chroococcum*. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.

REVILLA, E., CEJUDO, F.J., LLOBELL, A. y PANEQUE, A. (1986). Short-term ammonium inhibition of nitrate uptake by *Azotobacter chroococcum*. Arch. Microbiol. 144: 187-190.

REVILLA, E., LLOBELL, A. y PANEQUE, A. (1985). The assimilatory nitrate uptake in *Azotobacter chroococcum*. Induction by nitrate and cyanate. J. Plant. Physiol. 118: 165-176.

REVILLA, E., LLOBELL, A. y PANEQUE, A. (1986). Energy-dependence of the assimilatory nitrate uptake in *Azotobacter chroococcum*. J. Gen. Microbiol.

RICHARDS, R.L. (1979). Nitrogen fixation. En: "Chemistry and agriculture! Annual Chemical Congress. pp. 258-274. Chemical Society Special Publication. N°36.

RIGANO, C. y VIOLANTE, V. (1973). Efecto of nitrate, ammonia and nitrogen starvation on the regulation of nitrate reductase in *Cyanidium caldarium*. Arch. Microbiol. 90: 27-33.

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

ROBSON, R.L., CHESHYRE, J.A., WHEELER, C., JONE, R., WOODLEY, P.R.

- y POSTGATE, J.R. (1984). Genome size and complexity in *Azotobacter chroococcum*. J. Gen. Microbiol. 130: 1603-1612.
- ROBSON, R.L., KENNEDY, C. y POSTGATE, J.R. (1983). Progress in comparative genetics of nitrogen fixation. Can. J. Microbiol. 29: 954-967.
- ROBSON, R.L. y POSTGATE, J.R. (1980). Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. Ann. Rev. Microbiol. 34: 183-207.
- SADOFF, H.L., SHIMEL, B. y ELLIS, S. (1979). Characterization of *Azotobacter vinelandii* deoxyribonucleic acid and folded chromosomes. J. Bacteriol. 138: 871-877.
- SCHERINGS, G., HAAKER, H. y VEEGER, C. (1979). Regulation of nitrogen fixation by Fe-S protein II in *Azotobacter vinelandii*. Eur. J. Biochem. 77: 621-630.
- SCHERINGS, G., HAAKER, H. WASSINK, H. y VEEGER, C. (1983). On the formation of an oxygen-tolerant three component nitrogenase complex from *Azotobacter vinelandii*. Eur. J. Biochem. 135: 591-599.
- SCHLOEMER, R.H. y GARRET, R.H. (1974). Nitrate transport system in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 118: 259-269.
- SCOLIECK, P.A., VIROSO, J. y HASELKORN, R. (1983). The wild-type gene for glutamine synthetase restores ammonium control of nitrogen fixation to  $gln^-$  (*gln A*) mutants of *Rhodospseudomonas capsulata*. J. Bacteriol. 155: 180-185.
- SHAH, V.K. y BRILL, W.J. (1973). Nitrogenase. Simple method of purification to homogeneity of nitrogenase components from *Azotobacter vinelandii*. Biochem. Biophys. Acta. 305: 445-454.
- SHAPIRO, B. y STADTMAN, E. (1970). The regulation of glutamine

synthesis in microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 24: 501-524.

SINGH, H.N., RAI, U.N., RAO, V.V. y BAGCHI, S.N. (1983). Evidence for ammonia as an inhibitor of heterocyst and nitrogenase formation in the cyanobacterium *Anabaena cycadeae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 111: 180-187.

SMITH, B.E., LOWE, D.J., POSTGATE, J.R., RICHARDS, R.L. y THORNELEY, N.F. (1981). Studies on N<sub>2</sub> reduction by nitrogenase from *Klebsiella pneumoniae*. En: "Current perspectives in nitrogen fixation" (A.H. Gibson y N.E. Newton, Eds.). pp. 67-70. Australian Academy of Science. Canberra.

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

SOSA, F.M., ORTEGA, T. y BAREA, J.L. (1978). Mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* affected in the nitrate assimilation capability. Plant Sci. Lett. 11: 51-58.

STEWART, W.D.P., FITZGERALD, G.D. y BURRIS, R.H. (1967). *In situ* studies on N<sub>2</sub> fixation using the acetylene reduction technique. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 58: 2071-2078.

SWEET, W.J. y BURRIS, R.H. (1981). Inhibition of nitrogenase activity by ammonium in *Rhodospirillum rubrum*. J. Bacteriol. 145: 824-831.

SWISHER, R.H., LANDT, M. y REITHEL, F.J. (1975). Molecular weights of nitrogenase components of *Azotobacter vinelandii*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 66: 1476-1482.

SWISHER, R.H., LANDT, M. y REITHEL, F.J. (1977). The molecular weight of, and evidence for two types of subunits in the molybdenum-iron protein of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase. Bio-

chem. J. 163: 427-432.

THAYER, J.R. y HUFFAKER, R.C. (1982). Kinetic evaluation, using  $^{13}\text{N}$ , reveal two assimilatory nitrate transport systems in *Klebsiella pneumoniae*. J. Bacteriol. 149: 198-202.

THOMPSON, J.P. y SKERMAN, V.B.D. (1979). "Azotobacteraceae: the taxonomy and ecology of the aerobic nitrogen-fixing bacteria". Academic Press.

TISCHNER, R. y LORENZEN, H. (1979). Nitrate uptake and nitrate reduction in synchronous *Chlorella*. Planta 146: 287-292.

TRINCHANT, J.C. y RIGAUD, J. (1982). Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids. Appl. Environ. Microbiol. 44: 1385-1388.

TRIPLETT, E.W., WALL, J.D. y LUDDEN, P.W. (1982). Expression of the activating enzyme and Fe-protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. J. Bacteriol. 152: 786-791.

TORTOLERO, M., VILA, R. y PANEQUE, A. (1975). Ferredoxin-dependent nitrate reductase from *Azotobacter chroococcum*. Plant. Sci. Lett. 5: 141-145.

TUBB, R.S. y POSTGATE, J.R. (1973). Control of nitrogenase synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. J. Gen. Microbiol. 79: 103-117.

TURPIN, D.H., EDIE, S.A. y CANVIN, D.T. (1984). *In vivo* nitrogenase regulation by ammonium and methylamine and the effect of MSX on ammonium transport in *Anabaena flos-aquae*. Plant Physiol. 74: 701-704.



TYLER, B. (1978). Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 1127-1162.

VEEGER, C., DER VARTANIAN, D.U. y ZEYLEMAKER, W.P. (1969). Succinate dehydrogenase. En: "Methods in enzymology" (J.M. Lowenstein, Ed.). vol.XII, pp.81-90. Academic Press. New York and London.

VEGA, J.M., GUERRERO, M.G., LEADBETTER, E. y LOSADA, M. (1973). Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide nitrite reductase from *Azotobacter chroococcum*. *Biochem. J.* 133: 701-708.

WALKER, C.C. y YATES, M.G. (1978). The hydrogen cycle in nitrogen-fixing *Azotobacter chroococcum*. *Biochimie* 60:225-231.

WONG, T. y MAIER, R.J. (1984). Hydrogen-oxidizing electron transport components in nitrogen-fixing *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 159: 348-352.

WONG, T. y MAIER, R.J. (1985). H<sub>2</sub>-dependent mixotrophic growth of N<sub>2</sub>-fixing *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 163: 528-533.

YAMADA, T. y SAKAGUCHI, K. (1980). Nitrogen fixation associated with a hot spring green alga. *Arch. Microbiol.* 124: 161-167.

YATES, M.G. y PLANQUE, K. (1975). Nitrogenase from *Azotobacter chroococcum*. Purification and properties of the component proteins. *Eur. J. Biochem.* 60: 467-476.

YATES, M.G. y WALKER, C.C. (1980). Hydrogenase activity and hydrogen evolution by nitrogenase in nitrogen-fixing *Azotobacter chroococcum*. En: "Nitrogen fixation" Vol. 1 (Newton, W.E. y Crème-Johnson, W.H., Eds.) pp. 95-109. University Park Press. Baltimore.

YATES, M.G., WALKER, C.C., PARTRIDGE, C.D.P., PEDROSA, F.O., STEPMAH, M. y DOBEREINER, M. (1981). H<sub>2</sub> metabolism and nitrogenase activity in *A. chroococcum* and *Azospirillum brasilense*. En: "Current perspectives in nitrogen fixation". (Gibson, A.H. y Newton, E.W., Eds.). pp. 97-100. Australian Academy of Science. Canberra.

YOCH, D.C., ZHANG, Z., y CLAYBROOK, D. L. (1983). Methylamine metabolism and its role in nitrogenase "switch-off" in *Rhodopseudomonas capsulata*. Arch. Microbiol. 134: 45-48.

ZUMFT, W.G., ALEF, K. y MÜMMLER, S. (1981). Regulation of nitrogenase activity in *Rhodospirillaceae*. En: "Current perspectives in nitrogen fixation. (Gibson, A.H. y Newton, W.E., Eds.) pp. 190-193. Australian Academic of Science. Canberra.

ZUMFT, W.G. y CASTILLO, F. (1978). Regulatory properties of nitrogenase from *Rhodopseudomonas palustris*. Arch. Microbiol. 117: 53-60.

UNIVERSIDAD DE  
MEXICO

Francisco Javier Celudo Fernandez  
Regulación de la actividad  
nitrogenasa de *Azotobacter chro-  
ococcum*.  
Apto "cum laude"

15 Julio 86

*[Signature]*

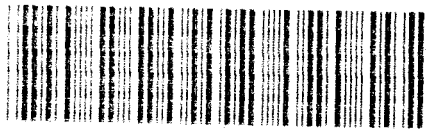
*[Signature]*

*[Signature]*

*[Signature]*

*[Signature]*

*[Signature]*



500293254

1986 07 15

293 254