

29
2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Colegio de Ciencias y Humanidades



ASIMILACION DE FRUCTOSA Y GLUCONATO EN
Azospirillum brasilense

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de
Licenciado en Investigación Biomédica Básica
P r e s e n t a

DENISE MARGOLIN SCHABES

México, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

2g
2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Colegio de Ciencias y Humanidades



ASIMILACION DE FRUCTOSA Y GLUCONATO EN

Azospirillum brasilense

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de
Licenciado en Investigación Biomédica Básica

P r e s e n t a

DENISE MARGOLIN SCHABES

México, D. F.

1984

INDICE.-

	Página
Introducción	1
Material y Métodos	13
I. Cepas bacterianas.	13
II. Crecimiento de las bacterias.	13
III. Mutagénesis con etil metano sulfonato.	15
IV. Preparación de extractos celulares.	17
V. Determinación de actividades enzimáticas.	17
Resultados	19
I. Crecimiento de <u>Azospirillum brasilense</u> en distintas fuentes de carbono.	19
II. Inducción del crecimiento en gluconato.	22
III. Inducción de las enzimas de la vfa Entner-Doudoroff.	25
IV. Niveles de 6-fosfogluconato deshidroge- nasa NAD-dependiente.	27
V. Niveles de gluconocinasa (GK) en células crecidas en gluconato o fructosa.	28
VI. Aislamiento de mutantes involucradas en la asimilación de fructosa y/o gluconato.	30
Discusión y Conclusiones	35
Bibliografía	45

LISTA DE TABLAS.-

	Página
Tabla 1. Clasificación de organismos diazotróficos.	3
Tabla 2. Diferencias fisiológicas entre <u>Azospirillum lipoferum</u> y <u>Azospirillum brasilense</u> .	11
Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo.	14
Tabla 4. Actividades combinadas de las enzimas de la vfa Entner-Doudoroff en diferentes microorganismos.	26
Tabla 5. Actividades específicas de 6-fosfogluconato deshidrogenasa en <u>Azospirillum brasilense</u> Sp7.	29
Tabla 6. Actividades comparativas de gluconocinasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa y enzimas de la vfa Entner-Doudoroff.	31
Tabla 7. Actividades comparativas de gluconocinasa y de las enzimas de la vfa Entner-Doudoroff en <u>A. brasilense</u> Sp7 y en la mutante MX2041 (Fut ⁻ Gut ⁻).	34
Tabla 8. Distribución del Sistema de Fosfotransferasa (PTS) para el transporte de carbohidratos en organismos procariotes.	39

LISTA DE FIGURAS.-

	Página
Figura 1. Representación gráfica de la reacción de la nitrogenasa.	4
Figura 2. Formación fotosintética de glucosa a partir de CO ₂ a través del ciclo Calvin en plantas C-3.	7
Figura 3. Vfa Hatch-Slack o ciclo de los ácidos dicarboxílicos (C-4).	8
Figura 4. Posibles vías de asimilación de distintos compuestos de carbono para microorganismos en general.	20
Figura 5. Curvas de crecimiento de <u>A. brasilense</u> utilizando distintas fuentes de carbono.	21
Figura 6. Diagrama representativo del Sistema de Fosfotransferasa fosfoenolpiruvato-dependiente para el transporte y la fosforilación de carbohidratos en algunas bacterias.	40
Figura 7. Esquema metabólico propuesto para la asimilación de fructosa y gluconato en <u>Azospirillum brasilense</u> .	42

INTRODUCCION.-

El hombre se enfrenta actualmente al incremento de la población y de la industrialización, al deterioro del medio ambiente y al agotamiento de los recursos no-renovables. Estos elementos, unidos a las limitaciones en la producción de alimentos, constituyen una grave problemática que la Humanidad debe afrontar a corto plazo, siendo el hambre una de sus más importantes manifestaciones.

El nitrógeno, elemento que ocupa el 80% de la atmósfera terrestre, que por ser un elemento constituyente de proteínas, ácidos nucleicos y otras importantes biomoléculas es indispensable para que exista la vida, no siempre se encuentra presente en formas que puedan ser utilizadas por plantas y animales. Los nitratos y el amonio son las principales fuentes de nitrógeno de las plantas, las cuales convierten estos compuestos en aminoácidos que van a formar parte de las proteínas. Estas últimas sirven como fuente de aminoácidos para los animales, que los utilizan para sintetizar sus propias proteínas celulares.

Entre los factores que pueden contribuir a mejores rendimientos en las cosechas, es fundamental el uso de mayores cantidades de fertilizantes nitrogenados. Sin embargo, con la actual crisis energética, la carestía de los productos y el alto consumo de ellos en el proceso de fabricación, estamos obligados a buscar una alternativa que permita responder a la demanda de alimentos. Bajo tales circunstancias, la fijación biológica de nitrógeno ha ido tomando gran impulso en los últimos años.

La cantidad de nitrógeno fijado biológicamente es difícil de estimar debido a la heterogeneidad de organismos diazotróficos (capaces de fijar N_2), de su amplia distribución y de los diferentes medio ambientes involucrados. Organismos diazotróficos asimbióticos, que incluyen bacterias de géneros como Klebsiella, Azotobacter, Clostridium, Rhodospirillum y Azospirillum, fijan N_2 independientemente de otros organismos. Algunos de ellos pueden formar una relación asociativa con la planta de manera que ésta pueda proveer a la bacteria de un medio ambiente más adecuado para el proceso de fijación de N_2 . Entre las bacterias que fijan N_2 únicamente al estar simbióticamente asociadas a una planta están especies de Rhizobium (que nodulan leguminosas)(1), algunos actinomicetes (que nodulan Comptonia)(2) y Anabaena azollae (que fija N_2 dentro de los poros de las hojas de Azolla)(3). Ningún organismo eucariote se ha encontrado capaz de fijar nitrógeno. (Tabla 1)

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso altamente energético (requiere ATP y NADPH), lábil al oxígeno y es reprimido por presencia de amonio. La nitrogenasa es la enzima que interviene en la reducción del N_2 a NH_4 . Está constituida por dos componentes: una ferromolibdoproteína o nitrogenasa (Kp1) y una ferroproteína o nitrogenasa reductasa (Kp2)(4). Ambos componentes son muy similares en una amplia gama de organismos (5, 6)(Figura 1).

Debido a la labilidad de la nitrogenasa por el O_2 , los organismos aerobios facultativos (ej. K. pneumoniae) no son capaces de fijar N_2 aeróbicamente. Los estrictos aerobios poseen mecanismos para proteger a sus nitrogenasas del O_2 , como son:

- a) elevada actividad respiratoria que reduce O_2 rápidamente

Tabla 1. Clasificación de organismos diazotróficos.

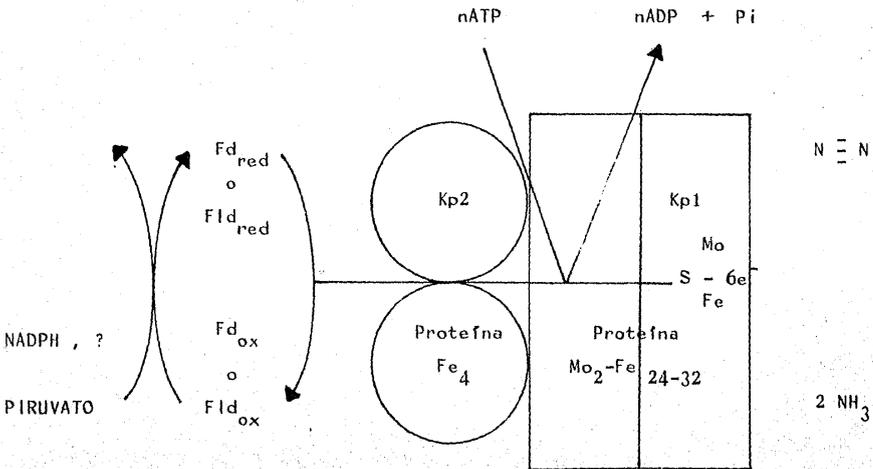
ASIMBIONTES O DE VIDA LIBRE

Aerobios estrictos: Azotobacter
Anaerobios estrictos: Clostridium
Fijación de N₂ anaeróbica:
Klebsiella y Bacillus
Fijación de N₂ microaerófila:
Azospirillum

SIMBIONTES

Organismo - Planta
Rhizobium - leguminosas
Anabaena azollae - Azolla
actinomicetes - Comptonia

Figura 1. Representación gráfica de la reacción de la nitrogenasa.



te (7);

b) localización de la nitrogenasa dentro de heteroquistes (8);

c) formación del complejo Kp1 - Kp2 - proteína Shetna, el cual posee mayor estabilidad en presencia de oxígeno (9);

d) producción de leghemoglobina, de la cual comentaremos a continuación.

En el caso de Rhizobium, la existencia de leghemoglobina en los nódulos que rodean a las bacterias, permite el paso de la cantidad de oxígeno que permita la fijación de N_2 sin inactivar a la nitrogenasa (10, 11). La síntesis de leghemoglobina es precisamente uno de los aspectos donde la simbiosis Rhizobium-leguminosa se presenta como una asociación íntima entre bacteria y planta, ya que la información para la globina se encuentra codificada en el genoma de la planta, mientras que la del grupo hemo se halla en el genoma bacteriano (12).

En el caso de anaerobios estrictos (ej. Clostridium), la labilidad de la nitrogenasa por el oxígeno no presenta problema alguno.

La importancia relativa de cada microorganismo o grupo de ellos, en cuanto a la fijación de nitrógeno se refiere, depende de la provisión de sustrato orgánico utilizable que, en casi todos los casos, ha de ser fuente de energía, de poder reductor y de esqueleto carbonado para la incorporación del amonio que resulta de la fijación.

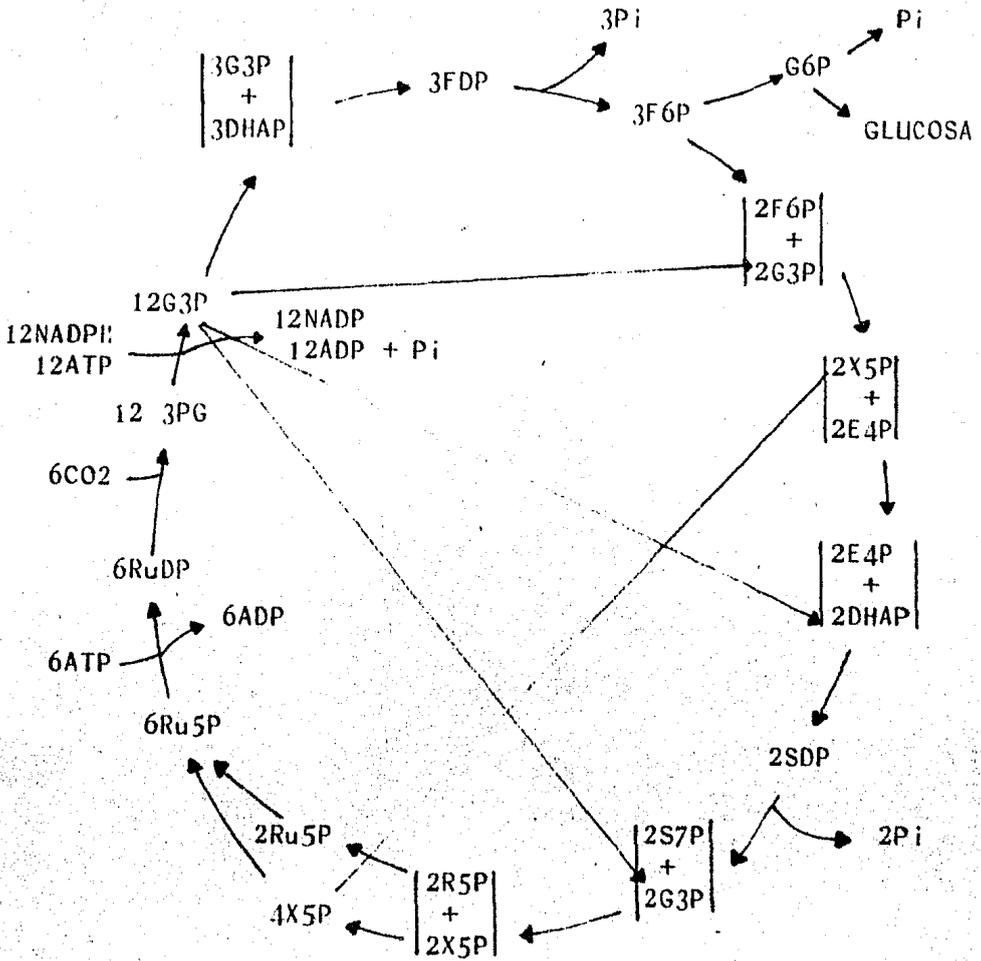
La fotosíntesis es un proceso en que los compuestos de carbono son elaborados a partir de CO_2 y agua en los tejidos verdes

de las plantas, utilizando energía luminosa. Este proceso es un factor limitante de la fijación de N_2 en bacterias que se encuentran en simbiosis con la planta (5, 6, 13). Estudios sobre la bioquímica de la fotosíntesis han revelado que, además del ciclo reductor de la vía de las pentosas fosfato o ciclo Calvin (C-3)(Figura 2), muchos pastos poseen el ciclo de los ácidos dicarboxílicos o vía Hatch-Slack (C-4)(14)(Figura 3). Los pastos que poseen esta última vía de la fotosíntesis utilizan el nitrógeno disponible más eficientemente (14), por lo que el grupo de Dobereiner (15) ha sugerido que la vía de los ácidos dicarboxílicos en pastos es importante para la capacidad de estas plantas de estimular la fijación de N_2 en bacterias que se localizan en sus zonas radiculares. Esta hipótesis parece atractiva si se toma en cuenta que el malato es el producto primario de la fotosíntesis de algunos pastos C-4 (Z. mays, Digitaria) (16) y que es preferida, junto con otros ácidos orgánicos (17, 18), como fuente de carbono por Azospirillum, microorganismo principalmente responsable de la fijación de N_2 observada en algunos de esos pastos (19). Sin embargo, se ha detectado actividad de nitrogenasa en pastos que no poseen la vía C-4 de la fotosíntesis (arroz, trigo)(20).

Otras formas de acción en que no esté involucrada la fijación de N_2 y que se han sugerido para explicar los incrementos en la producción de las cosechas al aplicar bacterias diazotróficas en los cultivos, son (20):

- a) cambios en la población microbiana de la rizósfera;
- b) supresión de enfermedades por los inoculantes;
- c) producción de sustancias promotoras del crecimiento de la planta. Hay evidencias firmes de que el ácido indol-3-acético, guiberelinas y citocininas, sustancias producidas por las plantas y esenciales para su desarrollo y crecimiento,

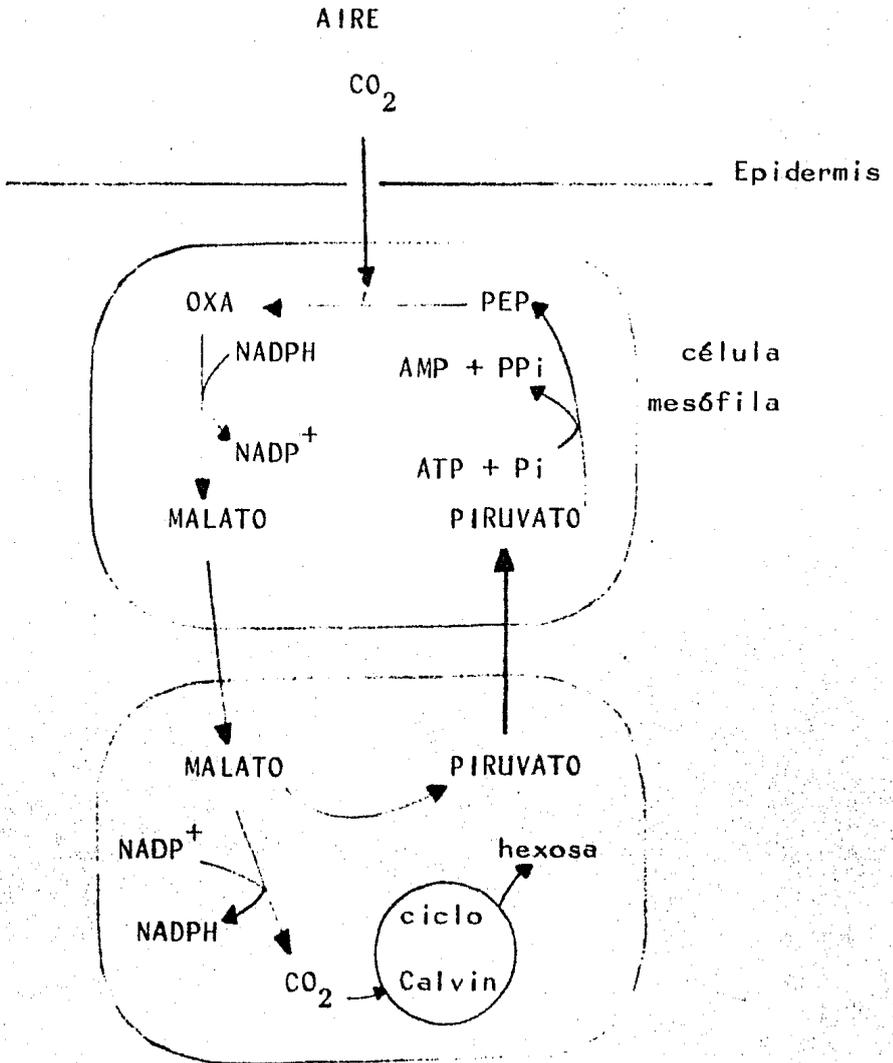
Figura 2. Formación fotosintética de glucosa a partir de CO_2 a través del ciclo Calvin en plantas C-3.



3PG= 3-fosfoglicerato
 G3P= gliceraldehido 3-P
 DHAP= dihidroxiacetona -P
 FDP= fructosa 1,6 di-P
 F6P= fructosa 6-P
 G6P= glucosa 6-P

E4P= eritrosa 4-P
 X5P= xilulosa 5-P
 SDP= sedoheptulosa 1,7 di-P
 S7P= sedoheptulosa 7-P
 R5P= ribosa 5-P
 Ru5P= ribulosa 5-P
 RuDP= ribulosa 1,5 di-P

Figura 3. Vía Hatch-Slack o ciclo de los ácidos dicarboxílicos (C-4).



OXA= oxaloacetato

PEP= fosfoenolpiruvato

son también elaboradas por algunas de las bacterias que viven en asociación a ellas (ej. Azotobacter, Azospirillum) (21, 22).

En general, aquellas relaciones bacteria-planta en que el sitio de fijación de N_2 se localice dentro o cerca de la planta van a permitir un acoplamiento directo y eficiente de nitrógeno fijado a la planta. Aquellas simbiosis de tipo obligado o asociativo, en que la planta de la cosecha sea una de las partes de la relación simbiótica, satisfarán los requerimientos para una mayor y mejor producción agrícola.

A pesar de que la mayoría de las leguminosas poseen la capacidad de fijar todo el nitrógeno que requieren, el area total mundial cultivada de estas plantas ha sido de, aproximadamente, el 10% del area utilizada para los cereales (6, 23). Es por esto que el estudio de bacterias pertenecientes al género Azospirillum ha cobrado gran atención en la última década.

En 1922, Beijerinck describió por vez primera una bacteria que fue nombrada Azotobacter spirillum y luego Spirillum lipoferum. Muy poca atención se le había dado a este organismo hasta que, en 1974, Dobereiner et al. la aislaron de las raíces de algunos pastos tropicales del Brasil (24, 25). Las porciones radicales exhibían actividad de nitrogenasa (cuantificada mediante reducción de acetileno). La capacidad de fijación de N_2 en aquellas plantas fue confirmada al demostrarse la incorporación de $^{15}N_2$ hacia el tejido de las mismas (26). Este organismo es gram negativo, de forma vibroide con un flagelo polar y puede acumular gránulos de poli- β -hidroxi-butarato (17, 27). Puede fijar N_2 libremente o en asociación a pastos tropicales y cereales, pero solo en un ambiente microaerofílico, ya

que no posee mecanismos de protección de su nitrogenasa hacia el oxígeno (18, 27). Si el medio de cultivo está suplementado con una fuente fijada de nitrógeno, el microorganismo es capaz de crecer aeróbicamente (27).

En 1978, 61 cepas de S. lipoferum fueron sometidas a un análisis de composición de ADN, requerimientos nutricionales, pruebas enzimáticas y de estructura (28). Los resultados indicaron que existen por lo menos dos especies de este organismo, por lo que, en base a sus características, se les asignó a un nuevo género denominado Azospirillum. A. brasilense es protótrofa e incapaz de utilizar glucosa, sacarosa y otras fuentes de carbono que A. lipoferum, auxótrofa de biotina, sí metaboliza (28). Otras diferencias fisiológicas entre ambas especies de Azospirillum se encuentran resumidas en la tabla 2. Entre las características más importantes en cuanto a producción agrícola se refiere, está el que A. brasilense se asocia preferentemente a trigo y arroz, mientras que A. lipoferum lo hace a maíz (29), sugiriendo una diferencia de especificidad entre las dos especies hacia plantas C-3 y C-4.

Estudios de la nitrogenasa de A. brasilense han demostrado que consiste en un sistema de tres componentes: una proteína Mo-Fe, una proteína Fe y un factor activador de la proteína Fe similar al que se encuentra en Rhodospirillum rubrum (30).

Se conoce relativamente poco sobre las vías de metabolismo central de carbohidratos en esta bacteria. Estudios previos de otros laboratorios indican que Azospirillum brasilense posee un ciclo de los ácidos tricarbóxicos funcional, pero que las vías glicolítica y de pentosas fosfato son inexistentes o bien,

Tabla 2. Diferencias fisiológicas entre Azospirillum lipoferum y Azospirillum brasilense.

A. lipoferum

-
- Asimilación de glucosa, sacarosa, manitol, sorbitol, ribosa
 - Requiere biotina
 - Se asocia a maíz
 - Catalasa negativa
 - Acidificación de medio con glucosa o fructosa
 - En medio semisólido sin N: se ensanchan y agrandan

A. brasilense

-
- No-asimilación de glucosa, sacarosa, manitol, sorbitol, ribosa
 - Protótrofa
 - Se asocia a trigo y arroz
 - Catalasa positiva
 - No-acidificación de medio con glucosa o fructosa
 - No cambia de forma ni de tamaño en medio semisólido sin N
-

vagamente operativas, ya que extractos libres de células no presentaron incremento alguno en la captura de oxígeno al usar varios azúcares y azúcar fosfatos como sustratos(17).

En el presente trabajo nos enfocamos a estudiar el metabolismo de carbohidratos en Azospirillum brasilense para lo cual utilizamos dos estrategias: una bioquímica y otra genética. La primera de ellas consistió en el análisis de fuentes de carbono que esta bacteria es capaz de asimilar, así como de los ensayos enzimáticos específicos para las distintas rutas metabólicas. La estrategia genética consistió en el aislamiento de mutantes deficientes en el metabolismo de carbohidratos con las que se comprobaron y ampliaron los resultados bioquímicos.

MATERIAL Y METODOS.-

I. Cepas bacterianas.

Azospirillum brasilense Sp7 fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC # 29145). Las mutantes de esta cepa se obtuvieron por tratamiento mutagénico con etil metano sulfonato. La cepa MX614 es una derivada de Escherichia coli K12. Todas las cepas utilizadas en el presente trabajo se encuentran descritas en la Tabla 3.

II. Crecimiento de las bacterias.

A. brasilense fue crecida en volúmenes de 20 ml de medio mínimo (31) suplementado con la fuente de carbono indicada (al 0.5%, m/vol) y con 0.25% m/vol de NH_4Cl . Como medio rico se utilizó Caldo Nutritivo (Difco)(31). Los cultivos se agitaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml a 30°C.

Escherichia coli se creció en medio mínimo NN como se reportó previamente (32). La fuente de carbono al 0.2% y 15 mM NH_4Cl fueron siempre agregados a los medios de cultivo.

La absorbancia de las suspensiones celulares se determinó en un colorímetro Klett, utilizando un filtro rojo cuyo rango espectral es de 640 - 700 nm. La relación de unidades Klett con respecto a densidad óptica se calculó con la si-

Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo.

Organismo	cepa	fenotipo ^a relevante	referencia
<i>A. brasilense</i>	Sp7	Fut ⁺ , Gut ⁺ , Sut ⁺	ATCC
"	MX2041 ^b	Fut ⁻ , Gut ⁻ , Sut ⁺	este trabajo
"	MX2046 ^c	Fut ⁻ , Gut ⁺ , Sut ⁺	" "
"	MX2047 ^c	Fut ⁻ , Gut ⁺ , Sut ⁺	" "
"	MX2063 ^d	Fut ⁺ , Gut ⁻ , Sut ⁺	" "
"	MX2067 ^d	Fut ⁺ , Gut ⁻ , Sut ⁺	" "
"	MX2068 ^d	Fut ⁺ , Gut ⁻ , Sut ⁺	" "
<i>E. coli</i>	MX614	Fut ⁺ , Gut ⁺ , Glt ⁺	F. Bastarrachea

a. Fut, Gut, Sut, Glt: utilización de fructosa, gluconato, succinato y glucosa, respectivamente; (-)positivo, (-)negativo

b. Seleccionada por su incapacidad de utilizar fructosa y contraseleccionada para Gut⁻.

c. Obtenidas a partir de la misma mutagénesis.

d. Obtenidas a partir de la misma mutagénesis.

guiente fórmula:

$$\text{densidad óptica} = \frac{\text{U. Klett}}{500}$$

Los tiempos de generación, cuantificados durante la fase exponencial, se calcularon mediante el uso de la siguiente fórmula (33):

$$\text{tiempo de generación} = \frac{0.3010 \ t}{\log b - \log a}$$

a= densidad óptica inicial
b= densidad óptica final
t= tiempo transcurrido

III. Mutagénesis con etil metano sulfonato (ems).

Para la selección de mutantes Fut^- (incapaces de utilizar fructosa) se empleó el siguiente protocolo elaborado en nuestro laboratorio, por lo que se describe detalladamente:

1. Crecer a A. brasilense Sp7 en 5 ml de medio líquido con fructosa y NH_4Cl hasta fase exponencial (aprox. 100 U.K.).
2. Centrifugar y resuspender en 2.5 ml de medio mínimo sin fuente de carbono.
3. A 2.4 ml de medio mínimo, agregar 0.1 ml del mutágeno.

4. Mezclar las células con el etil metano sulfonato e incubar 4 horas a 30°C sin agitación.
5. Centrifugar y lavar 2X con un volumen igual de tiosulfato de sodio al 5%, para inactivar el EMS.
6. Centrifugar y resuspender en 5 ml de medio nutritivo. Incubar hasta alcanzar la fase estacionaria (aprox. 3 días).
7. Centrifugar y lavar 2X con solución de fosfatos 20mM pH 6.8.
8. Centrifugar y poner a crecer las células en medio con fructosa. Incubar hasta 100 U. Klett a 30°C con aereación.
9. Agregar 1 ml de kanamicina al 1%. Incubar 3 horas.
10. Lavar 2X con solución de fosfatos.
11. Resuspender en medio con succinato. Incubar hasta alcanzar la fase estacionaria.
12. Hacer diluciones apropiadas (10^{-4} , 10^{-5}) para plaquear en cajas con succinato.
13. Seleccionar colonias aisladas y probar su crecimiento en succinato, fructosa y gluconato.

Las mutantes incapaces de utilizar fructosa se denominaron Fut^{-} . Todas ellas fueron examinadas para su capacidad de crecer en gluconato. Aquellas colonias que no pudieron metabolizar ninguna de las dos hexosas fueron nombradas $Fut^{-}Gut^{-}$.

Para comprobar que la mutante MX2041 ($Fut^{-}Gut^{-}$) debía su fenotipo a una sola mutación puntual, ésta fue crecida en succinato hasta fase estacionaria, para buscar posteriormente, revertantes espontáneas en medio con fructosa o gluconato. Se plaquearon inóculos de 0.1 ml de dicho cultivo en cajas con fructosa o gluconato. Todas las colonias que fueron capaces de crecer en fructosa lo hicieron también en gluconato cuando

se probaron en dicho medio. A su vez, las revertantes Gut⁺ crecieron también en fructosa.

Para la selección de mutantes Gut⁻ se utilizó gluconato en vez de fructosa en los medios de cultivo. El resto de la mutagénesis se llevó a cabo de la manera antes mencionada.

IV. Preparación de extractos celulares.

1. Cultivar las células hasta fase exponencial.
2. Centrifugar y lavar 2X con igual volumen de solución de fosfatos 20 mM pH 6.8 .
3. Centrifugar y resuspender en 10% del volumen original para proceder a sonicar las células.
4. Centrifugar a 10 000 g por 15 min. Utilizar el sobrenadante para los ensayos enzimáticos.

V. Determinación de actividades enzimáticas.

Todas las actividades enzimáticas están expresadas en términos de nanomolas de producto formado por minuto por miligramo de proteína. La cuantificación de proteína se determinó según el protocolo de Lowry et al. (34).

La actividad combinada de las dos enzimas de la vía Entner-Doudoroff (6-fosfogluconato dehidratasa y 2-ceto, 3-deoxi, 6-fosfogluconato aldolasa) se midió por la formación 6-fosfogluconato dependiente de piruvato, que se detec-

t6 colorimétricamente como su dinitrofenilhidrazona (35).

Las actividades de 6-fosfogluconato deshidrogenasa y de gluconocinasa se cuantificaron esencialmente como lo describieron Eisenberg y Dobrogosz para E. coli (36), excepto que 200 ul de extractos 20 veces concentrados de la cepa MX614 crecida en glucosa se emplearon como fuente de 6-fosfogluconato deshidrogenasa para la determinación de la gluconocinasa.

RESULTADOS. -

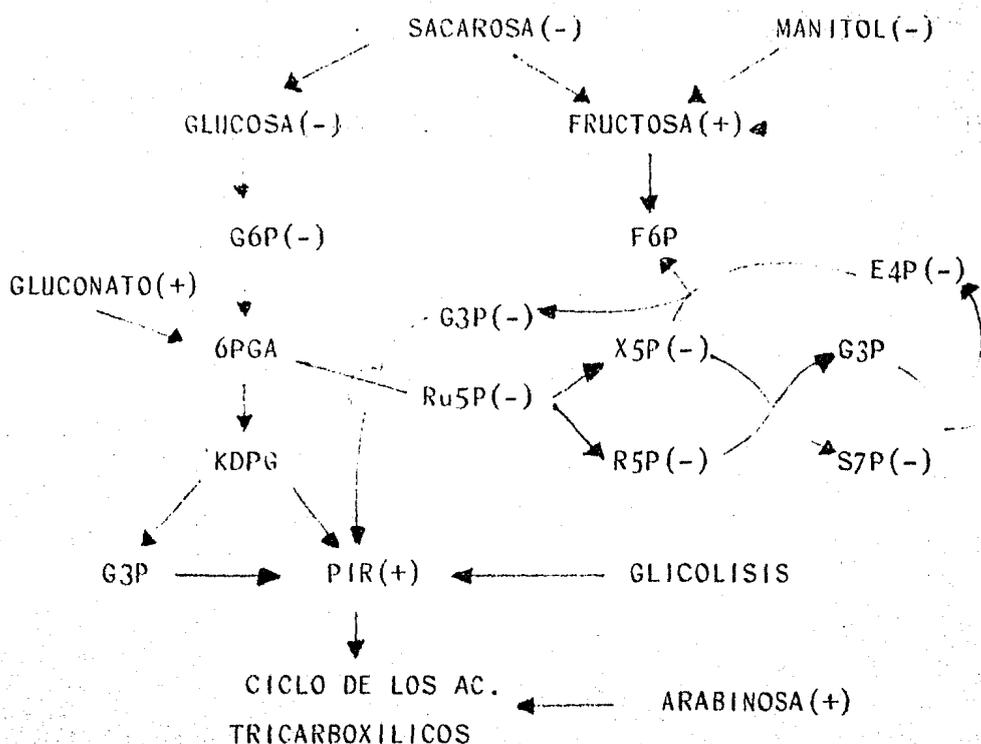
1. Crecimiento de Azospirillum brasilense en distintas fuentes de carbono.

Con el propósito de determinar cuáles vías del metabolismo central de carbohidratos posee Azospirillum brasilense, esta bacteria se creció aeróbicamente en medio líquido con NH_4Cl suplementado con distintas fuentes de carbono.

En la Figura 4 se muestran algunas rutas posibles del metabolismo de carbohidratos y las fuentes de carbono probadas como sustratos únicos. Este esquema representa una recopilación de las vías metabólicas empleadas por varios microorganismos. Asimismo, se indica el crecimiento positivo o negativo observado para cada compuesto carbonado. Es importante hacer mención de que, exceptuando la glucosa 6-fosfato, todos los demás compuestos se añadieron en forma no fosforilada. Succinato y malato, intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, también fueron probados como sustratos, pero no se incluyeron en la Figura ya que su utilización como mejores fuentes de carbono en A. brasilense (17, 18) y la funcionalidad del ciclo de Krebs en dicha bacteria (17) se reportaron anteriormente. Una vía oxidativa por medio de la cual la arabinosa es convertida a α -cetoglutarato ya ha sido demostrada (37).

La Figura 5A nos muestra las curvas de crecimiento en fructosa, gluconato y succinato. El crecimiento en malato

Figura 4. Posibles vías de asimilación de distintos compuestos de carbono para microorganismos en general.



(+) Compuestos que *A. brasilense* Sp7 utiliza como sustratos.

(-) Compuestos que *A. brasilense* Sp7 no metaboliza.

G6P= glucosa 6-fosfato

R5P= ribosa 5-fosfato

F6P= fructosa 6-fosfato

S7P= sedoheptulosa 7- P

6PGA= 6-fosfogluconato

E4P= eritrosa 4-fosfato

G3P= gliceraldehido 3- P

PIR= piruvato

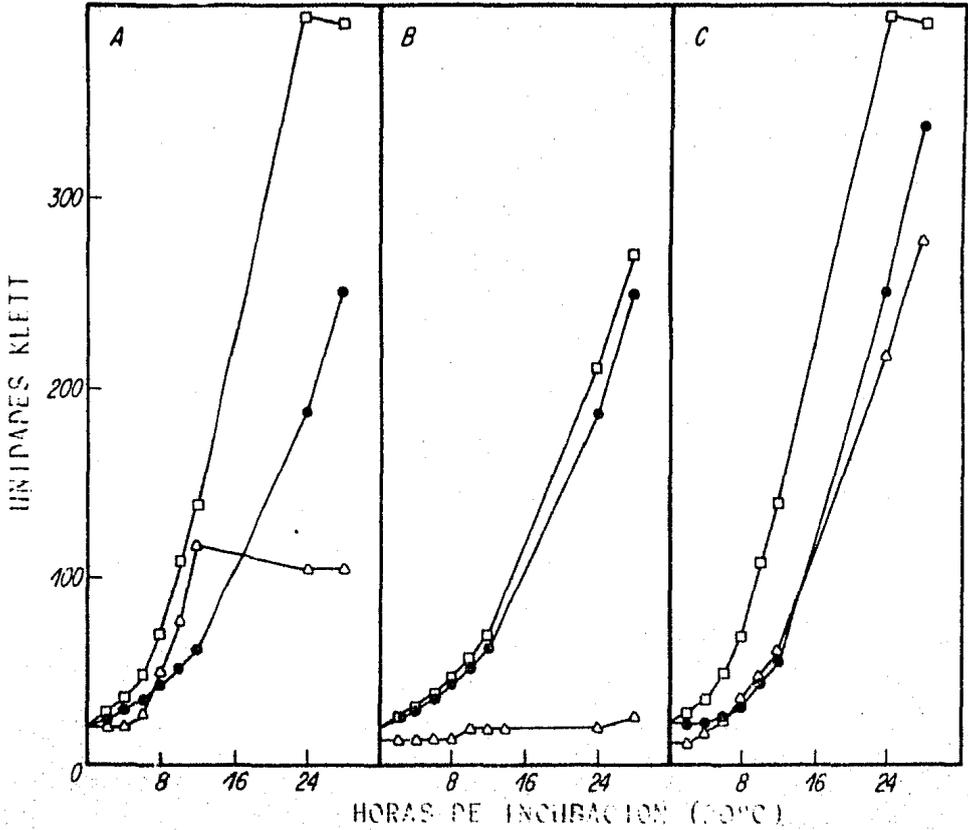
Ru5P= ribulosa 5-fosfato

KDPG= 2-ceto, 3-deoxi, 6-

X5P= xilulosa 5-fosfato

fosfogluconato

Figura 5. Curvas de crecimiento de A. brasilense utilizando distintas fuentes de carbono.



- A. Las células fueron preincubadas y crecidas en el mismo medio: cuadros = fructosa; círculos = gluconato; triángulos = succinato.
- B. Células crecidas en gluconato.
- C. Células crecidas en fructosa.
- B. y C. Las células se preincubaron en: cuadros = fructosa; círculos = gluconato; triángulos = caldo nutritivo.

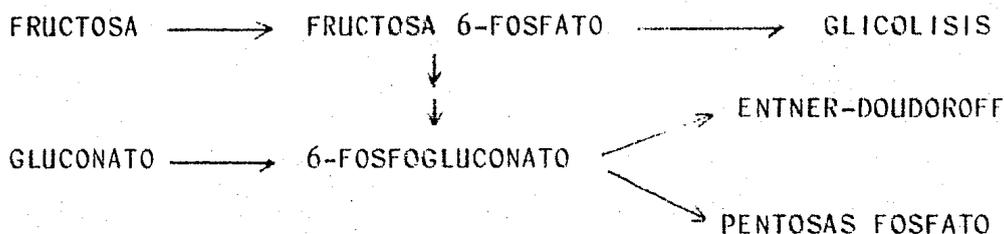
es similar al de succinato por lo que no se incluyó en la figura. Los tiempos de generación, cuantificados en fase exponencial, oscilaron entre 4 y 5 horas para estas cuatro fuentes de carbono. Nuestros datos indican que A. brasilense puede utilizar gluconato y fructosa de manera más eficiente que lo reportado para malato y succinato (17), bajo un criterio de masa celular total, que es, por lo menos, tres veces mayor en fructosa o gluconato. Esto ocurre a pesar de que en todos los casos, el medio de cultivo está amortiguado con una solución con alto contenido de fosfatos (aprox. 50 mM). En base a lo anterior, nos enfocamos a tratar de identificar si había algún(os) factor(es) en los medios de succinato y malato que estuviese(n) impidiendo el crecimiento de A. brasilense al llegar ésta a una densidad óptica de unas 200 U. Klett. Decidimos medir las variaciones de pH en el medio de cultivo ya que, de alejarse mucho del pH óptimo de crecimiento de la bacteria (pH7)(31), esto impediría su crecimiento y quizá, causaría también su muerte. Nuestra hipótesis resultó cierta ya que, el medio de cultivo en fructosa o gluconato se mantuvo en pH 7.2 - 7.4 a lo largo del crecimiento, mientras que en succinato o malato el medio se basificó hasta pH 9.5. Habrá que determinar si sustancias de tipo aminas alifáticas (ej. espermina, putrescina, cadaverina) son las responsables de la variación de pH, como ocurre en otras bacterias (38)(Bravo, A. y Bastarrachea, F., datos no publicados).

II. Inducción del crecimiento en gluconato.

Con el fin de determinar las rutas metabólicas involucradas en la asimilación de gluconato y fructosa, existiendo además la posibilidad de que tuvieran alguna vfa en común (ver Figura 4), decidimos estudiar si el precrecimiento de A. brasilense en alguna de las hexosas inducía el crecimiento posterior en la otra. Así, las células se precrecieron en fructosa, gluconato o caldo nutritivo hasta alcanzar la fase estacionaria. Diluciones de dichos cultivos fueron lavados con solución de fosfatos 20 mM pH 6.8 antes de ser transferidos a un medio de gluconato o de fructosa, de los que se tomaron medidas de densidad óptica a lo largo de su crecimiento.

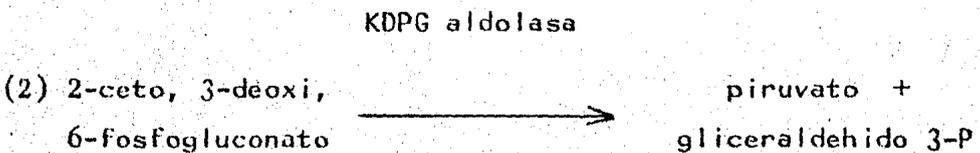
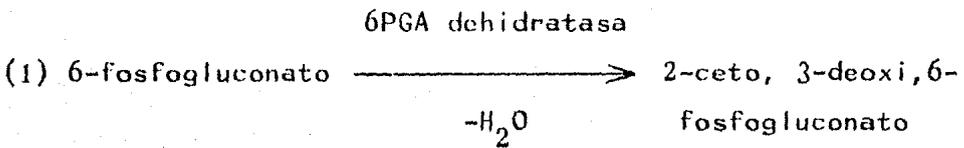
La Figura 5B nos muestra las curvas de crecimiento de A. brasilense con gluconato como fuente de carbono. Fructosa fue capaz de inducir el crecimiento en dicho medio tanto como el gluconato mismo. Sin embargo, en la Figura 5C observamos que el precrecimiento en gluconato no tuvo el mismo efecto al pasar las células a fructosa, ya que si se preincubaba en fructosa el período "lag" de crecimiento era notablemente menor. La preincubación de las células en caldo nutritivo no indujo crecimiento en estas hexosas.

Estos resultados nos hicieron pensar en un esquema metabólico de la siguiente forma:



De esta manera, la fructosa podría metabolizarse a través del 6-fosfogluconato (induciendo por lo tanto el crecimiento en gluconato, Figura 5B), así como por otra vía que no involucrase dicho compuesto (glicólisis) y que explicase la no-inducción del crecimiento en fructosa al provenir las células de un medio con gluconato.

Dos rutas principales para la asimilación de gluconato existen en diferentes microorganismos: la vía Entner-Doudoroff y la vía de las pentosas fosfato. La primera de ellas consiste en dos reacciones enzimáticas a partir del 6-fosfogluconato (6PGA):



La segunda, la vía de las pentosas fosfato, desemboca en la secuencia glicolítica mediante la producción de fructosa 6-fosfato, o en el ciclo de los ác. tricarbóxicos, a través del piruvato que produce (ver Figura 4).

III. Inducción de las enzimas de la vfa Entner-Doudoroff.

A. brasilense Sp7 fue cultivada en medio líquido suplementado con NH_4Cl y 0.5% (masa/vol) del compuesto carbonado indicado para cada caso. La Tabla 4 nos presenta los niveles de las dos enzimas de la vfa Entner-Doudoroff en ésta y otras especies bacterianas. Se determinó la actividad combinada de ambas enzimas de la vfa mediante la formación 6-fosfogluconato-dependiente de piruvato en ensayos conteniendo extractos celulares de bacterias crecidas bajo las condiciones especificadas.

Como se observa para Escherichia coli (36, 39), tanto la 6-fosfogluconato deshidratasa como la 2-ceto, 3-deoxi, 6-fosfogluconato aldolasa son enzimas inducibles en A. brasilense crecida en gluconato. Sin embargo, no se observó inducción de la vfa bajo ningún otro compuesto carbonado probado (a pesar de que fructosa fue capaz de inducir el subsecuente crecimiento en gluconato, Figura 5B), donde solo se detectaron niveles basales bajos de estas enzimas. Por el contrario, especies de Pseudomonas (40, 41) y de Rhizobium (42, 43) contienen altos niveles de esta actividad al crecerlas en gluconato, glucosa, fructosa y otras fuentes de carbono.

El análisis de nuestras mutantes deficientes en la utilización de una o de ambas hexosas apoyan los datos anteriores. Cepas de A. brasilense incapaces de usar fructosa como fuente de carbono (Fut^-) crecen normalmente en gluconato y poseen actividades de la vfa Entner-Doudoroff compa-

Tabla 4. Actividades combinadas de las enzimas de la vfa Entner-Doudoroff en diferentes microorganismos. ^a

Sustrato	<u>Pseudomonas</u> <u>cepacia</u> ^b	<u>Rhizobium</u> spp ^c	<u>Escherichia</u> <u>coli</u> ^d	<u>Azospirillum</u> <u>brasilense</u>
GLUCOSA	83	108	20	NC ^e
GLUCONATO	88	ND ^f	130	108
FRICTOSA	94	ND	ND	1
GLICEROL	75	ND	10	7
SUCCINATO	4	ND	10	5
ARABINOSA	ND	ND	ND	9

a. Expresado en nanomolas de piruvato formado por minuto por miligramo de proteína.

b. Referencias 40 y 41.

c. Referencias 42 y 43.

d. Referencias 36 y 39.

e. No hay crecimiento.

f. No determinado.

rables a los de la cepa silvestre Sp7 (Tabla 6). Comprobándose así, que la mutación que confiere el fenotipo Fut^- no está involucrada en la asimilación de gluconato. Esto no descarta la posibilidad de que alguna otra mutación que impida el uso de fructosa tenga la vía del gluconato alterada (no encontramos ninguna mutante de este tipo). Mutantes incapaces de crecer en gluconato (Gut^-) crecen en fructosa en la misma forma en que lo hace la cepa silvestre.

IV. Niveles de 6-fosfogluconato deshidrogenasa NAD-dependiente.

En la mayoría de los organismos, la actividad de 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGAD), por medio de la cual el 6-fosfogluconato sufre oxidación y decarboxilación para formar D-ribulosa 5-fosfato, es una reacción NADP-dependiente. Además, Pseudomonas multivorans (44) y Streptococcus faecalis (45) tienen otra forma de la enzima que es activa tanto con NAD como NADP bajo crecimiento en gluconato. Esta última parece jugar un papel muy importante en el catabolismo de gluconato, mientras que la NADP-dependiente estaría involucrada en proveer a la célula de factores reductores (NADPH) para diversas reacciones biosintéticas (45). Aunado a su especificidad por piridinonucleótidos, estas enzimas también difieren en tamaño y susceptibilidad a inhibición por ATP. Escherichia coli posee una 6PGA deshidrogenasa que a pesar de ser específica para NADP, está también sujeta a regulación por $NADH_2$ (46).

En A. brasilense solo pudimos encontrar actividad de 6-fosfogluconato deshidrogenasa asociada a NAD. Como puede apreciarse de la Tabla 5, el valor máximo observado se obtuvo al crecer las células en gluconato. El valor tan bajo observado con fructosa como sustrato carbonado sugiere que ésta no es su ruta principal de asimilación.

La actividad al probar para dependencia de NADP fue muy baja a pesar de que se utilizaron mezclas de ensayo que variaban desde pH 7.3 hasta 8.8. Esto se hizo ya que se han reportado pH's óptimos de actividad catalítica de 7.5 y de 8.0-8.5 para las formas NAD-NADP y NADP dependientes, respectivamente (45). La actividad máxima observada en A. brasilense de 6PGA deshidrogenasa NAD-dependiente fue a pH 8.5 .

V. Niveles de gluconocinasa (GK) en células crecidas en gluconato o fructosa.

El gluconato debe sufrir una fosforilación antes de que pueda ser metabolizado ya sea por la vía Entner-Doudoroff o por la de las pentosas fosfato.

La actividad de gluconocinasa fue cuantificada mediante el acoplamiento de la formación de 6-fosfogluconato a la reducción de NADP en presencia de exceso de 6-fosfogluconato deshidrogenasa:

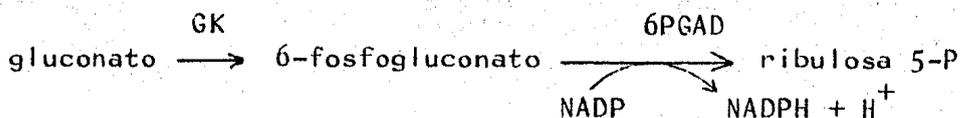
Tabla 5. Actividades específicas de 6-fosfogluconato deshidrogenasa en Azospirillum brasilense Sp7^a.

SUSTRATO	cofactor	
	NADP ^b	NAD ^c
GLUCONATO	0.49	16.6
FRUCTOSA	0.51	4.2
SUCCINATO	0.50	0.0

a. Expresado en nanomolas de producto por minuto por miligramo de proteína.

b. Actividades máximas observadas a pH 7.9 .

c. Actividades determinadas a pH 8.5 .



GK = gluconocinasa

6PGAD = 6-fosfogluconato deshidrogenasa

Un extracto celular de E. coli MX614 crecido en glucosa fue utilizado como fuente de 6PGAD, ya que tiene tan solo niveles basales de gluconocinasa y muy alta actividad de deshidrogenasa (36)(Tabla 6).

La Tabla 6 nos muestra que los niveles de actividad de gluconocinasa encontrados en extractos de A. brasilense crecida en gluconato, fueron similares a los obtenidos cuando se incubaron en fructosa mas no en succinato. Estos resultados, aunados a los de las Figuras 5B y 5C, sugieren que la fructosa puede inducir la actividad de gluconocinasa tanto como el gluconato mismo, lo que parece indicar que la misma enzima es capaz de fosforilar ambos sustratos.

VI. Aislamiento de mutantes involucradas en la asimilación de fructosa y/o gluconato.

Para tratar de comprobar que las rutas de asimilación de fructosa y gluconato son independientes una vez transcurrida la fosforilación, decidimos aislar mutantes de tres diferentes tipos:

Tabla 6. Actividades comparativas de gluconocinasa (GK), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGAD) y enzimas de la vía Entner-Doudoroff (ED).^a

Organismo	sustrato	GK ^b	6PGAD ^c	ED ^d
<u>E. coli</u> MX614	glucosa	2	252	ND ^e
<u>E. coli</u> MX614	gluconato	19	272	ND
<u>A. brasilense</u> Sp7	gluconato	12	0.5	108
" Sp7	fructosa	12	0.5	1
" Sp7	succinato	2	0.5	5
" MX2046 ^f	gluconato	12	0.5	100
" MX2047 ^f	gluconato	11	0.5	98
" MX2063 ^g	fructosa	12	0.5	2
" MX2067 ^g	fructosa	12	0.5	1
" MX2068 ^g	fructosa	11	0.5	1

a. Expresadas en nanomolas de producto por minuto por miligramo de proteína.

b. Extractos de Escherichia coli MX614 crecida en glucosa fueron utilizados como fuente de 6PGAD.

c. NADP fue utilizado como cofactor.

d. Actividad combinada de ambas enzimas de la vía ED.

e. ND : no determinado.

f. Mutantes de A. brasilense con fenotipo: Fut⁻ Gut⁺.

g. Mutantes de A. brasilense con fenotipo: Fut⁺ Gut⁻.

1. Mutantes Fut^-Gut^- , las cuales debido a una sola mutación puntual ya no fueran capaces de crecer en gluconato y fructosa. Dentro de ellas deberíamos encontrar mutantes defectivas en la glucono- (fructo-) cinasa (ver sección anterior). Mutantes que presentaran el mismo fenotipo Fut^-Gut^- podrían tener el locus de mutación en un sitio no involucrado con el que codifica para la glucono- (fructo-) cinasa, como pudiera ser la adenilato ciclasa (cya^-) o la proteína receptora de cAMP (CRP^-) y que causarían que el sistema de transporte de carbohidratos fuese deficiente (47).

2. Mutantes Gut^- o sea, que no asimilaban gluconato pero que utilizaran fructosa normalmente.

3. Mutantes Fut^- o sea, que no metabolizaran fructosa, pero que el gluconato sí pudiera funcionar como sustrato único de carbono. Estas mutantes deberían tener una vía Entner-Doudoroff normal al crecerlas en gluconato según nuestros datos de la Tabla 4.

Todas las mutantes Fut^-Gut^- fueron aisladas por su incapacidad de utilizar fructosa y contraseleccionadas por su falta de asimilación de gluconato. Posteriormente fueron probadas para actividad de gluconocinasa. Ante la imposibilidad de crecer dichas mutantes en gluconato o fructosa, en donde puede demostrarse la inducibilidad de la gluconocinasa, las células fueron incubadas en succinato para realizar las determinaciones enzimáticas.

Solo la mutante MX2041 (Fut^-Gut^-) no posee ni siquiera

niveles basales de esta enzima al crecerla en succinato (Tabla 7). Lo mismo fue observado cuando al llegar el cultivo a 80 U. Klett éste fue transferido a un medio con gluconato como única fuente de carbono, donde se incubaron las células hasta que la cepa silvestre (que recibió el mismo tratamiento) alcanzó las 200 U. Klett. Este experimento fue realizado para permitir la entrada de gluconato a la cepa MX2041, condición en que se induce la gluconocinasa en otros organismos (36). Queda por determinar si efectivamente el gluconato marcado con ^{14}C penetra al espacio intracelular de dicha mutante (ver Discusión y Conclusiones).

Mutantes cuyo fenotipo es de no-utilización de fructosa (Fut^-) o de gluconato (Gut^-) también fueron sometidos a estudio de la actividad de la gluconocinasa. La Tabla 6 nos muestra estos resultados en los que apreciamos niveles comparables a los de la cepa silvestre. La actividad combinada de las enzimas de la vía Entner-Doudoroff en las mutantes Fut^- crecidas en gluconato es igual al observado para la Sp7. Las actividades de las mutantes Gut^- crecidas en fructosa presentan actividades también comparables a los de la cepa silvestre.

A pesar de no conocer los loci exactos de mutación de las cepas Fut^- y de las Gut^- , podemos decir que la información genética que codifica para la glucono- (fructo-) cinasa no parece estar alterada.

Tabla 7. Actividades comparativas de gluconocinasa (GK) y de las enzimas de la vía Entner-Doudoroff (ED) en *A. brasilense* Sp7 y en la mutante MX2041 (Fut⁻Gut⁻).

CEPA	SUSTRATO	GK ^a	ED ^b
Sp7	succinato	2	5
MX2041	succinato	0	0
Sp7	succinato → gluconato ^c	3	90
MX2041	succinato → gluconato ^d	0	0

a. Expresada en nanomolas de NADPH por minuto por miligramo de proteína.

b. Expresada en nanomolas de piruvato por minuto por miligramo de proteína.

c. Las células fueron crecidas en succinato hasta alcanzar 80 unidades Klett. Se lavaron con solución de fosfatos 20mM pH 6.8 y se incubaron en un medio con gluconato hasta llegar a 200 unidades Klett de densidad óptica.

d. Las células fueron tratadas de igual manera que en el inciso anterior. Los extractos celulares se hicieron cuando la cepa silvestre alcanzó las 200 unidades Klett en el medio con gluconato.

DISCUSION Y CONCLUSIONES.-

En el presente estudio hemos demostrado que una vía Entner-Doudoroff funcional es específicamente inducida en Azospirillum brasilense Sp7 solo durante su crecimiento en gluconato. La actividad de 6-fosfogluconato deshidrogenasa, encontrada bajo la misma condición de crecimiento, parecería reflejar una vía de las pentosas fosfato operativa en la asimilación de gluconato e indirectamente, una secuencia glicolítica activa a través de la fructosa 6-fosfato formada durante la vía antes mencionada. Sin embargo, el hecho de no haber encontrado mutantes cuya utilización de gluconato fuese menor a la de la cepa silvestre parece indicar que la vía de las pentosas fosfato por sí sola, no le permite a A. brasilense crecer adecuadamente en gluconato, pero le proporciona precursores para reacciones biosintéticas.

Evidencias a favor de que nuestras mutantes Gut⁻ poseen alteraciones en la información genética para la vía Entner-Doudoroff, son:

- a) no-utilización de gluconato (la cepa silvestre tiene la vía Entner-Doudoroff altamente inducida en dicho medio);
- b) utilización de fructosa comparable a la de la cepa silvestre (fructosa no es metabolizada a través de la vía Entner-Doudoroff en esta bacteria; ver párrafo anterior);
- c) niveles normales de gluconocinasa al crecerlas en fructosa;
- d) no se detecta ninguna actividad de la vía Entner - Doudoroff al crecerlas en succinato (donde la Sp7 tiene ni-

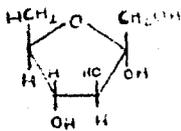
veles basales bajos de esta actividad).

El no haber encontrado actividad de 6-fosfogluconato deshidrogenasa NADP-dependiente con ninguno de los compuestos probados, a pesar de haber empleado un rango de pH muy amplio en las mezclas de ensayo (pH 7.3 - 8.8), representa un caso singular en la literatura y sugiere, además, una vía de las pentosas fosfato débilmente operativa solo con NAD como cofactor. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que la 6-fosfogluconato deshidrogenasa funcione con algún cofactor distinto a NAD o NADP.

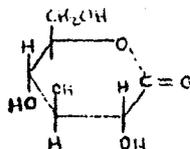
Fructosa pareciera entonces estar siendo metabolizada a través de la glicólisis, al haber descartado las vías de pentosas fosfato y de Entner-Doudoroff como rutas para su asimilación. Esta suposición va en contra de lo publicado por Okon et al. (17), pues reportan secuencias glicolítica y de pentosas fosfato poco operativas o inexistentes en Azospirillum. Sin embargo, sus resultados no son totalmente válidos pues, a pesar de que los extractos celulares utilizados no presentaron incremento alguno en la captura de oxígeno al usar varios azúcares y azúcar-fosfatos como sustratos, las células fueron siempre crecidas en malato como única fuente de carbono, por lo que no necesariamente debe uno esperar inducción de las enzimas involucradas en el transporte y/o el catabolismo de todos los carbohidratos probados.

La inducción del crecimiento en gluconato llevada a cabo por la fructosa (Figura 5B), aparentemente involucra al-

gún paso metabólico previo a la formación de 6-fosfogluconato y que ambos azúcares parecen compartir. La mutante de A. brasilense MX2041, que carece de actividad detectable de gluconocinasa (Tabla 7), sugiere que la misma enzima es responsable de la fosforilación de ambas hexosas, a pesar de tener conformaciones distintas:



α -D-fructofuranosa



D-6-gluconolactona

Una cinasa de este tipo ha sido reportada por Sapico y Anderson para Leuconostoc mesenteroides y que es capaz de fosforilar fructosa y manosa con la misma eficiencia, a pesar de poseer conformaciones diferentes (48). Será necesario purificar la enzima responsable de la fosforilación de gluconato y fructosa en Azospirillum brasilense para comprobar si se trata realmente de una sola glucono- (fructo-) cinasa la encargada de dichas actividades.

Una explicación alternativa para la falta de utilización de fructosa y gluconato en la mutante MX2041 podría residir a nivel de su sistema de transporte, que pudiera involucrar también la fosforilación de dichos compuestos. En una amplia gama de organismos procariotes (47), fructosa, glucosa y otras hexosas son transportadas hacia el interior de la célula por medio del Sistema de Fosfotransferasa fosfoenol-

piruvato-dependiente (PTS) (Tabla 8). Dos proteínas solubles, la Enzima I y la proteína HPr inician la transferencia del fosfato a partir del fosfoenolpiruvato y son generales para el transporte de todos los sustratos del sistema PTS de un organismo. Las Enzimas II y III, asociadas a la membrana citoplasmática, están encargadas de la fosforilación del azúcar del cual son específicos (Figura 6). Sin embargo, aunque se han reportado casos en los que la especificidad por el sustrato no es tan estricta, una misma Enzima II solo puede catalizar el transporte y la transfosforilación de azúcares de la misma conformación (ej. manosa y glucosa), por lo que fructosa y gluconato parecen no pertenecer al mismo sistema PTS. La mutación de la MX2041 sí podría estar afectando a la Enzima I o a la HPr, lo que resultaría en la no utilización de todos los sustratos PTS de este organismo (en caso de que los hubiera).

Otra forma de explicar la mutación que confiere a la cepa MX2041 el fenotipo $\text{Fut}^- \text{Gut}^-$ podría involucrar un sistema de transporte independiente de fosforilación. La falta de actividad de gluconocinasa de la MX2041 fue un resultado repetitivo, lo cual parece refutar esta posibilidad. Será necesario medir la entrada de compuestos radiactivos en ésta y otras mutantes para verificar este aspecto.

En Escherichia coli, que comparte un patrón similar de asimilación de azúcares por la vía Entner-Doudoroff con el de A. brasilense, el gluconato parece ser el inductor principal de la secuencia (39). Debe hacerse notar que, con el estudio de mutantes, Kornberg y Soutar sugieren que, bajo

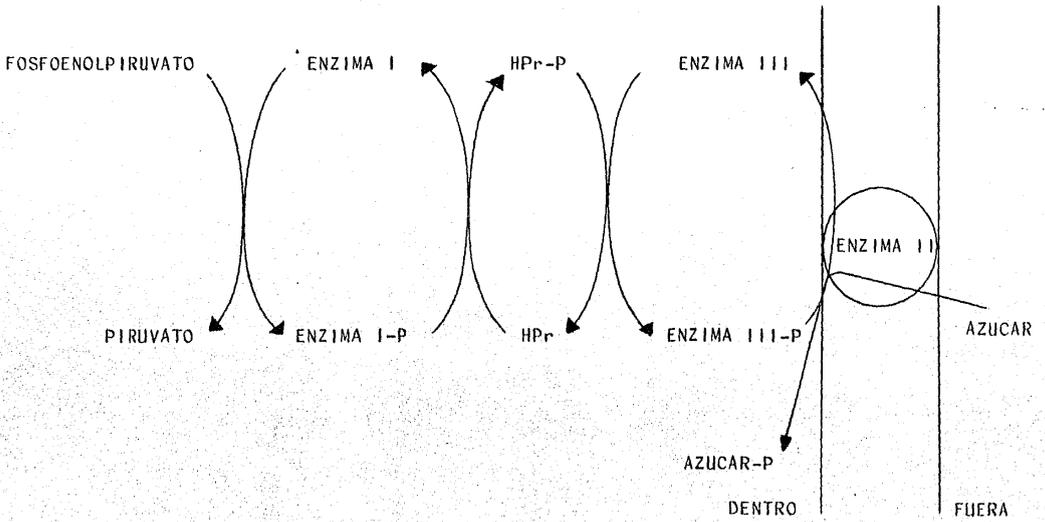
Tabla 8. Distribución del Sistema de Fosfotransferasa (PTS) para el transporte de carbohidratos en organismos procariotes.

GENERO	tinción gram	PTS ^a	sustrato PTS
<u>Azotobacter</u>	-	-	-
<u>Bacillus</u>	+	+	general
<u>Beneckea</u>	-	+	general
<u>Clostridium</u>	+	+	fructosa, manitol
<u>Escherichia</u>	-	+	general
<u>Klebsiella</u>	-	+	general
<u>Lactobacillus</u>	+	+	general
<u>Leucónostoc</u>	+	-	-
<u>Pseudomonas</u>	-	+	fructosa
<u>Rhodopseudomonas</u>	-	+	fructosa
<u>Rhodospirillum</u>	-	+	fructosa
<u>Salmonella</u>	-	+	general
<u>Serratia</u>	-	+	general
<u>Staphylococcus</u>	+	+	general
<u>Streptococcus</u>	+	+	general

a. (+)posesión del Sistema de Fosfotransferasa,

(-)ausencia del Sistema de Fosfotransferasa.

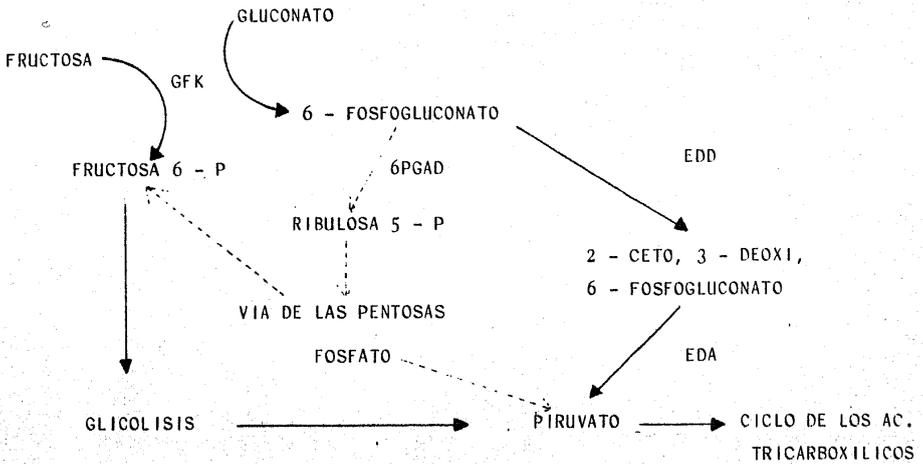
Figura 6. Diagrama representativo del Sistema de Fosfotransferasa fosfoenolpiruvato - dependiente para el transporte y la fosforilación de carbohidratos en algunas bacterias.



ciertas condiciones, el 6-fosfogluconato (6PGA) puede funcionar como el inductor de la vía Entner-Doudoroff en esa bacteria (39). Por otra parte, Allenza y Lessie encontraron que el 6PGA parece ser el inductor de la vía en Pseudomonas (40). De nuestros resultados, puede verse que la cepa silvestre de A. brasilense es capaz de una producción muy limitada de inductor en medios de cultivo distintos a gluconato. También, el hecho de que A. brasilense posea una vía de las pentosas fosfato débilmente operativa, es consistente con la idea de que casi nada de 6-fosfogluconato es producido durante la asimilación de compuestos distintos a gluconato. Estos datos, aunados a los obtenidos con la mutante MX2041, donde tampoco se detectó actividad combinada de la vía Entner-Doudoroff (Tabla 7), sugieren que el 6PGA es el inductor fisiológico en Azospirillum brasilense. Estudios con gluconato radiactivo en la mutante MX2041 nos aclararán este aspecto, si comprobamos que es capaz de ser transportado hacia el interior de la célula.

La Figura 7 presenta el esquema metabólico propuesto para la asimilación de fructosa y gluconato en Azospirillum brasilense. Podemos apreciar la existencia de una glucono-(fructo-) cinasa responsable de la fosforilación de ambos compuestos. Una vez catalizadas las reacciones anteriores, los compuestos fosforilados siguen vías catabólicas independientes. La fructosa 6-fosfato va a ser metabolizada por la secuencia glicolítica. El 6-fosfogluconato por su parte, posee dos vías de mayor y menor importancia para su asimilación. La vía Entner-Doudoroff es la encargada de metabolizar la mayor parte de este compuesto, mientras que la vía de

Figura 7. Esquema metabólico propuesto para la asimilación de fructosa y gluconato en *Azospirillum brasilense*.



GFK = glucono- (fructo-) cinasa
 6PGAD = 6-fosfogluconato deshidrogenasa

EDD = 6-fosfogluconato deshidratasa
 EDA = 2-ceto, 3-deoxi, 6-fosfogluconato aldolasa

las pentosas fosfato parece intervenir muy poco en su catabolismo (líneas punteadas). Todas estas rutas metabólicas producen piruvato, que ha de ser decarboxilado antes de que pueda reaccionar con el oxaloacetato para entrar al ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

Al término del presente trabajo, tuvimos noticia de un estudio realizado por E.M. Goebel et al. del Instituto Tecnológico de Virginia, E.E.U.U. con el que se comprueban y complementan algunos de nuestros resultados (49):

a) funcionalidad de la vía glicolítica para la asimilación de fructosa en A. brasilense Sp7;

b) inexistencia de la vía de las pentosas fosfato en fructosa y succinato (determinada por ausencia de actividad de 6-fosfogluconato deshidrogenasa NADP-dependiente);

c) no detectan actividad de las enzimas de la vía Entner-Doudoroff en fructosa ni en succinato (no lo determinan en gluconato como sustrato);

d) extractos libres de células crecidas en fructosa formaron fructosa 1-fosfato al suplementar el medio con fosfoenolpiruvato (PEP) indicando la existencia del Sistema de Fosfotransferasa PEP-dependiente para el transporte y la fosforilación de fructosa en A. brasilense.

La capacidad que tiene Azospirillum brasilense de metabolizar gluconato y fructosa pudiera ofrecerle algunas ventajas. Las paredes celulares de las plantas mono- y dicotiledoneas son ricas en carbohidratos de cinco y seis carbonos (50). Es posible que la muerte de células radiculares y el desprendimiento de células provean a estas bacterias que se

asocian a la raíz y que sin capaces de metabolizar estos azúcares, de sustrato abundante para su proliferación.

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- Vincent, J.M. 1974. Root-nodule symbiosis with Rhizobium. In: The Biology of Nitrogen Fixation. A. Quispel ed. North Holland Publishing Co. p. 265-341.
- 2.- Torrey, J.G. 1978. Nitrogen Fixation by a tinomycete-nodulated angiosperms. BioScience 28: 586-592.
- 3.- Peters, G.A. 1978. Blue-green algae and algae associations. BioScience 28: 580-585.
- 4.- Hageman, R.V. and R.H. Burris. 1978. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 2699-2702.
- 5.- Brill, W.J. 1980. Biochemical genetics of nitrogen fixation. Microbiol. Rev. 44: 449-467.
- 6.- Hardy, R.W.F. and V.D. Havelka. 1975. Nitrogen fixation research: a key to world food? Science 181: 633-643.
- 7.- Phillips, D.A. and M.J. Johnson. 1961. Aeration of fermentations. J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. 111: 277-309.
- 8.- Fleming, H. and R. Haselkorn. 1973. Differentiation in Nostoc muscorum: nitrogenase is synthesized in heterocysts. Proc. Natl. Acad. Sci. 70: 2722-2731.
- 9.- Robson, R.L. 1979. Characterization of an oxygen-stable nitrogenase complex isolated from Azotobacter chroococcum. Biochem J. 181: 569-575.
- 10.- Virtanen, A.I. 1945. Symbiotic nitrogen fixation. Nature 155: 747-748.

- 11.- Whittenberg, J.B., F.J. Bergersen, C.A. Appleby, and G.C. Turner. 1974. Facilitated oxygen diffusion. The role of leghemoglobin in nitrogen fixation in bacteroids isolated from soybean root nodules. J. Biol. Chem. 249: 4057-4066.
- 12.- Sidloi-Lumbroso, R., L. Kleiman, and H.M. Schulman. 1978. Biochemical evidence that leghemoglobin genes are present in the soybean but not Rhizobium genome. Nature 273:558.
- 13.- Hardy, R.W.F. and V.D. Havelka. 1976. Photosynthate as a major limiting factor in nitrogen fixation by field-grown legumes with emphasis in soybeans. In: Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. P.S. Nutman ed. England. p. 421-443.
- 14.- Black, C.C., R.H. Brown, and R.C. Moore. 1978. Plant photosynthesis. Basic Life Sci. 10: 95-110.
- 15.- Dobereiner, J., J.M. Day, and P.J. Dart. 1972. Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the Paspalum notatum-Azotobacter paspali association. J. Gen. Microbiol. 71: 103-116.
- 16.- Chollet, R. and W.C. Ogren. 1975. Regulation of photorespiration in C-3 and C-4 species. Bot. Rev. 41:147-149.
- 17.- Okon, Y., S.L. Albrecht, and R.H. Burris. 1976. Carbon and ammonia metabolism of Spirillum lipoferum. J. Bacteriol. 128: 592-597.
- 18.- Day, J.M. and J. Dobereiner. 1976. Physiological aspects of N_2 -fixation by a Spirillum from Digitaria roots. Soil Biol. Biochem. 8: 45-50.
- 19.- Neyra, C.A. and J. Dobereiner. 1977. Nitrogen fixation in grasses. Adv. Agron. 29: 1-35.
- 20.- P. van Berkum and B.B. Boinloul. 1980. Evaluation of

- nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses. *Microbiol. Rev.* 44: 491-517.
- 21.- Barea, J.M. and M.E. Brown. 1974. Effect of plant growth produced by Azotobacter paspali related to synthesis of plant growth regulating substances. *J. Appl. Bacteriol.* 37: 585-593.
- 22.- Tien, T.M., M.H.Gaskins, and D.H.Hubbell. 1979. Plant growth substances produced by Azospirillum brasilense and their effect on the growth of pearl millet (Pennisetum americanum L.). *Appl. Envir. Microbiol.* 37:1016.
- 23.- Food and Agricultural Organization of the United Nations. 1977. Annual fertilizer review for 1977. Rome.
- 24.- Day, J.M., M.C.P. Neves, and J.Dobereiner. 1975. Nitrogenase activity on roots of tropical grasses. *Soil Biol. Biochem.* 7: 107-112.
- 25.- von Bulow, J.W.F. and J.Dobereiner. 1975. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72: 2389-2393.
- 26.- De-Polli, H., E.Matsui, J.Dobereiner, and E.Salati. 1977. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by $^{15}\text{N}_2$ incorporation. *Soil Biol. Biochem.* 9:119-123.
- 27.- Okon, Y., S.L.Albrecht, and R.H.Burris. 1976. Factors affecting growth and nitrogen fixation of Spirillum lipoferum. *J.Bacteriol.* 127: 1248-1254.
- 28.- Tarrand, J.J., N.R.Krieg, and J.Dobereiner. 1978. A taxonomic study of the Spirillum lipoferum group, with description of a new genus, Azospirillum gen. nov. and two species, Azospirillum lipoferum (beijerinck) comb.

- nov. and Azospirillum brasilense sp. nov. Can. J. Microbiol. 24: 967-980.
- 29.- Baldani, V.L.D. and J. Dobereiner. 1980. Host plant specificity in the infection of cereals with Azospirillum spp. Soil Biol. Biochem. 12: 434-444.
- 30.- Okon, Y., S.L. Albrecht, and R.H. Burris. 1977. Methods for growing Spirillum lipoferum and for counting it in pure culture and in association with plants. APPL. Envir. Microbiol. 33: 85-88.
- 31.- Albrecht, S.L. and Y. Okon. 1980. Cultures of Azospirillum. Methods of enzymology. 69: 740-749.
- 32.- Covarrubias, A.A., R.S. Pescador, A. Osorio, F. Bolivar and F. Bastarrachea. 1980. ColE1 hybrid plasmids containing Escherichia coli genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. Plasmid 3: 150-164.
- 33.- Oginsky, E.L. and W.W. Umbreit. 1959. In: An introduction to Bacterial Physiology. 2nd. ed. Freeman & Co. U.S.A.
- 34.- Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- 35.- Lessie, T.G. and H.R. Whiteley. 1969. Properties of threonine deaminase from a bacterium able to utilize threonine as sole source of carbon. J. Bacteriol. 100: 1107-1117.
- 36.- Eisenberg, R.C. and Dobrogosz W.J. 1967. Gluconate metabolism in Escherichia coli. J. Bacteriol. 93: 941-949.
- 37.- Novick, N.J. and M.E. Tyler. 1982. L-Arabinose metabolism in Azospirillum brasilense. J. Bacteriol. 149: 364-367.
- 38.- Tabor, C.W. and H. Tabor. 1976. 1-4 Diaminobutane (Putrescine), spermidine and spermine. Ann. Rev. Biochem.

145: 285-306.

- 39.- Kornberg, H.L. and A.K. Soutar. 1973. Utilization of gluconate by Escherichia coli. Biochem J. 134:489-498.
- 40.- Allenza, P. and T.G. Lessie. 1982. Pseudomonas cepacia mutants blocked in the Entner-Doudoroff pathway. J. Bacteriol. 150: 1340-1347.
- 41.- Allenza, P., Y.N. Lee, and T.G. Lessie. 1982. Enzymes related to fructosa utilization in Pseudomonas cepacia. J. Bacteriol. 150: 1348-1356.
- 42.- Ronson, C.W. and S.B. Primrose. 1979. Carbohydrate metabolism in Rhizobium trifolii: identification and symbiotic properties of mutants. J. Gen. Microbiol. 112:77-88.
- 43.- Gardiol, A., A. Arias, C. Cerveñansky, C. Gaggero, and G. Martínez-Drets. 1980. J. Bacteriol. 144: 12-16.
- 44.- Lessie, T.G. and J.C. Vander Wyk. 1972. Multiple forms of Pseudomonas multivorans glucose 6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases: differences in size, pyridine nucleotide specificity and susceptibility to inhibition by adenosine 5'-triphosphate. J. Bacteriol. 110: 1107-1117.
- 45.- Brown, A.T. and C.L. Wittenberger. 1972. Induction and regulation of a nicotinamide adenine dinucleotide-specific 6-phosphogluconate dehydrogenase in Streptococcus faecalis. J. Bacteriol. 109: 106-115.
- 46.- Sanwal, B.D. 1970. Regulatory mechanisms involving nicotinamide adenine nucleotides as allosteric effectors. III. Control of glucose 6-phosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem. 245: 1626-1631.

- 47.- Dills, S.S., A.Apperson, M.R.Schmidt, and M.H.saier, Jr. 1980. Carbohydrate transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* 44: 385-418.
- 48.- Sapico, V. and R.L.Anderson. 1967. An adenosine 5'-triphosphate: hexose 6-phosphotransferase specific for D-mannose and D-fructose from Leuconostoc mesenteroides. *J. Biol. Chem.* 242: 5086-5092.
- 49.- Goebel, E.M. 1980. Carbohydrate catabolism in Azospirillum brasilense and Azospirillum lipoferum. Thesis: Doctor in Philosophy in Microbiology. Virginia Politechnic Institute and State University, U.S.A.
- 50.- Albersheim, P. 1975. The walls of growing plant cells. *Sci. Am.* 232: 80-93.