



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE  
REVERTANTES DE LA MUTANTE LM16 DE  
Rhizobium etli. ALTERADA EN LA ACTIVIDAD  
DE GLUTAMINASA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

Q U I M I C O

P R E S E N T A :

LUIS TONATIHUT SANCHEZ LINARES



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

## **JURADO ASIGNADO**

**Presidente:** Prof. Guadalupe Velez Pratt.  
**Vocal:** Prof. Beatriz Luna Millan.  
**Secretario:** Prof. Jorge Fernando Calderón Jiménez.  
**1er. Suplente:** Prof. Homero Hernández Montes.  
**2do. Suplente:** Prof. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

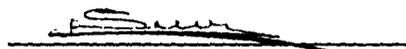
**Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM**

**Departamento de Biotecnología.**

**Asesor del tema:**

  
Dr. Jorge Fernando Calderón Jiménez.

**Asesor Técnico del tema:**

  
M. en I.B.B. Socorro C. Durán Vargas.

**Sustentante:**

  
Luis Tonatihu Sánchez Linares.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Facultad de Química**

**por la formación académica que recibí en sus aulas.**

**A Fundación UNAM**

**por el apoyo recibido durante el desarrollo de este trabajo.**

**A el Jurado Revisor**

**por las observaciones realizadas a el trabajo.**

**Al Dr. Jorge Calderón**

**por su dirección y asesoría, y**

**por darme la oportunidad de experimentar en su laboratorio.**

**A la Dra. Socorro Duran**

**por su guía en el trabajo de laboratorio**

Con un gran afecto a mis compañeros de generación, Marisa y Gloria por compartir los primeros momentos en esta facultad, Norman por soportar tantas locuras, Marcela por su sinceridad y afecto, Jorge por su comprensión y apoyo, Claudia por su cariño y paciencia, Eneida y Beatriz R. por su compañerismo, Eduardo por su estima. En especial a Natalia por saber escuchar y compartir tantos pequeños y grandes momentos, y a Betty V. por su afecto incondicional.

A todos gracias por el tiempo tan especial en que estuvimos juntos.

A Socorro, Alejandra, Gisela, Amaranta, Alejandro y Jorge C., por hacer del trabajo de laboratorio una experiencia muy agradable.

**Dedico este trabajo:**

**A mi abuela**

**por todos sus cuidados  
y por su invaluable cariño.**

**A mi madre**

**por ser el mejor ejemplo  
de superación y esfuerzo**

*A. . . . . (♥?)*

*"En medio de toda esta riqueza esplendorosa está el Hombre, formando parte de ella, aprovechándola para satisfacer sus necesidades, admirándola en los escasos momentos que le dejan libres sus diarias tareas, y amándola cuando posee la Inspiración Divina para dejar hablar a su corazón. Pero aunque la use, la admire y la ame, hay algo más que el Hombre debe hacer con la Naturaleza: comprenderla."*

*El viejo Alquimista.*

## INDICE

RESUMEN. . . . .	1
INTRODUCCIÓN. . . . .	3
1. Ciclo del Nitrógeno. . . . .	
2. Fijación de Nitrógeno . . . . .	5
2.1. Fijación Biológica de Nitrógeno. . . . .	
3. Fijación de Nitrógeno en Simbiosis con Leguminosas . . . . .	8
3.1. Nodulación. . . . .	
3.2. Fijación. . . . .	
4. Bioquímica de la Simbiosis <i>Rhizobium</i> -Leguminosa . . . . .	13
4.1. La Nitrogenasa. . . . .	
4.2. Producción y evolución de Hidrógeno. . . . .	
4.3. Sensibilidad a Oxígeno. . . . .	
4.4. Intercambio Metabólico. . . . .	
5. Asimilación de Amonio. . . . .	21
6. Crecimiento con Aminoácidos. . . . .	24
6.1. Asimilación y Degradación de Glutamina. . . . .	
OBJETIVO E HIPOTESIS . . . . .	32
MATERIALES Y METODOS. . . . .	33
1. Cepas. . . . .	33
2. Medios de Cultivo. . . . .	33
3. Condiciones de Crecimiento. . . . .	35
4. Cinética de Crecimiento. . . . .	35
5. Determinación de Proteína. . . . .	36
6. Obtención de Extractos Celulares. . . . .	38

7. Actividad de la Glutaminasa. . . . .	38
8. Obtención de Revertantes. . . . .	39
9. Termoestabilidad de la Glutaminasa. . . . .	42
10. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.. . . .	42
11. Actividad de la Glutaminasa en Gel de Poliacrilamida.. . . .	44
12. Purificación de la Glutaminasa. . . . .	45
RESULTADOS. . . . .	47
ANALISIS DE RESULTADOS. . . . .	67
CONCLUSIONES. . . . .	73
BIBLIOGRAFIA. . . . .	74

## RESUMEN

La glutamina, el producto final de la asimilación de amonio, es un compuesto clave en el metabolismo nitrogenado, ya que sirve como donador de nitrógeno en una gran variedad de vías biosintéticas y además funciona como el correpresor del catabolismo nitrogenado. La concentración de éste aminoácido determina la utilización del nitrógeno del medio, la velocidad de síntesis y de degradación del nitrógeno celular.

Se ha demostrado que la glutamina para que sea óptimamente asimilada como fuente de nitrógeno debe convertirse a glutamato, el otro donador de nitrógeno.

En *Rhizobium etli*, la cual es una bacteria fijadora de nitrógeno en simbiosis con *Phaseolus vulgaris*, se ha encontrado que la glutamina es degradada por las enzimas de la vía de la transaminasa- $\omega$ -amidasa, así como por la glutaminasa. La glutamato sintasa también participa en la asimilación de glutamina. Además se ha encontrado que el amonio liberado de la degradación de glutamina, por la glutaminasa, puede ser tomado por la glutamino sintetasa, completando de ésta forma un ciclo de degradación y síntesis.

La actividad de glutaminasa en *Rhizobium etli* está regulada positivamente por su sustrato, y negativamente por amonio y la fuente de carbono. Se ha sugerido que la glutaminasa en *Rhizobium etli* tiene un papel catabólico en la degradación de glutamina, permitiendo a la bacteria crecer en un medio de glutamina como fuente de carbono y nitrógeno; y así mismo se le ha asignado la función de mantener un balance entre la glutamina y el glutamato mediante su operación en el ciclo glutaminasa/glutamino sintetasa, con el consecuente gasto de ATP.

En éste proyecto se pretende conocer si existe alguna vía metabólica que pueda compensar la falta de glutaminasa en la mutante LM16 de *Rhizobium etli*. Para lo cual se han obtenido revertantes de ésta mutante, la cual es fue obtenida por mutagénesis con Tn5-mob, seleccionada por su incapacidad para crecer en un medio mínimo de

glutamina como fuente de carbono y nitrógeno, y tiene una baja actividad de glutaminasa.

Las revertantes fueron obtenidas por mutagénesis con nitrosoguanidina, para lo cual se establecieron las condiciones de mutagénesis y se compararon las frecuencias de mutación espontánea e inducida. Puesto que todas ellas presentaron actividad de glutaminasa y su crecimiento es intermedio entre la cepa silvestre y la mutante LM16; se pensó en la posibilidad de que éstas revertantes expresen alguna isoenzima de glutaminasa, diferente a la presente en la cepa silvestre.

Para diferenciar entre dos posibles isoenzimas, se probó la termoestabilidad de la actividad de glutaminasa en extractos crudos de la cepa silvestre y de la mutante. Se encontró que en la primera es termolábil, conservando un 10% de su actividad inicial después de 15 minutos de calentamiento a 50°C; y en la segunda es termoestable, conservando aproximadamente el 70% de la actividad en las mismas condiciones.

En la detección *in situ* de la actividad de glutaminasa en gel de poliacrilamida utilizando extractos crudos de la cepa silvestre, se ha observado una sola banda de actividad. Con los extractos purificados de glutaminasa de la cepa LM16 ha sido posible observar una segunda banda inferior a la que aparece en los extractos de la cepa silvestre. Así mismo, la cepa silvestre mostró una segunda banda semejante a la de la mutante LM16, muy tenue, cuando se purificó un extracto obtenido de un crecimiento de medio mínimo suplementado con amonio más succínico. Estos resultados sugieren la existencia de dos isoenzimas de glutaminasa en *Rhizobium etli*, que se diferencian por su termoestabilidad y movilidad electroforética. En el caso de una de las revertantes, los extractos purificados de la misma mostraron una banda semejante a la de la mutante LM16, e igualmente estos extractos son termoestables en la actividad de glutaminasa, lo que sugiere que ésta revertante tiene una mutación en la glutaminasa de la cepa parental que aumenta la actividad de glutaminasa y le permite ahora crecer en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno.

## INTRODUCCION

El nitrógeno representa, junto con el carbono, hidrógeno y oxígeno, uno de los elementos más importantes para el sustento de la vida; ya que forma parte esencial de las biomoléculas. Sin embargo, dada la poca disponibilidad del elemento en la naturaleza, se constituye en una limitante para el crecimiento de los organismos vivos.

La forma natural del nitrógeno es un gas diatómico ( $N_2$ ) que se encuentra formando parte de la atmósfera en un 80%. La gran estabilidad del triple enlace en la molécula de  $N_2$  lo hace poco disponible biológicamente. El nitrógeno puede entrar a los sistemas biológicos sólo cuando se ha fijado, ó está combinado con otros elementos como el H y el O.

Dada la importancia del elemento para la vida, éste debe ser reciclado. Este flujo de nitrógeno a través de la biosfera, se denomina ciclo del nitrógeno.

### 1. CICLO DEL NITROGENO.

El ciclo del nitrógeno representa la transformación del nitrógeno inorgánico a nitrógeno orgánico, junto el proceso de degradación inverso<sup>(1)</sup>. Este ciclo puede dividirse en cinco etapas principales (figura 1):

- (1) Reducción del nitrógeno atmosférico a amoníaco por determinadas bacterias. Este proceso catalizado por el complejo enzimático nitrogenasa, se denomina fijación de nitrógeno.
- (2) El amoníaco puede ser empleado directamente por la mayoría de los organismos. Sin embargo, la mayor parte del amoníaco del suelo se oxida a nitrito y, posteriormente a nitrato. Las bacterias nitrificantes obtienen su energía a partir de estas reacciones de oxidación, empleando el amoníaco como donador de electrones. Las bacterias del género *Nitrosomona* oxidan el amoníaco a nitrito, mientras que las que pertenecen al género *Nitrobacter* convierte el nitrito a nitrato.

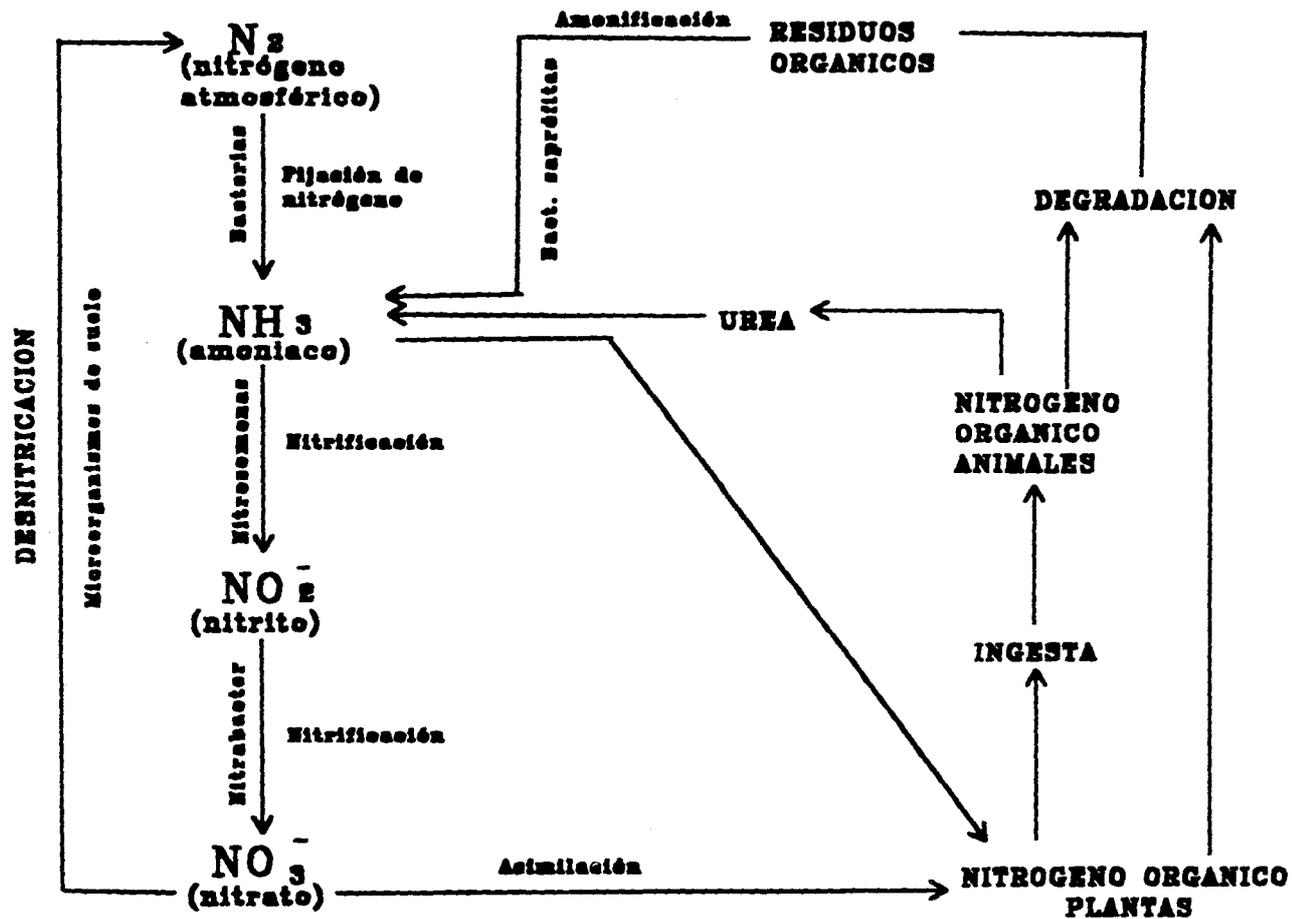


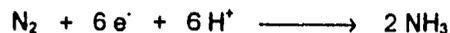
Figura No.1  
Ciclo del Nitrógeno

- (3) Existen numerosos microorganismos del suelo que reducen los nitratos a nitrógeno molecular en condiciones anaeróbicas. Estas reacciones de reducción se conocen como desnitrificación.
- (4) Las plantas absorben el nitrato y lo reducen a amoníaco, el cual se emplea en la síntesis de aminoácidos y de otros compuestos orgánicos que contienen nitrógeno. Las plantas tienen la capacidad de sintetizar todos los aminoácidos que van a requerir para sus procesos celulares. Los animales, sin embargo, deben alimentarse de plantas (o de otros animales) a fin de obtener los aminoácidos esenciales.
- (5) La descomposición de las plantas y de los animales muertos genera residuos orgánicos que son transformados en amoníaco por las bacterias saprófitas (bacterias que descomponen materia orgánica no viviente). Este proceso de conversión es conocido por amonificación. Las bacterias saprófitas emplean el amoníaco en sus propios procesos biosintéticos, aunque liberan el exceso al entorno; de éste modo proveen sustrato para la nitrificación. La urea secretada por los animales también se emplea en la nitrificación.

El ciclo del nitrógeno es de vital importancia para la agricultura en la provisión de nitratos solubles. A menos que los nitratos sean agregados al suelo como fertilizantes, el paso importante es el de la fijación de nitrógeno.<sup>(70)</sup>

## 2. FIJACION DE NITROGENO.

La fijación de nitrógeno ( la reducción del nitrógeno molecular a amonio)



se compara a la fotosíntesis como uno de los procesos fundamentales para toda la vida en la Tierra. El producto resultante, amonio, puede ser usado para la biosíntesis de ácidos nucleicos, aminoácidos y otros compuestos nitrogenados esenciales para la vida.<sup>(75)</sup>

El desarrollo en los métodos de la agricultura ha provocado un aumento en el uso y dependencia en los fertilizantes nitrógenados. El agotamiento de los

combustibles fósiles y el aumento en los costos de producción de los fertilizantes, puede conducir a una crisis alimenticia en el mundo.<sup>(75)</sup>

El nitrógeno molecular puede ser reducido por varios procesos industriales, entre los cuales el proceso Haber-Bosch es el más importante. Este proceso se basa en la reacción entre el hidrógeno y el nitrógeno atmosférico. El hidrógeno necesario para éste proceso es producido a partir de gas natural; y para completar la reacción eficientemente se requiere de elevadas temperaturas y altas presiones, lo que representa una gran demanda de energía.<sup>(126)</sup>

La fijación industrial del nitrógeno mediante la aplicación de fertilizantes químicos a la agricultura, ha sido un punto de atención en los años recientes; ya que esto representa una interferencia relativamente grande con el ciclo natural del nitrógeno.

La adición de nitrógeno fertilizante al depósito de nitrógeno inorgánico soluble ha tenido como consecuencia el cambio de las condiciones de equilibrio de este depósito. Los procesos de eliminación, como por ejemplo la desnitrificación, no parecen que vayan al mismo ritmo, y la excesiva pérdida de nitrógeno hacia los ríos y lagos puede causar un florecimiento excesivo de algas, cuya intensa actividad agota los demás nutrientes importantes, como por ejemplo el fósforo del agua. Luego sigue la muerte de las poblaciones de algas, y la descomposición por metabolismo aerobio agota el oxígeno del agua; de manera que se destruyen los peces y otros organismos que dependen del oxígeno. Esta condición es conocida como eutroficación.<sup>(107)</sup>

Debido a los inconvenientes que presenta el uso de los fertilizantes y a que la fuente de nitrógeno más abundante se encuentra en la atmósfera, se ha pensado en la fijación biológica del nitrógeno como una alternativa para fertilizar los suelos con un menor costo y con menores problemas de contaminación.<sup>(86)</sup> Por lo cual se realizan esfuerzos para investigar el mecanismo de la fijación biológica del nitrógeno, con la meta de poder establecer nuevos métodos comerciales viables en la fertilización de suelos y también para aumentar el conocimiento de los procesos químicos y bioquímicos fundamentales en el proceso involucrado.

## 2.1. Fijación Biológica de Nitrógeno.

En la fijación biológica de nitrógeno están implicados varios microorganismos que son capaces de aprovechar el nitrógeno molecular de la atmósfera.

Estos microorganismos pueden dividirse en dos grupos principales <sup>(69)</sup>:

### A. Organismos fijadores de nitrógeno en vida libre.

#### 1. Bacterias.

Aerobias, anaerobias y anaerobias facultativas, están representadas en éste grupo. *Azotobacter*, *Clostridium* y *Denxia*, habitan en la raíz y la rizosfera de varias plantas superiores. Anaerobios facultativos como ciertos bacilos, fijan nitrógeno sólo bajo condiciones de anaerobiosis. Bacterias fotosintéticas que viven principalmente en ambientes acuosos.

#### 2. Cianobacterias.

Las cianobacterias son generalmente resistentes a temperaturas extremas y a la desecación, lo que las hace adaptables a una gran variedad de condiciones ambientales. Viven en regiones cálidas, así como en regiones subárticas. La fijación de nitrógeno se ha encontrado en 23 generos de cianobacterias.

### B. Organismos Fijadores de Nitrógeno Simbióticos.

Existen dos tipos de asociación simbiótica entre bacterias y plantas superiores: la simbiosis asociativa, ahora llamada rhizocoenosis; <sup>(106)</sup> y la simbiosis obligatoria.

#### 1. Simbiosis asociativa.

Este tipo de simbiosis fue descubierta recientemente <sup>(40)</sup>. Se ha reportado para el caso de *Azotobacter paspali*, que penetra en la corteza de la raíz de *Paspalum notatum*, una fijación apreciable de nitrógeno. Otro caso es el de *Azospirillum* en asociación con varios *Gramineae*. <sup>(137)</sup>

#### 2. Simbiosis obligatoria.

##### a) No-leguminosas.

Un grupo numeroso de angiospermas, por ejemplo *Alnus*, *Hyppophæe*, *Ceanothus*, *Coriaria*, *Myrica*, generalmente conocidas como no leguminosas; fijan nitrógeno en simbiosis con *Frankia* en sus nódulos de raíz. Las plantas noduladas no

leguminosas son importantes en los ecosistemas naturales. El potencial de varios de estos sistemas aún no es totalmente investigado.

b) Leguminosas.

Un grupo de Fabaceae, por ejemplo *Medicago*, *Melilotus*, *Pisium*, *Trifolium*, *Vicia*, es infectada por miembros del género *Rhizobium*. La fijación de nitrógeno en los nódulos de la raíz de leguminosas contribuye significativamente a la incorporación de nitrógeno en los suelos agrícolas. Esta es la fijación biológica de nitrógeno más importante, y la más explotada en la práctica.

### 3. FIJACION DE NITROGENO

#### EN SIMBIOSIS CON LEGUMINOSAS

La importancia de las leguminosas en la agricultura ha estimulado la investigación intensiva de la simbiosis entre *Rhizobium* y las leguminosas. <sup>(10)</sup>

El género *Rhizobium* se subdivide en dos clases de especies: los *Rhizobium* de crecimiento rápido que tienen un tiempo de duplicación de dos a cuatro horas y forman colonias de entre dos y cuatro milímetros de diámetro en tres a cinco días; y los *Rhizobium* de crecimiento lento que tienen un tiempo de duplicación de seis a ocho horas y forman colonias de un milímetro después de siete a diez días de incubación. <sup>(126)</sup>

El término rhizobia es aplicado a las bacterias del suelo de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*. La primera clasificación de éstas bacterias se basa en la capacidad de un cultivo para invadir y formar nódulos efectivos en cierto tipo de plantas, es decir, en la especificidad de la simbiosis. Esta distinción no es absoluta, ya que se han descrito ejemplos de especificidades cruzadas. <sup>(126)</sup>

En los últimos años ésta clasificación se ha modificado parcialmente debido a la gran información que se ha obtenido. Esta nueva clasificación no solo se basa en la especificidad de las interrelaciones (compatibilidad), sino también considera la velocidad de crecimiento, el metabolismo y la hibridación de DNA; comparando todas estas características por técnicas de taxonomía numérica. <sup>(47,91)</sup>

Fenotípicamente se distinguen tres niveles de compatibilidad entre la planta y el *Rhizobium*: 1) la habilidad de formar nódulos, 2) la habilidad de fijar nitrógeno y 3) la efectividad de la fijación de nitrógeno. No todas las leguminosas nodulan y no todas las cepas de *Rhizobium* forman nódulos con todas las plantas del grupo correspondiente. Muchas cepas forman nódulos, pero poco o nada de nitrógeno es fijado. Tal inefectividad ocurre entre varias especies. Algunos rhizobia fijan altos niveles de nitrógeno con ciertas especies, y bajos niveles con otras. Estas características han permitido caracterizar la alteración de algún gene involucrado en el proceso de nodulación y fijación de nitrógeno.<sup>(69)</sup>

El estudio de los genes bacterianos requeridos para la formación de nódulos efectivos en la fijación de nitrógeno, ha tenido un gran avance gracias a los experimentos de mutagénesis con transposón, clonación recombinante, y transferencia de plásmidos.<sup>(36,79, 84)</sup>

La simbiosis en leguminosas se establece generalmente a través de los siguientes pasos:<sup>(69)</sup>

1. Infección de las células radiculares del hospedero.
2. Desarrollo del "hilo de infección" y penetración del tejido cortical del hospedero.
3. Estimulación de la división de las células corticales e iniciación de la nodulación.
4. Depositación del rhizobia dentro de la célula del hospedero, y
5. Conversión de la bacteria en bacteroide.

Vincet<sup>(135)</sup>, ha dado una descripción sistemática del desarrollo de los nódulos de leguminosas por etapas, y ha asignado códigos fenotípicos a cada uno de ellos.

### 3.1 Nodulación.

El proceso empieza por la llegada del rhizobia cerca de las raíces de la planta, debido a un proceso de quimiotaxis<sup>(17,63)</sup>. Como muchas otras bacterias, rhizobia puede movilizarse hacia ciertos compuestos. Se ha sugerido que compuestos flavonoides puedan funcionar como atrayentes específicos producidos por la planta.<sup>(2,9,16)</sup>

Las etapas iniciales de la simbiosis están definidas por los genes nod, que se requieren para la infección y la nodulación. Los genes nod de varios rhizobia no se

expresan en células cultivadas, pero se inducen en presencia de la planta o por exudados de la planta.<sup>(50, 81)</sup>

Existen varias flavonas, isoflavonas (figura 2) y compuestos relacionados contenidos en los exudados de la planta que varían en su capacidad de inducir o inhibir los genes nod. La variación producida es debida mayormente por la especificidad del hospedero.<sup>(111)</sup>

Estos compuestos que son secretados por la planta<sup>(102, 103)</sup> difieren ligeramente entre ellos, de una planta a otra; como por ejemplo en los grupos hidroxilo o alguna otra modificación.

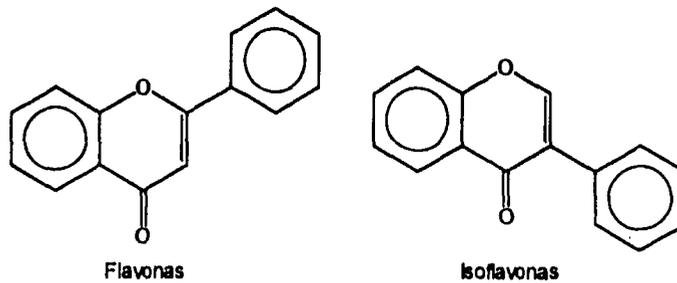


Figura No. 2

Los miembros del grupo de genes nod ABC, son llamados los genes nod comunes; ya que se encuentran presentes en todos los rhizobia y parecen ser funcionalmente intercambiables entre todos los *Rhizobium*.<sup>(51, 81, 91)</sup>

Estos genes parecen estar involucrados en la inducción de nódulos en las leguminosas y también en *Parasponia*.<sup>(92)</sup>

Estudios recientes con *Rhizobium meliloti* han aportado significativamente a el conocimiento de como los productos de nodABC pueden operar: nodA y nodB sintetizan compuestos de bajo peso molecular que pueden estimular la división celular de la planta; y se sugiere<sup>(72)</sup> que el producto de nodC pueda estar involucrado en la transducción de estas sustancias de la bacteria hacia las células de la planta.

Otro gene, nodD, parece estar directamente bajo la influencia de las flavonas o isoflavonas, y regular otros genes del complejo nod, incluyendo secciones de genes de nodulación específica para el hospedero.

La evidencia genética sugiere que NodD actúa como el receptor directo del inductor flavonoide, y por esto es importante en el reconocimiento efectivo entre la bacteria y la planta.<sup>(49,80)</sup> La proteína NodD se une a la región promotora que contiene secuencias conservadas, la caja nod, así que es posible sugerir<sup>(64)</sup> que el gene nodD tiene una función dual; una común para activar la expresión de los genes nod, y otra diversa para reconocer diferentes flavonoides.

Las células de *Rhizobium* inducidas para expresar los genes nodABC exportan un factor o factores que afectan la morfología de la raíz y el crecimiento de los pelos radiculares.<sup>(23,134)</sup> De esto se deduce que los genes nod causan la síntesis de señales para la planta.

Dos tipos de sustancias usualmente parecen estar involucradas tanto en el reconocimiento como en la unión. Estas son las lectinas, por parte de la planta, y polisacáridos de superficie (exopolisacáridos), por parte de la bacteria. Las lectinas (proteínas no catalíticas producidas por el hospedero) pueden reconocer residuos particulares de carbohidratos en el rhizobia de una manera específica.

Además de los exopolisacáridos, existen otros tres tipos de polisacáridos de superficie que pueden estar involucrados en la infección: lipopolisacáridos, polisacáridos capsulares y  $\beta$ .1,2-glucanos cíclicos.

Una vez que se logra el reconocimiento y la unión, la planta responde a la presencia del rhizobia con el enroscamiento de los pelos radiculares (como se dijo anteriormente debido a la expresión de los genes nod de la bacteria).

Las bacterias atrapadas en la espiral de los pelos de la raíz proliferan y empiezan a infectar las células superficiales de la planta; mientras tanto las células de la planta invadida son estimuladas a producir una envoltura de pared celular llamada "hilo de infección"<sup>(22)</sup>.

Después de la penetración de los pelos radiculares, la bacteria se multiplica dentro del hilo de infección que se mueve desde la corteza de la raíz hacia el

meristema. Simultáneamente, las células tetraploides de la planta son estimuladas a dividirse, las sucesivas divisiones producen el nódulo. Las células de la planta en el nódulo son infectadas por la bacteria, la cual es envuelta con la membrana plasmática de la planta <sup>(110)</sup>, dando origen a la llamada membrana peribacteroidal.

Durante el desarrollo del nódulo, *Rhizobium* lleva a cabo varios cambios morfológicos y fisiológicos, hasta su diferenciación a bacteroides, en donde se realiza la fijación de nitrógeno y un intercambio metabólico. <sup>(130)</sup>

La etapa final de la simbiosis, la fijación de nitrógeno, es la culminación de un complejo proceso de desarrollo, cuya función seguramente se constituye en la fuerza motriz de la simbiosis en la evolución. <sup>(85)</sup>

### 3.2 Fijación.

Los genes para la fijación de nitrógeno son divididos generalmente en dos grupos: aquellos que presentan homología con los sistemas de fijación de nitrógeno en vida libre, tales como *Klebsiella*, son referidos como genes nif; y aquellos que muestran ser requeridos para la fijación simbiótica de nitrógeno, pero a cuya función no se le conoce analogía a alguna función en vida libre, son referidos como los genes fix. Mutantes tanto en los genes nif como en los genes fix, son capaces de provocar el desarrollo del nódulo, pero estos no fijan nitrógeno. <sup>(85)</sup>

Los genes involucrados en la síntesis de la nitrogenasa (nif) están mejor caracterizados para *Klebsiella pneumoniae*. Las unidades de Fe-proteína están codificadas por el gene nifH. La secuencia de aminoácidos es altamente conservada entre diferentes organismos. Para la proteína Fe-Mo, la subunidad  $\alpha$  está codificada por el gene nifD. La otra, la subunidad  $\beta$ , está codificada por el gene nifK. La secuencia completa de ambas subunidades ha sido determinada en varios organismos fijadores de nitrógeno, y existe un grado considerable de homología.

Los genes nifB, nifN y nifS codifican para proteínas involucradas en la biosíntesis del cofactor Fe-Mo y su incorporación a la nitrogenasa. <sup>(29,46,55,109,115,129)</sup>

*Klebsiella pneumoniae* regula la transcripción de los genes nif vía el producto del gene nifA y el factor sigma codificado por ntrA, que a su vez es activado por ntrC que actúa sobre ntrA.<sup>(55)</sup>

La activación simbiótica de los genes nif, también es dependiente de nifA, pero nifA no es activado por ntrC.<sup>(131)</sup> La expresión de nifA es dependiente de una baja concentración de oxígeno,<sup>(38)</sup> cuyo efecto está mediado por los distalmente enlazados genes fix.<sup>(32,33,136)</sup> Este loci ha sido secuenciado e identificado como dos genes: fixL y fixJ.<sup>(33)</sup>

Se ha demostrado en *Rhizobium meliloti* que fixL y fixJ regulan a nifA en respuesta a la limitación de oxígeno.<sup>(12)</sup>

Los genes fixL y fixJ codifican para dos proteínas de tipo regulatorias de dos componentes en donde FixL es una hemoproteína que funciona como la proteína sensora de oxígeno, que es capaz de autofosforilarse y transferir el fosfato a FixJ, la proteína activadora.<sup>(57)</sup>

Los genes fixL y fixJ controlan positivamente la transcripción de nifA y de fixK, cuyos productos activan la transcripción de los demás genes que participan en la fijación de nitrógeno.

#### 4. BIOQUÍMICA DE LA SIMBIOSIS

##### RHIZOBIUM-LEGUMINOSA

Cuando termina el proceso de nodulación, comienza la fijación de nitrógeno como tal. De manera que la bacteria le proporciona a la planta nitrógeno en forma de amonio para sus requerimientos, y ésta le da a la bacteria un ambiente favorable y una fuente de energía para la función del bacteroide durante el proceso de fijación de nitrógeno.

##### 4.1. La nitrogenasa.

El complejo enzimático nitrogenasa (figura 3) cataliza la reducción del nitrógeno mediante seis electrones para dar amoníaco. Este proceso requiere de NADH y

ferrodoxina y está acompañado por la hidrólisis de 12 moléculas de ATP por molécula de  $N_2$  que se reduce.



La nitrogenasa es un oligómero complejo con dos componentes proteicos claramente distintos. Una de las proteínas, conocida como ferroproteína, es un dímero de subunidades idénticas (peso molecular de la subunidad de 34 mil D.) que rodea a un centro de  $F_4S_4$  y que contiene dos localizaciones para la unión de ATP.

La segunda proteína, llamada Ferro-Molibdenoproteína, es un tetramero (peso molecular de 220 mil D.) con una estequiometría  $\alpha_2\beta_2$ . Esta proteína contiene dos átomos de molibdeno, 28 a 30 átomos de hierro y 28 a 30 átomos de azufre, sin embargo, estas cantidades no se conservan en todas las Fe-Mo-proteínas.

En el proceso de reducción, el NADH, que es el último donador de electrones en ésta reacción, transfiere los electrones a la ferrodoxina (o una flavodoxina). La ferrodoxina reducida une entonces ATP, lo que aumenta el poder reductor de ésta proteína y la capacidad para ceder los electrones, uno a uno, a la Fe-Mo-proteína del complejo nitrogenasa.

Una vez que se reoxida la Fe-proteína, el ATP se hidroliza en ADP y Pi. La Fe-Mo-proteína almacena los electrones hasta que se alcanza un potencial electroquímico suficiente para la transferencia de los electrones al  $N_2$  que se une a esta proteína. El amoníaco inhibe de una forma potente a la nitrogenasa, actuando esta únicamente cuando la célula requiere nitrógeno reducido.

En *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* el desarrollo de la nitrogenasa es paralelo a la represión de la glutamino sintetasa (GS), de tal forma que el bacteroide puede reducir  $N_2$  a  $NH_3$  pero no puede asimilar amonio en compuestos orgánicos, este último papel es asumido por el hospedero.

También se requieren condiciones de bajo oxígeno para optimizar la función de la nitrogenasa <sup>(1)</sup>

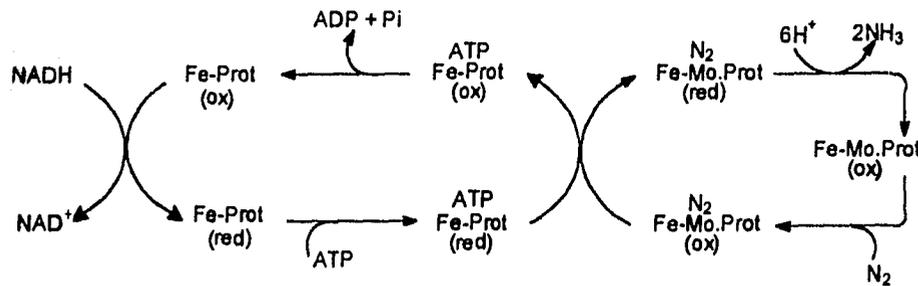


Figura No. 3  
Modelo de Nitrogenasa

#### 4.2. Producción y Evolución de Hidrógeno.

Un descubrimiento que fue posible gracias al desarrollo de sistemas de nitrogenasa *in vitro*, fue el comportamiento peculiar de la enzima en la ausencia de su sustrato. Gest <sup>(56)</sup> fue el primero en observar que cultivos de *Rhodospirillum rubrum* producen hidrógeno cuando crecen fototrópicamente en ácidos orgánicos con aminoácidos (por ejemplo glutamato) como fuente de nitrógeno.

Las células de tales cultivos fotometabolizaban sustratos tales como acetato, lactato y malato, completamente hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>. La fotoproducción de hidrógeno se inhibe por amonio y nitrógeno, lo cual indica la participación de la enzima en la evolución de hidrógeno. Como varios otros rhodospirillaceae, *Rhodospirillum rubrum* es capaz de reducir nitrógeno, la formación de la nitrogenasa se derreprime a bajas concentraciones de amonio (como en el caso en que crece con glutamato como fuente de nitrógeno); y en la ausencia de nitrógeno molecular, la actividad de hidrogenasa del sistema de la nitrogenasa produce H<sub>2</sub> a partir de NADH<sub>2</sub>, en una reacción que requiere ATP.

Por tanto, los ácidos orgánicos son oxidados vía el ciclo de ácidos tricarboxílicos, y la coenzima reducida generada se oxida por el sistema de la

nitrogenasa. Dado que el aceptor usual ( $N_2$ ) no está disponible, el poder reductor se libera como hidrógeno molecular.<sup>(62)</sup>

A pesar de que la producción de  $H_2$  es inevitable, el gas puede ó puede no ser desprendido; dependiendo de algunas condiciones; como por ejemplo si el abastecimiento de reductores de bajo potencial redox es limitado, o si la razón entre los dos componentes del complejo nitrogenasa es muy baja, entonces más electrones son dirigidos hacia la reducción de  $H^+$ .

Obviamente la producción de  $H_2$  consume energía en forma de ATP, para llevar a cabo la transferencia de electrones entre los componentes de la nitrogenasa. Varias de las bacterias fijadoras de nitrógeno, tienen una hidrogenasa especial que permite al organismo reincorporar el  $H_2$ .

Se han propuesto tres modos en los que la producción de  $H_2$  por la nitrogenasa puede ser de utilidad<sup>(39)</sup>

1. Para la reducción de  $O_2$  y proteger así a la nitrogenasa.
2. Para recuperar energía acoplando la producción de ATP a la oxidación de  $H_2$ .
3. Como una fuente de electrones para la propia nitrogenasa.

Estos y otros puntos relacionados a la producción de hidrógeno y la fijación de nitrógeno, han sido revisados por Evans<sup>(46)</sup> y Stam.<sup>(125)</sup>

En términos generales la posible ventaja de una hidrogenasa depende del factor que limita la fijación de nitrógeno en un sistema en particular.

#### 4.3. Sensibilidad a Oxígeno.

Una propiedad común en la nitrogenasa es su sensibilidad a oxígeno, esto representa un gran problema por que la producción de ATP en los bacteroides es un proceso aeróbico, y por tanto se requiere la presencia de oxígeno molecular. Otro efecto del oxígeno sobre las bacterias fijadoras de nitrógeno, es la represión de la síntesis de la nitrogenasa<sup>(69)</sup>

Este problema ha sido resuelto por la producción del pigmento rojo leghemoglobina (Lb). La leghemoglobina tiene dos funciones principales. La alta

concentración de esta proteína acarreadora de oxígeno, facilita la difusión del  $O_2$  hacia los dominios del bacteroide, permitiéndole entonces llevar a cabo la síntesis de ATP.<sup>(6)</sup>

Además, el oxígeno es transportado como el complejo Lb- $O_2$ , lo que significa que la concentración al equilibrio de  $O_2$  en la superficie del bacteroide, es extremadamente baja para poder inactivar la nitrogenasa o reprimir su síntesis.

La leghemoglobina es un producto de la simbiosis, las proteínas globulares están codificadas por genes de la planta, mientras que la síntesis del grupo hemo se lleva a cabo en la bacteria.

#### 4.4. Intercambio Metabólico.

En los sistemas simbióticos *Rhizobium*-leguminosa de fijación de nitrógeno, existe evidencia de que el nitrógeno reducido por el bacteroide es exportado como amonio, el cual es asimilado por las enzimas de la planta. Esta asimilación de amonio en la planta ocurre vía los aminoácidos glutamato y glutamina. (ver sección 5 de ésta introducción).

Como se muestra en la figura 4, parte de la glutamina final es usada para mantener el abastecimiento de la molécula aceptora, glutamato. Sin embargo, en ciertas especies (por ejemplo ciertas cícadas) patrones de marcaje muestran que la molécula aceptora proviene de otra fuente.

La asparagina es otro producto exportado de los nódulos de la leguminosa, usualmente junto con la glutamina. Tales nódulos son referidos algunas veces como exportadores de amidas.<sup>(124)</sup>

La asparagina es también un producto común de exportación en varios sistemas de actinorrhizal<sup>(118)</sup> pero no en cícadas.<sup>(101)</sup>

Sin embargo, en plantas vasculares principalmente, la glutamina puede ser procesada posteriormente para dar otros productos de exportación, como pueden ser citrulina, alantoina y ácido alantoico. La alantoina y su derivado el ácido alantoico son característicos de ciertos tipos de leguminosas, que se conocen como exportadores de ureidos.<sup>(124)</sup>

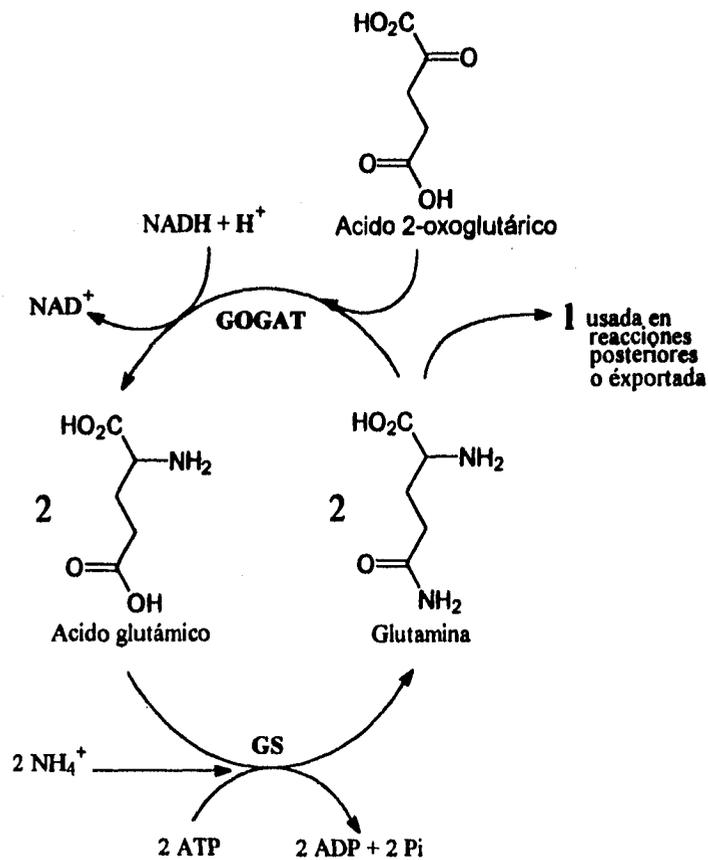


Figura No. 4  
Asimilación de amonio via GS/GOGAT

En cuanto a la naturaleza de la fuente de carbono que provee la planta al bacteroide, se han realizado varias investigaciones debido a que el abastecimiento de la fuente de carbono limita la fijación de nitrógeno,<sup>(66)</sup> ya que en última instancia, el abastecimiento de electrones para la nitrogenasa proviene de los compuestos de carbono disponibles para el bacteroide por la célula de la planta.

Originalmente se propuso que estos compuestos fueran sacáridos, los cuales son el mayor componente de la fotosíntesis de la planta.<sup>(126)</sup> Sin embargo, se encontró que tales compuesto no son la principal fuente de energía usada por el bacteroide ya que los azúcares no son transportados activamente, ni oxidados por bacteroides.<sup>(117)</sup>

Otros trabajos sugieren que *Rhizobium* puede utilizar como fuente de carbono ácidos dicarboxílicos, ya que estos compuestos son transportados y oxidados por bacteroides de *Rhizobium* y son requeridos para la fijación de nitrógeno.

Mutantes en el transporte de ácidos dicarboxílicos son capaces de nodular (Nod<sup>+</sup>) pero incapaces de fijar nitrógeno (Fix<sup>-</sup>)<sup>(13,49,50,112,127)</sup>. La mayoría de las evidencias soportan la idea de que los ácidos dicarboxílicos succinato y malato son los compuestos suplementados al bacteroide.<sup>(116,127)</sup>

El transporte de succinato en *Rhizobium* ocurre mediante el sistema de transporte de ácidos dicarboxílicos, el cual es constitutivo en bacteroides y puede transportar succinato, malato, fumarato y análogos a succinato.<sup>(40)</sup>

Los ácidos dicarboxílicos son oxidados en el ciclo de Krebs, y mutantes afectadas en la actividad de succinato deshidrogenasa y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa en *Rhizobium meliloti* inducen una nodulación tardía y son incapaces de fijar nitrógeno.<sup>(43,53,54)</sup>

Dado el hecho de que las mutantes en el transporte de ácidos dicarboxílicos son capaces de nodular, otros compuestos diferentes deben ser capaces de inducir el desarrollo de los bacteroides.<sup>(113)</sup> Kahn, et.al.<sup>(74)</sup> han propuesto que el intercambio de aminoácidos y/u otros ácidos orgánicos a través de la interface bacteria/planta, puede constituirse en una fuerza directriz en la fijación de nitrógeno. En este modelo la exportación de amonio por la bacteria está acoplada a la importación de esqueletos carbonados.<sup>(73)</sup>

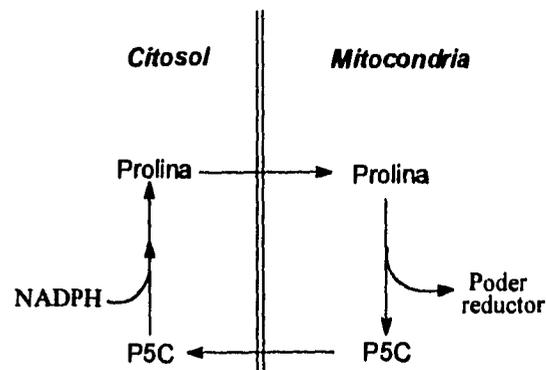
Algunas de las evidencias que soportan esta propuesta son que se han encontrado en bacteroides las actividades de las enzimas catabólicas de aminoácidos, como aspartasa, asparaginasa, glutaminasa, aspartato deshidrogenasa y alanina deshidrogenasa.<sup>(82,83)</sup> El glutamato y aspartato aceleran la actividad de nitrogenasa y respiración en *Bradyrhizobium japonicum*<sup>(116)</sup>. Una mutante de *Rhizobium meliloti* con

una actividad reducida de glutamato-oxalacetato transaminasa forma nódulos inefectivos.<sup>(106)</sup> Otra mutante afectada posiblemente en glutamato descarboxilasa reduce la actividad de nitrogenasa.<sup>(52)</sup> Se ha encontrado,<sup>(7)</sup> que una concentración de 10 mM de glutamato incrementa la proporción de amonio con una demanda de oxígeno debido a la fijación de nitrógeno, lo que sugiere que el bacteroide puede utilizar glutamato como fuente de carbono y estimular la fijación de nitrógeno.

Por otro lado, se ha propuesto<sup>(78)</sup> que la prolina puede ser un aminoácido suplementado a los bacteroides por la planta durante la fijación de nitrógeno como fuente de energía. Se piensa que en el citoplasma de la planta se lleva a cabo la reducción de pirrolina-5-carboxilato (P5P) dando como productos prolina y NADP<sup>+</sup>, y que éste aminoácido sea catalizado dentro del bacteroide por la prolina deshidrogenasa con una transferencia de electrones para producir el ATP requerido para la fijación de nitrógeno.

Esta interesante propuesta, evidenciada por varios estudios enzimológicos, sugieren una estrecha relación entre el citosol de la planta y el bacteroide; muy semejante a la encontrada entre el citosol y la mitocondria de los eritrocitos.<sup>(65)</sup> (figura 5); sin embargo, no se han encontrado evidencias del transporte de prolina en el caso del sistema de fijación de nitrógeno mencionado.

Esta vía es consistente con la propuesta de Kahn, Kraus y Somerville, que los bacteroides pueden derivar energía a partir de compuestos nitrogenados.



**Figura No. 5**  
**Metabolismo de la prolina en la transducción de energía**  
**del citosol a mitocondrias en eritrocitos humanos.**  
**P5C = pirrolina-5-carboxilato**

## 5. ASIMILACIÓN DE AMONIO.

El amonio se sitúa en un punto crucial en el metabolismo nitrogenado, ya que es el producto de la fijación de nitrógeno y el punto de convergencia entre la conversión del nitrógeno inorgánico a nitrógeno orgánico (asimilación) y el proceso inverso (desasimilación).

El amonio puede producirse intracelularmente por la degradación de urea, arginina, histidina, glutamato, etc. El amonio y otros productos iniciales de la asimilación de amonio se involucran en el control de estas vías y en la utilización de otras fuentes de nitrógeno, tales como los aminoácidos.

Existe clara evidencia de que ciertas bacterias son capaces de retener amonio intracelularmente en concentraciones más altas que las del medio del cultivo en el que se encuentran. Por ejemplo, cultivos fijadores de nitrógeno de *Klebsiella pneumoniae* y *Azotobacter chroococcum* contiene 3 mM y 2mM de amonio respectivamente.<sup>(41,138)</sup>

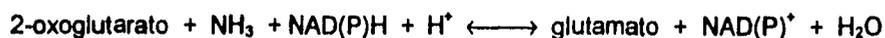
Kleiner <sup>(76,77)</sup> ha reportado que cultivos de *Az. vinelandi* contienen 0.6 M de amonio intracelularmente cuando la concentración extracelular era de 2-8 mM; es decir una diferencia de 100 veces a través de la membrana celular. El ha sugerido que la membrana de este organismo es impermeable a amonio y que se requiere un sistema de transporte.

Un experimento bastante útil para el estudio del transporte de amonio es el uso de [<sup>14</sup>C]-metilamonio como sustrato análogo.

Esta situación no es semejante para el caso de bacteroides de *Rhizobium*. Se induce una permeasa en cultivos de *Rhizobium leguminosarum* en condiciones de limitación de nitrógeno, pero ésta no se encuentra en bacteroides.<sup>(80)</sup> Estudios *in vitro* muestran que el <sup>15</sup>NH<sub>3</sub> de <sup>15</sup>N<sub>2</sub> aparece mayormente en los alrededores de los bacteroides fijadores de nitrógeno.<sup>(8)</sup>

Dado que el amonio parece equilibrarse rápidamente a través de la membrana de rhizobia en vida libre en concentraciones moderadas de amonio<sup>(37)</sup>; y por que el promedio de concentración de amonio en los nódulos es de cerca 2-4 mM, el movimiento de amonio del bacteroide hacia el citosol de la planta, es probablemente por difusión.

En la asimilación de amonio dos son los mecanismos conocidos, ambos resultan en la aminación de 2-oxoglutarato para formar glutamato. Una de estas vías es catalizada por la glutamato deshidrogenasa (EC.1.4.13. GDH) y que es una reacción reversible que convierte el 2-oxoglutarato directamente a glutamato con el amonio como donador de nitrógeno y el NADPH ó NADH como donador de electrones.

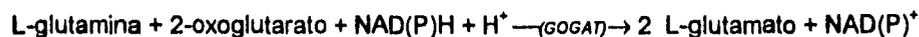


En general, se asume que la GDH asociada a NADP tiene una función biosintética, a pesar de que la Km para el amonio es usualmente alta, lo que indica que la enzima funciona eficientemente solo a altas concentraciones de amonio. Por otro lado, se sabe que la GDH asociada a NADH existe en varias bacterias, principalmente

pseudomonas, donde tiene una función catabólica asociada con el crecimiento con aminoácidos como fuente de carbono.<sup>(15)</sup>

Se sabe que existen otras deshidrogenasas específicas para alanina y leucina, que están presentes especialmente en *Bacillus sp.*, pero también tienen una función catabólica.<sup>(97,104)</sup>

Un mecanismo alternativo presente en muchas de las bacterias estudiadas involucra la participación de dos enzimas: la glutamino sintetasa (EC.6.3.12. GS) y la glutamato sintasa (EC.2.6.1.53. glutamina-2-oxoglutarato aminotransferasa. GOGAT). Estas enzimas catalizan la completa aminación del 2-oxoglutarato a glutamato, con la glutamina como intermediario.



Este sistema es fisiológicamente irreversible y tiene los mismos productos finales que la GDH, con el gasto adicional de un mol de ATP por mol de amonio asimilado. Este gasto de energía se compensa por el hecho de que la GS tiene una mayor afinidad por el amonio que la que tiene GDH; y por tanto permite al organismo asimilar el amonio aún cuando éste se encuentra en bajas concentraciones.

GOGAT fue descubierta por primera vez en cultivos limitados de amonio de *Klebsiella aerogenes*<sup>(132)</sup>, pero ahora se sabe que esta presente en varias bacterias.

La posición de la glutamina como un intermediario en la vía GS/GOGAT, es de particular importancia dado que el grupo amido de la glutamina puede servir como donador de nitrógeno, no sólo para el 2-oxoglutarato sino también en la biosíntesis de carbamil fosfato, glucosamina-6-fosfato, asparagina, histidina, triptofano, p-aminobenzoato, AMP, CTP y NAD.<sup>(56)</sup>

Por tanto para un organismo que utiliza la vía GS/GOGAT, el amonio es asimilado primeramente en la glutamina; colocando a la GS en una posición única en el metabolismo nitrogenado. No es sorprendente, entonces, que la GS esté sujeta a un

control tanto en su síntesis como en su actividad. Los mecanismos de los procesos de control varían en complejidad dependiendo del organismo que se trate.

En vida libre *Rhizobium* presenta una actividad de la glutamato deshidrogenasa muy baja o no detectable, de tal manera que el amonio es asimilado por la vía GS/GOGAT para sintetizar los aminoácidos glutamina y glutamato. <sup>(4)</sup>

*Rhizobium* presenta dos glutamino sintetasa las cuales tienen propiedades físicas y catalíticas diferentes. <sup>(100)</sup> GSI es semejante a la enzima encontrada en *E. coli*, con una estructura oligomérica de doce subunidades, termoestable, regulado post-transcripcionalmente a nivel de adenilación. <sup>(11,24,87,88)</sup>

Por otro lado GSII es de menor peso molecular, es termolábil y está compuesta por ocho subunidades. La actividad de GSII está regulada transcripcionalmente por el sistema regulador nitrogenado Ntr dependiendo de la condición nitrogenada. <sup>(14,31,70,90,121)</sup>

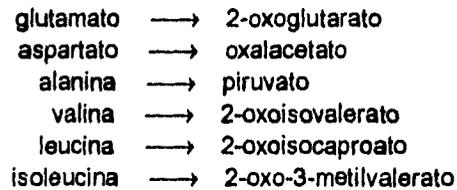
Recientemente se ha encontrado en *Rhizobium meliloti* y *leguminosarum* un locus llamado glnT que no hibridiza con el gene que codifica para GSI ni con el gene de GSII, por lo que a la enzima producto de este locus se le ha denominado GSIII. <sup>(35)</sup>

En *Rhizobium etli* la actividad de glutamato sintasa requiere como cofactor al NADPH, se reprime por glutamato y se inhibe por ácidos orgánicos. La actividad más alta se encuentra durante la fase exponencial de crecimiento, cuando *Rhizobium etli* utiliza amonio como fuente de nitrógeno, ó nitrato ó glutamina; y durante la fase estacionaria se mantiene alta y constante. En cambio cuando utiliza glutamato como fuente de nitrógeno, la actividad de esta enzima es baja. La actividad de la glutamato sintasa se encuentra cuatro veces más alta cuando *Rhizobium etli* utiliza succinato como fuente de carbono comparado cuando utiliza glucosa ó fructuosa en un extracto sin dializar; en un extracto dializado la actividad es similar en estas condiciones, por lo que se propone un efecto inhibitorio de metabolitos. <sup>(14)</sup>

## 6. CRECIMIENTO CON AMINOÁCIDOS.

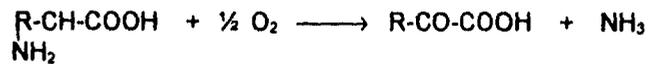
Los aminoácidos y péptidos de bajo peso molecular producidos por las proteasas, pueden ser asimilados y utilizados activamente por varios microorganismos

para su crecimiento. Algunos aminoácidos están tan estrechamente relacionados a los intermediarios centrales del metabolismo celular que su degradación es muy sencilla. En la mayoría de los casos el aminoácido es convertido a su correspondiente cetoácido.<sup>(62)</sup>



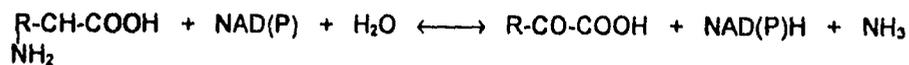
La desaminación oxidativa puede llevarse a cabo de acuerdo a los siguientes mecanismos:

(a.) Oxidación por oxidasas ligadas a citocromo.



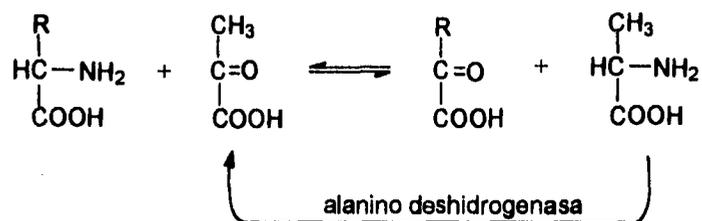
Varias bacterias contienen oxidasas de L-aminoácidos y D-aminoácidos. Estas últimas son importantes debido a la presencia de algunos D-aminoácidos en algunos polímeros (por ejemplo, peptidoglicanos), y por que trabajan junto con las racemasas, las cuales catalizan la conversión de D-aminoácidos a L-aminoácidos. Las oxidasas son flavoproteínas que proveen de electrones a la cadena respiratoria. Son relativamente inespecíficas, por lo que una oxidasa en particular puede unir a 10 aminoácidos diferentes.

(b.) Oxidación por deshidrogenasa ligadas a NAD(P)<sup>+</sup>.



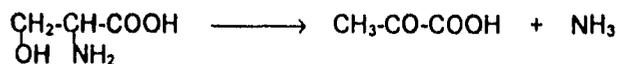
La alanino deshidrogenasa aparece en varios bacilos y clostridios. La glutamato deshidrogenasa es muy dispersa entre las bacterias y cataliza la reacción análoga con el glutamato como sustrato.

(c.) Transaminación con piruvato ó 2-oxoglutarato como aceptor del grupo amino y subsecuente regeneración del aceptor por deshidrogenación (como en b).



Las transaminasas son enzimas bastante estudiadas, las reacciones que catalizan son totalmente reversibles y su mecanismo de acción es ya conocido. Los productos de algunas transaminasas como 2-oxoglutarato, oxaloacetato y piruvato, son fácilmente manejados por la célula bacteriana. Sin embargo, se requieren rutas específicas para canalizar cetoácidos como el 2-oxoisovalerato ó el 2-oxoisocaproato, hacia el metabolismo intermediario. Las rutas encontradas en bacterias son las mismas que se hallan en animales, y conducen a la formación de acetil-CoA y propionil-CoA.

Otra reacción utilizada en la asimilación de aminoácidos es la desaminación. Esta reacción con serina y treonina produce piruvato y 2-oxobutirato respectivamente. El 2-oxobutirato puede ser oxidado por un complejo multienzimático parecido al complejo de la piruvato deshidrogenasa, para producir propionil-CoA.



La reacción empieza por la remoción de agua de la molécula.

### 6.1. Asimilación y Degradación de la Glutamina.

La glutamina funciona en la asimilación, almacenamiento y formación de amonio, en el control homeostático del balance de aminoácidos, en la síntesis de los residuos de purina y pirimidina de los ácidos nucleicos, ATP y otros nucleótidos, en la formación de aminoazúcares y en la biosíntesis de varios aminoácidos y otros compuestos de importancia biológica. <sup>(93)</sup>

La función biológica de la glutamina varía dependiendo del tejido ó célula de que se trate. Por ejemplo, en el riñón la glutamina es la mayor fuente de energía y de amonio urinario. <sup>(6)</sup> El papel de la glutamina en el cerebro, parece relacionarse con la función sináptica del glutamato y del  $\gamma$ -aminobutirato. En ciertas plantas, la glutamina es el mayor almacén de nitrógeno, y en varios microorganismos la glutamina funciona como un intermediario esencial en la asimilación de amonio.

En el caso particular de la asimilación de glutamina, existen reacciones en las que se utiliza en grupo  $\alpha$ -amino de la glutamina que son de importancia fisiológica y metabólica. Este tipo de reacciones son catalizadas por las enzimas acopladas fisiológicamente transaminasa de glutamina y  $\alpha$ -cetoácido- $\omega$ -amidasa. <sup>(26,27,28,94)</sup>

Existen varias transaminasas de glutamina que presentan gran afinidad por glutamina y ciertos  $\alpha$ -cetoácidos. Las transaminasas de glutamato-aspartato y glutamato-alanina no actúan sobre la glutamina en niveles aceptables, al igual que otras transaminasas de  $\alpha$ -cetoglutarato y aminoácidos.

Las reacciones de transaminación de glutamina, al igual que otras reacciones de transaminación, son totalmente reversibles. Pero a diferencia de la reacción de la transaminasa de glutamato-aspartato, la transaminasa de glutamina cataliza reacciones que proceden bajo condiciones fisiológicas en la degradación de la glutamina, más que en su síntesis.

La concentración de estado estacionario del  $\alpha$ -cetoglutamato en tejidos de mamífero es relativamente baja, <sup>(42)</sup> y en la presencia de la  $\alpha$ -cetoácido- $\omega$ -amidasa, la forma de cadena abierta del  $\alpha$ -cetoglutamato, sufre una rápida reacción de desamidación produciendo  $\alpha$ -cetoglutarato. Por lo tanto, la transaminación de

glutamina es esencialmente irreversible *in vivo*, por consiguiente su papel metabólico debe estar asociado con la utilización de glutamina, formación de amonio y la utilización de ciertos  $\alpha$ -cetoácidos para la síntesis de los correspondientes aminoácidos.

La idea más aceptable concerniente al papel fisiológico de la transaminasa de glutamina es que funciona para la conversión de  $\alpha$ -cetoácidos en aminoácidos.

En *Rhizobium etli*, se ha demostrado la actividad de transaminasa entre la glutamina y  $\alpha$ -cetoácidos (glioxilato y piruvato como sustratos preferenciales), para conducir a la formación de glicina, alanina y  $\alpha$ -cetoglutaramato. La actividad enzimática de la  $\omega$ -amidasa, acoplada a la transaminasa de glutamina produce una irreversibilidad en el sistema en dirección de la utilización de la glutamina. Se ha sugerido que en *Rhizobium etli* la transaminasa de glutamina puede tener un papel en la síntesis irreversible de glicina y alanina y otros aminoácidos, y que la transaminación de estos aminoácidos puede contribuir a la síntesis de otros aminoácidos para así conservar el balance de aminoácidos y la pérdida de esqueletos de carbono.<sup>(44)</sup>

La vía de la transaminasa de glutamina y la  $\omega$ -amidasa, han sido reportadas también en *Neurospora crassa* como la vía que preferencialmente degrada glutamina, debido a que en este hongo no se detectó la actividad de glutaminasa.<sup>(19,20,21)</sup>

En *Saccharomices cerevisiae* también se ha estudiado ésta vía. La transaminasa de glutamina fue incrementada en la presencia de glutamina y disminuida en presencia de lisina o glicina; esto sugiere que la glicina puede ser sintetizada por ésta vía, y que la glutamina modula positivamente su actividad.<sup>(122)</sup>

Por otro lado, existe un grupo bastante heterogéneo de reacciones enzimáticas en las cuales el grupo amido de la glutamina se utiliza directamente, dando como producto al glutamato. Estas reacciones son catalizadas por las amidotransferasas de glutamina, de las que han sido identificadas trece actividades catalíticas.<sup>(16,95)</sup>

Las amidotransferasas de glutamina están involucradas en la biosíntesis tanto de los anillos de purina como de pirimidina y en la introducción dentro de estos anillos de ciertos grupos amino. Las amidotransferasas también catalizan reacciones que

conducen a la síntesis de varios aminoácidos, incluyendo: asparagina, arginina, triptofano, histidina y p-aminobenzoato y (en bacterias) de glutamato (glutamato sintasa).

La glutamato sintasa es una transamidasa que cataliza la transamidación reductiva de la glutamina con el  $\alpha$ -cetoglutarato para dar dos moléculas de glutamato. Esta enzima sólo se encuentra en microorganismos y plantas.<sup>(25,99,114)</sup> La función de ésta enzima ha sido asociada principalmente para la asimilación de amonio.

Otra posibilidad en la degradación de glutamina, es la actividad de glutaminasas, que son enzimas que catalizan la desamidación hidrolítica de la glutamina dando como productos glutamato y amonio. Estas enzimas se han encontrada en animales, plantas, bacterias y levaduras. En *E. coli*, se han descrito dos glutaminasas intracelulares, a las que se les han atribuido funciones regulatorias. La glutaminasa A, descrita por primera vez por Meister, et. al.<sup>(66)</sup> funciona óptimamente a pH 5 y se induce cuando las reservas de energías disminuyen, tal como sucede hacia el final de un rápido crecimiento. Hartam,<sup>(67)</sup> postula que por el agotamiento de la glutamina bajo éstas circunstancias, la enzima inactiva las principales vías biosintéticas, y por tanto se conserva energía.

A la glutaminasa B (pH óptimo de 7), en colaboración con la glutamino sintetasa, se le atribuye la función de mantener el balance entre glutamina y glutamato, que evite un disminución letal de ATP cuando la bacteria pase rápidamente de una condición limitada de amonio y a una abundancia de este ión.<sup>(106)</sup>

*Saccharomices cerevisiae*, también tiene dos isoenzimas: una periplásmica, la glutaminasa A; y una citoplásmica, la glutaminasa B. Estas isoenzimas se distinguen por su termoestabilidad, su sensibilidad a piruvato y por su pH óptimo.<sup>(123)</sup>

En *Bacillus licheniformis* se ha reportado la actividad de la glutaminasa y se sugiere la existencia de dos isoenzimas, una con un pH óptimo de 7, y otra de 9.<sup>(138)</sup>

Se ha demostrado también la actividad de glutaminasa en *Rhizobium etli*. Esta actividad es positivamente regulada por su sustrato y negativamente por amonio y por la fuente de carbono<sup>(44)</sup>. Así mismo, ésta enzima ha sido reportada en bacteroides de *Rhizobium lupini*.<sup>(62,63)</sup>

Se ha observado que cuando *Rhizobium etli* crece por 12 horas en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno excreta mayor cantidad de amonio (0.7 mM) que cuando crece en glutamina más succinato (0.06 mM). Dado que la actividad de GSI y GSII en la segunda condición de crecimiento es dos veces mayor que en la primera, y por el hecho de que cuando se mide la excreción de amonio en glutamina más succinato más MS (L-metionina-D,L-sulfoximina), un inhibidor de GS, se encuentra que *Rhizobium etli* excreta seis veces más amonio que en glutamina más succinato; se ha propuesto que cuando *Rhizobium etli* crece en glutamina más succinato, el amonio liberado de la glutamina es asimilado por GS, dando lugar a la operación de un ciclo de glutamina que consume ATP. En condiciones de crecimiento en glutamina como fuente de carbono el ciclo de glutamina opera a una velocidad menor, permitiendo así el uso de la glutamina como fuente de carbono para el crecimiento.<sup>(44)</sup>

La importancia de la operación de un ciclo de glutamina está en regular su concentración, ya que el recambio entre glutamina y glutamato es una manera de regular rápidamente su concentración intracelular, y esta a su vez regularía las actividades de síntesis y de degradación del nitrógeno celular. Es decir, participar en el balance interno de los compuestos nitrogenados.

Este balance depende en gran medida del abastecimiento energético, así como de los nutrimentos disponibles; por lo que también se le han asociado a este ciclo funciones en la disipación de energía y en la utilización de esqueletos carbonados a partir de compuestos nitrogenados.

El trabajo realizado con la mutante LM16,<sup>(45)</sup> ha permitido conocer más acerca de las funciones de la glutaminasa en *Rhizobium etli*.

La mutante LM16 es incapaz de crecer en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno, pero es capaz de crecer igual que la cepa silvestre en otros medios. Estos resultados indican que la mutante LM16 transporta glutamina puesto que utiliza este aminoácido como fuente de nitrógeno y no está afectada en la utilización de otros aminoácidos como fuente de carbono; por lo tanto la alteración debe encontrarse en la degradación de glutamina a glutamato.

Se encontró que en comparación con la cepa silvestre, la mutante tiene niveles muy bajos en la actividad de glutaminasa en diferentes condiciones de crecimiento, siendo cerca de diez veces menos en glutamina, con ó sin succínato, y de cinco veces menos en amonio más succínico.

La cuantificación de las pozas intracelulares de glutamina y glutamato en ésta mutante en diferentes condiciones de crecimiento indican que, en comparación con la cepa silvestre, la mutante LM16 contiene mayores cantidades de glutamina y menores de glutamato. Puesto que la actividad de GSI y GSII son equivalentes tanto en la mutante como en la cepa silvestre, estos resultados indican que el principal papel de la glutaminasa de *Rhizobium etli*, es degradar glutamina cuando éste aminoácido es usado como fuente de carbono y nitrógeno, y también para mantener un balance óptimo entre glutamina y glutamato.

Así mismo, se ha encontrado que la mutante LM16 excreta menores cantidades de amonio que la cepa silvestre, cuando estas crecen en glutamina con ó sin succínato. La excreción es mucho menor cuando la glutamina es la fuente de carbono y nitrógeno.

El desprendimiento de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glutamina muestra que la glutaminasa participa en la utilización de este aminoácido como fuente de carbono, dado que la mutante LM16 desprende dos veces menos  $^{14}\text{CO}_2$  que la cepa silvestre cuando se utiliza glutamina como fuente de carbono y nitrógeno, y en cambio se liberan cantidades similares en ambas, cuando el succínico es la fuente de carbono.

El hecho de que la mutante LM16 mantenga un desprendimiento de  $^{14}\text{CO}_2$  residual, pone de manifiesto la posibilidad de degradar la glutamina mediante la participación de otras vías.

Los bacteroides de la mutante LM16 también acumulan glutamina y la poza de glutamato es baja, demostrando que la glutaminasa es activa en bacteroides. Por otro lado, el fenotipo simbiótico de la mutante es igual al mostrado por la cepa silvestre.

## OBJETIVO E HIPOTESIS

Este trabajo forma parte de un proyecto general sobre las vías que participan en la asimilación de glutamina, su regulación y el reciclaje de este aminoácido en *Rhizobium etli*; tanto en vida libre como en simbiosis con *Phaseolus vulgaris*; así como la relación que existe entre la asimilación de glutamina y la fijación de nitrógeno por la bacteria.

El objetivo de este trabajo es obtener y caracterizar revertantes y/o pseudorevertantes de la mutante LM16 de *Rhizobium etli*, las cuales sean capaces de crecer en un medio mínimo suplementado con glutamina como fuente de carbono y nitrógeno. Con lo cual se pretende conocer si existe alguna vía metabólica que pueda compensar la falta de glutaminasa, a través de la obtención de revertantes y/o pseudorevertantes de esta mutante.

La mutante LM16 de *Rhizobium etli*, fue obtenida con un transposón (Tn5-mob) y seleccionada por su incapacidad para crecer en un medio mínimo con glutamina como fuente de carbono y nitrógeno. La actividad de glutaminasa de esta mutante es baja y constante en varias condiciones de crecimiento.

Es decir, bajo la hipótesis de que si la glutaminasa es la principal vía de degradación de glutamina en *Rhizobium etli*, la caracterización de la revertante y/o pseudorevertante permitirá evidenciar la compensación de la degradación de glutamina por alguna otra vía metabólica, ó también por alguna isoenzima de glutaminasa, ó aún por la propia glutaminasa afectada en la mutante LM16.

En este caso el fenotipo a recuperar es la capacidad de la bacteria para crecer en un medio mínimo suplementado con glutamina, de modo que la bacteria pueda utilizar éste aminoácido como fuente de carbono y nitrógeno.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. Cepas.

Se utilizaron las cepas silvestre CE3-R28 de *Rhizobium etli*, resistente a ácido Nalídixico (Nal) y Estreptomicina (Sm), anteriormente clasificada como *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* <sup>(119)</sup>

Además se utilizó la cepa mutante LM16 de *Rhizobium etli*. con resistencia a ácido Nalídixico y a Kanamicina (Km), que fue obtenida en este laboratorio por tratamiento mutagénico con transposon Tn-5 mob; el cual confiere resistencia a kanamicina, y fue seleccionada por su incapacidad para crecer en un medio mínimo con glutamina como fuente de carbono y nitrógeno.

También se utilizó la cepa LM16 complementada con el plásmido pCD24; el cual restaura la actividad de glutaminasa en la mutante y confiere resistencia a Tetraciclina. Esta cepa se ha denominado LM16pCD24 y es resistente a Kanamicina y Tetraciclina.

La cepa CE3pCD24 se refiere a la cepa silvestre de *Rhizobium etli* con el plásmido pCD24. Igualmente fueron utilizadas la cepa silvestre de *Rhizobium meliloti* Rm1021 resistente a Streptomicina, y la cepa RmpCD24 correspondiente a la cepa silvestre de *Rhizobium meliloti* con el plásmido pCD24.

### 2. Medios de Cultivo.

#### Medio Rico PY (Peptone-Yeast).

Composición:	Extracto de levadura	0.3%
	Peptona de Caseína	0.5%
	CaCl <sub>2</sub>	7.0 mM
	Antibióticos."	

#### Medio Rico LB. (Luria-Bertani Broth)

Composición:	Extracto de levadura	0.5%
	Paptona de Caseina	1.0%
	NaCl	1.0%

En ambos casos, si el medio es sólido se agrega agar al 1.5%.

\* El cloruro de calcio se agrega de una solución 0.7M, esterilizada por separado. Se agrega 1 ml de la solución concentrada por cada 100 ml de medio PY.

\*\* Los antibióticos se esterilizan por filtración a una concentración 1000 veces la final. Se agregan cuando el medio esté tibio. La concentración final de los antibióticos usados es: ácido Nalidíxico 20 µg/ml, Kanamicina 30 µg/ml, Estreptomina 200 µg/ml, Tetraciclina 10 µg/ml.

Medio mínimo (M.m) para *Rhizobium etli*.

Composición:	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 mM
	MgSO <sub>4</sub>	0.8 mM
	FeCl <sub>3</sub>	0.03 mM
	CaCl <sub>2</sub>	1.5 mM
	Fuente de carbono	10 mM
	Fuente de nitrógeno	10 mM

Si se trata de medio sólido, se agrega agar al 1.5 %.

El medio salino se prepara a partir de soluciones concentradas 100 veces la final, de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y MgSO<sub>4</sub> respectivamente, con el pH ajustado a 6.8. Se esteriliza en autoclave por 25 minutos. El FeCl<sub>3</sub> se esteriliza por filtración en una solución con 10<sup>3</sup> veces la concentración final y se agrega al medio salino ya estéril en proporción de 0.1 ml por cada 100 ml de M.m. El CaCl<sub>2</sub> se esteriliza por separado en una solución con 100 veces la concentración final y se agrega al medio estéril en proporción de 1 ml por cada 100ml de M.m.

La fuente de carbono utilizada es succínico, éste se puede agregar al medio salino antes de esterilizar, a partir de una solución con 100 veces la concentración final

y a un pH de 6.8. La fuente de nitrógeno es glutamina, que se esteriliza por filtración de una solución 25 mM, y se agragan 4 ml por cada 100 ml de M.m. Esta solución no puede almacenarse por más de 24 horas ya que sufre hidrólisis. En el caso de que se utilice glutamina como fuente de carbono y nitrógeno, se omite el succínico del M.m. Puede usarse también cloruro de amonio como fuente de nitrógeno.

Una vez que el medio salino se ha esterilizado, se espera a que enfrie a temperatura ambiente; para entonces agregar el resto de componentes en las cantidades indicadas, poco antes de inocular el M.m ya complementado.

### **3. Condiciones de Crecimiento**

#### **Medio líquido:**

100 ml en erlenmeyer de 250 ml

250 ml en erlenmeyer de 500 ml.

Temperatura de 30°C.

Agitación constante de 200 rpm

#### **Medio sólido:**

Se preparan 300 ml de medio sólido en erlenmeyer de 500 ml, el medio fundido se vierte en cajas petri sobre las que se crece la cepa correspondiente. Mismas condiciones de temperatura

### **4. Cinética de Crecimiento.**

El crecimiento bacteriano se sigue por densidad óptica (D.O) a 540 nm de longitud de onda y por cantidad de proteína por el método de Lowry. El procedimiento es el siguiente:

- La cepa es recuperada en medio PY sólido con los antibióticos correspondientes en caja petri, que se incuba invertida por 2 a 3 días.
- De esta caja se inoculan 100 ml de PY líquido, que se incuban por 16 a 18 horas.

- El medio PY se centrifuga a  $10^4$  rpm por 10 minutos, se elimina el sobrenadante y se resuspende en sedimento celular con 50 ml de medio salino estéril para lavar.
- Se centrifuga nuevamente y se elimina el sobrenadante. el sedimento se resuspende en un volumen pequeño de medio salino, 10 ml aproximadamente.
- El M.m se inocula a una densidad óptica (D.O) de 0.05 a partir de la suspensión concentrada; para lo cual se utiliza la ley de Lambert-Beer para calcular el volumen de la suspensión concentrada necesarios para tener la D.O deseada en el volumen final; esto es:

$$V = (V_{\text{final}} * 0.05) / (50 * D.O)$$

donde V es el volumen para inocular,  $V_{\text{final}}$  el volumen de M.m a inocular, y D.O es la densidad óptica de una dilución de 50 veces de la suspensión concentrada. La D.O se determina a 540 nm contra un blanco de agua.

- A los diferentes tiempos se toma 1 ml de muestra para leer D.O y 1 ml para determinar proteína. Los tiempos son: 0, 4, 8, 12 y 24 horas.

Para determinar la proteína de la muestra se sigue el procedimiento siguiente:

- Las muestras colectadas en eppendorf se centrifugan por 2 minutos a  $10^4$  rpm en microfuga, se elimina el sobrenadante y se resuspende en 0.5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5%. El total de muestras colectadas se dejan reposar para después:
- Centrifugar en microfuga, eliminar el sobrenadante totalmente.
- Resuspender en 0.2 ml de sosa 0.4 N. Tomar 40  $\mu$ l de esta solución, más 160  $\mu$ l de agua; y con la solución resultante determinar proteína por el método de Lowry (micro).

##### 5. Determinación de Proteína. (Lowry).

Reactivos:

Solución A:	NaOH	0.1 N
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2.0%

Solución B: Tartrato de sodio y potasio

$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$  2.0 %

Solución C:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1.0 %

Reactivo de Fenol (Folin-Ciocalteu)

Estandar comercial de Sigma Chemical Company.

Estandar de albumina sérica bovina: 400  $\mu\text{g/ml}$

Se prepara una solución ABC poco antes de utilizarse en el orden y con las proporciones siguientes: 98% de solución A, 1% de solución B, y 1% de solución C. Igualmente se prepara una dilución 1:2 del reactivo de Folin.

Lowry (micro).

- Muestra de 200  $\mu\text{l}$  que contiene la proteína.
- Agregar 1 ml de solución ABC, agitar y dejar reposar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 0.1 ml de la dilución de Folin, agitar y reposar 20 a 25 minutos a temperatura ambiente.
- Leer D.O a 625 nm contra el blanco respectivo.

Blanco: 200  $\mu\text{l}$  de agua

Estandar: 100  $\mu\text{l}$  de estandar de albumina, más 100  $\mu\text{l}$  de agua.

Lowry (macro).

- Muestra de 1 ml que contiene la proteína.
- 5 ml de solución ABC.
- 0.5 ml de la dilución de Folin.

Blanco: 1 ml de agua.

Estandar: 0.5 ml de estandar de albumina, más 0.5 ml de agua.

## 6. Obtención de Extractos Celulares.

- Centrifugar 250 ml de M.m crecido, a  $10^4$  rpm por 10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante totalmente.
- Suspender el sedimento en 0.5 a 1.0 ml de amortiguador de extracción de la enzima. (para glutaminasa es amortiguador de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, pH=8.0).
- Transferir la suspensión a un vial en baño de hielo,
- Romper células por sonicación 2 minutos (conservar en baño de hielo).
- Centrifugar en microfuga por 2 minutos.
- Recuperar el sobrenadante (extracto).

## 7. Actividad de Glutaminasa.

La actividad enzimática se determina por la cuantificación espectrofotométrica del amonio, según la reacción catalizada de Indofenol <sup>(30)</sup>

Obtención del Extracto.

Se sigue el procedimiento descrito en el apartado anterior.

Reacción de Glutaminasa:

La reacción de glutaminasa se hace con 50  $\mu\text{l}$  del extracto más 200  $\mu\text{l}$  de solución 10 mM de glutamina en amortiguador de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, pH=8.0. Se corre la reacción por la adición del extracto, para cada uno de los siguientes tiempos: 0, 15, 30 y 60 minutos de incubación a 37°C. La reacción se detiene con 0.25 ml de TCA (ácido tricloroacético) al 1.5%.

Nota: Para cada una de éstas reacciones se corre un blanco, en el que se elimina la glutamina del medio de reacción; de modo de poder cuantificar solo la producción de amonio debido a la hidrólisis enzimática de glutamina.

Desarrollo de Color (Reacción de Indofenol).

Reactivos:

Solución I:	Fenol	10 g/l
	Nitropusiato de sodio	0.05 g/l
Solución II:	NaOH	5 g/l
	Hipoclorito de sodio	0.42 g/l

La mezcla de reacción y los blancos respectivos se centrifugan 2 minutos en microfuga. Del sobrenadante se toman 20  $\mu$ l que se agregan a 180  $\mu$ l de agua. Para desarrollar color, a esta dilución se le agregan 1 ml de solución I y después 1 ml de solución II, en este orden. Reposar por aproximadamente 30 minutos. Leer D.O a 625 nm.

Blanco: 200  $\mu$ l de agua

Estandar: 20  $\mu$ l de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2 mM, mas 180  $\mu$ l de agua.

### ***B. Obtención de Revertantes.***

En la obtención de revertantes se procede a someter a un proceso de mutagénesis a una población de la cepa LM16, de la cual se seleccionan aquellas colonias que por alguna alteración genética ahora sean capaces de crecer en un medio mínimo suplementado con glutamina como fuente de carbono y nitrógeno. La selección se realiza depositando y extendiendo homogéneamente sobre la superficie de la placa de agar diferentes cantidades de células en un medio mínimo sólido con glutamina, y se recuperan aquellas colonias que aparezcan en éste medio, (ésta técnica de siembra se conoce en la jerga de laboratorio como plaquear).

Los procedimientos para mutagenizar son por mutagénesis espontánea y por mutagénesis inducida.

#### **Mutagénesis Espontanea.**

- Se obtiene una suspensión concentrada de células en medio salino, obtenidas a partir de un crecimiento en 100 ml de medio PY(Nal, Km) por 16 a 18 horas.

- De esta suspensión se hace una dilución 1:100 para leer D.O a 540 nm, para así conocer la concentración aproximada de células por mililitro, según el factor de  $(7 \times 10^8 \text{ cel/ml} : 1) = (\text{Concentración} : \text{D.O})$ .
  - Conociendo la concentración de células en la suspensión concentrada, se calcula el volumen necesario para tomar  $10^{10}$  células.
  - De la suspensión concentrada se hacen diluciones sucesivas de 1:10, de modo que de cada una de ellas pueda tomarse el mismo volumen para contener  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$  y  $10^6$  células respectivamente.
  - Estos volúmenes son plaqueados en sendas cajas petri con el medio mínimo selectivo. Se usaron dos medios: medio mínimo de glutamina y medio mínimo de glutamina más Biotina\*.
  - Las cajas se dejan en incubación hasta que aparezcan colonias aisladas.
- \* Se utiliza biotina en concentración de  $1 \mu\text{g/ml}$ , la razón de ello es que en éste laboratorio se ha observado que la Biotina evidencia el crecimiento de la bacteria en medio sólido.

#### Mutagénesis Inducida.

A efecto de aumentar la probabilidad de obtener revertantes, se utiliza nitrosoguanidina (NG) como agente mutagénico químico.

Previamente a la mutagénesis se hace necesario determinar el tiempo óptimo de exposición de una población a una cierta cantidad de mutágeno por medio de una curva de viabilidad.

#### Curva de Viabilidad.

Lo siguiente es una modificación del método que se describe por Miller<sup>(98)</sup>

- Inocular 30 ml de PY en erlenmeyer de 125 ml a D.O de 0.1, incubar por 5 horas.
- Centrifugar el medio PY por 10 minutos a  $10^4$  rpm, hacer dos lavados resuspendiendo en 30 ml de amortiguador citrato de sodio 0.1 M, pH=5.5.
- Resuspender en 8 ml de amortiguador citrato. Tomar ocho muestras de 1 ml y colocarlas en eppendorf a temperatura constante de  $30^\circ\text{C}$ .

- Agregar a cada muestra 0.05 ml de solución de NG ( 2 mg/ ml en amortiguador de citrato)
- Se detiene el tiempo de exposición centrifugando a los tiempos 5, 10, 30, 45, 60, 90 minutos respectivamente cada una de las muestras. Para el tiempo cero, no se le agrega mutágeno.
- Eliminar el sobrenadante y lavar una vez con 1 ml de amortiguador  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, pH=7.0.
- Resuspender en 1 ml de amortiguador  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, pH=7.0.
- De esta suspensión se hacen diluciones sucesivas del orden  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  de cada una de estas diluciones se plaquea 0.1 ml sobre medio PY(Nal,Km) sólido en sendas cajas petri.
- Las cajas se incuban a  $30^\circ\text{C}$  por aproximadamente tres días, se espera la aparición de colonias aisladas en menor cantidad conforme sea mayor el tiempo de exposición al mutágeno.

#### Mutagénesis con NG.

El procedimiento es el mismo a el inmediato anterior descrito, hasta el paso tres, en el que se toman dos muestras de 1 ml. A sólo una de las muestras se le agrega el mutágeno, y ambas se incuban a  $30^\circ\text{C}$  por 25 minutos.

Al cabo de este tiempo se lava y resuspende en 1 ml de amortiguador de fosfatos como ya se indicó. Estas muestras se vierten en sendos medios PY(Nal,Km) de 100 ml y se dejan en incubación por 16 a 18 horas.

Trancurrido el tiempo de incubación, se centrifuga el medio PY(Nal,Km), y se lava con medio salino. Se centrifuga y se resuspende. Con esta última suspensión concentrada se inoculan 250 ml de M.m glutamina más biotina más Nal y Km, a una D.O de 0.05 (enriquecimiento). Se dejan en incubación hasta que aparezcan muestras de crecimiento. Una vez lo cual, se centrifuga el M.m y se resuspende en poco volumen de medio salino. Se determina la concentración de células en esta suspensión según el factor conocido de Concentración:D.O.

De esta suspensión concentrada se hacen diluciones sucesivas 1:10 para plaquear un volumen que contenga  $10^{10}$ ,  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$  y  $10^6$  células. Cada uno de este

número de células se plaquea en una caja petri con M.m selectivo de glutamina y glutamina más biotina. Las cajas se dejan en incubación hasta la aparición de colonias aisladas.

### 9. Termoeestabilidad de Glutaminasa.

- Obtener el extracto del M.m crecido, como se ha descrito anteriormente.
- El extracto se pone a temperatura constante de 50°C
- Se toma una alícuota de 200 µl a los tiempos 2, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos. (El tiempo cero se toma antes de poner el extracto a 50°C).
- Cada una de las alícuotas se colectan y se conservan en baño de hielo.
- Estas muestras se centrifugan y se recupera el sobrenadante.
- De cada una de estas fracciones se determina actividad de glutaminasa a los 0, 15, 30 y 60 minutos de reacción. Nota: el ensayo de glutaminasa se hacen con cinco veces menos las cantidades señaladas en el apartado correspondiente (ensayo micro). Pero el desarrollo de color se hace en igual forma.
- Se gráfica por ciento de actividad del extracto contra tiempo de incubación a 50°C.

En este ensayo se utilizaron las cepas CE3-R28, LM16 y la revertante SL3 crecidas en M.m glutamina más succínico. Se inocularon dos medios de 250 ml para cada una de las cepas. La biomasa resultante de los 500 ml son resuspendidos con 2 ml de amortiguador de extracción de glutaminasa.

### 10. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.

Soluciones empleadas:

- Acrilamida 30% p/v
- Bisacrilamida 0.8% p/v

Ambas se guardan en frasco ambar en refrigeración.

- Amortiguador Tris-base 2 M, pH = 8.8 (ajustado con HCl concentrado)
- Persulfato de amonio 10%. (0.05 gr/0.5ml, se prepara poco antes de usarse)

- Temed (estandar comercial Sigma Chemical Company.)
- Azul de Bromofenol. Glicerol al 10% en Tris-base 0.4 M, pH = 8.8, más una pisco de azul de bromofenol.
- Amortiguador de corrida: 0.1 M Tris-base, 0.77 M glicina. Se prepara con anterioridad y se conserva en refrigeración. Al momento de usarse se diluye cinco veces con agua desionizada, para llenar la cámara de electroforesis.

#### Preparación del Gel.

El gel se prepara de 1.5 mm de grosor, con los volúmenes siguientes de las soluciones mencionadas

	Gel superior	Gel inferior
Acrilamida 30%	2 ml	8 ml
Bisacrilamida 0.8%	1 ml	10 ml
Tris-base 2 M	0.65 ml	6 ml
Agua	10 ml	6 ml
Persulfato 10%	50 $\mu$ l	40 $\mu$ l
Temed	40 $\mu$ l	30 $\mu$ l

El gel se prepara mezclando las soluciones, agregando al final el persulfato y el Temed. Se homogeniza la mezcla y se vierte con pipeta en el espacio del grosor mencionado entre dos vidrios. Se agrega al final un poco de agua a lo largo de la parte superior del gel para facilitar la polimerización.

Se esperan aproximadamente treinta minutos para que gelifique, esto puede notarse por la diferencia de difracción entre el gel y la parte no gelificada, que se retira. Sobre este gel, se vierte la mezcla para el gel superior que se prepara de igual forma, El peine para formar los pozos, se coloca antes de que el gel superior gelifique. Una vez gelificado se retira, cuidando de no romper los pozos. Estos son lavados con agua desionizada varias veces y se secan introduciendo una pequeña tira de papel filtro.

Previamente a cargar el gel con las muestras, este se precorre a temperatura de 4°C con amperaje constante de 15 mA durante 6 a 8 horas.

Las muestras se cargan al gel con  $\frac{1}{4}$  de su volumen de solución de bromofenol.

Las condiciones de electroforesis son: voltaje constante de 40 mV durante el gel superior y de 80 mV durante el gel inferior. Se corre el gel por un lapso aproximado de 12 a 14 horas a temperatura de 4°C.

#### 11. Actividad de Glutaminasa en Gel de Poliacrilamida.

El método que se describe a continuación es para revelar en un gel de poliacrilamida, posterior a la electroforesis del mismo, bandas asociadas a la actividad de glutaminasa. El método ha sido descrito y utilizado previamente para la glutaminasa de *E.coli* <sup>(34)</sup>, y para la glutaminasa de hígado y riñón de mamíferos <sup>(3)</sup>

El procedimiento es el siguiente:

Una vez terminada la electroforesis, el gel se retira de la cámara y se separa de uno de los vidrios. Se lava en frío con aproximadamente 500 ml de amortiguador  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, pH=8.0, dos veces por 15 minutos.

La mezcla de reacción para revelar se prepara de la siguiente manera: se pesan las cantidades señaladas de los siguientes reactivos:

L-glutamina	0.12 gr
NAD <sup>+</sup>	0.08 gr
NBT	0.008 gr
PBS	0.003 gr

se colocan en un vaso de precipitado de 50 ml aislado de la luz y se conservan en refrigeración hasta poco antes de ser utilizados.

NAD<sup>+</sup>. Nicotin Adenin Dinucleotido.

NBT. Nitro Blue Tetrazolium.

PBS. Phenazine methosulfate.

Los reactivos son disueltos con 20 ml de amortiguador fosfatos  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1M, pH=8.0, y entonces se agregan 75  $\mu\text{l}$  de un estandar comercial de GDH (especificaciones: 14 mg prot/ml, 53 unidades/mg)

Esta solución se diluye a su vez con 20 ml de solución de agarosa al 2% p/v en amortiguador fosfatos. (Nota: la solución de agarosa debe calentarse hasta la

disolución total y esperar a que tenga  $\cong 40^{\circ}\text{C}$  para entonces agregarse a la mezcla de reacción.)

La mezcla final se vierte sobre el gel de poliacrilamida, y se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$ , aislado de la luz por aproximadamente 30 minutos.

Se realiza un control con un gel corrido en electroforesis con idénticas condiciones, pero en el que se elimina la glutamina de la mezcla de reacción para revelar actividad. De modo que las bandas que aparezcan con la mezcla completa sean específicas a glutaminasa.

## 12. Purificación de la Glutaminasa.

La técnica de purificación ha sido establecida en éste laboratorio por el trabajo realizado por A. Huerta-Saquero. El procedimiento que se describe a continuación es sólo parcial, ya que no se pretende para los fines de este proyecto, lograr una purificación a homogeneidad.

- Inocular 6 fermentadores con 1.5 l cada uno de M.m glutamina más succínico a una densidad óptica de 0.05, e incubar por 14 a 16 horas.
- Recuperar el sedimento, lavar con medio salino y resuspender con aproximadamente 40 ml de amortiguador  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, 0.5 mM ditioneitol (DTT), 5 mM glutamina, pH 8.0.
- Dividir en fracciones de 10 ml aproximadamente y sonicar cada una de ellas por 10 minutos.
- Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos y recuperar el sobrenadante.
- El sobrenadante se precipita al 20% p/v con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , agitando en baño de hielo durante 30 minutos.
- Repetir los dos últimos pasos, de modo que se agregue un 20% p/v más de sulfato de amonio para tener finalmente una solución al 40%. Esta vez recuperar el sedimento que es resuspendido en lo mínimo posible con el amortiguador de extracción, usado en el segundo punto.

- El extracto resuspendido se pone en diálisis contra un litro del mismo amortiguador por aproximadamente 14 a 16 horas.
- Al término de la diálisis el extracto es cargado a una columna de DEAE celulosa (resina de intercambio iónico), previamente hidratada, lavada, y equilibrada a pH 8.0 con amortiguador  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 M
- Se realiza un lavado con amortiguador  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, 0.5mM DTT, 5 mM glutamina , pH 8.0; para eliminar aquellas proteínas poco cargadas a este pH.
- El lavado se detiene hasta que disminuya la absorbancia a 280 nm en las fracciones colectadas.
- Posteriormente se procede a eluir las proteínas con un gradiente lineal ascendente de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M vs 1.0 M, ambos con 0.5 mM DTT y 5 mM glutamina. La elución comienza a partir de la fracción siguiente del término de lavado. El grado de elución también se monitorea por absorción en UV a 280 nm.
- A todas las fracciones colectadas se les determina actividad de glutaminasa (ensayo micro, reacción de 1 hora). Aquellas que son positivas se colectan.
- El volumen final colectado es precipitado con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 50% p/v, agitando en baño de hielo por 30 minutos. Se centrifuga a 12000 rpm y se recupera el sedimento que es resuspendido y puesto en diálisis, como ya se ha explicado.
- El extracto purificado puede conservarse en congelación a  $-70^\circ\text{C}$ .

## RESULTADOS

El primer intento para obtener revertantes de la cepa LM16 que pudieran crecer en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno fué seleccionar mutantes espontáneos de esta cepa. Sólo se observaron colonias aisladas en el M.m de glutamina más biotina. En una segunda condición de glutamina no hay aparición de colonias. El número de colonias observadas se tabulan respecto del número de células sembradas en el medio de selección. (Tabla 1).

Tabla 1.  
Mutagénesis espontánea.

Células Sembradas	Colonias Observadas
$10^5$	---
$10^6$	---
$10^7$	10
$10^8$	120
$10^9$	1038
$10^{10}$	---

Condición de selección: M.m glutamina más biotina.  
Frecuencia de mutación:  $\approx 1 \times 10^{-6}$ . --- No observadas

Se checó el fenotipo de las colonias aisladas en los siguientes medios (Tabla 2):

Tabla 2.  
Fenotipo en Medio Sólido.

	CE3-R28	LM16	Revertantes
LB	-	-	-
M.m gln + biot	+	-	+
M.m. gln	-	-	-
M.m. gln + succ	++	++	++
PY (Km,Nal)	-	+	+

+ Con crecimiento. ++ Crecimiento significativo. - Sin crecimiento.

El medio de LB se usa como control de contaminación ya que *Rhizobium etli* no crece en él. Se utilizó Kanamicina en el medio PY, puesto que la resistencia a este antibiótico está asociada a el transposón Tn5-mob presente en la mutante LM16. Se desea conservar esta mutación en las revertantes aisladas.

Se seleccionaron aquellas colonias que crecieron en M.m sólido de glutamina más biotina. De este grupo se determinó la actividad enzimática de glutaminasa para un grupo de siete, encontrando que sólo una de ellas tenía actividad y el resto no la presentaban. Posteriormente, en el crecimiento en el M.m líquido de glutamina como fuente de carbono y nitrógeno sólo la colonia que presentó actividad de glutaminasa fue capaz de crecer en tales condiciones; para el resto el crecimiento es poco significativo y semejante al de la cepa LM16.

Puesto que se deseaba obtener un mayor número de revertantes entre las cuales poder encontrar algunas en las que alguna otra vía de degradación de glutamina compensara la falta de glutaminasa, se decidió no continuar probando el resto de colonias aisladas en este primer intento; ya que la probabilidad de encontrar éxitos entre las mutantes de esta población puede ser muy baja debido a que la frecuencia de mutación espontánea es muy baja ( $1 \times 10^{-6}$ ).

Para aumentar la probabilidad de obtener revertantes, se empleó una mutágenesis inducida con Nitrosoguanidina (NG) como agente mutagénico químico. La NG es una agente alquilante, que altera el apareamiento por puentes de hidrógeno de las bases nitrógenadas en el DNA, produciendo mutaciones puntuales. Un mutágeno con estas características producirá cambios discretos en la secuencia, lo que permitirá sólo una modificación en el gene sobre el recaiga la mutación.

Se planeó mutagénizar sobre el M.m sólido de glutamina y glutamina más biotina, colocando un poco del mutágeno en el centro de la caja que tiene una población de la cepa LM16. Se esperaba que en la difusión del mutágeno se formaran gradientes de concentración sobre los cuales aparecieran colonias sobrevivientes. Sin embargo, no se observó sobrevivencia; esto puede deberse a que la velocidad de difusión sea mayor a la velocidad de crecimiento de la bacteria, por lo que al estar homogéneo el medio la cantidad de mutágeno es demasiada.

Entonces se decidió mutagenizar por el método convencional, para lo cual es necesario determinar el tiempo óptimo de exposición de una población a una cierta cantidad de mutágeno por medio de una curva de viabilidad; para así conocer el tiempo necesario de exposición para tener un 50% de sobrevivencia. Los resultados de esta curva de viabilidad se muestran en la tabla 3. La gráfica correspondiente se presenta en la figura 6.

Tabla 3.  
Viabilidad de *Rhizobium etli*

Tiempo (minutos)	Colonias Observadas	% Sobrevivencia
0	408	100
20	250	61
30	214	52
45	131	32
60	79	19

Colonias observadas en medio PY(Km,NaI).

De estos resultados se decidió tomar el tiempo de 25 minutos como el tiempo óptimo de exposición para tener aproximadamente un 50% de sobrevivencia en la población, considerando la tendencia de la gráfica.

Una vez que se determinó el tiempo de exposición, se procedió a mutagenizar como ya se ha descrito. En este proceso se tomó como control a una población de la cepa LM16 sobre la que se realizó el mismo tratamiento, excepto que no fue expuesta al mutágeno.

De este modo fue posible comparar la frecuencia de mutación espontánea e inducida, ambas con enriquecimiento en el medio mínimo de selección. Es decir, posterior a la mutagénesis ambas poblaciones son recuperadas en medio PY(Km,NaI) y de este medio son incubadas en M.m. líquido de glutamina como medio de selección; es en este periodo cuando puede enriquecerse la población con bacterias capaces de crecer en tales condiciones, para que posteriormente sean aisladas en el medio selectivo sólido.

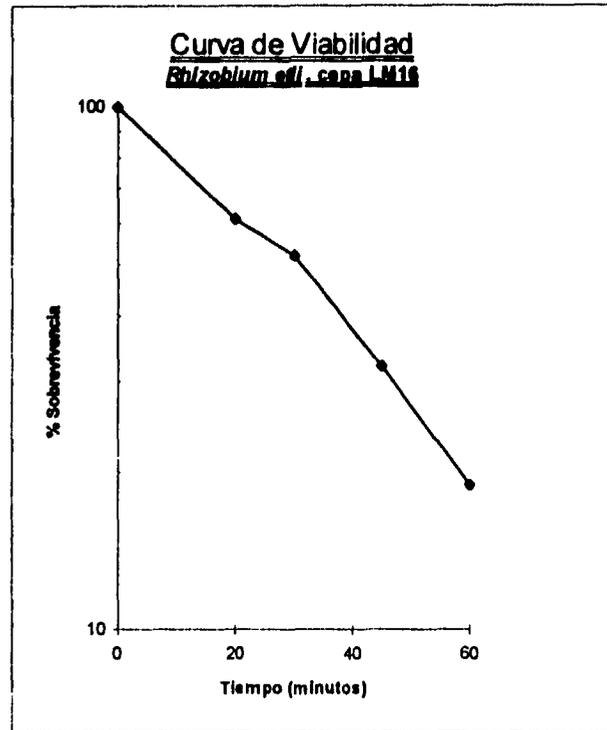


Figura No.6

Se usaron dos condiciones de selección: M.m de glutamina y M.m. de glutamina más biotina, solamente en esta última condición es donde fue posible observar la aparición de colonias aisladas. Igualmente que en el caso de la mutagénesis espontánea se tabulan el número de colonias observadas después de siete días de incubación, respecto del número de células sembradas. (Tabla 4).

Tabla 4.  
Mutagénesis de *Rhizobium etli*, cepa LM16.

No. células	Con mutágeno	Sin Mutágeno
	Gln + Biot	Gln + Biot
$10^{10}$	+++	+++
$10^9$	+++	3200
$10^8$	2400	440
$10^7$	230	50
$10^6$	25	---

Selección en M.m. sólido Glutamina más Biotina  
 --- No observadas. +++ Varias colonias no aisladas  
 Las colonias aparecieron después de siete días de incubación.

Con estos datos fue posible comparar la frecuencia de mutación espontánea con y sin enriquecimiento, mostrando, como se puede notar en la tabla 5, que la segunda es mayor que la primera; y además que la frecuencia de mutación inducida en varias veces mayor que la espontánea.

Tabla 5.  
Frecuencia de mutación de *Rhizobium etli*, cepa LM16

Condición de Mutagénesis	Frecuencia de mutación
Espontánea s/enriquecimiento	$1 \times 10^{-6}$
c/enriquecimiento	$4.2 \times 10^{-6}$
Inducida c/enriquecimiento	$24 \times 10^{-6}$

Las colonias observadas se transfirieron por picadura a medio PY(Km,Nal) para su recuperación, y así mismo sobre medio LB como control de contaminación.

En esta ocasión se consideró como primer parámetro de selección la capacidad de crecer en M.m. líquido de glutamina y de glutamina más succínico; para así evitar falsos positivos en los que se presenten colonias que crezcan en el medio selectivo sólido pero no en el medio líquido de iguales condiciones.

Para lo cual se realizó un sondeo rápido del crecimiento en líquido en tubo de ensayo de 70 de las colonias aisladas (todas ellas obtenidas por mutagénesis inducida). Este crecimiento se hizo en tubos de ensayo de 12x100 con 6 ml de M.m., con dos condiciones de crecimiento que fueron glutamina y glutamina más succínico.

Las cepas fueron clasificadas de acuerdo a su crecimiento caracterizado por la turbiedad que presentaron en M.m de glutamina, con respecto al control de la cepa silvestre. Se encontraron 23 colonias con una turbiedad mucho mayor a la silvestre, otras 25 con una turbiedad mayor, y 13 con una turbiedad igual; las nueve restantes no crecieron en esta condición. De estos tres grupos se seleccionan aleatoriamente 44 de ellas para corroborar el crecimiento en M.m. de glutamina por la cinética de crecimiento.

La razón de esta selección aleatoria en base a el crecimiento, es la de tener diversidad en las revertantes. Es decir, tener la posibilidad de que si existe más de una vía de degradación de glutamina que pueda compensar la falta de glutaminasa, entonces pudiera suceder que la efectividad de esta en la degradación del aminoácido pueda reflejarse en un mayor o menor crecimiento.

Del último grupo de 44 ya caracterizadas por su cinética de crecimiento, aquellas que tuvieron un crecimiento favorable en tales condiciones, fueron seleccionadas para determinarles actividad de glutaminasa; de esta manera fueron seleccionadas 32 de las 44.

A su vez de este grupo de 32, en el que todas presentaron actividad de glutaminasa en diferente proporción a la cepa silvestre, fueron seleccionadas finalmente 10 de ellas, que presentan una actividad de glutaminasa mayor, igual o menor que la de la cepa silvestre. La razón nuevamente es tener diversidad en el fenotipo, ésta vez ya sea por alteración de la regulación transcripcional de la enzima ó bien por cambios en sus propiedades cinéticas. Con este grupo de 10 se corrobora la cinética de crecimiento ( figura 7) en M.m. líquido de glutamina y de glutamina más succínico; además de la actividad de glutaminasa en ambas condiciones de crecimiento.

CURVA DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS REVERTANTES  
(Medio mínimo Gln ● y Gln-Suce ◊ )

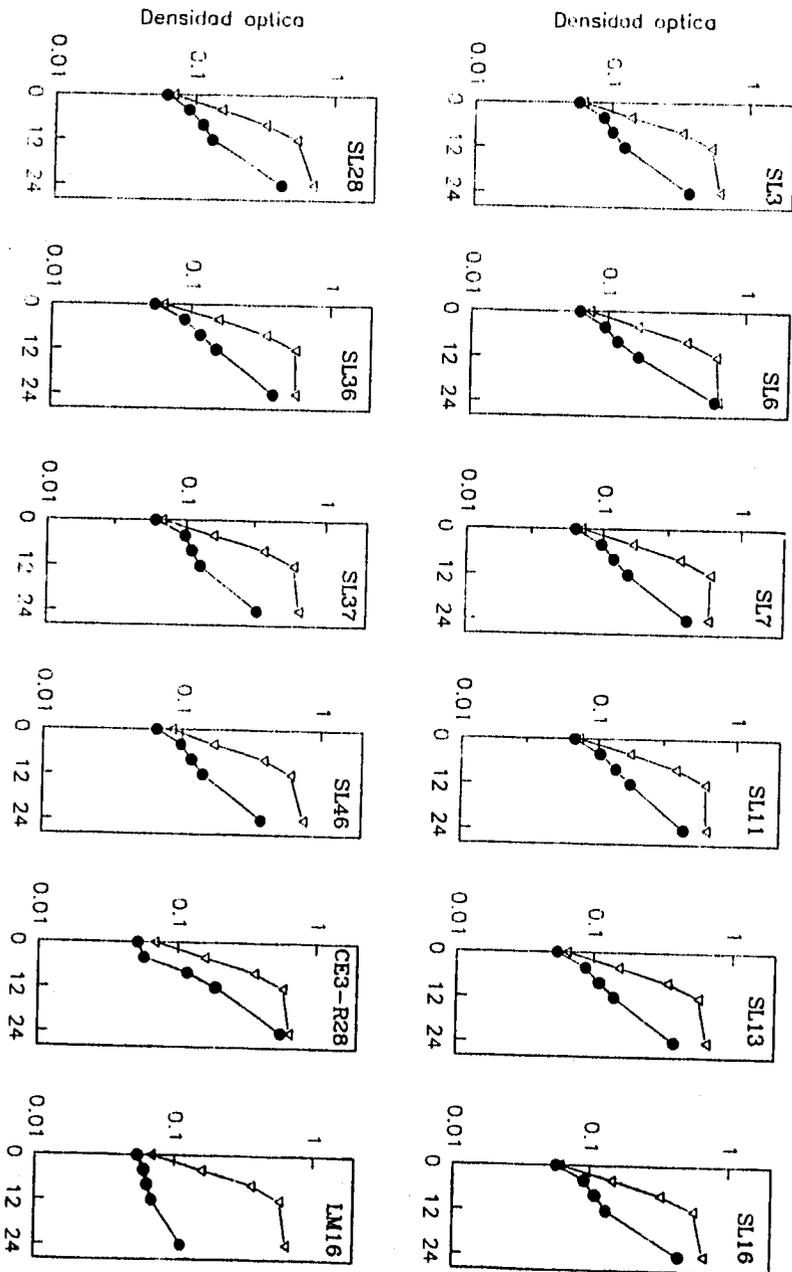


Figura No. 7

Con éstos resultados se puede observar que no existe una correlación clara entre la actividad enzimática y el crecimiento. La cinética de crecimiento de las 10 revertantes finalistas se muestran en la figura 7.

Por otro lado, en la tabla 6 se muestran los datos de actividad enzimática de glutaminasa para las mismas 10 revertantes y para los controles de las cepas LM16 y CE3-R28. Estos mismos resultados se muestran gráficamente en el histograma de barras de la figura 8.

Tabla 6  
Actividad de Glutaminasa

Cepa	Glutamina	Glutamina+Succínico
CE3-R28	73.04 ± 12.26	64.03 ± 11.04
LM16	5.37 ± 1.70	5.41 ± 0.57
SL3	83.14 ± 5.27	36.46 ± 4.37
SL6	32.14 ± 0.93	101.60 ± 28.36
SL7	33.54 ± 3.29	69.90 ± 7.65
SL11	71.31 ± 2.51	89.76 ± 8.10
SL13	53.74 ± 6.86	105.11 ± 15.49
SL16	65.28 ± 6.87	66.53 ± 5.40
SL28	---	---
SL36	13.29 ± 0.67	46.49 ± 1.32
SL37	52.60 ± 3.70	37.32 ± 4.25
SL46	61.15 ± 5.84	27.63 ± 4.08

La Actividad de Glutaminasa está expresada como  $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ .  
 Los extractos fueron obtenidos a partir de un crecimiento por 20 hrs. en el M.m respectivo  
 El intervalo de confianza es del 90%, para un conjunto de determinaciones por triplicado.  
 --- No existe reproducibilidad en las determinaciones.

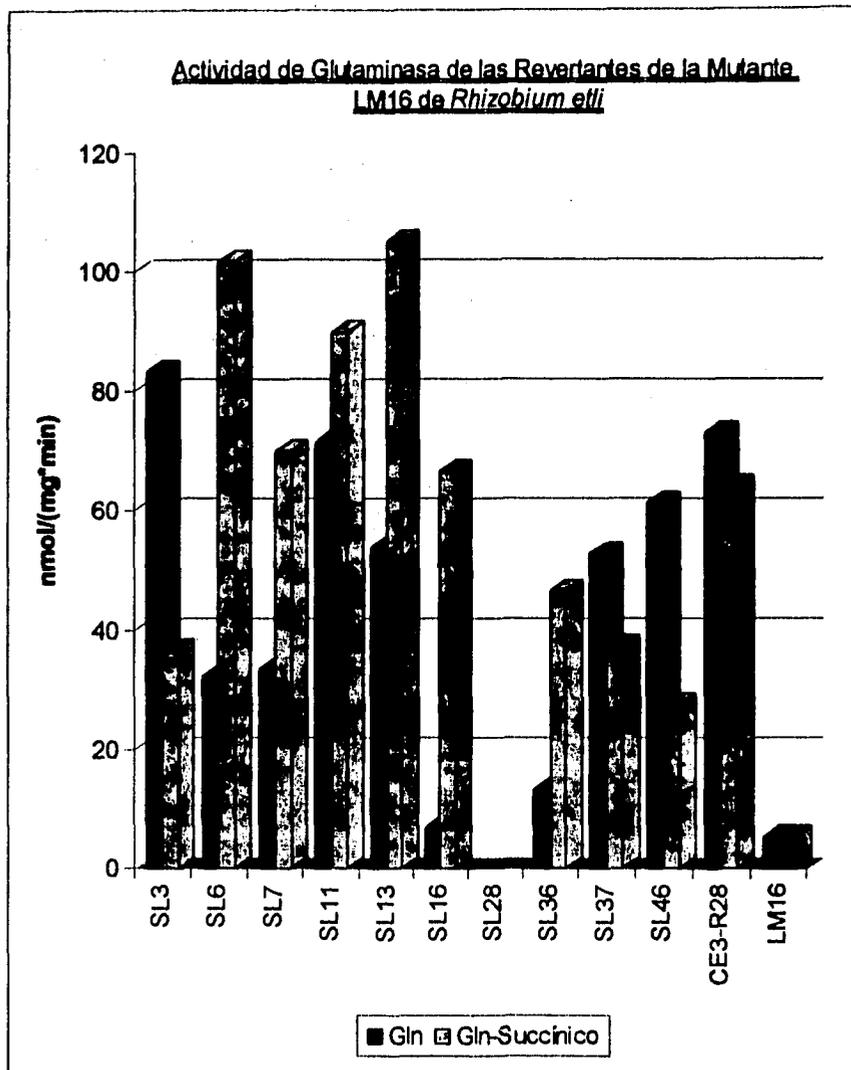


Figura No. 8

Estos resultados indican que la única manera de que la mutante LM16 recupere nuevamente la capacidad de crecer en medio mínimo de glutamina como fuente de carbono y nitrógeno, es recuperar la actividad de glutaminasa; y que otras vías que

participan en la degradación de glutamina son poco probables para sustituir la falta de glutaminasa en esta mutante.

La cuestión siguiente por resolver era saber si esta actividad de glutaminasa expresada en las revertantes, se debe a la misma enzima que se encuentra alterada en la mutante LM16 ó es debida a alguna isoenzima de glutaminasa. Puesto que la mutante LM16 presenta una actividad pequeña y constante de glutaminasa en varias condiciones de crecimiento; existe la posibilidad de que esta actividad se deba a una isoenzima de la glutaminasa que se expresa constitutivamente y que debido a la mutación inducida en las revertantes, ahora sea capaz de sustituir a la glutaminasa alterada. Los mecanismos posibles por los cuales puede ocurrir esta sustitución son por tener una síntesis mayor de la isoenzima, ó por haber modificado sus propiedades cinéticas. Se pensó entonces en la manera de poder diferenciar alguna posible isoenzima de glutaminasa que se exprese ahora en las revertantes obtenidas. Es decir, que la glutaminasa que se encuentra reprimida en la cepa LM16 se mantenga en éste estado en las revertantes y estas expresen ahora la posible isoenzima.

Una de las propiedades por las que pueden diferenciarse las isoenzimas, es la termoestabilidad; y es esta propiedad la que se utilizó para diferenciar la actividad de glutaminasa de los extractos de la cepa silvestre y de la mutante. Estos resultados se tabulan como porciento de actividad conservada respecto del tiempo de calentamiento a temperatura constante de 50°C (Tabla 7). La gráfica correspondiente a la termoestabilidad de glutaminasa en la mutante LM16 y la cepa silvestre CE3-R28 se presenta en la figura 9.

De acuerdo a estos datos, se pensó que la actividad residual que presenta la cepa mutante LM16 se debe a una glutaminasa termoestable, que es diferente a la enzima expresada en la cepa silvestre la cual es termolábil. Se dedujo entonces que es posible diferenciar la actividad de glutaminasa en los extractos de las cepas revertantes por calentamiento de los mismos a 50°C durante 15 minutos que es el tiempo en el cual se observa la diferente estabilidad de la enzima.

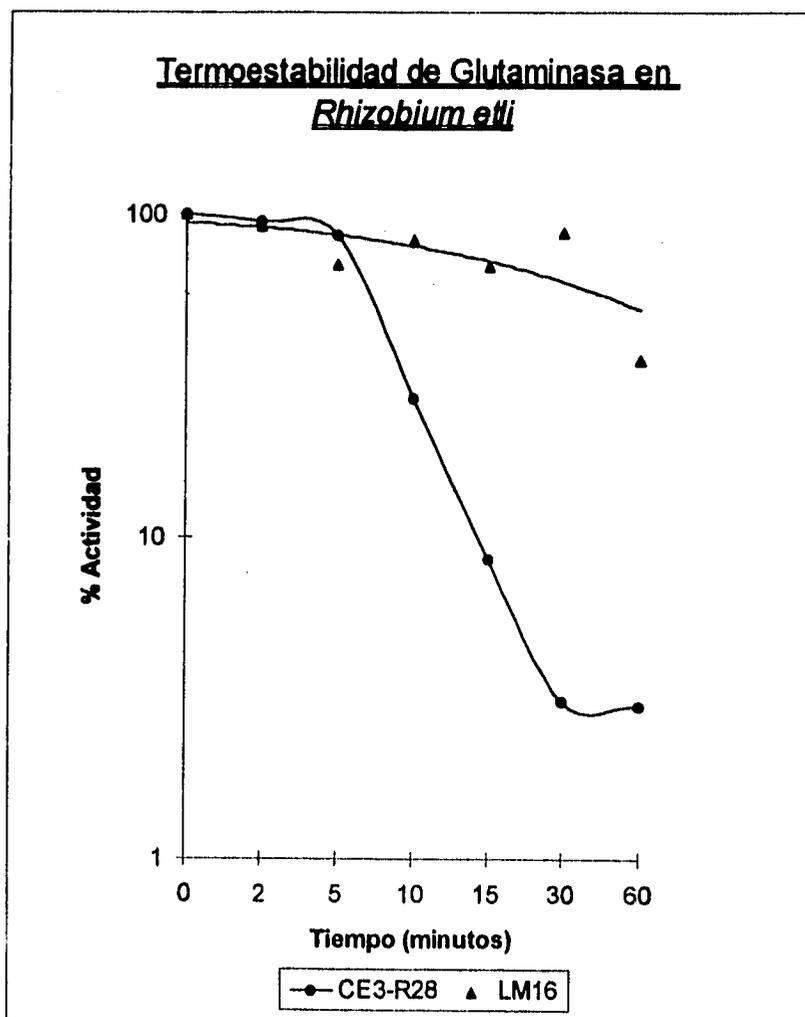


Figura No.9

Tabla 7.  
Termoestabilidad de Glutaminasa

Tiempo	% de Actividad	
	CE3-R28	LM16
0	100	100
2	99.6	91.42
5	62.3	69.6
10	30.7	82.7
15	8.5	68.6
30	2.98	87.3
60	3.10	35.42

Los extractos fueron obtenidos de un crecimiento por 20 hrs de M.m. glutamina más succínico. La actividad de las cepas CE3-R28 y LM16, fue de 80.32 y 4.43 ( $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) respectivamente. Tiempo de calentamiento en minutos

Para conocer cual era la isoenzima que presentaban las revertantes obtenidas, se les determinó la termoestabilidad de glutaminasa por calentamiento a 50°C durante 15 minutos. En la tabla 8 se encuentran reportados los datos de actividad sin y con calentamiento, para así establecer el porcentaje de actividad conservada en éstos extractos durante el calentamiento.

Puesto que todas las revertantes presentan una glutaminasa termolábil, similar a la de la cepa silvestre, se pensó que se trataba entonces de una reversión verdadera, es decir, la misma enzima alterada en la mutante LM16 ahora es expresada en las revertantes, presentando el mismo comportamiento que el de la cepa silvestre.

Sin embargo, cabía la posibilidad que la mutación originada en la mutante LM16 hubiese alterado la glutaminasa termoestable, de modo que ahora sea termolábil. Para poder diferenciar entre éstas dos posibilidades se pensó en utilizar una segunda propiedad para poder diferenciar entre dos posibles isoenzimas, como lo es la movilidad por electroforésis en un gel de poliacrilamida; el cual se revela por actividad específica *in situ*.

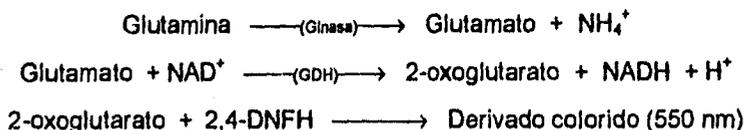
**Tabla 8.**  
**Termoestabilidad de Glutaminasa de las cepas revertantes.**

<i>Cepa</i>	<i>Actividad de Glutaminasa</i>		<i>% de Actividad</i>
	<i>Sin calentamiento</i>	<i>Con calentamiento</i>	
CE3-R28	82.0	4.0	4.9
LM16	5.0	4.2	84.0
SL3	40.6	3.9	9.6
SL6	93.7	4.9	5.2
SL7	64.2	2.6	4.0
SL11	77.5	6.3	8.1
SL13	91.4	7.5	8.2
SL16	59.6	3.4	5.7
SL28	67.2	2.7	4.0
SL36	45.0	2.8	6.2
SL37	33.8	4.5	13.2
SL46	31.3	4.1	13.1

Los extractos de las cepas revertantes fueron obtenidos de M.m glutamina más succínico en un crecimiento por 20 horas.  
 Actividad en  $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$

El primer diseño que se hizo para revelar actividad de glutaminasa en gel, fue por la producción directa de amonio; el cual con la reacción de Indofenol da un color azul visible. Sin embargo, después de varios intentos y modificaciones, se pudo finalmente detectar amonio en un gel de poliacrilamida; pero la difusión del ión es demasiada rápida para poder aplicar el ensayo a la detección de actividad enzimática en el gel.

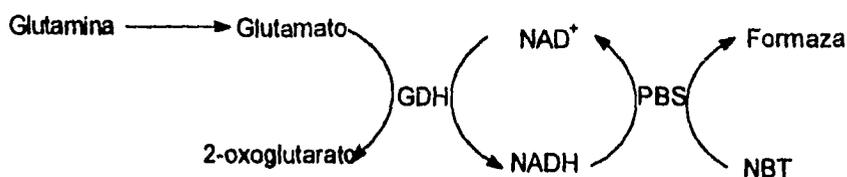
Un segundo intento fue acoplar la actividad de glutaminasa con glutamato deshidrogenasa (GDH), y revelar el producto final de 2-oxoglutarato como el derivado de la 2,4-dinitrofenilhidrazina.(2,4-DNFH), el cual da un color amarillo-rojizo. Este diseño puede esquematizarse como sigue:



Se pensó en la funcionalidad de este diseño, ya que se ha reportado en la literatura la detección de  $\alpha$ -cetoácidos en gel de poliacrilamida por la reacción de éstos con 2,4-DNFH y/o análogos.<sup>(68,120)</sup>

Los ensayos preliminares mostraron que la reacción de color con 2-oxoglutarato es lineal en un intervalo de concentraciones que ofrece una buena sensibilidad. Así mismo, se demostró el acoplamiento de las reacciones en solución, y pudo detectarse estándares de 2-oxoglutarato en gel de poliacrilamida. Sin embargo, al acoplar las reacciones para revelar actividad de glutaminasa en el gel, no hubo éxito. Esto puede deberse a una difusión del cetoácido que produce color, puesto que como producto de la GDH que se encuentra en solución incubando al gel; el cetoácido se diluye en la solución de incubación, y no es fijado en la matriz del gel.

Se decidió entonces probar un tercer sistema de reacción que se basa en la reducción de derivados de Tetrazolium por el cofactor NADH; el producto de la reducción es un compuesto de color azul-violeta. Esta reacción es catalizada por fenilmetasulfato (PBS) y puede ser aplicable a la detección de deshidrogenasas. Esquemáticamente el sistema de reacción funciona de la siguiente manera:



El producto de la glutaminasa es tomado como sustrato por la GDH para oxidarlo, y a su vez la coenzima reducida es reoxidada a NAD<sup>+</sup> para así entonces transferir los electrones al azul de nitrotetrazolium (NBT) cuya forma reducida

(Formazan) da un color azul-purpura. Esta última reacción es mediada catalíticamente por fenilmetasulfato (PBS).

Los primeros experimentos de este ensayo (figura 10) utilizando extractos crudos revelaron una sola banda en el gel de poliacrilamida asociada a la actividad de glutaminasa en la cepa silvestre, misma que en caso de la mutante LM16 no aparece. En estos dos casos no fue posible observar una segunda banda, ya sea en la cepa silvestre o en la mutante. Es de notar que toda vez que se usaron extractos crudos, se observó una banda asociada a una actividad inversa a la que desarrolla color en el gel. Se incluyó un extracto de la cepa CE3-pCD24, la cual es una cepa sobreproductora de glutaminasa, a fin de poder observar una posible segunda banda de glutaminasa; con lo cual podría atribuirse a esta isoenzima la mayor actividad de glutaminasa en esta cepa. Los resultados obtenidos con este extracto (figura 10.B) no mostraron más que una sola banda en igual posición a la de la silvestre pero de mayor intensidad. Este mismo comportamiento se presentó para un extracto purificado de la misma cepa, con la diferencia de que la banda de reacción inversa desaparecía.

De estos resultados se puede concluir que el plásmido pCD24 es aquel en el que se encuentra clonado el gene que codifica para la glutaminasa termolábil presente en la cepa silvestre. Esto mismo está confirmado por el hecho de que con los extractos crudos de la mutante complementada (LM16-pCD24), se presentó la misma banda de la cepa silvestre (figura 10.D); y que cuando a una cepa silvestre de *Rhizobium meliloti* se le introduce este plásmido, se presentan dos bandas, una semejante a la observada en la cepa silvestre de *Rhizobium meliloti* y otra semejante a la de *Rhizobium etli*, además de varias bandas intermedias entre estas dos (figura 10.F)

Cuando se aplicó este experimento con los extractos crudos de las cepas revertantes, no fue posible observar ninguna banda específica asociada a glutaminasa, solo fue posible observarla para el extracto crudo de la cepa silvestre y para el extracto purificado de la cepa CE3pCD24.

Con la finalidad de poder observar si en alguna condición de crecimiento pudiera expresarse preferentemente alguna isoenzima de glutaminasa, de modo que pudiese aparecer una segunda banda de glutaminasa, diferente a la ya observada; se

realizaron ensayos en los que se utilizaron extractos crudos obtenidos a partir de diferentes condiciones de crecimiento de las cepas CE3-R28, LM16 y algunas de las revertantes. Los resultados obtenidos mostraron solamente la banda ya característica.

Al utilizar un extracto purificado de la cepa LM16 fue posible observar una banda asociada a glutaminasa que migra en una posición diferente a la que aparece en la cepa silvestre y que es coincidente con aquella banda de interferencia en los extractos crudos (figura 10.G). Al mismo tiempo se supo que este extracto purificado es termoestable respecto a su actividad de glutaminasa.

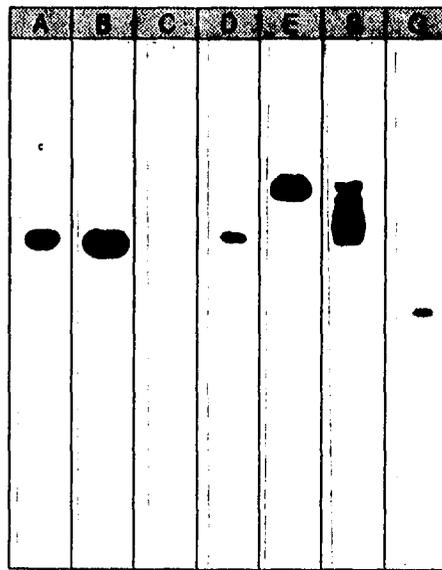


Figura. No. 10

Actividad de glutaminasa en gel nativo de poliacrilamida. I

(A).CE3-R28, silvestre. (B).CE3pCD24. (C).LM16.(D).LM16pCD24.  
(E).RM1021. (F).RMpCD24. (G).LM16, extracto parcialmente purificado.  
En todos los casos se trata de extractos crudos (excepto G) obtenidos  
de crecimiento en medio mínimo de glutamina más succínico,

Se decidió entonces purificar los extractos de la cepa silvestre y de una de las revertantes, en este caso de la SL13; para con ellos revelar actividad *in situ* en el gel de poliacrilamida.

Una vez que se tuvieron los extractos purificados de la cepa CE3-R28 y SL13 pudo entonces observarse, para el caso del extracto purificado de la cepa SL13, una banda de igual migración que la correspondiente a la mutante LM16. Los extractos purificados de las cepas SL13 y LM16 son termoestables y las bandas de actividad en el gel de poliacrilamida se mantienen en la misma posición si el extracto se calienta o no.(figura 11). En lo que respecta a la cepa silvestre, solo aparece la banda característica de los extractos crudos, no fue posible percibir una segunda banda inferior. (figura 11.A)

Para de poder observar una segunda banda inferior en los extractos de la cepa silvestre, se decidió intentar la purificación de un extracto obtenido a partir de un crecimiento de 24 horas en M.m. de amonio más succínico; puesto que se sabe que en tales condiciones la relación entre la actividad de glutaminasa termolábil y termoestable es menor, es decir, se aumenta la proporción de la glutaminasa termoestable, comparado con un crecimiento en glutamina más succínico del que habitualmente se purificaron los extractos por razones de tener mayor biomasa.

Los resultados de este experimento mostraron dos bandas en el extracto purificado de la cepa silvestre en tales condiciones. Una de ellas correspondiente a la banda ya característica y una segunda banda inferior y muy tenue que coincide con la migración de la banda observada para los extractos purificados de la mutante LM16. (figura 11.B). Estos resultados sugieren la existencia de dos isoenzimas de glutaminasa en *Rhizobium etli* diferenciadas por su termoestabilidad y movilidad electroforética. Una glutaminasa regulada y termolábil (A), y otra constitutiva y termoestable (B). La glutaminasa A tiene una menor migración que la glutaminasa B en el gel de poliacrilamida. Por el comportamiento observado durante la purificación de la enzima en una columna de intercambio iónico, se deduce que su carga es semejante (coeluyen); por lo que entonces la diferencias de migración pueden atribuirse a diferencias de peso molecular.<sup>(comunicación personal)</sup>



Figura No. 11

**Actividad de glutaminasa en gel nativo de poliacrilamida. II**

Todos los extractos fueron parcialmente purificados señalando en cada caso a partir de que condición de M.m fueron obtenidos

- (A). CE3-R28 de glutamina más succínico. (B). CE3-R28 de amonio más succínico.  
 (C). LM16 de glutamina más succínico. (D). Igual que C, y el extracto puro es calentado previamente a 50°C por 15 minutos. (E). SL13 de glutamina más succínico.  
 (F). Igual que E, y el extracto puro es calentado previamente a 50°C por 15 minutos.

Para caracterizar detalladamente la termoestabilidad de una de las revertantes, puesto que sólo se había determinado a un tiempo, se probó esta propiedad en la cepa SL13 contra el tiempo de calentamiento. Esta revertante tiene un comportamiento similar a el de la cepa silvestre (figura 12). Los datos correspondientes se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 9.  
Termoestabilidad de Glutaminasa. Revertante SL13.

Tiempo	% de Actividad		
	CE3-R28	LM16	SL13
0	100	100	100
2	88.3	83.9	100
5	71.1	81.7	74.0
10	23.6	74.4	28.5
15	8.2	62.7	4.6
30	4.7	32.3	3.9
60	4.6	33.8	3.5

Actividad inicial: CE3-R28= 76.15, LM16= 8.4, SL13= 130; expresada como  $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ . Extractos obtenidos de un crecimiento por 20 horas en M.m glutamina más succínico. Tiempo de calentamiento a 50°C en minutos.

Así mismo, se probó la regulación de la actividad de glutaminasa de la revertante SL13 en M.m de amonio más succínico; condición en la cual se sabe que para la cepa silvestre después de 20 horas de crecimiento, disminuye la actividad de esta enzima respecto de la actividad a las 8 horas; en cambio para la mutante LM16 la actividad de glutaminasa se mantiene. De esta manera, en base a el comportamiento de regulación se puede diferenciar entre la enzima de la cepa silvestre y aquella presente en la mutante, y entonces tener una característica más con la cual poder caracterizar a la glutaminasa de la revertante SL13.

Los resultados de este experimento se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 10.  
Regulación de la Actividad de Glutaminasa  
en M.m. amonio más succínico.

	R28	LM16	SL13
8 horas	43.41	7.69	52.43
20 horas	19.15	7.97	67.43

Actividad en  $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Por lo tanto, la regulación de la actividad de glutaminasa en la cepa SL13 en esta condición es igual a la que se presenta en la mutante LM16. Por este resultado y más el hecho de que la banda de esta revertante presenta una banda de igual posición que la de la mutante, se puede concluir que la enzima de la mutante LM16 es la que ahora se encuentra mayormente activa en la revertante SL13.

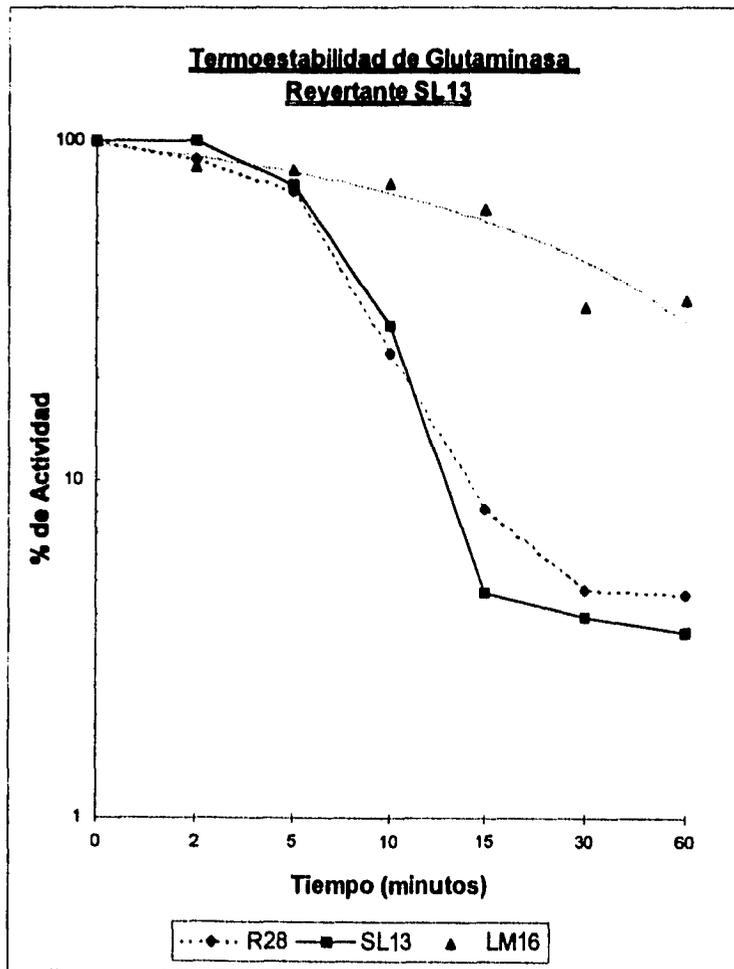


Figura No. 12

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

La glutamina tiene un papel central en el metabolismo nitrogenado, ya que es un intermediario entre la asimilación de amonio y la biosíntesis de gran variedad de compuestos nitrógenados. Por lo que este aminoácido debe ser asimilado y degradado para así funcionar como donador de su nitrógeno amino y amido, en las diferentes vías en las que participa. En *Rhizobium etli* se ha propuesto que la glutaminasa tiene un papel central en la utilización de glutamina como fuente de carbono y nitrógeno, y para mantener el balance entre glutamina y glutamato.

Para conocer si existe alguna vía metabólica que compense la falta de glutaminasa en la mutante LM16 de *Rhizobium etli*, se han obtenido revertantes de esta mutante; puesto que se han reportado vías alternas de degradación de glutamina en esta bacteria.<sup>(14,44,45)</sup>

En la obtención de revertantes de la mutante LM16 de *Rhizobium etli*, se observó que la frecuencia de mutación por conteo en placa aumenta de una mutación espontánea a una inducida y aún es mayor si en la mutagénesis se realiza un enriquecimiento, como el descrito, previo a el aislamiento en placa sobre el medio selectivo.

Puesto que la cepa parental no es capaz de crecer en un medio mínimo suplementado con glutamina como fuente de carbono y nitrógeno, nuestro primer parámetro de selección de las revertantes fue recuperar el fenotipo en que la bacteria sea capaz de crecer en tales condiciones.

Es necesario decir que no basta con aislar aquellas colonias que aparecen en placa sobre el medio selectivo; sino que además se debe caracterizar la cinética de crecimiento en líquido con iguales condiciones del medio. Esto es con la finalidad de minimizar la posibilidad de obtener falsos positivos en los que se tengan colonias que crecen en placa pero no en líquido, es decir, una colonia aislada en placa del medio selectivo no es concluyente que sea capaz de crecer en líquido en iguales condiciones de selección. Puesto que lo que se puede considerar como una colonia en placa,

puede tratarse solamente de una acumulación puntual de exopolisacárido; situación que no ocurre en medio líquido, el exopolisacárido producido no contribuye a la detección del crecimiento de la bacteria.

Una vez que se tuvieron seleccionadas algunas colonias bajo este primer parámetro, el siguiente es probar si estas mismas colonias tienen ó no actividad de glutaminasa. Nuestras primeras expectativas eran de encontrar alguna colonia que sin presentar actividad de glutaminasa, o una actividad baja semejante a la de la mutante, ahora fuera capaz de crecer en un medio mínimo de glutamina como fuente de carbono y nitrógeno. Lo cual sería indicativo de que alguna otra vía metabólica, diferente a la de glutaminasa, podía permitir a la bacteria utilizar este aminoácido como fuente de carbono y nitrógeno.

Bajo este segundo parámetro, todas las revertantes seleccionadas presentaron actividad de glutaminasa en diferente proporción a la cepa silvestre. Incluso, para algunas de ellas, su regulación por la fuente de carbono, succínico en este caso, no es igual a la observada en la cepa silvestre; sino más bien inversa, es decir, su actividad es mayor en glutamina más succínico que en sólo glutamina. Lo que es más, la proporción de actividad en estas dos condiciones no es constante respecto a la de la cepa silvestre.

Esta diversidad de fenotipos presentes en las revertantes, aunado a el hecho de que la cinética de crecimiento de todas ellas es muy similar; pone de manifiesto la existencia de un sistema de regulación que permite a la bacteria mantener un equilibrio en sus actividades metabólicas, que está asociado a la utilización de la glutamina.

Continuando con la caracterización de las revertantes obtenidas, se supuso entonces que estas pudiesen expresar ahora una isoenzima de glutaminasa, diferente a aquella que se expresa regularmente en la cepa silvestre y que está bloqueada en la mutante LM16. Esta idea se basa en el hecho de que todas las revertantes son resistentes a Kanamicina, y esta resistencia está asociada a la inserción del transposón Tn-5, con el cual fue mutagenizada la cepa silvestre para obtener la mutante LM16.

Es decir, se piensa que la mutación en la cepa LM16, que bloquea la glutaminasa regulada en la cepa silvestre, se conserva en las revertantes; y por otro

lado, la pequeña actividad y crecimiento que presenta la mutante LM16 se debe a una glutaminasa constitutiva; puesto que esta actividad es pequeña y constante en varias condiciones de crecimiento.

Es posible entonces, considerar que la mutación puntual inducida en la revertante pudiese permitir observar una mayor actividad de la glutaminasa constitutiva (B) presente en la mutante, ya sea por una modificación en el sistema transcripcional ó bien por cambios en las propiedades catalíticas de la enzima.

Se hace necesario poder diferenciar entre dos posibles isoenzimas por alguna propiedad física y/o química. Trabajos realizados anteriormente en este laboratorio mostraron que no hay otro punto de actividad de glutaminasa en un intervalo de pH, diferente al de pH 8.0; además se probó la localización de la actividad de glutaminasa, indicando que esta se encuentra predominantemente en citoplasma.

Por lo que entonces se consideró a la termoestabilidad como otra propiedad por la cual pueden diferenciarse las enzimas. El ensayo de termoestabilidad variando el tiempo de exposición a una temperatura constante de 50°C, mostró que la glutaminasa en la cepa silvestre es termolábil, y que la presente en la cepa LM16 es termoestable.

Además se sabe que la proporción de actividad en la mutante LM16 es del orden de diez veces menor que la actividad en la cepa silvestre. En este ensayo se observó que en la cepa silvestre a los quince minutos de calentamiento la actividad disminuye cerca de una diez veces. Después de este punto, la pendiente de la gráfica se aproxima a aquella de la mutante.

Cuando se probó este ensayo con las revertantes, todas ellas presentaron actividad de glutaminasa termolábil. Sugiriéndose entonces el hecho de que se tratase de una reversión verdadera, ó que posiblemente la mutación ocurrió sobre el gene de la glutaminasa de la mutante LM16, de modo que alteró sus propiedades físicas; por lo que ahora es termolábil.

Otra propiedad por la cual también pueden diferenciarse dos enzimas es por su movilidad electroforética en un gel de poliacrilamida, y la posterior detección de actividad *in situ*.

El primer experimento en el que se reveló actividad de glutaminasa en gel de poliacrilamida, se demostró que el plásmido pCD24 que complementa a la mutante LM16, es aquel que tiene clonado el gene correspondiente a la glutaminasa A regulatoria y termolábil de la cepa silvestre. Esto en base a que todas las bandas observadas tienen la misma posición que la que aparece en la cepa silvestre y a que ésta banda se intensifica en la cepa CE3-pCD24 (silvestre con el plásmido), que no aparece en la mutante LM16 y aparece en la mutante complementada (LM16-pCD24). además de que las bandas intermedias presentes en la cepa silvestre de *Rhizobium meliloti* complementada con el mismo plásmido, pueden atribuirse a oligómero híbridos entre la glutaminasa del hospedero y la glutaminasa ajena.

Sin embargo, no fue posible apreciar en este experimento ninguna segunda banda de glutaminasa; ya sea en la mutante LM16 ó en la cepa silvestre. Sólo cuando se utilizan extractos purificados, es posible ver la aparición de una banda específica a glutaminasa en la mutante LM16, la cual tiene una posición inferior a la observada en la cepa silvestre. A fin de poder observar dos bandas en los extractos de la cepa silvestre, se purificó un extracto obtenido a partir de un crecimiento por 24 horas en un medio mínimo suplementado con amonio más succínico; con este extracto fue posible revelar la banda de actividad ya característica de la cepa silvestre y una segunda banda tenue e inferior, coincidente en posición a la observada en la mutante LM16

Estos resultados sugieren fuertemente la existencia de dos posibles isoenzimas de glutaminasa en *Rhizobium etli*, una regulatoria y termolábil (A) y otra constitutiva y termoestable (B), ambas con diferente movilidad electroforética. La glutaminasa A tiene una menor migración por electroforésis en gel de poliacrilamida que la glutaminasa B.

En lo que respecta a la caracterización de las revertantes se continuo con sólo una de ellas, la cepa SL13; para probar termoestabilidad contra tiempo y su actividad en gel de poliacrilamida.

La termoestabilidad demostró que en el extracto crudo la enzima es termolábil. La purificación de este extracto se dificulta ya que durante el proceso la enzima se inactiva; sin embargo, la actividad remanente es suficiente para revelar la actividad en el gel. Esto último demostró que la enzima en esta revertante es semejante a la

presente en la mutante LM16, e igualmente los extractos purificados de ambas son termoestables. Además la regulación de la revertante SL13 en medio mínimo de amonio más succínico es igual a la que se presenta en la mutante LM16.

Dados estos últimos resultados, se concluye que la glutaminasa presente en la revertante SL13 es semejante a la que está presente en la mutante LM16. Por tanto, se trata de una pseudoreversión o reversión intergénica. En la que se observa una mayor actividad de glutaminasa respecto a la actividad de la cepa parental. La opción a seguir si se desea obtener revertantes en otras vías de degradación de glutamina diferentes a glutaminasa, es partir de una mutante que carezca de la actividad de las dos glutaminasas.

Por otro lado, el hecho de que el extracto crudo de esta revertante es termolábil y purificado es termoestable, da pauta a pensar que la enzima ha sido alterada en sus propiedades respecto de la glutaminasa de la cepa parental. Se podría pensar que la mutación ha ocurrido sobre el gene estructural de glutaminasa, modificándolo de tal manera que sus propiedades físicas y químicas son diferentes entre la glutaminasa de esta revertantes y las de la mutante LM16 y de la cepa silvestre.

Puesto que se sabe que la mutante LM16 acumula glutamina y su poza de glutamato es baja, cuando se utiliza glutamina como fuente de carbono y nitrógeno; es factible pensar que la velocidad máxima de esta enzima es baja, lo que implica un pequeño crecimiento. Al inducir una mutación puntual sobre la cepa LM16, se produce una modificación sobre la glutaminasa de esta; podemos suponer ahora que tal modificación ha alterado la velocidad observada de la enzima, aumentándola. Permitiendo ahora a la bacteria poder utilizar este aminoácido como fuente de carbono y nitrógeno y así crecer en tales condiciones.

El aumento en la velocidad observada de la glutaminasa en la revertante, puede atribuirse bien a que existe una mayor producción de la enzima; o bien a que la enzima ha alterado sus propiedades catalíticas. Para discernir entre estas dos posibilidades, es necesario cuantificar específicamente las cantidades de enzima producidas; para lo cual se requieren de técnicas inmonoquímicas.

Sin embargo, ya sea uno u otro mecanismo, la cuantificación de las pozas intracelulares de glutamina es un indicativo de la operatividad de este modelo, es decir, del aumento de la velocidad observada en la revertante. Se esperaría que la poza de glutamina en la revertante SL13 disminuyera respecto a la mutante LM16, cuando se utiliza glutamina como fuente de carbono y nitrógeno; puesto que ahora este aminoácido es hidrolizado rápidamente. En cambio, en una condición en la que se sabe que la poza de glutamina es baja (como lo es amonio más succínico) tanto para la cepa silvestre como para la mutante LM16; podemos suponer que la función de la glutaminasa en estas condiciones es mantener un balance entre glutamina y glutamato, que permita a la bacteria regular óptimamente el metabolismo mitrogenado para su crecimiento. Esta función puede atribuirse principalmente a la glutaminasa B, presente en la mutante LM16, puesto que no existen diferencias considerables en cuanto a las pozas de glutamina y al crecimiento, entre esta mutante y la cepa silvestre.

Ahora bien, si esta enzima aumenta su velocidad como se ha propuesto que ocurrió para la revertante SL13, entonces se requeriría aumentar la cantidad de sustrato para de esta forma mantener el equilibrio en la relación entre glutamina y glutamato. Esto estaría reflejado en un aumento en la poza intracelular de glutamina en la revertante SL13 respecto a la mutante LM16, en una condición de crecimiento de amonio más succínico. Esto mismo puede ser una razón para explicar por que la revertante tiene una mayor actividad de glutaminasa en glutamina más succínico; puesto que se sabe que en ésta condición las vías biosintéticas de glutamina tienen mayor actividad; por lo que, nuevamente, para mantener el balance de glutamina y glutamato, es necesario hidrolizar mayormente la glutamina.

Es claro entonces que la caracterización de los parámetros cinéticos de la glutaminasa de la mutante LM16, de la revertante SL13 y de la cepa silvestre; así como la cuantificación de la poza intracelular de glutamina y glutamato en la revertante, puede arrojar una visión más clara sobre la funcionalidad de glutaminasa en *Rhizobium etli*.

## CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son:

- ◆ Fue posible obtener revertantes de la mutante LM16, capaces de crecer en medio mínimo de glutamina como fuente de carbono y nitrógeno. Todas las cuales presentaron actividad de glutaminasa. Por lo que entonces la probabilidad de obtener revertantes en las que alguna otra vía de degradación de glutamina compense la falta de glutaminasa en esta mutante es muy baja.
- ◆ Las diferencias de comportamiento de termoestabilidad y movilidad electroforética en gel de poliacrilamida observadas en la glutaminasa de la cepa silvestre y de la mutante LM16, sugieren fuertemente la existencia de dos posibles isoenzimas de glutaminasa en *Rhizobium etli*. Una glutaminasa regulada, termolábil y de menor migración por electroforesis (A) y otra glutaminasa constitutiva, termolábil y de mayor migración electroforética, (B).
- ◆ La reversión del fenotipo en la cepa SL13 se debe muy probablemente a una mutación puntual inducida sobre la glutaminasa presente en la mutante LM16, que ha modificado las propiedades físicas y químicas de la enzima; de modo que ahora es eficiente en la degradación del aminoácido, permitiendo a la bacteria crecer en medio mínimo de glutamina como fuente de carbono y nitrógeno.
- ◆ Se propone que las propiedades cinéticas de la glutaminasa presente en la mutante LM16 se han modificado, de modo que ha aumentado su velocidad máxima, o bien que el aumento en la velocidad observada se deba a la mayor producción de la enzima.
- ◆ La caracterización posterior de ésta revertante puede ser de gran utilidad para conocer la posible función metabólica que desempeña una glutaminasa con las características de la mutante LM16 en *Rhizobium etli*.

## BIBLIOGRAFIA

1. Adams T.H. & Chelm B.K. (1988). Effect of oxygen levels on the transcription of *nif* and *gln* genes in *Bradyrhizobium japonicum*. J Gen Microbiol., 134: 611-618.
2. Aguilar J.M.M., Ashby A.M., Richards A.J.M., Loake G.J. Watson M.D. y Shaw C.H. (1988). Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseol towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. J. Gen. Microbiol., 134: 2741-2746
3. Aledo J.C., Gomez-Bredma S., Segura J.A., Molina M., Nuñez de Castro Y., Marquez J. (1993). Native polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins: Glutaminase detection after *in situ* specific activity staining. Electrophoresis. 14: 88-93.
4. Ali H., Niel C. & Guillaune J. (1981). The pathway of ammonium assimilation in *Rhizobium meliloti*. Arch. Microbiol., 129: 391-394.
5. Appleby C.A., Turner G.L. & MacNicol R.K. (1975). Involvement of Oxyleghaemoglobin and Cytochrome P-450 in an efficient oxidative phosphorylation pathway which supports Nitrogen Fixation in *Rhizobium*. Biochem. Biophys. Acta., 387: 461-4774.
6. Baruch S. (ed.) (1975). Symposium of Renal Metabolism. Med. Clin. North Am., 59: 3
7. Bergersen F.J. & Turner G.L. (1988). Glutamate as a carbon source for N<sub>2</sub> fixing bacteroids prepared from soybean root nodules, J. Gen Microbiol., 134: 2441-2448.
8. Bergersen F.J. & Turner G.L. (1967). Nitrogen Fixation by the bacteroid fraction of breis of Soybean Root Nodules. Biochem. Biophys. Acta., 141: 507-517.
9. Bergman, et.al. (1980). Physiology of behavioral mutant of *Rhizobium meliloti*: evidences for a dual chemotaxis pathway. J. Bacteriol, 170: 3249-3254.
10. Beringer J.E., Brewin N., Johnston A.B.W., Schulman H.M., & Hopwood D.A. (1979). The *Rhizobium-legume* symbiosis. Proc. R. Soc. Lond. B., 204: 219-233.
11. Bishop P.E., Guevara J.G., Enyelke J.A. & Evans H.J. (1976). On the relation between GS and nitrogenase activities in the symbiotic association between *R. japonicum* and glycine max. Plant Physiol., 57: 542-546.
12. Boistar P., Batut J., Doveran M.L., David M., Gamarone A.M., Li R.Y., & Kahn D. (1988). The regulatory pathway of *nif* and *fix* genes in *R. meliloti*. En Molecular Plant-Microbe Interactions. D.P.S. Verma y R. Palacios. APS Press. pp. 96-100.
13. Bolton E., Higgins B., Harrington A. & O'Gara F. (1986). Dicarboxylic acid transport in *Rhizobium meliloti*: isolation of mutants and cloning of the carboxylic acid transport genes. Arch. Microbiol.. 144: 142-146.
14. Bravo A. & Mora J. (1988). Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. J. Bacteriol., 170: 980-984.
15. Brown C.M., MacDonald-Brown D.S. & Stanley S.O. (1973). The mechanism of nitrogen assimilation in *pseudomonas*. Antonie van Leeuwenhoek., 39: 89-98.
16. Buchannan J.M. (1973). The amido-transferases. Adv. Enzymol., 39: 91-184.
17. Bushby H.V.A. (1982). Ecology. En Nitrogen Fixation. Vol 42: *Rhizobium*. W.J. Broughton (de). Clarendon Press. Oxford.
18. Caetano-Anollés G., Crist-Est D.K. y Bayer W.P. (1988). Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires furlinal nodulation genes. J. Bacteriol, 170: 3164-3169.

19. Calderon J., Morett E., & Mora J. (1985). The  $\omega$ -amidase pathway in the degradation of glutamine in *N. crassa*. *J. Bacteriol.*, 161: 807
20. Calderon J. & Mora J. (1985). Glutamine cycling in *N. crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 131: 3237.
21. Calderon J., Cooper A., Geibard A. & Mora J. (1989).  $^{15}\text{N}$  isotope studies of glutamine assimilation pathway in *N. crassa*. *J. Bacteriol.*, 171: 1772
22. Callahan D.A. & Torrey J.C. (1981). The structural basis for root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can. J. Bot.*, 59: 1647-1664.
23. Canter-Cremers H.C.J., VanBrussel A.A.N., Plazinski J., & Rolfe B.G. (1986). Sym plasmid and chromosomal gene products of *Rhizobium trifolii* elicit developmental responses on various legume root. *J. Plant Physiol.*, 122: 25-40.
24. Carlson T.A., Guerinot M.L. & Chelm B.K. (1985). Characterization of the gene encoding glutamine synthetase I (glnA) from *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.*, 162: 698-703.
25. Castaño Y., Bastarrachea F. & Covarrubias A. (1988). gltBDF operon of *E. coli*. *J. Bacteriol* 170: 821
26. Cooper A.J.L. & Meister A. (1972). Isolation and properties of highly purified glutamine transaminase. *Biochem.*, 11: 661-672.
27. Cooper A.J.L. & Meister A. (1974). Isolation and properties of a new glutamine transaminase from rat kidney. *J. Biol. Chem.*, 249: 2554-2561.
28. Cooper A.J.L. & Meister A. (1974). The glutamine transaminase- $\omega$ -amidase pathway. *CRC. Crit. Rev. Biochem.*, 4: 281-303.
29. Corbin D., Barran L. & Ditta G. (1983). Organization and expression of *Rhizobium meliloti* nitrogen fixation genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80: 3005-3016.
30. Chaney A.L. & Marbach E.P. (1962). Modified Reagents for Determination of Urea and Ammonia. *Clin. Chem.* (Winston Salem, N.C.). 8: 130-132.
31. Darrow R.A. (1980). Role of glutamine synthetase in nitrogen fixation. En *Glutamine synthetase: metabolism, enzymology and regulation*. J. Mora, R. Palacios (ed's). Academic Press Inc. New York. pp. 139-166.
32. David M., Domergue O., Pognonec P. & Kahn D. (1987). Transcription patterns of *Rhizobium meliloti* symbiotic plasmid. pSym identification of *nifA* independent fix genes. *J. Bacteriol.*, 169: 2239-2244.
33. David M., Doveran M.L., Batut J., Dedieu A., Domergue O., Ghar J., Hertig C., Boistard P. & Kahn D. (1988). Cascade regulation of *nif* genes expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell.*, 54: 671-683.
34. Davis J.N. & Prusiner S. (1973). Staining for Glutaminase Activity. *Anal. Biochem.* 54: 272-275.
35. De Bruijn F.J., Rossbacj S., Schneider M., Ratel P., Messer S., Szeto W.W., Ausubel F.M., & Schell J. (1989). *Rhizobium meliloti* 1021 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 171: 1673-1682.
36. Dénarié J. et al. (1981). Indigenous plasmids of *Rhizobium*. En *International Review of Cytology, Supplement 13*. G.H. Boume y J.F. Daniell (ed's). Academic Press. New York.
37. Dilworth M.J. & Glenn A.R. (1982). Movements of ammonia in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.*, 128: 29-37.
38. Ditta G., Virts E., Palomares A. & Kim C.H. (1987). The *nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated. *J. Bacteriol.*, 169: 3217-3223.
39. Dixon R.O.D. (1972). Hydrogenase in legume root nodules bacteroid, occurrence and properties. *Arch. Microbiol.*, 85: 193-201.
40. Döbbereiner, J. Day, J.M. y Dart, P.J. (1972). Nitrogenase Activity and Oxygen Sensitivity of the *Paspalum notatum* -

- Azotobacter paspali* association. J. Gen. Microbiol., 71: 103.
41. Drozd J.W. et al. (1972). A chemostat study of the effect of fixed nitrogen fixation membrane and free amino acid in *Azotobacter chroococcum*. J. Gen. Microbiol., 73: 221-232.
  42. Duffy F.E., Cooper A.J.L. & Meister A. (1974). Identification of  $\alpha$ -ketoglutarate in rat liver, kidney and brain. Relationships to glutamine transaminase and  $\omega$ -amidase activities. J. Biol. Chem., 249: 7603-7606.
  43. Duncan M.J. & Fraenkel D.G. (1979).  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol., 37: 415-419.
  44. Duran S. & Calderon J. (1995). Role of the glutamine transaminase- $\omega$ -amidase pathway and glutaminase in glutamine degradation in *Rhizobium elli*. Microbiology, 141: 589-595.
  45. Duran S., Du Pont G., Huerta-Zepeda A. & Calderón J. (1995). Isolation and Characterization of a *Rhizobium elli* mutant altered in the glutaminase activity. En prensa
  46. Ebeling S., Hahn M., Fisher H.M. & Hennecke H. (1987). Identification of *nifE*, *nifN*, and *nifS* like genes in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Gen. Genet., 207: 503-511.
  47. Elkan H.G. (1984). Taxonomy and metabolism of *Rhizobium* and its genetic relationship. En Biological Nitrogen Fixation. Martin Alexander (ed.) Plenum Publication Corporation.
  48. Evans H.J., Harker A.R., Papen H., Russel A.A., Hanus F.J. & Zuber M. (1987). Physiology, biochemistry and genetic of the uptake hydrogenase in rhizobia. Ann. Rev. Microbiol., 41: 335-361.
  49. Finan T.M., Wood J.M. & Jordan D.C. (1983). Symbiotic properties of C<sub>4</sub> dicarboxylic acid transport mutants of *Rhizobium leguminosarum*. J. Biol., 154: 1403-1413.
  50. Fisher R.F. y Long S.R. (1992). Rhizobium-plant signal exchange. Nature, 357: 655-660.
  51. Fisher R.F., Tu J.K., y Long S.K. (1985). Conserved nodulation genes in *R. meliloti* and *R. trifoli*. App. Environ Microbiol., 49: 1423-1435.
  52. Fitzmaurice A.M., & O'Gara F. (1988). Involment of glutamate as carbon source in supporting nitrogen fixation activity in *R. meliloti*. En Nitrogen Fixation: Hundred Years after.
  53. Gardiol A., Arias A. Cernofansky C. & Martinez-Drets J. (1982). Succinate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol., 151: 1621-1623.
  54. Gardiol A., Aeorges L. & Dazzo F. (1987). Requirement of Succinate dehydrogenase activity for symbiotic differentiation of *Rhizobium meliloti* in alfalfa nodules. Microbiol., 53: 1447-1450.
  55. Gaussin G.N., Ronson C.W. & Ausubel F.M. (1986). Regulation of nitrogen fixation genes. Ann. Rev. Genet., 20: 567-584.
  56. Gest H. (1972). Energy conversion and generation of reducing power in bacterial photosynthesis. Adv. Microbiol. Physiol., 7: 243-278.
  57. Giles-Gonzales M.A., Ditta G.S. & Helsinki D.R. (1991). A Hemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *R. meliloti*. Nature., 350: 170-172.
  58. Ginsburg A. & Standman E.R. (1973). Regulation of glutamine synthetase in *E. coli*. En The Enzymes of glutamine metabolism. S. Prusiner, E.R. Standman (ed's). Academic Press. London. pp. 9-43.
  59. Glenn A.R. & Brewin N.J. (1981). Succinate resistant mutants of *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol., 126: 237-241.
  60. Glenn A.R. & Dilworth M.J. (1984). Methylamine and ammonium transport system in *Rhizobium leguminosarum*

- MNF3841. J. Gen. Microbiol., 130: 1961-1968.
61. Goyer J.W. & Kasket E.R. (1987). K<sup>+</sup> regulates bacteroid-associated functions of *Bradyrhizobium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84: 4650-4654.
62. Gottschal G. (1986). Bacterial Metabolism. 2nd. edition. Springer-Verlag. pp. 318-326.
63. Götz R. & Schmitt R. (1987). *Rhizobium meliloti*: swims by unidirectional intermittent rotation of right-handed flagellar helices. J. Bacteriol., 169: 3146-3150.
64. Györgyfalvi Z., Yer N. & Kondorosi A. (1988). Three regular nod D alleles of diverged flavonoid specificity are involved in host-dependent nodulation by *Rhizobium meliloti*. Mol. Gen. Genet., 212: 85-92.
65. Hagerden & Plang (1986). Catalytic Transfer of Hydride ion from NADPH to Oxygen by the interconversion of Proline and  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate. Arch. Biochem. Biophys. 248: 166.
66. Hardy R.W.F. & Havelka U.D. (1976). Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field-grown legumes with emphasis on soybeans. En Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Vol 7. International Biology Program Series. P.S. Nutman (de). Cambridge University Press. London. pp. 421-439.
67. Hartman S.C. (1973). Relationships between glutamine amidotransferases and glutaminases. En Enzymes of the glutamine metabolism. E.R. Standman (ed). Academic Press, New York. pp. 319-330.
68. Hatfield W.G. & Umbriger H.E. (1970). Threonine Deaminase from *Bacillus subtilis*. I. Purification of the enzyme. J. Biol. Chem. 245: 1736-1741.
69. Hills S., Kennedy C., Kavanagh E., Goldberg R.B. & Nabau R. (1981). Nitrogen Fixation Gene (nif-L) involved in the oxygen regulation of nitrogenase synthesis in *K. pneumoniae*. Nature., 290: 424-426.
70. Howitt S. & Gresshof R. (1985). Ammonia regulation of glutamine synthetase in *Rhizobium* sp ANH289. J. Gen. Microbiol., 131: 1733-1740.
71. Hughes, M.N. (1981). The Inorganic Chemistry of Biological Processes. 2nd edition. John Wiley & Sons. USA.
72. John M., Schmidt J., Wieneke V., Krüssman H.D., & Schell J. (1988). Transmembrane orientation and receptor-like structure of the *Rhizobium meliloti* common nodulation protein Nod-C. EMBO. J., 7: 583-588.
73. Kahn D.H., Krauss J. & Somerville J.E. (1983). A model for nutrient exchange in the *Rhizobium*-legume symbiosis. En Nitrogen Fixation Research Progress. H.T. Evans, P.J. Bottomley, W.J. Newton. (ed's). Martinus Nijhoff, Dordrecht. pp. 193-199.
74. Kahn M.L., Krauss J. & Shatters R.G. (1988). Bacterial catabolism of nitrogen containing compounds in symbiotic nitrogen fixation. En Physiological limitations and genetic improvement of symbiotic nitrogen fixation. F. O'Gara, S. Manian, J.J. Drevon (ed's). Kluwer Academic Publishers. pp. 21-27.
75. Kendrick, M. et al. (1992). Metals in Biological Systems. Ellis Horwood. Great Britain.
76. Kleine (1975). Ammonium uptake and metabolism by nitrogen fixing bacteria. I. Arch. Microbiol., 104: 163-169.
77. Kleine (1976). Ammonium uptake and metabolism by nitrogen fixing bacteria. II. Arch. Microbiol., 11: 89-91.
78. Kohl D.H. Schubert K.R. Carter M.B. & Hagerdom C.H. (1988). Proline metabolism in N<sub>2</sub>-fixing root nodules: energy transfer and regulation of purine synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85: 2036-2040.
79. Kondorosi A. & Johnston A.W.B. (1981). The genetics of *Rhizobium*. En International Review of Cytology, Supplement 13. G.H. Bourne & J.F. Daniell (ed's). Academic Press. New York.

80. Kondorosi A. (1992). Regulation of nodulation genes in rhizobia. En *Molecular Signal in Plant-Microbe Communication*. D.P.S (de). CRC Press, Florida.
81. Kondorosi E., Banfalul Z., y Kondorosi, A. (1984). Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: Identification of nodulation genes. *Mol. Gen Genet*, 193: 445-452.
82. Kretovich V.L., Sidel'nikova L.I., Kazakova J.V., Veiniva M.K. & Karyakina T.I. (1981). Glutaminase and asparaginase activity of bacteroid from *Rhizobium lupini*. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 17 No 6. 616-619.
83. Kretovich V.L., Sidel'nikova L.I., Ivanoshkin A.G. & Karyakina T.I. (1985). Localization of aspartase, asparaginase and glutaminase in intact bacteroids of *Rhizobium lupini*. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 20 No 4. 362-364.
84. Long S.R. (1981). Genetics of *Rhizobium* nodulation. En *Plant Microbe Interaction*. T. Kosuge y E. Nester (ed's). Macmillan Publishing Company. New York.
85. Long S.R. & Staskawiez B.J. (1993). Prokariotic Plant Parasites. *Cell*, 73: 921-935.
86. Long S.R. (1989). *Rhizobium*-Legume Nodulation: Life Together in the underground. *Cell*, 56: 203-214.
87. Ludwig R.A. (1980). Physiological roles of glutamine synthetase I and II in ammonium assimilation in *Rhizobium sp-32H*. *J. Bacteriol.*, 141: 1204-1216.
88. Ludwig R.A. (1978). Control of ammonium assimilation in *Rhizobium 32H*. *J. Bacteriol.*, 135: 114-123.
89. Marecková, H. (1983). Bacteria for Nitrogen Fixation. En *Colec. Biotechnology*. Vol. 3. Rehm, H.J. & Reed, G. (ed's). Ed. Verlag Chemie.
90. Martin G.B., Chapman K.C. & Chelm B. (1988). Role of the *Bradyrhizobium* synthetase II gen (glnII). *J. Bacteriol.* 170: 5452-5459.
91. Martinez E.D., Romero D, y Palacios R. (1990). The *Rhizobium* genome. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 9: 59-93.
92. Marvel D.J., Torrey J.G. & Ausubel F.M. (1987). *Rhizobium* symbiotic genes for nodulation on legume and non legume host. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84: 1319-1323.
93. Meister A. (1979). Biochemistry of Glutamate: Glutamine and Glutathione. En *Glutamic acid: Advances in Biochemistry and Physiology*. L.J. Fisher Jr. et al (ed's). Raven Press New York.
94. Meister A. & Tice S.V. (1950). Transamination from glutamine to  $\alpha$ -ketoacids. *J. Biol. Chem.*, 187: 173-187.
95. Meister A. (1975). Structure-function relationships in glutamine amidotransferases: Carbamyl phosphate synthetase. *PAABS Rev.*, 4: 273-299.
96. Meister et. al. (1955). Hydrolysis and Transfer Reactions Catalized by  $\omega$ -amidase preparations. *J. Biol. Chem.* 215: 441-460.
97. Merr J.L. & Kjaergaard-Pedersen L.K. (1972). Nitrogen assimilation by *Bacillus licheniformis* organism growing in chemostat cultures. *J. Gen. Microbiol.*, 70: 277-286.
98. Miller J.H. (1974). Experiments in Molecular Genetic. Cold Spring Harbor, USA
99. Miller R. & Stadman E. (1972). Glutamate Synthase from *E. coli*: an iron-sulfide flavoprotein. *J. Biol. Chem.*, 247: 7487
100. O'Gara F., Shanmugank (1976) Regulation of nitrogen fixation by Rhizobia, exorte of fixed  $N_2$  as  $NH_3$ . *Biochem. Biophys. Acta.*, 437: 313-321.
101. Pate J.S., Lindblad P. & Atkins C.A. (1988). Pathways of assimilation and transfer of fixed nitrogen in coralloid roots of cycad-Nostoc symbiosis. *Planta.*, 176: 461-471.
102. Peters N.K. y Verma D.P.S. (1990). Phenolic compounds as regulator of gene expression in plan microbe relation. *Mol. Plant. Microbe. Interact*, 3: 4-8.

103. Phillips D.A. (1991). Flavonoids: plant signals to soil microbes. *Rec. Adv. Phytochem*, 26: 1-33.
104. Porella K. (1971). The induction of dehydrogenase activity for branched chain amino acid in *Bacillus subtilis*. *Arch. Microbiol.*, 77: 339-343.
105. Postgate, J.R. (1980). *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B*, 290: 421.
106. Prusiner S. (1975). Regulation of glutaminase levels in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 123: 992
107. Raiswell, R.W. (1983). *Química Ambiental*. Ediciones Omega. Barcelona, España.
108. Rastogi, Vispin & Watson (1989). Molecular characterization of a mutant of *Rhizobium meliloti* defective in aspartate utilization. *Plant Physiol.*
109. Roberts G.P. & Brill W.J. (1980). Gene-product relationship of the *nif* regulon of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 144: 210-217.
110. Robertson J.G., Lyttleton P., Bullivatn S. & Grayston G.F. (1978). Membranes in lupin root nodules in the role of Golgi bodies in the biogenesis of infection threads and peribacteroid membranes. *J. Cell. Sci.*, 30: 129-149.
111. Rolfe B.G. (1988). Flavones and Isoflavones as inducing substances of legume nodulation. *Biofactor*, 1: 3-10.
112. Ronsen C.W., Lyttleton P. & Robertson J.C. (1981). C<sub>4</sub> dicarboxylate transport mutant of *Rhizobium trifolii* from ineffective nodules of *Trifolium repens*. *Biochem.*, 78: 4284-4288.
113. Ronson C.W., Lyttleton P. & Robertson J.G. (1981). C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport mutants of *Rhizobium trifolii* form ineffective nodules on *Trifolium repens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78: 4284-4288.
114. Roon R.J., Ever H.L. & Larimore (1974). Glutamate synthase: properties of the reduced nicotinamide adenine nucleotide-dependent enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 118: 89
115. Ruvkun G.B. & Ausubel F.M. (1980). Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 17: 191-198.
116. Salmien S.O. & Streeter J.G. (1986). Involment of glutamate in the respiratory metabolism of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *J. Bacteriol.*, 169: 495-499.
117. Saroso S.A., Dilworth M.J. & Glenn A.R. (1985). The use of activities of carbon catabolic enzymes as probe for the carbon nutrition on Snakebean nodule bacteroid. *J. Gen. Microbiol.*, 132: 243-247.
118. Schubert (1986). Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 37: 539-574.
119. Segovia L., Young P. & E. Martinez. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, type Y strain as *Rhizobium etli* sp. nov. *J. Bacteriol.* 43: 374
120. Sharma H.K. & Rothstein M. (1979). A New Method for the Detection of Enolase Activity on Polyacrilamide Gels. *Anal. Biochem.* 98: 226-230.
121. Shatters R.G., Somerville J.E. & Kahn (1989). Regulation of glutamine synthetase II activity in *Rhizobium meliloti* 104 A14. *J. Bacteriol.*, 171: 5087-5094.
122. Soberon M. & González A. (1987). Glutamine degradation through the  $\omega$ -amidase pathway in *S. cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 133: 9-14.
123. Soberon M. & González A. (1987) Physiological role of glutaminase activity in *S. cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 133: 1-8.
124. Sprent J.I. (1980). Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin of some legumes. *Plant. Cell. Environ.*, 3: 35-43.
125. Stam H., Stouthamer A.H. & Verseveld H.W. Van. (1987). Hydrogen metabolism and energy cost in nitrogen fixation. *FEMS. Microbiol. Rev.*, 46: 73-92.

126. Stewart, W.D.P. (1986). Nitrogen Fixation. Its current relevance and future potential. *Israel. J. Bot.*, 31: 5-44.
127. Stovall Y., & Cole M. (1977). Organic acid metabolism by isolated *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Plant Physiol.*, 61: 787-790.
128. Stowers M.D. (1985). Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Ann. Rev. Microbiol.*, 39: 89-108.
129. Sundaresan V., Jones J.D.G., Ow D.W. & Ausubel F.M. (1983). *Klebsiella pneumoniae nifA* product activates the *Rhizobium meliloti* nitrogenase promoter. *Nature*, 301: 728-731.
130. Sutton W.D., Pankhursts C.E. & Craig A.S. (1981). The *Rhizobium* bacteroid state. In *International Rev. of Cytology. Suplemento 13*. G.H. Bourre y J.F. Danielli (ed's). Academic Press. New York. pp 149-177.
131. Szeto W.W., Nixon B.T., Ronson C.W. & Ausubel F.M. (1987). Identification and characterization of *Rhizobium meliloti* ntrC gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathway for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cell. *J. Bacteriol.*, 168: 1423-1431.
132. Tempest D.W., Meers J.L. & Brown C.M. (1970). Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by an hitherto unknown route. *Biochem. J.*, 117: 405-407.
133. Tempest D.W., Meers J.L. & Brown C.M. (1973). Glutamate synthase (GOGAT): a key enzyme in the assimilation of ammonium by prokaryotic organism. In *The enzymes of glutamine metabolism*. S. Prusiner, E. Standman (ed's). Academic Press Inc. pp 167.
134. VanBrussel A.A.N., Zaat S.A.J., Canter-Cremers H.C.J., Wijffelman C.A., Pees E., Tak T., & Lugtenberg B.J.J. (1986). Role of Plant root exudates and symplasmid-localized nodulation genes in the synthesis by *Rhizobium leguminosarum* of TSR factor which causes thick and short root on common vetch. *J. Bacteriol.*, 165: 517-522.
135. Vincet J.M. (1980). Factors controlling the legume-*Rhizobium* symbiosis. In *Nitrogen Fixation Vol.2*. W.E. Newton y W.H. Orme-Johnson (ed's). University Park Press. Baltimore.
136. Virts E.L., Stanfield S.W., Helsinky D.R. & Ditta G.S. (1988). Common regulatory elements control symbiotic and microaerobic induction of nifA in *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85: 3062-3065
137. Von Bülow, J. & Döbbereiner, J. (1975). Potential for Nitrogen Fixation in Maize Genotypes in Brazil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 2389-2393.
138. William R., Joshua H. & Berniher (1981). Occurrence of an inducible glutaminase in *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.*, 148: 365-367.
139. Yoch D.C. & Penagra R.M. (1980). Effect of amino acid on the nitrogenase system of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 92: 618-622.