

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas

FIJACION SIMBIOTICA DE NITROGENO.
LA EXPRESION DE LA CAPACIDAD
FIJADORA POR RHIZOBIOS.

Orlando Mario Aguilar

Tesis
1981

El presente trabajo de tesis para
optar al grado de
Doctor en Ciencias Bioquímicas
ha sido realizado
en el Laboratorio de Química Biológica
de la Facultad de Ciencias Exactas,
bajo la dirección
del Profesor Doctor Gabriel Favelukes.

a mi Madre

a mi Esposa

Mi reconocimiento

a la Facultad de Ciencias Exactas por haberme incorporado a sus claustros como docente y por los recursos insumidos en la realización de este trabajo,

a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por las becas otorgadas que permitieron el desarrollo del presente trabajo.

Mi agradecimiento

al Doctor Gabriel Favelukes por brindarme la posibilidad de iniciarme en la investigación científica, por su dirección y permanente apoyo en el plano científico y humano durante la realización de este trabajo,

a los compañeros y personal del Laboratorio de Química Biológica por su colaboración y amistad,

al Doctor Oscar Grau por los comentarios y estímulos recibidos durante el desarrollo del presente trabajo,

al Doctor C. Gómez Dumm por la realización de las micrografías electrónicas,

a los Ingenieros E. Aguirre y H. Garbi y a la empresa "La Oxígena S. A." por la preparación y donación de mezclas especiales de gases,

al Instituto de Investigación Bioquímica "Fundación Campomar" por facilitar el uso del cromatógrafo de gases durante los experimentos preliminares,

a la Lic. Stella M. Rustici y al alumno de bioquímica A. Lagares por sus colaboraciones en la realización de los geles y las determinaciones de poli- β -hidroxibutirato, respectivamente.

I N D I C E

	Página
INDICE DE FIGURAS	i
LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS	iii
FE DE <i>ERRATAS</i>	iv
INTRODUCCION	1
Sistemas biológicos fijadores de nitrógeno	3
LA SIMBIOSIS RHIZOBIUM-LEGUMINOSA	4
Características taxonómicas de ambos simbiotes	
- La Planta	5
- La Bacteria	6
El establecimiento de la simbiosis	7
Diferencias entre bacteroides y rizobios libres	
- La nitrogenasa	10
Mecanismo de acción de la nitrogenasa	12
- Funciones auxiliares del aparato simbiótico para la fijación de nitrógeno	13
<i>Poder reductor</i>	13
<i>ATP y sistemas de transporte de electrones</i>	14
<i>Leghemoglobina</i>	15
<i>Requerimientos de nutrientes</i>	17
<i>Asimilación del nitrógeno fijado</i>	19
<i>Nitrato reductasa</i>	20
<i>Acidos nucleicos, capacidad de biosíntesis de macromoléculas y viabilidad</i>	20
- Controles de la simbiosis	21
LA NITROGENASA EN AUSENCIA DE PLANTA HUESPED	24
Logros y perspectivas de los sistemas asimbióticos	29
Objetivo de este trabajo	30
MATERIALES Y METODOS	
Cepas de rizobios ensayadas	31
Cultivo de plantas leguminosas en simbiosis con rizobios	32
Extracción de bacteroides de nódulos	33

Sistema de cultivo microaerobio para la desrepresión de la nitrogenasa	
- A. Esquema del aparato	34
- B. Medio de cultivo (MDG, MDA)	
<i>Medio de desrepresión con gluconato (MDG)</i>	36
<i>Medio MDA</i>	37
- C. Inoculación y cultivo	38
- D. Medida del crecimiento bacteriano	38
<i>Absorbancia</i>	38
<i>Proteínas bacterianas totales</i>	39
<i>Recuento de bacterias viables</i>	39
Centrifugación en gradientes discontinuos de densidad de sacarosa	40
Medida de actividad de nitrogenasa	41
- Cromatografía gaseosa	41
- Ensayo de medida	
1. <i>Con raíces noduladas</i>	42
2. <i>Con preparaciones de bacteroides</i>	42
3. <i>Con cultivos puros microaerobios</i>	43
Medida de actividad de nitrato reductasa	44
Medida de actividad de β -hidroxibutirato deshidrogenasa (HBDH) en extractos acelulares	45
Determinaciones analíticas	
- Poli- β -hidroxibutirato (PHB)	46
- Porfirinas	47
- Concentración de O ₂ en la fase gaseosa	49
Preparación de rizobios para observación por microscopía electrónica	49
Marcación de proteínas in vivo con ³⁵ S-metionina	50
Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	51

RESULTADOS

CAPITULO I: SISTEMA DE CULTIVO DE RIZOBIO PARA LA EXPRESION ASIMBIOTICA DE LA NITROGENASA.

Aspectos preliminares	52
Características de los cultivos de R. japonicum 110	53
Requerimiento de O ₂ para optimizar la medida de actividad de Nasa	54
Efecto de amonio sobre la expresión de la Nasa	55
Bacterias formadoras de colonias en el cultivo microaerobio	56
Inducción de nitrogenasa en otras cepas de Rhizobium	58

CAPITULO II: REQUERIMIENTO DE CO₂ PARA LA EXPRESION DE LA NITROGENASA ACTIVA EN EL CULTIVO MICROAEROBICO DE R. JAPONICUM 110

59

CAPITULO III: CAMBIOS QUE ACOMPAÑAN A LA DESREPRE-
SION NO SIMBIOTICA DE LA NITROGENASA.

Propiedades de sedimentación de las bacterias en gradientes discontinuos de densidad de sacarosa	66
Acumulación de PHB	68
Propiedades de sedimentación en gradientes de densidad y contenido de PHB	70
Nitrato reductasa	72
Producción de porfirinas	76

DISCUSION

Expresión asimbiótica de la nitrogenasa	78
---	----

RESUMEN Y CONCLUSIONES	86
----------------------------------	----

BIBLIOGRAFIA	109
------------------------	-----

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Equilibración de la composición de la fase gaseosa al comienzo del cultivo microaerobio87
Figura 2: Reducción de NAD por extractos de <i>R. japonicum</i> 110: dependencia del agregado de β -hidroxibutirato (HB)88
Figura 3: Espectro de absorción del ácido crotonico89
Figura 4: Cultivo microaerobio de <i>R. japonicum</i> 110 en el medio MDG de desrepresión de la nitrogenasa90
Figura 5: Cultivo microaerobio de <i>R. japonicum</i> 110 en el medio MDA de desrepresión de la nitrogenasa91
Figura 6: Niveles óptimos de O_2 para la medida de actividad de Nasa92
Figura 7: Cultivo microaerobio de <i>R. japonicum</i> 110 en el medio MDG suplementado con NH_4^+ 20 mM93
Figura 8: Actividad de nitrogenasa y u.f.c. durante un cultivo microaerobio de <i>R. japonicum</i> 11094
Figura 9: Requerimiento de CO_2 de la Nasa en cultivos microaerobios de <i>R. japonicum</i> 11096
Figura 10: Efecto de CO_2 sobre la actividad de la Nasa en cultivos microaerobios de <i>R. japonicum</i> 11098
Figura 11: Proteínas sintetizadas por <i>R. japonicum</i> 110 en diversas condiciones fisiológicas (Gel A, 10% de poliacrilamida)99
Figura 12: Proteínas sintetizadas por <i>R. japonicum</i> 110 en diversas condiciones fisiológicas (Gel B, 12.5% de poliacrilamida)	100
Figura 13: Gradientes discontinuos de densidad de sacarosa: Distribución de poblaciones de bacteroides de <i>R. japonicum</i> 110	101

	Página
Figura 14: Distribución de poblaciones de <i>Rhizobium japonicum</i> 110, aeróbicos y microaeróbicos en gradientes discontinuos de densidad de sacarosa102
Figura 15: Subpoblación liviana de <i>R. japonicum</i> 110 en diversas condiciones de cultivo103
Figura 16: Micrografía electrónica de <i>R. japonicum</i> de cultivo microaeróbico104
Figura 17: Cambios de contenido de PHB y proporción de fracción liviana de un cultivo de <i>R. japonicum</i> 110 en medio MDG105
Figura 18: Pasaje de microaerobiosis a aerobiosis: cambios en el contenido de PHB y actividad de HBDH en <i>R. japonicum</i> 110106
Figura 19: Efectos de la presencia o ausencia de O_2 sobre la reducción de NO_3^- por la NR de rizobios cultivados en microaerobiosis107
Figura 20: Actividad de NR y Nasa en un cultivo microaerobio de <i>R. japonicum</i> 110108

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

ATP: adenosina trifosfato

cGMP: guanosina monofosfato (3', 5') cíclico

c.p.m.: cuentas por minuto

ELM: medio extracto de levadura, manitol, sales

HB: β -hidroxibutirato

HBDH: β -hidroxibutiratodeshidrogenasa

MDA: medio de desrepresión con arabinosa

MDG: medio de desrepresión con gluconato

Nasa: nitrogenasa

NR: nitrato reductasa

PHB: poli- β -hidroxibutirato

PIPES: ácido piperazina-N,N'-bis-2-etansulfónico

SDS: dodecil sulfato de sodio

TRIS: tris(hidroximetil)-aminometano

u.f.c.: unidades formadoras de colonias

FE DE ERRATAS

pág. 50, párrafo inferior, segunda línea:

donde dice "³⁵S-metionina (Amersham)"

debe leerse "³⁵S-metionina, actividad específica
1150 curies/milimol (Amersham)"

pág. 67, línea 5,

donde dice "cada subpoblación volvió a sedimentar"

debe leerse "cada subpoblación, ya sea la pesada
o la liviana, volvió a sedimentar"

pág. 70, entre la leyenda al fin de la Tabla II y el último
párrafo de la página:

intercalar la frase: "En este experimento la dis-
crepancia entre el total de PHB recuperado en el
gradiente, y el de la muestra original, podría
deberse a interferencias por la alta concentración
de sacarosa en el gradiente."

I N T R O D U C C I O N

El nitrógeno es un elemento esencial para los seres vivos, en los que forma parte de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes, y en muchos casos la disponibilidad de formas de nitrógeno asimilables, es un factor limitante del crecimiento de animales y plantas. La proporción relativa de nitrógeno asociado a la biosfera, comparativamente con otros elementos, es considerable; y de los tres grandes compartimientos en que se lo encuentra: suelo, mares y atmósfera, es mayoritario en la última. Los constituyentes nitrogenados de estos compartimientos se relacionan entre sí por un conjunto de procesos naturales abiológicos y biológicos que conforman el llamado ciclo del nitrógeno. En un ecosistema natural en equilibrio dicho ciclo resulta esencial y suficiente para el mantenimiento en el suelo de las cantidades necesarias de compuestos de nitrógeno utilizables por los seres vivos ("nitrógeno fijado"); en particular mediante la fijación del nitrógeno atmosférico se reponen sustancias nitrogenadas que entre otros destinos se pierden, en forma de nitrógeno molecular (N_2), por reducción disimilatoria de nitrato por bacterias denitrificantes. Una alteración en el balance nitrogenado de los suelos se produce en condiciones de explotación agrícola cuyos productos (y su contenido de nitrógeno) no retornan al propio suelo; la consiguiente depleción de nitrógeno se hace más intensa aún a través de las sucesivas cosechas. En consecuencia se debe intensificar los procesos compensatorios que introduciendo nitrógeno fijado mantengan la fertilidad de los suelos, y esta necesidad acompaña a la constante demanda de alimentos de una población creciente.

Los recursos disponibles para incrementar el nitrógeno fijado son de dos tipos: la fijación química y la biológica.

Tanto en la una como la otra la reducción de nitrógeno molecular a amonio requiere un reductor potente, cuya obtención es costosa en términos energéticos. En la primera se obtiene amoníaco mediante el proceso inventado por Haber y Bosch en 1914, en que se combinan nitrógeno e hidrógeno moleculares en condiciones de altas temperaturas y presión, y en plantas industriales con alto grado de desarrollo ingenieril. Esas fábricas tienen una gran capacidad de producción que permitirían satisfacer las actuales demandas de fertilizantes nitrogenados, y su expansión aseguraría las necesidades futuras. Pero tanto el proceso de manufactura como su aplicación poseen limitaciones de distintos tipos: las instalaciones requieren grandes inversiones de capital; surgen costos adicionales de transporte, almacenamiento y aplicación de los mismos; hay una gravosa dependencia de combustibles fósiles no renovables principalmente el gas natural, de cuyo metano se obtiene el H_2 .

La fijación biológica de nitrógeno es llevada a cabo exclusivamente por un grupo limitado de organismos procaríotes caracterizados por poseer todos ellos el sistema enzimático de la nitrogenasa que cataliza la reducción del nitrógeno molecular a amonio.

En el cuadro siguiente se muestran los distintos microorganismos fijadores de N_2 conocidos los cuales han sido ordenados según la capacidad de asociación con otros organismos.

SISTEMAS BIOLÓGICOS FIJADORES DE NITRÓGENO

Sistemas simbióticos

Líquenes	Nostoc, Anabaena, Tolypothrix
Gunnera	Nostoc
Azolla	Anabaena azollae
Nódulos radiculares	Leguminosas - Rhizobium
	No leguminosas - Frankia

Rizocoenosis

Pastos tropicales	Azotobacter paspali, Azospirillum
-------------------	-----------------------------------

Microorganismos fijadores de vida libre

Aerobios	Azotobacter, Derxia, Berjerinkia, Mycobacterium flavum, bacterias metano-oxidantes, Corynebacterium autotrophicum, Thiobacillus ferro- oxidans
Facultativos	Klebsiella spp., Bacillus polymyxa B. macerans, Enterobacter spp., Erwinia herbícola, Rhodospseudomonas Rhodospirillum
Anaerobios	Clostridium pasteurianum, Desulfo- brio, Desulfotomaculum, Chlorobium Chromatium

También es posible agruparlos de acuerdo a la capacidad que presentan para utilizar distintas fuentes de energía: hay bacterias heterotróficas, fototróficas y fotosintéticas (cianobacterias, algas azul-verdosas). Sin embargo en último término todos dependen, a través de la fotosíntesis, de la energía solar virtualmente inextinguible. Esto último es quizás una de las razones de más peso por la cual la fijación biológica ha ganado interés sobre el proceso químico industrial que consume recursos energéticos no renovables. Se ha estimado que por cada tonelada de nitrógeno fijado químicamente se requieren dos toneladas de petróleo o su equivalente. Estos aspectos prácticos estimulan el estudio del proceso de fijación biológica de nitrógeno, el cual ya desde el punto de vista puramente biológico resulta muy atractivo (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7).

LA SIMBIOSIS RHIZOBIUM-LEGUMINOSA

Uno de los sistemas fijadores de nitrógeno más sofisticados lo constituye la simbiosis entre plantas leguminosas y bacterias del género *Rhizobium*. El rizobio posee la capacidad selectiva de infectar las raíces y a través de una secuencia ordenada de interacciones entre ambos simbioses inducir la formación de nódulos. El nódulo viene a constituir el ámbito natural apropiado para la expresión de la enzima nitrogenasa de rizobios y para la incorporación del N_2 fijado en forma de compuestos que son directamente asimilados por la planta. Ninguno de ambos simbioses puede por sí solo llevar a cabo este proceso global. Se ha estimado que el aporte de este sistema al total mundial de la fijación biológica de

nitrógeno alcanzaría entre un 20 y 40%, y la explotación agropecuaria de las leguminosas como forrajeras o fuente de granos ricos en proteínas vegetales, está ampliamente distribuída en todo el mundo.

CARACTERISTICAS TAXONOMICAS DE AMBOS SIMBIONTES

La Planta

La simbiosis con *Rhizobium* siempre comprende un miembro de la familia de las Leguminosae como macrosimbionte. Las leguminosas parecen haberse originado como una familia arborescente tropical surgida en el Cretáceo, y de la cual han derivado posteriormente los ejemplares herbáceos pequeños, propios de los climas templados (por ejemplo vicias, lotus, trébol, alfalfa). Esta familia agrupa tres subfamilias: Mimosoideae, Caesalpinoideae y Papilionoideae. A su vez la subfamilia Papilionoideae comprende varias tribus que entre otras agrupan a aquellas especies de mayor significado económico, y a las cuales se las ha estudiado en mayor extensión. En el año 1973 Trinick describió un caso de simbiosis fijadora de nitrógeno entre *Rhizobium* spp., y una no leguminosa que primitivamente fue identificada como *Trema aspera*, pero que posteriores estudios establecieron que se trataba de un miembro de la familia Ulmaceae perteneciente al género *Parasponia*. Este constituye el único ejemplo comprobado de asociación simbiótica de *Rhizobium* con un macrosimbionte no leguminosa (8, 9).

La Bacteria

El género *Rhizobium*, definido como el grupo de bacterias capaces de nodular raíces de leguminosas, se encuentra junto con *Agrobacterium* y *Chromobacterium* en la familia *Rhizobiaceae*, dentro del orden *Eubacteriales* (10). Utilizando como criterio de especie, la selectividad de asociación simbiótica (los llamados grupos de inoculación), se han definido seis especies de *Rhizobium* sobre la base de la planta huésped preferida:

<i>R. leguminosarum</i>	<i>R. meliloti</i>
<i>R. trifolii</i>	<i>R. lupini</i>
<i>R. phaseoli</i>	<i>R. japonicum</i>

Quedan excluidas de esta clasificación otras cepas de amplio rango de huésped de infección aisladas de varias diferentes plantas, tal como sucede con los grupos de inoculación de caupí y de lotus.

Los rizobios en cultivos libres son bacilos Gram negativos, que miden entre 0.5 - 0.9 x 1.2 - 3.0 micrones, móviles cuando son jóvenes por medio de flagelos polares o peritricos. No presentan endosporos; en cultivos viejos gran parte de su interior está ocupado por gránulos de poli- β -hidroxibutirato.

En base a sus propiedades culturales se ha establecido dos grupos que han sido denominados de crecimiento rápido, y de crecimiento lento. Los primeros tienen un tiempo de generación entre 2 y 4 horas; tienden a acidificar el medio de cultivo; producen grandes cantidades de gomas solubles que liberan al medio. Están comprendidos en este grupo *R. leguminosarum*, *trifolii*, *phaseoli* y *meliloti*. Los rizobios de crecimiento

lento tienen un tiempo de duplicación entre 6 y 8 horas; alcalinizan el medio; producen menos goma que los rápidos, pero ésta es más densa y adherente. Entre ellos se encuentran *R. japonicum*, *R. lupini* y *R. spp.* (caupí).

Todos los rizobios son bacterias aeróbicas quimioorganotróficas y se desarrollan con una temperatura óptima entre 28 - 30°C en medios de cultivo complejos. El medio de cultivo más usado contiene extracto de levadura, manitol y sales (ELM). Se han encontrado ciertas diferencias metabólicas entre los grupos de rizobios de crecimiento rápido, y lento: los primeros utilizan un rango mayor de fuentes de carbono que los segundos, y disponen de varios caminos metabólicos para su aprovechamiento: además de la vía de Entner-Doudoroff, poseen las de pentosafosfatos, y de Embden-Meyerhof (11, 12, 13, 14).

EL ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS

El primer nivel de interacción entre la raíz y la bacteria se observa en la rizosfera, en la que, a través de sustancias que exuda la planta se atrae y facilita el desarrollo de los rizobios. Esto conduce a una microcolonización de la zona próxima a la raíz. Las conclusiones de varios autores no son coincidentes sobre la existencia de selectividad en la proliferación rizosférica de una determinada especie de rizobio. Posteriormente algunos rizobios se adhieren polarmente a la superficie de la raíz. En relación con los posibles mecanismos de esta unión se ha sugerido que las lectinas participarían en esta etapa de reconocimiento mutuo actuando como un puente entre ambos simbioses (15). Esas moléculas, de tipo multivalente,

tendrían capacidad para reconocer y unir, a manera de las interacciones antígeno-anticuerpo, a la superficie radicular por un lado y a la correspondiente bacteria nodulante por el otro. En *R. trifolii* y en *R. japonicum* los determinantes antigénicos residirían en los polisacáridos capsulares de la bacteria (16, 17, 18), mientras que en *R. leguminosarum* otras evidencias indican que sería el lipopolisacárido de pared quien interaccionaría con la correspondiente lectina (19). Esos determinantes serían de carácter transitorio dependiendo de la edad y estado metabólico de las bacterias. Si bien faltan evidencias sobre el rol generalizado de las lectinas, la reactividad química de las mismas las hace un candidato muy probable en relación con esta etapa de unión de los rizobios a los pelos radiculares (20, 21). Después de la adhesión el proceso de infección continúa con el enrulado del pelo radicular. Este evento parece ser la primera respuesta visible de la planta al rizobio: se puede alcanzar distintos grados y tipos de deformación que dependen de la planta, la cepa de *Rhizobium* y la porción de raíz implicada. Este efecto también puede ser provocado por tratamiento de las raíces con filtrado estéril del medio sobre el cual desarrolló el rizobio. También se ha sugerido que hormonas vegetales producidas por rizobios, y exopolisacáridos de los mismos, que activarían enzimas degradantes de pared, podrían estar implicados (22, 23).

En la base del plegamiento del pelo radicular se produce la entrada del rizobio por invaginación de la pared mediante un mecanismo no conocido. Este proceso en dedo de guante progresa formando un tubo o "hilo de infección" que encapsula a los rizobios alineados cola con cabeza, mientras que ya precediéndolo a distancia, se manifiestan cambios en

el tejido cortical de la raíz: un marcado incremento del tamaño de las células externas, y una mayor actividad mitótica en las células corticales internas. Ya sea porque el rizobio en el hilo de infección ha degradado la pared originalmente presente, o que el crecimiento de la zooglea, matriz interior del hilo, ha sido más rápido que la deposición del material de pared por parte de la célula huésped, ésta y la bacteria quedan en contacto. A continuación los rizobios son liberados en el interior celular por un proceso que parece ser una endocitosis. Después las bacterias encerradas en envolturas membranosas producidas por la planta se multiplican activamente, pudiendo dividirse también en el interior de sus propias membranas envolventes. Si bien no en todas las leguminosas, en algunas especies como arveja y soja la división de las células huéspedes se detiene cuando se produce la invasión o inmediatamente después de ello, y comienza a observarse un aumento de tamaño y un incremento en el número de mitocondrias y plástidos. Por su parte las bacterias se hinchan, alcanzando en algunas especies de rizobios un volumen diez veces el original, y un aspecto pleomórfico; en soja se produce muy poco engrosamiento. Finalmente el tejido nodular maduro aparece constituido por grandes células llenas de bacterias así modificadas (llamadas "bacteroides") y con mitocondrias y amiloplastos en su periferia; se observa la presencia de leghemoglobina y gránulos de almidón próximos a los bacteroides y dentro de éstos se incrementan (en el caso de los nódulos de soja) las inclusiones de poli- β -hidroxibutirato y polifosfato. Paralelamente ya se detecta actividad de nitrogenasa (23, 24).

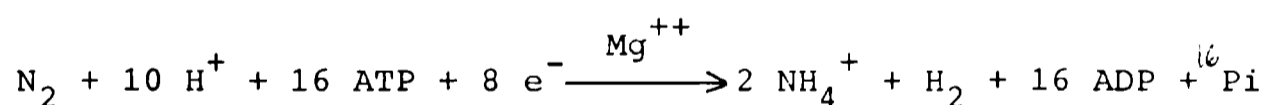
Con el término "bacteroide" se hace referencia a los rizobios que se encuentran en el nódulo que presentan un

aspecto pleomórfico y mayor volumen y poseen actividad de nitrogenasa. Un análisis más detallado revela otros cambios adicionales de tipo fisiológico y bioquímico que acompaña al proceso de diferenciación de las bacterias a bacteroides, a los cuales se hace referencia más extensa en las secciones siguientes.

DIFERENCIAS ENTRE BACTEROIDES Y RIZOBIOS LIBRES

La nitrogenasa

La capacidad de expresar el sistema enzimático de la nitrogenasa es el rasgo más saliente de los rizobios, en su forma de bacteroides. Dicho sistema ha sido estudiado en varios tipos de organismos. En todos ellos la reacción catalizada se puede esquematizar de la siguiente manera:



Aquí quedan indicadas algunas de las características salientes como son la necesidad de poder reductor, una gran demanda de energía bajo la forma de ATP, y la reducción concomitante de protones a hidrógeno molecular.

La nitrogenasa aislada y purificada a partir de varios microorganismos fijadores, presenta semejanzas estructurales en todos ellos: dos componentes proteicos separados, ambos con hierro no hemínico, y con una alta sensibilidad al oxígeno. Uno de los componentes, llamado "dinitrogenasa", componente I o molibdoferroproteína, de peso molecular 220.000 -

240.000 daltons, está constituido por cuatro subunidades iguales dos a dos, contiene dos átomos de Mo, 28 - 32 átomos de Fe y 28 átomos de S ácido-lábiles que constituyen centros compuestos por Fe_4S_4 ; $MoFe_8S_8$ (llamado cofactor FeMo-co); y por Fe_2S_2 . La otra proteína, conocida como dinitrogenasa reductasa, componente II, o ferroproteína, de 56.000 - 66.000 daltons, está constituida por dos subunidades iguales y contiene 4 átomos de Fe y 4 de S, ácidos-lábiles. Este componente II es extraordinariamente sensible al O_2 , mucho más que el componente I.

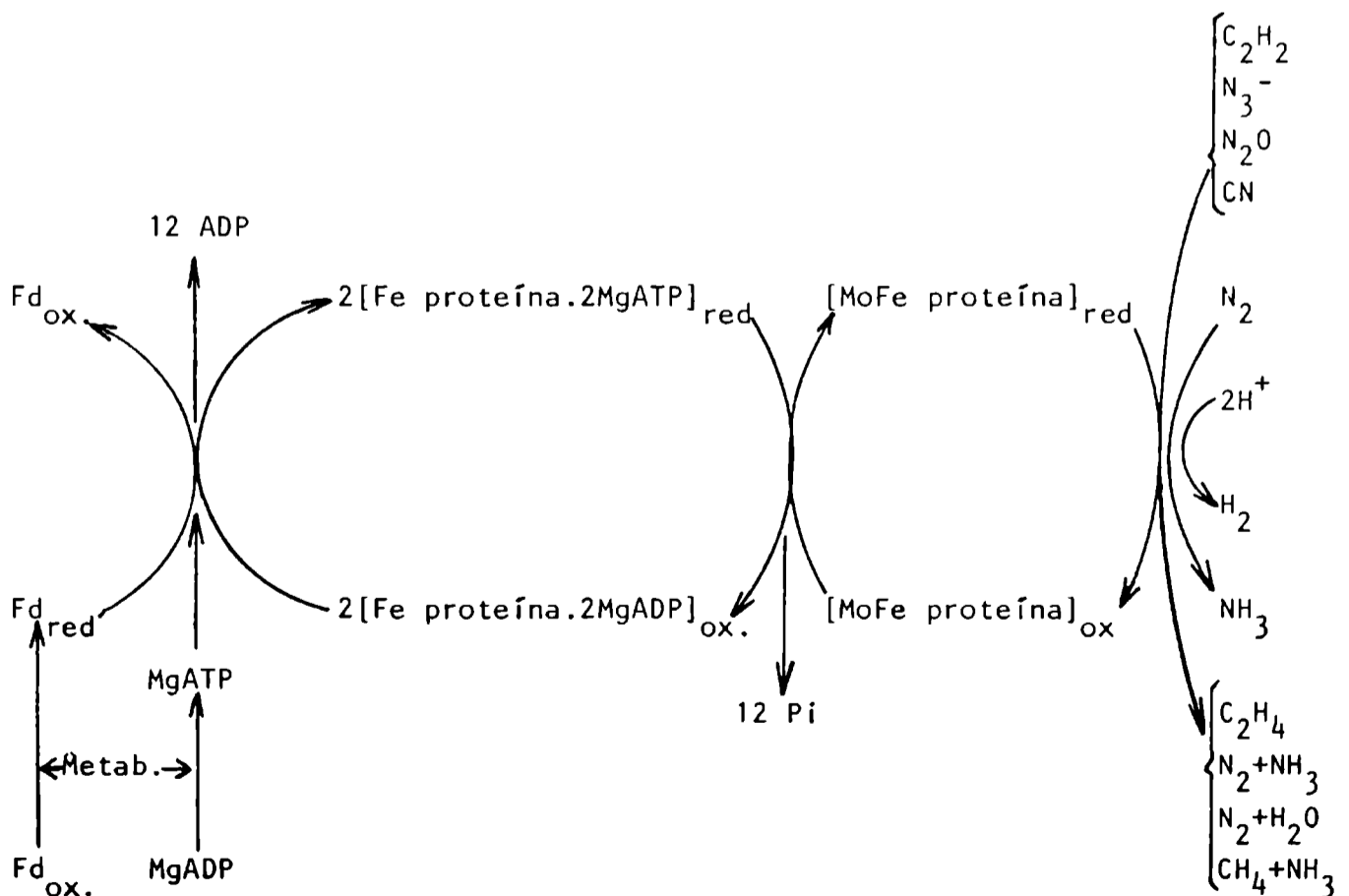
Una evidencia de las similitudes existentes entre las nitrogenasas de distintas especies está dada por las combinaciones cruzadas entre componentes I y II, que condujeron en la mayoría de los casos a nitrogenasas activas (25). Esto ha sido corroborado por los recientes trabajos de Ausubel y col. (26) que encontraron homología entre algunas zonas del DNA en la región de los genes *nif* de distintas especies, señalando el alto grado de conservación de los genes *nif* a lo largo de la evolución.

El proceso de reducción de dinitrógeno a amonio demanda un gasto mínimo de energía equivalente a 2 moléculas de ATP por cada electrón, y es exclusivamente el componente II el que interactúa, con el complejo de $ATPMg$, para después interaccionar con el reductor. También puede unir $MgADP$ pero ello conduce a una marcada inhibición de la catálisis. En el esquema que se muestra al pie de esta sección se indican las reacciones que tienen lugar en el proceso de reducción de N_2 . No se han aislado intermediarios de la reducción, tales como N_2H_2 o N_2H_4 , pero se ha detectado un intermediario hidruro de dinitrógeno unido a la enzima (27). En condiciones óptimas in

in vitro sólo el 75% del flujo de electrones que son canalizados por la nitrogenasa va a reducir N_2 , en tanto el otro 25% son consumidos en la reducción de protones a H_2 molecular. Esta actividad de protón reductasa también se manifiesta in vivo y es interesante que algunas bacterias, incluso ciertas cepas de *Rhizobium* (28, 29), poseen una hidrogenasa que es capaz de recuperar ese "desperdicio" de poder reductor.

Como se observa en el esquema, la nitrogenasa es capaz de reducir varios otros diferentes sustratos, además de N_2 . Una alternativa que ha resultado de mucha utilidad es el acetileno, el cual es reducido a etileno. Esto permitió desarrollar un método de medida de la actividad aplicable tanto en laboratorio como en investigaciones hechas a campo (30), y le dió un gran empuje a los estudios sobre fijación biológica de nitrógeno.

MECANISMO DE ACCION DE LA NITROGENASA



Funciones auxiliares del aparato simbiótico para la fijación de nitrógeno

El objetivo supremo de fijar nitrógeno, llevado a cabo por el sistema de la nitrogenasa de los bacteroides, requiere condiciones especiales que son aportadas por la acción concertada de ambos simbios. Así, se necesita la provisión de poder reductor y de energía como ATP, y la nitrogenasa debe estar protegida contra la inactivación por el oxígeno. Por otra parte, el NH_4^+ producido debe ser transformado en productos orgánicos nitrogenados que constituyen la forma definitiva de beneficio simbiótico a la planta. A continuación revisaré en forma comparativa los componentes y funciones que en ambos simbios participan en estos procesos complementarios de la fijación de nitrógeno, y otras características que acompañan a la adquisición de estas funciones en el desarrollo simbiótico.

Poder reductor. No está claramente identificado el proveedor de electrones para la reacción de reducción de N_2 en los bacteroides. Candidatos plausibles son las proteínas, transportadoras de electrones de bajo potencial redox, ferredoxina, o flavodoxina, ambos encontrados en bacteroides, además de varios otros organismos fijadores de nitrógeno (31). Los electrones de estos componentes son aceptados por la dinitrogenasa reductasa (ferroproteína, componente II). El origen de los mismos se atribuye a las oxidaciones de los metabolitos carbonados por los bacteroides. El transporte de esos electrones a la ferredoxina o la flavodoxina, requiere según Veeger y col. (32) la participación de una membrana energizada que hace aún

Funciones auxiliares del aparato simbiótico para la fijación de nitrógeno

El objetivo supremo de fijar nitrógeno, llevado a cabo por el sistema de la nitrogenasa de los bacteroides, requiere condiciones especiales que son aportadas por la acción concertada de ambos simbios. Así, se necesita la provisión de poder reductor y de energía como ATP, y la nitrogenasa debe estar protegida contra la inactivación por el oxígeno. Por otra parte, el NH_4^+ producido debe ser transformado en productos orgánicos nitrogenados que constituyen la forma definitiva de beneficio simbiótico a la planta. A continuación revisaré en forma comparativa los componentes y funciones que en ambos simbios participan en estos procesos complementarios de la fijación de nitrógeno, y otras características que acompañan a la adquisición de estas funciones en el desarrollo simbiótico.

Poder reductor. No está claramente identificado el proveedor de electrones para la reacción de reducción de N_2 en los bacteroides. Candidatos plausibles son las proteínas, transportadoras de electrones de bajo potencial redox, ferredoxina, o flavodoxina, ambos encontrados en bacteroides, además de varios otros organismos fijadores de nitrógeno (31). Los electrones de estos componentes son aceptados por la dinitrogenasa reductasa (ferroproteína, componente II). El origen de los mismos se atribuye a las oxidaciones de los metabolitos carbonados por los bacteroides. El transporte de esos electrones a la ferredoxina o la flavodoxina, requiere según Veeger y col. (32) la participación de una membrana energizada que hace aún

más negativo el potencial redox original de los donores de electrones.

ATP y sistemas de transporte de electrones. El ATP, requerido como vimos en grandes cantidades, se forma en los bacteroides principalmente por procesos de fosforilación oxidativa. Los rizobios, como ya se dijo son aerobios obligados y en particular carecen de la capacidad de extraer energía por fermentación anaeróbica. Los bacteroides participan de esta característica, con la particularidad de utilizar para las oxidaciones celulares, oxígeno molecular en concentración extremadamente baja. La adaptación a esta condición de microaerobiosis involucra el reemplazo de algunos componentes de la cadena de transporte de electrones propios de los cultivos aerobios. En particular las bacterias aerobias contienen los citocromos a y a_3 , y citocromo O , y una hemoglobina no relacionada con la leghemoglobina de los nódulos, todos los cuales desaparecen en bacteroides. Por su parte los bacteroides (de *R. japonicum*) poseen un citocromo c , y dos citocromos identificados como P_{450} y P_{420} , que no se encuentran en las bacterias aeróbicas. Se ha propuesto secuencias terminales de transporte de electrones para las dos situaciones descritas anteriormente en correspondencia con los citocromos observados y con el efecto inhibitorio por cianuro o CO (33). También se han comparado los citocromos presentes en células crecidas aeróbicamente, o bien anaeróbicamente con NO_3 como aceptor final de electrones, y se pudo observar que la condición de anaerobiosis (más bien que la presencia de NO_3) era responsable de la aparición de un tipo de citocromos semejante al de bacteroides (34).

Se han descrito dos sistemas de oxidasas terminales

en bacteroides, una de alta y otra de baja afinidad por O_2 . Si bien ambas son activas a niveles muy bajos de O_2 la oxidasa de alta afinidad lo sería en concentraciones de O_2 entre 0.01 y 0.1 μM y estaría asociada a una muy eficiente fosforilación oxidativa. Por encima de 1 μM esta oxidasa sería muy poco activa y sería reemplazada por otra de baja afinidad por O_2 . La disponibilidad de un sistema de oxidasa con gran afinidad por O_2 les permite a los rizobios mantener una oferta de ATP suficiente para el proceso de fijación de N_2 en las condiciones limitantes en O_2 que imperan en el nódulo. Otra de las características diferenciales de los dos sistemas de oxidasas se relaciona con su sensibilidad a algunos inhibidores: el sistema de alta afinidad para O_2 y (contrariamente a lo que ocurre con el otro) es inhibido por CO, por azida, y por N-fenilimidazol. Dado que el N-fenilimidazol es un inhibidor específico del citocromo P_{450} se ha señalado que este citocromo podría participar en el camino de oxidación. Por otra parte la oxidasa de baja afinidad sería una flavoproteína localizada en la membrana celular (35, 36, 37).

Leghemoglobina. La leghemoglobina (LGB) es un producto de la acción mancomunada de ambos simbioses que es esencial para el activo funcionamiento de los bacteroides en condiciones de una efectiva microaerobiosis. Las leghemoglobinas estudiadas son todas proteínas monoméricas de 15.000 - 17.000 daltons de peso molecular, con protohemo IX como grupo prostético. Se trata de un componente propio de los nódulos fijadores activos, que no se encuentra en otros tejidos de la planta, ni en bacterias aisladas (38). En el desarrollo nodular aparece en etapas tardías: en *Pisum sativa* su aparición coincide con el

componente I de la nitrogenasa y precede al componente II (39). En relación con su localización dentro del nódulo no hay conclusiones coincidentes. Es externa a los bacteroides, y según Bergersen y Goodchild (40) estaría dentro de las membranas en volventes en contacto directo con los bacteroides; contrariamente Verma y Bal (41) usando técnicas inmunológicas observaron su presencia en el citoplasma celular, y no en el espacio peribacteroidal.

Se sabe por los estudios de Dilworth (42) que la proteína de LGB está determinada genéticamente por la planta huésped. Además Verma y col. (43) han logrado sintetizar apoleghemoglobina en un sistema de embrión de trigo utilizando como RNA mensajero el RNA 9S asociado con ribosomas 80S del citoplasma de planta provenientes de nódulo de soja. Estos ha llazgos indican que la cadena peptídica de la hemoproteína es sintetizada y provista por la planta. Paralelamente hay evidencias que indicarían que los grupos hemo serían sintetizados y provistos por el bacteroide (44). Avissar y Nadler (45) han observado que *R. japonicum* en cultivos limitados en O₂ es capaz de excretar copro y protoporfirinas al medio de cultivo, y de incrementar marcadamente la actividad de algunas enzimas del metabolismo del hemo. Esto último reforzaría el propuesto rol de los bacteroides como potenciales proveedores de los grupos hemo para la formación de la holoproteína LGB. La síntesis concertada de la LGB aparecería como una clara manifestación de la simbiosis a nivel molecular.

La LGB puede oxigenarse reversiblemente:

$$\text{Fe}^{\text{II}}\text{-LGB} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{\text{II}}\text{-LGB}\cdot\text{O}_2$$
, y la concentración de O₂ libre (disuelto) que semisatura la proteína es 0.07 μM. Mediante la espectrofotometría de tejido intactos de nódulos de soja se

determinó que, in vivo, normalmente 20 - 25% de la LGB está oxigenada (46); la correspondiente concentración de O_2 libre en equilibrio, sería de aproximadamente $0.01 \mu M$. La LGB actuaría como un transportador de O_2 facilitando su difusión hacia los bacteroides (47), a los cuales llegaría con una concentración (libre) óptima para el ya mencionado sistema de oxidasas terminales de alta afinidad por O_2 , y muy eficientes en la producción de ATP. La LGB presente en alta concentración en el entorno de los bacteroides (más de $1 mM$ (38)) serviría también para mantener un reservorio importante de O_2 secuestrado, en equilibrio con niveles de O_2 disuelto libre dentro de límites permisibles para la estabilidad de la nitrogenasa. Según Wittenberg (47), tres factores: la barrera difusional de la corteza del nódulo para la entrada del O_2 , la difusión facilitada de O_2 por la LGB a bajas concentraciones de O_2 libre, y la capacidad de los bacteroides de un alto consumo de O_2 aún a bajas concentraciones, que conducen a una abundante producción de ATP, se conjugan en el nódulo simbiótico para la protección de la nitrogenasa; a través de ellos se mantiene una muy baja concentración de O_2 libre en el seno de los bacteroides, compatible con la estabilidad del sistema enzimático.

Requerimientos de nutrientes. Los bacteroides requieren una constante provisión de nutrientes para satisfacer las demandas de ATP y poder reductor de la actividad fijadora de N_2 . Minchin y Pate (48) han estimado en arveja que del total de fotosintatos producidos por la planta, 32% llegan al nódulo a través del floema, de los cuales más de un tercio (12%) son consumidos en el metabolismo energético y se eliminan como CO_2 .

Los principales productos de la fotosíntesis que llegan a la raíz son sacarosa y glucosa, y en el nódulo se los encuentra junto con otros azúcares en proporciones menores como m-inositol (49). Si bien los bacteroides de soja carecen de invertasa, la sacarosa podría ser utilizada indirectamente a través de su hidrólisis por una invertasa muy activa de las células vegetales del nódulo (50). Trinchant y Rigaud (51) encontraron que los bacteroides aislados de vicia eran capaces de mantener actividad reductora de acetileno metabolizando glucosa y sacarosa, en condiciones de presiones parciales de O_2 por debajo de 30 mm Hg. Si bien no se conoce completamente los posibles caminos degradativos de la glucosa en bacteroides, se supone que deben transcurrir por las vías encontradas en rizobios libres (13). Se ha observado que los niveles de la actividad de nitrogenasa en los nódulos reflejan las fluctuaciones en la producción y disponibilidad de fotosintatos de la planta durante períodos de oscuridad o escasa luminosidad, pero que la actividad persiste sin llegar a anularse. Esto ha inducido a pensar que los bacteroides recurren a alguna forma de reserva energética. Los bacteroides de *R. japonicum* y algunas otras especies contienen poli- β -hidroxibutirato (PHB) en proporción de hasta 30 - 50% de su peso seco. Este polímero carbonado se acumula en algunas especies de *Rhizobium* no sólo en sus bacteroides, sino también en cultivos saturados en vida libre (52). Evans y col encontraron actividad de PHB-depolimerasa y β -hidroxibutiratodeshidrogenasa (HBDH) en bacteroides de soja, pero sus resultados no les permitía concluir que la reserva de PHB utilizable a través de esas enzimas era suficiente para mantener valores altos de actividad de nitrogenasa en condiciones de oferta limitada de carbohidratos por

parte de la planta. Lo que sí fue demostrado es que β -hidroxibutirato (HB) es un sustrato apto para proveer electrones y energía para la actividad de nitrogenasa en bacteroides aislados de soja (53). En experimentos in vitro, se ha observado que una serie de ácidos di y tricarbónicos, y especialmente succinato, son satisfactoriamente utilizados por distintos bacteroides para sostener su actividad de nitrogenasa (54).

Asimilación del nitrógeno fijado. El amonio, producto inmediato de la fijación del nitrógeno, es transformado en el nódulo en compuestos orgánicos nitrogenados, que son exportados al resto de la planta por el sistema vascular del xilema. Scott y col. (55) han propuesto que serían las enzimas de la planta las que asimilarían el amonio, producido y secretado por los bacteroides dentro de los nódulos de *R. lupini*. Durante el desarrollo del nódulo las actividades de las enzimas glutamina sintetasa, glutamato sintasa, y asparagina sintetasa, se incrementan en la fracción del citoplasma vegetal pero no en los bacteroides; las mismas conducirían a la síntesis de asparagina que en muchas leguminosas es el producto de exportación del nódulo. Por otra parte, y en un mismo sentido, se ha observado que los bacteroides aislados de soja secretan al medio casi todo el amonio fijado (56), y de manera similar sucede con el N_2 fijado por los rizobios desreprimidos en cultivos libres (57, 58). Shanmugan y col. (59) han sugerido que las enzimas bacterianas relacionadas con la asimilación de amonio estarían, en el estado bacteroide, anuladas, lo cual conduciría a una casi exclusiva exportación del N_2 fijado. En este aspecto los rizobios diferirían significativamente de otras bacterias fijadoras no simbióticas, como por ejemplo

Klebsiella, Azotobacter, Clostridium, y algas azul-verdes.

Nitrato reductasa. Bacteroides extraídos de nódulos de soja tienen una nitrato reductasa muy activa. Cheniae y Evans (60) encontraron una correlación de los niveles de esta actividad con la capacidad fijadora de N_2 y el contenido de leghemoglobina. Daniel y Appleby (34) detectaron también niveles altos de nitrato reductasa junto con la ausencia de nitrito reductasa, sugiriendo que la primera sería una enzima del tipo respiratorio o disimilatoria. Rigaud y col. (61) mostraron que la reducción de nitrato podía sostener la actividad de nitrogenasa de bacteroides de soja, en anerobiosis. No se comprende cuál sería el rol fisiológico de esta nitrato reductasa sobre todo si se tiene en cuenta que el nitrito que produce y que se acumula es un potente inhibidor de la nitrogenasa; mutantes de R. spp. (caupí) 32HI carentes de nitrato reductasa fueron capaces de nodular y fijar N_2 (62).

Acidos nucleicos, capacidad de biosíntesis de macromoléculas y viabilidad. Entre otras importantes diferencias con los rizobios en cultivos aerobios, los bacteroides maduros de nódulo muestran una decrecida síntesis de proteína (63). Esta menor actividad biosintética se corresponde con el carácter de reposo de esa población bacteriana. En estudios tempranos se creyó poder justificar los cambios observados en base a una disminución en el contenido de DNA de los bacteroides (64). Paralelamente se encontró que los bacteroides extraídos de nódulos de soja tenían una muy baja capacidad de formar colonias en agar ELM (menos de 0.02% de los bacteroides fueron viables (65)). Posteriores estudios (66) en los que

por citofluorometría de flujo se medía el contenido individual de DNA de los bacteroides, revelaron que las poblaciones de éstos presentaban distribuciones de DNA que no explicaban la baja viabilidad. También se encontró que la viabilidad de los bacteroides (de *R. lupini*) dependía de la osmolaridad del medio, y que concentraciones aumentadas de manitol permitían lograr una alta viabilidad (67). Rolfe y col. (68) mostraron que los bacteroides obtenidos de protoplastos aislados de nódulos de trébol fueron viables en un 90%, y, Tsien y col. (69) encontraron una alta viabilidad en los bacteroides de soja cultivados en medio ELM, la cual era independiente de la edad de las plantas y de la cepa de *R. japonicum*.

La mayor sensibilidad osmótica de los bacteroides comparados con las bacterias (señaladas anteriormente) podría corresponderse con diferencias en la pared celular de unas y otros, observadas en *R. leguminosarum* por Van Brussel y col. (70).

Controles de la simbiosis

El proceso del establecimiento de la simbiosis comienza en la superficie del pelo radicular, y a través de una secuencia ordenada de varias etapas culmina en la formación de un nódulo altamente especializado en la fijación de nitrógeno molecular. Factores genéticos y fisiológicos de ambos simbioses, en interacción con el medio ambiente dirigen y controlan el desarrollo exitoso de la simbiosis, en distintas etapas definidas del proceso. Generalmente los casos en que no hay formación de nódulos se dice que el simbionte es

no infectivo mientras que en aquéllos en que los nódulos resultantes no son fijadores de N_2 se los denomina ineficientes. Se han identificado posibles puntos de control en los tres tramos principales del desarrollo simbiótico: preinfección; infección y desarrollo del nódulo; y funcionamiento del nódulo (23) y es posible encontrar para cada nivel alteraciones cuyas causas residen en uno u otro de los simbiosomas. En relación con la planta Nutman (71) seleccionó algunas líneas de trébol que eran resistentes a la infección por *R. trifolii*, no obstante las raíces retenían el efecto estimulante sobre la proliferación de los rizobios en la rizosfera y la capacidad de enrulado de los pelos, pero no se observaron hilos de infección. Por otra parte, en soja se ha llegado a identificar cuatro genes que afectarían la fijación simbiótica de N_2 : el llamado rj1 confiere resistencia a la nodulación por *R. japonicum*, y los rj2, rj3 y rj4 estarían asociados con la presencia de nódulos pequeños, blancos (sin leghemoglobina e ineficientes (72, 73)). También se ha estudiado la influencia del microsimbionte: Maier y Brill (74), empleando técnicas genéticas aislaron mutantes de la cepa parental efectiva de *R. japonicum*, 61A76 con diferentes comportamientos simbióticos; algunos de esos mutantes fueron no infectivos; otros indujeron la formación de nódulos que no tenían actividad de nitrogenasa y un aspecto interno que indicaba ausencia de leghemoglobina, y un tercer tipo cuyos nódulos ineficientes contenían leghemoglobina. Resulta interesante en ese trabajo que un mutante no infectivo y otro ineficiente fueron capaces de expresar la nitrogenasa en cultivos libres. Estos resultados ponen en evidencia que no es necesario que haya fijación de nitrógeno para que se forme leghemoglobina en el nódulo, y por otra

parte que el proceso de diferenciación en el nódulo puede requerir eventos que ocurren en etapas tardías del desarrollo y cuyo defecto impide la expresión simbiótica de la nitrogenasa. También Dénarie (75) observó en estudios con mutantes auxotrofos de *R. meliloti* ineficientes la interrupción del proceso de diferenciación en etapas avanzadas del mismo: mutantes auxotrofos respecto a adenina (Ade^-) estaban bloqueados en la transformación de bacteria a bacteroide, mientras que en una etapa precedente en el desarrollo del nódulo, mutantes auxotrofos para uracilo (Ura^-) eran incapaces de multiplicarse después de haber penetrado en la célula huésped. En trébol Pankhurst (76) ha descrito el comportamiento de mutantes de *R. trifolii* algunos de los cuales dan lugar a alteraciones en etapas intermedias del proceso simbiótico: tal como la capacidad para progresar en el hilo de infección, o para evolucionar en el interior de la célula vegetal. Por otra parte la planta controla esta etapa intermedia determinando la proporción de hilos de infección que culminarán exitosamente en un nódulo o abortarán (77). Finalmente el funcionamiento particular de cada simbionte en el nódulo formado puede originar distintos grados de eficiencia en el aprovechamiento del N_2 fijado. Se han seleccionado líneas de plantas de alfalfa y soja (78, 79), y cepas de rizobios con una incrementada capacidad de incorporación del N_2 fijado simbióticamente a la biomasa (80). En este sentido las cepas de rizobios que poseen la enzima hidrogenasa aparecen como más eficientes, al ser capaces de recuperar parte de la energía perdida a través de la liberación de H_2 por la nitrogenasa (81).

Estos ejemplos ilustran el grado de complejidad del proceso de la simbiosis, en que dos organismos, un eucariote

y otro procariote, se reconocen y se dan señales y respuestas a lo largo del proceso, y donde el cumplimiento ordenado de las sucesivas etapas es condición para el logro de un aparato diferenciado con nuevas e importantes funciones.

LA NITROGENASA EN AUSENCIA DE PLANTA HUESPED

Los primeros intentos exitosos para lograr la expresión de la actividad de nitrogenasa en *Rhizobium* en condiciones *in vitro*, fueron obtenidos inoculando cultivos de células de soja con cepas de *R. japonicum* o caupí (82, 83). En el año 1975, se informaron los resultados que mostraban que también había producción de nitrogenasa en rizobios asociados a cultivos de plantas no leguminosas (84, 85), sugiriéndose que si algún factor difusible producido por la planta era requerido para la desrepresión de la nitrogenasa, el mismo no estaba limitado a las leguminosas. Posteriormente en ese mismo año varios laboratorios informaron casi simultáneamente la obtención de actividad de nitrogenasa en cultivos puros (en ausencia de planta) de algunas cepas de *Rhizobium japonicum* y de *Rhizobium sp.* (caupí) (86, 87, 88, 89), y definían a la condición de microaerobiosis como un requerimiento indispensable para que ello ocurra (90, 91, 92). Estos resultados establecieron en forma concluyente que *Rhizobium* posee toda la información genética necesaria para la nitrogenasa.

Un determinante principal de la actividad y síntesis de la nitrogenasa o contrariamente su represión e inhibición es el nivel de O_2 , muchas observaciones así lo corroboran. Así, Keister (91) estableció en ensayos de inducción en

medio líquido que se debía lograr un ajuste cuidadoso entre la concentración de O_2 de la fase gaseosa y la densidad de rizobios del cultivo para desreprimir y obtener altos valores de actividad nitrogenasa. En los cultivos aeróbicos sobre medios sólidos agarizados, tal como fue descrito en los primeros experimentos (86, 87, 88), es probable que la nitrogenasa esté restringida a las bacterias de la zona interna de la colonia, donde una difusión limitada de O_2 y el propio consumo de las capas externas, que actuarían como atenuador, e internas, autorregularían la microaerobiosis. Utilizando el sistema de cultivos continuos en quimiostato, Bergersen y col. (92) encontraron que la actividad de nitrogenasa en la cepa de *R. sp.* CB756, es detectable cuando la concentración de O_2 disuelto era de $1 \mu M$, y que si se omitía el aporte de succinato en el medio de cultivo mientras se mantenía el aporte de O_2 , la concentración de O_2 se elevaba y la actividad de nitrogenasa declinaba hasta anularse. Esto sugiere que la concentración efectiva de O_2 que rodea a los rizobios está determinada por un balance entre los procesos difusionales de aporte de O_2 , y la propia capacidad de consumo respiratorio dependiente a su vez de la disponibilidad de sustratos rápidamente oxidables, y por la densidad de células del cultivo que lo llevan a cabo. Por otra parte Pankhurst y Craig (93) observaron que en un cultivo de rizobios incluidos en una capa de agar blando sobre otra de medio sólido en atmósfera de aire, desarrollaban tres zonas de bacterias que se diferenciaban morfológicamente entre sí. Los rizobios de la zona media eran morfológicamente muy semejantes a los bacteroides de nódulo. La posición de esa capa se modificaba con los niveles de O_2 presentes en la atmósfera superior, así a medida que se incrementaba el O_2 se

desplazaba a zonas más profundas del agar en que la concentración de O_2 resultara permisible para la expresión de la nitrogenasa. Complementariamente a estos trabajos se ha observado que niveles altos de O_2 no sólo inactivan irreversiblemente la nitrogenasa, sino además reprimen su síntesis (92, 94). Los posibles mecanismos de este efecto fueron explorados en un interesante trabajo de Lim y col. (95) que relaciona la expresión de algunas enzimas en microaerobiosis con nucleótidos cíclicos. En particular observaron que el agregado de cGMP (pero no los otros nucleótidos ensayados) a un cultivo microaerobio con nitrogenasa desreprimida provocaba una inhibición de la síntesis de nitrogenasa, y hallaron que los niveles de cGMP intracelulares en condiciones microaerobias eran significativamente inferiores a los detectados en aerobiosis. Esto sugiere que el O_2 podría estar controlando la expresión de la nitrogenasa a través de los niveles de un intermediario que podría ser sensible al estado redox de las células.

Con relación a los requerimientos de sustratos en el medio de desrepresión se ha establecido por una parte que las exigencias de fuentes carbonadas no son muy estrictas. En los primeros ensayos se vió que los mejores valores de actividad se encontraron con arabinosa y succinato; posteriores experimentos demostraron que un amplio rango de hexosas y pentosas resultaban aptos, así como también otros intermediarios del ciclo de ácidos tricarbónicos tales como piruvato, malato (96). Scott y col (94) estudiaron el efecto de distintas fuentes de carbono sobre la síntesis y actividad de nitrogenasa por *R. japonicum* cepa 110, en microaerobiosis. La síntesis de nitrogenasa era menor con glicerol o manitol que con gluconato, en tanto con glutamato la síntesis era semejante a la

situación de gluconato, pero el sistema no era activo. Para lograr su activación se debía suplementar con gluconato o hidrógeno molecular.

En relación con la presencia de compuestos nitrogenados en el medio de cultivo, *Rhizobium* presenta un comportamiento particular que lo diferencia de otras bacterias fijadoras como *Klebsiella*, *Azotobacter* y *Azospirillum*. Nitrógeno fijado en niveles bajos estimula el crecimiento y la actividad de nitrogenasa; ello ocurre con compuestos ya sea bajo la forma de aminoácidos como glutamina, glutamato o asparagina, o como amonio. Se han ensayado cultivos con hasta 30 mM de amonio sin que se observe pérdida de actividad de nitrogenasa tal como ocurre en las otras especies fijadoras. Se ha establecido que los rizobios usarían muy poco del nitrógeno que fijan para su propio crecimiento y el resto sería excretado al medio como NH_4^+ en su casi totalidad y de manera semejante a lo que ocurre en bacteroides aislados (54, 58). Esto último estaría de acuerdo con la hipótesis de que la asimilación del amonio en compuestos orgánicos en el nódulo transcurra a través de sistemas enzimáticos provistos por la planta, y sugirió que el control de la nitrogenasa por amonio podría ser distinto al mecanismo que opera en *Klebsiella pneumoniae*. En esta última la expresión de la nitrogenasa está regulada a través de la glutaminasintetasa y su estado de adenililación (97). Bergersen (98) empleando cultivos continuos de la cepa *Rhizobium* sp. CB756 encontró que la adenililación de la glutaminasintetasa en presencia de amonio era dependiente del nivel de O_2 disuelto en el medio. Así, incrementando el suministro de O_2 a un cultivo con amonio 10 mM, también aumentaba la proporción de glutaminasintetasa adenililada y concomitantemente se anulaba la actividad

de nitrogenasa. Si por el contrario se reestablecía la condición de bajo oxígeno la proporción de glutaminasintetasa adenililada caía antes que la actividad de nitrogenasa aumentara. Por otra parte estudios genéticos también han relacionado a la glutaminasintetasa, Ludwig y Signer (99) obtuvieron mutantes de *Rhizobium* sp. 32H1 auxotrofos para glutamina y con baja actividad de glutaminasintetasa, los cuales inducían la formación de nódulos inefectivos y no se desreprimían en vida libre. De los revertantes aislados que recuperaron la capacidad de síntesis de glutamina, sólo dos recuperaron la capacidad de producción de nitrogenasa. Estos serían los mutantes que adquirieron una glutaminasintetasa con las funciones catalíticas y regulatorias. Se ha descrito la existencia de dos tipos de enzima glutaminasintetasa en *Rhizobium* sp. 32H1: glutaminasintetasa I y II. La primera estaría involucrada, a través de su adenililación reversible, en el control de la expresión de los genes de la fijación de nitrógeno (genes *nif*) en condiciones simbióticas y en cultivos puros. Además se aisló un mutante con glutaminasintetasa I no adenililada constitutivo y cuya adenililación no era estimulada por NH_4^+ tal como ocurre en la cepa salvaje, el cual se comportaba como nitrogenasa constitutiva (100, 101). Las evidencias disponibles estarían indicando que en el mecanismo de control de nitrogenasa en *Rhizobium* estaría implicada en la glutaminasintetasa, y que el control por O_2 sería más relevante que por NH_4^+ .

Otro compuesto nitrogenado cuyos efectos han sido estudiados es el nitrato y se determinó que es el producto de su reducción (nitrito) quien inhibe la nitrogenasa; se ha observado que mutantes de *R. japonicum* que carecen de actividad de nitrato reductasa y en consecuencia no producen nitrito,

son insensibles a la presencia de nitrato y sus niveles de actividad de nitrogenasa son comparables a los de la cepa original (62, 94).

LOGROS Y PERSPECTIVAS DE LOS SISTEMAS ASIMBIOTICOS

Las cepas de *Rhizobium* capaces de desreprimirse en cultivos libres están restringidas a un grupo limitado en relación con el conjunto de cepas estudiadas. Están comprendidas preferentemente cepas de rizobios de crecimiento lento: *R. japonicum* y *Rhizobium* sp. (caupí) y el número se ha ido incrementado en la medida que se hacían nuevos ensayos y se lograba determinar las respectivas condiciones óptimas de desrepresión. Dentro del grupo de los rizobios de crecimiento rápido se han descrito algunas cepas de *R. leguminosarum* y una cepa de *R. meliloti* con capacidad para manifestar actividad de nitrogenasa en cultivos puros (102). Es posible que se incorporen más cepas de rizobios a la lista disponible, a medida que se establezcan las condiciones y requerimientos particulares de cada una para que la nitrogenasa se exprese activamente.

Los estudios sobre la nitrogenasa en estos sistemas controlados, en ausencia de la planta huésped, han permitido encarar aspectos relacionados con la regulación de la nitrogenasa en *Rhizobium*, y observar en los mismos algunas semejanzas con los bacteroides de nódulo. Se ha observado en ambos casos que la nitrogenasa se expresa en condiciones de niveles muy bajos de O_2 ; el N_2 fijado es exportado principalmente como NH_4^+ ; se han detectado sistemas de oxidasas terminales de alta afinidad y ambos tienen similares conjuntos de

enzimas relacionadas con el metabolismo de NH_4 (103).

Como se ha descrito aquí en secciones anteriores, cuando *Rhizobium* experimenta la transformación de bacteria a bacteroide en el interior del nódulo, se expresan una serie de características diferenciales que acompañan a la de nitrogenasa: cambios morfológicos, enzimáticos y fisiológicos definen al estado simbiótico del rizobio. Este proceso de diferenciación puede ser ahora estudiado en ausencia de planta huésped en los rizobios desreprimidos en cultivos puros y compararlo con aquéllos observados en simbiosis. Esto permitiría establecer qué cambios que comúnmente acompañan a la expresión de la nitrogenasa podrían estar provocados por la planta, o por el microambiente nodular, y no estar necesariamente asociada a la actividad nitrogenasa.

OBJETIVO DE ESTE TRABAJO

Nos hemos propuesto estudiar el proceso de expresión de la nitrogenasa de *Rhizobium japonicum* 110, en condiciones no simbióticas. Exploramos así los requerimientos, en particular de dióxido de carbono, para que tenga lugar la manifestación de la nitrogenasa activa, y estudiamos la relación de dicho proceso con otras propiedades, características de los bacteroides simbióticos, como la densidad boyante, el contenido de poli- β -hidroxibutirato y la actividad de nitrato reductasa.

M A T E R I A L E S

Y

M E T O D O S

CEPAS DE RIZOBIOS ENSAYADAS

Rhizobium meliloti:

- cepa U45, Laboratorio de Control de Inoculantes, Ministerio de Agricultura, República Oriental del Uruguay.
- cepa Rm11, cedida por el Dr. J. Olivares, Departamento de Microbiología, Estación Experimental del Zaidin, Granada, España.

Rhizobium sp. (caupí):

- cepa 32H1, cedida por el Dr. J. Burton, Nitragin Co., Estados Unidos de Norteamérica.

Rhizobium japonicum:

- cepa 311b110, cedida por el Dr. D. Weber, Departamento de Agricultura de Estados Unidos de Norteamérica (USDA).

Las cepas fueron mantenidas a través de sucesivos repiques mensuales en el medio ELM. El medio ELM (extracto de levadura, manitol y sales) fue preparado a partir de soluciones stock de acuerdo a lo siguiente (104):

	Solución stock	Concentración en el medio
Extracto de levadura (Difco)	4 %	0.4 g/litro
Manitol	10 %	10
MgSO ₄	2 %	0.2
K ₂ HPO ₄	5 %	0.5
NaCl	1 %	0.1

El medio sólido contenía 1.5% de agar, y 1 ml de solución de Rojo Congo (1:400) por 100 ml de medio.

La esterilización se hizo en autoclave a 120°C, 15 minutos.

CULTIVO DE PLANTAS LEGUMINOSAS EN SIMBIOSIS CON RIZOBIOS

El cultivo de plantas se realizó en macetas conteniendo vermiculita o perlita como soportes, para lo cual fueron lavadas repetidas veces con agua corriente y esterilizadas en autoclave durante 2 horas a 120°C.

Las semillas de leguminosas fueron esterilizadas con HgCl_2 , y alcohol etilítico (104); enjuagadas varias veces con agua destilada estéril y colocadas sobre un soporte de medio mineral agarizado exento de nitrógeno, y en un lugar oscuro para su germinación.

Las semillas que desarrollaron una pequeña raíz, fueron transferidas a un erlenmeyer que contenía un inóculo líquido de aproximadamente 3×10^9 rizobios/ml. Después de permanecer durante 1 hora a 28°C con agitación suave, se las transfirió a macetas de 14 x 14 cm, que contenían vermiculita o perlita estéril. Las macetas colocadas dentro de bandejas plásticas de 30 x 40 x 13 cm, eran mantenidas en una cámara de cultivo de plantas con temperatura controlada (24°C), y ciclo de luz día-noche (16 - 8 horas).

El riego de las plantas se hizo agregando líquido a los recipientes plásticos que contenían las macetas para lo cual tres o cuatro días a la semana se usó agua destilada estéril, y dos veces un medio mineral estéril exento de nitrógeno fijado compuesto por (mM): MgSO_4 2; $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ 5; KH_2PO_4 1; EDTA-Fe 0.1 (en hierro), y microelementos (μM): MnCl_2 9.14; H_3BO_3 46.2; ZnCl_2 0.8; CuCl_2 0.30; Na_2MoO_4 0.1.

En este sistema de cultivo de plantas de soja variedad Bragg inoculadas con *R. japonicum*, mostraron sus primeros nódulos entre 12 - 15 días después de la inoculación, y la etapa de floración se observaba entre los 55 - 60 días.

En los distintos ensayos se incluyeron controles de plantas que no habían sido inoculadas.

EXTRACCION DE BACTEROIDES DE NODULOS

Los nódulos fueron extraídos de lotes de plantas de soja de 42 - 45 días, que habían sido inoculadas con *R. japonicum* cepa 110, y cultivadas en las condiciones descritas anteriormente. A medida que se sacaban los nódulos eran colocados en agua helada, y finalmente se los lavaba dos veces con agua destilada fría. Inmediatamente los nódulos eran homogeneizados con la ayuda de un mortero, en presencia de polivinil pirrolidona insoluble (Sigma), y buffer con la siguiente composición (105): PO_4K 0.05M; sacarosa 0.3M; ascorbato de sodio 0.2M, y acetato de Mg 5mM, pH 7.5. La pasta obtenida fue filtrada a través de cuatro capas de gasa, y el filtrado se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos para eliminar restos de tejido vegetal. El sobrenadante era centrifugado nuevamente a 6000 rpm durante 15 minutos, y el pellet constituido por bacteroides era finalmente resuspendido en buffer. Todas las etapas de la preparación se realizaron en una cámara fría a 4°C. En los experimentos de medida de actividad de nitrogenasa en bacteroides, todas las operaciones preparativas fueron realizadas en anaerobiosis, para lo cual se gasearon las soluciones con N_2 , y se emplearon tubos de

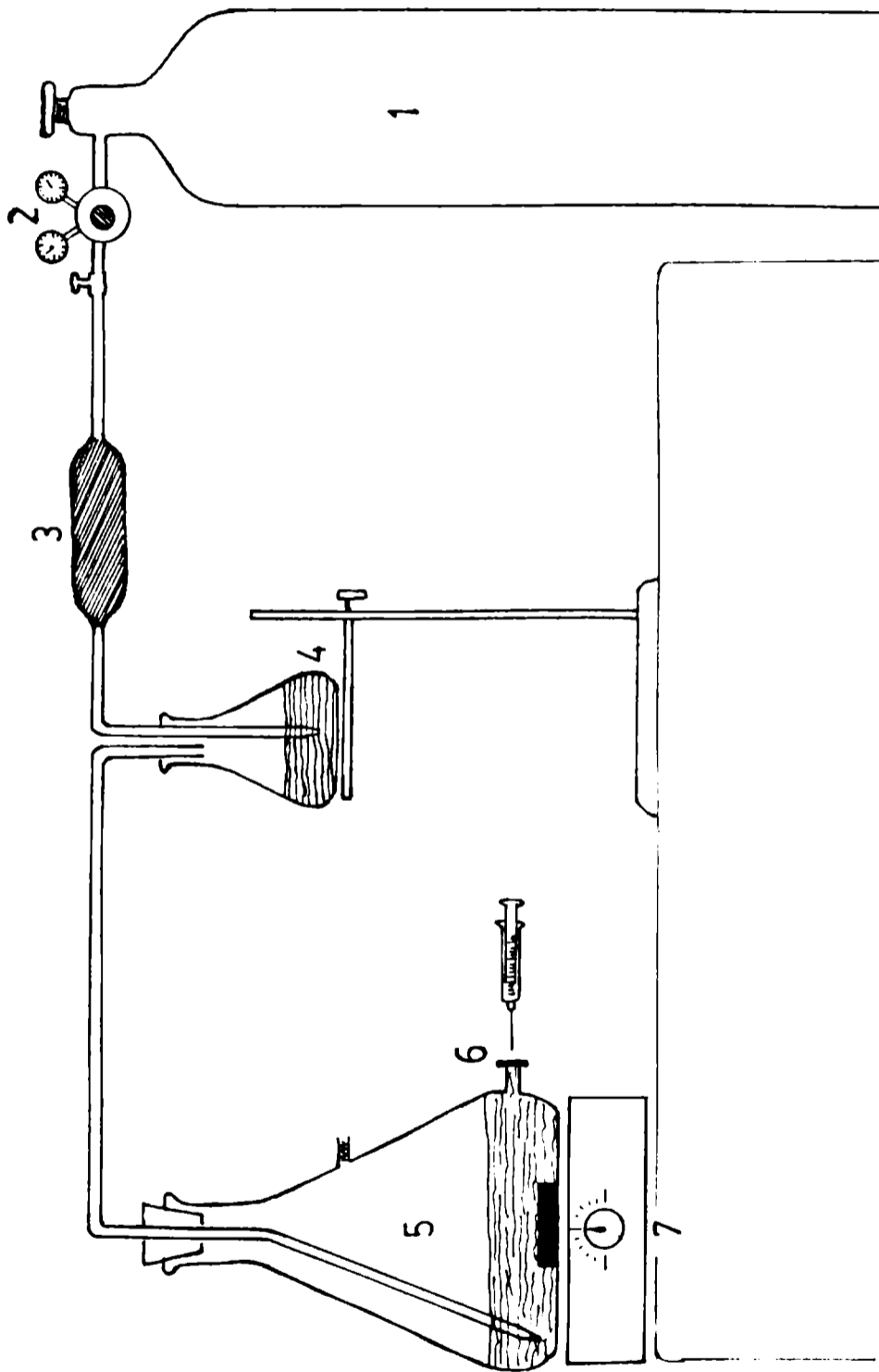
centrífuga de vidrio provistos de tapa rosca con agujero central y septum de goma que permitía tomar y extraer muestras con jeringa en anaerobiosis.

SISTEMA DE CULTIVO MICROAEROBIO PARA LA DESREPRESION DE LA NITROGENASA

A. Esquema del aparato

1. Cilindro conteniendo la mezcla microaerobia. Las mezclas fueron, en algunos casos, preparadas especialmente por La Oxígena, y en otros realizadas en el laboratorio a partir de una mezcla $N_2:CO_2$ (99:1%), y O_2 puro. Para este último caso se determinaban por caída de presión en capilares calibrados los caudales respectivos que se mezclaban en un frasco burbujeador con agua antes de entrar al frasco de cultivo. En ambos casos los niveles de O_2 eran medidos por cromatografía gaseosa.
2. Regulador de presión con salida máxima hasta 2 Kg/cm^2 .
3. Filtro de esterilización de gases realizado con un tubo de vidrio de $20 \times 4 \text{ cm}$, relleno con algodón y fibra de vidrio.
4. Burbujeador con agua destilada estéril. En los ensayos en los que se estudió el efecto del CO_2 sobre la nitrogenasa, la línea de gaseado con la mezcla carente de CO_2 , incluía un burbujeador con KOH 40%, entre los puntos 3 y 4.
5. Frasco de cultivo, con barra magnética agitadora y con

Esquema del aparato



tapón de goma perforado a través del cual pasaba un tubo de vidrio que pescaba en el medio de cultivo y por el cual se hacía burbujear la mezcla gaseosa microaerobia. Los recipientes y los respectivos volúmenes de cultivo ensayados fueron:

Volumen del erlenmeyer (l) Medio de cultivo (ml)

0.5	120
1.0	200 - 250
2.0	600

6. Tubuladura lateral de 1 cm de largo, con tapón de goma tipo penicilina a través del cual se extraían muestras de cultivo con jeringa. El septum era esterilizado externamente repetidas veces con etanol 96% antes de la toma de muestras.
7. Agitador magnético regulable.

Los elementos 3, 4, 5 y 6 eran esterilizados en autoclave a 120°C durante 15 minutos. El aparato se mantenía en una estufa termostática.

B. Medio de cultivo (MDG, MDA)

Medio de desrepresión con gluconato (MDG): Este medio fue preparado parcialmente con soluciones stock concentradas; en todos los casos se usaron drogas de alta pureza química, y agua bidestilada estéril.

	<u>Solución stock</u>	<u>Concentración final</u>
<u>Sales</u>		
MgSO ₄ (Merck pa)	(40 mM)	0.4 mM
Citrato Fe (BDH)	(10 mM)	0.1 mM
Na ₂ MoO ₄ (Merck pa)	(1.5 mM)	15.0 µM
KH ₂ PO ₄ (BDH)		12.5 o 25 mM
 <u>Fuente de carbono</u>		
succínico (como succinato de Na) (Sigma)	(0.5 M)	10 mM (1,18 g/l)
glucónico (como gluconato de Na (Hopkin y Williams))		13 mM (3 g/l)
 <u>Fuente de nitrógeno fijado</u>		
glutamato (como glutamato de K) (Merck)	(50 g/l)	^{4.6} 6.8 mM (1 g/l)

El pH del medio era ajustado a 6.8 con NaOH antes de la esterilización en autoclave a 120°C, 15 minutos; después de ésta no se observaba variación de pH.

Medio MDA: En éste se reemplazó el gluconato del medio MDG por arabinosa (D(-)-Arabinosa, Sandoz Ltd., Suiza), la cual era agregada al resto de medio estéril a partir de una solución estéril concentrada de arabinosa (150 g/l). La solución de arabinosa se esterilizó a través de filtro Millipore (0.2 µ). La concentración (p/v) de arabinosa en el medio de cultivo fue al igual que gluconato de 3 g/l (20 mM).

C. Inoculación y cultivo

El cultivo microaerobio se iniciaba inoculando el medio fresco con un cultivo aeróbico de rizobios en etapa logarítmica tardía en el mismo medio de desrepresión, y equivalente a un 5% del volumen a inocular, que proporcionaba una concentración inicial de aproximadamente 10^6 rizobios/ml de cultivo. La inoculación se realizó en una cámara estéril con flujo laminar. Inmediatamente se iniciaba la agitación magnética del medio, 200 rpm, y el pasaje de la mezcla microaerobia con un caudal entre 20 y 30 ml/minuto. El tiempo de equilibración de la composición de la fase gaseosa determinado por cromatografía gaseosa fue de 4 hs. (véase figura 1). La incubación se hacía en una estufa de aire seco a 28 - 30°C.

A lo largo del cultivo, que en algunos casos excedía los quince días, se tomaron muestras para su aislamiento en placas con medio ELM y/o agar nutritivo (medio NB, Difco), con el objeto de detectar posibles contaminaciones. Estas fueron observadas en muy pocos experimentos, cuyos resultados fueron desestimados.

D. Medida del crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano fue seguido en alícuotas del cultivo de acuerdo a dos criterios: absorbancia, concentración de proteínas bacterianas, y en un experimento por recuento de colonias.

Absorbancia: La absorbancia de 1 ml de cultivo se determinó en un espectrofotómetro Beckman Du a 500 nm, empleando

agua destilada como blanco (la absorbancia del medio era despreciable). En aquellos casos en que los valores superaban el valor de 0.800 unidades de absorbancia, la muestra se diluía con agua destilada.

Proteínas bacterianas totales: Se determinaron por el método de Lowry modificado para microorganismos que incluye una digestión previa de la suspensión bacteriana en NaOH 0.5 M en un baño maría a 100°C (106). Como estándar de calibración del método se utilizó una solución de seroalbúmina bovina (Sigma). Las muestras de cultivo de rizobios eran centrifugadas a 8000 rpm durante 20 minutos en una centrifuga Sorvall; el sedimento de bacterias se resuspendía en un volumen apropiado de agua destilada estéril y sobre el cual se efectuaba la determinación. Este método también fue aplicado en las determinaciones de proteínas en las fracciones de los gradientes de densidad (ver más adelante) y en las medidas de actividades enzimáticas específicas en bacteria entera.

Recuento de bacterias viables: Se hicieron diluciones seriadas de muestras de cultivo en una solución salina compuesta por las sales del medio ELM. De las suspensiones diluídas se tomó 0.1 ml que era resuspendido en 2.5 ml de agar blanco (ClNa 8%, agar 0.7%) fundido y mantenido a 45°C, con el cual se inoculó superficialmente cajas de petri con 15 ml de medio ELM sólido. Las cajas fueron incubadas a 28°C. El recuento de cada dilución se hizo en cuatro repeticiones. Los valores se expresan en unidades formadoras de colonias (u.f.c.).

CENTRIFUGACION EN GRADIENTES DISCONTINUOS DE DENSIDAD DE SACAROSA

La separación de subpoblaciones de rizobios en gradientes discontinuos de sacarosa fue realizada siguiendo la técnica descrita por Ching y col. (105). Los gradientes fueron preparados en tubos de nitrato de celulosa (88 x 14 mm), con soluciones de sacarosa (concentraciones expresadas en % peso/peso de solución y densidades en g/ml) en buffer PO_4K 0.05 M pH 7.5, en la forma siguiente: 2 ml de 58% ($\delta = 1.2748$); 3 ml de 52% ($\delta = 1.2406$); 3 ml de 50% ($\delta = 1.2296$) y 2 ml de 45% ($\delta = 1.2025$). Cada gradiente era sembrado con 2 ml de suspensión de rizobios conteniendo entre 1 y 2 mg de proteína bacteriana en el mismo buffer empleado para preparar las soluciones de sacarosa. Inmediatamente eran centrifugados en una ultracentrífuga Spinco, rotor SW 41 Ti, a 25000 rpm a 4°C durante 4 horas; después eran fraccionados en porciones iguales a través de una punción en la base del tubo.

Se determinó la concentración de sacarosa de cada fracción mediante su índice de refracción medido en un refractómetro Abbe 60. Para determinar las proteínas bacterianas de cada fracción se las diluyó individualmente con agua destilada estéril (1:10 aproximadamente) y se centrifugó durante 30 minutos a 10000 rpm en una centrífuga Sorvall. Se descartó el sobrenadante, y al pellet de bacterias resuspendido en un volumen apropiado de agua destilada estéril se le determinó el contenido de proteínas según se describió anteriormente.

En experimentos en que se requerían mayores masas de bacterias se emplearon tubos de 80 x 32 mm, con 10 ml de 58%, 13 ml de 52 y 50% y 10 ml de 45%, y se sembraron con 10 ml

de suspensión de rizobios. La centrifugación en el rotor SW 25.2 y el fraccionamiento se hicieron en la forma ya descrita.

MEDIDA DE ACTIVIDAD DE NITROGENASA

La actividad de nitrogenasa se determinó por el método de reducción de acetileno (30, 107).

- Cromatografía gaseosa

El etileno producido por la reducción catalizada por la nitrogenasa se cuantificó por cromatografía gaseosa en un cromatógrafo para gases ANTEK 300, operando de acuerdo a las siguientes condiciones:

Columna de acero inoxidable de 1 m x 3,2 mm rellena con Porapak N.

Gas carrier: N₂; 60 ml/minuto

Aire comprimido: 300 ml/minuto

H₂: 30 ml/minuto

Temperaturas: Columna: 60°

Inyector: 100°

Detector: 150°

Se empleó como estándar de calibración una mezcla de acetileno (10⁻¹ v/v) y etileno (10⁻⁴ v/v) en aire.

En las condiciones de trabajo descritas los tiempos de retención del etileno y acetileno fueron 30 y 54 segundos respectivamente.

Para el cálculo de los cromatogramas se tuvo en cuenta el tiempo de retención y la altura a la base de cada pico, y el factor de atenuación del electrómetro con el cual fue registrado el cromatograma.

Para la inyección de las muestras gaseosas se emplearon jeringas descartables de 1 ml "tipo insulina".

- Ensayo de medida

1. Con raíces noduladas: las plantas una vez retiradas de las macetas, se les cortaba la parte aérea y a las raíces noduladas se las colocaba en un frasco de 520 ml con un septum de goma. A continuación se les inyectaba un volumen de acetileno igual al 10% del volumen total, y se incubaban a 28 - 30°C. Se tomaron muestras gaseosas de 0.2 ml periódicamente (generalmente a los 0, 30 y 60 minutos) las cuales eran inyectadas inmediatamente en el cromatógrafo. Las medidas realizadas en plantas estaban dirigidas a comprobar la capacidad simbiótica de fijación de nitrógeno por los nódulos inducidos por las cepas que eran paralelamente ensayadas en cultivos puros.
2. Con preparaciones de bacteroides: A los bacteroides extraídos de nódulos en la forma descrita previamente, les fue medida la actividad de nitrogenasa en frascos de vidrio tipo penicilina de 38 ml, con tapón de goma, y previamente gaseados con nitrógeno para eliminar trazas de oxígeno. La mezcla de incubación, en un volumen final de 5 ml, estaba compuesta por: buffer PO_4K 100 mM pH 7.5; succinato de Na 25 mM, y suspensión de bacteroides (0.5 mg de proteína). A continuación se introducía con una jeringa O_2 hasta alcanzar la concentración deseada en la fase gaseosa, y se daba comienzo a la reacción con la inyección de acetileno (10% v/v de la fase gaseosa). Los frascos eran agitados rápidamente en un baño termostático a 28°C.

Las muestras de gas de 0.2 ml fueron tomadas a los 0, 20,

40 y 60 minutos.

En un frasco con 0.13% de O₂ en la fase gaseosa la reacción transcurrió linealmente hasta los 40 minutos y luego declinó, mientras que otro frasco con 0.33% de O₂ lo fue durante los 60 minutos ensayados; la actividad específica de este último fue poco más del doble del frasco con 0.13%: 285 y 122 nanomoles C₂H₄.h⁻¹.mg proteína⁻¹, respectivamente.

3. Con cultivos puros microaerobios: La actividad de nitrogenasa de los cultivos descritos previamente fue determinada en alícuotas que eran extraídas asépticamente con jeringa a través del septum lateral.

Los volúmenes de cultivo ensayados fueron de 2 o de 10 ml, e incubados en frascos con septum de goma de 10 a 38 ml respectivamente. Tanto los frascos de incubación como las jeringas de extracción de muestra de cultivo eran gaseados previamente con N₂. Una vez inyectado el volumen de suspensión de rizobios extraído del cultivo, se ajustaba la concentración de O₂ en la fase gaseosa a niveles entre 0.2 y 0.5% (v/v), predeterminados de acuerdo a la densidad de rizobios del cultivo en la muestra; ello aseguraba una actividad óptima. La reacción comenzaba con la inyección de un volumen de acetileno equivalente al 10% de la fase gaseosa. La incubación se hacía a 28°C con agitación rápida. Las muestras para la determinación cromatográfica de etileno fueron de 0.2 ml, tomadas a los 0, 30 y 60 minutos. En general con los niveles de O₂ mencionados la producción de etileno era lineal durante los primeros 60 minutos del ensayo; después de dicho período la actividad decaía.

En algunas determinaciones correspondientes a las primeras etapas del cultivo en las cuales comenzaba la desrepresión

de la nitrogenasa, las incubaciones con acetileno se prolongaban hasta dos horas.

MEDIDA DE ACTIVIDAD DE NITRATOREDUCTASA

Las determinaciones de actividad de nitratoreductasa en las distintas preparaciones de rizobios, tanto en presencia de O_2 como en su ausencia, fueron realizadas en las siguientes condiciones: la mezcla de incubación estaba compuesta por (mM): succinato de Na, 100; $NaNO_3$, 20; buffer PO_4K , 60, pH 7.5 y cloranfenicol, 80 $\mu g/ml$ (60). La reacción comenzaba con el agregado de la suspensión de rizobios en buffer que contenía entre 0.150 y 0.3 mg de proteína; se incubaron con agitación a $30^\circ C$. Se determinó el nitrito producido en alícuotas de 0.4 ml tomadas a los tiempos 0, 10, 30 y 60 minutos (108), las cuales eran depositadas en tubos que contenían 0.2 ml de solución de sulfanilamida (10% p/v en HCl 3N), y a continuación se agregaban otros 0.2 ml del reactivo copulante (N-(1-naftil)etilendiamina 0.02% p/v). La absorbancia del producto coloreado se midió a 530 nm en un espectrofotómetro Beckman DU. La calibración se hizo con una solución de $NaNO_2$ (Merck pa).

En los ensayos en que la reacción transcurría en ausencia de O_2 se emplearon frascos de 10 ml con septum de goma, los cuales eran gaseados con N_2 , al igual que la mezcla de incubación (NR(O_2^-)). En los ensayos con O_2 la atmósfera era de aire (NR(O_2^+)).

MEDIDA DE ACTIVIDAD DE β -HIDROXIBUTIRATO DESHIDROGENASA (HBDH)
EN EXTRACTOS ACELULARES

Los rizobios provenientes de 100 - 200 ml de cultivo (A_{500} : 0.4 - 1.2) eran cosechados por centrifugación, lavados una vez con solución de NaCl 0.9% (p/v), y resuspendido en 1 - 2 ml de buffer Tris.HCl 0.025 M, pH 8.0, conteniendo acetato de magnesio, 5 mM; y ditietreitol, 5 mM. La desintegración celular se realizó por sonicado de la suspensión de rizobios a 0°C, con cuatro pulsos de 10 segundos cada uno en un sonicador Branson, operando a 90 W; después se centrifugó 30 minutos a 30000 g. El sobrenadante fue usado para medir actividad de HBDH según Evans y col. (53). La mezcla de incubación a 25°C en un volumen final de 3 ml contenía (μ moles): buffer Tris.HCl pH 8.0, 100; acetato de magnesio, 3; NAD, 1.2; a tiempo cero se agregaba el extracto enzimático conteniendo entre 0.2 - 0.4 mg de proteína; después de 4 minutos de incubación se agregaba 20 μ moles de HB. A partir de tiempo cero, y cada minuto se determinó la $A_{340 \text{ nm}}$ de la mezcla de reacción. La pendiente de la curva de formación de NADH a partir del agregado de HB se utilizó para calcular la actividad de la enzima. La formación de NADH por los extractos ensayados era totalmente dependiente del agregado de NAD, y de HB (véase figura 2).

En un primer experimento de obtención de extractos acelulares, en que el tratamiento de sonicación utilizado fue el descrito por Pagan y col. (62) (6 pulsos de 30 segundos cada uno, 80 - 90 W), resultaron actividades muy bajas (10 veces menos que los valores obtenidos con el procedimiento descrito más arriba).

DETERMINACIONES ANALITICAS

Poli- β -hidroxibutirato (PHB)

El PHB fue aislado de los rizobios siguiendo el procedimiento descrito por Evans y col. (53) para bacteroides de nódulos. Se cosecharon los rizobios de alícuotas de cultivo de 30 - 50 ml por centrifugación a 10000 rpm, durante 30 minutos en una centrífuga Sorvall refrigerada. El sedimento se resuspendió en 2 - 3 ml de agua destilada y se transfirió a tubos de centrífuga previamente tarados en balanza analítica. La suspensión era centrifugada nuevamente. Se descartó el sobrenadante y el sedimento de bacterias era secado en una estufa de aire a 75 - 80°C durante 4 a 6 días hasta registrar un peso constante.

A continuación el sedimento se resuspendía en 2 ml de hipoclorito de sodio (lavandina comercial, 8 gr de Cl₂ activo %) con ayuda de un vortex, y se lo dejaba a temperatura ambiente durante una noche. Posteriormente se centrifugó y el sedimento conteniendo los gránulos de PHB se lavó sucesivamente con agua destilada y acetona.

El PHB fue extraído con tres porciones de 3 ml de cloroformo hirviente y filtrado por papel. Sobre una alícuota del filtrado se determinó cuantitativamente el PHB por el método de Law y Slepecky (109), el cual se basa en la transformación del PHB a ácido crotónico en medio sulfúrico concentrado, y su medida espectrofotométrica a 235 nm. En las mismas condiciones se trazó una curva de calibración empleando una solución estándar preparada con β -OH-butirato (Sigma). El contenido de PHB era expresado en términos de porcentaje de peso de

PHB por peso seco de rizobios.

El producto extraído en el tratamiento con cloroformo hirviente fue purificado para efectuar una caracterización del mismo. Con este objeto el PHB fue cristalizado de la solución clorofórmica agregando 5 volúmenes de acetona redestilada, a -20°C ; los cristales cosechados por centrifugación fueron redisueltos nuevamente en cloroformo caliente y se repitió la precipitación con acetona. Sobre estos cristales se hicieron los siguientes estudios de caracterización:

- 1) se determinó el punto de fusión en tubo capilar;
- 2) se hizo un espectro infrarrojo en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 457;
- 3) se efectuó un espectro de absorción en un espectrofotómetro Beckman DU del producto resultante de la deshidratación con ácido sulfúrico concentrado en caliente.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- 1) punto de fusión: 175 a 178°C ;
- 2) se observó un espectro infrarrojo típico con un máximo en la región correspondiente a la función carbonilo (1700 nm);
- 3) el espectro ultravioleta del producto resultante de la deshidratación con H_2SO_4 fue muy similar al obtenido en paralelo con β -hidroxibutirato puro (Sigma), y con el característico pico máximo a 235 nm (véase figura 3).

Las propiedades del producto extraído de los rizobios coinciden con las informadas por otros autores para PHB (53, 109, 110).

Porfirinas

Las porfirinas extraídas tanto del sobrenadante de

alícuotas de cultivo de rizobios, como en el correspondiente sedimento de bacterias obtenidas por centrifugación, fueron identificadas por cromatografía en capa fina. En ambos casos las porfirinas eran adsorbidas con alúmina (AG 7, Bio-Rad Lab.), equilibrada en solución de ácido acético 3% (45), durante 30 minutos. La alúmina era decantada y tratada con la mezcla esterificante metanol-ácido sulfúrico (95:5 v/v), durante una noche (111). Las porfirinas así esterificadas fueron extraídas con dos porciones de cloroformo que eran reunidos y lavados con solución saturada de Na_2CO_3 . La fase clorofórmica fue secada con Na_2SO_4 anhidro y filtrada a través de papel de filtro, y llevada a un volumen de 1 - 2 ml evaporando en un rotavapor Büchi a 45°C y presión reducida. Las soluciones fueron sembradas con un capilar en cromatofolios de silicagel 60 F254, 0.2 mm (Merck), conjuntamente con testigos de uro, copro y protoporfirina. Las placas se corrieron en el solvente benceno: acetato de etilo: metanol (85:13.4:1.5 v/v), y la fluorescencia roja de las porfirinas fue observada inmediatamente con luz UV 365 (112). Los testigos patrones de porfirinas puras fueron facilitados por el Dr. M Grinstein (Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires). Los R_f de los ésteres metílicos de uro, copro y protoporfirina fueron respectivamente 0.15, 0.6 y 0.8.

También se ensayó la extracción directa de las porfirinas del medio de cultivo con el solvente acetato de etilo: ácido acético (3:1 v/v), con resultados comparables a los obtenidos con la adsorción con alúmina.

Concentración de O₂ en la fase gaseosa

Los niveles de O₂ en la fase gaseosa fueron determinados por cromatografía gaseosa en un cromatógrafo ANTEK 300 con detector de conductividad térmica. Las condiciones de medida fueron las siguientes:

- Dos columnas de acero inoxidable de 3.2 mm de diámetro rellenas con tamiz molecular 5A; una de 1 m de largo para el análisis de las muestras; la otra de 0.5 m como balance del detector.
- Temperaturas (°C): inyector 40; columna 40; detector 150.
- Gas carrier: argón, caudal de 40 ml/min.
- Corriente del puente: 115 - 125 mA.
- Volumen de las muestras inyectadas: 0.1 - 0.2 ml.

PREPARACION DE RIZOBIOS PARA OBSERVACION POR MICROSCOPIA ELECTRONICA

Los rizobios provenientes de un cultivo líquido fueron sedimentados por centrifugación y prefijados en una solución de glutaraldehído 2.5%, en buffer de Kellenberg con triptona durante una hora (104). A continuación se lavaba con buffer de Kellenberg y se efectuaba la fijación principal con OsO₄ al 1% durante una noche. Después de lo cual se hacían dos lavados de 1 hora cada uno con buffer y el pellet de bacterias sedimentadas fue tratado de acuerdo a la técnica descrita por K. Lickfeld para preparación de bacterias para microscopía electrónica (113). Con este objeto se preparaba previamente una suspensión de agar al 2% en buffer el cual era fundido y

mantenido a 47°C; con una pipeta Pasteur se agregaba una gota de agar fundido al pellet de bacterias e inmediatamente se mezclaba con una varilla de vidrio de punta fina y se dejaba enfriar. El agar solidificado que contenía a las bacterias se depositaba sobre un portaobjeto y se cortaban pequeños bloques los cuales eran tratados en una serie de soluciones deshidratantes de etanol: 50, 75, 96 y 100% y finalmente dos tratamientos con óxido de propileno. Para la etapa siguiente de embebido se empleó una mezcla de partes iguales de araldita y óxido de propileno durante 2 - 4 horas, y finalmente se los transfirió a cápsulas con araldita fresca la cual era polimerizada en una estufa a 60° durante 24 horas.

Los cortes y las coloraciones con acetato de uranio y citrato de plomo de las muestras, así como las observaciones microscópicas fueron realizadas por el Dr. Gómez Dumm, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

MARCACION DE PROTEINAS IN VIVO CON ³⁵S-METIONINA

Alícuotas de cultivo de 1.0 ml fueron incubadas con 50 µCi de ³⁵S-metionina (Amersham) durante 30 minutos a 28°C con agitación permanente. En los casos en que las alícuotas provenían de cultivos microaerobios la extracción de las muestras se hizo en anaerobiosis y la incubación en un frasco cerrado con los mismos niveles de O₂ del cultivo original. La marcación se detuvo agregando 1 mg de metionina no radioactiva e incubando otros 5 minutos, después de lo cual se enfriaba en un baño de agua-hielo. La suspensión se transfirió a un

tubo de centrífuga tipo Ependorf de 1.5 ml y se efectuaron dos lavados con NaCl 0.9%. Finalmente los rizobios sedimentados eran resuspendidos en el buffer empleado para siembra de muestras en geles de poliacrilamida y tratados en un baño maría a 100°C durante 5 minutos. Sobre una alícuota de 5 µl de esta última suspensión se determinó la radioactividad incorporada a proteínas insolubles al tratamiento con TCA 5%. Las muestras se conservaron a -70°C hasta el momento de su siembra en geles de poliacrilamida.

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Los geles planos de SDS-poliacrilamida fueron realizados de acuerdo al procedimiento y recetas descritas para la segunda dimensión por O'Farrell (114).

Las muestras, conteniendo cada una entre 150.000 - 200.000 c.p.m., fueron corridas en una dimensión en un gel de SDS-poliacrilamida 10%, a 35 - 40 mA. Los geles fueron revelados por fluorografía para lo cual se los fijó con una solución de ácido tricloroacético 10%, metanol 30% y ácido acético 10%. Luego se los trató con EN³HANCE (New England Nuclear) y con agua para precipitar el centellador y finalmente se los secó a 60°C y presión reducida. Para la detección de las bandas proteicas radioactivas se empleó película radiográfica Kodak MinR. Simultáneamente con las muestras se sembró una mezcla de proteínas de distintos pesos moleculares (seroalbúmina, ovoalbúmina, pepsina, tripsinógeno, β-lactoglobulina y lisozima; Sigma) que eran reveladas por coloración.

R E S U L T A D O S

C A P I T U L O I

SISTEMA DE CULTIVO DE RIZOBIO PARA LA EXPRESION ASIMBIOTICA
DE LA NITROGENASA

ASPECTOS PRELIMINARES

Para alcanzar los objetivos de este trabajo fue necesario contar con un método de cultivo de rizobios que reuniera un conjunto de condiciones, tales como: asegurar un ambiente uniforme para toda la población; permitir obtener cantidades suficientes de masas celulares para estudios bioquímicos; permitir seguir la evolución de diferentes propiedades a través del ciclo de cultivo.

El sistema que se esperó cumpliría con estas condiciones fue un cultivo en frasco cerrado con agitación constante con barra magnética y permanente burbujeo con una mezcla gaseosa definida. Esta última característica estaba destinada a asegurar una eficiente transferencia de O_2 al cultivo.

Una serie de experimentos preliminares para obtener cultivos de rizobios con actividad Nasa en este sistema, gaseado con diversas mezclas de O_2 y N_2 resultaron negativos. Con el objeto de explorar las posibles causas de esos resultados, se pusieron en marcha otros dos métodos de cultivo con los cuales se deseaba comprobar la efectiva capacidad de las cepas de rizobios para desreprimirse en vida libre, y la eficiencia del medio de cultivo ensayado. Uno de estos métodos se basa en el cultivo de los rizobios en profundidad en un medio sólido agarizado, bajo atmósfera de aire (93); el otro emplea volúmenes relativamente pequeños de medio líquido (91) y atmósferas microaerobias confinadas sin renovación. Con ambos procedimientos se encontró actividad de Nasa lo que descartó que los resultados negativos anteriores fueran inherentes ya sea a las cepas de rizobios o al medio de cultivo, e indujo a pensar que aquéllos podrían deberse a las condiciones de

gaseado en los cultivos iniciales.

En experimentos posteriores la inclusión de CO₂ en la mezcla gaseosa permitió obtener cultivos con actividad de Nasa, resultado que además de satisfacer los requerimientos originalmente esbozados, condujo a explorar este insospechado efecto del CO₂. Estos estudios se describen más adelante en el Capítulo II.

CARACTERISTICAS DE LOS CULTIVOS DE R. JAPONICUM 110

En las figuras 4 y 5 se muestran los resultados de dos cultivos microaerobios típicos de la cepa de R. japonicum 110 en las condiciones finalmente adoptadas para este trabajo, en los medios de desrepresión respectivamente con gluconato (MDG) o arabinosa (MDA). El gaseado se realizó con una mezcla de N₂ : CO₂ 1% en que el nivel de O₂ era 0.3%. En base a la solubilidad del O₂ en las condiciones del experimento se puede estimar que la concentración de O₂ disuelto era menor que 3.4 μM. En ambos cultivos se obtuvo un lento crecimiento bacteriano hasta el día 10 u 11, y paralelamente, una paulatina alcalinización del medio, que a partir de un mismo pH inicial, 6.8, fue más acentuada en el caso del cultivo con gluconato, que con arabinosa (pH finales, respectivamente 7.7 - 7.8 y 7.3). En esas condiciones a partir del cuarto día de iniciado el cultivo microaerobio se pudo detectar actividad de Nasa, y la misma alcanzó un máximo en el sexto a séptimo día, (94.8 nmoles.h⁻¹mg⁻¹ en medio MDG, y 61 en MDA) después de lo cual disminuyó hasta anularse. Las características de estos dos cultivos se observaron también en varios otros experimentos.

En ellos los valores máximos de actividad específica de Nasa obtenidos con gluconato fueron siempre superiores a los alcanzados con arabinosa (respectivamente, 90 - 190, y 40 - 90 nmoles $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot mg \text{ proteína}^{-1}$); y en ambos casos resultaron comparables a los obtenidos por otros autores en cultivos libres de *R. japonicum* 110 (95), y 61-A-101 (103).

Por otra parte, la actividad de bacteroides simbióticos de la misma cepa 110 extraídos de nódulos de soja de 42 días fue considerablemente mayor (285 nmoles $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot mg \text{ proteína}^{-1}$).

Además de estos cultivos en que el contenido de O_2 de la mezcla de gaseado era 0.3%, se ensayó otros con una proporción de O_2 algo mayor, 0.4%. En estos últimos se observó que tanto la aparición como el máximo de actividad de Nasa se presentaron temporalmente retrasados y concomitantemente con mayores densidades de rizobios. Este comportamiento podría estar relacionado con el balance entre el suministro de O_2 y la densidad de células del cultivo, requerido para la expresión de la Nasa, ya referido en la sección introductoria (pág. 25).

REQUERIMIENTO DE O_2 PARA OPTIMIZAR LA MEDIDA DE ACTIVIDAD DE Nasa

En el experimento de la figura 6 se exploró los requerimientos de O_2 para optimizar el ensayo de medida de la actividad de Nasa de las muestras de los cultivos. Con este objeto se ensayó la actividad enzimática en distintas etapas de un mismo cultivo y en cada caso se utilizaron varias concentraciones de O_2 en la fase gaseosa. Como se observa en la

figura 6 para cada etapa del cultivo (caracterizada por la respectiva $A_{500\text{nm}}$ que refleja la concentración bacteriana) se encontró un valor de concentración de O_2 con el cual la actividad de Nasa era máxima y valores superiores eran inhibitorios. En la figura inserta se muestra que los aumentos de los niveles de O_2 óptimos acompañaban a los de absorbancia del cultivo. La falta de actividad en ausencia de O_2 muestra claramente la dependencia energética de la actividad de Nasa. La observación de las actividades en el nivel de O_2 superior del ensayo ilustra cómo la inhibición por O_2 puede estar relacionada con la concentración de células, pues contrariamente a lo ocurrido con las suspensiones de $A_{500\text{nm}}$ 0.550 y 0.710 la concentración de 2.0% de O_2 no resultó totalmente inhibitoria de la actividad en la suspensión más densa ($A_{500\text{nm}}$:1.026). Desde el punto de vista de la correcta medición de la actividad de Nasa estos resultados indicaron la necesidad de utilizar concentraciones óptimas de O_2 en relación con la densidad del cultivo. Contrariamente, un ajuste inadecuado de la fase gaseosa puede conducir a una subestimación de la actividad presente. En los experimentos que se describen en este trabajo se ha tomado en cuenta esta condición.

EFEECTO DE AMONIO SOBRE LA EXPRESION DE LA Nasa

En ciertas bacterias fijadoras de N_2 , la presencia de sales de amonio en el medio actúa reprimiendo la síntesis de nitrogenasa. En el experimento que se describirá a continuación se estudió en paralelo el comportamiento de la cepa 110 en cultivo microaerobio, en el medio de desrepresión ordinario, y en otro igual pero suplementado además con NH_4^+ 20 mM

(además del glutamato, véase figura 7). El ritmo de crecimiento en el medio MDG con NH_4^+ , expresado tanto en valores de absorbancia como contenido de proteínas, fue superior al del medio cuya única fuente de N_2 fijado fue glutamato. El efecto inhibitorio sobre la Nasa fue muy marcado, ya que la enzima sólo se llegó a detectar un solo día del cultivo (el 5°), y en nivel muy bajo. En otro experimento similar en el cual se empleó el medio MDA (arabinosa) también con NH_4^+ 20 mM, se obtuvieron resultados muy parecidos. Los valores de actividad observados en presencia de amonio tanto en el medio MDG como MDA, respectivamente 6 y 5 nmoles $\text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$, no superaban el 5% de los máximos observados en ausencia de amonio.

BACTERIAS FORMADORAS DE COLONIAS EN EL CULTIVO MICROAEROBIO

Paralelamente a las sucesivas determinaciones de la masa celular, a lo largo de un cultivo microaerobio se estudió el aumento del número de bacterias capaces de formar colonias en medio ELM sólido en condiciones aeróbicas (unidades formadoras de colonias, u.f.c.), y estos parámetros se compararon con el curso de la expresión de la actividad de nitrógenasa. En la figura 8 se muestran los resultados de este experimento. Se observó que en el período inicial de establecimiento de la microaerobiosis el cultivo tuvo un aumento considerable en el número de u.f.c., a razón de 9.6% por hora, compatible con un tiempo de generación de casi 8 horas (similar al de cultivos aerobios). Es pertinente señalar que la persistencia en la velocidad de multiplicación ocurrió en

condiciones de real limitación de O_2 (como se mostró en Materiales y Métodos, figura 1, la concentración efectiva de O_2 0.3% se alcanzaba en sólo 4 horas a partir de la iniciación del gaseado). Sin embargo, después de dos días de microaerobiosis, el ritmo de multiplicación del cultivo cayó abrupta y marcadamente; en los 8 días restantes el número de u.f.c. aumentó solamente 7.5 veces, y la velocidad de multiplicación osciló entre 1.7 y 0.5% por hora (tiempos de generación entre 41 y 143 horas). Este efecto coincidió con el inicio del período de actividad de nitrogenasa, y persistió aún durante la posterior desaparición de la enzima.

Las correlativas medidas de $A_{500 \text{ nm}}$ y proteína bacteriana, mostraron un aumento regular de la masa celular. Al compararlas con las determinaciones de u.f.c., surgió que a lo largo del período de lenta multiplicación y actividad nitrogenásica la masa y el contenido proteico por bacteria fértil (u.f.c.) experimentaron una disminución regular a la mitad de la inicial.

Los resultados anteriores no informaron si las bacterias detectadas como u.f.c. constituían la totalidad de la población celular, o si además de ellas, existían en los cultivos microaerobios células bacterianas que, a pesar de ser observables por microscopía óptica, hubiesen sido incapaces de multiplicarse y originar colonias en el ensayo de u.f.c. .

La determinación de la proporción de bacterias viables se realizó en una muestra del cultivo anterior, tomada en el 4° día, ya con actividad de nitrogenasa. Para ello se hizo un recuento de bacterias en una cámara de Neubauer observada al microscopio, y paralelamente se realizó la determinación de u.f.c. .

Los resultados fueron de 2.55×10^8 bacterias totales, y 1.45×10^8 u.f.c., por ml del cultivo. Es decir, 57% de las bacterias fueron viables.

INDUCCION DE NITROGENASA EN OTRAS CEPAS DE RHIZOBIUM

Además de la cepa 110, se hicieron experimentos de inducción de actividad de Nasa, en las condiciones antes descritas, con otras cepas de Rhizobium de crecimiento rápido y lento. Dentro de este último grupo se ensayó la cepa R. spp. (caupí) 32 H1, empleada por varios autores para los estudios sobre desrepresión en cultivos libres; con esta cepa se obtuvo valores de actividad específica de Nasa 3 veces superiores a los registrados con la 110, y el curso temporal del crecimiento y de la actividad de Nasa fue muy similar a la 110.

Las cepas de crecimiento rápido ensayadas comprendieron las de R. meliloti U 45, reconocida como simbióticamente muy activa, y la Rm 11 que fuera descrita por Bedmar y Olivares (102) como capaz de desreprimirse en condiciones de cultivo asimbiótico diferentes a las de este trabajo. Con ambas cepas se observó un crecimiento lento y comparable al de 110, pero no se detectó actividad de Nasa.

C A P I T U L O I I

REQUERIMIENTO DE CO₂ PARA LA EXPRESION DE LA NITROGENASA ACTIVA
EN EL CULTIVO MICROAEROBICO DE R. JAPONICUM 110

En el capítulo precedente se hizo referencia a que la obtención de cultivos microaerobios con *Nasa* activa se logró cuando a la fase gaseosa se le incorporó CO_2 . Este hallazgo sugirió un estudio más detallado del efecto de CO_2 , que se presenta a continuación.

En diversos experimentos preliminares se había acumulado una serie de evidencias fragmentarias que apuntaban a las circunstancias experimentales en que llegaba a manifestarse esa necesidad de CO_2 . Este último era un efecto esquivo: parecía presentarse en cultivos de baja concentración bacteriana, pero una vez superada una concentración crítica, la expresión de la *Nasa* se independizaba del aporte externo de CO_2 . El efecto se favorecía también mediante el uso de arabinosa como fuente de C, en vez de gluconato (por otra parte, confirmamos que, con la pentosa, los cultivos de *R. japonicum* se alcalinizaban menos que con gluconato (96), y Cap. I, pág. 53).

Teniendo en cuenta la experiencia ganada, se diseñaron experimentos para observar qué cambios se producían en la expresión de la *Nasa* por *R. japonicum* 110 cuando al cultivo gaseado con O_2 0.3% (en N_2) se le suministraba, o se dejaba de suministrarle, CO_2 1%. Las variables que se estudiaron a distintos tiempos durante el curso de cada cultivo, fueron: actividad específica de *Nasa*, absorbancia (a 500 nm) como medida de la concentración bacteriana, y pH del medio. Como controles se utilizó sendos cultivos en que el suministro de CO_2 fue continuo, o bien se lo eliminó.

Para disminuir el aumento de pH producido por *R. japonicum* durante su cultivo, se incrementó el poder buffer del medio MD, cuyo pH inicial era 6.8, agregándole PIPES 12.5 mM, o incrementando el fosfato hasta 25 mM, los cuales, por

tener ambos un mismo $pK = 6.8$, son capaces de disminuir eficientemente las alteraciones de pH alrededor de ese valor. Además por las razones ya mencionadas se utilizó como fuente de carbono, arabinosa, (MDA) con preferencia al gluconato.

En los dos experimentos (figuras 9 y 10) los cultivos controles con CO_2 mostraron (como se describió en el Capítulo I) la aparición de Nasa al día 3 - 4 del cultivo, que crecía hasta un máximo alrededor del día 5 - 6, y luego disminuía hasta desaparecer al día 8 - 9. El crecimiento fue moderado o abundante, y el medio se alcalinizaba hasta pH 7.35 - 7.75, tanto más alto cuanto mayor había sido el desarrollo bacteriano. Por el contrario, un control cultivado sin CO_2 (figura 9) tuvo un muy escaso crecimiento, y a lo largo de 13 días su actividad de Nasa fue siempre cero. En uno de los experimentos (figura 9) el cultivo experimental fue iniciado en ausencia de CO_2 : el limitado desarrollo se detuvo al día 6, y no se detectó Nasa en todo el período inicial de diez días. El día 10 se introdujo el gaseado con CO_2 1%, que se extendió durante cinco días; en este período el crecimiento se aceleró, y a partir del día 12 se detectó Nasa. El comportamiento del cultivo durante ese lapso con CO_2 fue similar al del control también con CO_2 , tanto en su crecimiento como en el desarrollo de la actividad de Nasa (nótese que en la figura 9 la escala de tiempos del control con CO_2 está desplazada diez días respecto del cultivo experimental, de modo de coincidir su día 0 con la iniciación del suministro de CO_2 a este último). El día 15 se interrumpió el aporte de CO_2 , y a ello siguió, después de un retardo de 12 horas, un descenso abrupto de la actividad de Nasa que en 48 horas llegó a hacerse nula. Mantenido sin CO_2 durante tres días, el cultivo disminuyó su crecimiento pero no

llegó a detenerlo. El día 18 se reanudó el aporte de CO_2 , y se produjo un nuevo proceso de aparición y aumento de Nasa, que después de alcanzar un pequeño máximo el día 20, decayó espontáneamente, siempre en presencia de CO_2 , hasta desaparecer el día 22.

En el otro experimento (figura 10) el cultivo experimental comenzó con un gaseado microaerobio con CO_2 1%, que dio lugar a una temprana desrepresión de Nasa al día 3. La supresión inmediata de CO_2 durante dos días fue acompañada por una disminución de la actividad de Nasa, hasta anularse. Reiniciado entonces el día 5 el suministro de CO_2 , muy rápida y sostenidamente se desarrolló actividad de Nasa, con un máximo en el día 8 y una posterior espontánea caída rápida, hasta desaparecer en el día 10. En este experimento el cultivo desarrolló abundantemente (llegó a tener $A = 1.95$) y la interrupción de la provisión de CO_2 entre los días 3 y 5 no afectó al crecimiento. En las figuras se indican también las curvas de aumento de pH de los cultivos en las distintas circunstancias.

El examen comparativo de la evolución de la actividad Nasa muestra que en todos los casos, la Nasa aparecía — y aumentaba — cuando en el gaseado se incluía CO_2 . Esto es válido para los controles con CO_2 , para el control negativo sin CO_2 , y para los dos cultivos experimentales. En el primero de éstos (figura 9) la Nasa no se detectó sino después que, a partir del día 10, se comenzó el suministro de CO_2 . Por otra parte, la supresión de CO_2 condujo en los dos experimentos a la desaparición de la Nasa. Debe señalarse sin embargo que no siempre ha sido ello así, y que este efecto de la supresión de CO_2 fracasó cuando — como ya se mencionó antes — la concentración bacteriana del cultivo excedía la absorbancia de 0.4.

Por último, la desaparición de la Nasa provocada por privación de CO_2 fue revertida cuando el CO_2 se restituyó. La reversibilidad de este fenómeno indica que el mismo es diferente de la pérdida de actividad de Nasa que ocurre espontáneamente en los cultivos microaerobios aún en presencia de CO_2 (véase los resultados de los cultivos controles). En distintos cultivos ésta se ha presentado a tiempos variables (los períodos de actividad de Nasa se han extendido entre 3 y 8 días), y desconocemos las causas que la provocan.

En ausencia de CO_2 inicial, el crecimiento bacteriano no fue muy escaso o nulo. Cuando las condiciones de partida del cultivo permitieron el arranque de su desarrollo, la posterior supresión de CO_2 causó a veces, y otras no, una disminución de la velocidad de crecimiento; pero nunca llegó a detenerlo. Así se ha observado crecimiento — ya sea moderado, o abundante — en los períodos en que durante la supresión de CO_2 desaparecía la Nasa.

El pH tendía en general a aumentar en relación directa con el crecimiento de la masa bacteriana. En cultivos microaerobios de gran concentración, el pH ha llegado a ser mayor de 8. Cuando a un cultivo en crecimiento se le suprimía la provisión de CO_2 , el pH tendía a elevarse más rápidamente. El posterior nuevo agregado de CO_2 no disminuía el pH alcanzado, y el aumento de éste proseguía paulatinamente, si bien a menor velocidad. Es importante notar que se ha observado actividad de Nasa en cultivos con pH mayores que 7.75, y que la aparición tardía de Nasa en el segundo período de tratamiento de cultivos con CO_2 , se observó también a pH superiores a 7.5.

Las observaciones anteriores permiten entonces afirmar que:

- a) la aparición y desaparición de la Nasa en los cultivos microaerobios correlacionó bien con la presencia o privación de CO_2 del medio.
- b) la desaparición de la actividad de Nasa por privación de CO_2 no requirió que el cultivo detuviera su crecimiento, y ni siquiera que lo aminorara.
- c) la recuperación de la actividad de Nasa por aporte de CO_2 tras su previa desaparición, no requirió una disminución del pH, y por el contrario tuvo lugar a pH más altos que el imperante durante la desaparición.

Se abre así un interrogante sobre el nivel en que estaría operando el efecto del CO_2 . Se intentó explorar si la falta de actividad de la Nasa por privación de CO_2 implicaba la represión de la síntesis de las proteínas enzimáticas del sistema de la nitrogenasa. Con este objeto se estudió qué proteínas de *R. japonicum* 110 eran sintetizadas in vivo en distintas condiciones de cultivo. Ello se hizo dando a cada cultivo un pulso de marcación con metionina- ^{35}S durante una hora. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio, y los polipéptidos radioactivos recién sintetizados fueron revelados mediante radioautografía del gel. De esta manera se comparó el espectro de proteínas sintetizadas en cuatro condiciones fisiológicas diferentes: a) rizobios cultivados en MDA en microaerobiosis + CO_2 , que alcanzaron a expresar actividad de Nasa ($25 \text{ nmoles } \text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$); b) rizobios del mismo cultivo anterior, luego de privarlo de CO_2 y decaer su actividad de Nasa a cero; c) rizobios cultivados como en a) en microaerobiosis + CO_2 , pero en presencia de NH_4^+ 20 mM, que al momento del experimento tenían actividad de Nasa cero (pero que al día

siguiente mostraron poseer una pequeña actividad); d) rizobios cultivados en medio MDA en aerobiosis, en fase logarítmica (cuya síntesis de Nasa está reprimida (94)).

Los resultados de este experimento se muestran en las radioautografías de las figuras 11, 12. Pese a las imperfecciones de estos geles en la zona del frente, se pueden apreciar bien algunos detalles que resultan útiles para el presente estudio. El electroforograma A (que se obtuvo en un gel de poli-acrilamida 10%) muestra con buen detalle las proteínas de tamaños moleculares medios y altos (nótese las posiciones de las proteínas de calibración). En el electroforograma B (poliacrilamina 12%) se han resuelto mejor las proteínas de menor tamaño. Obsérvese que todas las muestras de proteínas marcadas en microaerobiosis (andariveles 2, 3, 4 y 6 en el gel A, y 1, 3, 4, 5 y 6 en B) tiene perfiles sensiblemente similares, y que se diferencian muy marcadamente de las proteínas marcadas en aerobiosis (andariveles 1 y 5 en A, y 2 en B). Nótese en particular las bandas presentes en todas las muestras microaeróbicas (indicadas con las flechas en las dos figuras), y conspicuamente ausentes en las muestras aeróbicas. Las posiciones de esas bandas son compatibles con tamaños moleculares del orden de 55.000 - 60.000 y de 30.000 - 34.000 daltons. Los pesos moleculares mencionados por Scott y col. (94) en una caracterización preliminar de las distintas subunidades de la Nasa de *Rhizobium japonicum* son 56.000 y 58.000 para las subunidades α' y β del componente I, y 34.000 para el componente II. La comparación entre estos valores y los estimados en nuestros geles inducirían a pensar que las bandas presentes en microaerobiosis (en presencia o ausencia de CO₂), y ausentes en aerobiosis podrían en efecto ser los polipéptidos de la Nasa. La positiva

identificación de dichas bandas como los auténticos componentes de la Nasa podrá ser realizada cuando se las pueda contrastar con muestras purificadas de estas proteínas. Independientemente de ello, podemos comparar en los distintos perfiles de proteínas, las zonas en donde según los marcadores de tamaños moleculares deberían encontrarse los presuntos polipéptidos de la Nasa. En esas zonas, en ausencia de CO_2 no se observa la desaparición de bandas, al compararlas con las obtenidas en presencia de CO_2 . Por lo tanto estos experimentos no ofrecen evidencia de la falta de síntesis (represión) de alguna de las proteínas de la Nasa, en ausencia de CO_2 .

C A P I T U L O I I I

CAMBIOS QUE ACOMPAÑAN A LA DESREPRESION NO SIMBIOTICA DE LA
NITROGENASA

PROPIEDADES DE SEDIMENTACION DE LAS BACTERIAS EN GRADIENTES
DISCONTINUOS DE DENSIDAD DE SACAROSA

Ching y col. (105) han encontrado que la población de rizobios extraídos de nódulos de soja se separa en tres subpoblaciones cuando se los centrifuga en un gradiente discontinuo de densidad de sacarosa. Los autores identificaron a las tres fracciones como bacterias no transformadas, bacterias en transformación y bacteroides maduros, siendo estos últimos los que poseen actividad de Nasa. Además de las propiedades de sedimentación (en que posiblemente prevalezca la distribución isopícnica) otras características morfológicas y bioquímicas diferencian entre sí a las subpoblaciones.

Estos resultados sugirieron la posibilidad de estudiar las propiedades de sedimentación de poblaciones de rizobios cultivados en distintas condiciones, y en particular a lo largo del proceso de diferenciación que acompaña a la expresión de la Nasa en cultivos libres.

En esta sección se describirán las propiedades de sedimentación observadas en *R. japonicum*, cepa 110, en condiciones diversas de cultivo que comprenden: rizobios de nódulos; cultivos aeróbicos; y microaeróbicos.

En la figura 13A se muestra la distribución de una población de bacteroides de la cepa 110 extraídos de nódulos fijadores activos de soja, cuando se la analizó en un gradiente discontinuo de sacarosa. De manera similar a lo observado por Ching y col. (105) se encontraron tres subpoblaciones correspondientes a las interfases 52 - 58% sacarosa (fracción pesada); 50 - 52% (fracción media), y 45 - 50% (fracción liviana). Las densidades de las respectivas fracciones

del gradiente fueron $\delta = 1.281$; 1.252 ; y 1.211 . La reproducibilidad de este comportamiento por parte de cada fracción fue corroborada cuando a cada una de las fracciones aisladas se las sometió nuevamente a centrifugación en gradiente. Tal como se observa en la figura 13B cada subpoblación volvió a sedimentar mayoritariamente en la misma zona del gradiente de la cual había sido originariamente aislada. Con este mismo procedimiento fueron estudiadas las propiedades de sedimentación isopícnica de los rizobios en distintas condiciones de cultivo.

En la figura 14 se muestran conjuntamente las distribuciones de poblaciones de *R. japonicum* 110 crecidas en el mismo medio MDG, una de ellas cultivada en aerobiosis en fase logarítmica de crecimiento, y la otra en microaerobiosis y con actividad de Nasa. En tanto los rizobios aeróbicos (con Nasa reprimida) se acumularon mayoritariamente (60 - 65%) en la interfase pesada, y su fracción liviana fue solamente 10%; por el contrario una gran proporción de los rizobios microaerobios (55 - 60% de la proteína total) sedimentaron en la zona liviana.

En la figura 15 se representan simultáneamente los resultados correspondientes a la proporción de fracción liviana observados en las tres situaciones anteriores y en otras condiciones de cultivo que se describen a continuación.

Con el objeto de determinar si en los cultivos microaerobios la inducción de formas de rizobios livianas estaba asociada a la de actividad de Nasa, se exploraron dos condiciones de cultivo en las cuales la actividad de Nasa no es detectable: en presencia de NH_4^+ ; y en carencia de CO_2 . En ambos casos (D, E) se encontró una alta proporción de fracción liviana comparable a la de rizobios con Nasa activa (C).

Se estudió de la misma manera qué cambios se producían en las poblaciones de rizobios en aerobiosis al pasar el cultivo de la fase logarítmica a la estacionaria (cultivo saturado). En esta última (F) creció marcadamente la fracción liviana (24%) en comparación con la primera (B, 10%).

Los altos valores de subpoblación liviana correlacionaron con situaciones en las cuales existía una limitación de O_2 : bacteroides simbióticos (A); cultivos microaerobios (con (C) y sin actividad de Nasa (D)); y cultivo con escasa aireación y alta densidad de células (F). Estos resultados indujeron a estudiar las propiedades de sedimentación en una situación en la que las oxidaciones celulares estuvieran disminuidas por efecto de un inhibidor de la respiración. Con este objeto a una porción de un cultivo aeróbico se lo incubó con N_3Na en aerobiosis durante 12 horas después de lo cual se lo analizó en un gradiente. Los resultados revelaron un incremento en la subpoblación liviana (G) respecto al cultivo control sin N_3Na (32% y 9% respectivamente), que es compatible con la correlación antes mencionada.

Por último, hemos realizado algunas observaciones sobre el curso de la aparición de la fracción liviana en cultivos en microaerobiosis. Esta ocurría ya a las 24 - 32 horas de iniciado el cultivo, y precedía considerablemente a la actividad de Nasa.

ACUMULACION DE PHB

Un rasgo característico de los bacteroides de nódulo de soja es su contenido de PHB, que puede constituir hasta

el 50% del peso seco de los mismos, bajo la forma de inclusiones lipoides. Con el objeto de explorar la relación entre la expresión de la Nasa y la acumulación de PHB, se realizó experimentos en que se determinaba el contenido de PHB de *R. japonicum* 110 en diferentes condiciones de cultivo (Tabla I).

Tabla I

Condición de cultivo	Contenido de PHB % peso seco	Actividad de Nasa $\mu\text{moles.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}\text{prot.}$
1. aeróbico, fase logarítmica	2-3	0
2. microaeróbico	28-32	64
3. microaeróbico, NH_4^+ 20 mM	22	0

R. japonicum 110 fue cultivado en medio MDG en las siguientes condiciones: 1) en aire con agitación; cosechado en fase logarítmica ($A_{500\text{nm}} = 0.455$). 2) gaseado con O_2 0.3% en N_2 más CO_2 1%; cosechado a los 7 días. 3) cultivado como 2) en MDG suplementado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM; cosechado a los 8 días.

Los resultados muestran una marcada diferencia en los contenidos de PHB entre rizobios aeróbicos y microaeróbicos (2, y 30% respectivamente). La acumulación de PHB que aquí fue acompañada por actividad de Nasa pudo también ser observada en presencia de NH_4^+ , en que la actividad de Nasa era nula.

El alto contenido de PHB de los rizobios microaerobios se reflejó en su morfología. En la micrografía electrónica (figura 16) se pueden ver los gránulos intracelulares de PHB que aparecen como "manchas vacías", con una ubicación preferentemente polar. Estos gránulos ocupan buena parte del volumen celular y en algunos casos provocan la deformación y el

engrosamiento de la bacteria asemejándose a los bacteroides de nódulo.

PROPIEDADES DE SEDIMENTACION EN GRADIENTES DE DENSIDAD Y CONTENIDO DE PHB

Se realizaron varios experimentos en los cuales se exploró la capacidad de los rizobios para inducir formas que en los gradientes se comportaban como livianas, y se relacionó con la acumulación de PHB.

En un primer experimento (Tabla II) se determinó la distribución en gradiente de la población de rizobios crecidos en condiciones microaeróbicas para la desrepresión de la Nasa, y los respectivos contenidos de PHB en el total y en cada una de las fracciones obtenidas en el gradiente.

Tabla II

	Contenido de PHB % peso seco	% de la población total *
Población total	30	--
Fracción pesada	1.5	25
Fracción media	6.2	17
Fracción liviana	23.0	58

* % de la proteína bacteriana total

R. japonicum 110 cultivado en medio MDG en microaerobiosis O_2 0.3% en N_2 más CO_2 1%. Los rizobios fueron cosechados a los 7 días de cultivo con una actividad de Nasa de $72 \text{ nmoles } C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1} \text{ prot.}$ El análisis en gradiente y las determinaciones cuantitativas de PHB fueron realizadas como se describió en Materiales y Métodos.

Los resultados de este experimento señalaron que fueron las células de la fracción liviana las que mayoritariamente

acumularon PHB en microaerobiosis, y permiten inferir la existencia de una correlación global entre la proporción de subpoblación liviana y el contenido de PHB de la población total.

En un segundo experimento (figura 17) se observó simultáneamente la evolución de la proporción de fracción liviana y el contenido de PHB cuando un cultivo microaerobio (O_2 0.3%) se lo pasó a aerobiosis (aire normal). Los resultados muestran como los respectivos valores al término de la microaerobiosis en el día 6 (57% de fracción liviana, y 29% PHB/peso seco), se reducen después de 24 horas del pasaje a aerobiosis, a 5 y 8% respectivamente.

En el experimento de la figura 18, en el cual, de manera similar al experimento descrito precedentemente, un cultivo microaerobio fue pasado a aerobiosis, se estudió en intervalos más breves (6 y 22 horas), la disminución en el contenido de PHB, y los niveles de actividad de HBDH. El PHB producido por la despolimerización del PHB (53) puede ser metabolizado a través de una vía que se inicia con la oxidación a acetoacetato por la HBDH. Conjuntamente con las variaciones de PHB y HBDH se determinó los niveles de O_2 alcanzados por difusión del aire luego de la interrupción del gaseado con la mezcla microaerobia. A las 6 horas la concentración de O_2 de la fase gaseosa aumentó de 0.3 a 5.0%, en tanto el contenido de PHB se redujo a poco más de la mitad, mientras que no se encontró variaciones significativas en la actividad de HBDH. Sin embargo, a las 22 horas concomitantemente con una mayor reducción en el contenido de PHB (7.2%) se observó un marcado aumento de la actividad de HBDH que triplicó los valores observados en microaerobiosis con alto contenido de PHB. La mayor disponibilidad de O_2 se tradujo también en un mayor

crecimiento del cultivo y a diferencia del cultivo microaerobio, se observó producción de gomas.

NITRATO REDUCTASA

La nitrato reductasa (NR) bacteriana es una enzima que puede expresarse en dos condiciones definidas: en presencia de NO_3^- como única fuente de N fijado en el medio (NR asimilatoria), o en anaerobiosis con NO_3^- como aceptor final de electrones (NR respiratoria o disimilatoria). En cultivos libres de *R. japonicum* es posible observar la formación de ambos tipos de NR (34), y en bacteroides simbióticos se encuentran niveles elevados de la enzima (60).

En esta sección se presentarán experimentos en los cuales se estudió el desarrollo de la actividad de NR en ausencia de NO_3^- , en relación con la inducción de Nasa en las condiciones de cultivo microaeróbico antes descritas, y su caracterización parcial comparativamente con la enzima de bacteroides simbióticos.

Los ensayos de medida de actividad de NR en *R. japonicum* 110 comprendieron dos tipos de determinaciones, ambas con células enteras: en atmósfera exenta de O_2 (NR(O_2^-)) y en presencia de aire (NR(O_2^+)). En la Tabla III se muestran los valores de actividad de NR en bacteroides simbióticos en rizobios aeróbicos, y en rizobios de cultivos libres microaerobios con Nasa activa, medidos todos en las dos condiciones mencionadas.

Tabla III

Nitrato reductasa y nitrogenasa en Rhizobium japonicum 110

	NR, $\mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$		Nasa, $\text{rmoles C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$
	NR(O ₂ +))	NR(O ₂ -)	
Bacteroides simbióticos	0.33	2.45	284
Rizobios aeróbicos en fase logarítmica	0	0	0
Rizobios microaeróbicos	0	3.75	148

Las actividades de NR y de Nasa fueron medidas como se describió en Materiales y Métodos. Los bacteroides fueron extraídos de nódulos de plantas de 42 - 45 días. Los rizobios aeróbicos provenían de un cultivo normal aeróbico en MDG, con PO₄ 25 mM, y los microaeróbicos habían sido cultivados en el mismo medio con gaseado de O₂ 0.4% más CO₂ 1% en N₂.

Los dos tipos de bacteria tuvieron altos valores de actividad en ausencia de O₂. En presencia de O₂ solamente los bacteroides tuvieron actividad de NR(O₂+), y el valor de ésta fue inferior (aproximadamente 1/7) al encontrado en ausencia de O₂.

Estas relaciones se observan en el experimento de la figura 19 en que se estudió el efecto del pasaje de atmósfera de aire a atmósfera exenta de O₂, y viceversa, sobre la acumulación de NO₂⁻ por acción de la NR; las bacterias fueron rizobios cultivados en microaerobiosis (O₂ 0.4%) con actividad de Nasa. La actividad en presencia de aire, al igual que lo

mostrado en la Tabla II, es nula, pero se recupera inmediatamente cuando se pasa a ausencia de O_2 ($4.5 \mu\text{moles.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$). Inversamente la NR que aparece muy activa durante el período sin O_2 ($3.5 \mu\text{moles.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) es totalmente inhibida por la introducción de aire. En esta figura se indica con fines comparativos la acción reductora de nitrato por bacteroides simbióticos en ausencia y presencia de O_2 . Con esta última la actividad era $1/8$ de la actividad sin O_2 . En un ensayo complementario se probó el efecto de niveles de O_2 en la fase gaseosa hasta 0.2% (1/100 del aire). Esta baja concentración de O_2 , que permitió la expresión de la Nasa y su actividad en los rizobios, resultó totalmente inhibitoria para la respectiva NR.

En otro experimento se siguió el curso de la actividad de NR en relación con la de Nasa a lo largo del cultivo microaerobio (figura 20). La actividad de $NR(O_2+)$ fue cero a lo largo de todo el cultivo. Por otra parte, la actividad de $NR(O_2-)$ mostró un gran crecimiento entre el día 0 (actividad nula) y el día 6 ($3.60 \mu\text{moles.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) y se mantuvo con altos valores hasta el final del cultivo, en tanto que la actividad de Nasa después de alcanzar el valor máximo al día 9, comenzó a disminuir hasta anularse el día 18. En un experimento similar se observó que la aparición de actividad de NR precedía a la de Nasa; ya a las 24 horas de iniciado el cultivo microaerobio la actividad de NR era $2.81 \mu\text{moles.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, en tanto la Nasa se detectó 48 horas después.

La relación entre la expresión de NR y la de Nasa fue estudiada en cultivos microaerobios en tres condiciones: 1. con aporte de CO_2 en el gaseado; 2. en carencia de CO_2 ; y 3. con CO_2 y NH_4^+ 20 mM en el medio de cultivo. En la Tabla IV se indican las actividades de $NR(O_2-)$ y $NR(O_2+)$ y las

respectivas actividades de Nasa.

Tabla IV

Relación entre las actividades de Nasa y NR de R. japonicum 110
en cultivos microaerobios

Condición de cultivo	Actividad específica *		
	Nasa	NR(O ₂ -)	NR(O ₂ +) .
1. gaseado con CO ₂ en MDG	95	3960	0
2. gaseado sin CO ₂ en MDG	0	4120	0
3. gaseado con CO ₂ en MDG más NH ₄ ⁺ 20 mM	6	3490	0

* nmoles.h⁻¹.mg⁻¹ proteína

Los cultivos se realizaron como se describe en Ma
teriales y Métodos en el medio MDG con fosfato 25 mM
(suplementado en el cultivo 3 con SO₄(NH₄)₂), con
una mezcla de O₂ 0.3% en N₂, que en los cultivos 1
y 3 contenía CO₂ 1%. Las actividades se midieron al
día 5 (cultivos 1 y 3) ó 6 (cultivo 2). Las absor-
bancias de los cultivos en el momento de las deter-
minaciones fueron: 1, 0.297; 2, 0.300; 3, 0.350.

Los resultados corroboran que en microaerobiosis no
hay actividad de NR(O₂+), y muestran que la actividad de NR(O₂-)
no está ligada a la de la Nasa, y que se dan situaciones de cul-
tivo en las cuales se satisfacen los requerimientos para la ex-
presión de la NR, pero no para la Nasa (condición 2); y en otra
en que la actividad Nasa está fuertemente disminuída en tanto

la NR está poco afectada (condición 3).

En una sección precedente de este capítulo se mostró que es posible separar la población de rizobios microaerobios en 3 subpoblaciones en un gradiente discontinuo de densidad de sacarosa. Utilizando esta propiedad, se determinó la actividad de NR(O₂-) en cada una de las tres fracciones que se obtuvieron a partir de un cultivo microaeróbico de *R. japonicum* 110. La mayor actividad de NR se encontró en la fracción liviana del gradiente (1.47 $\mu\text{moles NO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) en la cual, como se ha visto anteriormente, también reside el mayor contenido de PHB. Las otras dos fracciones, media y pesada, conteniendo respectivamente el 23 y 15% de la proteína bacteriana global, tuvieron actividades menores y muy semejantes (respectivamente 0.82 y 0.76 $\mu\text{moles} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$).

Se ensayó si, en una atmósfera exenta de O₂, los rizobios que poseen Nasa, son capaces de reducir C₂H₂ utilizando NO₃⁻ como oxidante celular. La actividad de Nasa en esas condiciones fue cero.

PRODUCCION DE PORFIRINAS

Se ensayó en cultivos microaeróbicos de *R. japonicum* 110 la formación de porfirinas y su excreción al medio, comparativamente con cultivos aeróbicos. Los cultivos fueron realizados en la forma descrita en Materiales y Métodos, y se tomaron muestras de 50 ml a los 7 días en el cultivo microaeróbico y a las 48 horas en el aeróbico (absorbancias a 500 nm, 0.520 y 0.610, respectivamente). Se analizó por separado el contenido de porfirinas de las bacterias y del medio de

cultivo. Debido a la presunta degradación de estas sustancias en el medio a lo largo del cultivo no se intentó una cuantificación de los pigmentos. La extracción, separación cromatográfica, e identificación de los ésteres metílicos de las porfirinas se realizó siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos.

En el sobrenadante del cultivo microaerobio se encontró coproporfirina, mientras que en el correspondiente sedimento de rizobios se observó coproporfirina y en mucho menor proporción protoporfirina. Contrariamente en ninguna de las dos fracciones del cultivo aeróbico se pudo detectar porfirinas. En otro ensayo realizado sobre un cultivo aeróbico saturado (absorbancia a 500 nm, 1.90) se encontró coproporfirina en pequeña proporción en las bacterias y en el sobrenadante.

D I S C U S I O N

EXPRESION ASIMBIOTICA DE LA NITROGENASA

El punto de partida del presente estudio ha sido la obtención de cultivos de *R. japonicum* 110 en condiciones asimbióticas, con actividad de Nasa. Como es ya bien conocido, la condición esencial es un ambiente microaeróbico. Hemos corroborado que concentraciones de O_2 50 veces inferiores a la atmósfera, o menores, permiten que cultivos líquidos lleguen a expresar esa actividad, y con fuentes de carbono como gluconato más succinato (más glutamato como fuente de N) se han llegado a obtener cultivos cuya actividad de Nasa era cercana a la de bacteroides simbióticos de la misma cepa. Hemos considerado conveniente contar con un sistema experimental en que, con concentraciones mínimas de O_2 en fase gaseosa, se lograra una más eficiente transferencia de O_2 a la solución y a la masa de células. Esto fue implementado con un dispositivo de cultivo discontinuo con gaseado permanente mediante burbujeo y agitación magnética. El gaseado continuo ha sido poco utilizado en estudios de inducción de Nasa por rizobio, y en todos los casos la fase gaseosa contenía CO_2 (100, 103). El empleo de este método de oxigenación intensa nos permitió descubrir que en carencia de CO_2 los cultivos no desarrollaban actividad de Nasa, y que sí lo hacían cuando la mezcla gaseosa incluía CO_2 1%.

La demostración de esta propiedad fue posibilitada por la capacidad del sistema experimental para eliminar el CO_2 autogenerado por el propio cultivo (que oxida nutrientes carbonados). Con un régimen de hiperventilación adecuado en estado de flujo estacionario se podría alcanzar a mantener en el medio una concentración de CO_2 (en todos sus formas interconvertibles ($CO_2 + H_2CO_3 + HCO_3^-$)) que fuese inferior a la que sería críticamente necesaria para expresar la actividad de Nasa.

Esta condición es la que se habría alcanzado en nuestros cultivos al privárselos de CO₂ externo. El razonamiento anterior conduce a esperar que, si la producción de CO₂ endógeno fuese muy grande, no podría lograrse, con un gaseado moderado, la condición en que la Nasa no se expresa. Esto se observó en ciertos cultivos con concentraciones bacterianas considerables (A_{500 nm} mayor que 0.4) en que la actividad de Nasa se hizo independiente del aporte externo de CO₂. En estos casos la capacidad de eliminación de CO₂ habría sido insuficiente frente a la aumentada producción endógena de CO₂, y el cultivo habría alcanzado por sí mismo la concentración de éste necesaria para la actividad de Nasa.

Los efectos de la presencia o ausencia de CO₂ sobre la actividad de Nasa no dependieron ni de modificaciones en la velocidad de crecimiento del cultivo, ni de cambios en la evolución del pH. Esto permite descartar que dichos efectos se hubiesen ejercido a través de alguna influencia de estos parámetros del cultivo sobre la actividad de Nasa.

El mecanismo del efecto de carencia, o de presencia, de CO₂ sobre la actividad de Nasa nos es desconocido. Así, no sabemos cómo ocurre durante el período de carencia de CO₂ la pérdida de la función de Nasa previamente desarrollada. Se puede especular que sea afectado el componente I, o el II, o ambos; en cualquier caso los extractos acelulares deberían carecer de actividad de Nasa. Los resultados del experimento preliminar de caracterización de las proteínas sintetizadas por las bacterias indican que en esa condición de carencia de CO₂ continuaría desreprimida la síntesis de los polipéptidos observada en bacterias activas en microaerobiosis, en particular aquellos a los cuales, por sus tamaños moleculares aproximados, se les puede atribuir tentativamente la identidad de polipéptidos

de la Nasa. De ser ello así, la carencia de CO_2 no operaría como el O_2 (o el cGMP (95)) a través de la represión de los genes de la Nasa. Sin embargo esos polipéptidos, aún siendo sintetizados en ausencia de CO_2 , podrían ser no funcionales, por alteraciones en sus grupos prostéticos, o por modificaciones de tipo regulatorio, quizás covalentes. Tampoco puede descartarse que la falta de funcionalidad in vivo se deba a una alteración de los otros componentes celulares que participan en el proceso de reducción de N_2 . Además de los polipéptidos de la Nasa, sus grupos FeS, y el cofactor FeMoCo, se requiere la función de los sistemas de transporte de electrones y generación de ATP, con oxidasas terminales especiales de alta afinidad por O_2 y eficiencia de fosforilación oxidativa (37), la generación de poder reductor con participación de ferredoxina y/o flavodoxina, la energización de la membrana para esta última (32), la excreción de NH_4^+ al medio (54) en un proceso de transporte a través de membranas, y la operación de mecanismos regulatorios poco conocidos en que están involucrados al menos los mencionados O_2 , cGMP (quizás ligado al anterior (95)) y NH_4^+ , mediado probablemente por la glutamina sintetasa I (100, 101).

En tanto la carencia de CO_2 podría conducir a la inactividad, o la desaparición, de alguno(s) de esos componentes, al restituirse la presencia de CO_2 , y a través de un proceso lento, se recuperaría la función del mismo mediante su activación o su síntesis.

El CO_2 podría actuar en estos fenómenos por sí o a través de algún producto de su transformación. El CO_2 es un metabolito indispensable para la vida de las bacterias en condiciones de prototrofia, como es el caso de los rizobios cultivados en el medio de desrepresión, de constitución simple. En esas condiciones CO_2 intervendría obligadamente en muchos

procesos, entre los cuales podemos mencionar como ineludibles, la síntesis de purinas y la de pirimidinas, de aminoácidos (como arginina), de ácidos grasos, y la posible participación en otras carboxilaciones en vías metabólicas anapleróticas. Hace muchos años Lowe y Evans (115) demostraron que CO_2 es efectivamente indispensable para el crecimiento de *R. japonicum* en aerobiosis y señalaron en bacteroides la presencia de la propionil CoA carboxilasa (la fosfoenol piruvato carboxilasa no se encuentra en bacteroides de *R. japonicum* (116)). La influencia del CO_2 podría así ejercerse a través de la acción de cualquiera de estas sustancias derivadas.

Sin embargo, el hecho de observarse efectos de carencia de CO_2 sobre la Nasa cuando el crecimiento todavía se mantiene, obliga a pensar que la concentración de CO_2 necesaria para la acción sobre la Nasa es superior a la requerida para las múltiples formas de participación en el crecimiento.

En este trabajo se exploraron algunos cambios celulares en los rizobios que en vida libre llegan a expresar su Nasa. Las variables que se manejaron para relacionarlos con la Nasa, fueron los niveles de O_2 , la presencia de NH_4^+ en el medio de cultivo, y la presencia o ausencia de CO_2 .

Los cultivos en microaerobiosis presentan profundos cambios en la constitución y funciones celulares respecto de las bacterias en condiciones aeróbicas. La magnitud de los mismos está indicada por las grandes diferencias en las proteínas sintetizadas en uno y otro estado, que se han podido ver en las radioautografías de las figuras 11 y 12. Esos cambios culminan en la expresión de la Nasa activa. Las características que han adquirido las bacterias en ese proceso de diferenciación las asemejan a los bacteroides formados durante la asociación simbiótica con la raíz. Así lo señalan las evidencias

obtenidas en este trabajo, sobre la morfología, densidad boyante, formación y utilización de PHB, actividad de NR, y producción de porfirinas en los rizobios en microaerobiosis, comparativamente con bacteroides.

Los dos primeros aspectos, morfología y densidad boyante, están directamente relacionados a la acumulación de PHB, y aparecen dependientes de ésta. La misma da lugar a la formación de los gránulos lipoides observados por microscopía electrónica, que llegan a ocupar una fracción considerable del volumen celular. Estudios realizados con inclusiones de PHB en *Bacillus megaterium* indican que la densidad boyante de estos gránulos hidrofóbicos es aproximadamente 1.19 (117). Este hecho permite explicar el comportamiento de las poblaciones celulares en la centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa. Las células que los contienen presentan una densidad boyante menor que los rizobios carentes. Es posible que esto se deba a que la altísima presión osmótica de las soluciones concentradas de sacarosa del gradiente afecte al volumen citoplásmico acuoso provocando su concentración y mayor densidad, pero no a estas inclusiones hidrofóbicas, que constituyen una fase no acuosa de volumen invariable en estas circunstancias. Así la aparición de formas bacterianas de densidad boyante menor es una consecuencia y un indicador de la presencia de PHB, y de la cantidad intracelular del mismo.

La formación de PHB es una respuesta de muchas especies de bacterias a la limitación de O_2 en presencia de nutrientes carbonados, y constituye una forma de reserva de C utilizable nuevamente en aerobiosis. En *Azotobacter beijerinckii* (118) su síntesis y utilización aparecen vinculadas a la disponibilidad de acetil-CoA, piruvato, 2-oxoglutarato, CoASH, acetooacetil-CoA y NADH, y la dirección y regulación del proceso

está determinada por el estado redox de la bacteria, reflejado en efectores como el NADH. Hemos corroborado que el PHB se acumula en *R. Japonicum* 110 no solamente en las condiciones de microaerobiosis intensa necesarias para la expresión de la Nasa, sino también en cultivos aeróbicos saturados en que la gran masa celular limita la disponibilidad de O_2 . También hemos observado que el PHB acumulado es utilizado cuando se restituye la aerobiosis, y que el proceso refleja la disponibilidad de O_2 . La HBDH, una enzima característica de los bacteroides simbióticos, tiene en los cultivos microaeróbicos una actividad comparable a la de los primeros (53). Su vinculación a la utilización de PHB se puso de manifiesto en el notable aumento de actividad específica en bacterias, que al ser sometidas a aerobiosis consumieron su reserva de PHB.

La presencia de NR en *R. japonicum* 110 se ha observado en bacteroides simbióticos, en bacterias en microaerobiosis, y en bacterias en cultivos aeróbicos saturados, en fase estacionaria. En todos estos casos la formación de NR ha ocurrido en ausencia de NO_3^- . Esto, y la inhibición de su actividad por O_2 aún en niveles muy bajos, nos permite identificar a esta enzima como una NR de tipo respiratorio. Además de este tipo de NR, en bacteroides y en cultivos aerobios saturados (crecidos en el medio rico ELM), se detecta una forma de NR resistente a la inhibición por O_2 , que no se observa en cultivos microaeróbicos. En éstos el medio de cultivo fue el MDG, (un medio mínimo). La aparición de NR resistente a O_2 en bacteroides y en los cultivos saturados aerobios, podría quizás deberse a la presencia de nutrientes diversos en el medio de crecimiento (ELM, o el citoplasma vegetal). En ninguno de estos casos la NR estuvo acompañada por nitrito reductasa (el nitrito formado por reducción de NO_3 en el ensayo de actividad

enzimática, se acumulaba en el medio de reacción).

La inducción de NR de tipo respiratorio o disimilatorio, en condiciones microaeróbicas, es un fenómeno común en muchas especies de bacterias (119). En *Escherichia coli* la regulación de la NR respiratoria estaría determinada por el estado de un represor que sería redox-sensible (120).

La formación de NR en nuestros cultivos microaeróbicos tuvo lugar también en presencia de NH_4^+ . Esto refuerza la caracterización como enzima respiratoria o disimilatoria, insensible a NH_4^+ , a diferencia de la NR de tipo asimilatoria que depende de la presencia del inductor NO_3^- , y es reprimida por NH_4^+ (121, 122).

La relación entre la expresión de la Nasa y las otras características estudiadas en este trabajo, no es clara. La formación de PHB y la aparición de NR de tipo respiratorio pueden independizarse de la expresión de Nasa, como hemos visto en su insensibilidad a los cambios de CO_2 , o en etapas tempranas de los cultivos microaerobios que no llegaron a tener actividad de Nasa, o en el caso de la NR en etapas terminales del cultivo en que la Nasa ha decaído, y también en cultivos en presencia de NH_4^+ en que la Nasa está inactiva (¿inhibida?). Por otra parte, mutantes de *R. japonicum* 110 (94), y de *R. spp.* (caupí) 32H1 (62) carentes de NR llegaron a expresar su Nasa en cultivos microaerobios en vida libre, en forma análoga a las cepas parentales, demostrándose así la no esencialidad de la función de la NR durante la expresión de la Nasa. No se conocen mutantes afectados en la formación o utilización de PHB, con los que pueda evaluarse la influencia de éste, sobre la expresión de la Nasa. Podría ocurrir que estas capacidades metabólicas relacionadas a los estados de privación de O_2 respondan no a los requerimientos de la fijación de N_2 , sino a la

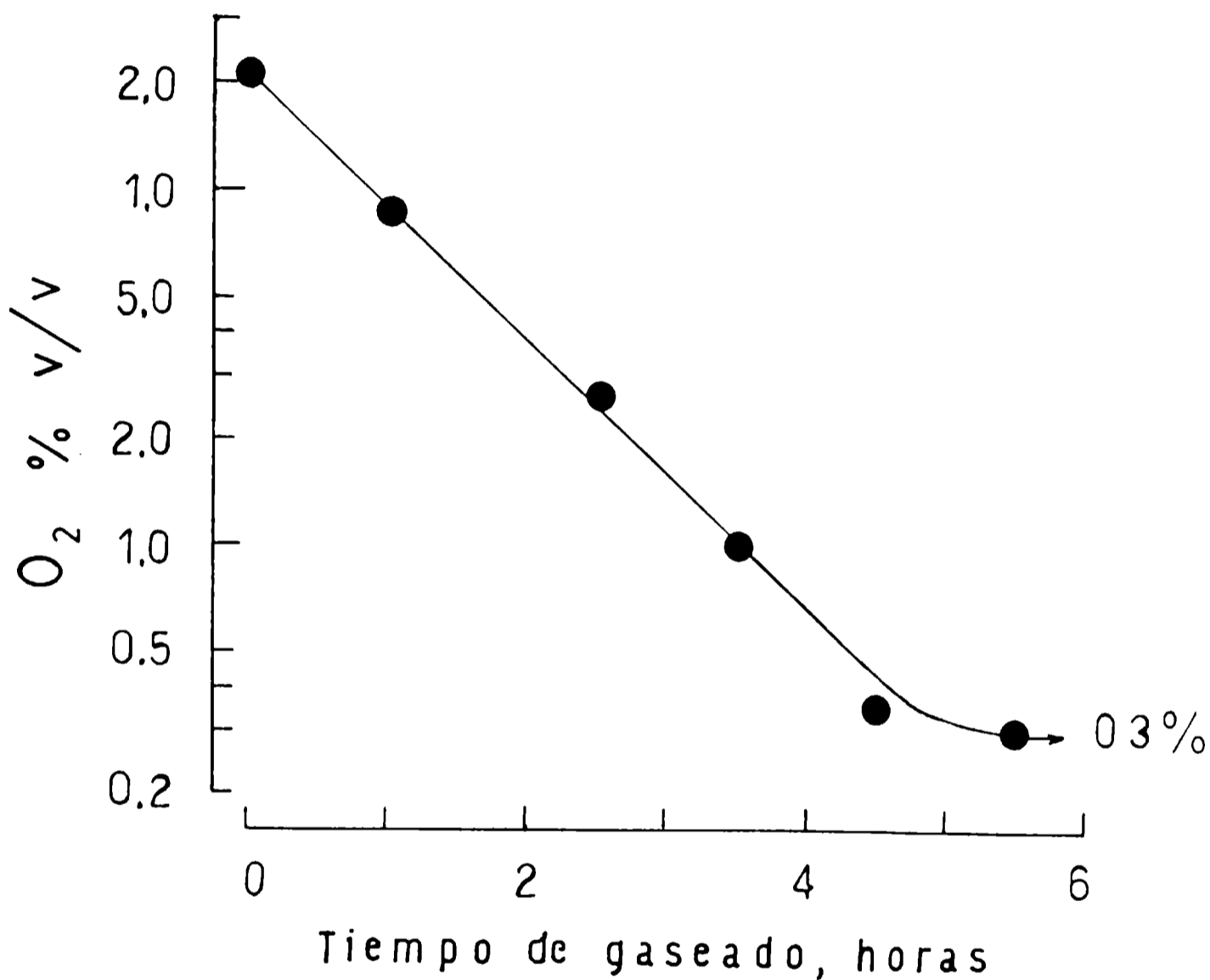
independiente necesidad de asegurar la supervivencia de los rizobios en eventuales condiciones desfavorables de disponibilidad de O_2 o aún total anaerobiosis (por ejemplo, en suelos inundados), en alguna de las etapas de su ciclo vital que comprende no solamente la asociación simbiótica sino también la vida libre en el suelo.

R E S U M E N
Y
C O N C L U S I O N E S

1. Se estudió la expresión en vida libre no simbiótica de la nitrogenasa de *Rhizobium japonicum* 110, y los cambios celulares que ocurrieron en ese proceso.
2. La expresión de la nitrogenasa que tuvo lugar en cultivos en medio MD con arabinosa o gluconato, con una atmósfera de O_2 0.3 - 0.4% en N_2 , mostró un requerimiento absoluto para la presencia de CO_2 . La privación de CO_2 a cultivos activos condujo a una pérdida de la actividad de nitrogenasa, y la restitución de CO_2 revirtió el fenómeno. La privación de CO_2 no modificó el perfil de proteínas sintetizadas en presencia de CO_2 , y en particular continuó en ausencia de la actividad de nitrogenasa la síntesis de sus presuntos componentes proteicos. Este hallazgo agrega un nuevo elemento de control de la fijación biológica de nitrógeno.
3. Otras características típicas de bacteroides simbióticos, a saber: acumulación de poli- β -hidroxibutirato, baja densidad boyante de las células, modificaciones morfológicas, y aparición de nitrato reductasa de tipo respiratorio, se desarrollaron en estos cultivos microaerobios. La falta de dependencia de CO_2 , la temprana aparición de estos rasgos, y su atenuada exigencia de limitación de O_2 comparada con el estricto requerimiento de microaerobiosis para la expresión de la nitrogenasa, sugieren que esos caracteres no están ligados a la actividad de ésta. Los mismos podrían conferir ventajas para la supervivencia de *R. japonicum* en etapas de su ciclo biológico diferentes del estado simbiótico fijador de nitrógeno.

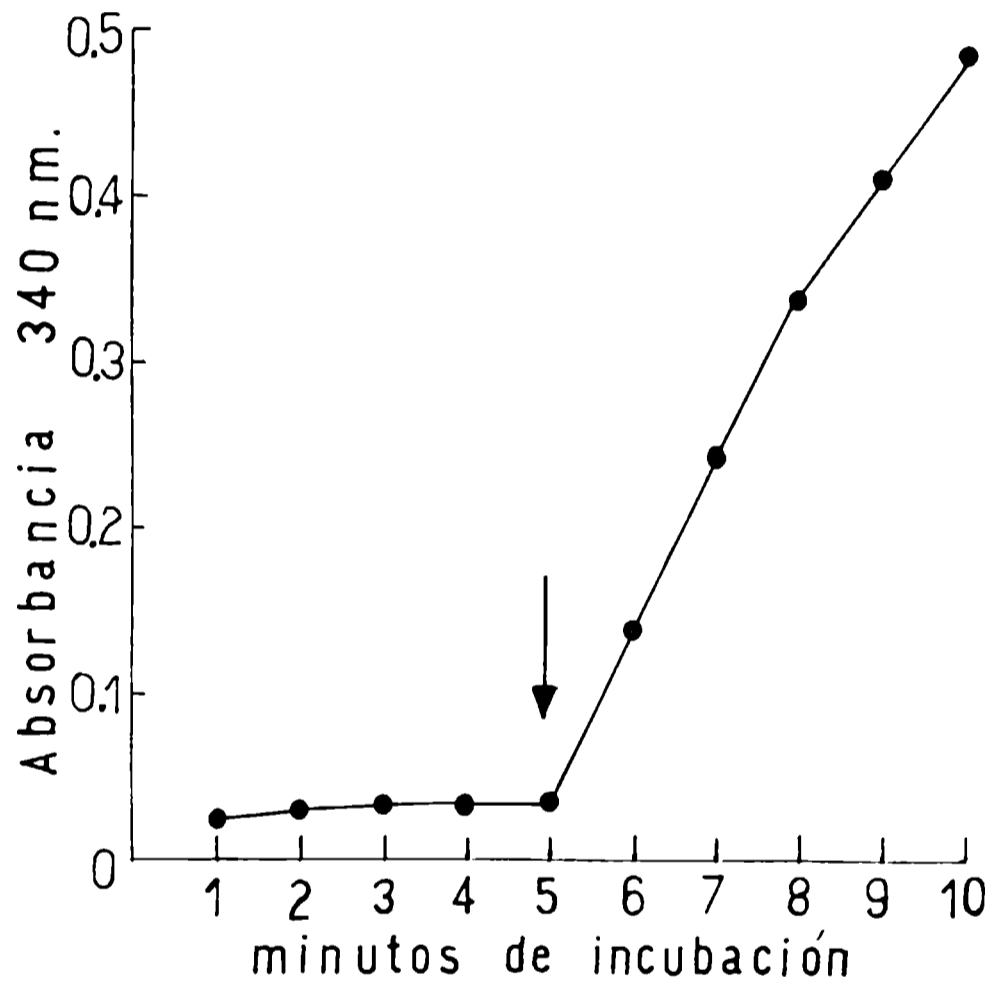


Figura 1



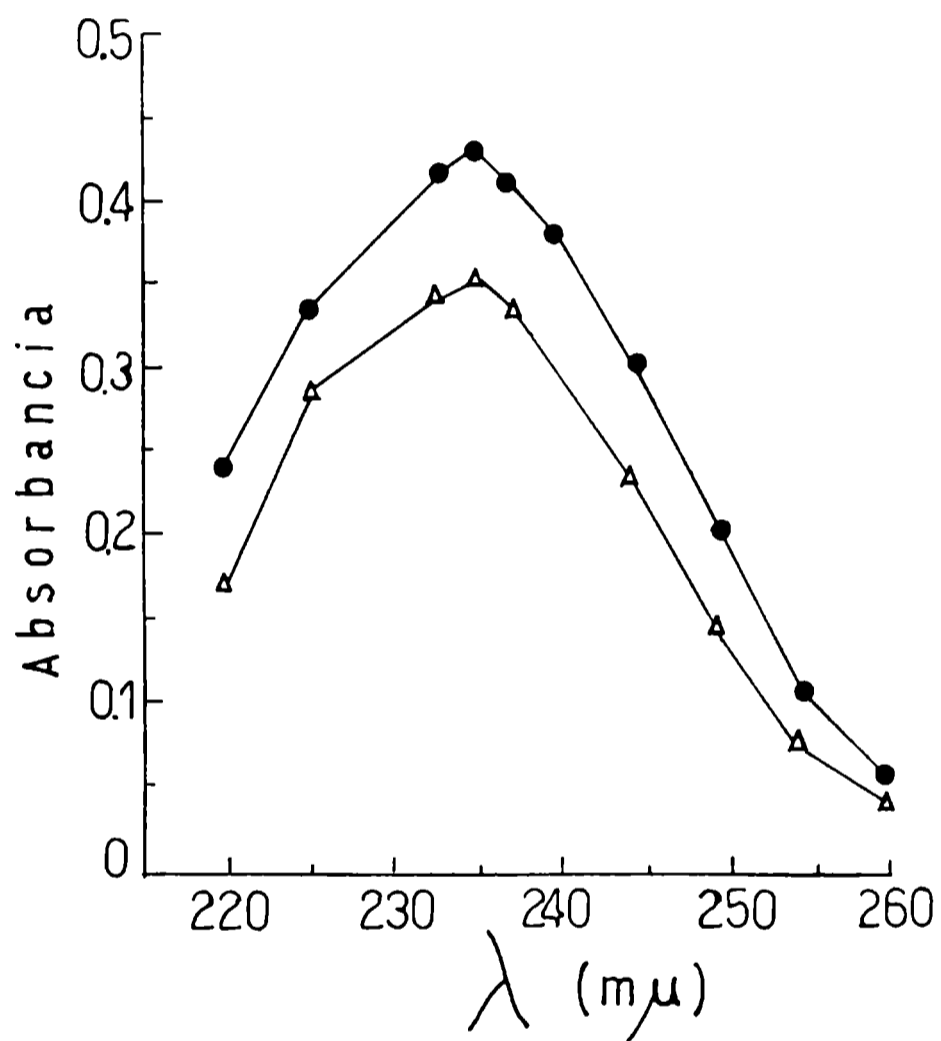
Equilibración de la composición de la fase gaseosa al comienzo del cultivo microaerobio. Un frasco erlenmeyer de 1l con 250 ml de medio MDG inoculado con *R. japonicum* 110 fue gaseado desde tiempo cero con una mezcla de O₂ 0.3% en N₂ más CO₂ 1% y un caudal de 20 ml/minuto. La concentración de O₂ se determinó por cromatografía de gases en muestras tomadas de la fase gaseosa a distintos tiempos.

Figura 2



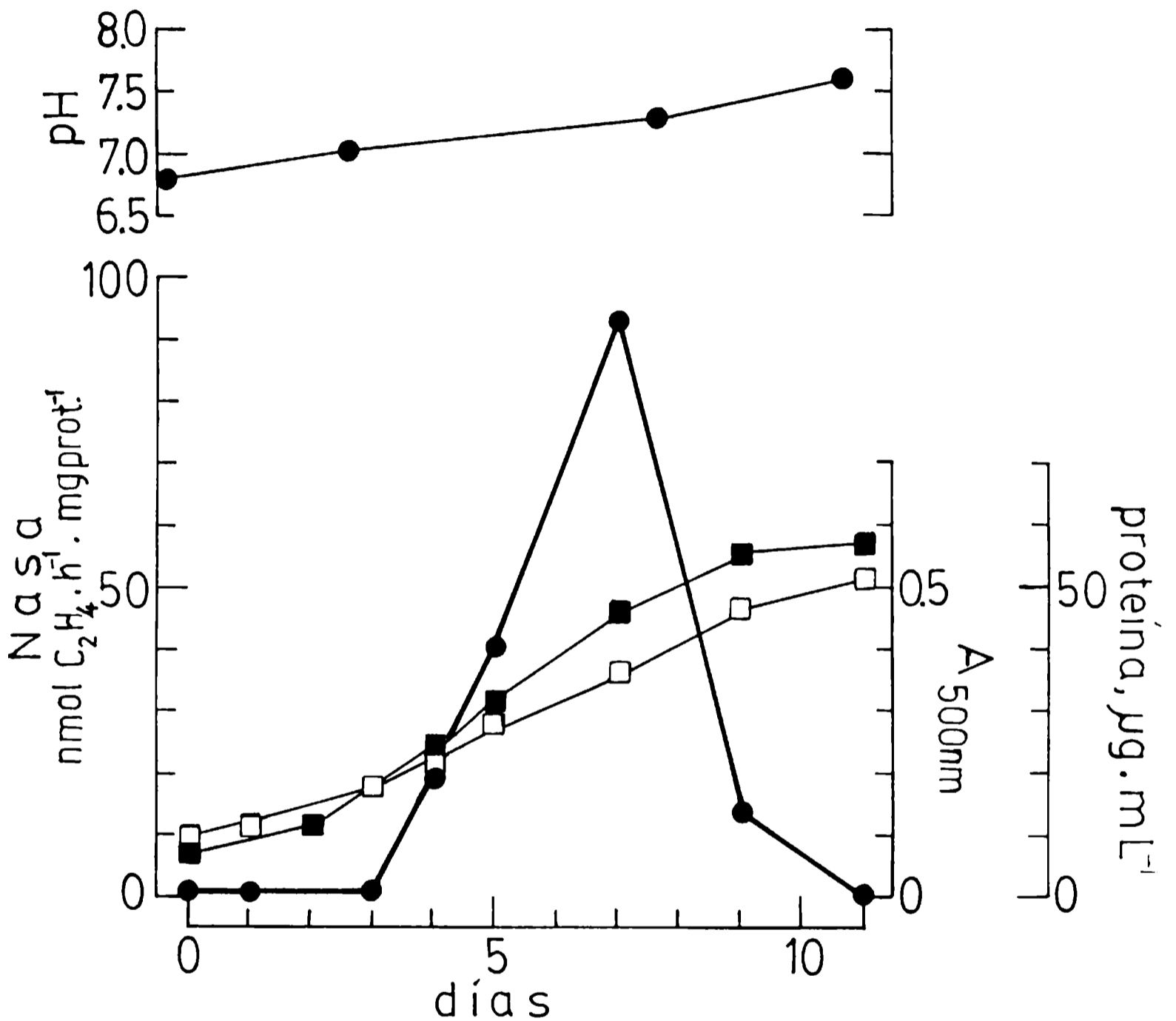
Reducción de NAD por extractos de *R. japonicum* 110: dependencia del agregado de β -hidroxibutirato (HB). La mezcla de incubación contenía en un volumen final de 3.0 ml (μ moles): Tris. HCl, 100; acetato Mg, 3; NAD, 1.2; y extracto enzimático (0.450 mg de proteína), pH 8. A los 5 minutos de incubación se agregó 20 μ moles de HB (indicado por la flecha).

Figura 3



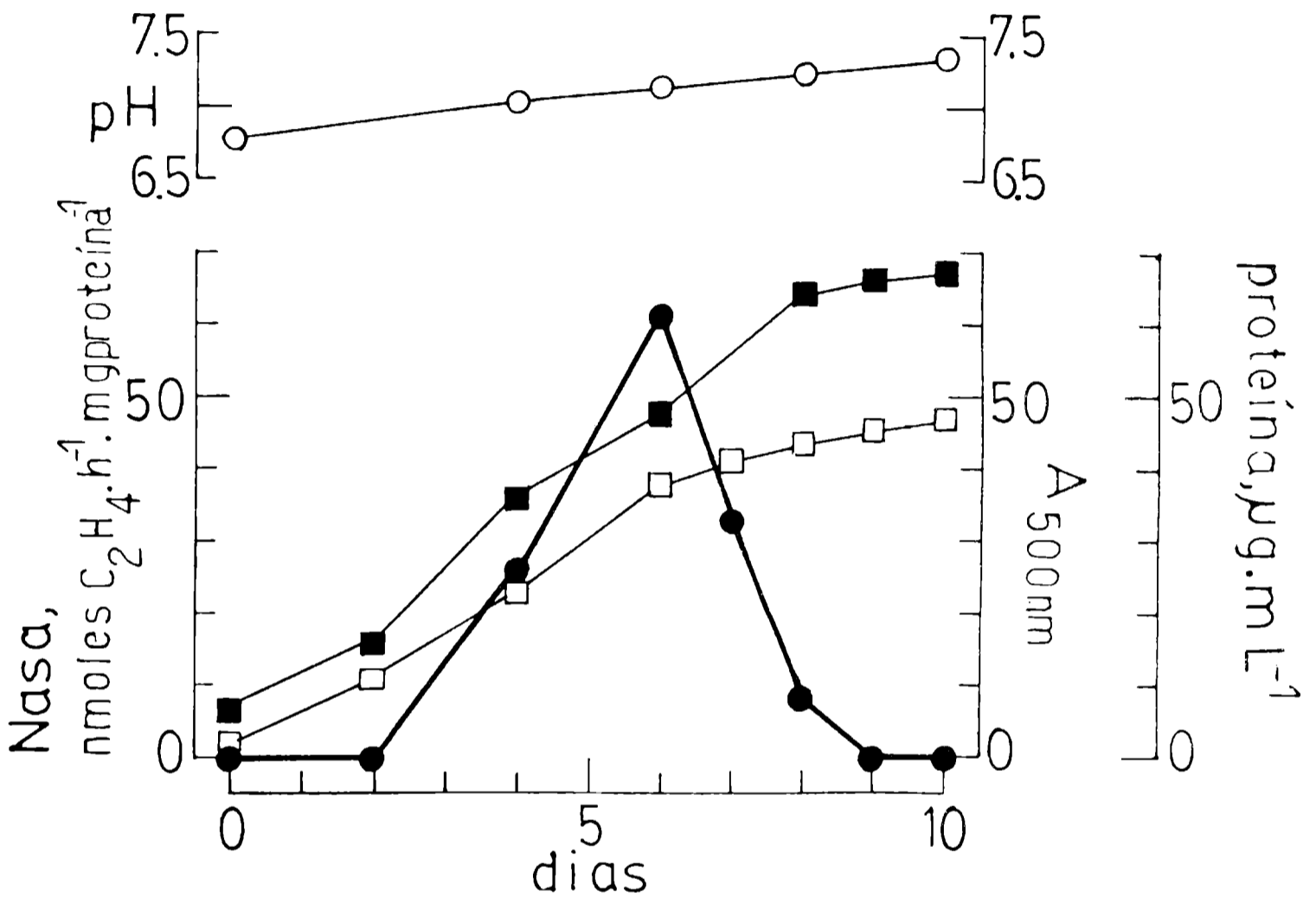
Espectro de absorción del ácido crotonico resultante de la deshidratación de: (Δ — Δ) PHB extraído de células de *R. japonicum* 110 cosechadas de un cultivo de 8 días en condiciones microaeróbicas (O_2 0.3% en N_2 más CO_2 1%). (●—●) HB puro (Sigma). La purificación del PHB extraído de los rizobios, y la deshidratación con H_2SO_4 concentrado fueron realizadas según se describió en Materiales y Métodos.

Figura 4



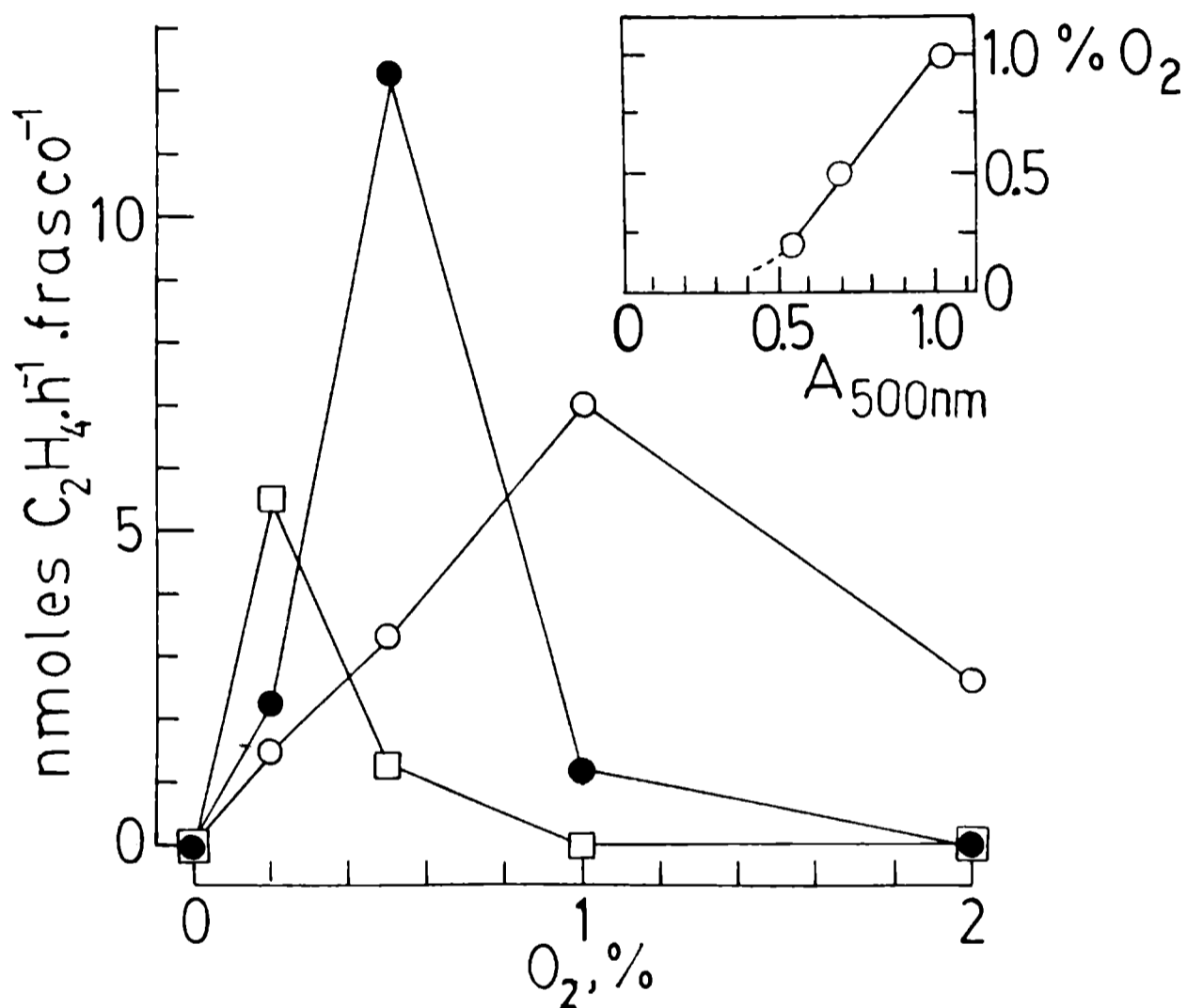
Cultivo microaerobio de *R. japonicum* 110 en el medio MDG de desrepresión de la nitrogenasa. La composición del medio MDG (con gluconato), con PO₄ 25 mM fue descrita en Materiales y Métodos. El cultivo fue gaseado permanentemente desde su inoculación (tiempo cero) con una mezcla de O₂ 0.3% en N₂ más CO₂ 1%. Las medidas de: Nasa (●); proteínas bacterianas (□), y absorbancia a 500 nm (■) fueron realizadas como se describió en Materiales y Métodos.

Figura 5



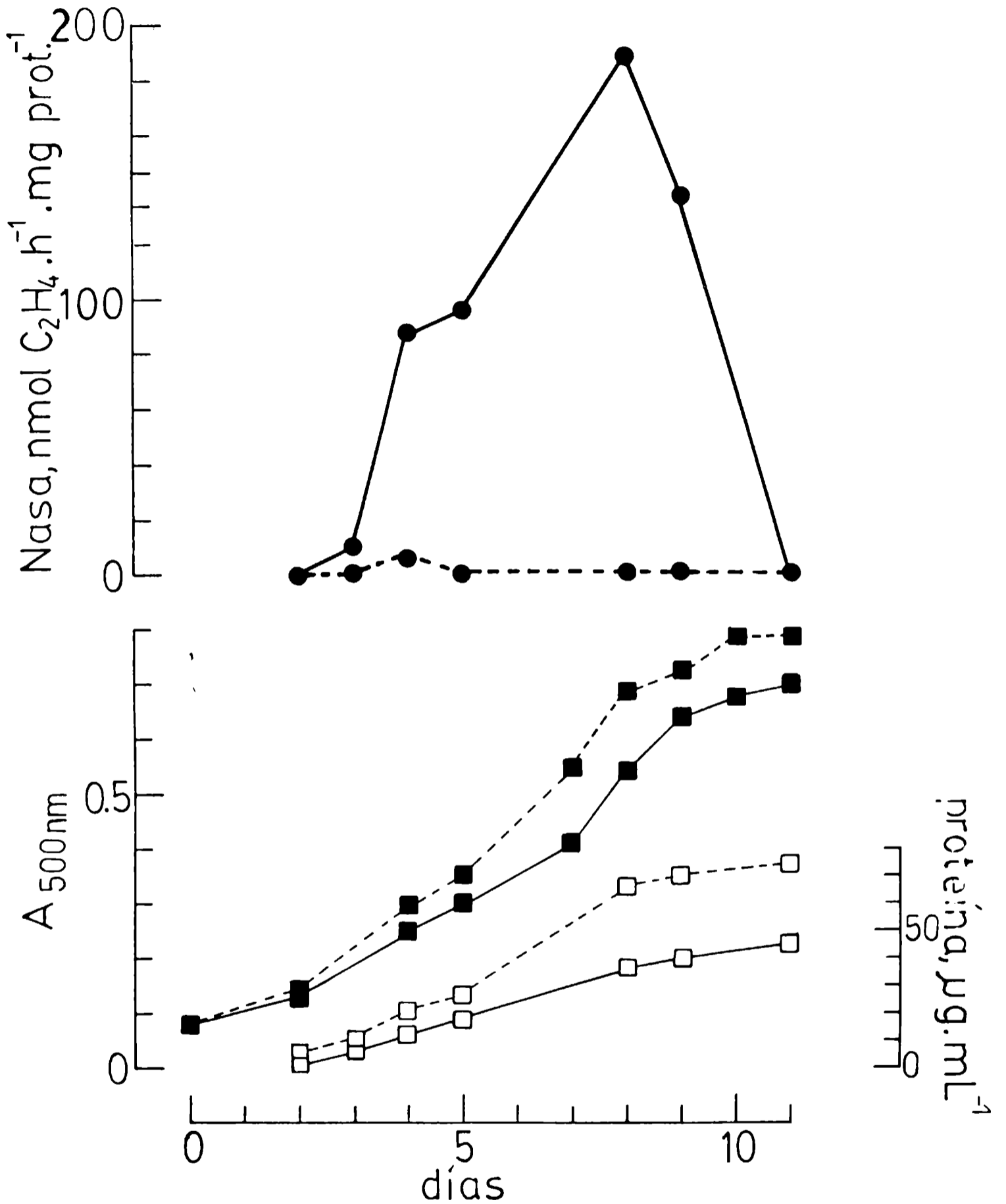
Cultivo microaerobio de *R. japonicum* 110 en el medio MDA de desrepresión de la Nasa. La composición del medio MDA (con arabinosa) con PO₄ 25 mM fue descrita en Materiales y Métodos. El cultivo fue gaseado permanentemente desde su inoculación (tiempo cero) con una mezcla de O₂ 0.3% en N₂ más CO₂ 1%. Las medidas de: Nasa (●); proteínas bacterianas (□), y absorbancia a 500nm (■) fueron realizadas como se describió en Materiales y Métodos.

Figura 6



Niveles óptimos de O₂ para la medida de actividad de Nasa. Muestras de 2.0 ml extraídas en distintas etapas de un cultivo microaeróbico (O₂ 0.3% en N₂ más CO₂ 1%) de *R. japonicum* 110 en el medio MDG (12.5 mM) fueron incubadas en frascos de 10 ml con C₂H₂ 10%, y distintas concentraciones de O₂ (0; 0.2; 0.5; 1.0; 2.0, %, v/v, en N₂). Se incubó a 28°C con agitación durante 1 hora, y se determinó el C₂H₄ producido. Las absorbancias (500 nm) del cultivo en cada ensayo fueron: (□—□), 0.550; (●—●), 0.710; (○—○), 1.026.

Figura 7



Cultivo microaerobio de *R. japonicum* 110 en el medio MDG suplementado con NH_4^+ 20 mM. Rizobios crecidos en el medio MDG (PO_4 25 mM) más $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (línea discontinua). Cultivo control: rizobios crecidos en el medio MDG (PO_4 25 mM) (línea continua). Ambos cultivos fueron gaseados con una mezcla de O_2 0.3% en $\text{N}_2 + \text{CO}_2$ 1%. Las determinaciones de: actividad de Nasa (●); proteínas bacterianas (□), y $A_{500\text{nm}}$ (■) fueron realizadas como se describió en Materiales y Métodos.

Figura 8

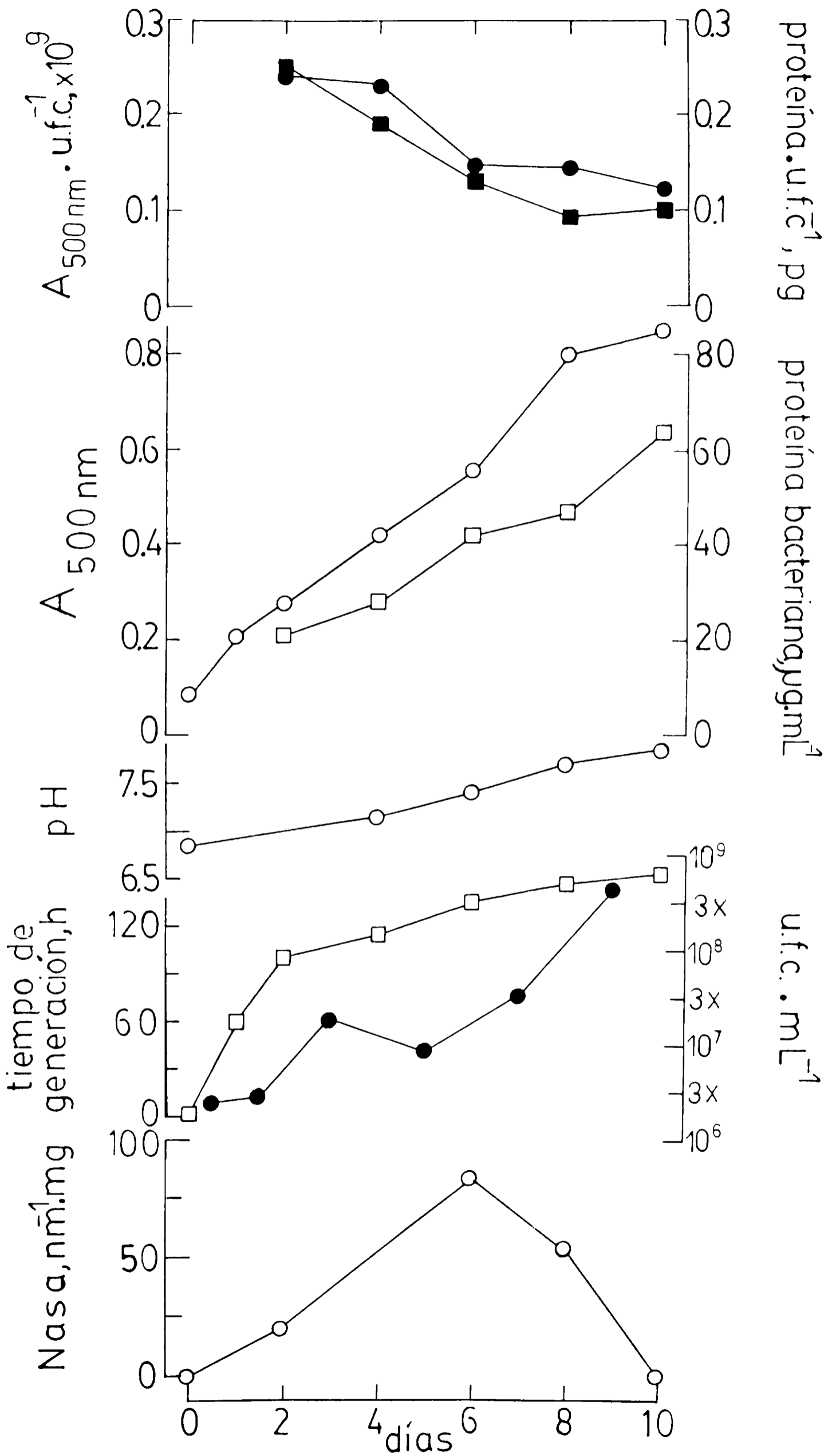


Figura 8

Actividad de nitrogenasa y u.f.c. durante un cultivo microaerobio de *R. japonicum* 110. Los rizobios fueron crecidos en el medio MDG con PO_4 12.5 mM, en microaerobiosis con O_2 0.3% en N_2 más CO_2 1.0%. El procedimiento de cultivo y las determinaciones de actividad de Nasa, u.f.c., proteínas bacterianas, y $A_{500\text{nm}}$ fueron las descritas en Materiales y Métodos.

Símbolos (de abajo hacia arriba)

(o—o) Actividad de Nasa

(●—●) Tiempo de generación (h)

(□—□) u.f.c. ml^{-1}

(o—o) pH

(□—□) Proteínas bacterianas, $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$

(o—o) $A_{500\text{ nm}}$

(●—●) $A_{500\text{ nm}} \cdot \text{u.f.c.}^{-1} \times 10^9$

(■—■) Proteína.u.f.c. $^{-1}$, pg

Figura 9

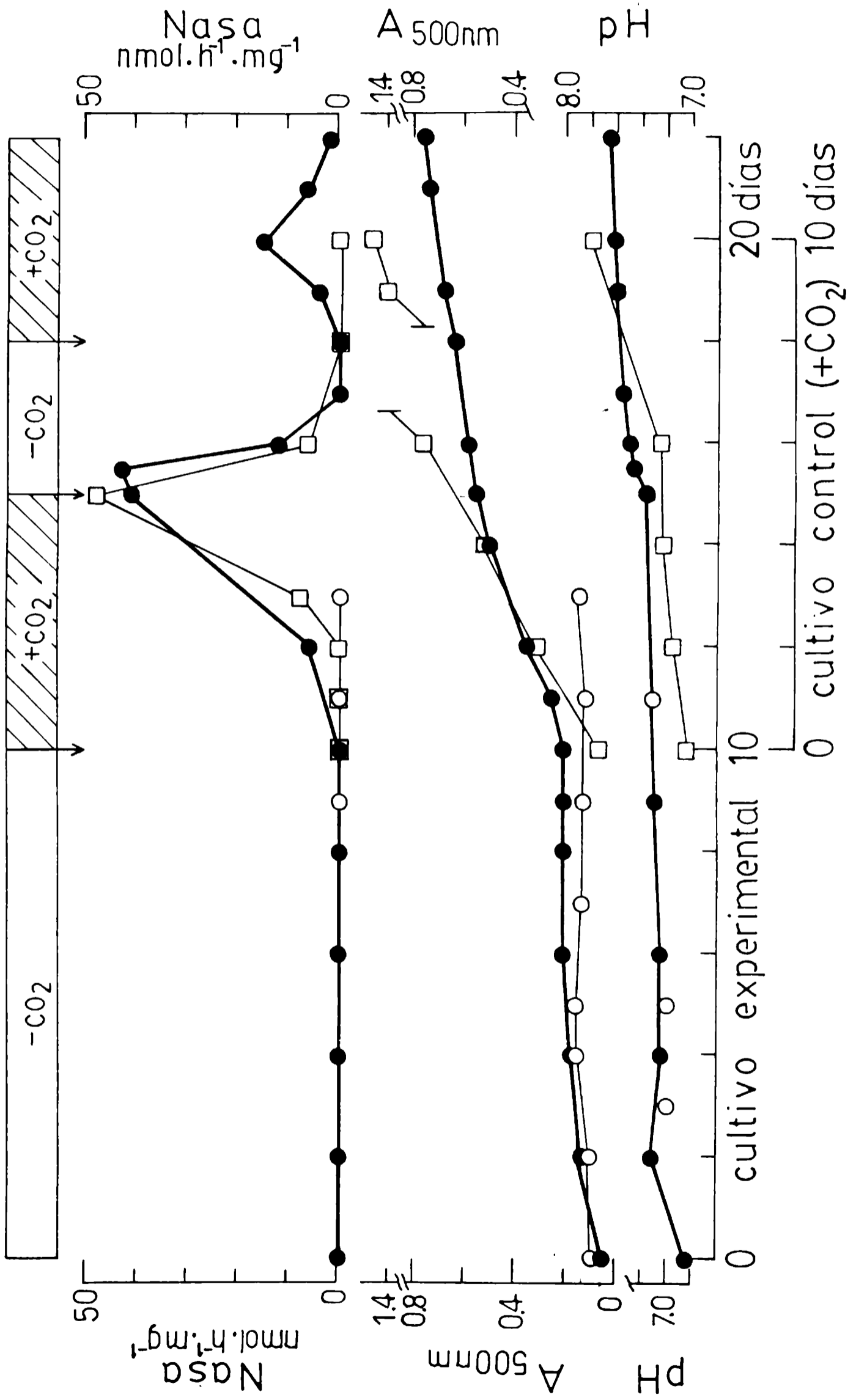
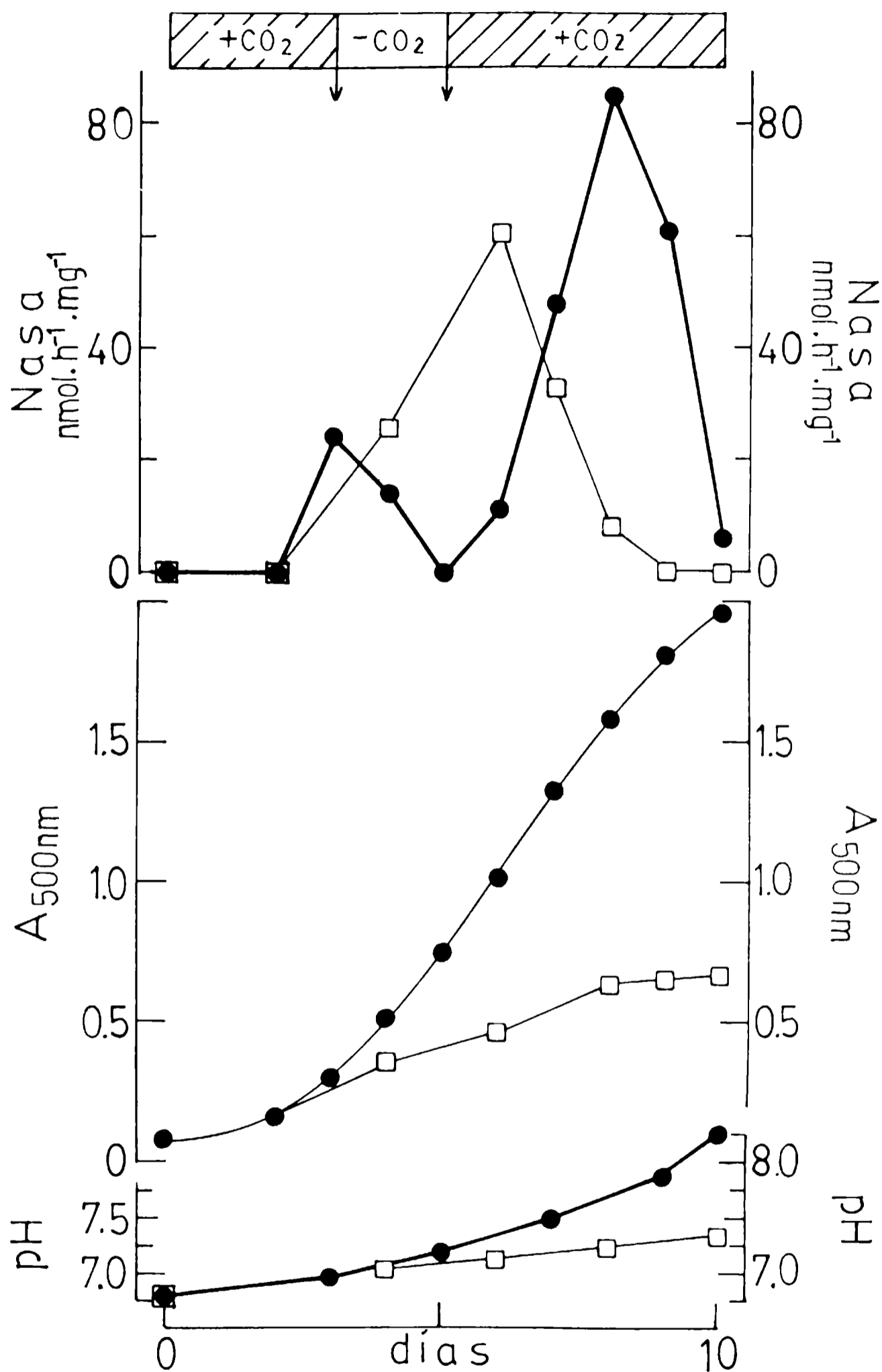


Figura 9

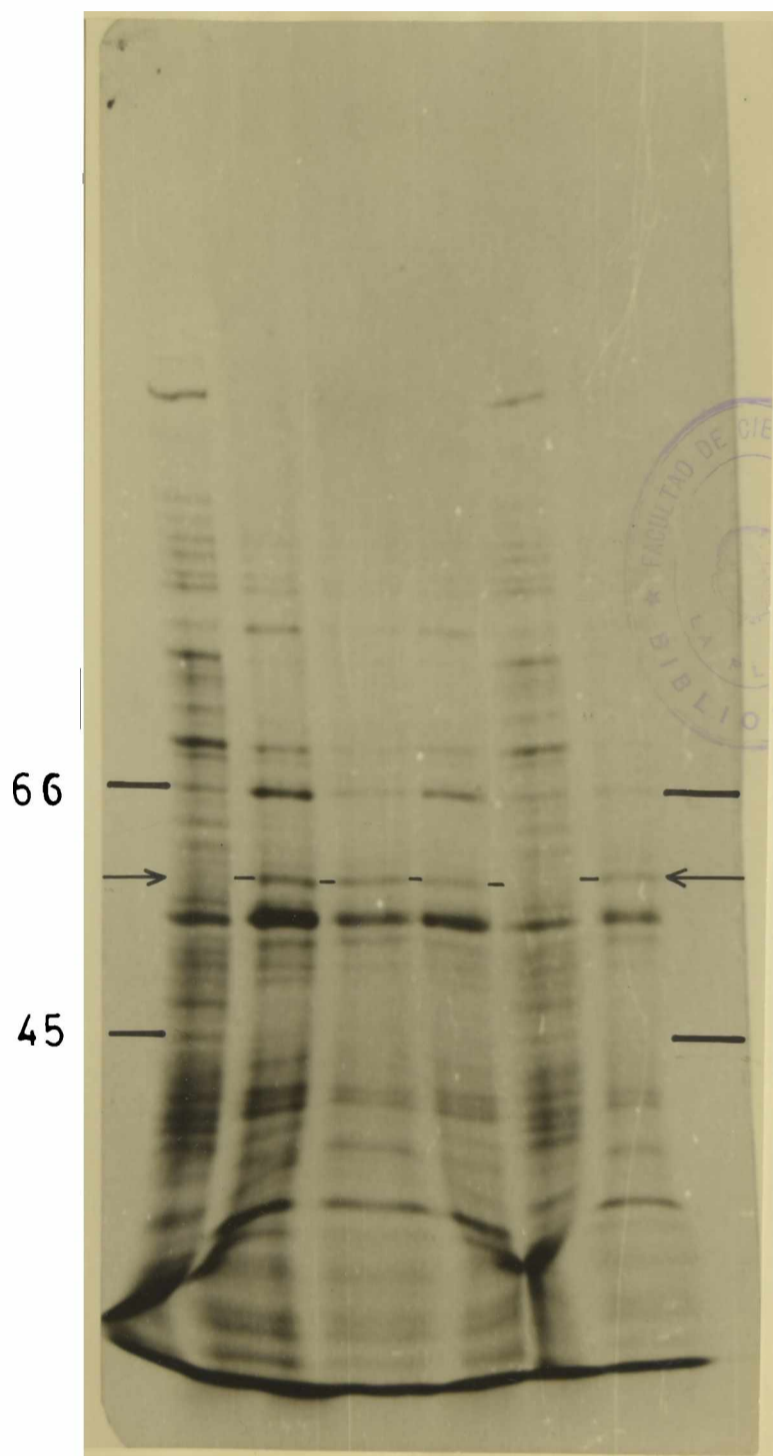
Requerimiento de CO_2 para la expresión de la Nasa en cultivos microaerobios de *R. japonicum* 110. El medio de cultivo fue MDA PO_4 12.5 mM más PIPES 12.5 mM. El procedimiento de cultivo fue el descrito en Materiales y Métodos. La composición de las mezclas gaseosas microaeróbicas fueron: O_2 0.3% en N_2 más CO_2 y O_2 0.3% en N_2 . (●) cultivo experimental con cambios de CO_2 ; (o) cultivo control gaseado sin CO_2 ; y (□) cultivo control gaseado con CO_2 .

Figura 10



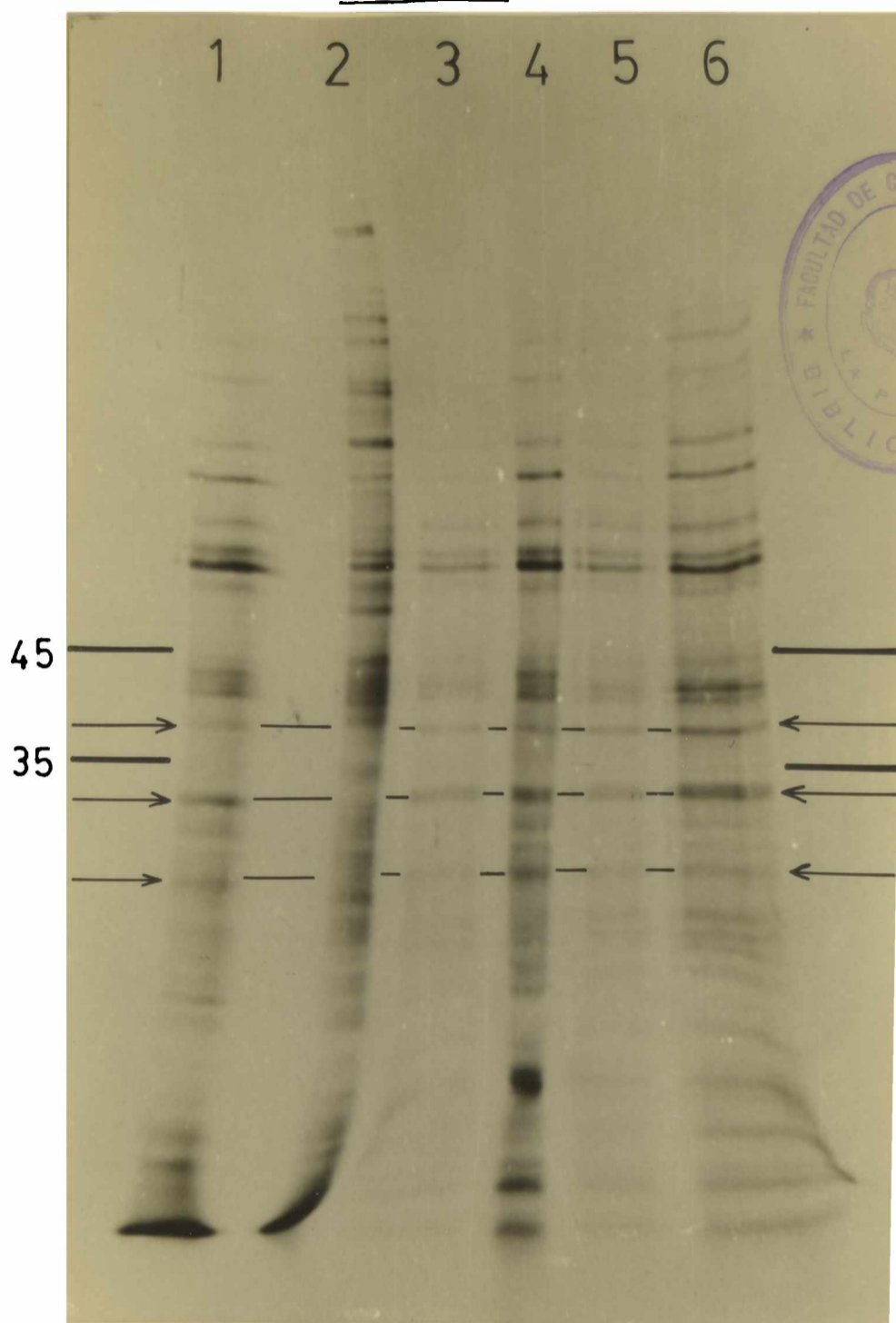
Efecto de CO₂ sobre la actividad de la Nasa en cultivos microaerobios de *R. japonicum* 110. El medio de cultivo fue MDA más PO₄ 25 mM. El procedimiento de cultivo fue el descrito en Materiales y Métodos. La composición de las mezclas gaseosas fueron O₂ 0.3% en N₂ + CO₂ y O₂ 0.3% en N₂. (●) cultivo experimental con cambios de CO₂; (□) cultivo control gaseado con CO₂.

Figura 11



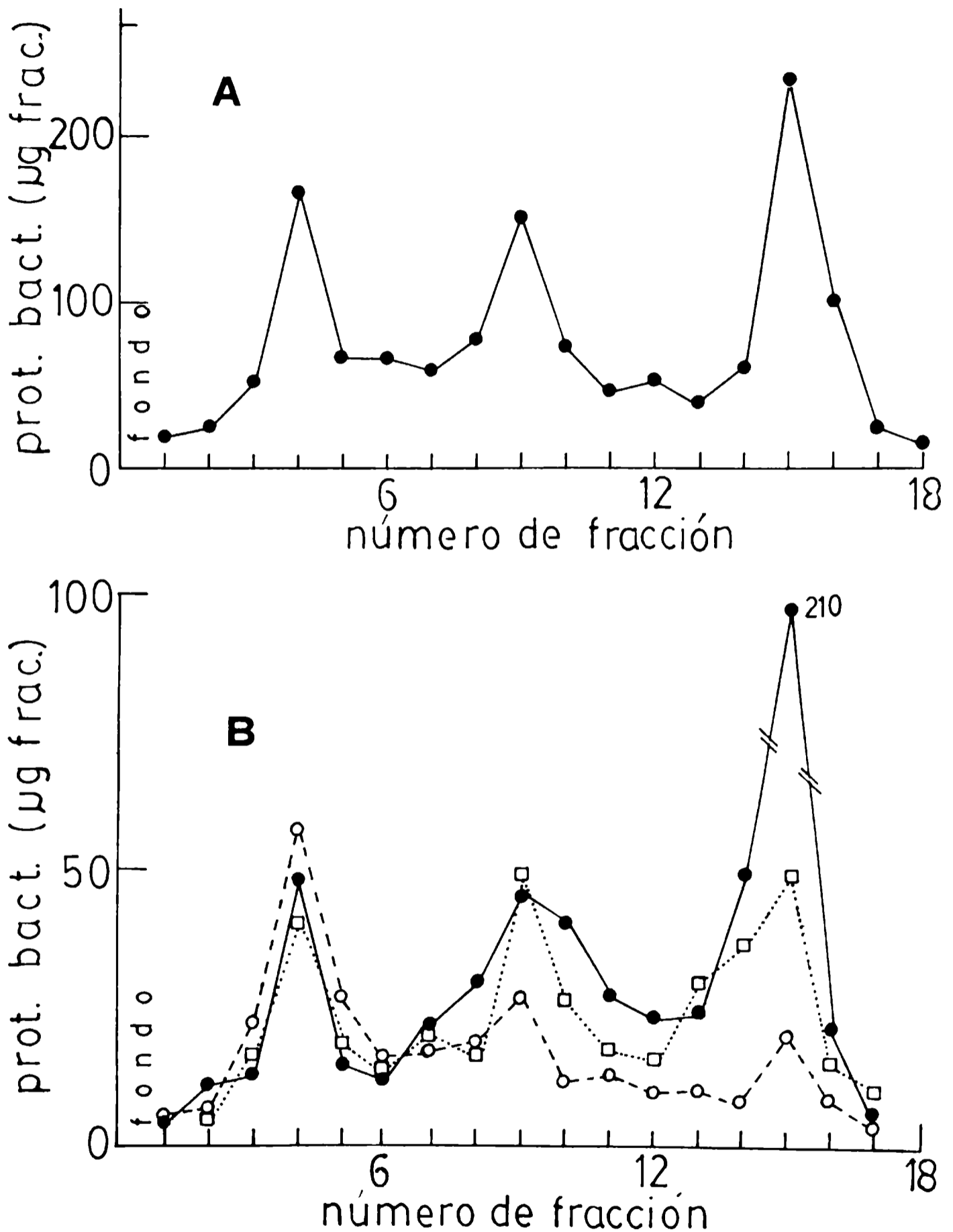
Proteínas sintetizadas por *R. japonicum* 110 en diversas condiciones fisiológicas. Gel A: electroforesis en gel de poliacrilamida 10%, y radioautografía de proteínas marcadas con metionina-³⁵S. Los trazos laterales indican la posición y peso molecular de proteínas conocidas (en kilodalton). Condiciones de los distintos cultivos: 1) cultivo aeróbico en MDA en fase logarítmica (andariveles 1 y 5); 2) cultivo microaeróbico en MDA (+ CO₂) con Nasa activa (25 nmoles C₂H₄.h⁻¹.mg⁻¹) (andariveles 3 y 6); 3) cultivo 2) al cual se le omitió CO₂ en la mezcla de gaseado y su actividad de Nasa cayó a cero a las 48 horas (andariveles 2 y 4). Se sembraron 150.000 cpm en los andariveles 4, 5 y 6; y 300.000 cpm en los andariveles 1, 2 y 3.

Figura 12



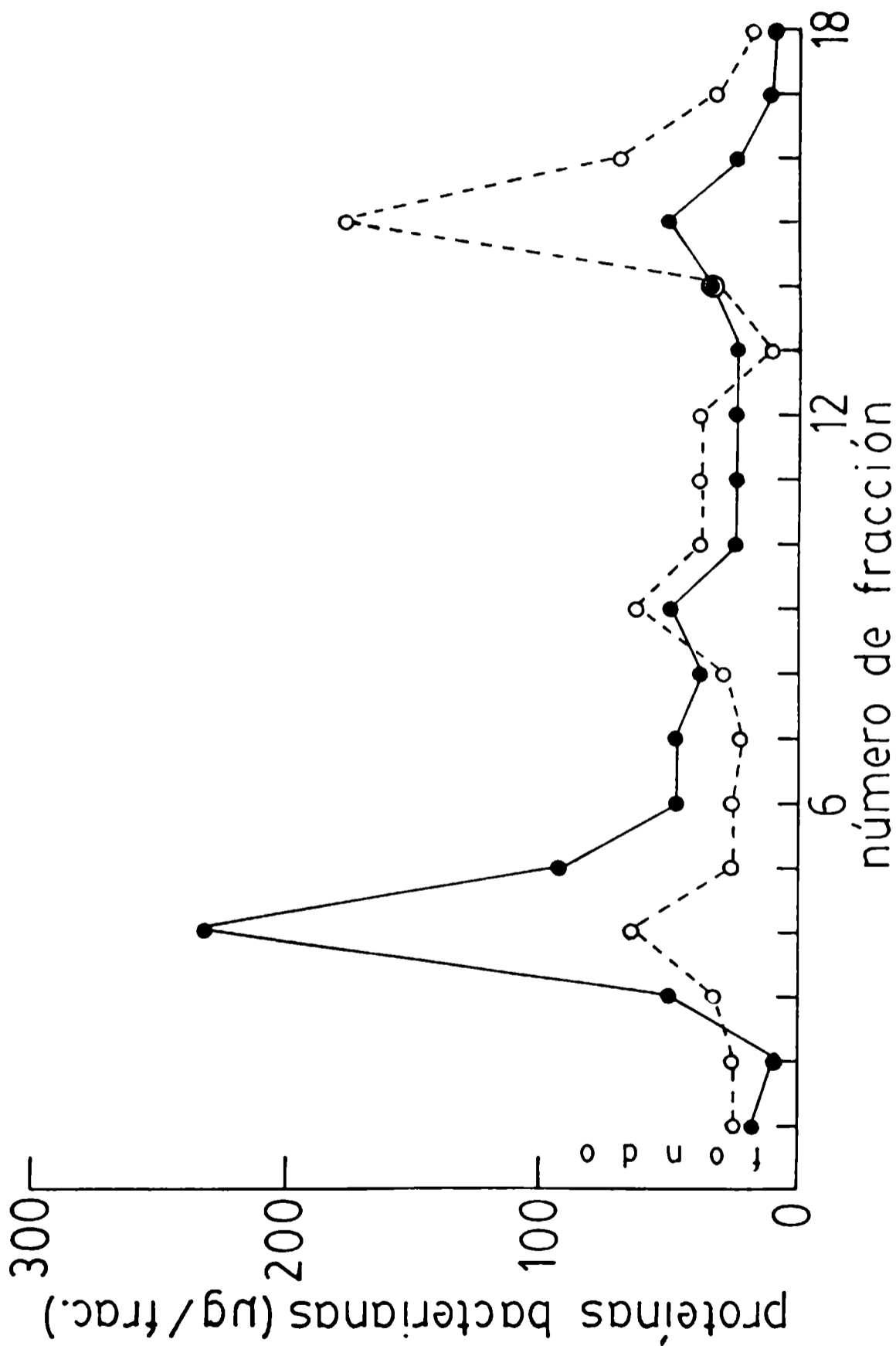
Proteínas sintetizadas por *R. japonicum* en diversas condiciones fisiológicas. Gel B: electroforesis en gel de poliacrilamida 12.5%, y radioautografía de proteínas marcadas con metionina-³⁵S. Los trazos laterales indican la posición y peso molecular de proteínas conocidas (en kilodalton). Condiciones de los distintos cultivos: 1) cultivo aeróbico en MDA en fase logarítmica (andarivel 2); 2) cultivo microaeróbico en MDA (+ CO₂) con Nasa activa (25 nmoles C₂H₄.h⁻¹.mg⁻¹) (andariveles 3 y 5); 3) cultivo 2) al cual se le omitió CO₂ en la mezcla de gaseado y su actividad cayó a cero a las 48 hs. (andariveles 1 y 4); 4) cultivo microaeróbico (+ CO₂) en MDA más NH₄⁺ 20 mM, con actividad de Nasa cero, pero que a las 24 hs. tuvo actividad baja (5 nmoles C₂H₄.h⁻¹.mg⁻¹) (andarivel 6). Se sembraron 300.000 cpm en los andariveles 1, 2, 4 y 6; y 150.000 cpm en los andariveles 3 y 5.

Figura 13



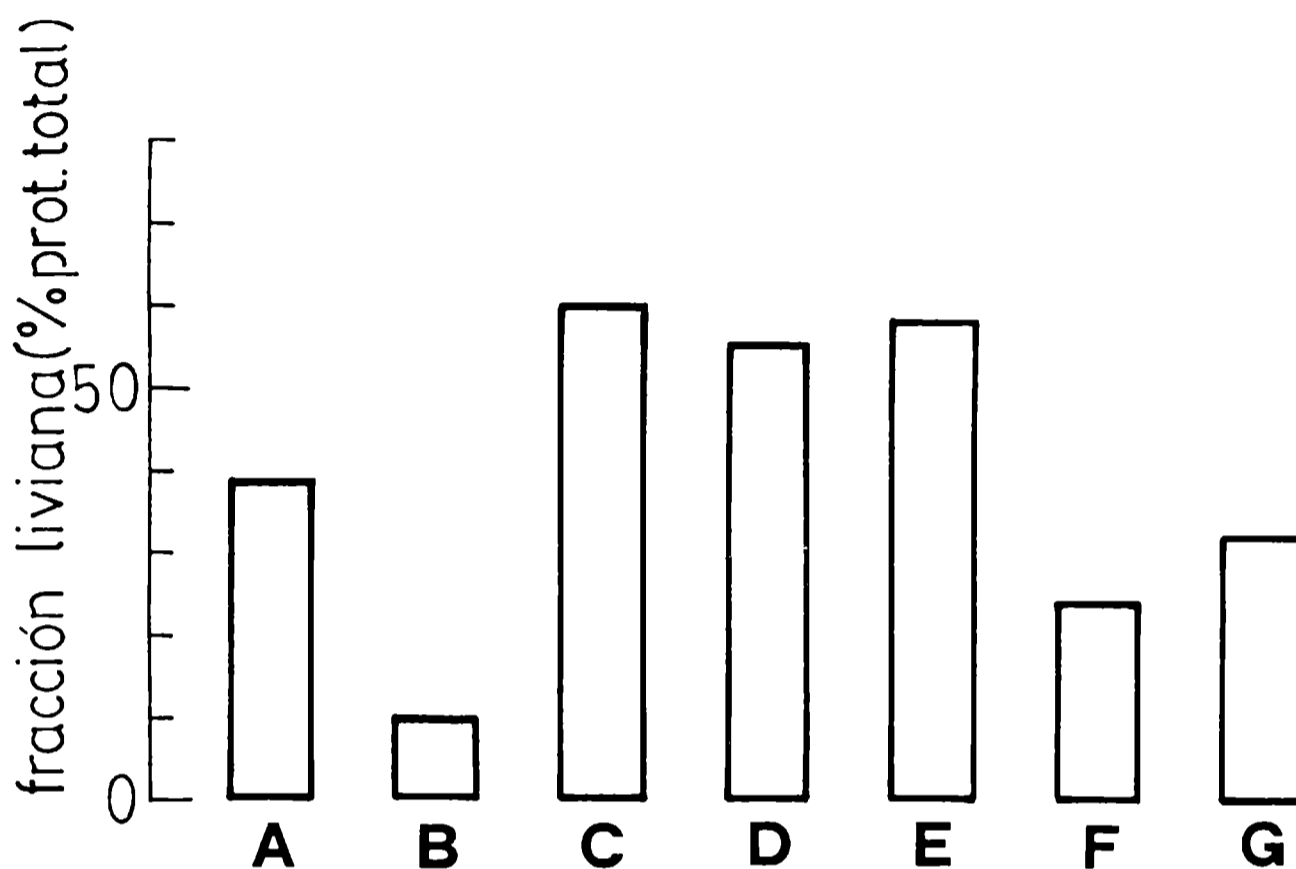
Gradientes discontinuos de densidad de sacarosa.
A: Distribución de poblaciones de bacteroides de la cepa *R. japonicum* 110 extraídos de nódulos de soja de 42 días. Densidades: fracción pesada (N°4), 1.281; fracción media (N°9), 1.252; fracción liviana (N°15), 1.211. B: Distribución de las subpoblaciones aisladas de un gradiente de bacteroides. Cada una de las 3 fracciones del gradiente A fueron aisladas y corridas nuevamente por separado en gradiente. (o---o), fracción pesada; (□.....□) fracción media; (●—●), fracción liviana. Los gradientes se realizaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

Figura 14



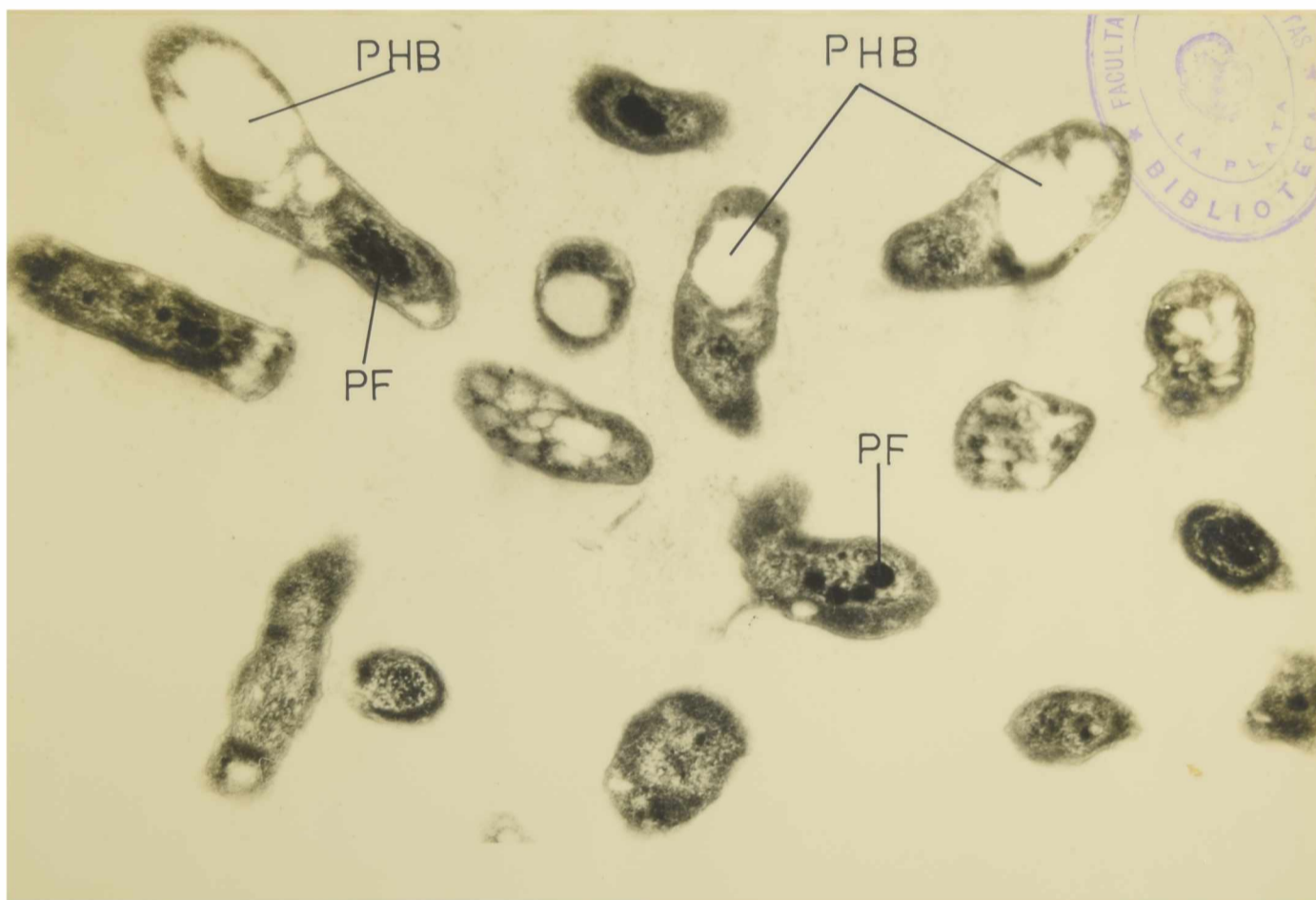
Distribución de poblaciones de *Rhizobium japonicum* 110, aeróbicos y microaeróbicos en gradientes discontinuos de densidad de sacarosa. Los gradientes se realizaron en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Los rizobios provenían de: (●—●) cultivo aeróbico en fase logarítmica (A500nm: 0.480). (○—○) cultivo microaeróbico (O₂ 0.4% en N₂ + CO₂ 1%) de 6 días (A500nm: 0.520), y actividad de Nasa (124 nmoles C₂H₄·h⁻¹·mg⁻¹). En ambos cultivos el medio fue MDG (PO₄ 25 mM).

Figura 15



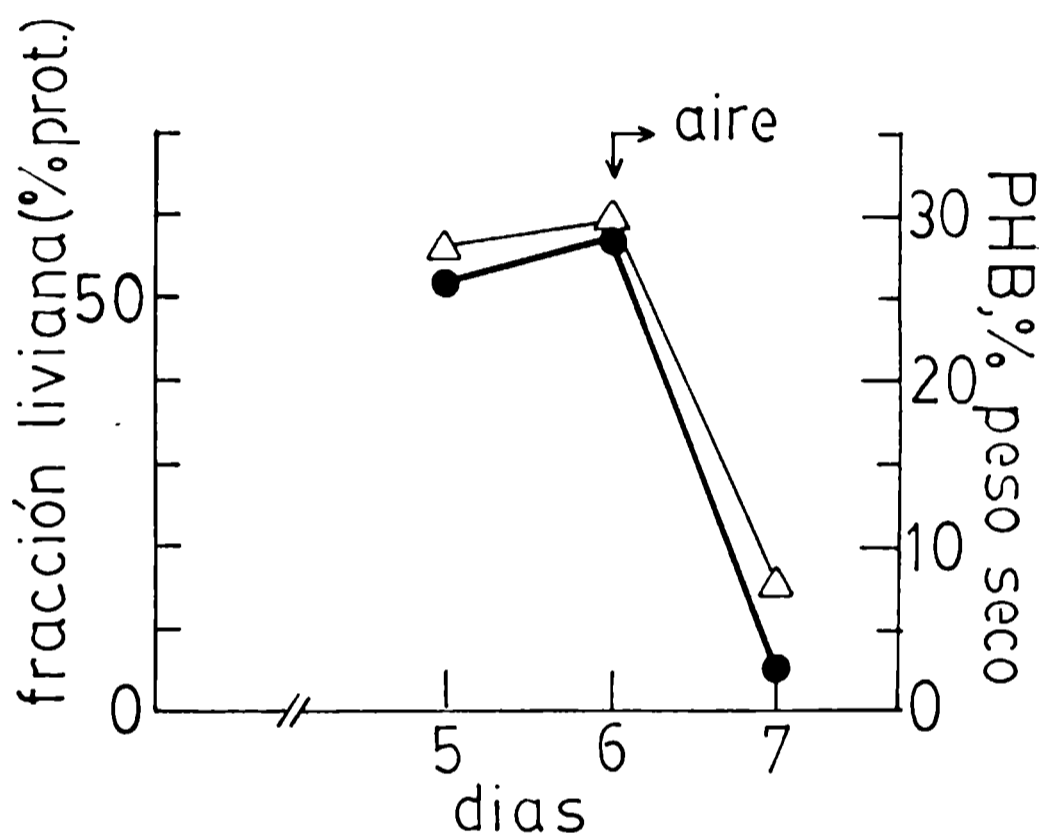
Subpoblación liviana de *R. japonicum* 110 en diversas condiciones de cultivo. Cada cultivo fue analizado en un gradiente discontinuo de sacarosa como se describió en Materiales y Métodos. A: bacteroides de nódulos de 42 - 45 días; B: cultivo aeróbico en medio MDG en fase logarítmica (A_{500nm} : 0.400); C: cultivo microaeróbico con CO_2 en medio MDG, con Nasa activa; D: cultivo microaeróbico con CO_2 en medio MDG más $(NH_4)_2SO_4$ 10 mM, sin actividad de Nasa; E: cultivo microaeróbico sin CO_2 en medio MDG, sin actividad de Nasa; F: cultivo aeróbico en medio MDG, en fase estacionaria (A_{500nm} : 1.94); G: cultivo aeróbico en fase logarítmica, en medio MDG, incubado con N_3Na 5 mM durante 12 horas.

Figura 16



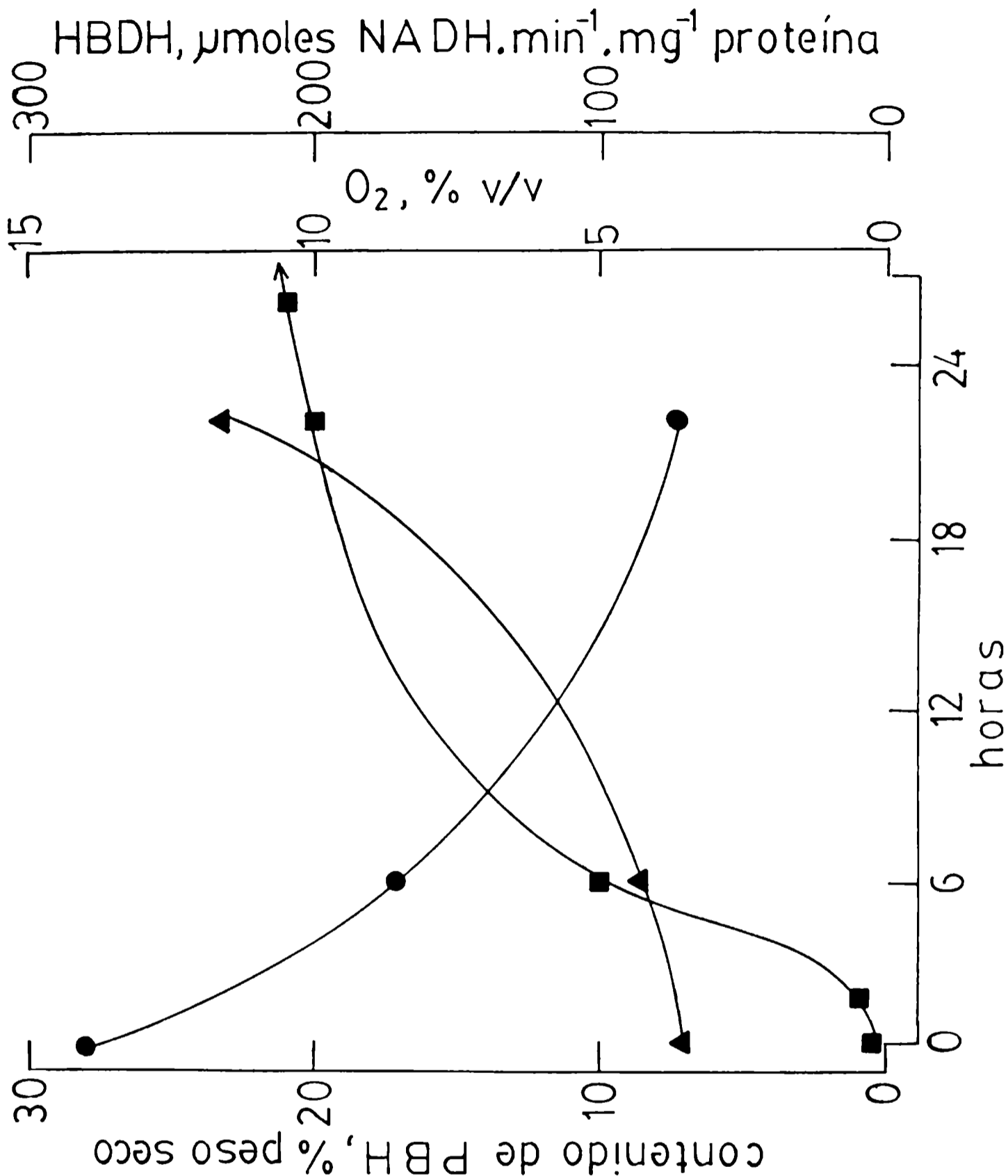
Micrografía electrónica de *R. japonicum* 110 de cultivo microaeróbico. Los rizobios provenían de un cultivo microaeróbico (O_2 0.3% en N_2 más CO_2 1%) de 7 días en el medio MDG (PO_4 25 mM), con actividad de Nasa. La preparación del material para su observación fue realizada según se describió en Materiales y Métodos. Nótese los prominentes gránulos de PHB, y los de polifosfato (PF) asociados a la región nucleoide (22.000 x).

Figura 17



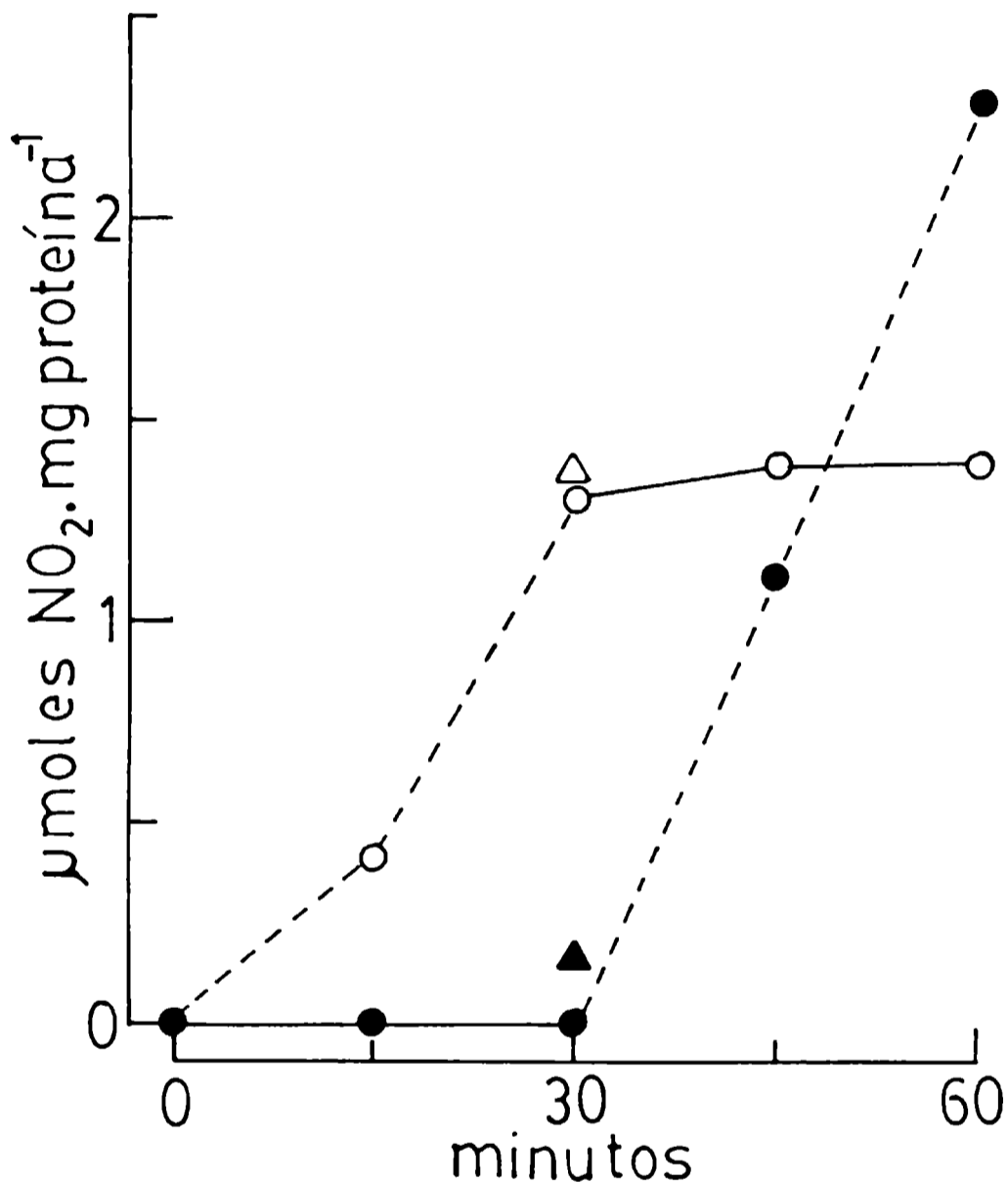
Cambios de contenido de PHB y proporción de fracción liviana de un cultivo de *R. japonicum* 110 en medio MDG. El cultivo se gaseó permanentemente con O_2 0.3% en N_2 más CO_2 1%. El día 6 se interrumpió el gaseado microaerobio y quedó expuesto al aire. Veinticuatro horas después la concentración de O_2 de la fase gaseosa se estimó en 10 - 12%. Δ — Δ contenido de PHB (% peso seco); \bullet — \bullet fracción liviana (% de la proteína total).

Figura 18



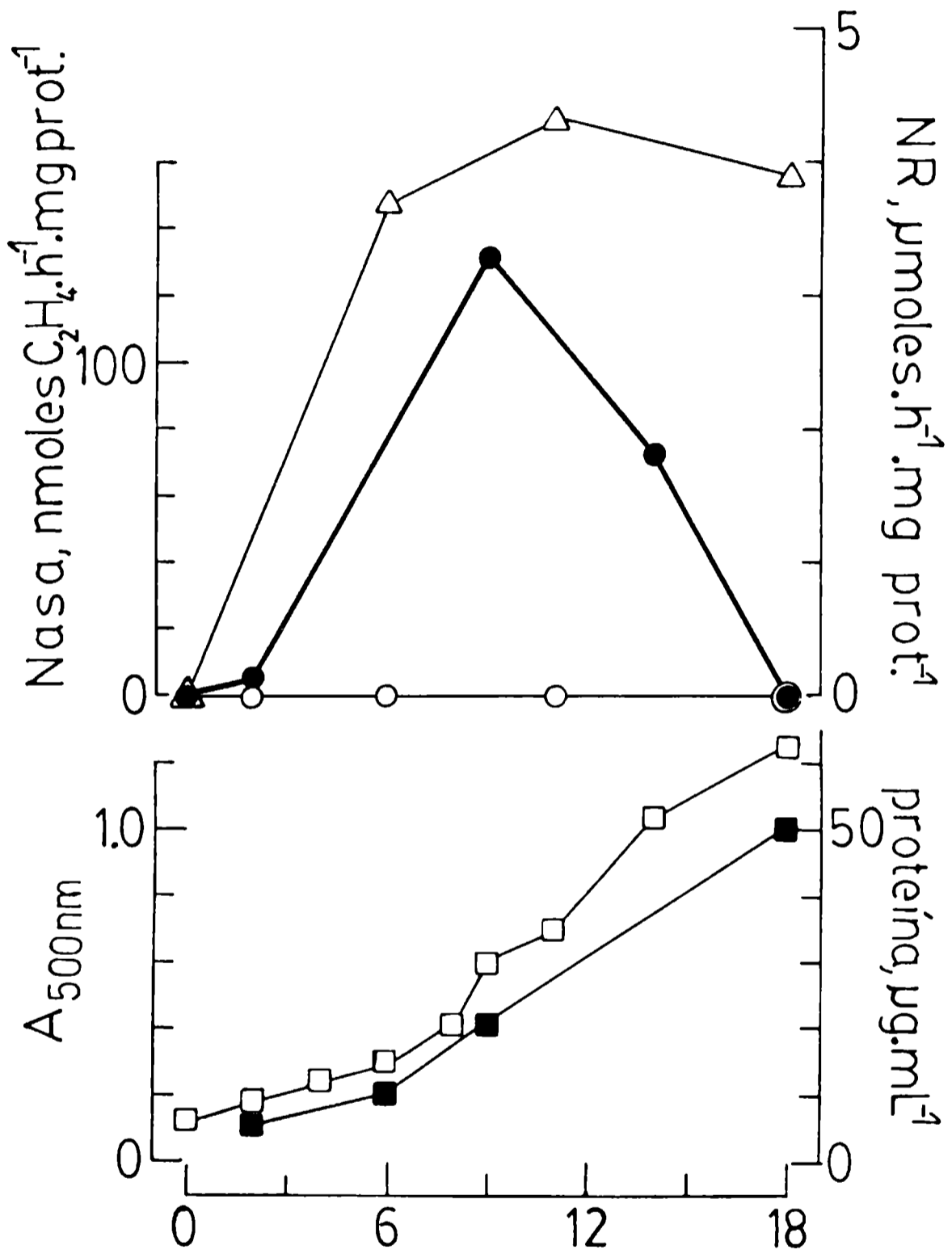
Pasaje de microaerobiosis a aerobiosis: cambios en el contenido de PHB, y actividad de HBDH en *R. japonicum* 110. El cultivo se desarrolló en el medio MDG y PO_4 25 mM, gaseado permanentemente con la mezcla O_2 0.3% en N_2 más CO_2 1%. El día 5 (actividad de Nasa $63 \text{ nmoles} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) se interrumpió el gaseado microaeróbico y quedó expuesto al aire. (●—●) contenido de PHB; (▲—▲) actividad de HBDH; (■—■) concentración de O_2 en la fase gaseosa del cultivo. Las determinaciones se realizaron según se describió en Materiales y Métodos.

Figura 19



Efectos de la presencia o ausencia de O_2 sobre la reducción de NO_3^- por la NR de rizobios cultivados en microaerobiosis. Los rizobios (●, o) provenían de un cultivo microaerobio (O_2 0.4% en N_2 más CO_2 1.0%) en medio MDG, y con una actividad de nitrógenasa de $95 \text{ nmoles } C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1} \text{ proteína}$. La composición de la mezcla de incubación (3 ml por frasco) fue la descrita en Materiales y Métodos; el ensayo comenzó a tiempo cero agregando la suspensión de rizobios (0.120 mg de proteína por frasco). Un ensayo (●) se realizó en presencia de aire los primeros 30 minutos y se continuó en ausencia de O_2 . El otro (o) se realizó en el orden inverso. Incubación en ausencia de O_2 ----; en presencia de aire —; Δ NO_2^- formado por bacteroides simbióticos en ausencia de O_2 ; \blacktriangle , idem, en presencia de aire.

Figura 20



Actividad de NR y Nasa en un cultivo microaerobio de *R. japonicum* 110. El medio MDG con fosfato 25 mM fue gaseado con O₂ 0.4% más CO₂ 1% en N₂. Δ , NR (O₂-); o, NR (O₂+); ●, Nasa; ■, proteína bacteriana; □, A_{500 nm}.

B I B L I O G R A F I A

1. Delwiche, C. C., *Sci. Am.* 223, 136-146 (1970).
2. Burris, R. H., "Nitrogen Fixation", Vol. I, Newton, W. E. & Orme-Johnson, W. H. (ed.), University Park Press, pág. 7-16 (1980).
3. Brill, W., *Sci. Am.* 236, N°3, 68-81 (1977).
4. Hardy, R. W. F. & Havelka, U. D., *Science* 188, 633-643 (1975).
5. Safrany, D. R., *Sci. A.* 231, N°4, 64-80 (1974).
6. Postgate, J. R., "Companion to Microbiology", Bull, A. T. & Meadow, P. M. (ed.) Longmans, pág. 343-353 (1978).
7. Knowles, R., "Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics", Döbereiner, J.; Burris, R. H. & Hollaender, A. (ed.) *Basic Life Science*, Vol. 10, 25-40 (1978).
8. Burkart, A., "Las Leguminosas Argentinas", Acme Agency, Buenos Aires (1952).
9. Akkermans, A. D. L.; Abdulkadir, S. & Trinick, M. J., *Nature* 274, N° 5667, 190-191 (1978).
10. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, The Williams and Wilkins Company (ed.) 7th Edition (1957).
11. Vincent, J. M., "A Treatise on Dinitrogen Fixation", Capítulo 7, Sección III, Hardy, R. W. & Silver, W. S. (ed.) Wiley Interscience, pág. 277-366 (1977).
12. Martínez de Dretz, G.; Arias, A. & Rovira de Cutinella, M. *Can. J. Microbiol.* 20, 605-609 (1974).
13. Keele Jr, B. B.; Hamilton, P. B. & Elkan, G. H., *J. Bacteriol.* 101 (3), 698-704 (1970).

14. Kuykendall, L. D. & Elkan, G. H., *J. Gen. Microbiol.* 98, 291-295 (1977).
15. Dazzo, F. B., "Nitrogen Fixation", Vol. II, Newton, W. E. & Orme-Johnson, W. H. (ed.), University Park Press, pág. 165-187 (1980).
16. Bauer, W. D., "Nitrogen Fixation", Vol. II, Newton, W. E. & Orme-Johnson, W. H. (ed.), University Park Press, pág. 205-214 (1980).
17. Dazzo, F. B.; Napoli, C. A. & Hubbell, D. H., *Appl. Env. Microbiol.* 32, 168-171 (1976).
18. Bal, A. K.; Shantharam, S. & Ratnam, S., *J. Bacteriol.* 133, 1393-1400 (1978).
19. Carlson, R. W.; Sanders, R. E.; Napoli, C. & Albersheim, P., *Plant Physiol.* 62, 912-917 (1978).
20. Bohlool, B. B. & Schmidt, E. L., *J. Bacteriol.* 125, N°3, 1188-1194 (1976).
21. Broughton, W. J., *J. Appl. Bacteriol.* 45, 165-194 (1978).
22. Yao, P. Y. & Vincent, J. M., *Aust. J. Biol. Sci.* 22, 413-423 (1969).
23. Dart, P., "A Treatise on Dinitrogen Fixation", Capítulo 8, Sección III, Hardy, R. W. F. & Silver, W. S. (ed.) Wiley Interscience, pág. 367-463 (1977).
24. Werner, D. & Mörschel, E., *Planta* 141, 169-177 (1978).
25. Burris, R. H.; Ljones, T. & Emerich, D. W., "Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics", Döbereiner, J.; Burris, R. H. & Hollaender, A. (ed.) *Basic Life Sciences*, Vol. 10, pág. 191-207 (1978).

26. Rukvun, G. B. & Ausubel, F. M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 191-195 (1980).
27. Mortenson, L. E. & Thorneley, R. N. F., Ann. Rev. Biochem. 48, 387-418 (1979).
28. Yates, M. G. & Walker, C. C., "Nitrogen Fixation", Vol. I, Newton, W. E. & Orme-Johnson, W. H. (ed.), University Park Press, pág. 95-109 (1980).
29. Schubert, K. R. & Evans, H. J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, N°4, 1207-1211 (1976).
30. Hardy, R. W. F.; Holsten, R. D.; Jackson, E. K. & Burns, R. C., Plant Physiol. 43, 1185-1207 (1968).
31. Koch, B.; Wang, .; Russell, C. A.; Howard, R. & Evans, H. J., Biochem. J. 118, 773-781 (1970).
32. Veeger, C.; Laane, C.; Scherings, G.; Matz, L.; Haaker, H. & Zeeland-Wolbers, L. V., "Nitrogen Fixation", Vol. I, Newton, W. E. & Orme-Johnson, W. H. (ed.), University Park Press, pág. 111-137 (1980).
33. Appleby, C. A., Biochim. Biophys. Acta 172, 88-91 (1969).
34. Daniel, R. M. & Appleby, C. A., Biochim. Biophys. Acta 275, 347-354 (1972).
35. Bergersen, F. J. & Turner, G. L., J. Gen. Microbiol. 91, 345-354 (1975).
36. Appleby, C. A.; Turner, G. L. & Macnicol, P. K., Biochim. Biophys. Acta 387, 461-474 (1975).
37. Bergersen, F. J. & Turner, G. L., J. Gen. Microbiol. 118, 235-252 (1980).

38. Bergersen, F. J., "Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics", Döbereiner, J.; Burris, R. H. & Hollaender, A. (ed.) Basic Life Science, Vol. 10, 247-261 (1978).
39. Bisseling, T.; Moen, A. A.; Bos, R. C. van den & Kammen, A. van, J. Gen. Microbiol. 118, 377-381 (1980).
40. Bergersen, F. J. & Goodchild, D. J., Aust. J. Biol. Sci. 26, 741-756 (1973).
41. Verma, D. P. S. & Bal, A. K., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 3843-3845 (1976).
42. Dilworth, M. J., Biochim. Biophys. Acta 184, 411-432 (1969).
43. Verma, D. P. S.; Nash, D. T. & Schulman, H..M., Nature 251, 74-77 (1974).
44. Cutting, J. A. & Shulman, H. M., Biochim. Biophys. Acta 192, 486-492 (1969).
45. Avissar, Y. J. & Nadler, K. D., J. Bacteriol. 135, 782-788 (1978).
46. Bergersen, F. J.; Turner, G. L. & Appleby, C. A.; Biochim. Biophys. Acta 292, 271-282 (1973).
47. Wittenberg, J. B., "Nitrogen Fixation", Vol. II, Newton, W. E. & Orme-Johnson, W. H. (ed.), University Park Press, pág. 53-67 (1980).
48. Minchin, F. R. & Pate, J. S., J. Exp. Bot. 24, 259-271 (1972).
49. Streeter, J. G. & Bosler, M. E., Plant Sci. Lett. 7, 321-329 (1976).
50. Kidby, D. K., Plant Physiol. 41, 1139-1142 (1966).

51. Trinchant, J. C. & Rigaud, J., *Physiol. Vég.* 17 (3), 547-556 (1979).
52. Vincent, J. M.; Humphrey, B. & North, R. J., *J. Gen. Microbiol.* 29, 551-555 (1962).
53. Wong, P. P. & Evans, H. J., *Plant Physiol.* 47, 750-755 (1971).
54. Bergersen, F. J. & Turner, G. L., *Biochim. Biophys. Acta* 141, 507-515 (1967).
55. Scott, D. B.; Farnden, K. J. F. & Robertson, J. G., *Nature* 263, 703-705 (1976).
56. Dilworth, M. J., "Nitrogen Fixation", Vol. II, Newton, W. E. & Orme-Johnson, W. H. (ed.), University Park Press, pág. 3-31 (1980).
57. Tubb, R. S., *Appl. Environ. Microbiol.* 32, N°4, 483-488 (1976).
58. O'Gara, F. & Shanmugam, K. T., *Biochim. Biophys. Acta* 437, 313-321 (1976).
59. Shanmugam, K. T.; O'Gara, F.; Andersen, K. & Valentine, R. C., *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 29, 263-276 (1978).
60. Cheniae, G. M. & Evans, H. J., *Biochim. Biophys. Acta* 26, 654-655 (1957).
61. Rigaud, J.; Bergersen, F. J.; Turner, G. L. & Daniel, R. M., *J. Gen. Microbiol.* 77, 137-144 (1973).
62. Pagan, J. D.; Scowcroft, W. R.; Dudman, W. F. & Gibson, A. H., *J. Bacteriol.* 129, N°2, 718-723 (1977).
63. Sutton, W. D., *Biochim. Biophys. Acta* 366, 1-10 (1974).
64. Dilworth, M. J. & Williams, D. C., *J. Gen. Microbiol.* 48, 31-36 (1967).

65. Bergersen, F. J., "The Biology of Nitrogen Fixation", Quispel, A. (ed.), American Elsevier Publishing Company, pág. 473-495. (1974).
66. Paau, A. S.; Lee, D. & Cowles, J. R., J. Bacteriol. 129, N°2, 1156-1158 (1977).
67. Suttow, W. D.; Jepsen, N. M. & Shaw, B. D., Plant Physiol. 59, 741-744 (1977).
68. Gresshoff, P. M.; Skotnicki, M. L.; Eadie, J. F. & Rolfe, B. G., Plant. Sci. Lett. 10, 299-304 (1977).
69. Tsien, H. C.; Cain, P. S. & Schmidt, E. L., Appl. Envir. Microbiol. 34, N°6, 854-856 (1977).
70. van Brussel, A. A. N.; Planque, K. & Quispel, A., J. Gen. Microbiol. 101, N°1, 51-56 (1977).
71. Nutman, P. S., Proc. Roy. Soc. B. 172, 417-437 (1969).
72. Caldwell, B. E. & Vest, H. G., "A Treatise on Dinitrogen Fixation", Cap.11, Sec.III, Hardy, R. W. F. & Silver, W. (ed.) Wiley Interscience, pág. 557-576 (1977).
73. Holl, F. B. & La Rue, T. A., "World Soybean Research", Hill, L. D. (ed.) The Interstate Printers and Publishers, Inc. (1976).
74. Maier, R. & Brill, W. J., J. Bacteriol. 127, N°2, 763-769 (1976).
75. Truchet, G. & Dénarié, J., C. R. Acad. Sc. Paris 277, Serie D, 925-928 (1973).
76. Pankhurst, C. E.; Schwinghamer, E. A. & Bergersen, F. J., J. Gen. Microbiol. 70, 161-162 (1972).
77. Nutman, P. S., Heredity 11, 157-173 (1957).

78. Seetin, M. W. & Barnes, D. K., *Crop. Sci.* 17, 783-787 (1977).
79. Gibson, A. H., *Aust. J. Agric. Res.* 13, 388-399 (1962).
80. Maier, R. J. & Brill, W. J., *Science* 201, 448-450 (1978).
81. Evans, H. J.; Emerich, D. W.; Ruiz-Argüeso, T; Maier, R. J. & Albrecht, S. L., "Nitrogen Fixation", Vol. II, Newton, W. E. & Orme-Johnson, W. H. (ed.), University Park Press, pág. 69-86 (1980).
82. Holsten, R. D.; Burns, R. C.; Hardy, R. W. & Hebert, R. R., *Nature* 232, 173-176 (1971).
83. Phillips, D. A., *Plant Physiol.* 53, 67-72 (1974).
84. Scowcroft, W. R. & Gibson, A. H., *Nature* 253, 351-352 (1975).
85. Child, J. J., *Nature* 253, 350-351 (1975).
86. Pagan, J. D.; Child, J. J.; Scowcroft, W. R. & Gibson, A. H., *Nature* 256, N°5516, 406-407 (1975).
87. Kurz, W. G. W. & Larue, T. A., *Nature* 256, N°5516, 407-408 (1975).
88. Mc Comb, J. A.; Elliott, J. & Dilworth, M. J., *Nature* 256, N°5516, 409-410 (1975).
89. Tjepkema, J. & Evans, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, N°2, 625-628 (1975).
90. Keister, D. L., *J. Bacteriol.* 123, N°3, 1265-1268 (1975).
91. Keister, D. L. & Evans, W. R., *J. Bacteriol.* 129, N°1, 149-153 (1976).
92. Bergersen, F. J.; Turner, G. L.; Gibson, A. H. & Dudman, W. F., *Biochim. Biophys. Acta* 444, 164-174 (1976).

93. Pankhurst, C. E. & Craig, A. S., *J. Gen. Microbiol.* 106, 207-219 (1978).
94. Scott, D. B.; Hennecke, H. & Lim, S. T., *Biochim. Biophys. Acta* 565, 365-378 (1979).
95. Lim, S. T.; Hennecke, H. & Scott, D. B., *J. Bacteriol.* 139, N°1, 256-263 (1979).
96. Keister, D. L. & Ranga Rao, V., "Recent Developments in Nitrogen Fixation", Newton, W.; Postgate, J. R. & Rodríguez Barrueco, C. (ed.) Academic Press, 419-430 (1977).
97. Streicher, S. L.; Shanmugam, K. T; Ausubel, F. M.; Morandi, C. & Goldberg, R. B., *J. Bacteriol.* 120, 815-821 (1974).
98. Bergersen, F. J. & Turner, G. L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73, N°2, 524-531 (1976).
99. Ludwig, R. A. & Signer, E. R., *Nature* 267, 245-248 (1977).
100. Ludwig, R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, N°10, 5817-5821 (1980).
101. Ludwig, R. A., *J. Bacteriol.* 141, N°3, 1209-1216 (1980).
102. Bedmar, E. J. & Olivares, J., *Current Microbiology* 2, 11-13 (1979).
103. Werner, D. & Stripf, R., *Z. Naturforsch* 33c, 245-252 (1978).
104. Vincent, J. M. "A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria", I. B. P. Handbook N°5, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1970).
105. Ching, T. M. & Hedtke, S., *Plant Physiol.* 60, 771-774 (1977).
106. "Methods in Microbiology", Vol. 5B, New York Academic Press, Norris, J. R. & Ribbons, D. W. (ed.) (1971).

107. Dart, P. J.; Day, J. M. & Harris, D., "Use of Isotopes for Study of Fertilizer Utilization by Legume Crops", Proc. of a panel held in Vienna, 8-12 Nov. 1971. FAO-IAEA, Division of Atomic Energy in Food and Agriculture, pag. 85-100 (1972).
108. Nicholas, D. J. D. & Nason, A., Methods in Enzymology, Vol. III, New York Academic Press, pag. 981 (1957).
109. Law, J. H. & Slepecky, R. A., J. Bacteriol. 82, 33-36 (1961).
110. Alper, R.; Lungren, D. G.; Marchessault, R. H. & Cote, W. A., Biopolymers 1, 545-556 (1963).
111. Dressel, E. I. B. & Falk, J. E., Biochem. J. 63, 80-89 (1956)
112. "Progress in Thin Layer Chromatography and Related Methods", Vol. III, Cap. 4, Niederwieser, A. & Petaki, G. (ed.) Ann. Arbor Science (1972).
113. Lickfeld, K. "Methods in Microbiology", Vol. 9 Cap. 4, Norris, J. R. (ed.) New York Academic Press, 127-176 (1976).
114. O'Farrel, P. H., J. Biol. Chem. 250, 4007-4021 (1975).
115. Lowe, R. E. & Evans, H. J., Soil Science 94, N°6, 351-356 (1962).
116. Reibach, P. H.; Mask, P. L. & Streeter, J. G., Can J. Microbiol. 27, N°5, 491-495 (1981).
117. Griebel, R.; Smith, Z. & Merrick, J. M., Biochemistry 7, N°10, 3676-3681 (1968).
118. Senior, P. J. & Dawes, E. A., Biochem. J. 134, 225-238 (1973).

119. Stouthamer, A. H., "Advances in Microbial Physiology", Rose, A. H. & Tempest, D. W. (ed.), Vol. 14, Academic Press, pág. 315-375 (1976).
120. Showe, M. K. & De Moss, J. A., J. Bacteriol. 95, N°4, 1305-1313 (1968).
121. Kiss, G. B.; Vincze, E.; Kalman, Z.; Forrai, T. & Kondorosi, A., J. Gen. Microbiol. 113, 105-118 (1979).
122. Sik, T. & Barabas, I., "Recent Developments in Nitrogen Fixation", Newton, W.; Postgate, J. R. & Rodríguez-Barrueco, C. (ed.), Academic Press, pág. 365-373 (1977).