

Prof. T-11-13

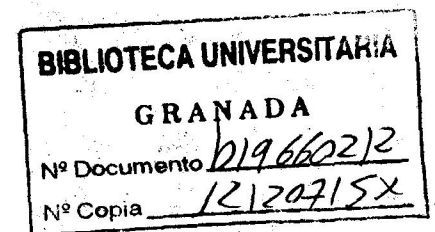
T  
14  
20

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha 20 SET, 1990  
ENTRADA NUM. 1329

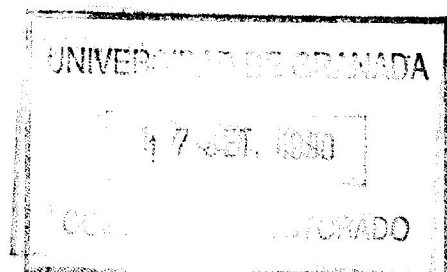
METABOLISMO DEL NITRATO EN CEPAS HIDROGENASA  
POSITIVAS (HUP<sup>+</sup>) E HIDROGENASA NEGATIVAS (HUP<sup>-</sup>)  
DE *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*. UTILIZACION DE  
NITRATO Y ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN  
(*BRADY*)RHIZOBIUM.

María Jesús Delgado Igeño



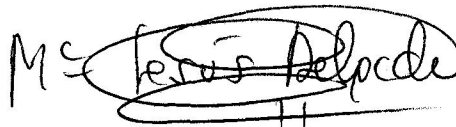
UNIVERSIDAD DE GRANADA

1990




METABOLISMO DEL NITRATO EN CEPAS HIDROGENASA  
POSITIVAS (HUP<sup>+</sup>) E HIDROGENASA NEGATIVAS (HUP<sup>-</sup>)  
DE *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*. UTILIZACION DE  
NITRATO Y ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN  
(*BRADY*)RHIZOBIUM.

Memoria que presenta la Licenciada en  
Ciencias Biológicas Dña. MARIA JESUS  
DELGADO IGEÑO, para aspirar al grado  
de Doctor.



Fdo. María Jesús Delgado Igeño

VO BQ  
El director



Fdo. Eulogio J. Bedmar Gómez  
Doctor en Ciencias Biológicas  
Investigador Científico del C.S.I.C.

Esta tesis ha sido realizada en  
la U. E. I. de Microbiología de  
la Estación Experimental del  
Zaidín (C.S.I.C.) de Granada.

Al finalizar esta tesis doctoral, deseo expresar mi agradecimiento a aquellas personas e instituciones que han contribuido a su realización.

Al Ministerio de Educación y Ciencia, que me concedió la beca predoctoral, y subvencionó mi estancia durante tres meses en el I.N.R.A. (Montpellier) Francia, donde, bajo la dirección del Dr. J. J. Drevon, se llevaron a cabo los trabajos relacionados con la desnitrificación en *Bradyrhizobium japonicum*.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Eulogio J. Bedmar Gómez, director de esta tesis, por su consejo y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

Igualmente, al Jefe del Departamento de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín, D. José Olivares Pascual, y a mi tutor D. Francisco Liger Liger les agradezco sus esfuerzos para facilitar la realización de este trabajo.

A D. Manuel Martínez por su labor de delineación y a J. Antonio Miquel por su ayuda en la mecanografía.

A Amparo Vivó por su ayuda en el trabajo de microscopía electrónica.

Finalmente, mi agradecimiento a todos los compañeros del Departamento de Microbiología, especialmente a Manuel Fernández, por su colaboración y apoyo.

A mis padres  
y a Paco.

## INTRODUCCION

1. Aspectos generales de la fijación de nitrógeno.....	1
2. Producción de hidrógeno catalizada por la nitrogenasa.....	12
3. Oxidación de hidrógeno en nódulos de leguminosas.....	14
4. Características del sistema de oxidación de hidrógeno	
4.1. Características bioquímicas.....	15
4.2. Características genéticas.....	19
5. Regulación de la expresión de la actividad hidrogenasa	
5.1. Regulación en células cultivadas en vida libre....	21
5.2. Regulación en bacteroides.....	24
6. Beneficios potenciales del sistema de oxidación de hidrógeno en ( <i>Brady</i> ) <i>rhizobium</i> .....	25
7. Utilización de nitrógeno inorgánico por las leguminosas.....	31
8. Inhibición de la fijación de nitrógeno por nitrato	
8.1. Inhibición del proceso de infección.....	33
8.2. Disminución en el suministro de fotosintato a los nódulos.....	34
8.3. Inhibición debida al nitrito.....	35
8.4. Transporte.....	37
8.5. Resistencia a la difusión del oxígeno.....	38
9. Asimilación del nitrato por los nódulos de las leguminosas.....	41
10. Asimilación del nitrato en el citosol y bacteroides de los nódulos.....	44
10.1. Nitrato reductasa y nitrito reductasa del citosol.....	45
10.2. Nitrato reductasa y nitrito reductasa de los bacteroides.....	46

11. Respiración, reducción desasimilatoria y desnitrificación del nitrato.....	49
---	----

## OBJETIVOS DE LA TESIS

## MATERIAL Y METODOS

1. Material biológico	
1.1. Bacterias.....	57
1.2. Material vegetal.....	58
2. Medios de cultivo	
2.1. Medios.....	58
2.2. Antibióticos.....	60
3. Crecimiento de plantas en condiciones bacteriológicamente controladas	
3.1. Esterilización de semillas y germinación.....	61
3.2. Soluciones nutritivas para cultivo de plantas.....	61
3.3. Cultivo de plantas.....	63
4. Cultivo de células en vida libre de <i>B. japonicum</i> .....	65
5. Aislamiento de bacteroides y citosol de los nódulos..	66
5.1. Aislamiento de bacterias, bacterias en transformación y bacteroides de la fracción bacteroidal de los nódulos.....	68
6. Incubación y bacteroides en medio de inducción para estudios sobre el metabolismo del nitrato.....	69
7. Determinación de actividad nitrato reductasa en nódulos y raíces.....	70
8. Determinación de actividad nitrato reductasa (NR), nitrito reductasa (NiR) y contenido en nitrito del citosol	
8.1. Determinación de actividad NR.....	71
8.2. Determinación de actividad NiR.....	71
8.3. Determinación del contenido en nitrito del citosol.....	72

9.	Determinación de actividad NR y NiR en células en vida libre y bacteroides	
9.1.	Determinación de actividad NR.....	72
9.2.	Determinación de actividad NiR.....	73
10.	Determinación de la actividad desnitrificante en <i>B. japonicum</i>	
10.1.	Desnitrificación a nivel de planta	
10.1.1.	Producción de óxido nitroso por nódulos en sistema de flujo abierto.....	74
10.1.2.	Producción de óxido nitroso por nódulos en sistema de flujo cerrado.....	75
10.2.	Desnitrificación a nivel de bacteroide.....	75
11.	Determinación de nitrato, nitrito y proteínas	
11.1.	Determinación de nitrato.....	77
11.2.	Determinación de nitrito.....	78
11.3.	Determinación de proteínas	
11.3.1.	Método de Lowry modificado por Maxwell....	79
11.3.2.	Método de bradford.....	80
12.	Localización, purificación parcial y caracterización de la enzima nitrato reductasa	
12.1.	Localización de la NR. Aislamiento de la fracción soluble y de la fracción particulada de células en vida libre y bacteroides de <i>B. japonicum</i> .....	80
12.2.	Purificación parcial de la NR.....	82
12.2.1.	Precipitación con sulfato amónico.....	83
12.2.2.	Filtración en Sephacryl S-200.....	83
12.2.3.	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	84
12.2.4.	Detección de actividad NR en geles de poliacrilamida.....	86
12.2.5.	Detección de proteínas en geles de poliacrilamida.....	87
12.3.	Estudios de caracterización de la NR	
12.3.1.	Determinación del peso molecular de la NR mediante cromatografía	



de exclusión molecular.....	87
12.3.2. Determinación del peso molecular de la NR mediante electroforesis en gradiente de poliacrilamida.....	88
12.3.3. Cinética enzimática de la NR.....	89
12.3.4. Efecto de diversos reactivos sobre la actividadNR.....	90

## RESULTADOS

1. ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA DE CEPAS HIDROGENASA POSITIVAS E HIDROGENASA NEGATIVAS DE <i>B. JAPONICUM</i> CULTIVADAS EN VIDA LIBRE Y EN SIMBIOSIS CON PLANTAS DE SOJA	
1.1. Actividad NR en nódulos de plantas de soja.....	91
1.2. Actividad NR en células en vida libre y bacteroides.....	99
1.2.1. Actividad NR en el citosol y en las vesículas de membrana de células en vida libre y de bacteroides.....	103
1.3. Actividad desnitrificante en los nódulos de plantas de soja.....	108
1.4. Actividad desnitrificante en bacteroides.....	109
2. METABOLISMO DEL NITRATO EN EL CITOSOL Y EN LOS BACTEROIDES DE LOS NODULOS DE PLANTAS DE SOJA Y GUISANTE	
2.1. Actividad NR y NiR del citosol. Contenido en nitrito.....	114
2.2. Actividad NR y NiR de los bacteroides.....	116
2.3. Inducción de actividad NR en bacteroides de <i>R. leguminosarum</i> 3855. Utilización de nitrato y producción de nitrito.....	120
2.4. Actividad NR y NiR en bacteroides de <i>B. japonicum</i> L-236. Utilización de nitrato	

y producción de nitrito.....	122
2.5. Actividad NR en bacterias, bacterias en transformación y bacteroides.....	128
3. LOCALIZACION, PURIFICACION PARCIAL Y CARACTERIZACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE CELULAS EN VIDA LIBRE Y BACTEROIDES DE <i>B. JAPONICUM</i> L-236	
3.1. Localización de la actividad NR.....	133
3.2. Purificación parcial de la NR de las vesículas de membrana de las células.....	136
3.3. Purificación parcial de la NR de la fracción soluble de las células.....	137
3.4. Caracterización de la NR del citosol y de las vesículas de membrana	
3.4.1. Determinación del peso molecular mediante cromatografía en SephacrylS-200.....	147
3.4.2. Determinación del peso molecular mediante electroforesis en geles depoliacrilamida.....	147
3.4.3. Estudios de cinética enzimática	
3.4.3.1. Cinética enzimática en función del tiempo de incubación.....	153
3.4.3.2. Cinética enzimática en función de la concentración de nitrato.....	153
3.4.4. Efecto de diferentes inhibidores enzimáticos.....	160

## DISCUSION

1. Estudio de la relación entre la actividad hidrogenasa y la actividad nitrato reductasa en <i>B. japonicum</i> ....	166
2. Estudio del metabolismo del nitrato en el citosol y en los bacteroides de los nódulos formados por	

*B. japonicum* L-236 y *R. leguminosarum* 3855.....176

3. Localización, purificación parcial y caracterización de la nitrato reductasa de células en vida libre y bacteroides de *B. japonicum*.....186

**CONCLUSIONES**

**BIBLIOGRAFIA**

# INTRODUCCION

## 1. ASPECTOS GENERALES DE LA FIJACION DE NITROGENO

La mayoría de los elementos químicos que intervienen en la composición de los seres vivos, tales como el carbono (C), nitrógeno (N), oxígeno (O<sub>2</sub>) y azufre (S) están sometidos a procesos cíclicos por los cuales se renuevan continuamente. De estos ciclos, el del N es el más importante tanto desde un punto de vista ecológico como económico y biológico. Esto se debe a la incidencia del N en la contaminación de suelos, agua y aire, a que es, con la excepción del agua, el nutriente limitante más común en la práctica de la agricultura y a que forma parte de moléculas esenciales para la vida como las proteínas y los ácidos nucleicos.

En el ciclo del N en la biosfera, una de cuyas representaciones se indica de forma esquemática en la Fig. 1, el proceso de fijación biológica es fundamental, ya que en su ausencia la desnitrificación agotaría las reservas de nitrógeno inorgánico del suelo. Por otra parte, a pesar de su abundancia en la atmósfera (78%), la molécula de dinitrógeno (N<sub>2</sub>) es químicamente muy estable y asimilable por las plantas y animales sólo en forma reducida, inorgánica para las primeras y orgánica para los segundos.

La fijación biológica de N<sub>2</sub>, esto es la reducción de N<sub>2</sub> a amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), es el proceso que inicia la utilización de N<sub>2</sub> por microorganismos, plantas y animales, calculándose en 2 x 10<sup>8</sup> Tm la cantidad anual de N que este proceso es capaz de producir (Postgate, 1987).

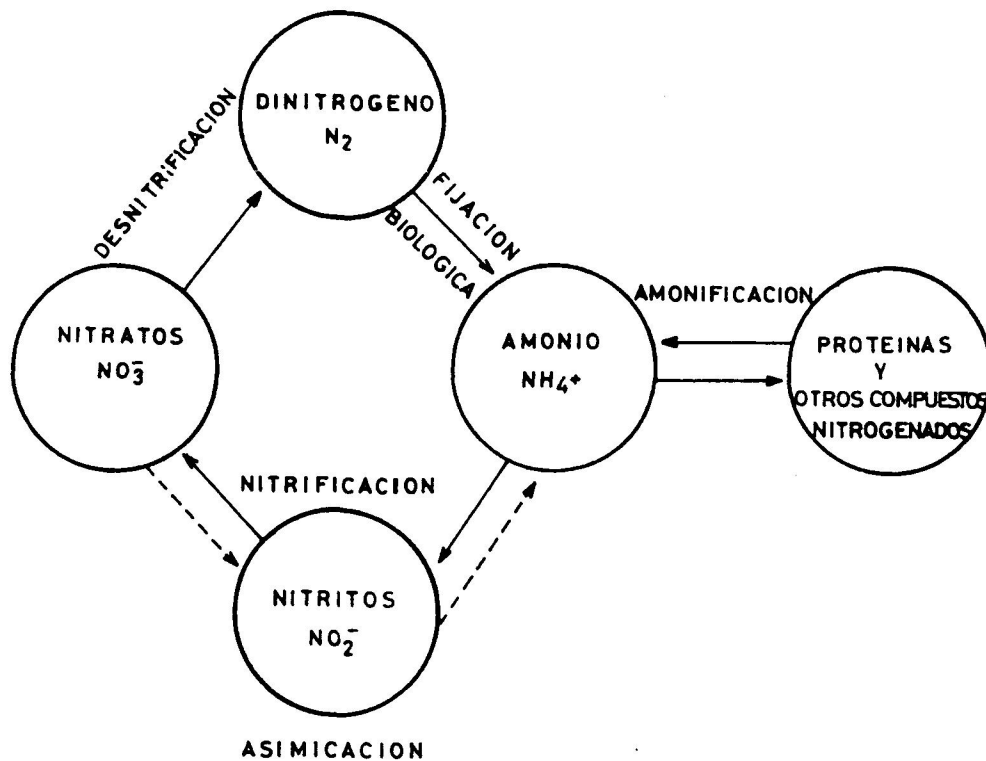


Figura 1. Representación esquemática del ciclo del N en la biosfera

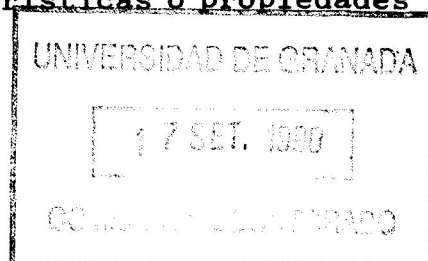
Aunque los microorganismos fijadores de  $N_2$  se han considerado habitualmente como procariotas (Postgate, 1982), actualmente se tiende a su división en dos reinos: procariotas y arqueobacterias (también conocidas como metabacterias) (Stackebrandt y Woese, 1984; Sprent, 1987). En general, todos ellos se pueden clasificar en dos grandes grupos: los fijadores en vida libre y los que establecen simbiosos mutualistas fijadoras de  $N_2$  con plantas.

La sospecha sobre la existencia de sistemas simbióticos fijadores de  $N_2$ , en los que algunos microorganismos realizan este proceso en asociación con las raíces de las plantas, se remonta a 1587 cuando Dalechamps menciona la

presencia de nódulos en raíces de *Ornithopus*. Aunque una segunda referencia sobre el tema se debe a Davy a principios del siglo XIX, fue en los años 1886-1888 cuando Hellriegel y Wilfarth demostraron claramente la ocurrencia de este fenómeno. Simultáneamente, Beijerinck (1888), siguiendo los postulados de Koch, confirmó que los nódulos de diferentes leguminosas eran producidos por bacterias.

La fijación simbiótica de  $N_2$  alcanza su culminación en eficiencia y magnitud en los nódulos de las raíces de las leguminosas. Según Polhill y Raven (1981), la familia *Leguminosaceae* (*Fabaceae*) incluye alrededor de 750 géneros y 20000 especies que se clasifican en tres subfamilias: *Papilinoideae* (*Faboideae*), *Mimosoideae* y *Caesalpinoideae*. Entre el 80% y el 90% de las especies de la *Papilionaceae* forman nódulos, mientras que sólo un 25% de la *Mimosoideae* y un 3% de la *Caesalpinoidea* son capaces de establecer simbiosis fijadoras de  $N_2$ . En la mayoría de los casos la nodulación ocurre en la raíz, excepto en *Sesbania*, *Aeschynomene* y *Neptunia* que pueden formar nódulos tanto en la raíz como en el tallo (Dreyfus et al. 1984).

Las bacterias que forman simbiosis fijadoras de  $N_2$  con las plantas leguminosas pertenecen a la familia *Rhizobiaceae*. Estas bacterias son capaces de infectar las células corticales de las raíces de las leguminosas, dar lugar a la formación de nódulos y transformarse en células especializadas llamadas bacteroides, que son las encargadas de reducir el  $N_2$  a  $NH_4^+$ . Hasta llegar a este punto se suceden una serie de etapas en las que, de una manera más o menos específica, interaccionan microbio y planta induciendo mutuamente la expresión fenotípica del carácter que corresponde a cada momento. Este conjunto de etapas se puede resumir en las llamadas características o propiedades



simbióticas: especificidad, infectividad y efectividad. Una incorrecta comunicación bacteria-planta, en cualquier etapa, puede llevar a la detención y aborto del proceso simbiótico de fijación de N<sub>2</sub>.

La especificidad de la asociación bacteria-leguminosa se utilizó para la clasificación en especies del género inicial, *Rhizobium*, en función de la leguminosa a la que era capaz de infectar, estableciéndose así los llamados grupos de inoculación cruzada (Jordan y Allen, 1974).

La clasificación actual, basada además del hospedador en otras características tales como homología de ADN, perfil de proteínas, presencia de polisacáridos, fagotipo, serotipo, utilización de azúcares y aminoácidos (Jordan, 1984; Scholl y Elkan, 1984; Dreyfus et al. 1988; Chen et al. 1988), establece 4 géneros:

- *Rhizobium*. Incluye tres especies de rápido crecimiento:

1. *R. meliloti*, que forma simbiosis con *Medicago*,  
*Melilotus* y *Trigonella*.

2. *R. leguminosarum*, que agrupa tres biovariedades:

biovar. *viceae*, nodula *Pisum*, *Lens* y *Vicia*

biovar. *phaseoli*, nodula *Phaseolus*

biovar. *trifolii*, nodula *Trifolium*

3. *R. loti*, nodula *Lotus*

- *Bradyrhizobium*, con la especie *B. japonicum* que incluye las especies de lento crecimiento que nodulan *Glycine* y *Lupinus*.



- *Azorhizobium*, con la especie *A. caulinodans* que forma nódulos fijadores en raíz y tallo de *Sesbania rostrata*.
- *Sinorhizobium*, género propuesto para la antigua especie *R. fredii*, que agrupa bacterias de rápido crecimiento capaces de nodular *Glycine*. Este nuevo género incluye las especies *S. fredii* y *S. xinjiangensis*.

Las bacterias que no pueden incluirse claramente en ninguno de los géneros definidos se denominan, en general, *Rhizobium* sp. o *Bradyrhizobium* sp., seguido del nombre latino de la especie de leguminosa, entre paréntesis, con la que se asocian. Los términos rápido y lento crecimiento aluden a la velocidad (tiempo de generación) con la que estos microorganismos crecen en medios definidos de laboratorio que contengan sales minerales, vitaminas y extracto de levadura. De ahora en adelante usaremos el término (*Brady*)*rhizobium* para referirnos, en conjunto, a los dos géneros más conocidos de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

Dentro de la familia *Rhizobiaceae* se incluye también el género *Agrobacterium* que forma asociaciones no mutualistas con plantas dicotiledóneas. *A. tumefaciens* y *A. rubi* forman tumores en las raíces y *A. rhizogenes* provoca la proliferación de raíces adventicias y la enfermedad de las raíces secundarias.

Hasta el momento se ha descrito la existencia de un sólo caso en que un *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) es capaz de infectar una planta tropical no leguminosa del género *Parasponia* (Trinik, 1973).

Hasta 1975 era generalizada la creencia de que las bacterias de los géneros (*Brady*)*rhizobium* sólo podían fijar  $N_2$  en estado simbiótico, esto es, era necesaria la íntima asociación bacteria-planta para que el proceso tuviera lugar. Este dogma se derrumbó cuando se demostró que la cepa 32H1 de *Bradyrhizobium sp. (Vigna)* era capaz de fijar  $N_2$  ex-planta (Kurz y La Rue, 1975; McComb et al. 1975; Pagan et al. 1975). Hoy día se sabe que la habilidad de fijar  $N_2$  en ausencia de la planta hospedadora está restringida a las especies de lento crecimiento y que este fenómeno se puede poner de manifiesto cultivando especies de *Bradyrhizobium* en condiciones microaerofílicas y en presencia de pequeñas cantidades de nitrógeno combinado.

La capacidad de fijar  $N_2$  se debe a la actividad de un complejo enzimático llamado nitrogenasa, cuya estructura, composición y propiedades son similares en todas las especies de las que se ha aislado. El complejo enzimático de la nitrogenasa se compone de dos proteínas: molibdoferroproteína (componente I o nitrogenasa) y ferroproteína (componente II o nitrogenasa reductasa). Separados el uno del otro, ningún componente es activo por sí mismo. En algunas especies de *Azotobacter* se ha demostrado la existencia de una nitrogenasa alternativa que consta también de dos unidades, de las cuales el componente I contiene vanadio en vez de Mo (Bishop et al., 1980; Robson et al., 1986; Bishop et al. 1988). También se ha descrito la existencia de otra nitrogenasa en la que el Fe es el único metal que forma parte del centro activo (Bishop et al. 1988; Bishop, 1990). El flujo de electrones a través de la nitrogenasa se representa esquemáticamente en la Fig. 2.

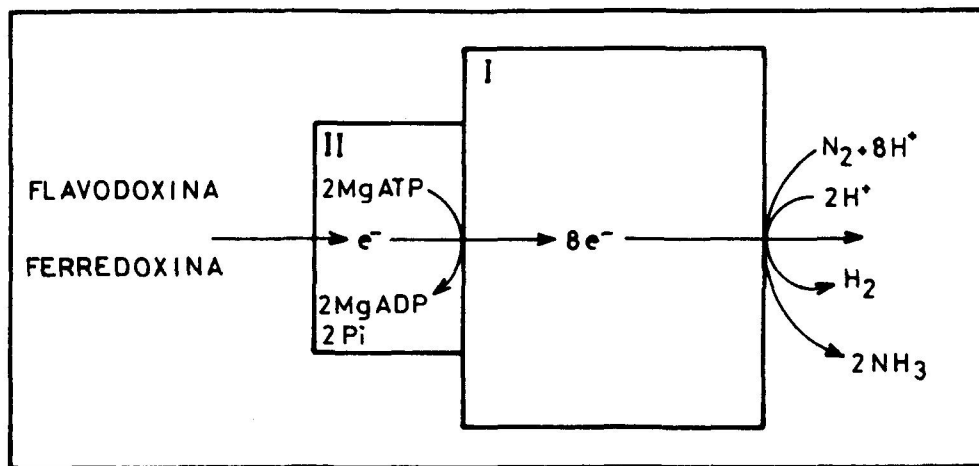


Figura 2. Representación esquemática del flujo de electrones a través de la nitrogenasa.

La capacidad de un microorganismo para fijar  $N_2$  se debe a la presencia y expresión de los llamados genes *nif*. El estudio de estos genes se ha realizado fundamentalmente en *Klebsiella pneumoniae* que ha servido como modelo para el estudio de los genes *nif* en el resto de diazotrofos. En *K. pneumoniae* se han identificado entre 20 y 21 genes *nif* que se agrupan en 7-8 operones adyacentes a un fragmento de ADN de aproximadamente 23 Kilobases situado en el cromosoma junto a los genes para la biosíntesis de histidina (Merrick, 1988; Arnold et al. 1988). En (*Brady*)*rhizobium*, además de los genes *nif*, se han caracterizado otros genes necesarios para la fijación simbiótica de  $N_2$  que no presentan homología con los genes *nif*. Tal es el caso de los genes integrados en el operón *fix ABCX* (Earl et al. 1987), de los que se especula puedan constituir una cadena de transporte electrónico para la nitrogenasa (Earl et al. 1987; Gubler y Hennecke, 1986; Evans et al. 1988).

En la mayoría de las bacterias del género *Rhizobium*, los genes *nif* y *fix* se localizan en plásmidos de elevado peso molecular, llamados pSym, junto a otros muchos genes implicados en el proceso de infección y nodulación del correspondiente hospedador. No ocurre así en *Bradyrhizobium*, donde todos estos los genes tienen localización cromosómica.

En *K. pneumoniae* la regulación de los genes *nif* se realiza por un sistema central llamado *ntr* que está compuesto por los genes *ntrA*, *ntrB* y *ntrC*. En condiciones de limitación de amonio, NtrC y NtrA activan la transcripción del operón *nifLA* y, a su vez, NifA y NtrA activan la transcripción del resto de los genes *nif*. Cuando la concentración intracelular de amonio es elevada, o en la presencia de altos niveles de O<sub>2</sub>, el producto del gen *nifL* reprime la función activadora de NifA y cesa la fijación de N<sub>2</sub>.

En los bacteroides de (*Brady*)*rhizobium* la regulación de los genes *nif* no parece depender de los niveles celulares de N<sub>2</sub> fijado, lo que es lógico si se considera que la síntesis de amonio está desreprimida en los bacteroides. En simbiosis, se ha demostrado que la activación de *nifA* se produce en respuesta a bajas concentraciones de O<sub>2</sub> (≈1%) (Ditta et al. 1987; Virts et al. 1988) y se han identificado dos genes, *fixL* y *fixJ* a los que se les considera responsables de la activación del promotor del gen *nifA* de *R. meliloti* (David et al. 1988). En *B. japonicum*, *nifA* se expresa aeróbicamente, si bien la proteína es inactiva en presencia de altos niveles de O<sub>2</sub> (Thöny et al. 1987).

Bergersen y Turner (1967) demostraron que la fijación de N<sub>2</sub>, y por lo tanto la formación de amonio, tenía lugar

en los bacteroides. El amonio es, a su vez, el componente inicial a partir del cual se van a formar los compuestos nitrogenados esenciales para el crecimiento, funcionamiento y desarrollo de las plantas. Del amonio formado, más del 95% se excreta al citosol, utilizandose el restante en los bacteroides para formar compuestos nitrogenados no proteicos. En el citosol existen dos posibles rutas para la asimilación del amonio. La primera implica la aminación de un cetoácido catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), que utiliza NAD(P)H y conduce a la formación de glutamato. En la segunda ruta intervienen dos enzimas. La primera, la glutamina sintasa (GS), cataliza la incorporación del amonio en la posición amida del glutamato para formar glutamina y requiere ATP. La segunda enzima, la glutamato sintasa (GOGAT), es la encargada de transferir el grupo amino-amido de la glutamina a la posición alfa del ácido cetoglutárico. Esta reacción utiliza NAD(P)H o ferredoxina reducida y lleva a la formación de dos moléculas de glutamato. La enzima glutamato sintasa es también conocida con el nombre de glutamina oxoglutarato aminotransferasa.

El empleo de  $^{13}\text{N}$  (Meeks et al. 1978) y  $^{15}\text{N}$  (Oyhama y Kumazawa, 1980), así como la utilización de inhibidores, fundamentalmente la metionina sulfoximida que inhibe a la glutamina sintetasa, y la azaserina que inhibe a la glutamato sintasa, indican que el sistema GS/GOGAT es la vía fundamental de asimilación del amonio en nódulos, y que la glutamina es el primer producto orgánico que se forma en el proceso de asimilación. Una característica de esta ruta metabólica es su naturaleza cíclica, en la cual el glutamato actúa como aceptor de amonio y como producto final de su asimilación (Mifflin y Lea, 1980).

En términos energéticos, la única diferencia entre el sistema GS/GOGAT y la GDH es que el primero utiliza ATP, lo que supone un gasto de energía. Se considera, sin embargo, que esta energía es necesaria para mantener el amonio en niveles muy bajos. De hecho, la GDH tiene mucha menor afinidad ( $K_m$  entre 4 y 10 mM) por el amonio que la GS ( $K_m$  entre 0.02 y 0.05 mM) (Gallon y Chaplin, 1986).

A partir del glutamato, en el citosol del nódulo se van a originar diversos compuestos orgánicos nitrogenados. De acuerdo con la composición de estos compuestos, las leguminosas se pueden clasificar en dos grandes grupos: a) las que producen amidas: glutamina, asparragina y 4-metil-N-glutamina y b) las productoras de ureidos: alantoína, ácido alantoico y citrulína. Es interesante destacar que las leguminosas propias de climas templados o fríos (alfalfa, guisante, trébol, haba, etc.) son productoras de amidas, mientras que las de climas tropicales (soja, cowpea, judía, etc.) producen ureidos.

Aunque los productos indicados anteriormente son las formas nitrogenadas predominantes en el xilema de las leguminosas correspondientes, otras proteínas y aminoácidos no proteicos pueden estar presentes en la savia, aunque en proporciones mucho menores (Herridge et al. 1978; Cooker y Schubert, 1981; Pate y Atkins, 1983). Igualmente, bajos niveles de alantoína y ácido alantoico se pueden encontrar en plantas productoras de amidas, y algunas amidas suelen estar presentes en el xilema de las leguminosas tropicales. Las cantidades absolutas y las proporciones relativas de estos productos pueden variar, además, con las condiciones ambientales y de desarrollo (Israel y McClure, 1980; Pate et al. 1980; Patterson y LaRue, 1983). La razón por la que unas leguminosas producen amidas y otras ureidos es todavía

objeto de controversia, aunque se ha sugerido que tal diferencia puede deberse a la eficiencia en la utilización del agua ya que, la mayor solubilidad en agua de las amidas respecto a los ureidos representa una ventaja en los climas templados o en las zonas áridas. De manera similar, se puede entender que la producción de ureidos quede restringida a las zonas tropicales, donde el agua es más abundante.

Por otra parte, los ureidos son formas más eficientes y económicas para el transporte del N ya que si se calcula el número de átomos de C que intervienen en la formación de estos compuestos, se puede concluir una relación de 4 C/4 N para los ureidos y 4 C/2 N para las amidas (concretamente la asparragina). Igualmente, se ha calculado que el número de moles de ATP que se requieren para la asimilación de un mol de  $\text{NH}_4^+$  en la forma de ureido es de 8.5, mientras que se necesitan 15.5 moles de ATP cuando el  $\text{NH}_4^+$  se asimila en forma de asparragina (Dixon y Weeler, 1986). En contra de esta aparente ventaja de la síntesis de ureidos sobre la de amidas, está el hecho de que cuando estas moléculas se emplean en la síntesis de proteínas, los grupos amino y amido, así como, los esqueletos carbonados de las amidas pueden ser incorporados directamente para la formación de proteínas, mientras que las moléculas de ureidos han de ser degradadas previamente.

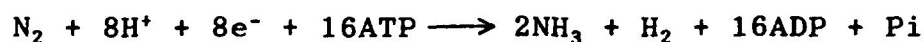
En cualquier caso, el coste metabólico para la síntesis de amidas y ureidos a partir del amonio formado, parece representar tan sólo una pequeña parte del total del coste energético necesario para el proceso global de la fijación de  $\text{N}_2$  (Schubert, 1986).

## 2. PRODUCCION DE HIDROGENO CATALIZADA POR LA NITROGENASA

En una atmósfera de nitrógeno, la nitrogenasa de todos los organismos de los que se ha aislado reduce protones ( $H^+$ ) a hidrógeno ( $H_2$ ) de forma simultánea a la reducción de  $N_2$  a  $NH_3$ . Bulen y LaCompte (1966) descubrieron este hecho por primera vez en extractos de *Azotobacter* y demostraron que el proceso es dependiente de ATP.

La reducción de  $H^+$  por la nitrogenasa es un hecho inevitable ya que incluso bajo una presión de 50 atmósferas de  $N_2$ , la nitrogenasa aún produce  $H_2$  (Simpson y Burris, 1984). El mecanismo más aceptado para explicar la producción de  $H_2$  concomitante a la fijación de  $N_2$  fue propuesto inicialmente por Chatt (1980) y revisado posteriormente por Thorneley y Lowe (1982) y Eisbrenner y Evans (1983). En el modelo citado, los dos componentes de la nitrogenasa se asocian y se disocian cada vez que se transfiere un electrón de la Fe-proteína a la MoFe-proteína. La transferencia sucesiva de 3 electrones y 3 protones a la MoFe-proteína generaría un trihidruro ligado a Mo, con pasos intermedios de mono y dihidruro. El  $N_2$  desplazaría dos átomos de hidrógeno del trihidruro, recibiendo posteriormente, en ciclos sucesivos, los 5 electrones restantes necesarios para su conversión en  $NH_3$ .

El modelo descrito predice la estequiometría de 1 mol de  $H_2$  producido por mol de  $N_2$  fijado, lo que está de acuerdo con la ecuación general propuesta para la fijación de  $N_2$ :



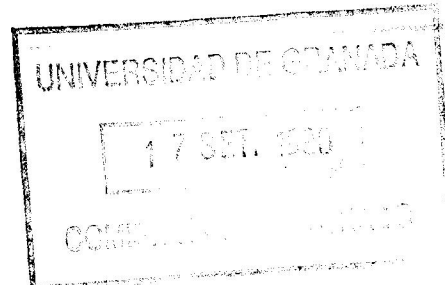


Esta ecuación implica que el 25% de la energía que se emplea en la fijación de  $N_2$  se consume en generar  $H_2$ , lo que supone una importante fuente de ineficiencia de la nitrogenasa.

La distribución de electrones hacia  $N_2$  o  $H^+$  está condicionada por factores tales como la temperatura (Hwang y Burris, 1972), la proporción de los dos componentes de la nitrogenasa (Hageman y Burris, 1980) y la relación ATP/ADP (Hageman et al. 1980). Estas variables, junto con el nivel de compuestos reducidos que llegan a la nitrogenasa, afectan a la capacidad de reciclaje de la MoFe-proteína, lo que influye directamente en la cesión de electrones a los sustratos.

La producción de  $H_2$  por los nódulos se descubrió por primera vez en soja (Hoch et al. 1957) y, posteriormente, se observó en otras leguminosas (Bergersen, 1962). Hoy día se calcula, a nivel mundial, que la cantidad de  $H_2$  que las leguminosas noduladas aportan a la atmósfera es de un millón de toneladas por año (Conrad y Seiler, 1980).

Schubert y Evans (1976) diseñaron un método para estimar la proporción del flujo de electrones que se utiliza para reducir  $N_2$ , basado en las siguientes observaciones: a) en presencia de concentraciones saturantes de  $C_2H_2$  no hay producción de  $H_2$  y, por lo tanto, el flujo de electrones a través de la nitrogenasa viene dado por la velocidad de reducción de acetileno ( $C_2H_2$ ) a etileno ( $C_2H_4$ ); b) en atmósfera de  $N_2$  el flujo de electrones se reparte entre  $N_2$  y  $H^+$  y c) en atmósfera de Argon, el flujo de electrones es proporcional al nivel de reducción de  $C_2H_2$ . Estos conceptos permitieron definir el parámetro llamado eficiencia relativa (ER) como medida para estimar la capacidad energética



relativa con la que se realiza la fijación de N<sub>2</sub>:

$$ER = 1 - \frac{H_2 \text{ (Producido en atmósfera de aire)}}{C_2H_4 \text{ (Producido en atmósfera de acetileno)}}$$

Utilizando esta fórmula, Schubert y Evans (1976) determinaron la eficiencia relativa de 77 asociaciones de (*Brady*)*rhizobium*-leguminosa, estableciendo que la ER media de las distintas cepas utilizadas era de 0.56, lo que equivalía a unas pérdidas medias del 44% de los electrones disponibles para la nitrogenasa. Actualmente, se considera que estas pérdidas oscilan entre el 0 y 60% (Evans et al. 1981).

### 3. OXIDACION DE HIDROGENO EN NODULOS DE LEGUMINOSAS

La existencia de nódulos con elevada eficiencia relativa fue lo que hizo pensar en la presencia de un sistema enzimático con actividad hidrogenasa (sistema Hup) capaz de reciclar parcial o totalmente el H<sub>2</sub> producido por la nitrogenasa.

La existencia de un sistema capaz de oxidar H<sub>2</sub> en nódulos de leguminosas fue observada inicialmente por Phelps y Wilson (1941) en guisante. Estas observaciones fueron confirmadas por Dixon (1967) quien demostró que la actividad de consumo de H<sub>2</sub> se localizaba en los bacteroides (Dixon, 1968). Desde entonces, se han analizado muchas cepas de (*Brady*)*rhizobium* con el fin de determinar la presencia o ausencia de hidrogenasa. Los resultados de estos ensayos se han recopilado en distintas revisiones

(Evans et al. 1981; Eisbrenner y Evans, 1983; Brewin, 1984; Evans et al. 1985, 1987), y de ellos es de destacar la baja frecuencia de cepas que poseen el sistema hidrogenasa. Ninguna de las cepas de *R. trifolii* y *R. meliloti* analizadas y sólo el 10% de las cepas de *R. leguminosarum* expresan actividad hidrogenasa. Tampoco se ha detectado actividad Hup en *R. loti* (Monza et al. 1989) ni en *Rhizobium sp. (Cicer)* (Minguez y Ruiz Argüeso, 1980). En *R. phaseoli* se ha descrito la existencia de cepas con alta eficiencia relativa (Hungria y Neves, 1986). La presencia de actividad hidrogenasa está más extendida en las especies de lento crecimiento, ya que el 25% de las cepas de *B. japonicum* y el 80% de las de *Bradyrhizobium sp. (Vigna)* analizadas poseen un sistema de oxidación de H<sub>2</sub>, que en la mayoría de los casos es capaz de reciclar todo el H<sub>2</sub> producido por la nitrogenasa. También se han descrito cepas de *Bradyrhobium sp. (Lupinus)* con elevada actividad hidrogenasa en nódulos de altramúz (Murillo et al. 1989) y en la cepa ORS571 de *Azorhizobium caulinodans* (Stam et al. 1984).

#### 4. CARACTERISTICAS DEL SISTEMA DE OXIDACION DE HIDROGENO

##### 4.1. Características bioquímicas

Las hidrogenasas son enzimas que catalizan la activación reversible del hidrógeno molecular, según la reacción:



Estas enzimas pueden clasificarse en dos grupos: 1. Hidrogenasas solubles en el citoplasma, de actividad catalítica bidireccional y, en general, implicadas en la liberación de poder reductor durante procesos fermentativos. 2. Hidrogenasas ligadas a membrana, con actividad consumidora de H<sub>2</sub> e implicadas en la generación de energía.

El sistema de oxidación de H<sub>2</sub> de (*Brady*)*rhizobium* se ha estudiado fundamentalmente en *B. japonicum*, purificandose a partir de bacteroides (Arp y Burris, 1979), de células vegetativas cultivadas autotróficamente (Harker et al. 1984) y de mutantes con actividad hidrogenasa constitutiva (Stults et al. 1986). De los resultados de estos autores, revisados por Evans et al. (1987) y O'Brian y Maier (1989), se puede concluir que la hidrogenasa de *B. japonicum* consta de dos subunidades de tamaños moleculares 63 y 33 Kd, presentes en relación molar 1:1 y antigénicamente diferentes. La enzima contiene Fe, Se y Ni, está ligada a membrana y es estable frente al oxígeno mientras se mantiene dicha unión, e inestable al solubilizarla.

El mecanismo de acción propuesto para la enzima es de tipo "ping-pong", con dos sitios activos diferentes para la activación reversible del H<sub>2</sub> y para la unión con el aceptor de electrones (Arp y Burris, 1981).

La oxidación de H<sub>2</sub> por la hidrogenasa de *B. japonicum* requiere la intervención de citocromos que puede compartir con los de la oxidación de los compuestos carbonados (Emerich et al. 1980; Eisbrenner y Evans, 1982). Los trabajos de O'Brian y Maier, (1982, 1983), revisados por Maier (1986) y O'Brian y Maier (1989) pusieron de manifiesto que los electrones procedentes de la oxidación del H<sub>2</sub> entran en la cadena transportadora a nivel de la ubiquinona, que los citocromos b y c estaban implicados en el

transporte y que los citocromos  $o$  y  $aa_3$  funcionan como oxidasas terminales. Por lo tanto, la oxidación de  $H_2$  puede acoplarse a la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa. Estos mismos autores (O'Brian y Maier, 1989), indicaron también que el transporte de electrones está ramificado en sus oxidasas terminales. Una de estas ramificaciones, en la que participa una citocromo  $c$  oxidasa (flavoproteína), parece estar desacoplada de la síntesis de ATP, siendo su función la de permitir un rápido, aunque ineficiente, consumo de  $O_2$ , que podría ser necesario para mantener las condiciones de microaerobiosis esenciales para la simbiosis. De hecho, el acoplamiento de la oxidación de  $H_2$  a la síntesis de ATP no es general en todas las cepas Hup<sup>+</sup> de (*Brady*)*rhizobium* (Nelson y Salminen, 1982).

Se ha indicado que el aceptor primario de electrones de la hidrogenasa es un citocromo específico (citocromo  $b_{559}$ , Eisbrenner y Evans, 1982; Eisbrenner et al. 1982). Otros autores, sin embargo, han presentado pruebas que indican que este componente del sistema de oxidación de  $H_2$  no existe ni en bacteroides ni en células cultivadas en vida libre que expresan actividad hidrogenasa constitutiva, por lo que sería la ubiquinona quien recibiría directamente los electrones de la hidrogenasa (O'Brian y Maier, 1985a, b). La discusión sobre la existencia o no de un transportador directamente relacionado con la hidrogenasa continua abierta (O'Brian y Maier, 1989).

Se dispone actualmente de una serie de mutantes alterados en la capacidad de oxidar hidrógeno (mutantes Hup<sup>-</sup>) que son de gran utilidad para el análisis de la bioquímica, regulación y genética de la oxidación de hidrógeno en (*Brady*)*rhizobium*. La mayoría de estos mutantes se han obtenido en *B. japonicum* por mutagénesis química con etil

metanosulfonato o por mutagénesis inducida por la inserción del transposón Tn5, y se han clasificado en siete tipos distintos en función de su fenotipo.

Los mutantes de la clase I oxidan H<sub>2</sub> sólo en presencia de aceptores artificiales de electrones, lo que parece indicar que están alterados en algún componente de la cadena de transporte de electrones. Sin embargo, la actividad hidrogenasa de estos mutantes se localiza en la fase soluble de extractos celulares (Maier, 1986), por lo que es más probable que en realidad sean deficientes en la incorporación de la hidrogenasa a la membrana.

La mayoría de los mutantes de la clase II, carecen de niveles detectables de las proteínas estructurales de la hidrogenasa, aunque no hay evidencia de que estén afectados directamente los genes estructurales de la enzima (O'Hara, 1984). Esto sugiere que estos mutantes están afectados en genes implicados en la regulación de la síntesis de las proteínas estructurales.

Los mutantes de la clase III, están afectados simultáneamente en los mecanismos de regulación de la actividad hidrogenasa por oxígeno y sustratos carbonados, lo que indica que ambos mecanismos comparten, al menos, un elemento común.

La existencia de mutantes de la clase IV, sugiere la posibilidad de que la actividad hidrogenasa se incremente por la presencia de algún lípido específico asociado con la hidrogenasa (Moshiri y Maier, 1983), ya que dicho lípido puede ser sustituido por detergente en las preparaciones purificadas del enzima que conservan la actividad enzimática (Maier, 1986).

Los mutantes Nif<sup>-</sup> Hup<sup>-</sup> de la clase V, indican que existe algún punto de regulación común en la síntesis de tres proteínas: la hidrogenasa y los dos componentes de la nitrogenasa. Alternativamente, el mutante podría estar afectado en algún componente que fuera común a las dos enzimas, como los agregados Fe-S (Maier, 1986).

El transporte de níquel, elemento constitutivo de la hidrogenasa, parece estar afectado en los mutantes de la clase VI. Stults et al. (1987) analizaron en detalle el transporte de níquel en *B. japonicum*, y concluyeron que dicho proceso depende de un transportador muy específico, no compartido por el Mg, y es independiente de ATP.

Los mutantes de fenotipo Hup<sup>c</sup> (clase VII), tienen actividad hidrogenasa constitutiva. La existencia de este tipo de mutaciones, que en algunos casos se han producido de forma espontánea (Graham et al. 1984), sugiere la existencia de un elemento genético que es clave para la expresión de todos los genes implicados en la oxidación de hidrógeno, y sobre el que probablemente actúen otros factores reguladores. O'Hara (1984) demostró la existencia de cinco polipéptidos en el mutante constitutivo que estaban ausentes en la cepa parental. Estas proteínas estarían implicadas en la regulación de la hidrogenasa, o serían correguladas con la misma, y no han sido aún caracterizadas con detalle.

#### 4.2. Características genéticas

En *R. leguminosarum*, los genes de oxidación de hidrógeno (*hup*) se localizan en plásmidos (Brewin et al. 1980). En

*B. japonicum*, la mayoría de las cepas Hup<sup>-</sup> contienen ADN plasmídico mientras que no se han detectado plásmidos en las cepas Hup<sup>+</sup>, por lo que los genes *hup* son de naturaleza cromosómica en estas cepas (Cantrell et al. 1982, 1983).

Los genes *hup* se aislaron por primera vez en *B. japonicum* a partir de una genoteca de la cepa 122DES (Cantrell et al. 1983). La capacidad de las cepas Hup<sup>+</sup> de inducir actividad hidrogenasa en vida libre facilitó la obtención de mutantes defectivos en la oxidación de hidrógeno y el aislamiento de los genes *hup* por complementación de dichos mutantes con genotecas genómicas. De esta forma, se aisló el cósmido recombinante pHU1 (Cantrell et al. 1983) que contenía una región de ADN de 15 kb esencial para el fenotipo Hup en simbiosis con soja (Haugland, 1984). Posteriormente, se identificó otro cósmido (pHU52), que contenía un fragmento de 5.5 kb adicional y contiguo al inserto de pHU1 que era esencial para la actividad hidrogenasa en células vegetativas (Lambert et al. 1985). Los genes estructurales de la hidrogenasa de *B. japonicum* se localizaron en un fragmento de 5.9 Kb que estaba presente tanto en el cósmido pHU1 como en el pHU52 (Zuber et al. 1986) y fueron posteriormente secuenciados (Sayavedra et al. 1988).

A diferencia de *B. japonicum*, las cepas Hup<sup>+</sup> de *R. leguminosarum* no expresan actividad hidrogenasa en vida libre, por lo que la caracterización de mutantes Hup<sup>-</sup> requiere la inoculación de las plantas hospedadoras adecuadas y la confirmación del fenotipo a nivel de bacteroide, en donde sí existe expresión de los genes *hup*. En todas las cepas Hup<sup>+</sup> de *R. leguminosarum* examinadas, los genes *hup* se localizan en el plásmido simbiótico (Kagan y Brewin, 1985; Leyva et al. 1987a). Aunque los primeros mutantes Hup<sup>-</sup> de



*R. leguminosarum* fueron obtenidos por Kagan y Brewin (1985), el aislamiento, caracterización y organización de los genes *hup* de *R. leguminosarum* lo han realizado Ruiz-Argüeso y colaboradores (Palacios et al. 1988; Leyva et al. 1987a, b, 1990). Estos autores demostraron que los genes *hup* se extienden a lo largo de un fragmento de 15 Kb insertado en el cósmido pAL618, aislado a partir de una genoteca de la cepa 128C53, y que tales genes se organizan en, al menos, seis unidades de transcripción, de las que sólo se conoce que la región I contiene la información genética necesaria para la síntesis de las dos subunidades de la hidrogenasa (Leyva et al. 1990; Ruiz-Argüeso et al. 1990).

## 5. REGULACION DE LA EXPRESION DE LA ACTIVIDAD HIDROGENASA

### 5.1. Regulación en células cultivadas en vida libre

La actividad hidrogenasa no se expresa en condiciones normales de cultivo de cepas de (*Brady*)*rhizobium*, expresión que sí es constitutiva en bacterias fijadoras libres de N<sub>2</sub> como *Azotobacter* (Partridge et al. 1980). En *B. japonicum*, sin embargo, es posible inducir la expresión de tal actividad en células vegetativas cuando se incuban heterótrofamente en una atmósfera de bajo nivel de O<sub>2</sub> y en condiciones limitantes de sustratos carbonados (Maier et al. 1978, 1979).

En *R. leguminosarum* no se han descrito las condiciones que permitan la desrepresión de los genes *hup* en vida libre, lo que sugiere la existencia de diferencias impor-

tantes en la regulación de los sistemas Hup de ambas especies.

Aunque durante mucho tiempo se ha considerado que los sustratos carbonados reprimían la actividad hidrogenasa en células vegetativas, se ha demostrado recientemente que esa represión era debida tanto a la eliminación del O<sub>2</sub> del medio de cultivo como a la acidificación del mismo producida por los compuestos resultantes del metabolismo de los sustratos carbonados (Van Berkum, 1987; Van Berkum y Maier, 1988). Sin embargo, el hecho de que mutantes que expresan actividad hidrogenasa de forma constitutiva también expresan de forma constitutiva actividad ribulosa 1-5 bifosfato carboxilasa, indica que la regulación de la hidrogenasa y el metabolismo del carbono están relacionados (Merberg y Maier, 1983).

Aunque en algunas bacterias oxidadoras de hidrógeno, como *Alcaligenes eutrophus*, la presencia de H<sub>2</sub> es necesaria para la inducción de actividad hidrogenasa (Friedrich et al. 1984), el hidrógeno no parece necesario para la desrepresión de los genes *hup* de *B. japonicum*, aunque sí tiene un cierto efecto estimulador. Dado que las condiciones de desrepresión de la hidrogenasa inducen también en algunas cepas de esta especie la expresión de actividad nitrogenasa, y consecuentemente la producción de hidrógeno, fue necesario utilizar inhibidores de la nitrogenasa para probar la independencia de la expresión del sistema Hup respecto de la presencia de H<sub>2</sub> (Graham et al. 1984).

Es posible que el sistema de oxidación de H<sub>2</sub> de *B. japonicum* esté sujeto a regulación por AMP cíclico (cAMP), ya que Lim y Shanmugan (1979) demostraron que la adición de cAMP eliminaba la represión de la expresión hidrogenasa

por malato, y que la inducción de actividad hidrogenasa estaba asociada con un incremento de diez veces de cAMP en los niveles intracelulares. Además, se ha comprobado que la represión de la hidrogenasa por algunos catabolitos estaba mediada por cAMP, así como, la existencia de una proteína de unión a este cAMP (Lim et al. 1980).

La actividad hidrogenasa de cultivos de *B. japonicum* incubados en condiciones de desrepresión de dicha enzima es dependiente de la presencia de pequeñas cantidades de níquel en el medio (Stults et al. 1986). Estos autores demostraron, además, que la cantidad de enzima sintetizado dependía también del mismo factor. Posteriormente, Maier et al. (1988) observaron que la presencia de los transcritos de mRNA correspondientes a los polipéptidos de la hidrogenasa se incrementaba en función de la presencia de níquel, indicando que la síntesis de ambas subunidades de la hidrogenasa está regulada por este elemento a nivel transcripcional.

Por otro lado, Moshiri y Maier (1988) indicaron la extrema sensibilidad de la subunidad de menor tamaño de la hidrogenasa de *B. japonicum* a la degradación por proteasas, por lo que sugirieron que uno de los posibles papeles del níquel en relación con la actividad hidrogenasa podría ser la estabilización del conjunto de las dos subunidades de la enzima. De esta forma, la subunidad de menor tamaño quedaría protegida de la degradación proteolítica e induciría la integración de la enzima en la membrana mediante el péptido señal presente en dicha subunidad pequeña.

La actividad hidrogenasa de *B. japonicum* se inhibe específicamente por los inhibidores de DNA girasa, novobio-

cina, coumermicina y ácido nalidíxico (Novak y Maier, 1987). Puesto que la actividad hidrogenasa de un mutante Hup<sup>c</sup> constitutivo, insensible a la represión por O<sub>2</sub>, presenta una menor sensibilidad a los inhibidores de girasa, se refuerza la hipótesis que establece una relación entre la regulación por oxígeno y la actividad de la girasa (Maier et al. 1988).

## 5.2. Regulación en bacteroides

Las condiciones que existen en los nódulos de las leguminosas, que incluyen microaerobiosis y aporte controlado de fuentes carbonadas de la planta, inducen la expresión de la actividad hidrogenasa en los bacteroides. Esta expresión está regulada por una serie de factores entre los cuales se incluyen: edad de la planta (Bethlenfalvay y Phillips, 1979), nivel de iluminación (Bethlenfalvay y Phillips, 1979; Sheikholeslam et al. 1980) y concentración de Na<sup>+</sup> en la solución nutritiva (Kapulnik y Phillips, 1986).

Hay que destacar que la expresión de la capacidad de oxidar hidrógeno por los bacteroides está fuertemente influenciada por la especie de la leguminosa hospedadora. Dixon (1972) demostró que una misma cepa de *R. leguminosarum* expresaba actividades hidrogenasas alta, baja y nula en simbiosis con *P. sativum*, *V. bengalensis* y *V. faba*, respectivamente. Posteriormente, López et al. (1983) demostraron la ausencia de actividad hidrogenasa en nódulos de *Lens culinaris* inoculada con la cepa 128C53 de *R. leguminosarum*, cepa que sí expresa actividad hidrogenasa en nódulos de guisante. Este "efecto hospedador" se observó

también cuando se utilizaron diferentes variedades de la misma especie de leguminosa, ya que las variedades de *P. sativum* Alaska, JI1008 y Feltham First inoculadas con la cepa 128C53 produjeron diferencias considerables en la expresión de la actividad hidrogenasa de los bacteroides (Bedmar et al. 1983).

Aunque las causas del "efecto hospedador" no han sido definitivamente aclaradas, Bedmar y Phillips (1984) demostraron, mediante injertos raíz-parte aérea, la existencia de un compuesto de naturaleza desconocida y translocable a la raíz capaz de promover la actividad hidrogenasa de los nódulos. Según dichos autores, este factor se sintetiza en la parte aérea de las variedades que inducen actividad hidrogenasa en sus nódulos, y es capaz de producir incrementos de actividad Hup en nódulos formados por cepas que no expresan normalmente actividad hidrogenasa en esa variedad. Estos hechos sugieren que la actividad hidrogenasa en bacteroides pudiera estar controlada por la cantidad y tipo de fotosintato suministrado por la planta hospedadora a los nódulos, parámetros que muy probablemente varían de unas especies o variedades a otras.

## 6. BENEFICIOS POTENCIALES DEL SISTEMA DE OXIDACION DE HIDROGENO EN (*BRADY*)*RHIZOBIUM*

Dixon (1972) propuso que la presencia y expresión de actividad hidrogenasa en bacteroides podía cumplir las siguientes funciones: a) proteger a la nitrogenasa de la inactivación por  $O_2$ , b) impedir la competición entre  $H_2$  y  $N_2$  por la nitrogenasa y c) recuperar parte del ATP perdido durante la producción de  $H_2$ , mediante el acoplamiento de la

síntesis de ATP a la oxidación del H<sub>2</sub>.

De las evidencias experimentales actualmente disponibles, examinadas en diversas asociaciones (*Brady*)*rhizobium*-leguminosa, se puede concluir que la hidrogenasa protege a la nitrogenasa de la inactivación por el oxígeno en los bacteroides de *B. japonicum* (Emerich et al. 1979; Ruiz-Argüeso et al. 1978), elimina el H<sub>2</sub> producido en los nódulos de *R. leguminosarum* (Dixon et al. 1981; Dixon y Blunden, 1983) y acopla la oxidación de H<sub>2</sub> con la síntesis de ATP en los bacteroides de *B. japonicum* (Dixon, 1972; Emerich et al. 1979) y de *R. leguminosarum*, aunque en esta última especie tal acoplamiento no se produce en todas las cepas Hup<sup>+</sup> (Nelson y Salminen, 1982). La posibilidad de que la hidrogenasa pudiera proporcionar electrones a la nitrogenasa no se ha demostrado en *B. japonicum* (Emerich et al. 1980), pero sí se ha puesto de manifiesto en los bacteroides de *R. leguminosarum* en condiciones limitantes de sustrato (Salminen y Nelson, 1984). Además, se ha descrito que los nódulos formados por cepas Hup<sup>+</sup> de *B. japonicum* consumen menos carbohidratos que los nódulos formados por las cepas Hup<sup>-</sup> puesto que pueden utilizar el H<sub>2</sub> como fuente de energía (Drevon et al. 1982; Rainbird et al. 1983).

Los posibles beneficios que pudieran derivarse de la inoculación de leguminosas con cepas Hup<sup>+</sup> de (*Brady*)*rhizobium* ha sido objeto de numerosos estudios. Schubert et al. (1978) emplearon cepas Hup<sup>+</sup> y Hup<sup>-</sup> de *B. japonicum* para demostrar que el uso de cepas Hup<sup>+</sup> incrementaba el peso seco y el nitrógeno fijado por las plantas de soja en un 24% y un 35%, respectivamente, en relación a las inoculadas con cepas Hup<sup>-</sup>. Resultados similares se obtuvieron por Albrecht et al. (1979) cuando inocularon soja con grupos

de cepas Hup<sup>+</sup> y Hup<sup>-</sup>, consiguiéndose, en condiciones de invernadero, un 16% y un 10% de aumento en el rendimiento y el contenido en N, respectivamente, y por Hanus et al. (1981), en condiciones de campo, donde el empleo de cepas Hup<sup>+</sup> y mutantes Hup<sup>-</sup> obtenidas mediante resistencia a antibióticos (Maier et al. 1978) demostró un incremento en el contenido de proteínas de las semillas de un 8.9% en favor de las cepas Hup<sup>+</sup>.

En otro caso, la utilización como inoculantes de cepas de *B. japonicum* Hup<sup>+</sup> y Hup<sup>-</sup> obtenidas mediante mutagénesis con ácido nitroso demostró que aquellas que expresaban actividad hidrogenasa incrementaron el peso seco y el contenido total de N en un 17% y un 36%, respectivamente (Lepo et al. 1981). Sin embargo, a estos autores se les ha criticado que las razas utilizadas por ellos no eran isogénicas, esto es, podían diferir para más de un carácter, además de la presencia o ausencia de los genes *hup*. Posteriormente, utilizando cepas Hup<sup>+/-</sup> presumiblemente isogénicas de *B. japonicum*, y en condiciones tales que permitieran a las plantas llegar al estado de madurez, la inoculación con la cepa Hup<sup>+</sup> resultó en un incremento de los contenidos en N del 8.6% para las semillas, 27% para las hojas y 11% a nivel de planta entera (Evans et al. 1984). Estos mismos autores sugieren que los experimentos que deben realizarse para evaluar los posibles beneficios que pudieran derivarse de la presencia de actividad hidrogenasa, deben incluir a) cepas isogénicas, excepto para los genes *hup*, b) que los determinantes genéticos de la oxidación de H<sub>2</sub> presentes en las cepas a comparar sean estables y que la actividad hidrogenasa que se exprese sea suficiente como para oxidar todo el H<sub>2</sub> producido por la nitrogenasa, c) que las cepas Hup<sup>+</sup> que se empleen acoplen la oxidación de H<sub>2</sub> a la síntesis de ATP, d) suficiente

número de repeticiones que permitan un tratamiento estadístico adecuado y e) plantas que puedan crecer hasta la madurez. Sólo de esta forma, es posible que puedan ponerse de manifiesto las ventajas que supone la oxidación del  $H_2$ , al expresarse tal actividad durante la fase logarítmica de acumulación de  $N_2$  fijado (Evans et al. 1985)

Paralelamente a los trabajos de Evans y colaboradores, los experimentos llevados a cabo por otros autores, en cuanto a los beneficios que supone la presencia de actividad hidrogenasa, confirman los resultados obtenidos por ellos como es el caso de plantas de "mugbean" inoculadas con *Bradyrhizobium sp. (Vigna)* (Pahwa y Dogra, 1981) o los contradicen (Gibson et al. 1981; Drevon et al. 1987). De particular interés es el caso de *R. leguminosarum* donde, en ningún caso, se ha podido demostrar que las cepas que poseen el sistema Hup posean algún tipo de ventaja sobre las cepas Hup<sup>-</sup> (Nelson y Child, 1981; Bedmar y Phillips, 1984; Truelsen y Wyndaele, 1984; Sorensen y Wyndaele, 1986).

La capacidad de oxidar  $H_2$  por (*Brady*)*rhizobium* es también de importancia ecológica cuando se encuentra en el suelo en forma vegetativa, independientemente del estado simbiótico. Aunque se considera que las especies de (*Brady*)*rhizobium* son heterótrofas, Hanus et al. (1979) demostraron que *B. japonicum* es capaz de crecer quimiolitotróficamente, utilizando  $H_2$  y  $CO_2$  como fuente de energía y carbono, respectivamente. Esta capacidad puede conferir a las células con fenotipo Hup<sup>+</sup> la ventaja de crecer en ambientes anaerobios utilizando el  $H_2$  producido por las bacterias fermentadoras o por otros microorganismos fijadores de  $N_2$  pero carentes de actividad hidrogenasa. En tales condiciones, *B. japonicum* reduce el  $CO_2$  mediante la



enzima ribulosa 1-5-bifosfato carboxilasa, pero necesita nitrato o amonio como fuente de nitrógeno ya que no se expresa la actividad nitrogenasa (Lepo et al. 1980; Purohit et al. 1982).

Puesto que la presencia de actividad hidrogenasa es una característica que puede aumentar el rendimiento de las cosechas de leguminosas, sería deseable que esta propiedad se expresara en otras especies de (*Brady*)*rhizobium* que carecen de ella y que son también de gran interés en la práctica agrícola, tales como *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, etc. En este sentido, la transferencia de los genes *hup* de *R. leguminosarum*, localizados en el plásmido pIJ1008, a cepas *Hup*<sup>-</sup> de la misma especie incrementó la fijación de N<sub>2</sub> entre un 30% y un 120% (Dejong et al. 1982).

Puesto que el plásmido pIJ1008 contiene además de los genes *hup* los determinantes de otras características simbióticas (plásmido pSym), no se puede concluir que la mejora de la fijación de N<sub>2</sub> se deba exclusivamente a la actividad *Hup*. De hecho, la obtención de cepas isogénicas *Hup*<sup>+/-</sup> de la cepa 128C53 de *R. leguminosarum* mediante mutagénesis con el transposón Tn5 (Kagan y Brewin, 1985) ha permitido demostrar que la inoculación de esas mutantes en tres variedades de guisante y una de veza produjeron valores de reducción de acetileno y peso seco que son consistentes con la interpretación de que la oxidación de H<sub>2</sub> producido por la hidrogenasa no estaba asociada con un incremento de la fijación de N<sub>2</sub> en las distintas simbiosis establecidas (Cunningan et al. 1985). Se ha de considerar, sin embargo, que en la cepa 128C53 la oxidación del H<sub>2</sub> se haya muy débilmente acoplada a la síntesis de ATP (Nelson y Salminen, 1982), y que el fondo genético es muy importante en la expresión de los posibles beneficios del

sistema Hup (Skot et al. 1986).

La expresión heteróloga de los genes *hup* se ha podido estudiar merced a la transferencia de estos genes desde *R. leguminosarum* a otras especies de (*Brady*)*rhizobium* Hup<sup>-</sup>, y más concretamente a *R. meliloti* (Bedmar et al. 1984; Behki et al. 1985). En ambos casos, se ha podido demostrar la presencia de actividad hidrogenasa en nódulos y bacteroides de *R. meliloti*, y que, por tanto, los genes *hup* se mantienen de forma estable en la población bacteriana. Sin embargo, la presencia de actividad no resultó en un incremento de la biomasa o del contenido en nitrógeno.

En *B. japonicum*, la transferencia de los determinantes *hup* ha sido posible mediante el empleo del cósmido pHU52. La adquisición de este cósmido por cuatro cepas Hup<sup>-</sup> de *B. japonicum*, tres de *R. meliloti* y una de *R. leguminosarum* confirió a estos microorganismos, creciendo en vida libre, la capacidad de oxidar H<sub>2</sub> y crecer autotróficamente utilizando H<sub>2</sub> como única fuente de energía, así como la expresión de actividad hidrogenasa en el estado simbiótico (Lambert et al. 1985). Puesto que al igual que en *R. leguminosarum*, la presencia de secuencias repetidas de ADN implicado en las características simbióticas podría traducirse en un aumento de la fijación de N<sub>2</sub>, se ha aislado en *B. japonicum* un cósmido que contiene los genes *nif* y *hup* (Hom et al. 1985). Sin embargo, no ha sido posible el empleo de estas cepas en estudios a nivel fisiológico y de tipo aplicado ya que los cósmidos producidos son muy poco estables en las cepas receptoras hasta ahora utilizadas.

Recientemente, la transferencia del cósmido pAL618 de *R. leguminosarum* a otras cepas Hup<sup>-</sup> de *R. phaseoli*, *R.*

*meliloti* y *R. leguminosarum* resultó en la expresión de actividad hidrogenasa en los bacteroides aislados de nódulos de las plantas hospedadoras, aunque no se han presentado datos relativos a parámetros de cosecha (Ruiz-Argüeso et al. 1990).

## 7. UTILIZACION DEL NITROGENO INORGANICO POR LAS LEGUMINOSAS

Las leguminosas son las únicas plantas superiores que pueden utilizar para su nutrición tanto el nitrógeno atmosférico, dada su capacidad de establecer simbiosis fijadoras de  $N_2$  con las bacterias de los géneros (*Brady*)-*rhizobium*, como el nitrógeno inorgánico presente en la solución del suelo.

El nitrato es la forma predominante de nitrógeno inorgánico capaz de ser asimilado por las plantas cultivadas que crecen en condiciones normales de campo. En suelos agrícolamente fértiles, la cantidad de nitrato puede alcanzar la concentración de 20 mM (280 ppm; Russell, 1973). Aunque los fertilizantes amoniacales son también muy usados, el amonio es oxidado a nitrato por los microorganismos del suelo. Además, la acumulación de amonio en el interior de la planta es perjudicial para la misma, ya que estos compuestos desacoplan los sistemas transportadores de electrones, promueven la oxidación de los nucleótidos de piridina e inhiben ciertas enzimas. La toxicidad debida al amonio se elimina, normalmente, mediante su incorporación a las cadenas hidrocarbonadas, procedentes de la fotosíntesis, para originar proteínas. En contraste, el nitrato es relativamente inocuo, su asimilación está regulada por la oxidación de carbohidratos asociada con la

producción de ácidos orgánicos y puede acumularse hasta elevadas concentraciones sin detrimento para la planta (Beevers y Hageman, 1980).

El nitrógeno y el carbono constituyen, aproximadamente, el 2% y el 40% del peso seco del material vegetal. Basándonos en las estimaciones de Galston (1961), que indican que a nivel mundial la cantidad de carbono fijado anualmente se aproxima a las  $200 \times 10^9$  Tm, se puede calcular que  $10 \times 10^9$  toneladas de nitrógeno han de incorporarse al material vegetal. Puesto que la fijación biológica supone  $2 \times 10^8$  Tm, se puede concluir que gran cantidad del N presente en las plantas procede de la asimilación del amonio o del nitrato.

La reducción de nitrato a amonio ocurre en dos etapas. La primera de ellas la cataliza la enzima nitrato reductasa (NR), que transforma el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ); la segunda fase, la reducción de nitrito a amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) se lleva a cabo por la nitrito reductasa (NiR). A diferencia de la nitrogenasa que sólo se encuentra en organismos procarióticos, la NR se localiza, además, en las raíces, tallos y hojas de la mayoría de las plantas, incluyendo las leguminosas.

Aunque la capacidad de las leguminosas para formar simbiosis efectivas con bacterias de los géneros (*Brady*)-*rhizobium* reducen sus requerimientos por el nitrógeno del suelo, el máximo desarrollo y rendimiento de estos cultivos no puede alcanzarse en ausencia de nitrógeno combinado (Hageman, 1979). De hecho, se ha demostrado tanto en soja (Thibodeau y Jaworski, 1975), como en judía (Franco et al. 1979) y en guisante (Dejong et al. 1982) que estas plantas pueden beneficiarse del efecto complementario de los

procesos de fijación de  $N_2$  y reducción de nitrato. Cuando ambas fuentes están disponibles, la contribución de la fijación de  $N_2$  a la nutrición nitrogenada de la planta varía dependiendo de las condiciones del cultivo (Duc, 1980), del genotipo de la planta (Duc, 1980) y del nivel de nitrógeno combinado en el suelo (Bello et al. 1980). En soja, el porcentaje de nitrógeno fijado varía entre el 25% en suelos muy fértiles y el 80% en suelos áridos (La Rue y Patterson, 1981). En alfalfa, del 40 al 70% del total del nitrógeno utilizado por la planta puede provenir de la simbiosis (Heichel et al. 1981) y hasta un 87% en *Vicia faba* (Richard y Soper, 1978).

## 8. INHIBICION DE LA FIJACION DE NITROGENO POR NITRATO

El incremento en la disponibilidad de nitrato puede resultar en una disminución de la fijación de nitrógeno. Aunque las razones por las que ocurre este efecto no se conocen todavía con exactitud, es posible que en términos generales, sea debido a que la fijación de  $N_2$  requiere más energía que la asimilación de nitrato (Sprent y Raven, 1985; Streeter, 1988). Hay varias hipótesis que tratan de explicar el efecto negativo del nitrato sobre la fijación de  $N_2$ .

### 8.1. Inhibición del proceso de infección

El nitrato afecta a una extensa serie de procesos implicados en la infección de la leguminosa por su (*Brady*)-*rhizobium* específico. Por un lado, disminuye la deformación

de los pelos radicales, la adhesión de la bacteria a los mismos y el número de canales de infección, y por otro, incrementa el número de infecciones abortivas (Streeter, 1988).

El mecanismo molecular responsable de estos efectos no se conoce con claridad. En un principio se consideró que el nitrito provocaba la destrucción del ácido indolacético que se requería para el proceso de infección así como que era el responsable de disminuir los procesos de reconocimiento e infección mediados por las lectinas implicadas en favorecer la unión de (*Brady*)*rhizobium* a la superficie de la raíz (Streeter, 1988).

El nitrato también inhibe el crecimiento y desarrollo de los nódulos, inhibición que se acompaña de cambios en la estructura de los mismos (Streeter, 1986)

## 8.2. Disminución en el suministro de fotosintato a los nódulos

Los nódulos de las leguminosas requieren fotosintato para mantener la fijación de  $N_2$ . La asimilación de nitrato en hojas, tallos y raíces es dependiente de los sustratos hidrocarbonados necesarios para la incorporación del amonio formado, por lo que la reducción de nitrato en esos órganos disminuiría el aporte de fotosintato a los nódulos inhibiéndose así la nitrogenasa (Small y Leonard, 1969; Oghoghorie y Pate, 1971). De hecho, la adición de azúcares al medio de la raíz disminuyó el efecto inhibitorio del nitrato sobre la nitrogenasa (Wong, 1980; Carroll y Gresshof, 1983) y el tratamiento con nitrato disminuyó la

concentración de carbohidratos de los nódulos (Wasfi y Prioul, 1986).

Sin embargo, la inmersión de hojas de guisante en soluciones de nitrógeno combinado no afectó la actividad nitrogenasa de los nódulos (Chen y Phillips, 1977). Por otro lado, el tratamiento con nitrato de la mitad de la raíz inhibió la actividad nitrogenasa sólo en la zona tratada (Hinson, 1975) y además, la disminución en el contenido de carbohidratos fue posterior a la inhibición de la actividad nitrogenasa (Minchin et al. 1986).

Dentro de esta teoría se pueden encuadrar las recientes observaciones de Drevon et al. (1988) que indican que la inhibición de la nitrogenasa por nitrato se debe a la competición por poder reductor entre la nitrato reductasa y la respiración a nivel de los bacteroides o las mitocondrias. De hecho, la adición de malato a la solución nutritiva de las plantas tratadas con nitrato suprimió el efecto negativo del mismo sobre la actividad nitrogenasa (Heckman et al. 1989).

### 8.3. Inhibición debida al nitrito

Esta hipótesis implica una actuación más directa y considera al nitrito como responsable de la inhibición de la actividad nitrogenasa. El nitrato *per se* no afecta la actividad nitrogenasa, pero el nitrito inhibe tal actividad en suspensiones de bacteroides de *B. japonicum* (Rigaud et al. 1973; Pagan et al. 1977; Trinchant y Rigaud, 1980) y en preparaciones de nitrogenasa purificada (Kennedy et al. 1975). Igualmente, se ha indicado que los productos de

desnitrificación del nitrato o nitrito pueden inhibir la nitrogenasa (O'Hara y Daniel, 1985).

El mecanismo de inhibición por nitrito se puede explicar por la capacidad de este compuesto para unirse al componente FeMo de la nitrogenasa inhibiendo competitivamente a la misma (Trinchant y Rigaud, 1980) o, alternativamente, disminuyendo la capacidad respiratoria de los bacteroides (Trinchant y Rigaud, 1981).

También se ha sugerido que otro efecto inhibitor del nitrito podría deberse a la inactivación de la leghemoglobina, lo que se produciría al unirse el nitrito, de forma reversible, a la leghemoglobina (LHb<sup>2+</sup>) y oxidarla hasta su forma férrica (LHb<sup>3+</sup>) inactiva (Rigaud y Puppo, 1977).

Cabe preguntarse, si la reducción de nitrato y la consecuente producción de nitrito en los nódulos es cuantitativamente suficiente para inhibir la nitrogenasa. Para resolver esta cuestión se han utilizado mutantes de (*Brady*)*rhizobium* deficientes en actividad nitrato reductasa (NR<sup>-</sup>). Si el efecto inhibitor del nitrato se debe al nitrito, la actividad nitrogenasa de los nódulos producidos por mutantes NR<sup>-</sup> no debería ser afectada por el nitrato.

Gibson y Pagan, (1977) utilizaron mutantes NR<sup>-</sup>, seleccionados mediante resistencia al clorato, de *R. trifolli* y *Bradyrhizobium* sp. para demostrar que la actividad nitrogenasa se inhibía tanto en cepas mutantes NR<sup>-</sup> como en las cepas parentales. Resultados similares se obtuvieron utilizando cepas resistentes al clorato de *B. japonicum* 61A76 (Stephens y Neyra, 1983; Streeter, 1986).



Estos hechos, junto con la demostración de que el nitrato inhibe la actividad nitrogenasa de bacteroides que no expresan actividad NR constitutiva (Streeter, 1985a) restan credibilidad a la hipótesis de la inhibición de la nitrogenasa por el nitrito en condiciones fisiológicas.

Puesto que una serie de mutantes NR<sup>-</sup> de *R. meliloti* también carecían de actividad nitrogenasa, se sugirió que nitrogenasa y NR podían compartir algún elemento común, concretamente el cofactor de Mo (Kondorosi et al. 1973). Estudios posteriores (Kennedy et al. 1975; Kiss et al. 1979) demostraron que ambas enzimas no poseían ningún determinante genético común.

Desde el punto de vista aplicado, es interesante resaltar que las cepas NR<sup>-</sup> suelen presentar valores de nodulación y fijación de N<sub>2</sub> comparables o superiores a las cepas parentales, y en algunos casos la inoculación de las leguminosas específicas con cepas NR<sup>-</sup> incrementó el peso seco y el contenido en N respecto a las inoculadas con las cepas silvestres (Williams y Phillips, 1983; Hom et al. 1985). Sin embargo, aunque se ha pretendido utilizar la actividad NR como parámetro para evaluar la actividad nitrogenasa, no se ha encontrado relación entre ambas actividades (Antoun et al. 1980; Manhart y Wong, 1979).

#### 8.4. Transporte

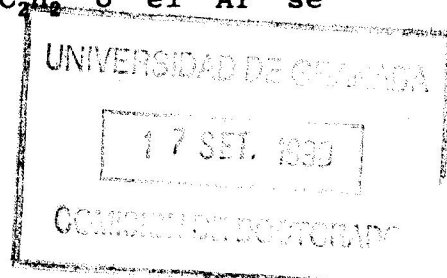
Diversos autores han sugerido que el papel que desempeña el nitrato en la inhibición de la nitrogenasa se realiza a través de un efecto indirecto, al incrementarse la descarga de aminoácidos, amidas o ureidos, procedentes de la

reducción del nitrato, en el xilema (Pate et al, 1979; Cookson et al. 1980; Streeter, 1982; Zengbé et al. 1984). Sin embargo, no está claro cómo este efecto puede influir en la actividad nitrogenasa de los nódulos. De hecho, se ha demostrado que la acumulación de productos nitrogenados no coincide con la inhibición de la actividad nitrogenasa, sino que es posterior, tratándose de un efecto de la inhibición de la nitrogenasa más que una causa (Streeter, 1985a; Schuller et al, 1986). Por otro lado, la acumulación de ureidos se produce en toda la planta y no exclusivamente en los nódulos (Yoneyama et al. 1985). Además, mientras que en soja la disminución de actividad nitrogenasa se acompañó de una acumulación de aminoácidos y ureidos, no se observó este efecto en judía (Streeter, 1986).

#### 8.5. Resistencia a la difusión del oxígeno

Finalmente, otra hipótesis indica que la presencia de nitrato aumenta la resistencia a la difusión del oxígeno en los nódulos, disminuyendo por tanto la disponibilidad de oxígeno en los bacteroides y la producción de ATP necesaria para la fijación de  $N_2$  (Carroll et al. 1985; Minchin et al. 1986).

Recientemente, cuando el empleo de sistemas de flujo continuo ha permitido medir la actividad nodular instantánea en atmósferas de  $C_2H_2$ :aire o de Ar: $O_2$ , se ha descubierto que el  $C_2H_2$  y el Ar inhiben concomitantemente la actividad nitrogenasa (producción de  $C_2H_4$  o de  $H_2$ ) y la respiración nodular (producción de  $CO_2$ ) en unos pocos minutos (Witty et al. 1986; Hunt et al. 1987). La inhibición de la nitrogenasa por el  $C_2H_2$  o el Ar se



atribuyó a una disminución en la concentración de  $O_2$  que alcanza la región infectada por los bacteroides, lo que llevó a postular la existencia en los nódulos de una barrera a la difusión de  $O_2$  (Witty et al. 1986; Hunt et al. 1987). De hecho, la utilización de microelectrodos ha permitido observar una disminución drástica de la concentración de  $O_2$  en el córtex interno nodular, lo que confirma la existencia de una barrera física de difusión al  $O_2$ , que posiblemente estaría situada en el córtex interno próximo a la endodermis. Tales estudios también revelaron cambios aparentes en la distribución de espacios aéreos intercelulares en los nódulos tras la variación de la presión parcial de  $O_2$  externa, y que dichos cambios podían interpretarse en términos de una adaptación de la barrera a concentraciones fluctuantes de  $O_2$  (Witty et al. 1987). Se ha indicado que el estímulo que desencadena el cierre de la barrera parece ser el cese en la producción de amonio (Hunt et al. 1987).

La utilización conjunta de los datos anteriores y de los de ultraestructura nodular ha permitido la construcción de modelos matemáticos de las vías de difusión de  $O_2$  (y de otros gases) entre la atmósfera exterior y los espacios intercelulares adyacentes a las células infectadas (Sheehy et al. 1985; Hunt et al. 1988; Layzell et al. 1988). Estos modelos señalan que las observaciones experimentales pueden explicarse mejor asumiendo que la barrera de difusión consiste en una(s) capa(s) de células cuyos espacios intercelulares están parcialmente rellenos de agua, de modo que los cambios en la resistencia de la barrera podrían deberse a variaciones en la longitud de tales "tapones" de agua (Sheehy et al. 1985; Layzell et al. 1988). Mientras que para Minchin y colaboradores (James et al. 1990) el control de la difusión de  $O_2$  se debe a la

presencia de glucoproteínas en los espacios intercelulares, Layzell y colaboradores (Hunt et al. 1990) consideran que la barrera de difusión se regula por un mecanismo osmótico que implica a la sacarosa como soluto.

La capacidad de la barrera a la difusión para poder ajustarse a cambios externos juega un papel importante en la protección de la nitrogenasa cuando los nódulos están sometidos a estrés. Así, los resultados descritos inicialmente sobre el incremento de las resistencias al  $O_2$  en nódulos bajo déficit hídrico (Sprent, 1976) se han confirmado recientemente midiendo fijación de  $N_2$  con sistemas abiertos de flujo continuo (Durand et al. 1987). La limitación del  $O_2$  disponible para las células infectadas está implicada en la inhibición de la actividad nodular tras el tratamiento de las plantas no sólo con nitrato sino también con la defoliación o la exposición de las plantas a oscuridad continua (Witty et al. 1986; Minchin et al. 1986; Carroll et al. 1987). Lo mismo parece ocurrir en otros tipos de estrés, como la inundación y tratamiento con bajas temperaturas (Minchin et al. 1988). El que las primeras etapas de la inhibición de la fijación del  $N_2$  por el nitrato estén mediadas por una menor disponibilidad de  $O_2$  de los bacteroides se apoya por estudios que muestran que los bacteroides aislados de nódulos tratados con nitrato retienen intacta la actividad nitrogenasa (Houwaard, 1980), y que la resistencia a la difusión de  $O_2$  aumenta antes de que el nitrato haya alcanzado los bacteroides (Minchin et al. 1989).

Por otro lado, la defoliación, la oscuridad prolongada y las bajas temperaturas reducen el aporte de fotosintetizados a los nódulos, y, en consecuencia, el incremento de la resistencia al  $O_2$  debe considerarse como un mecanismo

para establecer el equilibrio entre suministro de azúcares y disponibilidad para la subsiguiente oxidación (Minchin et al. 1988).

#### 9. ASIMILACION DE NITRATO POR LOS NODULOS DE LAS LEGUMINOSAS

En general, la utilización de nitrato por las plantas tiene tres componentes: absorción, reducción y asimilación. En condiciones naturales, el nitrato se absorbe por la raíz, probablemente mediante la acción de un transportador específico (Ullrich, 1987). Dentro de la raíz, el nitrato puede reducirse o acumularse dentro de las vacuolas de las células del córtex. El nitrato que no se reduce se transporta por el xilema hasta la parte aérea, tallo y hojas, donde también se puede reducir.

La relación entre el nitrato que se absorbe y se reduce en la raíz, varía según la especie vegetal, la edad de la misma y la concentración de nitrato en la solución externa (Pate y Atkins, 1983). En la raíz, la reducción de nitrato depende de la formación de poder reductor que se origina durante la oxidación de los productos carbonados producidos durante la fotosíntesis, mientras que en los tejidos verdes se acopla directamente a las reacciones fotosintéticas de la fase luminosa que proporciona poder reductor (Beevers y Hageman, 1980, 1983).

De las evidencias experimentales actualmente disponibles, se puede concluir que, en las leguminosas de origen templado (*Pisum*, *Vicia*, *Lupinus*, *Trifolium*, etc.) el nitrato se reduce en la raíz de forma mayoritaria y que al

aumentar su concentración en el medio externo, se incrementa la reducción del mismo en la parte aérea. Por otra parte, en las leguminosas de origen tropical (*Glycine*, *Vigna*, *Phaseolus*, *Cajanus*, etc.) la mayor parte del nitrato absorbido se reduce en el tallo y en las hojas y la relación entre el nitrato que se reduce en la parte aérea y en la raíz permanece constante al aumentar la concentración externa del ión (Andrews, 1986). Una explicación posible a este fenómeno puede ser que la reducción de nitrato en el tallo de plantas sometidas a ambientes de elevada intensidad luminosa puede suponer una ventaja, mientras que, la reducción de nitrato en el tallo de plantas sometidas a bajas temperaturas supone un inconveniente. Una evidencia de este hecho se obtuvo al estudiar la asimilación de nitrato en la raíz y tallo de 2 variedades de *Vicia faba*, una sensible al frío y otra tolerante. Se observó que la reducción de nitrato en el tallo era mayor en la variedad sensible que en la tolerante al frío. Cuando se incrementó la concentración de nitrato, de manera que se forzara el transporte de nitrato al tallo, se produjo clorosis en la variedad tolerante al frío (Andrews et al. 1984; Sutherland et al. 1985).

En las leguminosas, parte del nitrato puede reducirse, además, en los nódulos. Aunque el empleo de  $^{15}\text{NO}_3^-$  permitió comprobar que el  $^{15}\text{N}$  se incorporaba a los compuestos aminados formados en los nódulos (Randall et al. 1978; Ohyama y Kumazawa 1979), la contribución del nitrato que se asimila en ellos al total del contenido en N reducido de las plantas es muy pequeño, ya que oscila entre el 1.5% y el 3% para nódulos de alfalfa (Vance y Heichel, 1981). Sin embargo, la asimilación de  $\text{NO}_3^-$  puede ser importante en plantas de soja durante la última etapa del periodo reproductivo (Randall et al. 1978), cuando la NR

foliar ha decaído (Thibodeau y Jaworski, 1975).

La asimilación del nitrato en nódulos, esto es, la transformación del nitrato a amonio, puede ocurrir por los siguientes mecanismos: a) mediante la actividad de la NR y NiR del citosol; b) reducción de nitrato a nitrito por la NR de los bacteroides; el nitrito sería entonces exportado al citosol y reducido a amonio por la NiR citosólica. Esta posibilidad puede deducirse considerando el caso de bacteroides que expresan escasa actividad NiR y por el hecho de que el nitrito se acumula en el citosol y en los bacteroides (Vairinhos et al. 1986; Becana et al. 1985a, b); c) reducción de nitrato a amonio por las enzimas del bacteroide, ya que Vairinhos et al. (1986) han demostrado que *B. japonicum* en vida libre puede reducir nitrato a amonio y a nitrógeno molecular ( $N_2$ ) y d) reducción de nitrato a amonio en dos etapas sucesivas, siendo la primera la transformación de nitrato en  $N_2O/N_2$ , y la segunda, la reducción del  $N_2O/N_2$  a amonio por la nitrogenasa (O'Hara y Daniel, 1985). De hecho, se ha observado que tanto el  $N_2$  como el  $N_2O$  producidos durante el proceso de desnitrificación pueden ser reciclados en los bacteroides por la nitrogenasa (Bhandari y Nicholas, 1984; O'Hara y Daniel, 1985).

A la enzima NR se la considera como uno de los mejores ejemplos de enzimas inducibles por su sustrato (Beever y Hageman, 1980; Campbell, 1988). Sin embargo, Pate y Atkins (1981), Hunter (1983) y Giannakis et al. (1988) observaron que la enzima NR de los bacteroides de *B. japonicum* no se inducía cuando las plantas noduladas se cultivaban en presencia de nitrato. Un estudio sobre la distribución de nitrato y actividad NR en los nódulos de soja, haba y cowpea ha revelado que el nitrato no tiene acceso a la

región de los bacteroides, quedando su localización restringida a los tejidos corticales (Sprent et al. 1987; 1988). Recientemente, Becana et al. (1989) han comprobado que la reducción de nitrato por las enzimas del citosol y de los bacteroides depende de la concentración de nitrato y del tiempo del tratamiento de las plantas.

#### 10. ASIMILACION DEL NITRATO EN EL CITOSOL Y EN LOS BACTEROIDES

Los nódulos de las raíces de las leguminosas pueden separarse en dos fracciones: la bacteroidal, de naturaleza microbiana, y la citosólica, de origen vegetal. La presencia de un sistema activo de reducción de nitrato en nódulos se demostró por primera vez en plantas de soja (Evans, 1954). Desde entonces se ha podido comprobar que las leguminosas de los géneros *Phaseolus*, *Pisum* y *Lotus* expresan actividad NR sólo en la fracción soluble de los nódulos. Otros géneros, tales como *Glycine*, *Medicago* y *Vigna* muestran actividad NR tanto en el citosol como en los bacteroides (Becana y Sprent, 1987; Monza et al. 1989; Becana y Bedmar, 1990).

Diversos autores han presentado estimaciones de la contribución que el citosol y los bacteroides aportan a la capacidad total de los nódulos para reducir nitrato. Estas estimaciones varían considerablemente debido a: 1) las diferencias que existen en actividad NR entre especies y cepas de (*Brady*)*rhizobium*, 2) las dudas sobre si la medida de la NR *in vivo* o *in vitro* se realiza en condiciones óptimas de ensayo y 3) porque en el caso de que los ensayos de la NR *in vivo* o *in vitro* sean óptimos, se desconoce si son



buen reflejo de la actividad NR *in situ*. De hecho, el ensayo *in vitro* para determinar la actividad NR se realiza normalmente en condiciones no limitantes de sustrato y poder reductor. Sin embargo, existen evidencias que indican que la concentración de nitrato limita la actividad NR *in situ* del nódulo (Streeter, 1986, Sprent et al. 1987).

A pesar de estas dificultades, de acuerdo con los datos existentes en la bibliografía (Hunter, 1983; Stephens y Neyra, 1983; Becana et al. 1985b) se puede considerar que, en nódulos de soja y alfalfa, los bacteroides contribuyen mayoritariamente (>90%) a la actividad NR total de los nódulos (Becana y Sprent, 1987).

#### 10.1. Nitrato reductasa y nitrito reductasa del citosol.

La NR del citosol, como las de raíz, tallo y hojas, es de tipo asimilatorio y utiliza NADH como donador de electrones (Streeter, 1982). Queda, sin embargo, por establecer con claridad si existe más de una isoenzima, ya que en hojas de soja se ha demostrado la existencia de NR dependiente de NADH y NADPH (Campbell y Smarrelli, 1976).

Mientras que la NR de la raíz y hojas responde linealmente al tratamiento de las plantas con  $\text{NO}_3^-$ , la NR del citosol de los nódulos no es tan sensible al nitrato (Bedmar et al. 1990).

La fracción soluble de los nódulos también contiene NiR. Esta enzima se ha purificado y caracterizado a partir del citosol de nódulos de soja (Hunter, 1984). Su peso molecular, estimado por filtración, fue de 55 Kd y el pH óptimo

fue de 7.1. La actividad de esta enzima se puede determinar utilizando donadores no fisiológicos de electrones y su Km para el nitrito fue de 0.5 mM.

Mientras que algunos autores han descrito que la actividad NiR aumenta con la concentración de nitrato y es varias veces mayor que la actividad NR (Stephens y Neyra, 1983; Becana et al. 1985b), otros no han observado tales aumentos (Giannakis et al. 1988; Bedmar et al. 1990).

#### 10.2. Nitrato reductasa y nitrito reductasa de los bacteroides

Manhart y Wong (1979), en un amplio estudio, demostraron que la mayoría de las especies de (*Brady*)*rhizobium* eran capaces de crecer en medios definidos con nitrato como única fuente de nitrógeno. Sin embargo, la existencia de actividad NR constitutiva se ha puesto de manifiesto sólo en bacteroides de *B. japonicum*, *R. meliloti* y *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*). Tal actividad no se ha detectado en bacteroides de *R. leguminosarum*, *R. trifoli*, *R. phaseoli* y *R. loti* (Becana y Sprent, 1987; Becana y Bedmar, 1990; Bedmar et al. 1990).

*In vivo*, los bacteroides aislados pueden utilizar succinato para generar los equivalentes de reducción necesarios para mantener la actividad de la enzima (Manhart y Wong, 1979), pero en los ensayos *in vitro* es necesaria la utilización de derivados del viológeno, reducidos con ditionito, para mantener esta actividad (Kennedy et al. 1975).

Aunque los primeros estudios relativos a la caracterización de la NR en bacteroides de (*Brady*)*rhizobium* y en sus formas en vida libre, se deben a Cheniae y Evans, (1960) y Lowe y Evans, (1964), Kennedy et al. (1975) fueron quienes demostraron la existencia de actividad NR tanto en la fracción soluble como en la particulada de los bacteroides de *B. japonicum*. Estos mismos autores indicaron que la NR soluble de los bacteroides poseía un peso molecular, estimado por filtración en Sephadex G-150, de 70 Kd.

Esta enzima fue incapaz de utilizar NADPH, NADH o FAD como donadores de electrones y el ditionito inhibió su actividad, inactivación que pudo prevenirse con metil viológeno (Kennedy et al. 1975).

Igualmente, Kennedy et al. (1975) comprobaron que la enzima del citosol de células de *B. japonicum* cultivadas aeróbicamente con glutamato tenía un peso molecular idéntico a la de los bacteroides. La similitud entre la NR soluble de células en vida libre y bacteroides en cuanto a peso molecular, donadores de electrones y sensibilidad al ditionito les hizo sugerir que se trataba de la misma proteína. Kennedy et al. (1975) también compararon las NRs soluble y particulada de los bacteroides, observando que ambas NRs diferían en sus constantes cinéticas pero que presentaban la misma sensibilidad al ditionito y que en ambos casos el metil viológeno prevenía la inactivación de las mismas. Estos hechos les llevó a concluir que las NR soluble y particulada de bacteroides de *B. japonicum* era la misma enzima.

Posteriormente, Daniel y Gray (1976) estimaron el peso molecular de la NR del citosol de bacteroides de *B.*

*japonicum* en 69 Kd, lo que coincide con las observaciones previas de Kennedy et al. (1975). Igualmente, la NR soluble de células de *B. japonicum* cultivadas anaeróbicamente tuvo el mismo peso molecular que la de los bacteroides. Sin embargo, a partir de células cultivadas aeróbicamente Daniel y Gray (1976) identificaron, sorprendentemente, una NR soluble con un peso molecular de 180 Kd, superior al indicado por Kennedy et al. (1975). Para Daniel y Gray, (1976) las diferencias en peso molecular, sensibilidad al oxígeno e inhibición por cianuro, entre las NRs solubles de cultivos aerobios y anaerobios de *B. japonicum* indicaba que ambas enzimas eran distintas.

También se ha estudiado la NR soluble de los bacteroides aislados de nódulos de *Lupinus*. El peso molecular estimado de la misma fue de 67 Kd y utilizaba ferredoxina reducida como donador de electrones (Alikulov et al. 1980).

Más recientemente, Sekiguchy y Maruyama (1988) han purificado la NR soluble de células en vida libre de *R. meliloti* cultivadas aeróbicamente, calculando su peso molecular en 58 Kd mediante cromatografía de exclusión molecular.

Los informes sobre la presencia de actividad NiR en bacteroides de (*Brady*)*rhizobium* son más escasos. Hay que indicar, sin embargo, que se ha observado actividad NiR en bacteroides de *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* (Burikhanov et al. 1981), *R. phaseoli* (Rigaud, 1976), *R. leguminosarum* (Streeter, 1985a) y *R. meliloti* (Becana et al. 1985a).

Los datos bibliográficos sobre la existencia de actividad NiR en *B. japonicum* son contradictorios. De hecho, algunos autores han determinado la existencia de tal

actividad (Chen y Sung, 1983; Streeter, 1985a), mientras que otros no han detectado la presencia de la misma (Daniel y Appleby, 1972; Stephens y Neyra, 1983 ; Giannakis et al. 1988). Hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio sobre el aislamiento y caracterización de la enzima NiR ni en células en vida libre ni en bacteroides.

#### 11. RESPIRACION, REDUCCION DESASIMILATORIA Y DENITRIFICACION DEL NITRATO

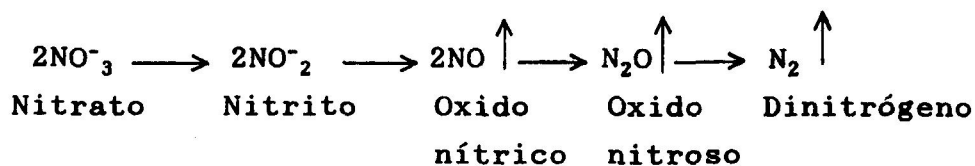
En diversas cepas de (*Brady*)*rhizobium*, la utilización del nitrato puede ocurrir en condiciones anaeróbicas, actuando este ión como aceptor final de electrones. A este proceso se le llama respiración del nitrato para diferenciarlo de aquel por el cual el nitrato es incorporado a los componentes proteicos celulares (Stouthamer, 1976). Cuando el nitrato es la única fuente de nitrógeno disponible, la respiración puede iniciar tanto la reducción desasimilatoria del mismo, proceso por el cual el nitrato se reduce a amonio, como la desnitrificación, que conduce a la formación de óxidos de nitrógeno (NO y N<sub>2</sub>O) e incluso a nitrógeno molecular (Delwiche, 1981; Payne, 1981; Stewart, 1988). Aunque desnitrificación y reducción desasimilatoria ocurren en condiciones de baja concentración de O<sub>2</sub>, el primero resulta en la pérdida de nitrógeno combinado, mientras que el segundo lo conserva (Aparicio-Tejo et al. 1990).

En la reducción desasimilatoria de nitrato intervienen dos enzimas; la primera, una NR desasimilatoria ligada a la membrana que reduce el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y la segunda, una NiR asimilatoria de naturaleza soluble que cataliza la reduc-

ción del  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NH}_4^+$ . A este proceso algunos autores lo han denominado amonificación del nitrato (Reddy y Lodha, 1986, 1988).

Las primeras investigaciones que pusieron de manifiesto la capacidad de (*Brady*)*rhizobium* para producir  $\text{N}_2$  a partir de nitrato se deben a Rajagopalan (1938) y Wilson (1947).

Hoy día está claramente establecido (Payne, 1981) que la reducción del nitrato en condiciones anaeróbicas procede de la siguiente manera:



y que este proceso puede ocurrir en (*Brady*)*rhizobium* tanto en vida libre como en simbiosis (O'Hara y Daniel, 1985).

Recientemente, se ha demostrado en células en vida libre de *B. japonicum*, que la asimilación (formación de  $\text{NH}_4^+$ ) y desnitrificación (producción de óxidos de nitrógeno) del nitrato pueden ocurrir simultáneamente (Vairinhos et al. 1989).

En la mayoría de los bacteroides el producto final de la desnitrificación es el  $\text{N}_2\text{O}$ , aunque algunos sólo reducen nitrato a nitrito y otros continúan hasta la formación de  $\text{N}_2$  como es el caso de determinadas cepas de *B. japonicum* y *R. meliloti* (Daniel et al. 1982). En general, los (*Brady*)*rhizobium* de lento crecimiento tienen mayor capacidad desnitrificadora que los de rápido crecimiento, con la excepción, quizás, de *R. meliloti* y *R. trifoli* (Daniel et al. 1982; Casella et al. 1984). Aunque se ha indicado que

la disminución en la tensión de  $O_2$  es el principal factor responsable de la síntesis de las enzimas implicadas en el proceso de desnitrificación (O'Hara et al. 1983), parece que ambas circunstancias, ausencia de  $O_2$  y presencia de nitrato, son necesarias para la expresión óptima de la actividad desnitrificante (Van Berkum y Kaiser, 1985; Smith y Smith, 1986). De hecho, Vairinhos et al. (1989) han establecido que la desnitrificación es dependiente de la presencia de nitrato y que la relación desnitrificación/asimilación depende de las condiciones en que se hayan cultivado las células, aumentando la proporción al disminuir la tensión de  $O_2$ .

En los últimos años se ha prestado gran atención a la desnitrificación en bacteroides de (*Brady*)*rhizobium* por las siguientes razones:

1. Es un proceso capaz de generar energía mediante la traslocación de  $H^+$  durante la reducción de nitrato a nitrito (Daniel et al. 1980). En bacteroides de *B. japonicum* la desnitrificación puede proporcionar ATP suficiente para permitir la fijación de  $N_2$ , aunque el proceso es 2.5 veces menos eficaz, en términos de transferencia de electrones, que la fijación de  $N_2$  que se lleva a cabo utilizando  $O_2$  como aceptor final (Rigaud et al. 1973; Daniel et al. 1980).

2. La capacidad de desnitrificación puede permitir a los bacteroides sobrevivir durante periodos de anoxia producidos por sequía o encharcamiento (Zablotowicz y Foch, 1979). De hecho, en plantas sometidas a condiciones de sequía se produce una disminución de la presión parcial de  $O_2$  dentro de los nódulos (Sprent y Gallacher, 1976) y un incremento de la actividad NR *in vivo* de los nódulos (Aparicio-Tejo

y Sánchez Díaz, 1982) así como de la actividad *in vitro* de los bacteroides (Chen y Sung, 1983; Becana et al. 1986). Por el contrario, la actividad NR del citosol disminuye considerablemente (Becana et al. 1986). Estas evidencias sugieren que, en condiciones de sequía, puede producirse en los bacteroides una alteración en el flujo de electrones desviándose hacia la reducción de nitrato.

3. El proceso de desnitrificación permite eliminar el nitrito y los óxidos de nitrógeno producidos, todos ellos muy tóxicos para la planta, ya que pueden inhibir la actividad nitrogenasa e inactivar funcionalmente a la leghemoglobina (O'Hara y Daniel, 1985).

Desde un punto de vista aplicado, hay que resaltar que la importancia del proceso de desnitrificación en (*Brady*)-*rhizobium* estriba en el papel que representa como mecanismo para eliminar el nitrato que se emplea como fertilizante y en su contribución a la producción de óxidos de nitrógeno. En el primer caso, se ha demostrado, en una serie de experimentos de campo, que las tasas de desnitrificación por (*Brady*)*rhizobium* son comparables a las de fijación de  $N_2$  (O'Hara et al. 1984). En cuanto al segundo, el  $N_2O$  se considera que representa una seria amenaza ambiental por su intervención en la formación de óxido nítrico en la atmósfera que se elimina en forma de la llamada lluvia ácida y porque colabora en la eliminación de la capa de ozono. No hay que olvidar tampoco que el  $N_2$  que se puede liberar a la atmósfera equilibra el ciclo del N en la biosfera.

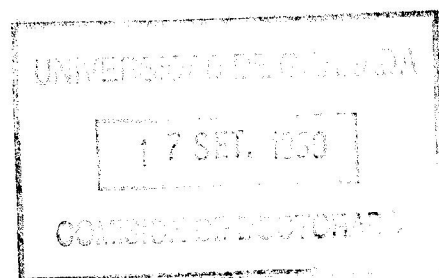
Posiblemente, al igual que la actividad Hup, la capacidad desnitrificadora de (*Brady*)*rhizobium* tenga importancia ecológica ya que su existencia permite a las formas



vegetativas crecer en condiciones de anaerobiosis, teniendo en cuenta, además, su papel como agente detoxificante ya que el  $\text{NO}_2^-$  es perjudicial.

Igualmente, la presencia en bacteroides, de forma simultánea, de un activo mecanismo de fijación de  $\text{N}_2$  y de desnitrificación, aunque contraproducente desde el punto de vista energético, podría ser de gran interés como mecanismo de supervivencia. (*Brady*)*rhizobium* podría activar uno u otro de acuerdo a las condiciones ambientales, lo que permitiría tanto su crecimiento en vida libre como el mantenimiento de la simbiosis (*Brady*)*rhizobium*-leguminosa durante las situaciones anóxicas que pudieran ocurrir en el suelo donde se cultivan.

## OBJETIVOS DE LA TESIS



Fijación de nitrógeno y utilización de nitrato por los bacteroides de (*Brady*)*rhizobium* son dos procesos de reducción que pueden competir por el poder reductor procedente de la oxidación de sustratos hidrocarbonados o por los electrones procedentes del sistema hidrogenasa (Hup). Además, la producción de hidrógeno por los nódulos y el efecto inhibitor del nitrato sobre la actividad nitrogenasa son los dos factores que más limitan la fijación biológica de  $N^2$  en la simbiosis (*Brady*)*rhizobium*-leguminosa. Por ello, sería interesante estudiar las relaciones que pudieran existir entre las actividades hidrogenasa y nitrato reductasa con el objeto de esclarecer el papel fisiológico de tales actividades en los cultivos de leguminosas.

Se ha demostrado que los nódulos de plantas de guisante inoculadas con cepas Hup<sup>-</sup> de *R. leguminosarum* expresaron mayor capacidad de reducir nitrato que los de plantas inoculadas con cepas Hup<sup>+</sup>. Sin embargo, en estos trabajos no se utilizaron cepas isogénicas de *R. leguminosarum*, así como, no se indicó si la relación inversa que parece existir entre las actividades NR y Hup a nivel de nódulo ocurría también a nivel de bacteroides y células en vida libre de *R. leguminosarum*.

Se sabe que, aunque la capacidad de las leguminosas para establecer simbiosis fijadoras de  $N_2$  con bacterias de los géneros (*Brady*)*rhizobium* permite a estas plantas utilizar el nitrógeno atmosférico para su nutrición, el máximo desarrollo y rendimiento de los cultivos de leguminosas no puede alcanzarse en ausencia de nitrógeno combinado. Además, el nitrato es la forma de nitrógeno inorgánico más abundante en el suelo y la enzima NR, que abre la ruta metabólica de su utilización, se localiza, además de en las

hojas, tallos y raíces, en los nódulos de las leguminosas. Sin embargo, existe gran controversia acerca de la implicación de la NR de los nódulos en la asimilación de nitrato por las leguminosas.

En los años 1975 y 1976, se demostró la localización citosólica y de membrana de la NR de los bacteroides y células en vida libre de *B. japonicum* y se purificó parcialmente y caracterizó sólo la NR soluble. Desde entonces, la información sobre la NR soluble y particulada de *B. japonicum* en vida libre y en simbiosis es inexistente. Además, aunque la baja presión parcial de oxígeno en el interior de los nódulos proporciona un ambiente adecuado para la expresión de la actividad NR respiratoria, aún no se ha demostrado si la actividad NR constitutiva de los bacteroides de *B. japonicum* es de tipo asimilatorio o respiratorio, si se trata de la misma enzima o son enzimas diferentes.

Este trabajo se ha dirigido, en primer lugar, al estudio de la utilización de nitrato en nódulos, bacteroides y células en vida libre de cepas Hup<sup>+</sup> y Hup<sup>-</sup> de *B. japonicum*, incluyendo las cepas isogénicas 122DES (Hup<sup>+</sup>) y PJ17 (Hup<sup>-</sup>). Se ha demostrado que algunas cepas de (*Brady*)*rhizobium* pueden utilizar el nitrato en condiciones anaeróbicas y reducirlo hasta la formación de gases nitrogenados, por lo que el estudio de la relación entre las actividades NR y Hup se completó analizando la capacidad de producción de óxido nitroso por los nódulos y bacteroides de las cepas 122DES y PJ17.

Por otra parte, se ha pretendido estudiar el metabolismo del nitrato en el citosol y bacteroides de los nódulos de plantas de soja y guisante.

Por último, dada la escasísima información existente sobre la NR de (*Brady*)*rhizobium*, en este trabajo se han iniciado los estudios de purificación parcial y caracterización de la NR aislada de la fracción soluble y de la de vesículas de membrana de células de *B. japonicum* en vida libre y en simbiosis, realizándose un estudio comparativo de la NR que se expresa en células cultivadas en vida libre y en simbiosis con el objeto de determinar el carácter asimilatorio o respiratorio de la NR constitutiva de los bacteroides.

## MATERIAL Y METODOS

