

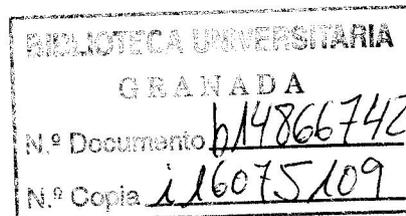
T 8/71

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS



**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES
modABC DE *Bradyrhizobium japonicum* IMPLICADOS EN
EL TRANSPORTE DE MOLIBDENO**



ALVARO TRESIERRA AYALA

TESIS DOCTORAL

2003



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha <u>12.8.03</u>
ENTRADA NUM. <u>2440</u>

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES
modABC DE *Bradyrhizobium japonicum* IMPLICADOS EN
EL TRANSPORTE DE MOLIBDENO

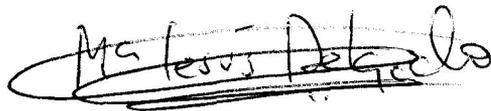
Memoria que presenta el Licenciado en Biología Alvaro Benjamín Tresierra Ayala para aspirar al grado de Doctor



Fdo. Alvaro Benjamín Tresierra Ayala

VºBº

Directores de la Memoria:



Fdo. María J. Delgado Igeño
Doctor en Ciencias Biológicas
Científico Titular del CSIC



Fdo. Eulogio J. Bedmar Gómez
Doctor en Ciencias Biológicas
Profesor de Investigación del CSIC

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LOS MICRONUTRIENTES Y EL SUELO	3
1.1.1. Consideraciones generales	3
1.1.2. Factores que afectan la disponibilidad de micronutrientes	5
1.2. EL MOLIBDENO EN EL SUELO	6
1.3. EL MOLIBDENO Y LAS PLANTAS	9
1.3.1. Síntomas de deficiencia	9
1.3.2. Síntomas de exceso	11
1.4. LAS MOLIBDOENZIMAS	12
1.4.1. Aspectos generales	12
1.4.2. Las molibdoenzimas microbianas	14
1.4.2.1. El molibdeno y la nitrogenasa	15
1.4.2.2. El molibdeno y la nitrato reductasa	21
1.5. LOS TRANSPORTADORES ABC	25
1.5.1. El transporte del molibdeno en bacterias	27
1.5.1.1. El transporte del molibdeno en <i>Escherichia coli</i>	28
1.5.1.1.1. El sistema de transporte de alta afinidad	30
1.5.1.1.2. El sistema de transporte del sulfato	34
1.5.1.1.3. El sistema de transporte aniónico no específico	35
1.5.1.2. El transporte del molibdeno en otras bacterias	36
1.5.1.3. El transporte del molibdeno en la familia <i>Rhizobiaceae</i>	39
1.6. OBJETIVOS	41

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS	45
2.1.1. Cepas bacterianas y plásmidos	45
2.1.2. Medios de cultivo	48
2.1.3. Antibióticos	50
2.1.4. Conservación de cepas bacterianas	51
2.1.5. Cultivo de células de <i>B. japonicum</i>	51
2.1.5.1. Cultivo aeróbico	51
2.1.5.2. Cultivo microaeróbico y anaeróbico	51
2.1.6. Incubación de células en microaerobiosis y anaerobiosis con nitrato	52
2.1.7. Obtención de las fracciones soluble (citosol) y particulada (membranas) de <i>B. japonicum</i>	54
2.1.8. Determinación del crecimiento de <i>B. japonicum</i> en medios de cultivo con diferentes concentraciones de Mo, sulfato, cisteína y tungsteno	55
2.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS	57
2.2.1. Determinación de actividad nitrato reductasa (NR)	57
2.2.2. Determinación de nitrito	57

2.2.3. Determinación de actividad β -galactosidasa	58
2.2.4. Determinación de proteína (Reactivo de BIO-RAD)	59
2.2.5. Detección inmunológica de proteínas	60
2.2.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS)	60
2.2.5.2. Transferencia a membranas de nitrocelulosa (Western blotting) y quimioluminiscencia	61
2.2.6. Detección de citocromos tipo <i>c</i> en membranas de <i>B. japonicum</i>	63
2.2.6.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS)	63
2.2.6.2. Transferencia a membranas de nitrocelulosa	64
2.2.6.3. Detección de citocromos tipo <i>c</i>	64
2.2.7. Determinación de la captación de Mo en cultivos de <i>B. japonicum</i>	64
2.3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	66
2.3.1. Obtención de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i> ("minipreps")	66
2.3.1.1. Método de Rusconi (Método rápido)	66
2.3.1.2. Método de la lisis alcalina	66
2.3.2. Obtención de ADN plásmidico de <i>B. japonicum</i>	68
2.3.3. Obtención de ADN total de <i>B. japonicum</i>	69
2.3.3.1. Método tradicional	69
2.3.3.2. Método Quantum Prep® (BIO-RAD)	70
2.3.4. Determinación de la concentración de ADN y ARN	72
2.3.5. Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción	72
2.3.6. Identificación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa	73
2.3.6.1. Electroforesis de ADN	73
2.3.6.2. Revelado del gel y fotografía	73
2.3.6.3. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción	74
2.3.7. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa: Qiaex II®	74
2.3.8. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación	75
2.3.8.1. Ligación a vectores de clonación	75
2.3.8.2. Generación de extremos romos de extremos 5' protuberantes	76
2.3.8.3. Eliminación de extremos 3' de fragmentos de restricción	77
2.3.8.4. Defosforilación de vectores de clonación	77
2.3.9. Transformación de células de <i>E. coli</i>	78
2.3.9.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> con RbCl	78
2.3.9.2. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	79
2.3.10. Transferencia de ADN a células de <i>B. japonicum</i> mediante conjugación	80
2.3.11. Experimentos de hibridación ADN-ADN	80
2.3.11.1. Transferencia de ADN a filtros de nylon o <i>Southern</i>	80
2.3.11.2. Transferencia de ADN en vacío	82
2.3.11.3. Marcaje de sondas no radiactivas	83
2.3.11.4. Hibridación ADN-ADN con sondas no radiactivas	84
2.3.12. Secuenciación de ADN	86
2.3.12.1. Purificación de ADN para secuenciación	86
2.3.12.2. Secuenciación manual con oligonucleótido	87
2.3.12.3. Secuenciación automática de ADN de doble cadena	89
2.3.12.4. Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas	90
2.3.13. Identificación del sitio de inicio de la transcripción	90

2.3.13.1. Aislamiento de ARN total de células de <i>B. japonicum</i>	90
2.3.13.2. Diseño y marcaje de los cebadores	93
2.3.13.3. Extensión reversa a partir de cebador	94
2.3.13.4. Separación de las cadenas extendidas de ADNc mediante electroforesis	95
2.4. INOCULACIÓN DE PLANTAS DE SOJA CON <i>B. japonicum</i>	
2.4.1. Esterilización de semillas y germinación	96
2.4.2. Soluciones nutritivas para el cultivo de las plantas	97
2.4.3. Cultivo de las plantas de soja	97
2.4.4. Medida de la capacidad de fijar nitrógeno	98
2.4.5. Preparación de citosol de los nódulos de soja	98
2.4.6. Determinación del contenido de leghemoglobina en los nódulos	99
2.4.7. Determinación del contenido de proteína en el citosol de los nódulos	100
2.4.8. Análisis de los parámetros fisiológicos de plantas de soja inoculadas con cepas de <i>B. japonicum</i>	100
2.4.8.1. Determinación del contenido de nitrógeno	101
3. RESULTADOS	
3.1. IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE LOS GENES <i>mod</i> IMPLICADOS EN EL TRANSPORTE DE Mo DE ALTA AFINIDAD.	105
3.1.1. Mutagénesis y selección de transconjugantes resistentes al clorato	105
3.1.2. Clonación de las regiones de ADN de las cepas mutantes que contienen la inserción Tn5 y elaboración de mapas de restricción	105
3.1.3. Identificación del gen homólogo a <i>modB</i> en una genoteca de <i>B. japonicum</i> .	107
3.1.4. Identificación y caracterización de otros genes que codifican la síntesis de proteínas transportadoras de Mo del sistema de alta afinidad.	112
3.1.5. Caracterización de las proteínas ModABC de <i>B. japonicum</i> .	119
3.1.6. Análisis de la región promotora de los genes <i>modABC</i>	121
3.1.7. Construcción de la cepa mutante 110-0512 de <i>B. japonicum</i> , afectada en el gen <i>modA</i>	123
3.1.8. Complementación de la cepa mutante 110-0512 de <i>B. japonicum</i> .	127
3.2. CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LAS CEPAS MUTANTES DE <i>B. japonicum</i> 110-0512 y GRMB1.	129
3.2.1. Caracterización de las cepas 110-0512 y GRMB1 en vida libre	129
3.2.1.1. Crecimiento de las cepas USDA110, 110-0512 y GRMB1 de <i>B. japonicum</i> en microaerobiosis y aerobiosis.	129
3.2.1.2. Efecto del Mo sobre el crecimiento de la cepa 110-0512 de <i>B. japonicum</i> en medio mínimo con nitrato.	131
3.2.1.3. Determinación de la actividad nitrato reductasa de las cepas USDA110 y 110-0512 de <i>B. japonicum</i> .	132
3.2.1.4. Determinación de la cinética de consumo de Mo por células de las cepas USDA110 y 110-0512 de <i>B. japonicum</i> .	133
3.2.1.5. Implicación del transportador del sulfato sobre el transporte del molibdeno.	134
3.2.1.5.1. Efecto del sulfato sobre la concentración mínima de Mo necesaria para que la cepa mutante 110-0512 de <i>B. japonicum</i> recupere el fenotipo silvestre.	135
3.2.1.5.2. Efecto de la cisteína sobre el crecimiento de las cepas de <i>B. japonicum</i> USDA110 y 110-0512, en presencia de diferentes concentraciones de molibdeno y sulfato.	137

3.2.1.5.3. Efecto de la altas concentraciones de sulfato sobre los requerimientos de Mo por las cepas USDA110 y 110-0512 de <i>B. japonicum</i> .	139
3.2.1.6. Detección de la proteína NapA en la mutante 110-0512 de <i>B. japonicum</i> .	141
3.2.1.7. Detección de citocromos de tipo c en las membranas de <i>B. japonicum</i> USDA110, GRNAP1 y 110-0512.	142
3.2.2. Caracterización de las cepas 110-0512 y GRMB1 de <i>B. japonicum</i> , en simbiosis con plantas de soja.	143
3.2.2.1. Efecto de la inoculación en plantas de soja con las cepas USDA 110, GRMB1 y 110-0512.	143
3.3. EFECTO DEL TUNGSTENO SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA CEPA USDA110 DE <i>B. japonicum</i> .	147
3.4. ESTUDIOS DE REGULACION DEL TRANSPORTE DE Mo EN <i>B. japonicum</i> .	148
3.4.1. Construcción de una fusión transcripcional <i>modA-lacZ</i> .	148
3.4.2. Efecto del Mo sobre la expresión de los genes <i>modABC</i>	148
3.5. EFECTO DEL MO SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE ALGUNAS MOLIBDOENZIMAS DE <i>B. japonicum</i> .	149
3.5.1. Efecto del Mo sobre la expresión de los genes <i>nap</i> de <i>B. japonicum</i>	149
3.5.2. Efecto del Mo sobre la expresión de los genes <i>nif</i> de <i>B. japonicum</i> .	151
4. DISCUSION	
4.1. Identificación y caracterización de los genes <i>modABC</i>	155
4.2. Caracterización fenotípica de las mutantes <i>mod</i> , en vida libre y en simbiosis	162
4.3. Estudios sobre la regulación de la expresión de los genes <i>modABC</i>	170
5. CONCLUSIONES	179
6. BIBLIOGRAFIA	183

AA Aminoácido	NR Actividad nitrato reductasa
ADN Ácido desoxirribonucleico	ONPG 2-Nitrofenil- β -D-galactopiranosido
ADNasa Desoxirribonucleasa	ORF (<i>Open reading frame</i>) Marco abierto de lectura
AMV-RT Transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar	pb Par de bases
Ap Ampicilina	PBS Buffer fosfato salino
ARA Actividad reductora de acetileno	PEG Polietilenglicol
ARN Ácido ribonucleico	PFN Peso fresco de nódulos
ARNasa Ribonucleasa	PIPES Piperacina-N,N'-bis (2-etanosulfonato)
BSA Albúmina sérica bovina	PMSF Fluoruro de ácido fenil sulfónico
c.p.m. Cuentas por minuto	PSN Peso seco de nódulos
Cm Cloramfenicol	PSP Peso seco de planta
CMM Concentración mínima de molibdato	PSY (<i>Peptone Salt Yeast Medium</i>) Medio definido <i>B. japonicum</i>
DEPC Dietilpirocarbonato	PVPP Polivinilpolipirrolidona
DMSO Dimetil sulfóxido	RBS Sitio de unión al ribosoma
dNTPs Desoxirribonucleótidos	SSC Solución de citrato sódico y cloruro sódico
DO Densidad óptica	SDS Dodecil sulfato sódico
DTT Ditioneitrólito	Sm Estreptomina
FAD Flavin adenin dinucleótido	Spe Espectinomicina
FeMoco Cofactor hierro molibdeno	Tc Tetraciclina
IPTG 1-Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido	TBE Tris-ácido bórico-EDTA
kb Kilobase (1000 pb)	TE Tris-EDTA pH 8,0
Km Kanamicina	TEMED Tetrametilendiamina
Lb Leghemoglobina	Tris Tris (hidroximetil) aminometano
LB Medio completo para <i>Escherichia coli</i>	UM Unidades Miller
Mo Molibdato	UV Ultravioleta
Moco Cofactor de molibdeno	YEM Medio completo de <i>B. japonicum</i>
MTAB Alquil-trimetil-bromuro de amonio	YEMN YEM suplementado de nitrato 10 mM
MOPS Ácido morfolino propanosulfónico	X-gal 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
[N] Contenido en nitrógeno	
NBT Azul de nitrotetrazolio	
NN Número de nódulos	
NNDA Ácido N-naftil-etilén-diamino	
NNEDA Ácido N-naftil-etilén-diamino	

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LOS MICRONUTRIENTES Y EL SUELO

1.1.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Los micronutrientes (también llamados oligoelementos o elementos traza), son sustancias esenciales para el normal crecimiento de los organismos y se les ha conferido dicha denominación puesto que son consumidos en muy pequeñas cantidades, lo cual se debe a que no son elementos plásticos y solo forman parte constitutiva de las enzimas o activadores de las mismas (Marschner et al. 1997).

Siete de los 16 nutrientes esenciales son denominados micronutrientes. Ellos son: boro (B), cobre (Cu), cloro (Cl), hierro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo) y zinc (Zn).

Como es de suponer, los suelos varían en su contenido de micronutrientes y generalmente poseen una menor cantidad de micronutrientes que de nutrientes primarios y secundarios (Williams y da Silva 2002). En la Tabla 1, se presentan datos sobre el contenido total de micronutrientes presentes en el suelo, medidos en partes por millón (ppm), debiendo recordarse que el contenido total de micronutrientes en el suelo no indica las cantidades disponibles para el crecimiento de los organismos, pero si indica la abundancia relativa y el potencial para abastecer un nutriente en particular.

Tabla 1. Contenido total de micronutrientes en el suelo.

NUTRIENTE	Rango en el suelo, ppm		
	Mundo	China	India
Boro	10 – 360	Trazas – 500	6 – 630
Cobre	1 – 960	3 – 300	2 – 960
Hierro	3000 – 100000	3000 ⁽¹⁾	20000 – 100000
Manganeso	30 – 5000	42 – 5000	37 – 4600
Molibdeno	0.01 – 18	0.16 – 6.0	0.01 – 18
Zinc	2 – 1600	3.790	2 – 1600

⁽¹⁾ Contenido medio de hierro total en el suelo.
No se dispone de información en cloro.

En el caso de las plantas, los micronutrientes son requeridos en cantidades que oscilan entre 0.01 a 0.05 ppm, cantidades equivalentes a entre algunos gramos a cientos de gramos por hectárea. No obstante, la deficiencia de cualquier micronutriente puede provocar problemas en el crecimiento de la planta y desarrollo de las raíces, repercutiendo por consiguiente en la producción, tanto en calidad como en cantidad (Mendel y Hansch 2002).

La carencia de estos elementos puede producirse:

- Por la falta del micronutriente en cantidad suficiente en el suelo, por lo que la planta no puede tomarlo en la cantidad adecuada. Esta carencia la podríamos llamar “absoluta” y se da raramente.
- Por no encontrarse en el suelo en estado asimilable, es decir, disponible para el organismo, por estar “bloqueado” en algún componente del suelo o por la presencia de otros elementos.

Generalmente, los micronutrientes no se aplican al suelo mediante el uso de fertilizantes comerciales, a pesar de que su extracción del suelo ha proseguido durante siglos sin ninguna reposición sistemática, agotándose sus existencias, con el subsiguiente efecto sobre la productividad vegetal. Así mismo, la utilización de fertilizantes químicos que estimulan un mayor rendimiento de los cultivos, junto a la pérdida de micronutrientes por meteorización, lixiviación, el uso cada vez menor de estiércol animal y de otros productos fertilizantes naturales, en comparación con el uso de fertilizantes químicos, cada vez más puros, entre otros, está contribuyendo al agotamiento acelerado de las reservas de oligoelementos en los suelos. El suministro mezquino de oligoelementos a las plantas trae como consecuencia una limitación del desarrollo y productividad vegetal (Marschner 1997).

1.1.2. FACTORES QUE AFECTAN LA DISPONIBILIDAD DE MICRONUTRIENTES.

Son varios los factores que pueden afectar a la disponibilidad, y por lo tanto, a la absorción de micronutrientes por las plantas. Los más destacados son:

- **pH del suelo:** tiene una enorme influencia. Un pH alto disminuye la solubilización y absorción del cobre, zinc, hierro y cobalto, y específicamente la del manganeso, aumentando, en cambio, la del molibdeno y azufre.
- **Textura:** es otro de los factores que influyen en el contenido de micronutrientes en el suelo. Así, en suelos de texturas gruesas (muy arenosos) es más frecuente la carencia de manganeso, cobre, zinc, boro y molibdeno, debido a que estos nutrientes son lavados en estos suelos con suma facilidad.
- **Contenido de materia orgánica:** tiene gran influencia sobre la disponibilidad de micronutrientes. Diferentes autores han determinado cantidades crecientes de micronutrientes en el suelo al aumentar el contenido de materia orgánica del mismo, aunque en ocasiones los resultados han sido contrarios. Los suelos orgánicos se encuentran entre los suelos que con más frecuencia sufren las deficiencias en uno o más micronutrientes. En algunos casos, los análisis de suelo presentan contenidos elevados en micronutrientes y, sin embargo, las plantas analizadas presentan contenidos inferiores a los de otros suelos. Hay 2 posibles razones para esto:
 - Baja disponibilidad o elevada fijación de los micronutrientes en los suelos orgánicos. Hay que tener en cuenta que en la fracción orgánica del suelo existen ácidos húmicos de baja movilidad y que pueden retener fuertemente los metales y ácidos fúlvicos, que formarían complejos con mayor movilidad. Si dominan los ácidos húmicos sobre los fúlvicos, disminuye la disponibilidad de micronutrientes.

- Bajo contenido total. Esto se puede comprender si tenemos en cuenta que las concentraciones de elementos se dan sobre la base del peso (mg/Kg). Sin embargo, el volumen de un suelo orgánico es, para un mismo peso, superior a la de un suelo mineral, por lo que el contenido total es menor en el orgánico para una misma concentración en mg/Kg.

- **Otros factores:** la actividad microbiológica, el drenaje de los suelos, las condiciones de oxidación-reducción, las condiciones climáticas y las variaciones estacionales intervienen, interaccionadas, en la disponibilidad de micronutrientes. La deficiencia de zinc puede ser ocasionada por microorganismos que compiten con las plantas por este elemento, presente en pequeñas cantidades. Los microorganismos también influyen al liberar iones durante la descomposición de la materia orgánica. El proceso de oxidación-reducción afecta de forma más importante al manganeso y al hierro que al resto de micronutrientes, pero la reducción provocada por un alto contenido de humedad puede aumentar la disponibilidad del cobre, molibdeno y cinc, pudiendo llegar a niveles tóxicos. La temperatura afecta en la medida que se ha comprobado que temperaturas elevadas en el suelo ocasionan una fuerte absorción de micronutrientes (Mendel 1997).

1.2. EL MOLIBDENO EN EL SUELO

El Mo de la litosfera procede de la descomposición de las rocas que lo contienen y su contenido varía de 0.2 a 5 ppm, estando el valor promedio cercano a 2 ppm.

El Mo existe en el suelo bajo tres formas: disuelto en la solución del suelo como anión molibdato (MoO_4^{2-}), adsorbido en forma intercambiable y no intercambiable, como constituyente de los minerales del suelo y de la materia orgánica (Williams y da Silva 2002).

El Mo soluble: Solamente el Mo(IV) bajo la forma de molibdato, es fácilmente soluble y estable en soluciones acuosas y es la única fuente relevante de Mo para los sistemas biológicos. La concentración de ión molibdato en la solución del suelo es muy

pequeña, variando su disponibilidad con el pH. Esta aumenta con el pH y si se encala un suelo incrementando su pH de 5.4 a 6.4, puede aumentar el contenido foliar de Mo en 500%.

En la Tabla 2 se presenta el contenido y la solubilidad de las principales fuentes de Mo.

Tabla 2. Fuentes comunes de molibdeno.

FUENTE	PORCENTAJE DE Mo	SOLUBILIDAD EN AGUA
Molibdato de amonio	54	Sí
Molibdato de sodio	39 – 41	Sí
Acido molíbdico	47.5	Ligeramente

El Mo intercambiable. La absorción del ión molibdato se parece a la del sulfato y fosfato. Es probable que se intercambie con iones hidroxilos de los minerales arcillosos y óxidos hidratados. Los iones sulfato compiten débilmente y los iones fosfato fuertemente con los iones molibdatos por sitios de intercambio. En este sentido se ha observado que la absorción de molibdato aumenta al caer el pH y que la absorción cause un aumento en el pH de la solución de equilibrio. Además, el ión molibdato se ha reportado fijado en forma no-intercambiable por óxidos de hierro hidratados, durante el proceso de laterización.

El Mo no intercambiable. Se encuentra en rocas ígneas como molibdenita (MoS_2) y como el molibdato primario powelita (CaMoO_4) y wulfenita (MoO_4Pb), también se encuentra presente en la olivina y minerales arcillosos. En el suelo el Mo se encuentra presente en la materia orgánica y en óxidos hidratados.

Por consiguiente, la mayor parte del Mo se encuentra en formas no disponibles para los organismos. La mayor o menor disponibilidad, tal como se ha mencionado, está determinada por el pH del suelo y los contenidos en óxidos de hierro, aluminio y titanio.

La materia orgánica o las cantidades de fosfatos o sulfatos tienen menor influencia.

A diferencia de otros microelementos (Fe, Mn, Cu, Zn), su disponibilidad aumenta al hacerlo el pH. De esta forma se explica que no existan deficiencias en suelos básicos, así como que en los suelos ácidos al encalarse aumentan la cantidad de Mo disponible.

En suelos ácidos y con contenidos elevados de óxidos de hierro y aluminio, la retención del anión MoO_4^{2-} es elevada. La fijación es tanto más intensa cuanto mayor es el contenido de ambos óxidos y menor el pH. La razón es que los óxidos de aluminio y hierro tienen la capacidad de crear cationes y de fijar aniones en las condiciones habituales de pH de los suelos agrícolas.

En relación con la materia orgánica, se han obtenido resultados contradictorios, es decir, existen casos en que aumenta la disponibilidad con la materia orgánica y otros en que disminuye.

Se ha comprobado que la adición de grandes cantidades de fertilizantes fosfatados en suelos ácidos favorece la absorción de Mo por la planta. Sin embargo, la adición de cantidades importantes de sulfatos provoca una acción depresora de la absorción de Mo.

Los suelos arenosos presentan deficiencias de Mo con más frecuencia que los suelos de textura fina.

Los contenidos de Mo en la corteza terrestre oscilan entre 0,2 y 5 mg/Kg, alcanzando hasta 200 mg/Kg en casos extremos (suelos de origen volcánico o cercanos a yacimientos de molibdenita); sin embargo, se ha logrado establecer como valor promedio 15µg de Mo/Kg de suelo (Maier y Graham 1988). Por otro lado, existen muchos casos de ambientes naturales donde este micronutriente constituye un factor limitante para la fijación de nitrógeno atmosférico, tal es el caso del crecimiento de los simbioses *Rhizobium*-trébol en pastos de Sud-Africa y Nueva Zelanda, así como el crecimiento de *Sinorhizobium*-alfalfa en ciertos suelos de Nueva Jersey.

Cabe mencionar que la mayor parte del Mo presente en el suelo es insoluble, solamente el Mo(IV) bajo la forma del oxianión molibdato, es fácilmente soluble y estable en soluciones acuosas y es la única fuente relevante de Mo para los sistemas biológicos, de modo que en adelante el símbolo Mo hará referencia al molibdato.

1.3. EL MOLIBDENO Y LAS PLANTAS (Marschner 1997).

- El Mo se absorbe bajo la forma de anión MoO_4^{2-} . Compite a nivel de absorción con sulfatos y fosfatos. Las plantas requieren pequeñas cantidades (menos de 1 mg de Mo/Kg de material seco, o lo que es igual, 40-50 g/Ha, que son suficientes, en general, para cubrir las necesidades de todos los cultivos).
- El Mo forma parte de la enzima nitrato-reductasa, catalizadora de la reducción de nitratos, por lo que las plantas con carencia de Mo tienen acumulaciones de nitratos, mientras que faltan aminoácidos (fundamentalmente, ácido glutámico y glutamina). Así la falta de Mo tiene repercusiones similares sobre la falta de N.
- El Mo también participa en el sistema enzimático nitrogenasa por lo que influye en el rendimiento y velocidad de fijación del N atmosférico. Así el Mo es requerido más cuando las leguminosas están en condición de fijación por la simbiosis leguminosa-*Rhizobium*, que en leguminosas cultivadas sin simbiosis.
- El Mo participa en la sulfito reductasa y en la xantín oxidasa.
- Su deficiencia repercute negativamente en la formación de ácido ascórbico, en el contenido en clorofila y en la actividad respiratoria.
- Las plantas superiores pueden crecer en ausencia de Mo si se les suministra el nitrógeno en forma de ión amonio.

1.3.1. SINTOMAS DE DEFICIENCIA

Al parecer, los síntomas causados por la deficiencia de Mo varían según el tipo de planta, en algunos casos se presentan como un amarillamiento general y una falta de crecimiento de la planta, mientras que en otras ocasiones el síntoma característico es que las hojas, aún manteniendo el color verde, se deforman, causado por la muerte de alguna de las células del parénquima. No induce formas específicas en las hojas, sino que frena su desarrollo en la fase embrionaria.

- Las hojas tienen un tamaño más reducido, presentando clorosis y moteados de color marrón (en toda o parte de la hoja), surgen zonas necróticas en la punta de la hoja, que se extienden a los bordes. Por último, se muere la hoja, provocando una caída prematura.
- La deficiencia en Mo repercute en un contenido anormal de NO_3^- en hojas y, por lo tanto, influye en el metabolismo del N. La deficiencia de Mo promueve la aparición de síntomas de deficiencia de nitrógeno en las leguminosas como la soja y la alfalfa, debido a que la carencia de este elemento dificulta la fijación de nitrógeno atmosférico. En consecuencia, las producciones son menores.

Tabla 3. Respuesta de la soja al molibdeno en suelos de diferente pH.

pH del suelo	Rendimiento (Ton./Ha.)	
	Con molibdeno	Sin molibdeno
5,6	2,76	2,15
5,7	2,89	2,28
6,0	2,69	2,35
6,2	2,82	2,69
6,4	2,76	2,82

- En *Citrus*, la carencia recibe el nombre de "yellow spot", puesto que se manifiesta con manchas amarillas en grupos con aspecto brillante, de forma elíptica o circular, situadas entre las nervaduras. En estados avanzados de la deficiencia las manchas se necrosan, se caen y originan perforaciones en las hojas. Otra característica de las manchas es que están dispuesta de forma simétrica respecto al nervio central. Las manchas pueden aparecer en cualquier época del año y nos indican la deficiencia del elemento.

- En el ciruelo, las hojas tienen un tamaño más pequeño, presentando manchas de color pardo claro de tejidos muertos en las extremidades a lo largo del borde. Pueden adoptar aspecto moteado.
- En el manzano, la deficiencia se manifiesta en las hojas jóvenes que se vuelven cloróticas, mientras que las adultas se necrosan en el ápice y en el borde, presentando tendencia a curvarse hacia abajo.
- En el tomate, las hojas inferiores presentan moteado, estando los bordes necróticos y curvados.
- En la coliflor las hojas reducen su desarrollo y se deforman.

1.3.2 SINTOMAS DE EXCESO

- Los casos de toxicidad no son muy frecuentes, habiéndose descrito plantas crecidas en zonas de minas, con hasta 200 mg /Kg de hoja sin síntomas de toxicidad.
- Pueden surgir casos de toxicidad por Mo en el ganado por ingerir forrajes con alto contenido en este elemento. En estos casos se producen trastornos intestinales. El Mo afecta también el metabolismo del cobre; por ejemplo, los animales que se alimentan con pasto de bajo contenido de molibdeno pueden desarrollar toxicidad de cobre si los niveles de este elemento son suficientemente altos. Por otro lado, los animales que comen pasto con un alto contenido de Mo pueden desarrollar deficiencia de cobre, dando lugar a la enfermedad denominada "molibdenosis", la cual puede corregirse mediante el suministro de sulfato de cobre.
- La corrección de suelos con exceso en Mo es siempre más difícil que la corrección de las carencias. Una solución es utilizar fertilizantes sulfatados que reducen la absorción de Mo por parte de la planta.

1.4. LAS MOLIBDOENZIMAS

1.4.1. ASPECTOS GENERALES

La actividad de algunas enzimas depende solamente de su estructura como proteínas, mientras que otras necesitan, además uno o más componentes no proteicos, llamados cofactores. El cofactor puede ser un ión metálico o bien una molécula orgánica (coenzima), aunque algunas enzimas necesitan de ambos (Mendel y Hansch 2002).

El complejo enzima-cofactor catalíticamente activo recibe el nombre de holoenzima, pero cuando se separa el cofactor, la proteína restante, que por sí misma es inactiva catalíticamente, se designa con el nombre de apoenzima.

Tabla 4. Algunas de las enzimas que contienen iones metálicos o los necesitan como cofactores.

ION	ENZIMAS
Zn ²⁺	Alcohol-deshidrogenasa Anhidrasa carbónica Carboxipeptidasa
Mg ²⁺	Fosfohidrolasas Fosfotransferasas
Mn ²⁺	Arginasa Fosfotransferasas
Fe ²⁺ o Fe ³⁺	Peroxidasa Catalasa
Cu ²⁺	Tirosinasa Citocromooxidasa
K ⁺	Piruvatoquinasa
Na ²⁺	ATPasa de la membrana plasmática
Mo ⁻	Nitrato reductasa Dinitrogenasa Formato deshidrogenasa Trimetilamina-N-óxido reductasa Dimetilsulfóxido reductasa Biotinsulfóxido reductasa

La tabla anterior reúne algunas enzimas que precisan de iones metálicos como cofactores. En tales enzimas, el ión metálico puede actuar como: 1) Centro catalítico primario; 2) como grupo puente para reunir el sustrato y la enzima, formando un complejo de coordinación; o 3) como agente estabilizante de la conformación de la proteína enzimática en su forma catalíticamente activa.

Algunos investigadores optan por denominar como metaloenzimas, a las enzimas que precisan de iones metálicos, entre las cuales destacan las molibdoenzimas, aquellas que contienen Mo como cofactor.

Las enzimas que contienen Mo son alrededor de 40 e intervienen en una variedad de reacciones de oxidación/reducción, ya que catalizan hidroxilaciones oxidativas o deshidroxilaciones reductivas. Las enzimas oxidativas son llamadas también molibdeno-hidroxilasas y las enzimas reductivas, molibdeno deshidroxilasas (Rajagopalan y Johnson 1992). La nitrogenasa y la nitrato reductasa desempeñan roles críticos en el ciclo del nitrógeno. Otras molibdoenzimas, tales como la formato deshidrogenasa, la nitrato reductasa, la dimetilsulfóxido (DMSO) reductasa y la trimetilamina N-óxido (TMAO) reductasa catalizan reacciones rédox que permiten crecer a ciertos microorganismos bajo condiciones anaeróbicas, usando formato como donador de electrones y nitrato, DMSO y TMAO, como aceptores de electrones (Williams y da Silva 2002).

Con excepción de la nitrogenasa, que contiene un cofactor hierro-molibdeno, en todas las demás molibdoenzimas, el Mo es parte de una estructura organometálica llamada cofactor de molibdeno (Moco).

Algunas observaciones indican que los cofactores Mo son sintetizados en un sitio (libres o unidos a proteína) y luego son insertados en la apoproteína. El Mo por sí solo parece ser biológicamente inactivo, salvo que esté conformando el cofactor. El molibdeno se combina con diversas apoproteínas y es responsable de su correcta inserción dentro de la holoenzima, de modo que el centro Mo puede interactuar con otros componentes de la cadena de transporte de electrones de la enzima. Después de la inserción, la xantina deshidrogenasa y la aldehído oxidasa, pero no la nitrato reductasa

ni la sulfito oxidasa, requieren la adición de un ligando de azufre terminal al sitio donde está ubicado el Mo, lo cual es catalizado por la sulfuro transferasa ABA3.

Solamente cuatro molibdoenzimas han sido encontradas en plantas: (i) la nitrato reductasa que cataliza una fase en la asimilación de nitrógeno orgánico, (ii) la aldehído oxidasa que cataliza el último paso en la biosíntesis de las fitohormonas ácido abscísico y ácido indolil acético, (iii) la xantina deshidrogenasa que está involucrada en el catabolismo de purinas, en las reacciones de estrés y tiene importancia en ciertas leguminosas en las cuales es crucial para la síntesis de ácido alantoico como forma de transporte de nitrógeno y, (iv) la sulfito oxidasa que probablemente está involucrada en la detoxificación del exceso de sulfito. (Hille 1996, Kisker et al. 1997, Mendel 1997, Mendel y Hansch 2002). De modo que en las plantas, las molibdoenzimas desempeñan roles importantes en las vías de asimilación del nitrato (Guerrero et al. 1981), en el metabolismo de purinas (Mendel y Müller 1976) y en la biosíntesis de ácido abscísico (Walker-Simmons et al 1989).

Gran parte del Mo se encuentra en la enzima nitrato reductasa de las raíces y tallos de las plantas superiores, la que cataliza la reducción del ión nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-). La nitrato reductasa de las plantas superiores se encuentra como una molibdoflavoproteína soluble, que en las hojas puede estar asociada con la envoltura de los cloroplastos. La enzima oxidada contiene casi siempre Mo^{+5} .

Además de las plantas, las molibdoenzimas son también importantes para el metabolismo del ser humano, animales y microorganismos (Johnson y Wadman 1995).

1.4.2. LAS MOLIBDOENZIMAS MICROBIANAS

Los microorganismos producen un número limitado de molibdoenzimas bajo determinadas condiciones fisiológicas y por consiguiente, requieren de la presencia de cantidades traza de Mo en el medio.

Este elemento es esencial en algunas rutas metabólicas presentes en casi todos los microorganismos (Rajagopalan y Johnson, 1992). Algunas de estas rutas contribuyen a la generación de ATP, por citar como ejemplo, el proceso de respiración

anaeróbica en el que se utilizan, en lugar del oxígeno, otros aceptores de electrones como nitrato, dimetilsulfóxido y óxido de trimetilamina (Stewart 1988). La reducción asimilatoria de nitrato o dinitrógeno a amonio por parte de las molibdoenzimas nitrato reductasa y nitrogenasa, respectivamente, también requiere de Mo. La síntesis de los cofactores FeMo-co o Mo-co y posterior activación de apoenzimas a formas activas de molibdoenzimas requiere que la célula realice secuencialmente, el transporte de Mo, la activación del Mo y, finalmente la incorporación del Mo activado en una parte orgánica, la molibdopterina (MPT) o la molibdopterina guanina dinucleótido (MGD) (Rajagopalan y Johnson 1992, Grunden y Shanmugam 1997, Hasona et al. 1998).

Tal como se ha mencionado anteriormente, la concentración de Mo soluble presente en la mayoría de los suelos es muy baja, en consecuencia, los organismos han desarrollado sistemas específicos de alta afinidad para captarlo, luego transportarlo hacia el interior celular y posteriormente metabolizarlo (Self et al. 2001).

1.4.2.1. EL MOLIBDENO Y LA NITROGENASA

La capacidad de un organismo para fijar nitrógeno atmosférico requiere la síntesis y la participación del complejo enzimático de la nitrogenasa. Desde hace muchos años ha existido considerable interés por la determinación de la estructura de la nitrogenasa, a fin de comprender el modo como el nitrógeno atmosférico se convierte en amonio.

Bortels (3) descubrió la existencia de una relación entre la fijación del N₂ y el Mo, cuando demostró que el crecimiento de *Azotobacter vinelandii* bajo dependencia del N₂ requería de Mo, pero el crecimiento de las células bajo dependencia de amonio, no lo requería.

La estructura, composición y propiedades del complejo enzimático nitrogenasa son similares en todas las especies de las que se ha aislado. Mortenson (1966) determinó que dos componentes proteicos estaban involucrados en la composición de éste complejo en *Clostridium pasteurianum* (Fig 1) y posteriormente, Tso et al. (1972) reportaron el aislamiento de dos metaloproteínas: la molibdoferroproteína,

molibdoferredoxina, molybdofer, proteína del MoFe, dinitrogenasa o componente I y la ferroproteína, azofer, proteína del Fe, dinitrogenasa reductasa o componente II. Ambos componentes contienen hierro, además, tal como se ha mencionado anteriormente, el Mo es requerido como parte importante de la enzima nitrogenasa, específicamente constituye parte de la molibdoferroproteína o componente I. El Mo junto con el hierro constituyen el cofactor conocido como cofactor hierro-molibdeno (FeMo-co), el cual, al parecer está asociado con el sitio activo de la enzima y es el centro donde ocurre la reducción real del dinitrógeno (Shah et al, 1984).

La composición del FeMo-co es MoFe_7S_9 homocitrato y se presentan dos copias de FeMo-co por molécula de nitrogenasa.

Alrededor de 20 genes han sido implicados en la formación y en la actividad de la nitrogenasa de *Klebsiella pneumoniae* (Roberts y Brill 1980). La mayoría de estos genes *nif* están involucrados en la síntesis de la nitrogenasa funcional. Los genes estructurales D y K codifican al componente I, mientras que el gen estructural H codifica al componente II. Los productos de la traducción primaria de los genes estructurales de la nitrogenasa no son competentes para la reducción del sustrato. Productos de determinados genes *nif* son requeridos para el procesamiento de productos inmaduros a sus formas activas. También existen elementos regulatorios específicos de los genes *nif* que son responsables de la activación e inhibición de la expresión de los genes *nif* bajo condiciones fisiológicas apropiadas. Los genes *nifA* y *nifL* codifican elementos transcripcionales que regulan la expresión de los operones *nif* en respuesta al nitrógeno fijado. El resto de los genes son requeridos para la síntesis del FeMo-co, para la síntesis de los clusters hierro-azufre y la maduración de la dinitrogenasa.

Los productos de varios genes, incluyendo *nifE*, *nifN*, *nifV*, *nifB*, *nifX* y *nifQ* están involucrados en la síntesis del cofactor.

Estructura de la nitrogenasa:

A)- Componente I:

Esta metaloproteína es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ de aproximadamente 220 a 270 kDa. La subunidad α es codificada por el gen *nifD*, mientras que la subunidad β está

codificada por el gen *nifK*. Existe una gran homología en la secuencia de aminoácidos de la subunidad α con cinco residuos de cisteína conservados en cada polipéptido y tres residuos de cisteína conservados en la subunidad β . Por tanto, esta metaloproteína contiene 16 restos de cisteína disponibles para unirse a los centros metálicos.

Esta proteína contiene 2 átomos de Mo, 24 - 32 átomos de Fe y 24 - 32 átomos de S lábiles, por molécula. Diversos estudios sugieren que existen seis centros metálicos, cuatro centros del tipo 4Fe-4S denominados centros P y dos del tipo Fe_6MoS_8 , llamados centros M o cofactor de hierro y molibdeno.

B)- Componente II:

Esta metaloproteína es un dímero conformado con dos idénticas subunidades de aproximadamente 30 kDa cada una. Su secuencia de aminoácidos está altamente conservada entre las diversas nitrogenasas de las diferentes especies bacterianas, tal como se observa en la gran homología del gen *nifH* que codifica esta proteína en *Rhizobium meliloti* y *Klebsiella pneumoniae*. Este dímero se une de manera simétrica a un centro 4Fe-4S.

Esta proteína actúa como reductor específico de la Mo-Fe proteína, que es donde tiene lugar la reducción del nitrógeno. Para que la transferencia de electrones tenga lugar, es necesario que esta proteína se una a MgATP en dos lugares de enlace. Este fenómeno produce una alteración en la conformación de la proteína, una disminución de su potencial redox y un aumento de la sensibilidad al oxígeno.

Cada subunidad de esta proteína contiene cinco residuos de cisteína que se conservan durante la catálisis y síntesis de la Mo-Fe proteína.

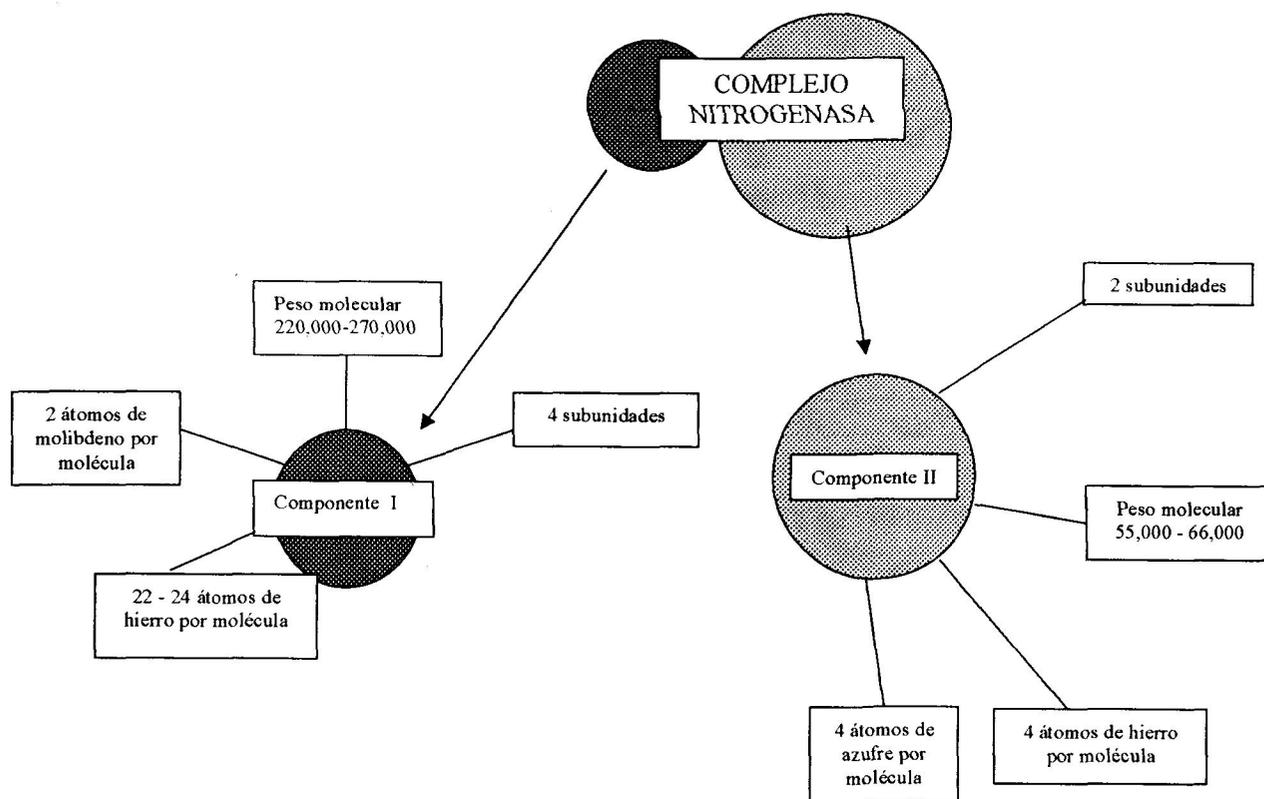


Fig 1. Características de los componentes I y II de la nitrogenasa.

Bajo ciertas condiciones de crecimiento, algunas bacterias fijadoras de nitrógeno pueden sintetizar nitrogenasas carentes de Mo; estas nitrogenasas alternativas contienen vanadio (más hierro) o hierro solo. Estas enzimas también presentan cofactores similares al FeMo-co, tal es el caso del FeVa-co en la nitrogenasa con hierro y vanadio y, la nitrogenasa en la que el hierro es el único metal que forma parte del centro activo.

Azotobacter vinelandii, una bacteria aeróbica del suelo, fijadora de nitrógeno, fue el primer diazótrofo que mostró tener 3 distintas nitrogenasas. Una de estas nitrogenasas es la nitrogenasa clásica que contiene Mo (nitrogenasa 1), mientras que las otras dos son nitrogenasas independientes del Mo (nitrogenasas 2 y 3). La nitrogenasa 1 es expresada en medio libre de nitrógeno pero conteniendo Mo y ha sido ampliamente caracterizada. La nitrogenasa 2 es una nitrogenasa que contiene vanadio y es expresada

en medio libre de nitrógeno y deficiente de Mo, pero conteniendo vanadio (Bishop et al. 1988). La nitrogenasa 3 es una nitrogenasa que contiene hierro y es expresada en un medio sin nitrógeno y deficiente en Mo y vanadio (Bishop et al 1990).

A pesar que los casos conocidos en los cuales la deficiencia de Mo puede limitar el proceso de fijación de nitrógeno en ambientes naturales (Coventry et al. 1885, Shah et al. 1984), la captación y el metabolismo intracelular del Mo por la mayoría de bacterias fijadoras de N₂, no ha sido estudiado ampliamente. Los primeros estudios de captación de Mo fueron realizados en *Azotobacter* spp. por Keeler y Varner (1957). Ellos encontraron que la captación de Mo no era dependiente de la fijación de N₂.

Anabaena variabilis ATCC 29413, una cianobacteria que fija nitrógeno bajo una variedad de condiciones ambientales, posee tres sets de genes de la nitrogenasa: los clusters *nifI* y *nifII* que codifican molibdonitrogenasas y, el cluster *vnf* que codifica una nitrogenasa dependiente de vanadio. Bajo condiciones aeróbicas de crecimiento, la fijación de nitrógeno depende de la diferenciación de heterocistos y de la expresión de los genes de la nitrogenasa dependiente de Mo o de la nitrogenasa dependiente de vanadio. Esta última, la cual funciona cuando las células crecen con vanadio y en ausencia de Mo, es codificada por el cluster *vnfDGKEN* que es similar al de *Azotobacter vinelandii* y al igual que en esta bacteria, estos genes son reprimidos por Mo (Thiel, 1996).

Los diazótrofos en lo que se ha demostrado la presencia de sistemas de la nitrogenasa independiente de Mo incluyen a diversos microorganismos fisiológica y filogenéticamente diversos, tales como: *Clostridium pasteurianum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Anabaena variabilis*, *Rhodospirillum rubrum*, *Heliobacterium gestii*, *Azospirillum brasilense*, etc.

Las nitrogenasas independientes del Mo resultan ser de gran ventaja en ambientes deficientes de molibdeno, pese a que no es frecuente la deficiencia de este elemento en el suelo, puede llegar a ser limitante en la fijación de nitrógeno, bajo condiciones naturales en las que el vanadio es más abundante que el molibdeno.

En ambientes con niveles de temperatura cercanos a 30 °C, la nitrogenasa convencional o clásica es 15 veces más activa que la dependiente del vanadio o hierro

(nitrogenasas 2 y 3, respectivamente), es decir, si el 75% del flujo de electrones se utiliza en la reducción del nitrógeno, en ambas nitrogenasas 2 y 3, sólo utilizan el 50%, el resto se utiliza en la formación de hidrógeno. Sin embargo, esta relativa eficacia de la nitrogenasa convencional es revertida a 5 °C cuando las otras nitrogenasas presentan una eficiencia seis veces mayor que la convencional.

A pesar de la existencia de casos en los cuales, la deficiencia de Mo puede limitar el proceso de fijación de nitrógeno en medios ambientes naturales, la captación y el metabolismo intracelular de Mo por la mayoría de bacterias fijadoras de N₂, no ha sido estudiado ampliamente.

Los primeros estudios sobre la captación de Mo fueron realizados en *Azotobacter* spp. por Keeler y Varner (21), quienes determinaron que la captación de Mo no era dependiente de que las células eran fijadoras de N₂.

En *Klebsiella pneumoniae*, mutantes deficientes en el cofactor hierro-molibdeno, requieren altos niveles de Mo para la actividad nitrogenasa ya que tienen lesiones en el gen *nifQ* (Imperial et al. 1984).

: Actividades máximas de la nitrogenasa de una cepa silvestre de *K. pneumoniae* se obtuvieron a concentraciones de Mo sobre 100nM mientras que se requerían 10² a 10³ veces más Mo para alcanzar la actividad máxima de la nitrogenasa de cepas Mol⁻.

El fenotipo Nif⁻ de mutantes Mol⁻ y NifQ⁻, parece ser el resultado de una disminución en la capacidad de incorporar Mo en el componente I de la nitrogenasa. En mutantes NifQ⁻, el componente I de la nitrogenasa deficiente de Mo, desreprimido con bajos niveles de Mo, puede ser parcialmente activado en la ausencia de la síntesis proteica por la adición de altos niveles de Mo. La actividad nitrogenasa fue recuperada en la misma magnitud tanto en la cepa silvestre como en las mutantes NifQ⁻ y Mol⁻, indicando que no existen diferencias funcionales entre las cepas silvestre y mutantes con respecto al componente I de la nitrogenasa cuando el Mo está en exceso. Por consiguiente, la mutación *mol* no afecta la síntesis de la nitrogenasa.

1.4.2.2. EL MOLIBDENO Y LA NITRATO REDUCTASA

El rol universal del Mo en la reducción del nitrato ha sido reconocido desde hace mucho tiempo. Casi todas las nitrato reductasas que han sido descritas hasta la actualidad contienen Mo como cofactor como una unidad estructural (Zumft 1997). Sin embargo, recientemente, nuevas enzimas reductoras del nitrato que no contienen un cofactor de Mo, han sido descubiertas en bacterias que reducen el vanadato y el hierro (Antipov et al 1998, Murillo et al 1999). Se especula que estas nitrato reductasas alternativas podrían ser utilizadas por bacterias que viven bajo condiciones inusuales (por ejemplo, extremas), tales como condiciones de pH y temperaturas extremas y, elevadas concentraciones de sustancias tóxicas (Antipov et al. 2003).

La reducción del nitrato en las bacterias puede ser asimiladora y no asimiladora.

- La asimilación del nitrato se realiza mediante el sistema Nas, el cual requiere un sistema de transporte (NasFED) y su reducción a amonio mediante la nitrato reductasa (NasCA) y la nitrito reductasa (NasB) asimiladoras, que son enzimas citosólicas que se inducen por nitrato o nitrito, respectivamente y no generan fuerza motriz de protones (FMP).

El proceso de reducción asimilatoria del ión nitrato comienza con el transporte del mismo hacia el interior celular. Butz y Jackson (1977) postularon inicialmente que la NR catalizaría el transporte del nitrato y su reducción posterior a nitrito; sin embargo, el aislamiento de una proteína de 45 kDa de la membrana citoplasmática de la cianobacteria *Synechococcus* PCC7942 crecida con nitrato, junto con la clonación del gen y la obtención de mutantes que no sintetizaban esa proteína, indicó que la incorporación y reducción del nitrato son catalizadas por proteínas diferentes (Omata et al. 1989).

La nitrato reductasa asimilatoria requiere para su funcionamiento dos electrones. Aunque en eucariotas el NADH es el donador de electrones más común, se ha encontrado enzimas bioespecíficas que pueden utilizar tanto NADH como NADPH y otras específicas de NADPH. Los procariontes pueden utilizar tanto NADH como sucede con *Rhodobacter capsulatus* (Martínez-Luque et al. 1991) o ferredoxina en el caso de

bacteroides de *Bradyrhizobium* sp. (Alikulov et al. 1980), aunque es frecuente tener que emplear donadores no fisiológicos de electrones para poner de manifiesto la actividad nitrato reductasa.

Independientemente de su origen, la mayoría de nitrato reductasas analizadas se presentan como homodímeros de tamaño molecular entre 210-230 kDa, cuyos monómeros tienen un tamaño molecular entre 100 y 120 kDa. Cada subunidad tiene tres grupos prostéticos redox: FAD, citocromo b_{557} y un cofactor de Mo (MoCo) formado por Mo y una pterina fosforilada. El MoCo es responsable tanto de la actividad catalítica de reducción del nitrato como del ensamblaje entre las dos subunidades de flavohemoproteína y, por tanto, de la formación de la holoenzima.

- La reducción no asimiladora del nitrato tiene lugar mediante una nitrato reductasa de membrana (sistema Nar) o periplásmica (sistema Nap):

La nitrato reductasa de membrana (NarGHI) requiere un previo transporte del nitrato, es una enzima respiratoria ya que origina FMP y se induce en anaerobiosis en presencia de nitrato. El nitrito que genera se puede reducir a amonio como es el caso de *Escherichia coli* o hasta nitrógeno molecular, pasando previamente por óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O) como es el caso de los microorganismos desnitrificantes, en el proceso llamado desnitrificación. Esta enzima está compuesta de tres sub-unidades: α , β y γ , así como de varios cofactores; las sub-unidades α y β constituyen el domain citoplásmico y la sub-unidad γ constituye el domain de membrana requerido para mantener las dos primeras sub-unidades al lado citoplásmico de la membrana interna. La sub-unidad α contiene un cluster [4Fe-4S] y un cofactor molibdopterina, el cual es el sitio de la reducción del nitrato. El Mo puede existir como Mo^{+6} , Mo^{+5} y Mo^{+4} , con un equilibrio dependiente del pH entre "pH alto" y "pH bajo" de la forma Mo^{+5} . En base a la estructura de este centro Mo, NarGHI puede ser categorizada en la misma familia de las enzimas Mo mononucleares como la DMSO reductasa. Cabe mencionar que una comparación de la secuencia de aminoácidos de NarGHI reveló la existencia de cuatro motivos conservados encontrados en las molibdopterin oxidoreductasas procarióticas. El rol del cofactor pterina aún se encuentra en investigación y dos roles podrían ser atribuidos al cofactor en los mecanismos de reacción de la enzima Mo mononuclear. La

pterina podría mediar la transferencia de electrones fuera del centro Mo a otro centro redox activo sin cambios en su estado redox durante la catálisis o la uterina podría modular la potencial reducción del centro Mo.

La nitrato reductasa periplásmica (NapAB) no requiere un previo transporte de nitrato ya que esta enzima es siempre periplásmica, puede o no estar acoplada al sistema desnitrificante, no siempre genera suficiente FMP y a veces se induce en aerobiosis. El nitrito que genera se puede liberar al medio como producto final (*Rhodobacter sphaeroides*) o reducirse completamente hasta nitrógeno molecular (microorganismos desnitrificantes). La secuencia peptídica de la sub-unidad catalítica NapA de la heterodimérica Nap indica que esta enzima es también un miembro de la familia molibdopterina polipéptidos. El alineamiento de NapA con las secuencias de nitrato reductasas unidas a membrana y con la secuencia de otras molibdoenzimas reveló la existencia de regiones conservadas. En la Nap de *P. denitrificans*, los datos fuertemente sugieren la presencia de dos ligandos =O al Mo^{+6} y uno al Mo^{+4} , mientras que solamente un solo ligando =O en el Mo^{+6} ha sido identificado en NarGHI.

Así, algunos microorganismos que utilizan el nitrato como fuente de nitrógeno no pueden utilizarlo en la respiración; otros, que lo utilizan para obtener energía, son capaces además, de desviar la reacción y utilizarlo como única fuente de nitrógeno. Existen microorganismos que son capaces de asimilar y desnitrificar simultáneamente. Estos procesos van asociados, generalmente, a condiciones determinadas de disposición de oxígeno, de manera que la aerobiosis conlleva la asimilación del nitrato a amonio, mientras que la anaerobiosis da lugar a su respiración y posterior amonificación o desnitrificación.

La utilización del nitrato en condiciones microaeróbicas o anaeróbicas implica el uso de este ión como aceptor final de electrones de la cadena respiratoria. Al proceso por el cual el nitrato se reduce a nitrito 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 energía 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, N₂O) e incluso a nitrógeno molecular (N₂) (Stewart 1988). Aunque la reducción desasimilatoria y la desnitrificación ocurren en condiciones de baja concentración de oxígeno, el primero conlleva a la conservación de nitrógeno combinado, mientras que el segundo lo pierde (Aparicio-Tejo et al. 1991).

En la reducción desasimilatoria del nitrato intervienen dos enzimas, la primera una NR respiratoria ligada a membrana y la segunda una NiR asimilatoria citosólica que cataliza la reducción del nitrito a amonio. A este proceso algunos autores lo han denominado amonificación del nitrato (Reddy y Lodha, 1988).

En la desnitrificación, que es una forma alternativa de respiración en condiciones limitantes de oxígeno, los microorganismos pueden utilizar el nitrato y sus óxidos derivados, como aceptores de electrones en una cadena de transporte hasta la formación de dinitrógeno molecular (N₂). La reducción de algunos óxidos de nitrógeno está acoplada a la producción de ATP, lo que permite a la célula crecer en ausencia de oxígeno.

La capacidad de desnitrificar está muy extendida en los procariotas y abarca a bacterias que pertenecen taxonómicamente a varias subclases de Proteobacterias, y a las Arqueobacterias (Zumft 1997). Aunque la desnitrificación es una característica propia de las bacterias anaerobias facultativas, y se considera que sólo ocurre en ausencia de oxígeno, se ha descrito que algunas especies del género *Paracoccus* (antes *Thiobacillus*) son capaces de desnitrificar en condiciones aeróbicas (Stouthamer et al. 1997). Además, algunos hongos, como los del género *Fusarium*, también tienen la capacidad de desnitrificar (Kobayashi et al. 1996).

La reducción del nitrato (NO₃⁻) a dinitrógeno (N₂) lleva consigo la formación de una serie de intermediarios que son: nitrito (NO₂⁻), óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N₂O). Las enzimas que catalizan estas reacciones son, en orden de actuación, nitrato reductasa (Nar o Nap), nitrito reductasa (Nir), óxido nítrico reductasa (Nor) y óxido nitroso reductasa (Nos). Aunque la reducción del nitrato inicia la desnitrificación, se considera, en sentido estricto, que la reducción del NO₂⁻ a NO es la reacción clave que define la desnitrificación. Ello se debe a que la reducción del nitrato también puede ocurrir en microorganismos no desnitrificantes. De hecho, *Escherichia coli*, una de las

bacterias donde más se ha estudiado la fisiología, bioquímica y genética de la respiración del nitrato, es, sin embargo, incapaz de desnitrificar.

Se han descrito bacterias que no contienen, o que no expresan, el equipo enzimático necesario para llevar a cabo la desnitrificación. El ejemplo más extendido es el de aquéllas que carecen de óxido nitroso reductasa como *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aureofaciens* y diversas especies de la familia *Rhizobiaceae*. *Wollinella succinogenes* posee óxido nítrico y óxido nitroso reductasas y *Campylobacter fetus* sólo contiene óxido nitroso reductasa (Zumft 1992). A estos microorganismos no se les considera verdaderos desnitrificantes, ya que son incapaces de crecer microaeróbicamente con nitrato o nitrito como única fuente de energía.

La síntesis de los cofactores FeMo-Co y Mo-Co de la nitrogenasa y de las nitrato reductasas, respectivamente, requiere que los microorganismos transporten el molibdato hacia el interior celular, ya que es la forma más soluble y estable en soluciones acuosas y es la forma asimilable más relevante para los organismos (Pope *et al.* 1980), para lograr esto, utilizan sistemas de transporte tipo ABC.

1.5. LOS TRANSPORTADORES ABC

En las bacterias Gram negativas, las proteínas periplásmicas que unen solutos y sus homólogas en las bacterias Gram positivas, las lipoproteínas de la membrana externa, son mayormente conocidas por participar en dos fenómenos de reconocimiento relacionados: la quimiorrecepción y el transporte transmembrana (Higgins *et al.* 1990, Stock *et al.* 1991). En ambos casos, los dominios hidrofílicos de estas proteínas que unen el soluto interactúan con las proteínas de la membrana citoplasmática originando un cambio conformacional inducido por la unión del soluto. La unión del soluto induce un substancial cambio conformacional en las proteínas periplásmicas de unión de las bacterias Gram negativas, lo cual facilita la interacción con las proteínas de quimiorrecepción transmembrana o de transporte (Miller *et al.* 1983).

En todos los organismos, los solutos son transportados a través de la membrana citoplasmática de la célula y activamente acumulados o eliminados en procesos conducidos por la hidrólisis del ATP (Nikaido y Saier 1992). Una clase de transporte ATPasas consiste de sistemas de transporte multicomponentes con una organización estructural común correlacionados con un mecanismo de acción unificado. Estos transportadores, llamados cassettes de unión-ATP (tipo ABC) o ATPasas de transporte o permeasas, son funcionalmente diversos. Algunos de estos sistemas de transporte sirven para captar metabolitos mientras que otros sirven para eliminar otros metabolitos. Los sistemas de captación en bacterias transportan una amplia variedad de sustratos, incluyendo azúcares, aminoácidos, péptidos, ésteres de fosfato orgánicos e inorgánicos, sulfato, poliaminas, cationes metálicos (tales como cobre, hierro y níquel), molibdeno, vitaminas, etc. Los sistemas bacterianos de eliminación del tipo ABC muestran especificidad hacia drogas como la daunomicina, tilosina, espiromicina y eritromicina, toxinas como la hemolisina, leucotoxina, ciclolisina, bacteriocinas, proteasas, polisacárido capsular y otros carbohidratos complejos, etc. (Tam y Saier 1993).

Los componentes proteicos comunes de los sistemas de captación tipo ABC incluyen una o dos proteínas transmembrana, una o dos proteínas de unión-ATP localizadas al lado citoplásmico de la membrana y una proteína extracitoplásmica de alta afinidad de unión al soluto (Higgins 1992). En las bacterias Gram negativas, esta proteína de unión específica, es soluble y periplásmica, aunque su forma de unión al soluto debe asociarse con los constituyentes transmembrana de la permeasa antes de que la actividad de transporte pueda ser observada. En las bacterias Gram positivas, esta proteína también es extracelular pero está unida a la membrana vía una extensión lipídica hidrofóbica N-terminal. Los componentes de la proteína transmembrana forman los canales específicos del soluto; las proteínas de unión-ATP energizan los sistemas y algunas veces desempeñan roles regulatorios y las proteínas de unión al soluto confieren a los sistemas de transporte, especificidad y alta afinidad por los sustratos.

Los sistemas cassette de unión-ATP (ABC) constituyen una gran superfamilia de proteínas, la cual está creciendo muy rápidamente debido al aumento de proyectos de

secuenciación de genomas (Saurin et al. 1999).

Los miembros de esta superfamilia poseen una proteína conservada ó módulo ABC, que muestra los motivos Walker A y Walker B, característica común de todas las proteínas que requieren ATP (Walker et al. 1982). Además de estos motivos, los módulos ABC poseen una secuencia corta pero altamente conservada (LSGGQ), la cual es llamada secuencia señal o péptido de unión (Ames et al. 1990).

Las proteínas ABC purificadas o módulos tienen la propiedad de unir el sustrato e hidrolizan el ATP, haciendo aceptable la hipótesis que ellos emplean la energía de la hidrólisis del ATP al movimiento de sustratos por un mecanismo desconocido (Morbach et al. 1993, Shimabuku et al. 1992).

Unos pocos sistemas ABC no están directamente involucrados con el transporte, pero participan en otros procesos celulares tales como la traducción del RNAm (Belfield et al. 1995) y reparación del ADN (Thiagalingam y Grossman 1993).

Entre los diversos transportadores tipo ABC, las bacterias incorporan una amplia variedad de oligoelementos, tales como el cobre, hierro, níquel, molibdeno, etc.

1.5.1. EL TRANSPORTE DEL MOLIBDENO EN BACTERIAS

Estudios relacionados con el transporte del Mo en bacterias se iniciaron con el reconocimiento que la mutación en ciertas mutantes de *Escherichia coli* resistentes al clorato, podía ser suprimida por el incremento de la concentración de Mo en el medio de cultivo, también se determinó que cepas mutantes que eran defectivas en la actividad nitrato reductasa, sobrevivían en un medio que contiene clorato. Finalmente se determinó que subpoblaciones de estas mutantes eran deficientes en el transporte del Mo, en la activación del Mo, en la síntesis de la parte orgánica de la molibdopterina o en la síntesis de la apoenzima nitrato reductasa.

1.5.1.1. EL TRANSPORTE DEL MOLIBDENO EN *Escherichia coli*

El transporte de Mo, en sus aspectos fisiológicos, bioquímicos y genéticos, ha sido el aspecto del metabolismo de este elemento, que más ampliamente se ha estudiado, generalmente tomando como prototipo a *E. coli* (Grunden y Shanmugam, 1997). En esta bacteria, los primeros intentos de identificar genes implicados en el transporte o metabolismo del Mo se iniciaron mediante el aislamiento de mutantes resistentes al clorato (Glaser y DeMoss, 1971, Dubourdiou et al. 1976, Sperl y DeMoss, 1975).

Teniendo en consideración de que el clorato (ClO_3^-) es un análogo del nitrato, este método se basa en que el clorato puede ser reducido por las enzimas nitrato reductasas asimilatoria o respiratoria, dando como producto clorito (ClO_2^-), el cual es muy tóxico para las células. Por consiguiente, sólo aquellas cepas mutantes afectadas en la actividad nitrato reductasa serán capaces de crecer en un medio con clorato.

Desde los primeros trabajos de Pichinoty y Piéchaud (1968) en los que describen que la enzima nitrato reductasa respiratoria puede usar clorato como sustrato, este compuesto se ha utilizado para la obtención de mutantes (llamadas *chl*) deficientes en actividad NR.

Aunque esta técnica de mutagénesis dió lugar a una amplia colección de mutantes: *chlA*, *chlB*, *chlC*, *chlD*, *chlE*, *chlG*, *chlM* y *chlN* (Stewart 1988), todas las mutantes, a excepción de *chlC*, son deficientes en el metabolismo del Mo, bien en la síntesis del cofactor (*chlA*), en la incorporación del cofactor a la apoenzima (*chlB*), en el transporte del Mo (*chlD*), en la actividad del cofactor (*chlG*), etc. En el locus *chlC* se encuentran los genes estructurales de la enzima nitrato reductasa.

Las cepas resistentes al clorato pueden estar afectadas en los genes implicados en el transporte, activación, incorporación del Mo activado, o en los genes estructurales de la apoenzima nitrato reductasa. Las mutantes en el metabolismo del Mo suelen ser pleiotrópicas y estar afectadas en la actividad no sólo de las nitrato reductasas sino de todas las enzimas dependientes de Mo. De esta forma se identificaron en *E. coli* los

genes *mod*, anteriormente denominados *chID* y que estaban implicados en el transporte de Mo (Stewart 1988, Hinton y Dean 1990, Hemschemeier *et al* 1991).

Con excepción de las cepas con mutaciones en los genes estructurales de la nitrato reductasa que afectan la apoenzima de la nitrato reductasa, todas las otras mutantes son pleiotrópicas para la actividad de todas las molibdoenzimas de la célula.

Los genes afectados en las mutantes pleiotrópicas (*moa*, *mod* y *moe*, anteriormente llamados *chlA*, *chID* y *chlE*, respectivamente), están mapeados en varias localizaciones en el cromosoma. Entre estos, las mutaciones en el operón *mod*, son suprimidas por altas concentraciones de Mo en el medio, sugiriendo que las proteínas codificadas por el operón *mod* juegan un rol en transporte del Mo.

Por estudios de transporte directo, los mutantes *mod* han sido encontrados ser deficientes en la captación y acumulación del Mo.

Lopez *et al.* (1993) han reportado que la tasa de captación de este elemento es superior cuando las células son cultivadas en un medio que contiene concentraciones < 10nM. En células cultivadas con 1µM de molibdato en el medio, el transporte de Mo es abolido casi completamente. Estos estudios muestran que *E. coli* posee un sistema de transporte de molibdato de alta afinidad, el cual es inducido solamente bajo condiciones de limitación de Mo.

Hoy en día se ha determinado que muchos microorganismos han desarrollado diversos sistemas, altamente eficientes, para captar el Mo desde el medio ambiente (Lopez *et al.* 1993, Maupin-Furlow *et al.* 1995; Neubauer *et al.* 1999). En particular, *E. coli* posee tres sistemas que transportan molibdeno con afinidades variables, estas incluyen:

- a- Un sistema de transporte de Mo de alta afinidad.
- b- Un sistema de transporte del sulfato
- c- Un sistema de transporte aniónico no específico.

El modo de transporte preferido es el sistema de transporte de alta afinidad, aunque las rutas alternativas pueden ser empleadas bajo condiciones particulares.

1.5.1.1.1. El sistema de transporte de alta afinidad

Este es un sistema de transporte tipo ABC, que es inducido solamente bajo condiciones de limitación de Mo. Dos operones divergentes (Figura 1.1), localizados en el minuto 17 del mapa cromosómico de *E. coli*, son responsables de la síntesis de las proteínas que constituyen el sistema de transporte de alta afinidad, estos son:

- El operón *modABCD* (anteriormente llamado *chID*).
- El operón EF.

El operón de transporte del Mo (*modABCD*) ha sido clonado, secuenciado y caracterizado; se ha determinado que codifica un sistema de transporte bacteriano tipo ABC. La secuencia de ADN revela que el cluster de genes *mod* contiene dos operones divergentes. Estos genes están localizados en el minuto 17 del mapa cromosómico de *E. coli* y están situados entre 795 y 802 Kb del mapa físico integrado de genoma de *E. coli*, inmediatamente después del gen *gale*.

Los genes estructurales para el proceso del transporte están codificados por el operón *modABCD*, mientras que la proteína reguladora (ModE) está codificada por el operón divergente *modEF*.

La proteína ModA está conformada por 257 aminoácidos; en base a su composición aminoacídica tiene un peso molecular 27,363 Da. El complejo proteína A-Mo en un gel de poliacrilamida migra más rápido que la proteína libre de Mo, lo cual sugiere un cambio conformacional en la proteína unida al Mo. Empleando absorbancia UV diferencial para distinguir entre formas de proteína ModA libre de Mo de las formas unidas al molibdeno. La localización periplásmica de ModA, el cambio conformacional asociado con la unión al Mo y la falta de transporte del molibdeno en mutantes *mod*, confirma que el operón *modABCD* codifica para los componentes del sistema de transporte del molibdeno en la célula.

La proteína ModB está conformada por 229 aminoácidos (24,000 Da), contiene seis regiones hidrofóbicas, sugiriendo que la localización primaria de la proteína es la membrana. La naturaleza hidrofóbica de ModB, su secuencia similar con los miembros de la familia de transportadores ABC y su localización corriente abajo del gen *modA*,

sugiere que ModB es la proteína del canal de la membrana a través del cual el Mo atraviesa la membrana.

Desde que el operón *modABCD* posee un solo gen que codifica una proteína integral de membrana, el canal de membrana está presumiblemente compuesto solamente del homopolímero ModB. Esto es contrastante con el sistema de transporte de otro oxianión, el sulfato, el cual contiene dos genes (*cysU* y *cysW*), que codifican para un presunto canal de membrana conformado por dos proteínas separadas (CysU y CysW).

La proteína ModC tiene un típico motivo unido a ATP que confirma su rol como ATPasa energizante del transporte del Mo. Está conformada por 352 aminoácidos (39,045Da) y es comparable con el tamaño de otros componentes que confieren energía en los sistemas de transporte dependientes de ATP. Mutaciones en *modC* perjudican severamente la acumulación de Mo y conlleva a la incapacidad de la célula de crecer bajo condiciones de poco Mo (aproximadamente debajo de $1\mu\text{M}$). Este fenotipo puede ser superado suplementando Mo exógeno ($100\mu\text{M}$), a las células de *E. coli*.

A continuación del gen *modC*, se ha detectado un marco abierto de lectura de 696 pb, el cual codifica para una proteína de 231 aminoácidos (26,336Da). La secuencia aminoacídica es única y una proteína similar no ha sido reportada para otro organismo. Una delección de este ADN no tiene efecto fenotípico en la mutante. Debido a su localización en dirección 3', adyacente al gen *modC*, este ORF ha sido llamado *modD*. La proteína ModD carece de similitud secuencial con otras conocidas porinas de membrana externa y su rol putativo en la célula es incierto.

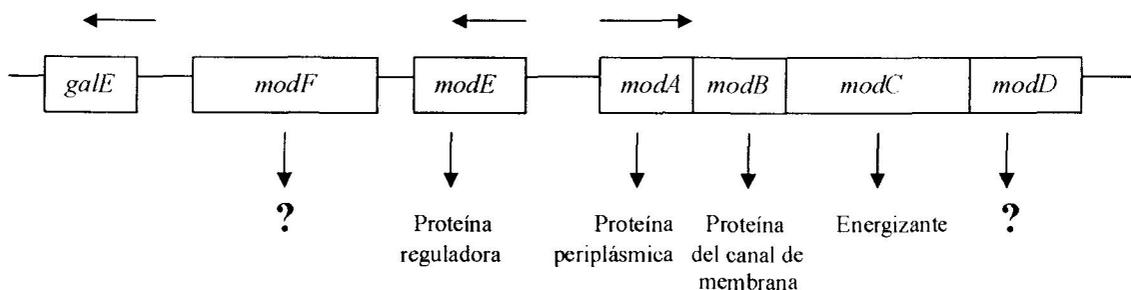


Figura 1.2. Operones *mod* de *Escherichia coli*

Por analogía a otras proteínas bacterianas unidas al periplasma, la proteína ModA une el Mo y lo transfiere a la proteína ModB, en la superficie externa de la membrana citoplasmática. La proteína ModB junto con la proteína ModC transportan el Mo a través de la membrana citoplasmática hacia el citoplasma celular. ModC posee una actividad ATP hidrolasa que proporciona energía para el proceso de transporte.

En base a que el Mo se une a las células intactas, Lopez et al. (1993) han propuesto que el Mo se une a un receptor de la membrana externa en una tasa muy elevada. Esta unión es insensible a la temperatura de incubación y a la presencia de otros oxianiones tales como el sulfato. La proteína de membrana externa podría facilitar una acumulación de Mo en el periplasma cuando la concentración de Mo en el medio está por debajo del nivel subnanomolar.

Los genes *modABCD* están regulados por la proteína represora ModE, codificada por el gen *modE*, que forma parte del operón *modEF*. Esta proteína contiene 262 aminoácidos con un aparente peso molecular de 28271 Da. La parte N-terminal de la proteína contiene un motivo hélice-vuelta-hélice encontrado en otras proteínas que se unen al ADN de la familia LysR. La transcripción del operón *modE* es constitutiva, lo cual está de acuerdo con un rol propuesto para la proteína ModE en la regulación genética.

El segundo gen en el operón *modEF* codifica una proteína de 490 aminoácidos (ModF). Esta proteína de peso molecular de 54000 Da., es similar a la proteína ModC y tiene dos motivos de unión ATP/GTP; sin embargo, su papel fisiológico en el transporte de Mo se desconoce por el momento (Self et al. 1999). Una mutación o delección dentro del gen *modF* no tuvo fenotipo detectable.

El operón *modEF* es transcrito desde un promotor ubicado en dirección 5', antes del gen *modE*; sin embargo, la transcripción de *modF* es regulada por ModE y Mo, de un modo similar que el operón *modABCD*.

Regulación del sistema de transporte de molibdato de alta afinidad

Tal como se ha mencionado, el sistema de transporte de alta afinidad está regulado por la proteína constitutiva ModE, puesto que regula negativamente la transcripción del operón *modABCD*. Esta represión se debe a que ModE se une al sitio operador del operón *modABCD*, lo cual no permite una apropiada unión de la RNA polimerasa a la región promotora. Una mutación en el gen *modE* desreprime la transcripción de *modABCD*, aún en presencia de Mo, lo cual sugiere que la proteína ModE es un represor del operón *modABCD*.

Se ha determinado que este sistema es inducido cuando la disponibilidad de Mo se encuentra limitada. Inducciones óptimas de este sistema ocurre cuando la concentración de molibdeno es aproximadamente 10nM. La expresión del operón *modABCD* es fuertemente disminuída a concentraciones superiores de 500nM y es totalmente suprimida en niveles de molibdeno de 1µM o más (Miller *et al.* 1987).

Además de su rol como represor de los genes del transporte de Mo, ModE unida al Mo también mejora la expresión de los genes que codifican las molibdoenzimas formato deshidrogenasa (*fdhF*), formato hidrogenliasa y reguladores de la nitrato reductasa respiratoria.

Estudios sobre la regulación de los genes que codifican las proteínas de transporte de Mo han sido realizados empleando derivados de la fusión *lac*. En base a estos experimentos, el nivel de transcripción del operón *modABCD* es muy bajo a no detectable en las células tipo silvestre incluso cuando han sido cultivadas en medios que no contienen Mo añadido. Altos niveles de transcripción han sido observados solamente en mutantes *modA*, *modB* o *modC*. Esta desrepresión del operón *modABCD* se invierte por la adición de Mo al medio. El Mo es aparentemente transportado por sistemas de transporte alternativos de afinidad más baja, al entrar, el Mo permite la represión del operón *modABCD*. Por otro lado, la carencia de Mo intracelular como consecuencia de una mutación en *modA*, *modB* o *modC*, previene la represión.

Mutaciones en alguno de los tres genes *modA*, *modB* o *modC* conllevan a un efecto pleiotrópico en la actividad de todas las molibdoenzimas de la célula, el cual

puede ser suprimido por adición de Mo al medio de cultivo. La cantidad de molibdato necesaria para esta supresión depende del medio de crecimiento.

1.5.1.1.2. El sistema de transporte del sulfato

Una célula de *E. coli* que es deficiente en el transporte de Mo vía el sistema de transporte de alta afinidad, puede usar el sistema de transporte de sulfato como una ruta alternativa para transportar molibdeno. Este defecto podría ser el resultado de una mutación del locus *mod* (Grunden y Shanmugam 1997).

El sistema de transporte de sulfato consta de los productos de los genes del operón *cysPTWAM* y el gen *sbp*. El operón *cysPTWAM* está localizado en el minuto 54.7 del mapa cromosómico de *E. coli*, codifica a CysT y CysW, las cuales son proteínas integradas a la membrana, que permiten a los compuestos azufrados y al molibdeno, atravesar la membrana celular. CysA es una ATPasa que proporciona la energía necesaria para este sistema de transporte activo. El gen *sbp* codifica una proteína periplásmica asociada a la membrana a la que se une el sulfato y el Mo (Rosentel *et al.* 1995).

Los productos de los genes de este sistema de transporte muestran cierta homología con las proteínas involucradas en el sistema de transporte de Mo de alta afinidad. ModB tiene 33% de su secuencia similar a CysT y 31% similar a CysW. ModC y CysA son 23% similares y ambas tienen actividad ATPasa que suministra la energía a sus respectivos sistemas de transporte (Rosentel *et al.* 1995).

Este sistema tiene preferencia por el transporte del sulfato, por tanto, para que el molibdeno sea transportado es necesario que el medio contenga altas concentraciones de molibdeno. La concentración de Mo en el medio debe ser por lo menos de 300nM cuando los niveles de sulfato son altos y 30nM cuando los niveles de sulfato son limitados (Rech, *et al.* 1995).

Por ejemplo, la síntesis y actividad del complejo enzimático hidrógenoformato liasa depende de la disponibilidad de Mo. En un medio mínimo con 15mM de sulfato, la cantidad de Mo necesario para la producción de la máxima actividad del complejo

enzimático por una mutante *mod* (y la supresión del fenotipo mutante), es aproximadamente 300nM. Por otro lado, para una mutante *modA*, *modB* o *modC*, cultivada en medio mínimo limitado en compuestos azufrados (medio con poco azufre), la cantidad mínima de Mo necesario para la producción del máximo nivel de actividad de esta enzima es aproximadamente 30nM. Este valor es aproximadamente 10 veces superior a la cantidad de Mo requerido para la producción de niveles óptimos de actividad de la hidrógenoformato liasa por la cepa silvestre cultivada en un medio con poco azufre.

Estos resultados sugieren que los mutantes *mod* cultivados en un medio con poco azufre, utiliza el sistema de transporte del sulfato como un sistema alternativo para el transporte del Mo, ya que los genes que codifican los componentes para el transporte del sulfato son activados en células cultivadas en medios con poco sulfato. Se desconoce si el Mo es transportado por ambos sistemas de transporte (sulfato y Mo) cuando dichas rutas no están reprimidas. Se sospecha que el sistema nativo podría ser preferido como ruta para el transporte del Mo.

1.5.1.1.3. El sistema de transporte aniónico no específico

El sulfato, el selenato, el selenito y el molibdeno pueden ser transportados en *E. coli*, vía un sistema de transporte aniónico no específico, que no requiere energía. Este sistema puede ser empleado para el transporte de molibdeno bajo ciertas condiciones como:

- La existencia de una mutación en el locus *mod* y en el locus *cys*.
- Alto nivel de compuestos azufrados presentes en el medio.
- Mo presente en altas concentraciones en el medio.

Este sistema tiene una muy baja afinidad por el Mo, por lo que es necesario que este elemento se encuentre presente en el medio en una alta concentración para ser transportado por esta vía (Rosentel *et al.* 1995).

El rol del sistema de transporte del sulfato en el transporte del Mo también ha sido confirmado mediante experimentos genéticos. Dobles mutantes *mod*, *cysA* requieren significativamente altos niveles de Mo para la producción de la actividad de la hidrógenoformato liasa cuando se cultivan en un medio con poco azufre. En estos mutantes y en los mutantes *mod*, el Mo es aparentemente transportado por una tercera maquinaria de transporte. Experimentos fisiológicos sugieren que el transporte del Mo a través de este tercer sistema de transporte es competitivamente inhibido por el selenito. Este sistema de transporte sensible al selenito es probablemente un sistema de transporte aniónico no específico, con muy poca afinidad por el Mo.

Por lo consiguiente, *E. coli* tiene por lo menos tres sistemas de transporte independientes, capaces de transportar el Mo: un sistema de transporte específico, el sistema de transporte del sulfato y un sistema de transporte no específico, de baja afinidad.

1.5.1.2. EL TRANSPORTE DEL MOLIBDENO EN OTRAS BACTERIAS

En base a la información de la secuencia de sus genomas y a su similitud con los genes *mod* de *E. coli*, los genes *mod* están muy conservados en muchos microorganismos y pueden ser identificados en casi 20 eubacterias y archibacterias. Estas incluyen a *Azotobacter vinelandii*, *Rhodobacter capsulatus*, *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis*, *Synechocystis* sp., *Staphylococcus carnosus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Arthrobacter nicotinovorans*, *Deinococcus radiodurans*, *Campylobacter jejuni*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Aquifex aeolicus*, *Aeropyrum pernix*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanopyrus kandleri*, *Streptomyces coelicolor*, *Haloferax volcanii*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrococcus furiosus* y *Pyrococcus horikoshii* (Luque et al. 1993, Wang et al. 1993, Fleischmann et al. 1995, Heidelberg et al. 2000, Kunst et al. 1997, Kaneko y Tabata 1997, Neubauer et al. 1999, Stover et al. 2000, Tomb et al. 1997, Menendez et al. 1997, White et al. 1999, Parkhill et al. 2000, Cole et al. 1998, Deckert et al. 1998, Kawarabayasi et al. 1999,

Smith et al. 1997, Slesarev et al. 2002, Bentley et al. 2002, Wanner y Soppa 1999, Cohen et al. 2003, Robb et al. 2001, Kawarabayasi et al. 1998).

La presencia de uno o más genes *mod* en estos procariotas sugiere que los genes *mod* también existen en otros organismos relacionados. En este grupo, solamente en *Azotobacter vinelandii*, *Rhodobacter capsulatus*, *Staphylococcus carnosus* y *Haloferax volcanii*, los genes *mod* han sido funcionalmente definidos y el ADN apropiado ha sido clonado e identificado (Luque et al. 1993, Wang et al. 1993, Neubauer et al. 1999, Wanner y Soppa 1999).

En la mayoría de estas bacterias, los tres genes *mod* están organizados como un simple operón. En *B. subtilis* y *D. radiodurans*, el gen que codifica la ABC-ATPasa no se encuentra en el mismo operón y está aparentemente localizado en otra parte del genoma. La archibacteria hipertermofílica *Pyrococcus* sp. carece de una proteína homóloga a ModA. En la secuencia del genoma de la bacteria hipertermofílica *Aquifex aeolicus* y la archibacteria *Aeropyrum pernix*, homólogos a ModB y ModC no son fácilmente distinguibles, pero se ha detectado un homólogo a ModA. Aunque los genes para el transporte del Mo son encontrados en varias eubacterias y archibacterias, homólogos a ModE solamente han sido identificados en pocas especies bacterianas (Self et al. 2001).

Al igual que en *E. coli*, en *R. capsulatus* se ha descrito la existencia en el operón *modABC* de un gen adicional, *modD*, cuya función es desconocida.

Una investigación de las secuencias de los genomas en las bases de datos reveló que además de *E. coli*, solamente cuatro especies bacterianas (*A. vinelandii*, *H. influenzae*, *Herbaspirillum seropedicae* y *P. aeruginosa*), poseen un gen correspondiente al gen *modE* de *E. coli* (Fleischmann et al. 1995, Luque et al. 1993, Stover et al. 2000, Voigt et al. 2000). Esto está en contraste con los alrededor de 20 procariotas que contienen los homólogos de genes que codifican el transporte de Mo.

El operón *mod* de *R. capsulatus* es similar al de *E. coli*, pero contiene un gen homólogo a *modE* (denominado *mopA*), el cual junto con los genes *modABC* son parte de un operón, al final del cual, se ha identificado un ORF que codifica una proteína ModD, cuyo rol es desconocido. Divergiendo del operón *mopAmodABC* se encuentra un

gen que codifica una proteína que es similar a MopA y se ha denominado MopB. Una mutación en uno de los genes *mop* no tiene efecto sobre la represión dependiente de Mo de la expresión *modA-lacZ*, pero una doble mutante *mopAB* desreprime la transcripción *modA-lacZ* en presencia de Mo (Kutsche et al. 1996, Masepohl y Klipp 1996). Estos resultados sugieren que las proteínas MopA y MopB interactúan posiblemente como un dímero con la región operadora del operón *mopAmodABC* en la regulación de los genes *mod*. Una secuencia de unión consenso (TATAT) en ModE también fue identificada en la región operadora de este operón; el complejo Mo-MopA-MopB probablemente se une a ella a fin de prevenir la transcripción (Kutsche et al. 1996).

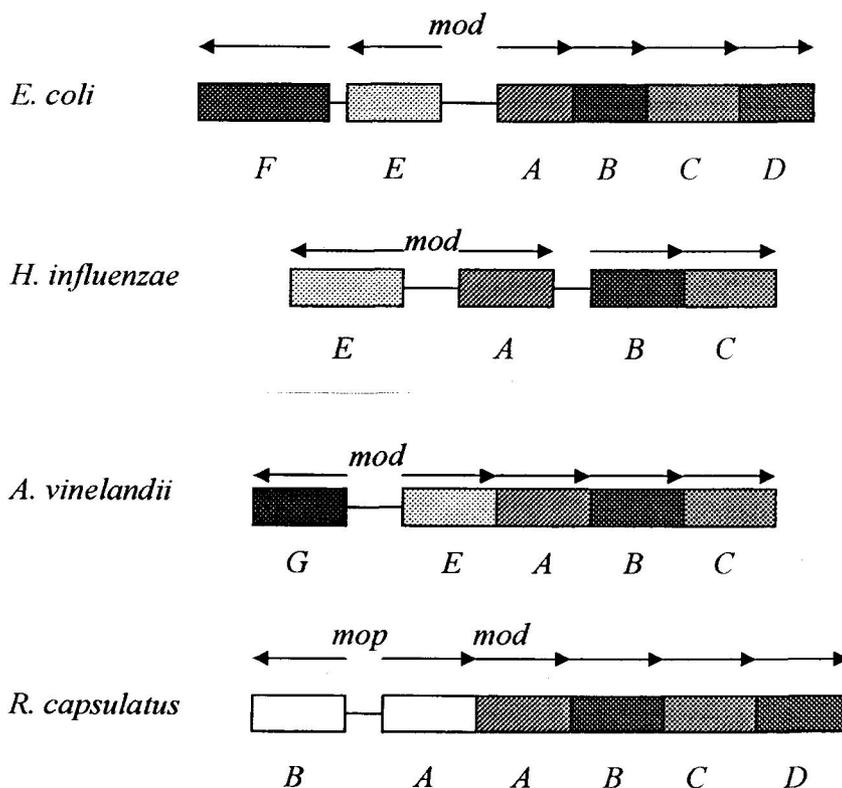


Figura 1.3. Distribución de los genes del sistema de transporte de Mo de alta afinidad en diferentes especies bacterianas.

En *Klebsiella pneumoniae*, un organismo fijador de dinitrógeno estrechamente relacionado a *E. coli*, el Mo puede ser transportado por el sistema de transporte de sulfato, siendo la Km para el Mo en este proceso de transporte 2 μM . Grunden y Shanmugam (1997), concluyen que esta bacteria produce cuatro sistemas de captación de Mo: un sistema nativo (*mod*), un sistema de captación de alta afinidad utilizado bajo condiciones de fijación de nitrógeno que transporta tanto Mo como sulfato, un sistema de transporte de sulfato que también transporta Mo y un sistema de transporte aniónico inespecífico de baja afinidad.

1.5.1.3. EL TRANSPORTE DEL MOLIBDENO EN LA FAMILIA RHIZOBIACEAE

Las bacterias de la familia *Rhizobiaceae* se caracterizan generalmente por su capacidad para infectar las células corticales de las raíces de las leguminosas y formar nódulos, estructuras típicas de la asociación planta-bacteria, donde se lleva a cabo el proceso de fijación biológica del N_2 , esto es, la reducción del N_2 a amonio. Mientras que las especies de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Allorhizobium* forman nódulos en las raíces de sus leguminosas hospedadoras, *Azorhizobium* los ocasiona tanto en las raíces como en los tallos de *Sesbania rostrata* y *Phyllobacterium* los origina en las hojas de las plantas de las familias *Myrsinaceae* y *Rubiaceae*. Finalmente, el género *Agrobacterium* incluye especies fitopatógenas que producen tumores en los tallos y raíces de diversas plantas, excepto *A. radiobacter* (van Berkum and Eardly 1998; Amarger 2001).

En el interior de los nódulos, las bacterias se transforman en bacteroides que son las células que sintetizan la molibdoenzima nitrogenasa responsable de la catálisis del N_2 a amonio (NH_4^+). A partir del amonio formado, se originan los productos orgánicos nitrogenados esenciales para la nutrición, funcionamiento y desarrollo de las plantas. La capacidad, por tanto, de estas bacterias para reducir N_2 en simbiosis es un proceso de enorme significación agrícola, ya que las plantas implicadas, las leguminosas, tienen

una gran repercusión en la nutrición humana y animal como fuente de proteínas, obtención de aceite, fibras, etc. Así, la simbiosis *B. japonicum*-soja, por su utilización tanto como fuente de alimento humano como para pienso en ganadería o como semilla productora de aceite, resulta ser la de mayor importancia (Peoples et al. 1995).

En las *Rhizobiaceae*, el metabolismo del nitrato puede ocurrir a través de dos vías según las disponibilidades de oxígeno (Bergensen 1977). En condiciones aeróbicas, la reducción de nitrato por una nitrato reductasa asimilatoria da lugar a la formación de nitrito que, reducido por una nitrito reductasa, se convierte en amonio. En un amplio estudio, Manhart y Wong (1979) demostraron que la mayoría de las especies de esta familia son capaces de crecer aeróbicamente en medios definidos con nitrato como única fuente de N. Sin embargo, la capacidad de desnitrificar no está muy extendida ya que sólo *B. japonicum* y *A. caulinodans* son capaces de crecer cuando se cultivan en condiciones limitantes de oxígeno con nitrato como única fuente de energía (O'Hara y Daniel 1985; Vairinhos et al. 1989; Raju et al. 1997).

Se ha descrito que la capacidad de desnitrificar pudiera constituir una ventaja competitiva para la permanencia y distribución en el suelo y para la capacidad de colonización de aquellas bacterias que la posean (Philippot et al. 1995). Esta capacidad es de gran interés en las asociaciones simbióticas que se establecen entre las especies de la familia *Rhizobiaceae* y sus leguminosas específicas, ya que esta habilidad permite a los bacteroides sobrevivir durante períodos de anoxia producidos por sequía, encharcamiento, etc. (Zablotowicz y Focht 1979; O'Hara y Daniel 1985). Aún más, en bacteroides de *B. japonicum* se ha demostrado que la desnitrificación puede proporcionar, aunque de forma menos eficiente que la respiración oxigénica, suficiente ATP para mantener la actividad de la nitrogenasa (Daniel et al. 1980; O'Hara y Daniel 1985). La utilidad de la desnitrificación en la simbiosis *Rhizobiaceae*-leguminosa se basa también en la capacidad de eliminar los compuestos intermediarios que pueden producirse y que son potenciales inhibidores de la fijación de N₂.

B. japonicum es la única especie de la familia *Rhizobiaceae* en la que se han descrito los genes *napEDABC* (Delgado et al. 2003), *nirK* (Velasco 1999), *norCBQD* (Velasco et al. 2001) y *nosRZDFYLX* (Mesa et al. 2001) implicados en la síntesis de las

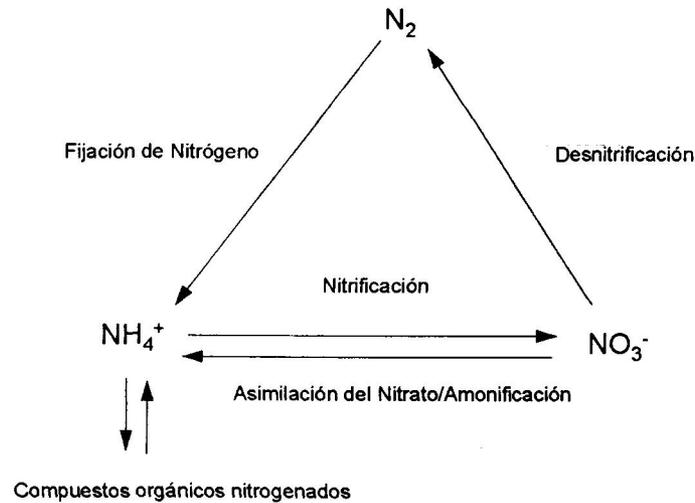
enzimas nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa, respectivamente.

B. japonicum es una de las pocas bacterias capaces de fijar nitrógeno simbióticamente y a la vez, de desnitrificar, de allí que para lograr realizar estos procesos biológicos, es necesaria la participación de las molibdoenzimas nitrogenasa y nitrato reductasa, respectivamente. Por consiguiente, las células bacterianas deben de incorporar Mo hacia su interior para posteriormente metabolizarlo.

A pesar de que el transporte de Mo es clave para la síntesis de estas dos molibdoenzimas, entre otras; la única información existente sobre el transporte de Mo en bacterias de esta familia se refiere a unos estudios fisiológicos realizados en *B. japonicum*, en donde se propone la existencia de un sistema de transporte de alta afinidad (Maier y Graham 1988); sin embargo, actualmente se desconoce la caracterización molecular de ningún sistema implicado en el transporte de Mo en *B. japonicum*, ni en ningún otro miembro de la familia *Rhizobiaceae*. Por ello, el estudio a nivel molecular del transporte de este elemento hacia el interior celular, complementaría los conocimientos científicos relacionados con el metabolismo anaeróbico del nitrato y la fijación de nitrógeno en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

1.6. OBJETIVOS

El nitrógeno (N) es uno de los más importantes elementos químicos que forman parte de los seres vivos, desde el punto de vista económico, ecológico y biológico. Ya sea porque, con la excepción del agua, es el nutriente limitante más común para el crecimiento de las plantas de interés agronómico, porque forma parte de biomoléculas como las proteínas y los ácidos nucleicos, o por la existencia de compuestos nitrogenados que tienen una incidencia crucial en la contaminación de suelo, agua y aire, el ciclo del N se sitúa como especialmente crítico en el conjunto de la biosfera.



Ciclo biogeoquímico del N (adaptado de Zumft, 1997).

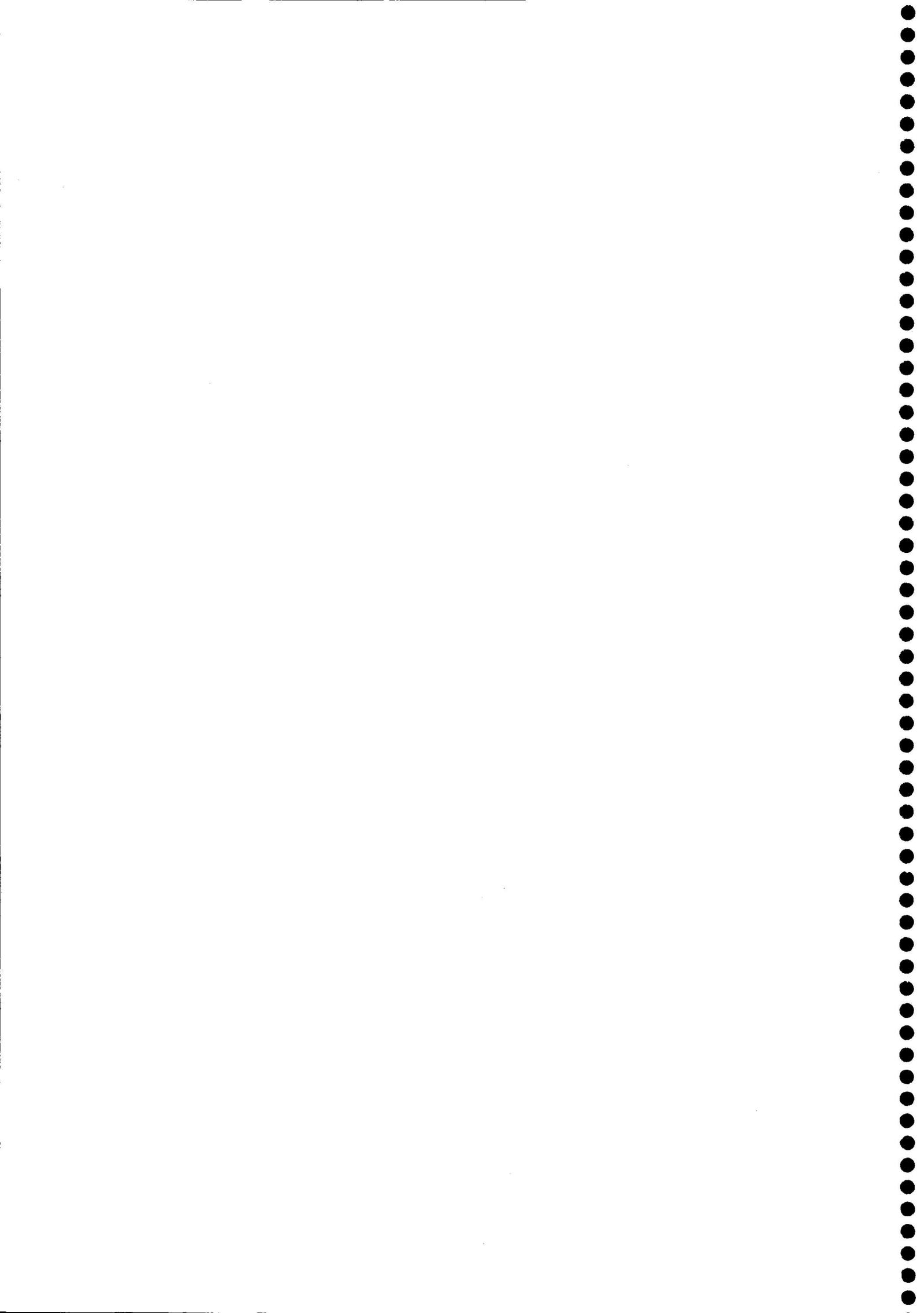
Si la fijación de nitrógeno atmosférico (N_2) es el mecanismo por el que los microorganismos inician la utilización de nitrógeno, la desnitrificación es el proceso biológico por el que se devuelve a la atmósfera el nitrógeno atmosférico fijado y el procedente del uso abusivo de fertilizantes nitrogenados que se emplean en la práctica agrícola, cerrando el ciclo biogeoquímico del N en la biosfera.

Dada la trascendencia de estos procesos y tomando en consideración que en ellos tanto la nitrogenasa como la nitrato reductasa desempeñan un rol elemental en dicho ciclo, los estudios fenotípicos del transporte del Mo en *B. japonicum* se realizarán en torno a estas enzimas.

De acuerdo con lo expuesto, se han planteado los siguientes OBJETIVOS:

1. Identificación y caracterización de los genes *mod* implicados en el transporte de Mo de alta afinidad en *Bradyrhizobium japonicum*.
2. Construcción y caracterización de mutantes *mod* de *B. japonicum*, en vida libre y en simbiosis.
3. Estudio de regulación de la expresión de los genes *mod* de *B. japonicum*.
4. Estudio de regulación por Mo de genes que codifican molibdoenzimas.
5. Implicación del transportador del sulfato sobre el transporte del Mo.

2. MATERIAL Y MÉTODOS



2.1. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

2.1.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* y *Escherichia coli*, así como los plásmidos utilizados en este trabajo, junto con sus características más relevantes, se indican en las Tablas 2.1 y 2.2, respectivamente.

Tabla 2.1. Cepas bacterianas.

CEPA	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	FUENTE O REFERENCIA
<i>B. japonicum</i>		
USDA110	Cepa parental; Cm ^r	Maier y Brill (1978)
GRMB1	USDA110 <i>modB</i> ::Tn5 con pSUP2021; Cm ^r , Km ^r	Este trabajo
GRMB1pBG0506	GRMB1 con pBG0506, Cm ^r , Km ^r , Tc ^r	Este trabajo
110-0512	USDA110 <i>modA</i> ::Ω; Cm ^r , Sm ^r , Spc ^r	Este trabajo
110-0512pBG0523	USDA110 <i>modA</i> ::Ω, con pBG0523, Cm ^r , Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
110-0512pBG0524	USDA110 <i>modA</i> ::Ω, con pBG0524, Cm ^r , Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
110-0512pBG0525	USDA110 <i>modA</i> ::Ω, con pBG0525, Cm ^r , Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
110-0512pBG0526	USDA110 <i>modA</i> ::Ω, con pBG0526, Cm ^r , Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
USDA110pBG0513	USDA110 con pBG0513, Cm ^r , Tc ^r	Este trabajo
110-0512pBG0513	110-0512 con pBG0513, Cm ^r , Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
USDA110pRJ1025	USDA110 con pRJ1025, Cm ^r , Tc ^r	Este trabajo
110-0512pRJ1025	USDA110 <i>modA</i> ::Ω, con pRJ1025, Cm ^r , Sm ^r , Tc ^r	Este trabajo
USDA110pBG0613	USDA110 con pBG0613, Cm ^r , Tc ^r	Este trabajo
110-0512pBG0613	USDA110 <i>modA</i> ::Ω, con pBG0613, Cm ^r , Tc ^r	Este trabajo
GRNAP1	USDA110 <i>napA</i> ::Ω, Cm ^r , Sm ^r , Spc ^r	Delgado <i>et al.</i> (2003)
110-0522	USDA110 ORF1::Ω; Cm ^r , Sm ^r , Spc ^r	Este trabajo

<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>supE44, ΔlacU169, f80, lacZΔM, 5hsdR171, <i>recA1, endA1, gyrA96, thi1, relA1</i></i>	BRL®
S17.1	<i>thi, pro, recA, hsdR, hsdM, RP4Tc::Mu,</i> Km ^r :Tn7; Tp ^r , Sm ^r , Spc ^r	Simon <i>et al.</i> (1983)
MC1061	Δ (lacIPOZYA)X74 hsdR	Casadaban <i>et al.</i> (1983)

Tabla 2.2. Plásmidos.

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	FUENTE O REFERENCIA
pUC18	Vector de clonación; Ap ^r	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
pBS II KS(+)	Vector de clonación; Ap ^r , <i>lacZ, ori fl</i>	Stratagene®
pSUP2021	Vector de clonación pBR325::Tn5, <i>mob</i> ⁺ , Cm ^r , Ap ^r , Km ^r	Simon <i>et al.</i> (1983)
pSUP202pol4	Vector de clonación derivado de pSUP202, con el lugar de múltiple clonaje (MCS) entre <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i> del pBS II KS+/-; Tc ^r	Fischer <i>et al.</i> (1993)
pBBR1MCS-3	Vector de clonación; Tc ^r	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pBBR1MCS-4	Vector de clonación, Ap ^r	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pJB3Tc19	Vector de clonación; Ap ^r Tc ^r	Blatny <i>et al.</i> (1997)
pMP220	Vector de clonación para la construcción de fusiones transcripcionales con <i>lacZ</i> ; Tc ^r	Spaink <i>et al.</i> (1987)
pME8656	Vector de clonación para la construcción de fusiones transcripcionales con <i>lacZ</i> , Km ^r	Nienaber <i>et al.</i> (2001)
pHP45Ω	Plásmido portador de los genes de resistencia a Sm/Spc (interposón Ω), Sm ^r Spc ^r	Prentki y Kirsch (1984)
pK18mobsacB	Vector de clonación derivado del pK18, <i>mob</i> ⁺ , <i>oriT</i> (RP4), <i>lacZ, sacB</i> , Km ^r	Schäfer <i>et al.</i> (1994)
pBG0613	Fusión transcripcional P _{<i>nape</i>} :: <i>lacZ</i> del plásmido pMP220; Tc ^r	Delgado <i>et al.</i> (2003)
pRJ1025	Fusión transcripcional P _{<i>njd</i>} :: <i>lacZ</i> del plásmido pMP220; Tc ^r	Alvarez-Morales <i>et al.</i> (1986)
pCHL7B	pBS con el fragmento <i>Bam</i> HI (5,9 kb) que contiene la mitad del Tn5 (Km ^r) y región de ADN adyacente de la mutante <i>B. japonicum</i> GRMB1, dicha región se utilizó para preparar la sonda MOD, Ap ^r Km ^r	Este trabajo

cGBj20-23	Cósmido derivado de pLAFR3, procedente de la genoteca de <i>B. japonicum</i> USDA110 (vial 20), que mostró señal de hibridación (<i>Pst</i> I) con la sonda MOD, Tc ^r	Este trabajo
pBG0502	pBS con el fragmento <i>Pst</i> I del cósmido cGBj20-23, que mostró señal de hibridación (4,5kb) con la sonda MOD, Ap ^r	Este trabajo
pBG0504	pBS con el fragmento <i>Eco</i> RI del cósmido cGBj20-23, que mostró señal de hibridación (8,8 kb) con la sonda MOD, Ap ^r	Este trabajo
pBG0505	pBS con el fragmento <i>Sal</i> I (1,8 kb) procedente del pBG0502, Ap ^r	Este trabajo
pBG0506	pJB3Tc19 con el fragmento <i>Pst</i> I (4,5 kb) procedente del pBG0502, Ap ^r Tc ^r	Este trabajo
pBG0507	pJB3Tc19 con el fragmento <i>Eco</i> RI (8,8 kb) procedente del pBG0504, Ap ^r Tc ^r	Este trabajo
pBG0508	pBS con el fragmento <i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I (3,5 kb) procedente del pBG0504, Ap ^r	Este trabajo
pBG0509	pBS con el fragmento <i>Sal</i> I/ <i>Pst</i> I (2,6 kb) procedente del pBG0502, Ap ^r	Este trabajo
pBG0510	pBS con el fragmento <i>Eco</i> RV (0,9 kb) procedente del pBG0509, Ap ^r	Este trabajo
pBG0511	Inserción del interposón Ω en el sitio <i>Nru</i> I del fragmento <i>Eco</i> RV (pBG0510), Ap ^r Sm ^r Spc ^r	Este trabajo
pBG0512	pBG0511 digerido con <i>Sal</i> I/ <i>Pst</i> I, el fragmento de 0,9 kb en el cual se había insertado el interposón Ω , fue clonado en el pK18 <i>mobsacB</i> , Km ^r Sm ^r Spc ^r	Este trabajo
pBG0513	pMP220 con el fragmento <i>Sal</i> I/ <i>Nco</i> I (0,9 kb) procedente del pBG0509, mediante generación de extremos romos. Fusión transcripcional P _{modA} :: <i>lacZ</i> , Tc ^r	Este trabajo
pBG0514	pBS con el fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I (2,9 kb) procedente del pBG0502, Ap ^r	Este trabajo
pBG0515	pBG0514 digerido con <i>Sal</i> I y previa generación de extremos romos se insertó el interposón Ω , Ap ^r Sm ^r Spc ^r	Este trabajo
pBG0518	pBS con el fragmento <i>Eco</i> RV/ <i>Xho</i> I (1,2 kb) procedente del pBG0514, Ap ^r	Este trabajo
pBG0519	pBS con el fragmento <i>Hind</i> III/ <i>Pst</i> I (0,8 kb) procedente del	Este trabajo

	pBG0513, Ap ^r	
pBG0520	pUC18 con el fragmento <i>KpnI/SacI</i> (4,9 kb) que contiene el interposón Ω y que procede del pBG0515, Ap ^r Sm ^r Spc ^r	Este trabajo
pBG0521	pBS con el fragmento <i>EcoRV/PstI</i> (1,5 kb) procedente del pBG0509, Ap ^r	Este trabajo
pBG0522	pBG0520 digerido con <i>EcoRI/SalI</i> , el fragmento de 4,9 kb que contenía el interposón Ω , fue clonado en el pK18 <i>mobsacB</i> , Km ^r Sm ^r Spc ^r	Este trabajo
pBG0523	pBBR1MCS-3 con el fragmento <i>Apal/XbaI</i> (2,6 kb) procedente del pBG0509, Tc ^r	Este trabajo
pBG0524	pBBR1MCS-3 con el fragmento <i>XhoI/XbaI</i> (0,9 kb) procedente del pBG0510, Tc ^r	Este trabajo
pBG0525	pBBR1MCS-3 con el fragmento <i>XhoI/XbaI</i> (1,2 kb) procedente del pBG0518, Tc ^r	Este trabajo
pBG0526	pBBR1MCS-3 con el fragmento <i>Apal/XbaI</i> (1,5 kb) procedente del pBG0521, Tc ^r	Este trabajo
pBG0527	pUC18 con el fragmento <i>HindIII/PstI</i> (0,8kb) procedente del pBG0519, Ap ^r	Este trabajo
pBG0528	pBBR1MCS-4 con el fragmento <i>HindIII/SalI</i> (0,8 kb) procedente del pBG0527, Ap ^r	Este trabajo
pBG0529	pME8656 con el fragmento <i>EcoRI/SalI</i> (0,8 kb) procedente del pBG0528, Km ^r	Este trabajo
pBG0530	pSUP202pol4 con el fragmento <i>EcoRI/DraI</i> (4,0 kb) procedente del pBG0529, Tc ^r	Este trabajo

2.1.2. Medios de cultivo

Las cepas de *E. coli* se cultivaron de forma rutinaria en medio LB (Luria-Bertani):

Medio Luria-Bertani LB (Miller 1972): NaCl, 5 g; triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; agua (desionizada), 1 litro. Para preparar medio sólido, se adicionó agar

bacteriológico a una concentración de 15 g/litro. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El cultivo de células de *E. coli* se realizó a 37 °C.

Para *B. japonicum* se han empleado los siguientes medios:

Medio YEM (Vincent, 1970): Manitol, 5 g; NaCl, 0,1 g; extracto de levadura, 1 g; K_2HPO_4 , 0,5 g; $MgSO_4 \times 7 H_2O$, 0,2 g; agua (desionizada), 1 litro. Para preparar medio sólido se adicionó agar bacteriológico a una concentración de 15 g/litro. Este medio se utilizó para preparar los precultivos de células para inducciones y para determinar el crecimiento de las cepas en aerobiosis y microaerobiosis.

Medio YEMN: Se preparó adicionando 10 mM de KNO_3 al medio YEM. Este medio se utilizó para determinar el crecimiento de las cepas en microaerobiosis y anaerobiosis y para la realización de inducciones en tales condiciones. A veces fue necesario adicionar determinadas concentraciones de Na_2MoO_4 .

Medio PSY (Regensburger y Hennecke 1983): KH_2PO_4 , 0,3 g; Na_2HPO_4 , 0,3 g; $CaCl_2 \times 2H_2O$, 0,05 g; $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,10 g; extracto de levadura, 1 g; peptona, 3 g; 10 ml de solución concentrada 100x de elementos traza; agua desionizada, 1 litro. Para preparar medio sólido fue necesario adicionar agar bacteriológico a una concentración de 15 g/litro. Este medio se utilizó para el cultivo de células para el aislamiento de ADN genómico de cultivos aeróbicos y para preparar suspensiones bacterianas.

Medio Bergersen (Bergersen 1977): Medio mínimo para *B. japonicum*: K_2HPO_4 , 0,23 g; $MgSO_4 \times 7 H_2O$, 0,10 g; glicerol, 4 ml; glutamato sódico, 1,1 g; 10 ml de solución concentrada 100x de elementos traza; agua desionizada, 1 litro. Para preparar medio sólido fue necesario adicionar agar bacteriológico a una concentración de 15 g/litro. Se empleó para sembrar las conjugaciones, para la realización de inducciones en semiaerobiosis. A veces fue necesario adicionar determinadas concentraciones de Na_2MoO_4 .

Solución concentrada de elementos traza (100x): H_3BO_3 , 1g; $ZnSO_4 \times 7H_2O$, 0,1 g; $CuSO_4 \times 5H_2O$, 0,05 g; $Mn Cl_2$, 0,05 g; $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$, 0,01 g; $FeCl_3$, 0,1 g; agua desionizada, 1 litro. A veces fue necesario emplear solución de elementos traza carente de Mo.

Todos los medios de cultivo para *B. japonicum* se prepararon utilizando agua milli-Q, ajustando el pH a $7,0 \pm 0,2$ y se esterizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El cultivo de células de *B. japonicum* se realizó a 28 °C.

2.1.3. Antibióticos

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se realizó a partir de soluciones concentradas de los mismos en agua desionizada y posterior esterilización con filtros Minisart® NML (Sartorius) de 0,2 µm de tamaño de poro. En el caso de las soluciones de tetraciclina y de cloramfenicol no fue necesaria la esterilización por filtración ya que se empleó alcohol o una mezcla hidroalcohólica para disolver los citados antibióticos. La concentración final de los distintos antibióticos fue la que se indica en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Antibióticos.

ANTIBIOTICO	CONCENTRACION (µg/ml)		
	<i>B. japonicum</i>		<i>E. coli</i>
	Líquido	Sólido	Líquido y sólido
Espectinomomicina (Spc)	100	200	25
Sulfato de estreptomicina (Sm)	100	200	25
Tetraciclina* (Tc)	50	100	10
Sulfato de kanamicina (Km)	100	200	20
Ampicilina (Ap)	–	–	100
Cloramfenicol** (Cm)	20	20	50

-*La solución concentrada de Tc se preparó en metanol:agua (1:1) o metanol dependiendo de la concentración de la misma (1 ó 10 mg/ml, respectivamente).

-**Para la solución concentrada de Cm se utilizó etanol.

2.1.4. Conservación de cepas bacterianas

Para la conservación prolongada de las distintas cepas se han utilizado criotubos que contenían alícuotas de cultivos en fase logarítmica adicionados de glicerol estéril a una concentración final del 20%. En el caso de las cepas de *B. japonicum*, se emplearon suspensiones bacterianas que se obtuvieron a partir de cultivo sólido. Los criotubos se almacenaron a -80 °C.

2.1.5. Cultivo de células de *B. japonicum*

2.1.5.1. Cultivo aeróbico

Los cultivos de células de *B. japonicum* se llevaron a cabo, de forma rutinaria, a partir de precultivos de 3 ml de medio líquido con los que se inocularon (dilución 1:50) volúmenes de 20, 50 ó 100 ml de medio de cultivo líquido. Estos cultivos, a su vez, se emplearon para inocular (dilución 1:100) cantidades mayores de medio de cultivo. El medio de cultivo PSY se empleó como medio líquido rutinario. El medio YEM se utilizó para preparar los precultivos de células para inducciones o para el cultivo de células de las que se aisló el ARN para experimentos de extensión del cebador. Las células se incubaron aeróbicamente en un agitador orbital (200 r.p.m.) a 28 °C durante 4- 6 días.

2.1.5.2. Cultivo microaeróbico y anaeróbico

Para el cultivo microaeróbico de *B. japonicum* se utilizaron tubos tapa rosca de 17 ml de capacidad y enrasados hasta su volumen total con el medio de cultivo requerido.

Estos tubos se inocularon de manera que la DO_{600} inicial de los cultivos fuera de 0,030 - 0,050. Las células se incubaron con agitación (100 r.p.m.) a 28 °C durante 8-10 días.

En el caso del cultivo anaeróbico se utilizaron tubos de 17 ml provistos de tapón de goma perforable que contenían un 50 % de su capacidad de medio YEM o YEMN. Igualmente la DO_{600} inicial de los cultivos fue de 0,030 - 0,050. La anaerobiosis se consiguió gaseando el medio con argón hasta que la concentración de O_2 en el interior de los frascos fuera de 0,1%. Dicha concentración se determinó haciendo pasar el flujo procedente del interior del frasco a través de un analizador de O_2 (Servomex 572B). Para evitar posibles contaminaciones durante el proceso de gaseado, se emplearon filtros Acro 50 (Gelman) de 0,2 μm de tamaño de poro. Es propicio mencionar que el término anaerobiosis se empleó no para indicar la ausencia absoluta de oxígeno, sino como forma de cultivo en la que se procuró eliminar la mayor parte del oxígeno disponible. Una vez estandarizados los tiempos adecuados para obtener una concentración de O_2 de 0,1%, no fue necesario el uso del analizador de oxígeno, puesto que en adelante se gaseaban los tubos que contenían el medio inoculado durante un periodo de cinco minutos. y se incubaron con agitación (100 r.p.m.) a 28 °C hasta llegar a la fase estacionaria (7-10 días).

2.1.6. Incubación de células en microaerobiosis y anaerobiosis con nitrato

En vista que, bajo determinadas condiciones (limitación de Mo), muchas de las cepas mutantes de *B. japonicum* empleadas en este estudio eran incapaces de crecer cuando se cultivaban micro y anaeróbicamente con nitrato, la inducción de actividad nitrato reductasa y β -galactosidasa, se llevó a cabo de la manera que se indica a continuación:

1.- Las células de *B. japonicum* cultivadas aeróbicamente en medio YEM líquido durante 4 días se precipitaron (8.000 r.p.m., 15 minutos, 4 °C), se lavaron , se resuspendieron en el mismo medio (2,5 ml/l de cultivo original) y, finalmente, se utilizaron para inocular (2,5 ml/l) frascos provistos de tapón de goma perforable que contenían medio YEM y YEMN.

2.-Para la inducción en microaerobiosis, se emplearon frascos enrasados con medio hasta su volumen total. Para la inducción en anaerobiosis, los frascos se llenaron al 50 % de su capacidad y se eliminó la mayor parte del oxígeno según se indica en el apartado 2.1.5. En ambas condiciones, los cultivos se incubaron con agitación (100 r.p.m.) a 28 °C un tiempo mínimo de 36 h.

3.- Para la detección de actividad β -galactosidasa, se emplearon tubos de 17 ml de capacidad provistos de tapón de rosca que contenían medio YEM. Cuando fue necesario el medio se suplementó con KNO_3 (10 mM), Na_2MoO_4 , etc. La inoculación se realizó de manera que la densidad óptica, determinada a 600 nm (DO_{600}), oscilara alrededor de 0,2. Después, las células se incubaron durante el tiempo necesario, normalmente 96 horas, hasta conseguir que la DO_{600} incrementara hasta 0,4-0,6. Finalmente, se tomaron alícuotas de los cultivos (1,5 ml para cultivos aeróbicos y 3 ml para cultivos microaeróbicos) para determinar la actividad β -galactosidasa (ver apartado 2.2.3).

4.- Para la determinación de actividad nitrato reductasa, las células se incubaron durante al menos 96 h en medio YEM y YEMN. Después de la incubación, las células se centrifugaron y lavaron (8.000 r.p.m., 15 minutos, 4 °C) con buffer Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) hasta eliminar el nitrito del medio, se resuspendieron en el mismo tampón (10 ml/l de medio de incubación) y, finalmente, se emplearon para los ensayos de actividad nitrato reductasa (apartado 2.2.1).

5.- Para la detección inmunológica de proteínas o para la detección de citocromos tipo *c*, las células de *B. japonicum* se cultivaron aeróbicamente, durante 72 horas, en matraces de 2 l que contenían 500 ml de medio YEM. Después de la incubación, las células se lavaron mediante centrifugación (8.000 r.p.m., 10 minutos, 4 °C) y se resuspendieron en el mismo medio, con lo que se inocularon frascos de 1 l enrasados hasta un volumen total con YEMN, de forma que la DO_{600} inicial oscilara alrededor de 0,2. Las células se incubaron en agitación a 100 r.p.m. durante 96 horas. Pasado este tiempo, las células se centrifugaron y lavaron dos veces a fin de obtener las fracciones soluble (citosol) y particulada (membranas) de las células de *B. japonicum* (apartado 2.1.7).

2.1.7. Obtención de las fracciones soluble (citosol) y particulada (membranas) de *B. japonicum*

La obtención de citosol y membranas de *B. japonicum* se llevó a cabo mediante rotura de las células por diferencia de presión, siguiendo la metodología indicada por Fernández-López *et al.* (1996):

- 1.- Lavar dos veces las células de *B. japonicum*, con 2 – 3 ml de tampón de lavado.
- 2.- Resuspender el sedimento celular en 3 ml de tampón de extracción o fraccionamiento.
- 3.- Preenfriar en hielo el émbolo y el pistón de una célula de presión (SLM, Aminco).
- 4.- Romper las células aplicando una presión constante de 1000 PSIG en una prensa de French (SLM). Repetir el proceso 2-3 veces.
- 5.- Centrifugar el extracto celular resultante (10.000 r.p.m., 10 minutos, 4 °C) para sedimentar las células que no se hayan roto. Recoger el sobrenadante y recentrifugar a 50.000 r.p.m. (2 horas a 4 °C).
- 6.- El sobrenadante resultante se considera como la fracción soluble (citosol) y el sedimento como la fracción particulada (membranas).
- 7.- El sedimento se lava sin resuspenderlo, en 100 µl de tampón de lavado y finalmente, con la ayuda de un palillo estéril, se resuspende en 100 µl de tampón de lavado y se distribuye en tubos de microfuga (20 µl/tubo).
- 8.- El sobrenadante se concentra empleando un dispositivo de filtrado por centrifugación Centricon® (Millipore), se centrifuga a 6.500 r.p.m. durante 2 – 4 horas, hasta obtener un volumen concentrado aproximado de 100 µl, que se distribuyen en tubos de microfuga (20 µl/tubo).

- **Tampón de lavado:** 50 mM de NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 6,8; 1 mM MgCl₂; 0,1 mM CaCl₂ y 0,9% NaCl.

- **Tampón de extracción o de fraccionamiento:** Al tampón de lavado se le adiciona: 1mM de fluoruro de ácido fenil sulfónico (PMSF), ADNasa (20 µg/ml) y ARNasa (20 µg/ml).

2.1.8. Determinación del crecimiento de *B. japonicum* en medios de cultivo con diferentes concentraciones de Mo, sulfato, cisteína o tungsteno.

- Para la determinación de la concentración mínima de Mo (CMM) por la cual la cepa 110-0512 recuperaba el fenotipo de la cepa parental, esa se inoculó en medio Bergersen con 10 mM de KNO_3 y diferentes concentraciones de Na_2MoO_4 (0,25; 0,35; 0,45 y 0,5 μM) e incubaron en condiciones microaeróbicas. Diariamente se determinó la D.O.₆₀₀ de los cultivos. Se empleó como control a la cepa USDA110.

- Para la determinación del efecto de la limitación de sulfato sobre la CMM por la cual la cepa 110-0512 recuperaba el fenotipo de la cepa parental, la cepa 110-0512 se inoculó en dos sets de tubos con medio Bergersen con 10 mM de KNO_3 y diferentes concentraciones de Na_2MoO_4 (0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40 μM) y cada set de tubos contenía 5,0 μM y 0,5 mM de sulfato, e incubaron en condiciones microaeróbicas. Diariamente se determinó la D.O.₆₀₀ de los cultivos. Se empleó como control positivo a la cepa USDA110 y como control negativo a la cepa 110-0512 inoculada en medio Bergersen y sin adición de Mo.

-Para la determinación del efecto de la altas concentraciones de sulfato sobre los requerimientos de Mo por las cepas USDA110 y 110-0512 de *B. japonicum*, las células se inocularon en tres tipos de medio Bergersen con KNO_3 10 mM como única fuente nitrogenada y además contenía, diferentes concentraciones de Mo y sulfato, e incubaron en aerobiosis. Medio A: Medio Bergersen con 0,35 μM de Mo y diferentes concentraciones de sulfato (0,5; 0,75 y 1,0 mM de MgSO_4); Medio B: Medio Bergersen con 0,5 mM de Mo y diferentes concentraciones de sulfato (0,5; 0,75 y 1,0 mM de MgSO_4); Medio C: Medio Bergersen con 1,0 mM de Mo y diferentes concentraciones de sulfato (0,5; 0,75 y 1,0 mM de MgSO_4). Diariamente se determinó la D.O.₆₀₀ de los cultivos.

- Para la determinación del efecto de la cisteína sobre el crecimiento de las cepas de *B. japonicum* USDA110 y 110-0512, en presencia de diferentes concentraciones de Mo y sulfato, las células se inocularon en tres tipos de medio Bergersen con KNO_3 10 mM como única fuente nitrogenada y además contenía, diferentes concentraciones de Mo

(sin adición de Mo, 0,15; 0,25 y 0,35 μM), y sulfato e incubaron en aerobiosis. Medio A: Medio Bergersen con 0,5 mM de sulfato; Medio B: Medio Bergersen sin sulfato, pero suplementado con cisteína (0,4 mM de azufre); Medio C: Medio Bergersen suplementado con 0,5 mM de sulfato y cisteína (0,4 mM de azufre). Diariamente se determinó la D.O.₆₀₀ de los cultivos.

- Para la determinación del efecto del tungsteno sobre el crecimiento de la cepa USDA110 de *B. japonicum*, las células se inocularon en medio YEMN, en ausencia y presencia de Mo adicionado (0,5 μM) y diferentes concentraciones de Na_2WO_4 . (sin adición de W, 1, 5, 10, 20 y 50 mM), e incubaron en condiciones microaeróbicas. Diariamente se determinó la D.O.₆₀₀ de los cultivos.

2.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS

2.2.1. Determinación de actividad nitrato reductasa (NR)

La determinación de actividad nitrato reductasa en extractos celulares (ensayos *in vitro*) se realizó empleando la metodología descrita por Delgado *et al.* (1989). Para ello,

1.- Mezclar:

250 μ l de mezcla NR

200 μ l de suspensión o extracto celular (0,3-0,5 mg de proteína)

2.- Iniciar la reacción adicionando 50 μ l de ditionito sódico 46 mM en Tris/HCl 500 mM pH 7,5 (8 mg/ml). Mezclar con suavidad e, inmediatamente, colocar los tubos a 30 °C.

3.- Mantener la reacción a 30 °C durante 15-30 minutos. Los controles se obtienen agitando las mezclas de reacción vigorosamente en el momento de la adición del ditionito sódico hasta la completa desaparición del color azul producido por éste.

Para la detección de actividad nitrato reductasa en células enteras (ensayos *in situ*) se empleó la misma mezcla de reacción suplementada con 50 μ g/ml de alquil-trimetil-bromuro de amonio (MTAB) para permeabilizar las células.

-Mezcla NR (por 100 ml): 40 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5); 20 ml de KNO₃ 100 mM, 20 ml de metil viológeno 2 mM y 20 ml de agua destilada.

2.2.2. Determinación de nitrito

Para la valoración del nitrito se utilizó la reacción de diazotación de Griess-Yllosway que emplea la sulfanilamida y el ácido N-naftil-etilén-diamino (NNEDA) como reactivos (Hageman y Hucklesby, 1971):

1.- A un volumen de muestra se adicionan volúmenes iguales de sulfanilamida y de NNEDA. Agitar e incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.

2.- Determinar la absorbancia a 540 nm de longitud de onda. La curva patrón de nitrito se preparó a partir de concentraciones conocidas de KNO_2 en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5).

- **Sulfanilamida:** Disolver 5 g de sulfanilamida en 100 ml de ácido clorhídrico concentrado (12 N). Diluir hasta 500 ml con agua destilada.

- **Acido N-naftil-etilén-diamino (NNEDA):** Disolver 100 mg de NNDA en 500 ml de agua destilada.

* Ambos reactivos deben preservarse de la luz, manteniéndolos en frascos color topacio o envueltos en papel de aluminio. Es aconsejable guardarlos a 4 °C.

2.2.3. Determinación de la actividad β -galactosidasa

La actividad β -galactosidasa se determinó siguiendo la metodología que se describe a continuación (Sambrook et al. 1989):

1.- Tomar alícuotas de 1,5 ó 3 ml de los cultivos aeróbicos y microaeróbicos, respectivamente ($\text{DO}_{600} = 0,3-0,5$) de *B. japonicum*. Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 5 minutos. Resuspender en 300 μl de medio YEM.

2.- Añadir 400 μl de tampón Z.

3.- Adicionar 100 μl de cloroformo y 50 μl de SDS al 0,1 % en tampón Z. Agitar en vórtex durante 30 s e incubar 5-10 minutos a 30 °C.

4.- Adicionar 150 μl de ONPG en tampón fosfato 0,1 mM e incubar a 30 °C hasta que aparezca suficiente color amarillo. Adicionar 350 μl de CO_3Na_2 1 M.

5.- Centrifugar 5 minutos. Recoger el sobrenadante y determinar la absorbancia espectrofotométricamente a 420 nm.

- La actividad β -galactosidasa se expresa en unidades Miller (U), de acuerdo con la fórmula: $U = \frac{1000 \times \text{DO}_{420}}{t \text{ (minutos)} \times V \text{ (ml)} \times \text{DO}_{600}}$, donde DO_{420} y DO_{600} son los valores de DO

determinados a 420 y 600 nm respectivamente; t = tiempo de incubación; V = volumen de cultivo.

- La actividad β -galactosidasa también se puede expresar de acuerdo con la fórmula:

$$U/mg \text{ proteína} = \{1000 \times DO_{420}\} / \{0,0045 \times t \text{ (minutos)} \times V \text{ (ml)} \times mg \text{ proteína/ml}\}$$
, donde 0,0045 es la absorbancia de 1 nmol de ONPG; DO_{420} y DO_{600} son los valores de DO determinados a 420 y 600 nm respectivamente; t = tiempo de incubación; V = volumen de cultivo.

- **Tampón Z:** $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$ (60 mM), 1,068 g; $NaH_2PO_4 \times H_2O$ (40 mM), 0,551 g; KCl (10 mM), 0,074 g; $MgSO_4$ (1 mM), 0,0246 g; β -mercaptoetanol (50 mM), 0,350 ml; agua destilada, 100 ml. Ajustar a pH 7,0.

- **ONPG:** 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosido: 4 mg de ONPG/ml de tampón fosfato.

- **Tampón fosfato:** A: $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (0,1 mM), 1,245 g/70 ml; B: $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (0,1 mM), 0,689g/50 ml, 39 ml. Mezclar 61 ml de A y 39 ml de B.

- **Carbonato sódico** (CO_3Na_2 , 1 M): 10,6 g/ 100ml

2.2.4. Determinación de la concentración de proteína (Reactivo de BIO-RAD).

Este método se empleó para determinar la concentración de proteína en células y enteras y en extractos libres de células. En el caso de células enteras es necesario realizar el tratamiento previo de lisis que se describe a continuación:

1.- Tomar alícuotas de la muestra y adicionar 1 volumen de NaOH 1 N. Agitar en vórtex y hervir durante 20 minutos. Centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos para eliminar los restos celulares. Tomar alícuotas de 25 - 50 μ l de las muestras y completar con agua destilada hasta un volumen final de 500 μ l. Una vez lisadas las células el protocolo es común para todo tipo de muestras.

2.- Tomar alícuotas de las muestras convenientemente diluidas y completar con agua destilada hasta un volumen final de 800 μ l.

3.- Adicionar 200 μ l de reactivo de Bradford (BIO-RAD).

4.- Agitar en vórtex e incubar entre 2 y 60 minutos. La concentración de proteína se calcula después de registrar los valores de absorbancia de las muestras a una longitud de

onda de 595 nm frente a un blanco que contiene 800 µl de agua y 200 µl del reactivo de Bradford (BIO-RAD).

La concentración de proteína se calculó mediante interpolación respecto a una curva patrón que se preparó con albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma).

2.2.5. Detección inmunológica de proteínas.

2.2.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se ha empleado el método descrito por Laemmli (1970). Los geles de separación y de empaquetado se prepararon a una concentración final del 12 % y 5 % de acrilamida:bisacrilamida, respectivamente. Para ello, se prepararon las mezclas que contenían:

GEL DE SEPARACION (12%)		GEL DE EMPAQUETADO (5%)	
Agua	6,6 ml	Agua	6,8 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	5,0 ml	Tris 1 M pH 6,8	1,25 ml
EDTA 0,1 M pH 7,5	0,4 ml	EDTA 0,1 M pH 7,5	0,2 ml
SDS 10 %	0,2 ml	SDS 10%	0,1 ml
Acrilamida:Bisacrilamida (29,2:0,8), 30%	8,0 ml	Acrilamida:Bisacrilamida (29,2:0,8), 30%	1,7 ml
Persulfato amónico 10 %	200 µl	Persulfato amónico 10%	100 µl
TEMED	10 µl	TEMED	10 µl

Previo al cargado de las muestras en el gel, se calculó la concentración de proteína presente en cada una de ellas, a fin de cargar las mismas cantidades de proteína por cada muestra (10 – 50 µg). Estas se calentaron a 100 °C durante 1 – 2 minutos.

La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta Miniprotean II (BIO-RAD) que emplea como moldes placas de vidrio de 7 x 10 cm y espaciadores de 0,75 mm. La

intensidad de la corriente fue de 20 mA y a una temperatura ambiental baja (5 – 10 °C). Las muestras y los marcadores de tamaño molecular se prepararon mezclándolos con un volumen de tampón de carga.

- **Tampón de carga (2x):** Tris-HCl 60 mM pH 6.8, glicerol 20 %, SDS 2 %, EDTA 2 mM, β -mercaptoetanol 10 %, azul de bromofenol 0,2%. Calentar a 100 °C durante 1 minuto.

- **Tampón de desarrollo electroforético (5x):** Tris 15 g, glicina 72 g, agua destilada 1 litro. Para prepararlo 1x, diluir 200 ml del buffer 5x con 800 ml de agua destilada y luego adicionar 10ml de SDS al 10%.

2.2.5.2. Transferencia a membranas de nitrocelulosa (Western blotting) y quimioluminiscencia.

Después de la electroforesis (aproximadamente 3 h en las condiciones descritas), las proteínas se transfirieron a filtros de nitrocelulosa de la forma descrita por Bradley et al. (1988). Para ello, antes de su uso, la membrana de nitrocelulosa se equilibró, sumergiéndola durante 15 segundos en metanol, 2 minutos en agua milli-Q y por lo menos, 5 minutos en buffer de transferencia. A continuación, entre las dos esponjas de una cubeta de electroforesis Miniprotean II (BIO-RAD) empapadas en tampón de transferencia se formó una unidad compuesta por un papel Whatman 3MM también empapado en tampón de transferencia, el gel de poliacrilamida, la membrana y, finalmente, otro papel Whatman. La unidad así preparada se colocó sobre la cubeta y la transferencia se llevó a cabo aplicando una intensidad de 10 mA durante 3 h. Después de la transferencia, la membrana se sumergió en PBS y se comprobó si ésta había sido adecuada, para ello se cortó y tiñó con rojo Ponceau, durante 2 a 3 minutos, la parte de la membrana correspondiente al marcador y luego se colocó en PBS.

El resto de la membrana fue sumergida en tampón de bloqueo, en agitación, durante 2 horas a temperatura ambiente o bien, durante toda la noche a 4 °C. Tras un rápido lavado de la membrana con buffer PBST, se cubrió ésta, con 10 ml de una

dilución 1/1000 del anticuerpo (primario) en buffer PBSTA (10 µl de anticuerpo en 10 ml de PBSTA), en agitación, durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con PBST, durante 10 minutos por lavado, manteniendo siempre la agitación.

A continuación, se incorporó sobre la membrana, una solución de anti-IgG de conejo (anticuerpo secundario), marcada con peroxidasa a una dilución de 1/1000 (vol/vol) en PBSTA y se incubó, en agitación, durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con PBST y luego 2 veces con PBS, durante 6 minutos por lavado, manteniendo siempre la agitación.

Finalmente, se procedió al revelado, para lo cual, en la cámara oscura, se sumergió la membrana en la solución de quimioluminiscencia durante 2 – 3 minutos, en agitación. Bien escurrida, se envolvió en un plástico transparente y la emisión de luminiscencia se detectó poniendo en contacto la membrana con una película para autorradiografía (Hyperfilm β-max, Amersham), durante el tiempo apropiado según la intensidad de la luminiscencia (si esta era visible, 2 – 3 segundos de exposición fueron suficientes; si no, con 15 a 30 minutos se obtuvo una buena señal). El revelado de la película se llevó a cabo utilizando revelador y fijador de TETENAL® a las diluciones y tiempos recomendados. Mientras que la película secaba, la membrana se sumergió en PBS y luego se tiñó con la solución de rojo de Ponceau.

-
- **Solución de rojo de Ponceau:** Ponceau S 0,4 % (P/V) en ácido tricloroacético 3 % (V/V).
 - **Buffer de transferencia:** Tris 25 mM (18,0 g); glicina 192 mM (86,4 g); metanol 20 % (V/V) (1200 ml); agua destilada 4800 ml; pH 8,3.
 - **Buffer fosfato salino (PBS):** Na₂HPO₄ x 2H₂O 80 mM (14,24 g); NaH₂PO₄ x H₂O 20mM (2,76 g); NaCl 100 mM (5,84 g), agua destilada 1 l; pH 7,5.
 - **Buffer de bloqueo:** PBS con leche desnatada en polvo al 5 %.
 - **Buffer PBST:** PBS con Tween 20 al 0,1 %.
 - **Buffer PBSTA:** PBSTA con albúmina sérica bovina (Sigma) al 0,1 % (P/V).
 - **Solución de revelado:** luminol (Roche®, Alemania) 8,0 mg en 20 ml de solución Tris-HCl 50 mM pH 8,6 y NaCl 150 mM, a lo que antes de su utilización se añaden 200 µl de 4-yodofenol al 1 % en dimetilsulfóxido y 3,2 µl de H₂O₂ 30 %.

2.2.6. Detección de citocromos tipo *c* en membranas de *B. japonicum*

2.2.6.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se ha empleado el método descrito por Laemmli (1970). Los geles de separación y de empaquetado se prepararon a una concentración final del 12 % y 5 % de acrilamida:bisacrilamida, respectivamente, pero a diferencia de los geles empleados para la detección inmunológica de proteínas, contenían menor concentración de SDS, puesto que no se necesitaban condiciones desnaturalizantes. Para ello, se prepararon las mezclas que contenían:

GEL DE SEPARACION (12%)		GEL DE EMPAQUETADO (5%)	
Agua	6,6 ml	Agua	3,1 ml
Tris 1,5 M pH 8,8 + SDS 0,4 %	5,0 ml	Tris 0,25 M pH 6,8 + SDS 0,4 %	5,0 ml
EDTA 0,1 M pH 7,5	0,4 ml	EDTA 0,1 M pH 7,5	0,2 ml
Acrlamida:Bisacrlamida (29,2:0,8), 30%	8,0 ml	Acrlamida:Bisacrlamida (29,2:0,8), 30%	1,7 ml
Persulfato amónico 10 %	200 µl	Persulfato amónico 10%	150 µl
TEMED	10 µl	TEMED	10 µl

Previo al cargado de las muestras en el gel, se calculó la cantidad de proteína presente en cada una de ellas, ya que se cuidó que en todas las muestras se carguen las mismas cantidades (25 – 75 µg). Las muestras no se calentaron a fin de no inactivar las proteínas.

La electroforesis se llevó a cabo de manera similar que para la detección inmunológica de proteínas (apartado 2.2.5.1).

2.2.6.2. Transferencia a membranas de nitrocelulosa.

Después de la electroforesis (aproximadamente 3 h en las condiciones descritas), las proteínas se transfirieron a filtros de nitrocelulosa de acuerdo a lo descrito por Bradley et al. (1988), tal como se detalla en el apartado 2.2.5.2. Concluida la transferencia, la membrana se sumergió en PBS.

2.2.6.3. Detección de citocromos tipo *c*.

La detección de proteínas que pudieran tener hemo *c* unido covalentemente se realizó mediante la técnica descrita por Vargas et al. (1993), la cual está basada en la detección de actividad peroxidasa intrínseca del hemo *c*. Para ello, en la cámara oscura, se sumergió la membrana en la solución de revelado o de quimioluminiscencia (apartado 2.2.5.2), durante 2 – 3 minutos, en agitación. Bien escurrida, se envolvió en un plástico transparente y la emisión de luminiscencia se detectó poniendo en contacto la membrana con una película para autorradiografía (Hyperfilm β -max, Amersham), durante 10 – 30 minutos. El revelado de la película se llevó a cabo utilizando revelador y fijador de TETENAL® a las diluciones y tiempos recomendados. Mientras que la película secaba, la membrana se sumergió en PBS y luego se tiñó con la solución de rojo de Ponceau.

2.2.7. Determinación de la captación de Mo en cultivos de *B. japonicum*.

Para la determinación del nivel de captación de Mo por parte de células de las cepas a analizar, se utilizaron tubos tapa rosca de 17 ml de capacidad, los cuales fueron enrasados hasta su volumen total con medio YEMN y se prepararon en sets con diferentes concentraciones de Mo. Después de ser esterilizados, se incularon de manera que la DO₆₀₀ inicial de los cultivos fuera de 0,080 – 0,100. Estos cultivos se incubaron con agitación (100 r.p.m.) a 28 °C durante 10 días.

Trabajando por triplicado, diariamente se determinó la concentración de MoO_4^- presente fuera de las células de los cultivos bacterianos, para lo cual se utilizó el método espectrofotométrico de Cárdenas y Mortenson (1975), con algunas modificaciones.

El método se basa en la formación de un complejo ditiólico entre el tolueno -3,4-ditiol y el MoO_4^- y, la posterior extracción y cuantificación de este complejo.

El reactivo ditiólico se preparó disolviendo 1 g de tolueno - 3,4 - ditiol en 500 ml de NaOH al 1 %. Esta solución se agitó durante 1 hora; posteriormente, se añadió ácido tioglicólico, gota a gota, hasta visualizar la aparición de una ligera turbidez opalescente. El reactivo se almacenó en un recipiente de plástico a 4 °C por un periodo no mayor a 2 meses.

De cada tubo se tomó una muestra de 10 ml, las cuales se centrifugaron a 6000 r.p.m. durante 10 minutos, 4 °C, a fin de eliminar las células presentes en los cultivos. La concentración de MoO_4^- se determinó en el sobrenadante, al cual se añadió 1 ml de H_2SO_4 16 N y 0,5 ml del reactivo ditiólico. Tras agitar fuertemente durante algunos segundos para homogenizar la muestra, de preferencia con la ayuda del vórtex, se dejó en reposo durante un periodo de 20 minutos, hasta la completa formación de un complejo de color verde grisáceo.

El complejo coloreado se extrajo adicionando 1 ml de acetato de amilo, mediante agitación fuerte con el vórtex durante un lapso de 1 minuto. Finalmente se midió la absorbancia a 680 nm.

La concentración de MoO_4^- se calculó mediante interpolación respecto a una curva patrón que se preparó con medio YEMN conteniendo diferentes concentraciones de Na_2MoO_4 (Sigma).

