



03081
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

2
24

**CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION
DE NITROGENO**

**METABOLISMO DE CARBONO Y NITROGENO EN LA
FERMENTACION Y AEROBIOSIS DE Rhizobium etli**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA**

**P R E S E N T A :
SERGIO MANUEL ENCARNACION GUEVARA**

CUERNAVACA, MOR.

1997

**TESIS CON
FALSA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

... y si he podido ver a lo lejos es porque me ha apoyado en los hombros de unos gigantes.

Isaac Newton.

Dedico la presente tesis con todo cariño, a mis papás, por enseñarme el camino de la vida de la manera más amorosa y responsable, a quienes sin su apoyo seguramente no estaría yo escribiendo esta tesis.

A Ma. del Carmen por su apoyo incondicional tanto moral como académico, por sus palabras de aliento en todo momento, pero sobre todo por su cariño y por aceptar compartir la vida conmigo.

A mis hermanos Arminda y Javier por permitirme quererlos tanto como los quiero.

A mi ahijado y sobrino Bolívar Jesús, por darnos tanta felicidad a todos.

A mi maestro Jaime Mora por su amistad, confianza y enorme compromiso con mi formación académica.

A mi amigo Jorge Calderón en donde quiera que este.

A todos los que hicieron posible este trabajo.

Normalmente cuando uno llega a este punto de la escritura de una tesis, se piensa que lo más difícil ya está hecho, pero en realidad esta parte es sin duda la más compleja, cuando tiene uno que agradecer a las personas que han colaborado directa o indirectamente en la elaboración de un trabajo de tesis o en la formación académica del redactor de una tesis, y esto no es porque sea difícil agradecer a quien nos ha ayudado, sino porque es difícil no olvidar a alguno.

Agradezco a los Drs. Jaime Mora Celis, Georgina Hernández Delgado, Guillermo Dávila Ramos y Jorge Calderón Jiménez por su asesoría durante el Doctorado.

A los Drs. Edgardo Escamilla, Julio Collado, Jesús Aguirre, Mario Soberón y nuevamente a Guillermo Dávila y Jorge Calderón por sus comentarios durante la revisión de la tesis.

A Yolanda Mora por el cuidado y esmero en la redacción de esta tesis.

A mis compañeros y amigos del Centro de Investigación Sobre Fijación de Nitrógeno, por su amistad, ayuda y por los buenos momentos: a Mera, Araceli, Adriana C., Pedro B, Toña, Alberto, Víctor, Necho, Humberto, Sandra, Mike, Gisela, Martha, Nancy, Chivis, Adriana S, Pedro A, Alfonso, Alma, Amparo, Lupita, Oscar, Juanito, Ernesto P, Conchita, César, David, Patrick, Mario, Ramón, Sara Isabel, Jesús C, Jesús A y Svieta. A mis amigos del IBT y IIB Brenda, Humberto B, Socorro, Gisela D, Germán, Luz María, Lety y Verónica N.

Este trabajo se realizó bajo la Dirección del Dr. Jaime Mora Celis en el Departamento de Ecología Molecular del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México.

CONTENIDO.

1.-	Introducción.....	2
1.1.-	La disminución del crecimiento.....	4
1.1.1.-	Cambios morfológicos y fisiológicos presentes en bacterias que dejan de crecer.....	5
1.1.2.-	Síntesis de proteínas en células que dejan de crecer.....	6
1.2.-	Metabolismo de carbono en <i>Shigella</i>	6
1.2.1.-	Posibilidades nutricionales para <i>Shigella</i>	7
1.2.2.-	Mutantes en el metabolismo de carbono.....	9
1.2.3.-	Niveles enzimáticos.....	11
1.2.4.-	Regulación del ciclo de los ácidos tricarbóxicos.....	12
1.2.5.-	Síntesis de PMS.....	13
1.2.5.1.-	Síntesis de PMS en <i>Acetabacter halicrius</i>	13
1.2.5.2.-	Síntesis de PMS en <i>Shigella</i>	14
1.3.-	Integración del metabolismo de carbono y nitrógeno.....	15
1.4.-	La biología de los radicales del oxígeno.....	16
1.4.1.	Catalasas.....	18
1.5.-	La red de regulación dependiente del gene <i>rhoG</i>	19
1.6.-	Comunicación Bacteriana a través de N-acil homoserinas lactonas.....	20
1.6.1.-	Circuitos regulatorios del tipo <i>luxI-luxR</i>	21
1.7.-	Señales involucradas en la modulación.....	22
1.7.1.-	Comunicación intracelular y pequeñas bacteriocinas en <i>Shigella</i>	23
2.-	Justificación.....	24
3.-	Resultados.....	
3.1.-	Manuscrito del artículo "Fermentative and aerobic metabolism in <i>Shigella</i> <i>soli</i> ".....	30
3.2.-	Manuscrito del artículo "Genetic and physiological characterization of a <i>Shigella</i> <i>soli</i> mutant strain unable to synthesize poly- β -hydroxybutyrate".....	40
3.3.-	Manuscrito del artículo "Pyruvate carboxylase from <i>Shigella</i> <i>soli</i> mutant: characterization, nucleotide sequence, and physiological role".....	50
3.4.-	Manuscrito del artículo "Glutamine biosynthesis and the utilization of succinate and glutamine	

SUMMARY.

Strains of *Rhizobium etli*, *R. meliloti*, and *R. tropici* decreased their capacity to grow after successive subcultures in Minimal Medium (MM) with a pattern characteristic for each species. During the growth in MM, a fermentation like response is characterized by; organic acids and amino acids were excreted and poly- β -hydroxybutyrate (PHB) was accumulated, and concomitantly, the activities of several TCA cycle and auxiliary enzymes like PYC, PDH y OGDH decreased substantially or became undetectable, and cell aggregation. Optimal and sustained growth and a low PHB content were found in *R. etli* when it was grown in MM in the presence of supplements such as biotin, thiamine, glutamine, fatty acids (palmitic and stearic) malate and fumarate or inoculated at a low cell density with O2 maintained at 20%. Although these *Rhizobium* strains are not auxotrophic for biotin or thiamine the addition of each compound restores enzyme activities.

R. etli accumulates PHB and this is a biological marker of the fermentative metabolism, to elucidate the role of PHB on the carbon metabolism we constructed an *R. etli* PHB-negative mutant, did not accumulate PHB under any condition tested; however, during growth in MM large amounts of organic acids are excreted. The remarkable amount of metabolites excreted by the mutant-strain is direct evidence that this strain is less capable than the wild-type strain of effectively oxidizing the carbon source. This mutant grew poorly with pyruvate or glucose as the carbon source. A lower NAD⁺/NADH ratio was observed in the mutant strain, something that has to be related to the absence of a sink (PHB) for reductive power. It is known that these cofactors inhibit some of the enzymes of the TCA cycle or auxiliary enzymes. For instance, NADH inhibits PDH and OGDH. As already proposed for *R. etli*, PHB may be considered a necessary fermentative product that sequesters reductive power, allowing the TCA cycle to operate under microaerobic conditions.

biotin-supplemented cultures, PYC activity was substantially increased in all subcultures. This enzyme requires a biotin prosthetic group for its activity. For this we cloned and mutagenized the *pyc* gene, the mutant was unable to grow in pyruvate as a carbon source. During serial subcultivation in MM containing 30 mM succinate, the *R. etli* parent and PYC mutant strain exhibited similar decreases in growth rate with each subculture. Supplementation of the medium with biotin prevented the growth decrease of the parent but not the mutant strain, indicating that PYC was necessary for the growth of *R. etli* under these conditions.

Isotopic studies with ¹⁴C and ¹³N-labeled compounds demonstrated that in *R. etli* and *R. meliloti* the glutamine nitrogen and carbon are turned over to ammonium and CO₂; some of the ammonium released is assimilated back into glutamine. In contrast to many other bacteria, succinate is a good carbon source in *Rhizobium* and is effectively oxidized to CO₂ and oxidizes preferentially over glutamine. However an *R. meliloti* double mutant that lacks *GSII* and *GSIII* oxidizes glutamine more readily than succinate. *GSIII* activity is very low when glutamine is a carbon and nitrogen source. The lack of induction of *GSII* in the absence of succinate suggests a role for this organic acid in the induction of this enzyme.

M. en C. Sergio Manuel Encarnación Guevara.

Vo. Bo.

J. Jaime Mora Celis.

RESUMEN.

Cepas de *Shimobium olei*, *S. maliloti* y *S. tremulae* dejan de crecer después de subcultivos sucesivos en Medio Mínimo (MM) con un patrón específico para cada especie. Este crecimiento desbalanceado está asociado con un cambio de un metabolismo aeróbico a uno fermentativo. Se observó simultáneamente excreción de ácidos orgánicos, aminoácidos, acumulación de polibetahidroxibutirato (PHB) y concomitantemente un decremento en la actividad de algunas enzimas del ciclo TCA y enzimas auxiliares (anapleróticas) como PC, PDM y OGDH además de agregación celular. Un crecimiento óptimo, sostenido y con bajo contenido de PHB fué observado en *S. olei* CE3 cuando fué cultivado en MM con algunos suplementos adicionales como: biotina, tiamina, glutamina, ácidos grasos (palmitico y estérico), malato y fumarato; así cuando el crecimiento fué en condiciones especiales de cultivo como el inocular a una baja densidad celular o el mantener en el MM, mediante burbujeo, una concentración de oxígeno entre 18 y 20%. En MM suplementado con tiamina o biotina la cepa silvestre de *S. olei* CE3 mantiene niveles elevados de las enzimas del TCA. *S. olei* no es un autótrofo de estas vitaminas, este organismo es capaz de sintetizarlas y la síntesis de estas puede estar siendo reguladas negativamente en cierto momento del crecimiento en MM.

Uno de los marcadores del cambio de metabolismo es la acumulación de PHB, para conocer el papel de la acumulación de PHB en el metabolismo de carbono se obtuvo una mutante en la PHB-sintasa *phbC⁻*, la cual no acumula PHB y excreta al medio una concentración mayor de ácidos orgánicos, lo que indica que existe una menor capacidad de oxidación de la fuente de carbono, inclusive esta mutante no crece en piruvato o glucosa como fuente de carbono. Esto se debe a que la alta concentración de poder reductor, que no es sequestrado en la síntesis de PHB podría estar inhibiendo algunas actividades enzimáticas del TCA y de algunas enzimas auxiliares como la PDM. Nosotros proponemos que para *S. olei* el PHB puede ser considerado un producto de fermentación necesario ya que sequestra poder reductor, permitiendo la operación del TCA en condiciones microaeróbicas.

Por considerarla una enzima importante en el metabolismo aeróbico de *S. olei*, fué clonado y mutagenizado el gen de la Piruvato carboxilasa (PC) una enzima dependiente de biotina, observándose que la mutante no crece en piruvato como fuente de carbono y al ser subcultivada en succinato 30 mM es incapaz de crecer aún en presencia de esta vitamina, indicando que esta enzima es necesaria para el crecimiento de la bacteria al ser subcultivada en MM.

Mediante el uso de compuestos marcados con ¹⁴C y ¹³N demostramos que tanto en *S. olei* como en *S. maliloti* la glutamina se encuentra ciclando, es decir, se sintetiza y se degrada al mismo tiempo. Nuestros resultados indicaron que el succinato en contraste con otras bacterias, es una buena fuente de carbono para *S. maliloti* y que es eficientemente oxidado a CO₂ y preferentemente oxidado frente a la glutamina. Sin embargo una mutante de *S. maliloti* que carece de la *GSII* y *GSII⁻* oxida la glutamina en un grado mayor que el succinato. Cuando la bacteria es cultivada en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno, la actividad de la *GSII* es casi imperceptible. La pérdida de esta actividad enzimática nos sugiere que el succinato tiene un importante papel en la inducción de la *GSII*.

1.-INTRODUCCION.

1. INTRODUCCION.

El nitrógeno es un elemento que se encuentra en una gran variedad de compuestos y en casi todas las macromoléculas de los organismos, las proteínas y los ácidos nucleicos son especialmente ricos en nitrógeno. Aunque el nitrógeno molecular se encuentra en grandes cantidades en la atmósfera, es relativamente inerte químicamente y no puede ser usado por la mayoría de los seres vivos. La gran mayoría de los organismos deben obtener su nitrógeno de alguna forma combinada, por ejemplo, nitrato, amonio, o compuestos más complejos como aminoácidos. Sin embargo, estas formas combinadas de nitrógeno son muy escasas en el suelo, de tal manera que las bacterias fijadoras de nitrógeno juegan un papel muy importante en la incorporación del nitrógeno atmosférico a compuestos nitrogenados.

Algunas bacterias que fijan N₂ frecuentemente se encuentran en asociación con otros organismos con los que intercambian el nitrógeno fijado por carbono. Algunas de estas bacterias sufren cambios metabólicos que las conduce a fijar N₂ y asociarse eficientemente. Entre estas bacterias fijadoras de nitrógeno se encuentran las del género *Rhizobium* las cuales fijan este elemento en simbiosis con plantas leguminosas.

La fijación simbiótica de nitrógeno tiene lugar en los nódulos, órganos especializados que se desarrollan después de la infección de esta bacteria en la raíz de plantas leguminosas. En las células infectadas del nódulo se observan formas diferenciadas de *Rhizobium*, los bacteroides, que son los que fijan nitrógeno y aportan el amonio requerido para el crecimiento de la planta. En esta relación la bacteria proporciona amonio a la planta a cambio del carbono que ésta le provee durante la relación simbiótica. Varios modelos han sido propuestos para explicar como puede funcionar esta interacción (Kahn et al., 1985; Kohl et al., 1988; McDermott et al., 1989; Mellor, 1989; Brewin et al., 1990; Udvardi y Kahn, 1992; van Rhijn et al., 1995) y la idea central es que la fijación de nitrógeno se mantiene en un medio ambiente donde la planta tiene un considerable control sobre la disponibilidad de nutrientes para la bacteria y la remoción de productos del catabolismo.

Por otro lado el crecimiento bacteriano requiere la coordinación de varias vías metabólicas. El metabolismo de carbono, nitrógeno, oxígeno, estrés oxidativo, de temperatura, osmótico, pH etc., a veces son descritos cada uno como efectos separados, pero que están claramente ligados a través del metabolismo global de la célula. La disponibilidad limitada del oxígeno o los productos tóxicos del metabolismo de éste pueden producir un cambio total en el metabolismo de la bacteria, por mencionar sólo un ejemplo.

Uno de los objetivos principales del proyecto fué el estudiar los procesos fisiológicos que ocurren en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas. El enfoque que hemos seguido ha consistido en reproducir dichos procesos fuera de la planta, es decir, en vida libre. Entre los procesos fisiológicos más importantes que se llevan a cabo en la simbiosis, destaca el de la pérdida de la capacidad para crecer que sufre *Rhizobium* durante su proceso de diferenciación. En

la siguiente parte de la introducción (1.1) se analizarán los cambios morfológicos y fisiológicos que a la fecha se han reportado en la literatura en bacterias que dejan de crecer cuando las condiciones del medio ya no son favorables para continuar haciéndolo, de ésta manera se podrán comparar con los presentados por *Shigella* para enseguida poder analizar los mecanismos moleculares así como los reguladores del crecimiento existentes en estas bacterias y plantear la posibilidad de la existencia de mecanismos similares en *Shigella*.

1.1.- LA DISMINUCION DEL CRECIMIENTO.

El éxito de los procariotes para colonizar casi todos los medios ambientes de nuestro planeta, está relacionado con su habilidad para replicarse rápidamente cuando las condiciones son favorables para crecer, y en su capacidad para diferenciarse y para poder sobrevivir cuando las condiciones impiden su crecimiento óptimo. Para controlar su medioambiente y para contender con los retos de su entorno, es necesario el rápido y eficiente control de su expresión genética. Muchos genes son seleccionados para ser expresados bajo diferentes circunstancias y en muchos casos, esta expresión es regulada a través del control en el inicio de la transcripción. Los genes responden a una circunstancia particular de su medio ambiente y con frecuencia están controlados por reguladores globales muy generales o regulones. Esta organización de reguladores globales permite un control individual sobre genes, con diferente distribución en el cromosoma.

Las redes regulatorias son necesarias, primero, porque los genes involucrados en una respuesta particular pueden estar o no organizados en un solo operón, y segundo, porque varios genes pueden ser regulados independientemente; sin embargo en circunstancias diferentes pueden estar sujetos a un control coordinado. Un ejemplo de estos últimos son los genes y operones que codifican enzimas involucradas en la utilización de carbono y fuentes de energía, los cuales requieren de la presencia de un sustrato específico para su inducción, y los son controlados como grupo, por medio de represión catabólica.

Muchas redes regulatorias de la célula responden a diferentes tipos de estrés tales como el calor, el estrés oxidativo, daño a el ADN y limitación de nutrientes. Los productos de los genes de un regulón de respuesta a un estrés son necesarios para resistir dicho cambio ambiental. Sin embargo muchos reguladores no responden exclusivamente a un estrés en particular, y comparten genes. Cuando se disminuye el crecimiento se activan varias redes regulatorias aparentemente no ligadas (Van Bogelen et al. 1992; Great et al. 1986). Los productos de estos genes son interesantes ya que se conoce poco acerca de ellos y de su participación en la fisiología de la bacteria como por ejemplo, ¿que pasa cuando la bacteria detiene su crecimiento?, o ¿por qué en la última parte de la fase estacionaria las células mueren?. El análisis de estas respuestas generales pueden ayudar a entender las bases bioquímicas de los procesos que mantienen o llevan a una pérdida de la viabilidad en los procariotes que no tienen capacidad de diferenciación.

1.1.1.- CAMBIOS MORFOLOGICOS Y FISIOLOGICOS PRESENTES EN BACTERIAS QUE DEJAN DE CRECER.

Este fenómeno se encuentra ampliamente documentado en *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella* las cuales presentan una serie de cambios fisiológicos y morfológicos cuando dejan de crecer. A continuación se describen los cambios que presenta *E.coli* en las condiciones antes mencionadas.

Una disminución de nutrientes en el entorno de *E.coli* puede conducir a una disminución en la actividad metabólica de este organismo, en ocasiones, a un nivel mínimo. El término fase estacionaria del crecimiento de una bacteria se refiere a las condiciones en las cuales el organismo es incapaz de duplicarse sufriendo una serie de cambios fenotípicos como son: i) cambio en la composición de los ácidos grasos y fosfolípidos de la membrana interna de la bacteria, que es la barrera más importante entre el citoplasma y el medio extracelular (El-Khani et al., 1981); ii) incremento en la concentración de lipopolisacáridos en la membrana externa (Ivanov et al., 1989; iii) decremento en la capa de mureina (Allen et al., 1979); iv) protección y condensación del DNA (Mason et al., 1993); v) transcripción dirigida por factores sigma alternativos (Lange et al., 1991), fosforilación de subunidades de RNA polimerasa y alteraciones en la composición de ribosomas (Ozaki et al., 1991), síntesis de ppGpp y la disminución de tRNA sintetases (Jakubowski et al., 1992); vi) cambios de dirección en vías metabólicas afectándose las actividades enzimáticas correspondientes (Rasmussen et al., 1991; Chang et al., 1994); vii) formación de flagelos (Amaler et al., 1993); viii) excreción de acetato y glutámico al medio de crecimiento (Luli et al., 1990); ix) acumulación de carbono en forma de glucógeno y trealosa (Damotte et al., 1968) por mencionar algunas de los cambios más importantes (Huisman et al., 1995).

En estas condiciones, la bacteria sufre también cambios en sus circuitos metabólicos siendo excreción de acetato el que más llama la atención. Este acetato se produce, aparentemente, por un ineficiente funcionamiento del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), debido a que la α -cetoglutarato deshidrogenasa se pierde (Amarasingham et al., 1965). El resultado, es un proceso no cíclico en el cual existen dos brazos del ciclo TCA: uno de oxaloacetato a succinato y el otro de oxaloacetato y acetyl-CoA a α -cetoglutarato. Estudios en la expresión de algunos genes como *katG* que codifica para la catalasa HP11, sugieren que los intermediarios del TCA, pueden ser las señales que disparan la síntesis de proteínas reguladoras cuando se priva de nutrientes el medio de cultivo (Loewen et al., 1985). Recientemente se han reportado genes cuyos productos funcionan en estas condiciones metabólicas. Por ejemplo, los genes de la piruvato-formato liasa (*pfk*) y la piruvato oxidasa (*pox*) que se expresan preferentemente en estas condiciones (Rasmussen et al., 1991; Chang et al., 1994). Una observación interesante es el incremento en la citocromo d oxidasa dependiente de los reguladores globales *arcA*/*arcB* que monitorean el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria (Georgiou et al., 1988).

1.1.2.- SINTESIS DE PROTEINAS EN CELULAS QUE DEJAN DE CRECER.

La adición de inhibidores de la síntesis de proteínas por un breve lapso en el comienzo de la fase de disminución del crecimiento (pre-estacionaria), produce una disminución dramática en la supervivencia de *E. coli* (Reeve et al., 1984), *Salmonella typhimurium* (Spector et al., 1993) y especies de *Yersinia* (Mystrom et al., 1990). La adición de estos inhibidores en la fase estacionaria tiene poco efecto, lo que hace pensar que la síntesis de proteínas en las etapas primarias del crecimiento tienen efecto en la supervivencia en las etapas posteriores (Reeve et al., 1984; Mystrom et al., 1990). Trabajos recientes en varios laboratorios han confirmado esta propuesta, además han sido identificadas varias redes de genes reguladores y los genes individuales relacionados con la supervivencia (Mystrom et al., 1994; 1994b; 1994c; Spector et al., 1992; Lange et al., 1991; Tormo et al., 1990; Jenkins et al., 1991; Spence et al., 1990; Li et al., 1992). Varios de los productos genéticos esenciales presentan particularidades cinéticas y son inducidos pocas horas después de que el crecimiento ha cesado.

1.2.- METABOLISMO DE CARBONO EN *Rhizobium*.

Nosotros observamos que los cambios presentados por *Rhizobium* cuando cesa su crecimiento son consecuencia de un cambio de metabolismo del carbono, aeróbico a fermentativo y que la regulación enzimática en este organismo ha sido dirigida principalmente a enzimas del metabolismo de carbono, por lo anterior, el metabolismo de carbono es el objeto principal de nuestro estudio, por esto, es importante analizar los antecedentes de dicho metabolismo con la mayor profundidad posible, revisando las posibilidades nutricionales de *Rhizobium*, la regulación del ciclo TCA, los niveles de las enzimas involucradas, tanto en vida libre como en simbiosis, así como las posibles rutas catabólicas del carbono.

Los nódulos de las leguminosas presentan un nicho ecológico único para que *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* sean proveedores de carbono. Las propiedades de este nicho han sido estudiadas con interés por científicos de diferentes disciplinas. Las razones de este interés incluyen una atracción básica por la intrincada asociación planta-bacteria, y el potencial agronómico de esta relación. Si esperamos manejar o manipular este sistema, es esencial tener un entendimiento completo del metabolismo del carbono.

En la planta los compuestos derivados fotosintéticamente como la sacarosa entran al nódulo provenientes del floema. Estos compuestos son convertidos posteriormente en ácidos orgánicos y aminoácidos que pueden ser transportados a través de la membrana peribacteroidal al bacteroide. Posteriormente la oxidación de compuestos de carbono por los bacteroides genera ATP y poder reductor que es usado por la enzima nitrogenasa para convertir el nitrógeno en amoníaco. El amoníaco producido es exportado a la planta, donde es asimilado por la glutamino sintetasa y posteriormente convertido en amidas y/o ureídos para ser exportados al resto de la planta a través

del xilema (Atkins, 1991).

La reacción de fijación de nitrógeno es muy demandante, no sólo por que requiere una gran cantidad de ATP y poder reductor, sino porque es sensible a oxígeno y a agentes oxidantes. Las bacterias de la familia de las *Rhizobiaceae* son aeróbios obligados y el ATP producido resulta de la fosforilación oxidativa. Esto ha sido observado en *Bradyrhizobium japonicum* en donde un complejo de citocromos, inducido bajo condiciones microaeróbicas, es necesario para la simbiosis (Preisig et al., 1993). La respiración de *Rhizobium* en el nódulo consume oxígeno a través de oxidasas terminales presentes en los bacteroides las cuales tienen gran afinidad por O_2 (Hunt y Layzell, 1993). Este flujo de oxígeno a través de barreras O_2 difusible, localizadas en el parénquima del nódulo, mantiene la concentración de oxígeno a niveles compatibles con la actividad de la nitrogenasa (Hunt y Layzell, 1993).

Al momento se han dado pasos significativos para entender múltiples aspectos de la asociación de leguminosas con *Rhizobium*. Sin embargo, una cuestión básica, que consiste en saber cómo es regulado el metabolismo de carbono en el bacterioide, permanece sin resolver. Una peculiaridad de la relación *Rhizobium*-leguminosa es que muchos tipos de bacteroides acumulan carbono en forma de poli- β -hidroxibutirato (PHB), bajo condiciones en las cuales la energía para la nitrogenasa es supuestamente una limitante. La acumulación de éste polímero y los factores que rodean esta síntesis son importantes para entender cómo los bacteroides de *Rhizobium* metabolizan el carbono provisto por el hospedero. Mientras que la literatura sugiere que los bacteroides de *Rhizobium* tienen un ciclo TCA, la naturaleza microaeróbica del entorno del bacterioide sugiere que existen condiciones que pueden conducir a la represión/inhibición de algunas de las enzimas del ciclo TCA, en particular, la citrato sintasa, NADP-isocitrato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa, ya que estas enzimas son muy sensibles a inhibición por NAD(P)H, lo anterior puede ser una limitante para la completa operación del TCA. Si ese fuera el caso, los bacteroides pueden requerir del empleo de otras vías alternativas o "bypass" para continuar con la oxidación y generación de energía. Esas otras vías podrían ser usadas para ajustar niveles intracelulares del NAD(P)H. En seguida se mencionan las siguientes vías que pueden ser alternativas al ciclo TCA. (1) síntesis de PHB; (2) la enzadera malato-aspartato; (3) la vía α -cetoglutarato-glutamato; (4) un ciclo de los ácidos dicarboxílicos modificado; y (5) vías reductivas dirigidas a acetato, acetaldehído y etanol (6) síntesis de glucógeno.

1.3.1.- POSIBILIDADES NUTRICIONALES PARA *Rhizobia*.

Bradyrhizobia utiliza un amplio rango de fuentes de carbono para crecer (Graham, 1964; Dilworth y Glenn, 1981). Por ejemplo los disacáridos son utilizados por *Rhizobium spp.*, pero no por *Bradyrhizobium spp.* donde este último carece de sistemas de transporte. En muchos *Rhizobia*, las hexosas son catabolizadas por la vía Entner-Doudoroff (ED) descrita en muchas otras bacterias como *Moraxella*, *Rhodospirillum* y *Aerobacterium* y la vía de las pentosas *R. leguminosarum*, *R. lotii*, *R. trifolii* y *Rhizobium sp.*

MGR 234 (Ronsan y Primrose, 1979; Glenn et al., 1984; McKay et al., 1989).

Las evidencias de que el ciclo de las pentosas existe en *Shibuya* están basadas en la presencia de la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Romanov et al., 1994). En *S. granii* se detectó actividad de fosfogluconato deshidrogenasa tanto en bacterias crecidas en vida libre como en bacteroides (Romanov et al., 1994). Por otro lado Saroso et al., (1986) y McKay et al., (1989) han demostrado la presencia de todas las enzimas de la vía pentosa fosfato en *Shibuya* MGR234 y *S. lamninarum* MNF300, respectivamente.

El catabolismo de pentosas como L-arabinosa es común en *Shibuya* y *S. granii*, produciendo la formación de L-2-oxo-3-deoxialdonato (Duncan, 1979; Dilworth et al., 1986). En *Shibuya*, este se convierte a 2-oxoglutarato (Duncan, 1979; Dilworth et al., 1986) mientras que en *S. granii*, este compuesto es metabolizado a piruvato y glicolaldehído (Pedrosa y Zanca, 1974; Duncan, 1979).

Shibuya es capaz de metabolizar compuestos de 3 carbonos tales como el glicerol, a través de la glicero cinasa y la glicerol fosfato deshidrogenasa para formar gliceraldehído-3-fosfato que producirá piruvato (Arias et al., 1976). De la misma manera *Shibuya* es capaz de metabolizar compuestos de 2 carbonos a través del ciclo del glicoxilato con las enzimas isocitrato liasa y malato sintasa (Preston et al., 1989); el malato y el succinato que son los productos finales serían metabolizados directamente por el ciclo TCA. Cabe señalar que las enzimas participantes en esta ruta son inducibles e incluso reprimidas por succinato o glucosa.

Los ácidos dicarboxílicos como succinato, malato o fumarato son metabolizados vía el ciclo TCA, involucrando la enzima málica y la piruvato deshidrogenasa (McKay et al., 1988; Copeland et al., 1989; Driscoll et al., 1993). Asimismo en numerosos estudios en *Shibuya* ha sido reportada la presencia de enzimas específicas del ciclo TCA (Kurz y LaRue, 1977; Hawthorne et al., 1980). Sin embargo estos estudios no comprobaron la presencia de todas las actividades enzimáticas del ciclo TCA y no existen evidencias suficientes para asegurar la importancia fisiológica de un ciclo completo. Sin embargo, McKay et al. (1988) demostró la existencia de un ciclo completo en *S. lamninarum* cepa MNF3841, además de mencionar que las actividades enzimáticas no varían notablemente con las condiciones de crecimiento.

En lo concerniente a la utilización de aminoácidos como sustratos para el crecimiento de *Shibuya*, se encuentran varios reportes en la literatura. Por ejemplo para glutamato están los artículos de Poole et al., 1986; Jin et al., 1990a; para histidina están el de Dilworth et al., 1983; para 4-aminobutirato el de Jin et al., 1990b; para prolina, Jiménez-Zurdo et al., 1997 y para glutamina (Duran et al., 1993). El conocimiento de las vías para el catabolismo de aminoácidos en *Shibuya* es aún muy esquemático y por lo general está restringido a la demostración de las primeras enzimas de las vías.

Al crecer *Shibuya* en sustratos como ácidos dicarboxílicos, o aminoácidos como glutamato, prolina o 4-aminobutirato, éstos son

catabolizados mediante el ciclo TCA con dos finalidades; por un lado para el mantenimiento de intermediarios para la biosíntesis y por otro para la síntesis de azúcares necesarias en la formación de pared celular y la biosíntesis de nucleótidos. La gluconeogénesis se lleva a cabo vía fosfoenolpiruvato carboxicinas (McKay et al., 1985; Finan, 1988; Driscoll y Finan, 1993).

1.3.2.- MUTANTES EN EL METABOLISMO DE CARBONO

Se han realizados varios estudios en los que se analizó la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno en mutantes con deficiencias en el catabolismo de fuentes de carbono. Se han obtenido mutantes incapaces de degradar azúcares de 12C, 6C o 5C (Ronson y Primrose, 1979; Glenn et al., 1984; Dilworth et al., 1985), sin embargo, nodulan y fijan N₂ de manera semejante a la cepa silvestre. En otros casos como el de una mutante en la fructoquinasa en *Rhizobium* nodula, pero no es capaz de fijar nitrógeno (Gardiol et al., 1980). Mutantes en la fosfoglucoasa isomerasa muestran retraso en la nodulación y la fijación de nitrógeno es baja respecto a la cepa silvestre (Arias et al., 1982). Asimismo mutantes de *R. meliloti* en fosfoglicerato cinasa, enolasa y gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa son incapaces de fijar nitrógeno. Por otro lado, es conveniente mencionar que mutantes en gluconeogénesis presentan diversos fenotipos simbióticos dependiendo de la especie bacteriana de que se trate o de la planta con la cual se establece la simbiosis. De esta manera, mutantes en la fosfoenolpiruvato carboxicinas (PCK), muestran una fijación de nitrógeno reducida a pesar de que en los bacteroides de la cepa silvestre no se detecta actividad de esta enzima (Osteras et al., 1991). En *R. lotum* esta misma mutación no produce un fenotipo simbiótico (McKay et al., 1985) y se detecta actividad de esta enzima a niveles bajos en los bacteroides. En mutantes de *Rhizobium* en la cepa N234, si la simbiosis se realiza con *Lotus* o *Medicago* la eficiencia en la fijación de nitrógeno disminuye un 60 y 30% respectivamente, pero cuando nodula a *Vicia* presenta un fenotipo Fix- (Osteras et al., 1991). Sin embargo, un gran número de reportes (Glenn y Brewin, 1981; Ronson et al., 1981; Finan et al., 1983; Arwas et al., 1985; Finan et al., 1988; Humbeck y Werner, 1989; Day et al. 1989; El-Din et al. 1992) han mostrado que cuando se presentan defectos en la capacidad para transportar ácidos dicarboxílicos (dic), succinato, malato o fumarato, las mutantes tienden a tener un fenotipo fix-. Esto sugiere que el transporte de ácidos dicarboxílicos es esencial para la fijación de nitrógeno. Los bacteroides de algunas especies de *Rhizobium* contienen cantidades significativas del polímero polibetahidroxibutirato (PHB) como reserva de carbono. Este compuesto podría ser capaz de generar ácidos dicarboxílicos "in situ", los cuales estarían disponibles para soportar la fijación de nitrógeno.

Aún no es claro el por qué mutantes en el transporte de ácidos dicarboxílicos, nodulan, y sus bacteroides logran la diferenciación celular. Sin embargo, esto sugiere que estas mutantes pueden obtener suficiente carbono de la planta hospedera. A pesar de algunos intentos por determinar la identidad de las fuentes de carbono que están siendo utilizadas en esas circunstancias, esto aún no se

conoce. Se ha observado que dobles mutantes que pierden el sistema de transporte de ácidos dicarboxílicos y la capacidad de catabolizar un gran número de azúcares como fuentes de carbono (5C, 6C y 12C o glutamato; Arwas et al., 1986), son capaces de nodular así como las mutantes act-.

Entre las mutantes reportadas recientemente, la mutante de A. nifidii que pierde la actividad de la enzima mítica dependiente de NAD, pero que retiene la enzima mítica dependiente de NADP (Driscoll et al. 1993), es capaz de fijar nitrógeno. Esto apoya la idea de que el metabolismo de ácidos dicarboxílicos es la principal fuente de energía en los bacteroides, ya que esta mutante estaría proporcionando el piruvato necesario para la operación del TCA.

La caracterización genética de las enzimas del ciclo TCA y el análisis de mutantes afectadas en los genes correspondientes, son importantes para el entendimiento del metabolismo central de Rhizobium y para entender como éste puede influir en la simbiosis en el nódulo. Mutantes en Rhizobium nifidii que pierden la succinato deshidrogenasa (Gardioli et al., 1987), α -cetoglutarato deshidrogenasa (Duncal, M.J. y Fraenkel, 1979; Kahn et al., 1995), o isocitrato deshidrogenasa (McDermott y Kahn, 1992) no son capaces de fijar nitrógeno en simbiosis (Fix-). Además ya fueron clonados el gen nifA que codifica para la citrato sintasa, la mutante respectiva forma un número normal de nódulos pero son blancos y no parecen contribuir en la fijación de nitrógeno (Kahn et al., 1995) y los genes, ncsA y ncsB, que codifican para la citrato sintasa, tanto plasmídica, como cromosomal, respectivamente (Hernández-Lucas et al., 1995; Pardo et al., 1994). Mutantes que poseen otro tipo de mutación no tienen fenotipo simbiótico en cambio la doble mutante, no es capaz de fijar nitrógeno.

Recientemente Thöny-Meyer et al., (1996) reportaron la clonación y mutagénesis del gen de la aconitasa (acsA), en R. japonicum, actividad que es importante en vida libre, pero no esencial, ya que el crecimiento de la mutante no es completamente abotado. Este gen es esencial en simbiosis y proponen la existencia de un segundo gen. En Bradyrhizobium liaisonum, la mutación en el gene de la fumarasa (fumC), mostró que este gen no es esencial en simbiosis, sin embargo, en esta bacteria se sabe de la presencia de otra actividad enzimática (Acuña et al., 1991).

El gen de la citrato sintasa en A. nifidii (nifA) fue clonado en base a que fue posible complementar una mutante de A. nifidii. La mutante correspondiente pierde la actividad enzimática y es auxótrofa de glutamato. Los análisis preliminares de la secuencia demostraron que tiene homología en un 63% con el gen nifA de R. strainii (Pardo et al., 1994). En A. nifidii, a diferencia de R. strainii (Pardo et al., 1994), sólo se tiene una copia del gen nifA. Esta mutante crece en oxoglutarato, glutamato o arabinosa. Cuando se probaron varias fuentes de carbono en el medio que contiene arabinosa para satisfacer la auxotrofia, las mutantes fueron capaces de crecer como la cepa silvestre en una gran cantidad de azúcares y ácidos orgánicos, pero no en piruvato. La mutante nifA forma un número normal de nódulos en las plantas infectadas, pero éstos son blancos y no tienen una contribución aparente en el desarrollo de la planta.

Recientemente ha sido descrita la mutante en α -cetoglutarato deshidrogenasa de *Bradyrhizobium japonicum* (Green et al., 1997) la cual se obtuvo por mutagénesis del gen *sucA*. En esta mutante no se detecta actividad enzimática lo cual sugiere la presencia de una sola copia del gen. Debido a que la mutante es capaz de crecer en succinato o malato como fuente de carbono, los autores proponen que no es necesario tener un ciclo TCA íntegro para poder crecer en fuentes de carbono que son intermediarios del ciclo TCA.

1.2.3.-NIVELES ENZIMATICOS.

A la fecha se conoce la regulación de las actividades metabólicas de *Rhizobium* en vida libre. La presencia o ausencia de enzimas específicas en el bacteroide, pueden sugerir qué tipo de metabolitos son proporcionados por la planta. Esto está basado en la suposición de que la represión catabólica en bacteroides y en células en vida libre sea la misma.

Actualmente disponemos de una cantidad razonable de datos acerca de las actividades enzimáticas en el metabolismo de azúcares en bacteroides (Ronson y Primrose, 1979; Glenn et al., 1984; Streeter y Salminen, 1985; Kouchi et al., 1988; McKay et al., 1989). Por citar algunos, están los reportes sobre el metabolismo de acetato (Preston et al., 1989), metabolismo de succinato (McKay et al., 1989; Copeland et al., 1989), metabolismo de poli- β -hidroxibutirato (Karr et al., 1984) y en las enzimas del ciclo de Krebs (McKay et al., 1989). Los bacteroides parecen oxidar ácidos dicarboxílicos vía el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, enzima málica y piruvato deshidrogenasa (McKay et al., 1988; Copeland et al., 1989).

En bacteroides de *R. lotum*, de la cepa MNF300, McKay et al. (1989) reportaron un incremento de la mayoría de las enzimas del ciclo TCA (más de 15 veces) comparadas con el valor reportado en las actividades encontradas en células en vida libre. En particular en ese estudio, sólo la enzima isocitrato deshidrogenasa no se incrementó. Esta actividad se encuentra alta en células en vida libre. En otros estudios (DeVries et al 1980; Waters et al., 1985; Kouchi et al., 1988), se ha reportado una alta actividad de la malato deshidrogenasa en bacteroides de chícharo y soya. Así mismo, en un experimento realizado con bacteroides de soya, (Karr et al., 1984) se observó que la actividad de la fumarasa y piruvato deshidrogenasa se incrementan, mientras que la actividad de la malato deshidrogenasa permanece constante y la de la isocitrato deshidrogenasa, disminuye.

En contraste, en bacteroides de plantas de frijol inducidos de la cepa NGR234 de *Rhizobium* (Saroso et al., 1986) y de la cepa MNF300 de *R. lotum* (McKay et al., 1989) se encontró que las enzimas del catabolismo de azúcares presentan niveles basales (ejem. bacteroides de *R. phaseoli*, Salminen y Streeter, 1987). Por otro lado en algunos nódulos producidos por la cepa MNF300, se observó la presencia de ácidos orgánicos aromáticos como el benzoato, esto sugiere que están siendo utilizados por los bacteroides como fuente de carbono (Werner et al., 1975; Rohm y Werner, 1985). En relación a esto, se han hecho experimentos con bacteroides, incubando con compuestos

fendlicos radiactivos y se vió que estos pueden ser convertidos en $^{14}\text{CO}_2$, además se pudieron detectar algunas de las enzimas de la degradación de los compuestos aromáticos (Parke y Ornston, 1966).

Estos datos sugieren que aunque los *Shigella* en vida libre son capaces de utilizar un amplio número de sustratos, los bacteroides pueden tener acceso a sólo un número limitado de compuestos en concentraciones suficientes para permitir la fijación de azúcar y el desarrollo del nódulo. Esta evidencia basada indirectamente en la fisiología de los bacteroides sugiere que la membrana peribacteroidal puede actuar como una barrera importante para el desplazamiento de materiales del citosol de la célula a los bacteroides.

1.3.4.-LA REGULACION DEL CICLO DE LOS ACIDOS TRICARBOXILICOS.

Las funciones básicas del ciclo TCA son las de proveer compuestos de carbono intermediarios del TCA para funciones biosintéticas y generar el poder reductor que acoplado a la cadena respiratoria genera el ATP necesario para el crecimiento bacteriano. El ciclo es alimentado por acetil-CoA, compuesto de dos carbonos, el cual se combina con compuestos de 4 carbonos como el oxalacetato para producir citrato. El ciclo tiene 4 pasos de oxidación, dos de los cuales (mediados por la isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa) son descarboxilaciones simultáneas. Estas descarboxilaciones remueven el carbono equivalente a acetil-CoA y el producto final, oxalacetato, es regenerado, completando así el ciclo. Para que el TCA funcione óptimamente, todo el carbono debe ser removido a través de la descarboxilación o de reacciones biosintéticas usando los intermediarios del TCA como precursores.

Las demandas fisiológicas de la bacteria varían de acuerdo a su medio ambiente, y tales demandas serán reflejadas por cambios en el metabolismo central mediado por efectores positivos y negativos (Samuel D.D., 1970; Weitzman, P.D.J., 1966; Senior et al., 1971; Kornfeld et al., 1977). Por ejemplo, si el transporte de electrones es saturado con NADH, como ocurre bajo limitaciones temporales de oxígeno, el potencial redox de la célula inmediatamente disminuye y la relación NADH/NAD se incrementa (Jackson et al., 1976). Esto resulta en una desaceleración del TCA debido a una inhibición de las enzimas citrato sintasa, NADP-isocitrato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa, por la acumulación de nucleótidos reducidos (Senior et al., 1971; Jackson et al., 1976). La regulación de esas enzimas constituye un mecanismo de retroalimentación (feedback), y si tales condiciones continúan, la célula responderá posteriormente reprimiendo la síntesis de las enzimas involucradas.

Estudios posteriores (Emerich et al., 1968) demuestran que la malato deshidrogenasa es sensible a un considerable número de efectores metabólicos incluyendo al NADPH. La NADP-isocitrato deshidrogenasa es *insensible* a ATP y en un menor grado a ADP y AMP (Chandrasekharan et al., 1976). La NAD-isocitrato deshidrogenasa presenta características similares, sin embargo, en extractos de bacteroides esta enzima fué insensible a nucleótidos de

adenina (Moustafa et al 1975). En *R. lamnarius*, cepa 311B-143, la piruvato deshidrogenasa que acopla la glicólisis al TCA, se estimula por la presencia del piruvato y es inhibida por NADH (Emerich D.W., 1985). Por esta razón, es posible que los cambios descritos para *A. baierinckii* y *R. sol.* puedan ser semejantes en *A. baierinckii* y consecuentemente puedan ser importantes en el metabolismo de carbono de esta bacteria.

Es claro que el ciclo TCA es necesario para generar energía para la fijación de nitrógeno, sin embargo no existen evidencias claras de que tan necesario es un TCA completo, la evidencia genética implica que el brazo descarboxilante de la vía está interrumpido, mientras que la evidencia bioquímica aún es ambigua, por ejemplo la isocitrato deshidrogenasa (IDH) y la oxoglutarato deshidrogenasa (OGDH), dos enzimas descarboxilantes en el ciclo TCA son con frecuencia inhibidas por altas concentraciones de nucleótidos reducidos y tanto su expresión como su actividad son inhibidas por condiciones anaeróbicas. Por lo anterior se podría especular que la acumulación de poder reductor en las condiciones microaeróbicas del medio ambiente en el nódulo podría inhibir a las enzimas IDH y OGDH y que la baja actividad enzimática podría repartir el flujo de carbono a PHB o a la vía de descarboxilación a glutamato, dependiendo de la limitación o no de las enzimas CS, IDH o OGDH.

1.2.5.- SINTESIS DE PHB.

Estudios de ultraestructura por microscopía electrónica en bacteroides de *R. lamnarius* (Ching et al., 1977) muestran invariablemente grandes cantidades de depósitos de PHB, el cual puede ser acumulado hasta en un 50% del peso seco de la bacteria (Wong et al., 1971). Además de haberse observado en *R. tropici* una alta actividad de la enzima S-hidroxitubirato deshidrogenasa (Romanov et al., 1994). La prominencia citoplásmica de este polímero en los bacteroides claramente sugiere que toda la energía disponible y equivalentes reductores no son automáticamente canalizados a la operación de la nitrogenasa. En *R. lamnarius* las mutantes en genes estructurales de la nitrogenasa como las cepas, *nifD::tn5* y *nifH::tn5*, han sido reportadas por acumular grandes cantidades de PHB (Kaluza et al., 1983). Por microscopía electrónica de nódulos formados por éstas y otro tipo de mutantes se observan acumulaciones similares de PHB en proporción a los nódulos de las cepas silvestres. Sin embargo es interesante, que esas mutantes acumulan grandes cantidades de PHB, sólo después de 3.5 semanas de simbiosis. Esto sugiere que la síntesis de PHB y la nitrogenasa compiten por energía y poder reductor. El poder entender las condiciones que propician la síntesis de PHB podrían aportar una ayuda importante para el conocimiento del metabolismo de carbono en los bacteroides.

1.2.5.1.- SINTESIS DE PHB EN *Acetobacter baierinckii*.

Dawes y colaboradores (Senior et al., 1971; Jackson et al., 1976; Ritchie et al., 1971; Senior et al., 1972) han estudiado el ciclo del PHB en una bacteria que fija nitrógeno, aunque no en

condiciones simbióticas. En *A. halotolerans* la síntesis de PNB se inicia por la condensación de dos moléculas de Acetil-CoA, vía β -cetotiolasa formando Acetoacetil-CoA, posteriormente siendo éste reducido a β -hidroxibutiril-CoA por la enzima acetoacetil-CoA reductasa, a la cual puede usar NADH o NADPH como donadores de electrones, aunque ésta tiene 5 veces más afinidad por NADPH. La polimerización de β -hidroxibutiril-CoA en PNB es catalizada por la polimerasa de PNB.

Senior et al., (1972), demostraron que la limitación de oxígeno produce grandes cantidades de PNB en *Acetobacter*. A bajo pO_2 , el potencial redox de la célula disminuye con un incremento inmediato en la relación NADH/NAD y NADPH/NADP, seguido por disminución de un 30% en la actividad de la isocitrato deshidrogenasa (Jackson et al., 1976). El NADPH y NADP demostraron ser poderosos inhibidores de la NADP-isocitrato deshidrogenasa y citrato sintasa, respectivamente. (Senior et al., 1972). Bajo estas condiciones *Acetobacter* canaliza acetil-CoA y los electrones del NAD(P)H a la formación de PNB.

1.3.3.2.- SINTESIS DE PNB EN *Rhizobium*.

Basándonos en los resultados de Wong et al., (1971) y Kerr et al., (1984), parece observarse que la acumulación de PNB en los bacteroides de *R. japonicum* puede ser iniciada por eventos similares a los descritos en *Acetobacter*.

En *R. japonicum*, Tajima et al., (1988), midieron las concentraciones de efectores metabólicos en bacteroides incubando bajo condiciones semejantes a las del nódulo. Las relaciones en el bacteroide para NADH/NAD y NADPH/NADP fueron 0.43 y 2.7, respectivamente. Por lo anterior en *R. japonicum* la síntesis de PNB puede ser en parte responsable de la baja relación NADH/NAD debido a que el NADH es el cofactor preferencial de la acetoacetil-CoA reductasa la cual tiene una afinidad 20 veces más baja para NADH que para NADPH (Emerich D.W., 1985). Sin embargo, una alta relación NADPH/NADP es potencialmente muy importante. En estudios preliminares se ha observado una inhibición sustancial de la NADP-isocitrato deshidrogenasa cuando presenta una relación de NADPH/NADP de 2.5. Por otro lado, Weitzman y Jones, (1968), encontraron que en 18 géneros de bacterias gram negativas la enzima citrato sintasa resultó ser inhibida por NADH, aunque esas bacterias podrían subdividirse en dos grupos si se basan en el efecto de reactivación por AMP. En organismos que utilizan la vía Entner-Doudoroff como una primera opción para la glicólisis, la citrato sintasa fue reactivada por AMP. El AMP no tuvo efecto en las bacterias que utilizan principalmente la vía Embden-Meyerhof para la degradación de glucosa. Mientras que *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* utilizan la vía Entner-Doudoroff (Elkan et al., 1982), *R. japonicum* usa la vía Embden-Meyerhof (Mennecke et al., 1985). Por lo anterior es posible que la regulación de la citrato sintasa, así como de otras enzimas del TCA pudiera ser diferente entre *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. La citrato sintasa juega un papel estratégico en el metabolismo de carbono debido a que controla la entrada de éste en la reacción inicial del TCA. Si en los bacteroides la citrato sintasa está siendo reprimida/inhibida, esto podría tener

implicaciones directas sobre el flujo de carbono a través del TCA. Por lo mismo, el flujo de malato o succinato a través de esta vía se vería afectado.

1.3.- INTEGRACION DEL METABOLISMO DE CARBONO Y NITROGENO.

Durante la simbiosis de *Rhizobium* con plantas leguminosas, la fijación de nitrógeno llevada a cabo por la bacteria provee a la planta de nitrógeno en forma de amonio que intercambia con ella por el fotosintato. La propuesta consiste en investigar fuera de la planta, los estados metabólicos antes y durante la simbiosis, que son responsables del intercambio de nitrógeno y carbono. Por lo anterior, en esta parte de nuestra introducción analizaremos los antecedentes de la interacción que existe entre estos dos metabolismos ya que un objetivo de nuestro proyecto ha sido el análisis de la integración de éstos, en vida libre.

La glutamina es el producto final de la asimilación de amonio y es un donador de nitrógeno para reacciones biosintéticas (Stadtman, 1973). Este aminoácido ha sido catalogado como el metabolito nitrogenado responsable de la represión catabólica del nitrógeno en varios microorganismos (Halpern, 1988), como consecuencia, juega un papel central en el metabolismo nitrogenado.

La glutamina es sintetizada por la glutamino sintetasa (GS) a partir de amonio y glutamato. En *Rhizobium*, el amonio es asimilado principalmente por la vía glutamino sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), (Bravo y Mora, 1988). La familia de las *Rhizobiaceae*, la cual incluye géneros como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Sinorhizobium*, a diferencia de otras bacterias, posee al menos dos formas de GS (Darrow y Knotts, 1977; Fuchs y Keister, 1980; Tsapurun et al., 1987) con excepción de *Sinorhizobium melilotis* (Donald y Ludwig, 1984). La forma llamada GSI es estructural y enzimáticamente perecida a la GS de procariones, su actividad es regulada post-transcripcionalmente por una adenilación reversible y es sintetizada constitutivamente (Bravo y Mora, 1988; Rossi et al., 1989). En contraste, la GSII es distinta de las otras GS reportadas para procariones y no está sujeta a adenilación; los niveles de GSII son dependientes de la fuente de nitrógeno presente en el medio y no se expresa en mutantes en *ntrA* o *ntrC* (Bravo y Mora, 1988; de Bruijn et al., 1989; Martin et al., 1988; Rossbach et al., 1987; Rossi et al., 1989; Shatters et al., 1989). Además se identificó un tercer locus, llamado *glnT*, que codifica a la GSIII en *S. melilotis*, *Aerobacterium tumefaciens* y *Mycobacterium avium* (Chiurazzi et al., 1982; de Bruijn et al., 1989; Espin et al., 1990; Shatters et al., 1993). El metabolismo nitrogenado se encuentra íntimamente relacionado con el metabolismo de carbono. Por ejemplo, en *Mucoromycota grisea*, se demostró que la glutamina, que es el donador universal de nitrógeno, y es central en el metabolismo de éste elemento, es continuamente sintetizado y degradado (Mora, 1990). La síntesis y degradación de este aminoácido resultan en el ciclo de la glutamina. En *M. grisea* se ha demostrado que este ciclo es esencial para la utilización del carbono presente en el medio. El ciclo de glutamina en este hongo

resulta en la disipación de energía que se libera del proceso catabólico y es regulado por ATP y nucleótidos reducidos lo que hace posible el flujo continuo de carbono (Hernández y Mora, 1986).

La existencia de procesos cíclicos con diferentes propósitos, tales como oxidación, síntesis, y generación de energía, es común en organismos vivos. Los ciclos fútiles son aquellos en los cuales las reacciones de síntesis y degradación, catalizadas por diferentes enzimas operan simultáneamente. En una dirección, las reacciones gastan compuestos de alta energía. La operación de esos ciclos sirven para disipar energía. (Katz et al., 1976, 1978; Newsholme et al., 1984).

La operación de un ciclo que conduce el nitrógeno entre amonio, glutamato y glutamina bajo condiciones donde el crecimiento no es restringido, posee la interrogante acerca de la futilidad, y surge la pregunta de, qué tan necesario es este ciclo. Por otro lado el drenaje de esqueletos de carbono, poder reductor y ATP como resultado del ciclaje de la glutamina es evidente. Por lo tanto el ciclaje del nitrógeno puede afectar el rendimiento del carbono y la distribución de la energía. A continuación se describen las diferentes funciones que han sido propuestas para el ciclo de glutamina en *SALICORNIA* (Calderón et al., 1989; Calderón y Mora, 1985; Cooper y Meister, 1977; Katz y Rognstad, 1976; Mora, 1990): (a) Una contribución a la irreversibilidad en la transaminación de la glutamina; (b) vía rápida para regular instantáneamente la concentración intracelular y por lo tanto un control inmediato de la tasa de síntesis y degradación del nitrógeno celular; (c) una vía general para tomar o liberar los esqueletos de carbono de metabolitos orgánicos nitrogenados; (d) el recambio de glutamina a glutamato y a otros aminoácidos para mantener el balance óptimo entre compuestos nitrogenados; (e) para disipación de energía; y (f) para gastar energía e inducir el flujo de carbono (Mora, 1990). Por lo anterior es interesante investigar en *SALICORNIA* cuál que grado de relación existe entre el metabolismo de carbono y nitrógeno.

1.4.- LA BIOLOGÍA DE LOS RADICALES DEL OXIGENO.

Como mencionamos al inicio de nuestra introducción la regulación genética y fisiológica que sufren las bacterias cuando dejan de crecer ha sido extensamente estudiada en *S. SALLI*. Esta bacteria cuando deja de crecer aumenta la respuesta de resistencia a diversos tipos de estrés. Cuando *S. SALLI* en vida libre deja de crecer en *MS*, también aumenta la respuesta de resistencia al estrés oxidativo. Por otro lado, si consideramos que poco se conoce acerca de la respuesta de las bacterias fijadoras de nitrógeno al estrés ambiental de su habilidad para adaptarse y sobrevivir a condiciones adversas en el suelo y como otros tipos de estrés pueden afectar la formación una simbiosis efectiva con plantas leguminosas.

Para los organismos aeróbicos el oxígeno molecular es al mismo tiempo benéfico y perjudicial. Este actúa como un aceptor terminal de electrones, y provee enormes ventajas en términos de generación de energía, pero es también universalmente tóxico. La

reducción incompleta del oxígeno molecular genera especies reactivas como lo son el radical anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo; especies que pueden oxidar ácidos grasos, peroxidar lípidos (Storz et al., 1990), oxidar proteínas (Brot et al., 1981) y dañar DNA (Dempfle et al., 1983; Levin et al., 1982; Malliwell y Gutteridge, 1986). Además, hay evidencia de que existe una importante implicación de especies reactivas derivadas del metabolismo del oxígeno durante la simbiosis al menos en la etapa de senescencia (Long, 1989). La simbiosis está caracterizada principalmente por la capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, y la enzima clave en estos procesos es la nitrogenasa localizada en el microsimbionte. Se sabe que ésta es rápida e irreversiblemente inactivada por oxígeno y aún no se define el posible papel de especies derivadas del oxígeno en este proceso de inactivación. En los nódulos existe un alto potencial para que sean generadas especies reactivas del oxígeno tales como el peróxido de hidrógeno, por las fuertes condiciones reductoras requeridas para la fijación de nitrógeno y la participación de varias proteínas que incluyen a la ferredoxina, uricase, hidrogenasa, y leghemoglobina (Dalton et al., 1991). Esta última es una hemoproteína, presente en importante concentración en el nódulo, sujeta a un proceso de autooxidación, generando el anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Puppo et al., 1981). Por otro lado se ha observado que el peróxido de hidrógeno reacciona con la hemoglobina generando especies reactivas (Davies et al., 1992), junto con cantidades significativas de radicales hidroxilo que han sido encontradas en nódulos senescentes (Secana et al., 1992). Esto puede estar relacionado con la alta concentración de hierro, el cual puede catalizar en el citosol de los nódulos, la formación de radicales hidroxilo del peróxido de hidrógeno, vía la reacción de Fenton (Secana et al., 1992). De esta manera el remover el peróxido de hidrógeno del nódulo es esencial para su funcionamiento. Dalton et al. (1991) mostraron que un ciclo eficiente de ascorbato-glutathion se encuentra presente en el citosol de la célula hospedera y que existe una importante relación entre la fijación de nitrógeno y el proceso de desintoxicación generado durante la fijación de nitrógeno (Dalton et al., 1993).

Otro posible proceso de desintoxicación del peróxido de hidrógeno puede ser proporcionado por catalasas, las cuales catalizan la conversión del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Las catalasas se pueden localizar tanto en el citosol de la planta, como en el microsimbionte (Francis et al., 1972).

La respuesta de las bacterias al estrés oxidativo ha sido extensamente estudiada en bacterias entéricas como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Dempfle, 1991; Barr y Kogoma, 1991; Storz et al., 1990). Cuando éstas son tratadas con dosis no letales de H_2O_2 alcanzan un cierto grado de adaptación, volviéndose más resistentes a tratamientos subsecuentes con dosis letales de H_2O_2 (Christman et al., 1985; Dempfle y Halbrook, 1983). De manera similar, *E. coli* puede adaptarse al estrés generado por el superóxido con pretratamientos con bajos niveles de menadiona o paraquat (Greenberg y Dempfle, 1989). Numerosas proteínas, (y sus genes) forman parte de la respuesta al estrés oxidativo, éstas incluyen a la catalasa, la superóxido dismutasa, y a las enzimas reparadoras de DNA tales como la exonucleasa IV, DNA polimerasa, nucleasa RecBC y RecA (Dempfle, 1991;

Farr y Kogoma, 1991). Los genes involucrados en el control de la respuesta al estrés oxidativo también han sido identificados. Por ejemplo, el producto del gene *oxyE* en respuesta al estrés por H_2O_2 regula la inducción de 9 proteínas bajo control positivo (Christman et al., 1989). Se ha encontrado que existen sobreposiciones considerables entre las respuestas metabólicas que tienen las bacterias e diferentes tipos de estrés (Mystrom, 1993; Siegle y Kolter, 1992). Por ejemplo, bacterias de *Escherichia coli* una vez adaptadas al reto por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se vuelven más resistentes a choques por altas temperaturas y al reto osmótico, dándose en la célula, al mismo tiempo, una sobreposición entre las proteínas sintetizadas durante el estrés oxidativo y las inducidas por la privación de carbono o nitrógeno, (Christman et al., 1985; Siegle y Kolter, 1992).

1.4.1.- CATALASAS

Entre los sistemas de protección de la célula existen dos tipos de enzimas para remover el peróxido de hidrógeno: las catalasas y peroxidasas. (Deisseroth y Dounce, 1970; Nakata et al., 1997).

Mientras que en algunos microorganismos sólo se ha descrito un tipo de catalasas, en otros se ha reportado la presencia de más de uno, como en el caso de *Saccharomyces cerevisiae* (Claiborne y Fridovich, 1979; Claiborne et al., 1979), *Saccharomyces uvarum* (Seah et al., 1973; Seah y Kaplan, 1973), *Basillus subtilis* (Loewen y Switals, 1987) y *Klebsiella pneumoniae* (Golberg y Hochman, 1989). *S. cerevisiae* produce dos tipos de especies de hidropoxidasas (MPI I y MPII) para las cuales la síntesis está genéticamente controlada por al menos 4 locis no contiguos *katE*, *rop8*, *katG*, y *oxyE*. MPI, es codificada por *katE* (Triggs-Raine et al., 1988), la cual es una enzima bifuncional que tiene actividad de catalasa y peroxidasa y es dependiente de la respuesta al estrés oxidativo y del regulon *oxyR* (Christman et al., 1989). MPII codificada por *katE* (Von Ossowski et al., 1991), presenta sólo actividad de catalasa y su máxima síntesis se determina en células en fase estacionaria (Loewen et al., 1985) o bajo estrés osmótico (Jenkins et al., 1990). La expresión de MPII requiere un gene *rop8* (*katE*) funcional (Loewen et al., 1994) el cual también ha mostrado ser regulador de la transcripción de *katG* de una manera diferente a como lo hace *oxyR* (Ivanova et al., 1994).

Poco se conoce acerca de las catalasas en la familia *Shiobacteraceae*. Recientemente se ha reportado que *Shiobacterium lacustrum* bv. *shanshanii* responde al estrés por peróxido de hidrógeno con una modesta inducción en la actividad de catalasa (Crockford et al., 1995). La actividad de catalasa muestra una regulación dependiente de la densidad celular (Crockford et al., 1995). Por otro lado la actividad de catalasa reportada para una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* aislada de nódulos fijadores de nitrógeno fue mayor que la observada en otra cepa extraída de nódulos no fijadores (Francis et al., 1972). Más recientemente se reportó la clonación y caracterización del gene *katA* de *Shiobacterium mollisii*, el cual codifica para una catalasa monofuncional (*katA*), que es inducida por peróxido de hidrógeno (Merouart et al., 1996).

1.5.- LA RED DE REGULACION DEPENDIENTE DEL GENE *xpoS*.

E. coli responde a la limitación de nutrientes en la fase estacionaria, desarrollando una elevada resistencia a diferentes presiones ambientales. Esas células mantienen un metabolismo reducido y pueden permanecer viables incluso por años. Las células se hacen más pequeñas, su citoplasma se condensa, y su volumen periplásmico se incrementa (Huisman et al., 1996). El gene *xpoS* (Tanaka et al., 1993) codifica para el segundo factor vegetativo sigma " σ " o sigma 38. Este es un componente de la RNA polimerasa y dirige la polimerasa a promotores que son pobremente reconocidos por el factor denominado "cuidador de la casa" (housekeeping) sigma 70 (Lange et al., 1991; Tanaka et al., 1993). Aproximadamente de 20-35 productos génicos requieren este factor para su inducción durante la disminución del crecimiento (Nystrom et al., 1994c; Lange et al., 1991; McCann et al., 1991). Mutantes *xpoS* negativas son menos capaces para sobrevivir y no desarrollan resistencia a múltiples presiones, que son indicadores de la respuesta de supervivencia en la fase estacionaria (Nystrom et al., 1994c; Lange et al., 1991; McCann et al., 1991). A la fecha han sido identificados varios genes dependientes de *xpoS* con papeles específicos en la resistencia al estrés por calor, oxidativo, osmótico y por luz UV (Henge-Aronis R., 1993), como son la expresión de las catalasas, (NPI, NPII) para proteger contra el estrés oxidativo (Loewen et al., 1985). Sin embargo todavía existen muchos genes dependientes de *xpoS* no identificados. Otros aspectos fisiológicos en las células que dejan de crecer aún no han sido explicados.

La concentración de RpoS en las células es regulada a nivel de la transcripción, traducción del rRNA y de la estabilidad de la proteína. Se sabe que varios factores modulan su síntesis (Lange et al., 1994). Algunos de los metabolitos que median esta regulación han sido identificados como en *E. coli* y en *S. typhimurium* donde varios genes que son importantes para la supervivencia son dependientes de ppGpp y son reprimidos por la introducción de mutaciones en *gca* (codifica para la adenilato ciclasa) o *cap* (codifica para la proteína receptora del AMP cíclico (CAP) (Spector et al., 1993). Sin embargo el papel fisiológico del complejo CAP-cAMP en la regulación negativa de genes esenciales para sobrevivir la fase estacionaria, aún no es claro. Por otro lado se sabe que los niveles intracelulares de ppGpp y AMPc regulan los niveles de rRNA de *xpoS* y que los ácidos débiles como acético y benzoico también influyen en la transcripción de *xpoS*.

La transcripción de *xpoS* en *E. coli* es inducida por homoserina lactona (Huisman et al., 1994), un metabolito derivado de intermediarios de la biosíntesis de treonina, lo cual sugiere que *xpoS* puede ser también regulado por la densidad celular a través de homoserinas lactonas (NSL) y sus derivados (Huisman et al., 1994). La participación de HSL en la respuesta al agotamiento de nutrientes en la fase estacionaria es intrincada ya que compuestos estructuralmente relacionados como las acil-homoserinas lactonas, actúan como señales extracelulares en poblaciones con una alta densidad celular expresadas por las bacterias en "quorum" (Fuqua et al., 1994). ¿Cuál es la conexión entre NSL(s) como reguladores de *xpoS* y las acil-homoserinas lactonas como sensores de densidad celular? La evidencia que liga a las HSL a RpoS se deriva de estudios con mutantes en las vías de síntesis de treonina y metionina (Huisman et al., 1994). Mutantes con

bloqueos en los pasos previos a la síntesis de homoserina (HS) no inducen *luxR* a menos que se les proporcione HS o acilHSL. Sin embargo estas mutantes pueden sintetizar acilHSLs. Esas mutantes al ser provistas con metionina o treonina en el medio pueden crecer y producir S-adenosilmetionina, un sustrato conocido en la síntesis de acil-HSL (Eberhard et al., 1991; More et al., 1996; Schaefer et al., 1996). Por lo tanto la HSL y acil-HSL a pesar de ser estructuralmente semejantes, parecen ser producidas por metabolitos diferentes. Las acil-HSL son compuestos que actúan como señales extracelulares las cuales se incrementan en concentración dependiendo de la densidad celular. En contraste, la HSL (derivada de HS) podría ser una señal intracelular producida por la limitación de nutrientes. Zambrano et al., (1996) especulan que la ciclización de HS en HSL puede ser catalizada por tRNA sintetasas ya que se sabe que varias tRNA sintetasas enlazan, adenilan y ciclan HS para generar HSL in vitro (Jakubowski et al., 1992). Esto último sugiere que una primera señal metabólica puede ser generada en respuesta al agotamiento de nutrientes sin requerir cambio en la expresión de genes. No obstante los diferentes orígenes de las señales moleculares, no parece haber una conexión entre la respuesta al agotamiento de nutrientes o a la fase estacionaria dada por HSL y la respuesta de alta densidad celular de acil-HSL. Así mismo mutantes con bloqueos en la síntesis de HS pueden hacer acil-HSL pero no son capaces de responder a ella a menos que sean suplementadas con HS o HSL (Zambrano et al., 1996). Esto sugiere que además de la señal de concentración celular de las acil-HSL(s) los circuitos de transmisión de señales también sientan los niveles intracelulares de HSL.

Las N-acil homoserinas lactonas (acilHSLs) han sido descritas como moléculas sintetizadas por las bacterias con la finalidad de regular su crecimiento cuando las bacterias llegan a una cierta densidad celular, como se podrá analizar más adelante, proponemos que ~~estas~~ *luxR* deja de crecer a causa de una señal de densidad celular. Debido a la importancia de este en la siguiente parte de la introducción (1.6), analizaremos lo recientemente publicado acerca de estas moléculas, así como su mecanismo de acción a través de los circuitos regulatorios tipo *luxR*.

1.6.- COMUNICACION BACTERIANA A TRAVES DE N-ACIL HOMOSERINAS LACTONAS.

Recientemente se ha puesto mucha atención a un tipo común de sistemas sensores conocidos como sistemas reguladores de dos componentes, en los cuales un componente proteico (el sensor) regula la fosforilación del otro (el regulador de respuesta) (Ulitzur, 1989; Downen et al., 1992; Stock et al., 1989; Parkinson et al., 1992 y 1993; Russo et al., 1993; Salmond et al., 1995). Existen reguladores que sirven para la comunicación intercelular y usan como señal N-acilhomoserinas lactonas (acilHSLs), de manera preferente a la fosforilación (Bainton et al., 1992; Williams et al., 1992; Fuqua et al., 1994). Concretaremos nuestra atención en las acil HSLs las cuales han mostrado controlar un rango muy diverso de factores dependientes de densidad celular (Salmond et al., 1995; Sitnikov et al., 1995), incluyendo el control en la producción de antibióticos y exoenzimas en

Vibrio saxatilis (Bainton et al., 1992 y 1992b; Jones et al., 1993; Pirhonen et al., 1993), conjugación del plásmido T1 en *Aeromonas luminescens* (Zhong et al., 1993; Piper et al., 1993) y producción de exoenzimas en *Escherichia coli* (Jones et al., 1993; Passador et al., 1993), así como el ya establecido papel en el control de la bioluminiscencia, la cual ocurre en *Vibrio fischeri* en vida libre pero que tiene especial significado cuando se encuentra en simbiosis. Las bases del control de la bioluminiscencia en *V. fischeri* es la siguiente: luxI provoca la producción de una pequeña molécula N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona (OHHL), la cual activa a luxR causando la transcripción del operon luxS. Greenberg et al., (1979) y Manselka et al., (1995), mostraron que los sobrenadantes de los cultivos de una bacteria marina no luminosa podían inducir bioluminiscencia en *V. harveyi* de la misma manera que los sobrenadantes de *V. harveyi*. Sin embargo, esos sobrenadantes no tuvieron efecto en *V. fischeri*. Esto llevó a la hipótesis de que especies de bacterias marinas podían comunicarse usando autoinductores. La estructura química de los autoinductores ha sido identificada (Eberhard et al., 1981; Cao et al., 1989) así como los genes y la regulación involucrada. (Ulitzur, S., 1989; Meighen E.A., 1991). Actualmente la integración de la regulación génica, a nivel celular, llevada a cabo por pequeñas moléculas, está empezando a comprenderse.

1.6.1.- CIRCUITOS REGULATORIOS DEL TIPO luxI-luxR.

Investigaciones realizadas con *E. aeruginosa* y *A. luminescens* han incrementado en gran manera el conocimiento en bacterias gram negativas que utilizan MSLs en su regulación genética.

En *E. aeruginosa*, las acilMSLs regulan positivamente la producción de elastasa (Latifi et al., 1995). Las evidencias son, primero, la identificación de un homólogo de luxR y segundo las observaciones de que *E. aeruginosa* produce MSLs. El grupo de Barbara Iglewski clonó el regulador positivo lasR, el cual pertenece a la familia de reguladores del regulón comX (Gambello et al., 1991) y demostró, que éste controla la producción de elastasa vía lasA y lasB, de la proteasa alcalina (Apr) y de la exotoxina A (ToxA) (Gambello et al., 1991 y 1993; Toder et al., 1991; Latifi et al., 1995). En *E. aeruginosa* el control es similar a *V. saxatilis*, ya que una bacteria con determinantes de virulencia no relacionados, están aparentemente bajo el control de un mecanismo regulador único. El componente de regulación del regulón constituido por lasR y lasA ha sido clonado y se ha observado que produce la síntesis de una acilMSL en una cepa recombinante de *E. coli* (Passador et al., 1993; Pearson et al., 1994).

Se ha observado que diferentes acilMSLs pueden ser producidas por un solo organismo (Gilson et al., 1995), incluso algunos modelos bacterianos como *Aeromonas salmonicida* y *Pseudomonas*, producen y responden a un rango amplio de especies de acilMSLs (Bainton et al., 1992; Jones et al., 1993; Zhang et al., 1993; Pearson et al., 1994 y 1995; Gilson et al., 1995). En *Shigella*, los papeles específicos de las acilMSLs aisladas hasta la fecha, no han sido aún

definidos, salvo un reporte (Gray et al., 1996).

Los estudios en la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en la simbiosis de *Rhizobium* y plantas leguminosas son un modelo excelente para revelar con detalle las complejas interacciones entre dos organismos (Long et al., 1993). La comunicación entre dos organismos se puede iniciar con la generación de señales moleculares que pueden tener un mismo origen y de esta manera no importa si la invasividad de las bacterias se realice en células vegetales o animales, más aún el estado fisiológico que predispone a las bacterias a establecer esta comunicación puede ser consecuencia de señales previas entre las propias bacterias, por lo anterior analizaremos un poco de esto en la siguiente parte de la introducción (1.7).

1.7.- SEÑALES INVOLUCRADAS EN LA MODULACION.

Recientemente Glazebrook et al., (1993), al aislar y caracterizar un gene proveniente de *M. lotii*, *baca*, observaron que al mutagenizar este gen, el desarrollo del bacterioide dentro del nódulo se bloquea (Long et al., 1988). Esta mutante entra por los pelos de la raíz de la planta, a través del hilo de infección. Sin embargo, las bacterias senescen rápidamente, antes de formar los bacteroides. La secuencia de aminoácidos de *baca* fue idéntica en un 66% y similar en un 79% a la secuencia del producto *abm* de *M. lotii*. El producto de *abm* ha sido identificado en *M. lotii* en un grupo de mutantes que son resistentes al péptido antibiótico microcín B17 (MccB17) (Levita et al., 1986) el cual es un inhibidor de la DNA girasa lo que sugirió que la función del *StmA* es la de funcionar como receptor de MccB17.

Al hibridizar el *baca* contra DNA de bacterias gram negativas, incluyendo a otros simbioses, patógenos de plantas, patógenos de humanos y bacterias de vida libre se encontró que las especies que tuvieron homología con este gen fueron *M. lotii*, *M. lotii*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Citrobacter freundii*, *Brucella abortus*, *Shigella flexneri*, *Richardella moultonii* y *Alcaligenes eutrophanus*. La homología entre los genes de *baca/StmA* en una gran número de especies, sugiere que estas proteínas tienen papeles similares en diversos medio ambientes lo que lleva a preguntarse, ¿cuál es la conexión que existe en estos organismos tan diversos? Algo en común puede ser la necesidad de algunas de estas bacterias de invadir células de diferentes tipos y promover la patogenicidad de esos organismos.

Pero ¿qué metabolito, señal o estado metabólico de la bacteria en vida libre conduce a la simbiosis o a la invasividad como patógenos? Esta pregunta conduce a otra, ¿que es la vida libre de algunas bacterias? ¿Son *M. lotii* y *Rhizobium* bacterias de vida libre, ya que su medio ambiente natural está en estrecho contacto con organismos eucarióticos? Es por esto interesante pensar que quizá existan moléculas comunes, posiblemente de origen eucariótico, que son detectadas por estos organismos en sus diversos medios ambientes, las cuales pueden ser utilizadas como nutrientes o señales indicativas de su entorno. Los organismos (bacterias) de "vida libre" necesitan

Mecanismos para determinar cómo, cuando y donde iniciar un complejo proceso de desarrollo tal como dejar de crecer, formar esporas, entrar en fase estacionaria, diferenciarse, etc. (Kotler et al., 1993; Siegel et al., 1992; Kaiser et al., 1993).

1.7.1.- COMUNICACION INTRACELULAR Y PREGUERAS BACTERIOCINAS EN *Rhizobium*.

Aunque de manera general las toxinas no son clasificadas como señales moleculares. Se ha reportado una pequeña toxina de origen rizobiano que pertenece a una clase de señales moleculares, la acil-homoserina lactona (HSLs) de la familia de moléculas secretadas por las células las cuales activan la expresión genica relacionada a la comunicación intercelular en alta densidad celular (Fuqua et al., 1994). Esta molécula fue identificada como N-(3-R-hidroxi-7-cis-tetradecanoil)-L-MSL (Schripsema et al., 1996) (Gray et al., 1996). En este último reporte se demostró que el crecimiento de la cepa 248 de *S. laticaudatum* bv. *viciae*, puede ser inhibido por esta pequeña molécula. Esta cepa y otras más poseen la capacidad de producirla. Esta molécula es producida por dos biovarias de esta especie, *trifolii* y *viciae*. Otras HSLs son auto-inductores de *M. lotum*, *M. lotum* y *M. lotum* las cuales activan la expresión del gene *luxI* (que induce la producción de luciferasa) y del factor de conjugación de *Agrobacterium tumefaciens* el cual se requiere para la expresión de los genes *tra*. Usando una fusión *tra-lacZ*, esta molécula pequeña induce la actividad de β -galactosidasa. Sorpresivamente el sobrenadante de la cepa mutante derivada de la cepa 248 que no produce esta pequeña molécula en *S. laticaudatum* induce fuertemente la actividad de β -galactosidasa. El último inductor fue purificado y parece ser otra HSL, identificada tentativamente como hexanoil-MSL (Schultze et al., 1995). *S. laticaudatum* puede producir al menos dos tipos de HSLs de las cuales no se conoce su función. Quizás la actividad tóxica de esta molécula tenga una relación con las moléculas producidas por densidad celular. Alternativamente, una u otra, o ambas de estas HSLs pueden ser autoreguladores involucrados en procesos tales como la conjugación (Wasserman et al., 1993; Schripsema et al., 1994) y/o de la transcripción del operón *chi* (Dibb et al., 1984). La expresión de la proteína *Chi*, necesaria sólo en los rizosfera, requiere del operón *chiABC*, así como del *chiR*. Este último gene *chiR* muestra homología con *luxR* sin embargo no se pudo identificar un gen homólogo a *luxI* (Cubo et al., 1992). La proteína *Chi* es característica de *S. laticaudatum* bv. *viciae*, y no fue encontrada en *S. laticaudatum* bv. *trifolii* de las analizadas. Esta es una proteína de 24 kD la cual se acumula en fase estacionaria en células en vida libre pero no en bacteroides, siendo regulada por alta densidad celular. Dibb et al., (1984), observó que la proteína *Chi* es más abundante en cultivos realizados en medio sólido que en medio líquido.

2.- JUSTIFICACION.

3.- JUSTIFICACION.

El nitrógeno se encuentra en forma abundante en la atmósfera y es escaso en el suelo. La fijación de nitrógeno en la naturaleza es un proceso que se regula según la cantidad de nitrógeno que existe en la corteza terrestre, de tal manera que aquellos organismos que como resultado de una relación simbiótica fijan nitrógeno, están adaptados a la disponibilidad de este micronutriente. Dentro de éste contexto, la simbiosis *Rhizobium-leguminosa* puede verse como la relación entre el medioambiente y dos organismos que a través de intercambiar una serie de señales regulatorias y modificar su metabolismo, podrán contender con la limitación de carbono y nitrógeno y con diferentes presiones externas a las que son sujetas en su medio ambiente. Al establecerse dicha simbiosis, se forma en las raíces de la planta, un órgano especializado, el nódulo, en el que coexisten células diferenciadas de la planta y bacteroides. Es obvio que la relación simbiótica no es totalmente el resultado de un programa determinado sino que depende, por un lado del estado nutricional de la planta y la bacteria en cuanto a sus requerimientos de carbono y nitrógeno y por otro, a las presiones ambientales a las que estuvieron sometidas las bacterias previas al establecimiento de la simbiosis, como son: pH(s) adversos, estrés oxidativo, salino, predadores, toxinas, competencia etc., y las señales moleculares del microambiente que incluyen quimiotaxis, comunicación intercelular etc., que también juegan un papel importante; por lo tanto de acuerdo a lo anterior, el proceso simbiótico tendrá diversos grados de eficiencia y en casos extremos podría detenerse.

El estado metabólico de la planta y la bacteria genera un intercambio de señales donde intervienen transmisores y receptores de ambos organismos y que dependiendo de las condiciones de la rizósfera, puede conducir o no al establecimiento de la simbiosis.

Nosotros creemos que la participación por parte de la bacteria es mucho más que una relación altruista y por lo tanto otros factores pueden intervenir además de la obtención de carbono como fuente de energía durante la fijación de nitrógeno. Con éste enfoque la fijación biológica de nitrógeno no sólo estaría acoplada a una necesidad de la bacteria por el carbono por lo que es posible considerar otro tipo de eventos metabólicos de *Rhizobium* antes y durante la simbiosis con la rizósfera. Pensamos que para sobrevivir en la tierra, *Rhizobium* entra en simbiosis con la planta, obteniendo además un beneficio de la fijación biológica de nitrógeno.

El enfoque que nosotros hemos seguido y que ha sido poco explorado en el área de la fijación biológica del nitrógeno, ha sido el buscar las condiciones fuera de la planta que reproduzcan los eventos metabólicos de *Rhizobium* antes y durante la simbiosis con plantas leguminosas, debido a que poco se conoce acerca de como este proceso se relaciona con la fisiología en vida libre de la bacteria. Esto contrasta con la tendencia actual en el área que investiga la fijación de nitrógeno que es principalmente en relación al proceso simbiótico. En este proyecto de investigación pretendemos identificar algunos estados metabólicos de *Rhizobium* que tienen alguna coordinación semejante a lo que ocurre a la bacteria en el proceso simbiótico.

Una de las características más peculiares de la bacteria durante la infección es la de poder utilizar el carbono que en forma de succinato le proporciona la planta, para ser metabolizado eficientemente para crecer y aumentar el número de bacterias. A partir de este hecho el comportamiento de *Rhizobium* durante la simbiosis se puede describir de una manera muy general por la existencia de tres procesos metabólicos fundamentales. El primero es la inducción de la división celular de la bacteria y dejar de proliferar; el segundo es la fijación de nitrógeno en un ambiente microaerofílico; el tercero y último el intercambio de carbono y nitrógeno entre ambos organismos.

En función a lo anterior, un objetivo central que hemos perseguido ha sido el buscar en *Rhizobium*, en ausencia de la planta las condiciones que reproduzcan algunos de los procesos metabólicos antes mencionados. Así una primera condición que hemos buscado es aquella en que la bacteria disminuya su velocidad de crecimiento y deje de proliferar, tal como lo hace durante la simbiosis.

Hemos observado que al cultivar a *Rhizobium* en vida libre, este organismo pierde su capacidad para crecer después de ser subcultivado en medio mínimo. En este proceso *Rhizobium* sufre un cambio tanto fisiológico como morfológico. Al analizar la estructura de las bacterias en micrografías obtenidas por microscopía electrónica se observa la presencia de bacterias pleomórficas parecidas a los bacteroides con un aumento de tamaño de hasta 5 veces más de lo normal y con una gran cantidad de gránulos de PHB (poli- β -hidroxibutirato). Este polímero requiere para su síntesis de poder reductor y es acumulado por diversas bacterias durante la limitación de oxígeno, carbono, nitrógeno etc. Así mismo se ha reportado que varias especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* sintetizan y acumulan PHB en vida libre (Stam et al., 1986; Tombolini et al., 1989). Además, existen múltiples reportes que describen la acumulación de PHB durante simbiosis con plantas leguminosas (Goodchild, D.J. 1977). A pesar de lo anterior se desconoce cuál es la función de la síntesis y de la acumulación de este polímero en *Rhizobium* tanto en vida libre, como en simbiosis. Una de las funciones que se han propuesto para explicar la presencia de este polímero es la de dar protección respiratoria a la nitrogenasa y también proveer de energía para la fijación de nitrógeno (Anderson et al., 1990). A pesar de lo anterior, a nuestro parecer el papel fisiológico del PHB tanto en simbiosis como en vida libre aún no ha sido claramente entendido, por ejemplo se sabe que *Bradyrhizobium japonicum* acumula grandes cantidades de PHB durante simbiosis a la vez que fija nitrógeno, sin embargo ambos procesos requieren una gran cantidad de poder reductor. La obtención de una mutante en la síntesis de PHB ayudará en gran manera a contestar algunas preguntas acerca del papel de la síntesis de este polímero, tanto en vida libre, como en simbiosis, ya que el consumo de fotosintato en la síntesis del polímero en simbiosis, podría ser utilizado en la generación de energía para la fijación de nitrógeno. Por lo anterior un objetivo central de este proyecto es aportar conocimientos que nos ayuden a entender el papel de la acumulación de PHB en vida libre y en simbiosis. Además del PHB, otros productos de fermentación son también generados por *Rhizobium* cepa CE3 cuando fue subcultivada en Medio Mínimo (MM). Hemos identificado en el medio, algunos productos de excreción como ácidos orgánicos y aminoácidos que

han sido reportados como promotores de la agregación celular, sin embargo éstos son escasos en sobrenadantes de células crecidas en MM suplementados con biotina o tiamina.

Las especies de *Rhizobium* están bien adaptadas a vivir microaeróbicamente, al menos durante la simbiosis, sin embargo no se ha explorado si éstas tienen una capacidad natural para cambiar a un metabolismo fermentativo como se puede observar en *E. coli* por la acumulación de altas cantidades de PHB. Por esto, analizaremos en diferentes especies y cepas de *Rhizobium*, la capacidad de esta familia de bacterias de dejar de crecer en MM y las similitudes que este proceso pueda tener en las diferentes especies y cepas estudiadas.

Nemos observado que al subcultivar a *Rhizobium* en MM suplementado con metabolitos como biotina, tiamina o glutamina, el proceso anteriormente descrito de dejar de crecer no se presenta, no importando el número de veces que se subcultiva. Por lo anterior, es importante investigar a través de qué mecanismos, enzimas o vías metabólicas estas condiciones y estos suplementos están manteniendo el crecimiento de manera continua en MM.

El metabolismo del nitrógeno se encuentra estrechamente interrelacionado con el metabolismo de carbono. En *Nostocum sphaera* la glutamina, el donador universal del nitrógeno, es también central en la regulación del metabolismo de este elemento (Mora et al., 1990). En relación al intercambio de carbono y nitrógeno que le ocurre a *Rhizobium*, al cultivar a *E. coli*, en MM succinato-glutamina observamos que presenta una actividad enzimática de glutamino sintetasa II (GSII) 4 veces mayor a la observada en MM succinato-amoniaco, lo cual sugiere la existencia del cicloje de la glutamina en esta bacteria (Mora et al., 1993). Por otro lado existen evidencias en *E. sphaera* (Mora et al., 1990) y *Sarasinococcus sarasiniana* (Flores-Samaniego et al., 1993) el cicloje de la glutamina en el cicloje de este aminoácido. En *E. sphaera* se ha propuesto que este cicloje no es futil, ya que es necesario para un efectivo flujo de carbono que soporte el crecimiento. El cicloje de glutamina en este hongo resulta en la disipación de energía que libera al proceso catalítico de la rigurosa regulación por ATP y nucleótidos reducidos haciendo posible la eficiente utilización de la fuente de carbono y en consecuencia el crecimiento (Hernández et al., 1990). En *Sarasinococcus* se ha propuesto que este cicloje tiene un papel en la regulación del flujo de carbono en la glicolisis (Flores-Samaniego et al., 1993). Por lo anterior y por nuestras observaciones de que al subcultivar a *E. coli* en MM (succinato-glutamina) crece continuamente, independientemente del número de los subcultivos, un objetivo de este proyecto fué analizar la posible existencia del cicloje de glutamina en *Rhizobium*, así como su implicación en el metabolismo de carbono y el posible mecanismo mediante el cual la presencia de este aminoácido adicionado al MM permite a *E. coli* crecer continuamente al ser subcultivado.

El conocimiento que se genere de este proyecto lo consideramos esencial para entender el proceso simbiótico. A partir de esto, se podría diseñar e implementar una simbiosis más efectiva que aumente el rendimiento de semilla de cultivos con plantas leguminosas, lo que tendría repercusiones en cuanto a su aplicación en uno de los

problemas centrales en la agricultura, que es la falta de nitrógeno en el suelo.

3.- RESULTADOS.

**3.1.- MANUSCRITO DEL ARTICULO "FERMENTATIVE AND
AEROBIC METABOLISM IN *Rhizobium sli*".**

Fermentative and Aerobic Metabolism in *Rhizobium elii*

SERGIO ENCARNACIÓN,¹ MICHAEL DUNN,¹ KAETHE WILMS,² AND JAIME MORA^{1*}

¹Departamento de Ecología Molecular, Centro de Investigación Sobre Fijación de Nitrógeno,
Universidad Nacional Autónoma de México, y ²Departamento
de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional
Autónoma de México, Circuito Interior, Ciudad Universitaria,
México D.F., México

Received in December 1984/Accepted 21 March 1985

Strains of *Rhizobium elii*, *Rhizobium meliloti*, and *Rhizobium leguminosarum* decreased their capacity to grow after successive subcultures in minimal medium, with a pattern characteristic for each species. During the growth of *R. elii* CE 3 in minimal medium (MM), a fermentative-like response was observed: the O₂ content of the reduced and, simultaneously, organic acids were increased and poly- β -hydroxybutyrate (PHB) was accumulated. Some of the organic acids entered into the medium were tricarballic acid (TCA) cycle intermediates, and, consequently, the activities of several TCA cycle and auxiliary enzymes decreased substantially or became undetectable. Optimal and sustained growth and a low PHB content were found in *R. elii* CE 3 when it was grown in MM inoculated at a low cell density with O₂ maintained at 20% or with the absence of supplements that have an effect on the supply of substrates for the TCA cycle. In the absence of supplements such as biotin or thiamine, no amino acids were increased and the organic acids already entered into the medium were later reoxidized. Levels of enzyme activities in cells from unbalanced cultures indicated that carbon flux through the TCA cycle was maintained, which did not happen in MM. It is proposed that the fermentative state in *Rhizobium* species is triggered by a cell density signal that results in the regulation of some of the enzymes responsible for the flux of carbon through the TCA cycle and that this in turn determines how much carbon is available for the synthesis and accumulation of PHB. The fermentative state of free-living *Rhizobium* species may be closely related to the condition that these bacteria express during symbiosis.

In aerobic bacteria, the tricarballic acid (TCA) cycle functions to generate reduced nucleotides by the complete oxidation of pyruvate, which enters the cycle in the form of acetyl coenzyme A (acetyl-CoA). The reduced nucleotides are then used to generate ATP in the electron transport system. Another major function is to produce intermediates for anabolism, and several anaplerotic reactions serve to replenish TCA cycle intermediates which are consumed in these processes (32).

The accumulation of the microbial reserve polymer poly- β -hydroxybutyrate (PHB) in bacteria is well documented (1, 6, 45), as is the presence of PHB in several species of *Rhizobium*, both in the free state (4, 46) and in symbiosis (14, 19, 48). While several different pathways for the production of PHB in various groups of bacteria have been characterized (1), the most common pathway involves the conversion of two molecules of acetyl-CoA to form acetoacetyl-CoA. Sequential reduction and polymerization reactions produce PHB. This product can be depolymerized and ultimately converted back to acetyl-CoA (Fig. 1). Like the TCA cycle, carbon flux through this pathway is greatly influenced by growth conditions, and the mechanism of regulation is still unknown (2). Studies of *Rhizobium* species has not been defined.

Studies of *Rhizobium* physiology have been directed mainly towards understanding how this organism participates in symbiosis with leguminous plants, but little is known about how this process relates to the physiology of free-living *Rhizobium*

organisms. For instance, it is known that *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids accumulate PHB during symbiosis at the same time that they fix N₂ (20) and that bacteroids incubated in low levels of O₂ can utilize PHB as a source of energy and reduce the power for N₂ fixation (3). It has also been proposed that PHB accumulation functions as a sink for reductive power and, by sequestering reduced nucleotides, allows the TCA cycle to operate microaerobically (29). Nevertheless, it is not known if free-living *Rhizobium* species operate as microaerophilic organisms that are partially engaged in fermentation.

Previously, we reported that the growth of *Rhizobium elii* CE 3 was impaired when cells were transferred from a rich to a minimal medium (MM) and that this unbalanced growth was associated with a fermentative-like metabolism (2). When other strains or species of *Rhizobium* were tested under the same conditions, a qualitatively similar response was found. In this work, we present the results of physiological studies of this fermentation-like metabolism, which is characterized by the excretion of organic and amino acids into the medium and PHB accumulation, because PHB, as a sink for reductive power (43), is a fermentative product and because the excretion of organic and amino acids is a documented fermentative response in other bacteria (31). We retain the term "fermentative" to describe the phenomena described here. However, because *Rhizobium* species are strict aerobes, the fermentative response we describe for this genus more probably differs in some respects from that exhibited by, for example, facultative anaerobes (31). *Rhizobium* species are well adapted to live microaerophilically, at least during symbiosis, although it has not been explored whether they have the natural capacity to engage in a fermentative metabolism, as defined above, under low-oxygen conditions *in vitro*. Significantly, we show that the supplementation of MM with compounds that affect substrate concentrations and/or enzyme activities within or auxiliary to

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Ecología Molecular, Centro de Investigación Sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 562-A, Cuernavaca, Morelos, México. Phone: (731) 11 4061. Fax: (731) 17 5094.

TABLE 1. Bacterial strains used in this work

Strain	Original host plant	Geographic origin	Source or reference
R. cell			
CE 3	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Mexico	5
Viking 1	<i>P. vulgaris</i>	United States	37
CFN 7	<i>P. vulgaris</i>	Brazil	36
Nitrogen H251	<i>P. vulgaris</i>	United States	26
CFN 5	<i>P. vulgaris</i>	Mexico	36
IRA 5	<i>P. vulgaris</i>	Brazil	36
R6	<i>P. vulgaris</i>	Mexico	36
R. trypsi			
Subgroup A			
CFN 299	<i>P. vulgaris</i>	Brazil	27
C-05-1	<i>P. vulgaris</i>	Brazil	27
BR 10042	<i>P. vulgaris</i>	Brazil	28
BR 845	<i>L. leucocephala</i>	Brazil	28
BR 846	<i>L. leucocephala</i>	Brazil	28
Subgroup B			
CIAT 899	<i>P. vulgaris</i>	Colombia	47
C-05 11	<i>P. vulgaris</i>	Brazil	28
BR 863	<i>L. leucocephala</i>	Brazil	28
BR 853	<i>L. leucocephala</i>	Brazil	28
BR 857	<i>L. leucocephala</i>	Brazil	28
R. meliloti			
RCB 2011	<i>Medicago sativa</i>	Australia	39
1021	<i>Medicago sativa</i>	Australia	39
R. mel 2	<i>Medicago sativa</i>	Mexico	10
R. mel K	<i>Medicago sativa</i>	Mexico	E. Martínez

¹ Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigaciones sobre Fisiología de Nitrogeno, Curitiba, Parana, Mexico.

used for organic acid and amino acid analyses. Organic acids from cell and medium samples were separated and quantified by injecting 10 and 50 μ l, respectively, into a Waters Model 410 chromatograph (Waters Chromatography Division, Millipore Corp.) equipped with a Waters model 480 programmable multiwavelength detector. The separation was performed on a Waters model 600 KCC-11 Waters Chromatography Division column (300 by 3 mm [inside diameter]) connected in a series.

Flow rate was 0.2 ml/min. Organic acids were eluted with 1.25 ml (MCL), and reacted with 0.2 ml brominated fuchsin 15 mM Na₂HPO₄·2H₂O and 0.1M buffer (pH 10.5) through the reaction coil and detected at 436 nm by color change. Amino acids were quantified fluorometrically as described previously (5) or by reverse-phase chromatography using an octadecylsilylated (C₁₈) Shimadzu column and a Nova-Pak C₁₈ column (AT-7 TAG OPA [Waters] 180 by 3.9 mm [inside diameter]). Amino acid standards, reverse-phase chromatography was performed with a 10 to 80% gradient of solvents A and B (solvent A, 10% NH₄PO₄ (pH 6.5) adjusted with H₂PO₄; solvent B, 45% solvent A; 10–27% acetonitrile; 10–27% methanol; 10–27% isopropanol) at a flow rate of 1 ml/min. C₁₈ Amine was used with a 10 to 80% gradient of solvents A and B (solvent A, 10% NH₄PO₄ (pH 6.5) adjusted with H₂PO₄; solvent B, 45% solvent A; 10–27% acetonitrile; 10–27% methanol; 10–27% isopropanol) at a flow rate of 1 ml/min. C₁₈ Amine was used with a 10 to 80% gradient of solvents A and B (solvent A, 10% NH₄PO₄ (pH 6.5) adjusted with H₂PO₄; solvent B, 45% solvent A; 10–27% acetonitrile; 10–27% methanol; 10–27% isopropanol) at a flow rate of 1 ml/min. The single, symmetrical absorption peak for succinate acid appearing at 235 nm indicated that other reaction products were not interfering with the assay.

Measurement of intracellular pH. Cell cultures of *Rhizobium* spp. were grown on 10% sucrose, 10% tryptic soy, in MM or MM Plus (100 by 100 ml) media. After 70 h of growth, a 10-ml sample of [¹⁴C]- and [¹³C]-sucrose (400 μ Ci each) was given. After pulse-labelling, the culture was centrifuged, washed on the washed above. Bacterial strains and growth conditions used and preceded the determination of PHB (23) with the following modifications: in the incubation step with chloroform, total lipid aliquots were taken; one was analyzed by the spectrophotometric method described above (23) and the radioactivity incorporated into the other was determined in a scintillation counter (Beckman LS5000TC).

Determination of P₂ concentration. Cultures used for described ³²P incorporation were grown in batch cultures as described above in 250-ml Erlenmeyer flasks which received with a 100-ml culture stopper, through which were passed 6 ml of gas from the medium. The medium was collected in model 57 Yellow Springs Instrument Co., Inc. Yellow Springs, Ohio, and a scintillation glass tube to act as a pressure receiver. The O₂ electrode (model 5) culture medium was measured by using a model 5b O₂ meter (Yellow Springs

Instrument Co.) and a strip chart recorder. O₂ concentrations are expressed as percent dissolved O₂ in the medium.

Determination of cell viability. Total cell numbers in cultures were determined by light microscopy using a Petriell-Hausser chamber. Serial dilutions prepared from the cultures were plated on PY medium, and colonies were counted after 3 days of incubation at 30°C. Cell viability was determined as the number of CFU obtained by the total number of cells.

RESULTS

Growth of different *Rhizobium* strains. *R. cell* CE 3, *Rhizobium meliloti* 1021, and *Rhizobium trypsi* subgroup A (strain CFN 299) and B (strain CIAT 899) strains were subcultured every 24 h in MM batch cultures containing succinate as the carbon source and ammonium chloride as the nitrogen source. The growth rate of *R. cell* CE 3 decreased by half in the second subculture, and almost no growth occurred in the third subculture (Fig. 2A). The other *R. cell* strains tested (Table 1) behaved similarly. Furthermore, *R. cell* CE 3 maintained this same pattern of growth when subcultured every 12 h, i.e., with inocula prepared from exponentially growing cells (data not shown). When subcultured every 24 h, *R. meliloti* 1021 stopped growing in the fourth subculture, and the *R. trypsi* subgroup B strain (CIAT 899) stopped growing in the fifth subculture (Table 1 and Fig. 2B and C). However, the *R. trypsi* subgroup A strain (CFN 299) decreased its growth rate by only half in the fifth subculture (Fig. 2D), and this rate was maintained in subsequent subcultures (data not shown). All of the strains tested (Table 1) grew continuously if subcultured in PY complex medium. Cell viability, determined as described in Materials and Methods, was not affected when *R. cell* CE 3 was subcultured in MM.

Inclusion of compounds, such as different carbon sources, including glucose (except fumarate and malate), amino acids (except glutamine), purines, pyrimidines, vitamins (except biotin and thiamine), metals, trace elements, nitrate, or urea, in the MM used to subculture the different *Rhizobium* strains gave growth rate decreases similar to those observed in MM subcultures (Fig. 2). The unbalanced growth of *Rhizobium* organisms in MM was not prevented by variations in pH, temperature, or osmolarity.

Accumulation of glutamine, succinate, and malate on culture growth and PHB accumulation. All of the *Rhizobium* strains studied accumulated PHB when they were successively subcultured in MM. In comparison with the other strains tested, strains of *R. cell* (Table 1) which stopped growing after the second subculture, accumulated higher levels of PHB after each subculture (Fig. 1). For the *Rhizobium* strains studied, a direct correlation between the unbalanced growth in subsequent subcultures in MM and the accumulation of PHB was established (Fig. 2). It has been reported that *Rhizobium meliloti* does not grow in ammonium or nitrate after being previously grown in MM containing either of these compounds as a nitrogen source (34). However, no data regarding PHB accumulation in this strain are available.

In contrast to other bacteria which accumulate PHB only when growth ceases (35, 42), *Rhizobium* organisms accumulated this polymer during growth in the first and second subcultures (Fig. 2 and data not shown). This unique pattern of PHB accumulation occurred even when subcultures were made every 12 h from exponentially growing cells. The accumulation of PHB was also observed in electron micrographs of the *Rhizobium* species studied, and a positive correlation between cellular PHB content, measured chemically, and the presence of intracellular granules was found (data not shown).

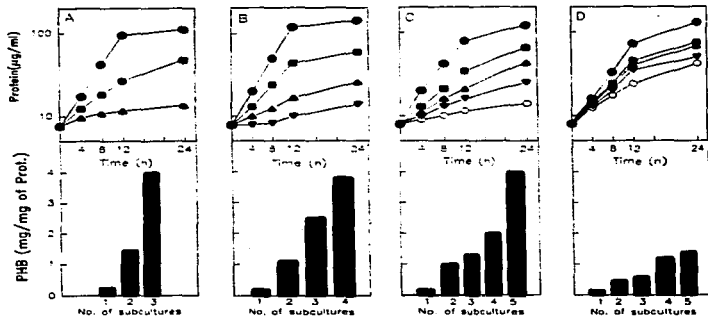


FIG. 2. Growth of and PHB accumulation in different *Rhodospirillum rubrum* strains successively subcultured in MM: (A) *R. rubrum* CE 3; (B) *R. rubrum* CFN 299 (subgroup B); and (C) *R. rubrum* CFN 299 (subgroup A). Growth and PHB accumulation after 24 h of incubation were measured as described in Materials and Methods. Results after the first (1), second (2), third (3), fourth (4), and fifth (5) subcultures are shown. Prot., protein.

When biotin, thiamine (Fig. 3), or fumarate and malate (not shown) were added to MM cultures of *R. rubrum* CE 3, growth was optimal during subculturing and PHB was not accumulated.

PHB formation. *R. rubrum* CE 3 cultures grown in MM for 14 h with or without biotin were given a 30-min pulse of [14 C]succinate, and the radioactivity incorporated into PHB was measured. The amount of PHB produced was 10-fold higher in the absence of biotin, but the specific radioactivity (counts per minute per milligram of PHB) incorporated into PHB was only 41% of that found in the presence of biotin. When a 30-min pulse was given to cultures grown for only 7 h, the specific radioactivity in PHB was only slightly higher with biotin supplementation than without it. The results of these experiments indicate that PHB is turning over even under conditions in which the polymer is not accumulated, such as in the presence of biotin.

Effects of biotin and thiamine supplementations on enzyme activities. Because *R. rubrum* CE 3 and *R. rubrum* CFN 299 have very different phenotypes when subcultured in MM (Fig. 2A and D), the levels of various enzyme activities in these two strains were determined and are shown in Table 2. With regard to the effect of biotin supplementation on enzyme activities in strain CE 3, four general categories of responses were observed: (i) enzyme activities which were not significantly affected by biotin supplementation in any subculture (ACC, NADP⁺-ME, and AD⁺-ME, PEPC, and PYK); (ii) enzymes whose activities were not affected by biotin supplementation in the first subculture but which were maintained, with biotin supplementation, at a significantly higher level of activity in the

second and/or third subcultures (CS, IDH, MDH, ODH, and PDH); (iii) enzyme activities which were significantly elevated in biotin-containing cultures in the first and subsequent subcultures (PYC and PCK); and (iv) the enzyme whose activity was substantially decreased over the course of subculturing in MM containing biotin (KT).

Enzyme activities in strain CFN 299 were not affected by biotin supplementation, with the exception of KT, whose activity increased in the presence of biotin in the first and second subcultures. Several enzyme activities were substantially higher in CFN 299 than in CE 3 regardless of biotin supplementation, and they include NAD⁺-butyrate ODH and PDH. The activity of PYC was severalfold higher in strain CFN 299 than in strain CE 3 grown in MM lacking biotin. Biotin supplementation of strain CE 3 cultures caused an approximately five- to ninefold increase in the activity of the enzyme, PYK was the only enzyme measured whose activity was lower in CFN 299 than in CE 3.

Table 3 presents a comparison of low biotin and thiamine supplementation of strain CE 3 cultures affects the activities of enzymes which require one of these supplements as a cofactor. Compared with non-supplemented cultures, biotin supplementation increased PYC activity four- to sixfold, while thiamine supplementation resulted in only a twofold increase (Table 3). In thiamine-supplemented cultures, PDH activity was only slightly increased and ODH activity was fourfold higher in the first subculture, but these activities were maintained at this increased level during the second and third subcultures. In non-supplemented cultures, these activities were undetectable

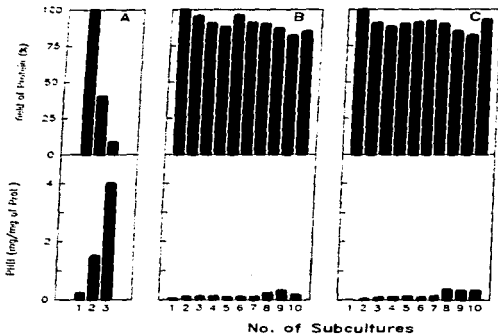


FIG. 3. Growth (yields) and PHB accumulation in *R. rubi* CE 3 during successive subcultures in MM alone (A) and supplemented with biotin (1 μ g/ml) (B) or thiamine (2 μ g/ml) (C). In each experiment, growth and PHB accumulations at 24 h were measured as described in Materials and Methods. The 100% value for yield of protein is from 100 to 100% of protein per ml. PHB, poly- β -hydroxybutyrate.

after the first subculture (Tables 2 and 3). Biotin supplementation also maintained the activities of these enzymes following the first subculture (Tables 2 and 3), although the levels of activity were less than those in thiamine-supplemented cultures (Table 3).

Enzyme activities in *R. rubi* CE 3 during subculturing in MM supplemented with fumarate and malate. The data presented in Table 4 show that the enzyme activities most affected in cells grown in the presence of malate and fumarate were PDI and PYC (minimum increases of 2.5- and 3-fold, respectively). Enzymes showing a less pronounced increase or maintenance of activity during the course of subculturing were MDH and NAD⁺-ME. PGM (Table 4) and NADP⁺-ME (data not shown) showed no significant increase in the presence of these supplements. It should be noted that for some of the enzymes, for which data are presented in Tables 2 through 4, substantial variations in activities were sometimes found between experiments, as noted previously for batch cultures of *Rhodospirillum rubrum* (13). However, there is a difference between Tables 2 and 4 and Table 3, since the sampling was done at 12 and 10 h, respectively. The general trends in enzyme activity changes reported above have been consistent from experiment to experiment.

Excretion of organic acids and amino acids. In addition to PHB, other fermentation products were also produced by *R. rubi* CE 3 when it was grown in MM. Organic acids such as 2-oxoglutarate, malate, fumarate, lactate, and γ -hydroxybutyrate were excreted into the medium (Table 5). In contrast,

when biotin or thiamine was added to the MM, most of the organic acids, although present in the culture medium at 10 h, were consumed by 24 h in the second subculture, with the exception of pyruvate (Table 5).

Glutamate and, to a lesser extent, alanine were also excreted by *R. rubi* CE 3. At the end of the second subculture in MM, the concentrations of these amino acids in the medium were highly elevated. The excretion of these amino acids was drastically reduced in the presence of biotin or thiamine (Table 5). It should be noted that neither the organic acids nor the amino acids were accumulated intracellularly (data not shown).

Effect of O₂ concentration on the growth of *Rhodospirillum rubrum*. It has been reported that O₂ concentration regulates PHB accumulation in other bacteria (18, 42). PHB production by *R. rubi* CE 3 was influenced by O₂ concentration, and PHB was accumulated to different levels during growth in all of the O₂ concentrations tested. When the O₂ concentration was decreased from 100 to 5%, cellular PHB content increased from 0.15 to 0.75 mg/mg of protein, respectively, over the course of 2 h. *R. rubi* CE 3 consumed a great deal of dissolved O₂ during the first 12 h of growth, and only by supplying O₂ to the cultures was it possible to maintain a dissolved-O₂ concentration between 10 and 25%. Under these conditions, *R. rubi* CE 3 was able to grow well in the second and third subcultures and PHB accumulation was greatly reduced (Fig. 4).

PHB accumulation in the *Rhodospirillum* strains studied also varied as a result of differences in O₂ consumption and growth rate. In the first subculture, *R. rubi* CE 3 had the highest growth

TABLE 2. Enzyme activities in *R. etli* CE 3 and *R. trespici* CFN 299 subcultured in MM in the presence or absence of biotin^a

Enzyme	Substrate	Enzyme activity in the indicated culture ^b			
		CE 3	CE 3 Biotin	CFN 299	CFN 299 with biotin
ACC	First	30 ± 4	18 ± 3	9 ± 3	8 ± 2
	Second	15 ± 10	26 ± 5	2 ± 5	7 ± 6
	Third	14 ± 1	19 ± 2	10 ± 5	4 ± 2
CS	First	284 ± 34	371 ± 28	257 ± 21	233 ± 26
	Second	246 ± 85	237 ± 32	234 ± 50	243 ± 44
	Third	71 ± 8	255 ± 13	227 ± 18	222 ± 9
IDH	First	372 ± 10	355 ± 21	379 ± 17	385 ± 55
	Second	276 ± 77	339 ± 3	368 ± 68	386 ± 55
	Third	109 ± 7	339 ± 10	346 ± 13	348 ± 26
KT	First	11 ± 13	13 ± 15	NA	90 ± 101
	Second	53 ± 17	6 ± 8	8 ± 6	38 ± 33
	Third	218 ± 34	53 ± 18	NA	76 ± 8
MDH	First	10,995 ± 1,406	10,279 ± 1,762	9,356 ± 2,991	10,366 ± 3,081
	Second	9,030 ± 4,753	8,007 ± 484	11,884 ± 4,350	11,021 ± 3,736
	Third	3,509 ± 1,282	10,722 ± 3,307	9,826 ± 2,741	11,732 ± 3,668
NAD ⁺ -ME	First	39 ± 4	36 ± 4	124 ± 18	100 ± 21
	Second	34 ± 6	44 ± 1	137 ± 5	151 ± 6
	Third	32 ± 8	32 ± 5	114 ± 17	104 ± 9
NADP ⁺ -ME	First	22 ± 6	18 ± 2	26 ± 5	36 ± 8
	Second	26 ± 7	27 ± 0	28 ± 9	35 ± 11
	Third	22 ± 12	18 ± 0	43 ± 6	41 ± 9
ODH	First	10 ± 5	23 ± 4	40 ± 4	44 ± 2
	Second	9 ± 6	36 ± 1	66 ± 1	66 ± 2
	Third	NA	17 ± 2	61 ± 2	63 ± 4
PCK	First	291 ± 117	936 ± 304	165 ± 5	200 ± 10
	Second	84 ± 18	147 ± 45	227 ± 21	257 ± 8
	Third	NA	346 ± 8	288 ± 22	252 ± 10
PDH	First	14 ± 0	17 ± 2	56 ± 4	56 ± 4
	Second	NA	19 ± 1	41 ± 1	40 ± 3
	Third	NA	8 ± 2	31 ± 1	32 ± 5
PEPC	First	11 ± 1	7 ± 2	16 ± 3	18 ± 2
	Second	10 ± 0	5 ± 3	15 ± 1	11 ± 1
	Third	13 ± 7	8 ± 1	10 ± 3	12 ± 2
PKK	First	86 ± 12	88 ± 2	35 ± 6	26 ± 3
	Second	69 ± 10	94 ± 3	29 ± 2	27 ± 2
	Third	97 ± 1	107 ± 9	37 ± 10	36 ± 1
PVC	First	6 ± 5	53 ± 13	36 ± 1	33 ± 4
	Second	8 ± 3	43 ± 19	53 ± 2	41 ± 3
	Third	5 ± 6	27 ± 4	20 ± 1	30 ± 6

^a Cells were harvested from duplicate, independently inoculated and maintained cultures at 12 h. Duplicate aliquots of each cell lysate were assayed as described in MacIntosh and MacIntosh.

^b Results are mean ± standard deviation expressed as nanomoles of product formed per minute per milligram of protein. NA, no activity detected.

rate and depleted O₂ from the medium more rapidly than *R. meliloti* 1021, and it also accumulated more PHB. Conversely, *R. trespici* CFN 299 grew at the lowest rate, consumed one-third as much O₂, and had a lower accumulation of PHB (data not shown).

When the standard inoculum used to initiate MM cultures of *R. etli* CE 3 (Fig. 2A) was diluted approximately 16-fold (to give a theoretical initial culture cell density of 0.03 OD₆₀₀ units), O₂ consumption was drastically reduced during growth and the strain grew optimally (to a cell density of approxi-

mately 0.10 OD₆₀₀ units in 11 h before transfer). PHB was not accumulated during this incubation time, even after eight subcultures, and PVC, PDH, and ODH activities were similar to those found when supplements such as thiamine were added to MM cultures started at the standard inoculum density (data not shown). Furthermore, when after eight subcultures initiated with low inoculum densities the cells were subcultured at a high inoculum density, the response was the same as that presented in Fig. 2A in regard to growth and PHB accumulation. It should be noted that strain CE 3 completely accumu-

TABLE 2. Enzyme activities in *R. celi* CE 3 during subculturing in MM in the presence of biotin and thiamine

Enzyme	Substrate	Enzyme activity in the induced culture*					
		MM		MM plus biotin		MM plus thiamine	
		10 h	24 h	10 h	24 h	10 h	24 h
PVC	First	12	8	45	48	26	18
	Second	12	38	38	17	21	21
	Third	7	6	30	32	14	15
PDH	First	16	15	20	21	21	41
	Second	NA	NA	13	11	26	34
	Third	49	25	82	80	74	114
ODH	First	26	NA	81	127	112	177
	Second	NA	NA	84	97	95	136
	Third	NA	NA	84	97	95	136

* Activities are the averages for duplicate cultures of each treatment harvested at 10 and 24 h, respectively, and are expressed in nanomoles of product formed per minute per milligram of protein. NA, no activity detected.

imately the same number of generations in 24 h during the first MM subculture regardless of whether the culture is started at a high or low initial cell density.

DISCUSSION

When *R. celi* CE 3 is subcultured in MM, a fermentative response (see the Introduction) is induced and is characterized by (i) a decrease in the activities of several TCA cycle or auxiliary enzymes, (ii) the synthesis and accumulation of PHB, (iii) the excretion of organic acids and amino acids, and (iv) a reduction in growth rate in each subculture.

The addition of specific supplements to MM or the growth of cultures under conditions in which CO_2 was maintained at a relatively high concentration (by sparging or by starting cultures at a low cell density) prevented the fermentative response and allowed an aerobic metabolism to be maintained.

The activities of some of the TCA cycle or auxiliary enzymes measured in strain CE 3 subcultured in MM declined (CS, IDH, and MDH) or disappeared (PCK, PDH, and ODH) by the third subculture, when culture growth was severely restricted (Fig. 2A and Table 2). These results indicate that some TCA cycle activity is impaired under these conditions. On the other hand, the activities of PVC, PEPC, and the MEs (Table 2) did not decrease during subculturing.

In biotin-supplemented MM, strain CE 3 grew well and did not accumulate substantial amounts of PHB during subculturing (Fig. 3B). In addition, the activities of the TCA cycle enzymes were maintained and K_T activity was reduced in comparison with the activities in cells grown in nonsupplemented medium. In biotin-supplemented cultures, PVC activity was substantially increased in all subcultures. This enzyme requires a biotin prosthetic group for its activity (20) and appears to be selectively affected by biotin, since the activity of ACC, another biotin-requiring enzyme, was not significantly altered by biotin supplementation (Table 2). While PVC is not normally essential for the growth of bacteria on succinate (41), it is an important anaerobic enzyme in some species (8, 17). The significantly higher PVC activity present in cells grown with biotin could supply more carbon, in the form of oxalacetate, to the TCA cycle and allow it to continue operating efficiently. Higher levels of oxalacetate, the substrate for PCK, may be responsible for maintaining the activity of this enzyme in bi-

TABLE 3. Enzyme activities in *R. celi* CE 3 during subculturing in MM in the presence or absence of fumarate and malate*

Enzyme	Substrate	Enzyme activity in the induced culture*			
		MM		MM plus fumarate plus malate	
		10 h	24 h	10 h	24 h
FUM	First	833 ± 71		698 ± 1	
	Second	486 ± 18		618 ± 1	
	Third	531 ± 26		952 ± 15	
MDH	First	4,578 ± 548		5,338 ± 84	
	Second	3,466 ± 90		7,010 ± 735	
	Third	3,636 ± 744		5,866 ± 5	
NAD ⁺ -ME	First	93.2 ± 0.7		91.0 ± 0.8	
	Second	88.9 ± 1.6		148.7 ± 2.1	
	Third	86.2 ± 0.9		112.5 ± 6.4	
PDH	First	23.5 ± 4.3		57.8 ± 3.8	
	Second	4.9 ± 2.3		69.8 ± 9.3	
	Third	NA		65.8 ± 4.3	
PVC	First	4.9 ± 0.5		32 ± 2	
	Second	5.8 ± 0.5		24.8 ± 0.8	
	Third	7.7 ± 0.2		22 ± 2	

* For subculturing in the presence of fumarate and malate, 100-fold concentrations of fumarate and L-malate were added to pH 6.8 Riet sterilized, and added to the MM to a final concentration of 1 mM each.

* Activities are averages ± standard deviations for duplicate cultures of each treatment harvested at 12 h and are expressed in nanomoles of product formed per minute per milligram of protein, except for PCK, which is expressed as change in Δ_{420} per minute per milligram of protein. NA, no activity detected. * Duplicate cultures were independently inoculated and maintained in the presence or absence of 1 mM fumarate and 1 mM malate as described in Materials and Methods.

otin-supplemented cultures. PCK, which catalyzes the first step of gluconeogenesis, is essential for the growth of *Rhizobium* species in succinate (2). Even though high levels of MDH activity are present in *Rhizobium* species (11, 38) (Tables 2 and 3), some bacteria require PVC activity to provide oxalacetate in substrate amounts for citrate and phosphoenolpyruvate synthesis. When MDH and PVC are both present, MDH is thought to function mainly in generating energy via the TCA cycle (8).

In MM supplemented with thiamine, strain CE 3 maintained high levels of PDH and ODH activity during subculturing. Because PDH and ODH require thiamine PP, for activity (32), they may be two of the sites at which thiamine, the precursor of biotin compound, acts. In fact, biotin supplementation activity was also stimulated by thiamine but to a lesser extent than in the presence of biotin. Conversely, PDH and ODH activities were also maintained with biotin supplementation, but the activities observed with this supplement were lower than those obtained with thiamine. We consider these to be secondary, metabolic effects.

Supplementation of MM cultures of strain CE 3 with fumarate and malate substantially increased the activities of PDH and PVC (Table 3) with respect to cells grown in MM. This activity observed may allow the continued operation of the TCA cycle and gluconeogenesis, as discussed above. In addition, the increased activity of NAD⁺-ME in supplemented cultures could supply more pyruvate, the substrate for PVC and PDH. Similar effects on enzyme activities were found when cultures were started at a low inoculum density (no oxygen depletion), indicating that PVC, PDH, and ODH do not require exogenously supplied cofactors or cofactor precursors in order to maintain these high levels of activity (data not shown).

An important component of the fermentative response we

TABLE 5. Excretion of organic acids and amino acids by *R. etli* CE 3 grown in MM with or without vitamin supplements*

Culture ^b	Time (h)	$\mu\text{mol of excreted product}^c$								
		Fumarate	Malate	Pyruvate	Lactate	2-Deog	γ-OMB	Asp	Glu	Ala
MM	10	5.6	10.5	ND	5.0	82.8	0.3	ND	0.5	ND
	24	9.3	20.9	0.9	2.6	12.5	0.3	0.6	2.0	1.1
	10	3.3	0.6	5.0	0.6	9.8	0.4	ND	ND	ND
MM plus biotin	24	ND	ND	0.8	2.3	0.7	ND	ND	ND	ND
	10	1.4	3.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	24	ND	ND	0.2	ND	0.7	0.3	ND	ND	ND

* Cells from a second subculture and levels of excreted organic acids and amino acids were determined at the indicated times as described in Materials and Methods. Experiments were repeated several times with similar results, and data from a representative experiment are shown.

^b MM, MM cultures with 10 mM succinate and 10 mM NH₄Cl; MM plus biotin and MM plus thiamine, MM cultures supplemented with biotin (1 mg/ml) or thiamine (10 mg/ml), respectively.

^c 2-Deog, 2-oxoglutarate; γ-OMB, γ-hydroxybutyrate; Asp, aspartic acid; Glu, glutamic acid; Ala, alanine; ND, not detected.

observed was the synthesis and accumulation of PHB, which may function as a carbon reservoir and as a sink for reductive power. The utilization of carbon and NADPH for PHB synthesis may prevent a drastic inhibition of several enzymes of the TCA cycle (11, 18, 20, 30). Strict aerobes such as *Rhodospirillum rubrum* may be able to maintain a functional TCA cycle even under the oxygen-limited conditions required for symbiotic N₂ fixation.

In contrast to *R. etli* CE 3, *R. tropicum* CFN 299 maintained high activities of the enzymes within or auxiliary to the TCA

cycle and exhibited only a slight decrease in growth during three subcultures in MM.

In summary, *R. etli* must be provided with an adequate supply of biotin or thiamine or substrates for the TCA cycle, including O₂. These treatments result in the maintenance of PVC, PDH, and ODH activities and thereby allow an adequate flow of carbon into the TCA cycle, which is required for sustained culture growth. We believe that the starting signal for the fermentative response may be an increase in cell density and/or decrease in O₂ concentration (see Results) (unpublished data). The substantially reduced activities of PVC and PDH during the fermentative response would limit the coordinated production of oxaloacetate and acetyl-CoA. The reduced production of these two TCA cycle substrates may account for the general decrease in TCA cycle activity we observed and could also increase the amount of carbon available for PHB synthesis. We have yet to define the mechanism(s) by which oxidizable substrates are cycled by strain CE 3 during fermentative growth. Because this excretion did not result from the accumulation of high intracellular levels of these compounds (data not shown), it bears a resemblance to the specific transport mechanisms operating in fermentative bacteria (21). The fermentative and aerobic states described here are the result of a change in the regulation of the carbon metabolic traffic. A recent report described the role of regulatory proteins in directing the central metabolic traffic of carbon during stress (40), and this regulation in one case involves the phosphorylation of a TCA cycle enzyme (40).

R. etli appears to be well adapted to survive under oxygen-limited conditions in the free state. The precise mechanism that occurs under these conditions may be related to that which may occur in symbiosis, in which PHB is synthesized in a microaerobic environment.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by DGAPA grants IN204449 and IN202393 from the Universidad Nacional Autónoma de México and by grant 0954-NW11 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

We thank Alejandra Bravo and Jorge Calderin for their collaboration at an early stage of this work; Sandra Contreras, Luz Ma. Martínez, and Dalila Ferreras for technical assistance in the chromatographic determinations; and Yolanda Mosa for help in the preparation of the manuscript. We acknowledge Samantha Zapata for her careful typing of the manuscript.

REFERENCES

- Anderson, J. J., and E. A. Thomas, 1980. Kinetics of metabolic, metabolic flux, and maintenance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 44:541-572.

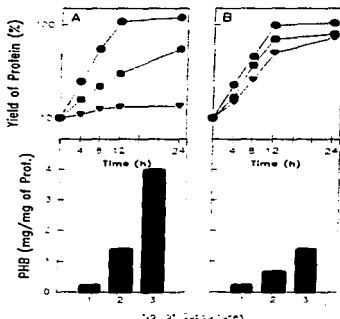


FIG. 4. Effect of dissolved O₂ on growth and PHB accumulation in *R. etli* CE 3. Cells were subcultured in MM, and O₂ concentration was measured as described in Materials and Methods. At zero time, the O₂ concentration was 20% (●) or 10% (○) (arrows). The O₂ concentration at 12 h is 22% with changing results for the first (○) second (●), and third (●) subcultures (as shown). The error value for yield of protein is from PHB to 110 μg of protein per ml. Prot., protein.

2. Anwar, B., A. Ghosh, M. J. Sussman, F. R. P. Swamy, and L. A. Melnick. 1962. Properties of mutants of *Rhizobium japonicum* strain 381. *J. Gen. Microbiol.* 23:205-209.
3. Bhargava, P. L., and R. B. Johnson. 1963. Regulation of nodule formation: accumulation of poly- β -hydroxybutyrate during supply of malate and succinate in relation to ion-transport reactions. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 206:76-80.
4. Bhargava, P. L., and R. B. Johnson. 1966. *Rhizobium japonicum*. *J. Gen. Microbiol.* 104:1-104.
5. Inhoff, L. M., and J. E. Anderson. 1966. Accumulation of β -hydroxybutyrate in the glutamate synthase-glutamate synthase pathway. *J. Bacteriol.* 170: 106-110.
6. Benson, E. A., and J. Sanner. 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms, p. 115-203. In A. H. Rose and D. M. Tengwey (ed.), *Advances in microbial physiology*. Academic Press, Inc., London.
7. The Straub, F. J., S. Boushark, P. Lindquist, P. Hesse, E. Schweizer, W. W. Hamm, P. M. Hanzel, and J. Rebholz. 1965. *Rhizobium meliloti* H21 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 171:1167-1167.
8. Hirschebald, M. R., and E. F. Pinner. 1975. Role of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxylase, and malate dehydrogenase during growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 250:267-267.
9. Johnson, R. T., and T. M. Flynn. 1963. NAD⁺-dependent malate enzyme of *Rhizobium meliloti*: a frequent of symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Microbiol.* 7:663-671.
10. Kasper, B. R., G. A. Stanton, W. R. Smith, D. A. Johnson, M. D. Sussman, and R. B. Johnson. 1961. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 20: 117-121.
11. Eberhardt, R. W., G. L. Austin, B. R. Hesse, D. R. Kerr, R. Long, G. E. Pinner, M. P. Sisson, and J. L. Waters. 1964. Metabolism of *Rhizobium japonicum* plant nodules with an emphasis on bacterial carbon metabolism. p. 536-549. In H. Bode, F. J. de Bruijn, and W. E. Newton (ed.), *Nitrogen fixation: plant nodules*. Elsevier, Fischer, Stuttgart, Germany.
12. Encarnación, R., B. Williams, and J. Mena. 1983. Krebs cycle function, poly- β -hydroxybutyrate (PHB) accumulation, and oxidative damage in *Rhizobium* sp. 547. In R. P. Falck, J. Mena, and W. E. Newton (ed.), *Nitrogen fixation in nitrogen fixation*. Proceedings of the 9th International Congress on Nitrogen Fixation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: The Netherlands. p. 247-247.
13. Ghosh, A. B., L. A. Melnick, B. Anwar, and M. J. Sussman. 1964. Sugar metabolism and nitrogen fixation by *Rhizobium meliloti*. *J. Gen. Microbiol.* 38:239-243.
14. Ghosh, A. B., and J. E. Anderson. 1966. Glutamate in relation to nitrogen fixation. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 2:23-24.
15. Ghosh, A. B., R. E. Hildner, R. Mena, and M. D. Sussman. 1974. Acetyl coenzyme A carboxylase system of *Zizanthia cava*. *J. Biol. Chem.* 249:114-114.
16. Ghosh, A. B., J. Mena, and H. Hildner. 1976. Assay of phosphoenolpyruvate carboxylase in crude root extracts. *Anal. Biochem.* 74:73-74.
17. Hildner, H. 1963. The AcCoA enzyme cycle, p. 181-197. In A. L. Sternberg, J. V. Hech, and R. L. Dawes (ed.), *Bacterial nodules and other gram-negative bacteria*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
18. Johnson, F. A., and E. B. Lewis. 1976. Regulation of the tricarboxylic acid cycle and poly- β -hydroxybutyrate synthesis in *Escherichia coli* grown under nitrogen fixation conditions. *J. Gen. Microbiol.* 97:303-312.
19. Rhee, D. R., B. L. Johnson, and R. B. Johnson. 1966. The synthesis of the poly- β -hydroxybutyrate and citric acid cycle of *Rhizobium japonicum* nodules. *Plant Physiol.* 41:103-103.
20. Sussman, M. J. 1962. The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 31:1-31.
21. Kramer, R. 1964. Secretion of amino acids by bacteria: physiology and metabolism. *FEMS Lett.* 1:1-1.
22. Kary, M. G., and J. L. Huber. 1977. Citric acid cycle enzymes and nitrogenase. *Mol. Microbiol. Symp. Ser. J.* 1:1-1.
23. Kary, M. G., and J. L. Huber. 1978. Regulation of poly- β -hydroxybutyrate acid. *J. Bacteriol.* 122:33-36.
24. Lacey, G. R., N. S. Bhargava, A. L. Orr, and J. Randall. 1951. Protein metabolism with the *Rhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem.* 193:226-231.
25. Markovitz, M. R., A. M. Sussman, and N. E. Talbot. 1976. A modulation of the Lewisy product to support protein determination in microtiter and liquid samples. *Anal. Biochem.* 78:209-211.
26. Marston, E. M., A. Cavallini, E. Pineda, and M. G. Pinner. 1963. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in isolation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 13:111-116.
27. Marston, E. M., R. Johnson, and E. Pinner. 1967. Nitrogen-fixing nodules induced by non-symbiotic *Rhizobium japonicum* strains. *J. Bacteriol.* 102:236-244.
28. Marston, E. M., R. Johnson, R. P. Manning, A. A. Fryer, P. Graham, and M. R. Pinner. 1961. *Rhizobium japonicum*: a novel system including *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 9:103-103.
29. Pinner, E. M., and J. E. Anderson. 1966. Nitrogen fixation. *J. Biol. Chem.* 241:426-426.
30. Pinner, E. M., R. M. Gifford, G. R. P. Swamy, and R. G. Gannon. 1960. Carbon metabolism in *Rhizobium japonicum* nodules. *FEMS Microbiol. Lett.* 60:227-231.
31. Pinner, E. M., and C. R. Long. 1975. Effect of adrenergic nucleotides on NAD-dependent isocitrate dehydrogenase and bacteroids of legume root nodules. *Biochem. Biophys. Acta* 391:1-11.
32. Hildner, H., F. C. J. L. Hagedorn, and M. Schneider. 1960. Biochemistry and the feeding, p. 113-173. In *Physiology of the bacterial cell*. A molecular approach. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.
33. Nannin, M. G. 1967. The tricarboxylic acid cycle and anaerobic reactions, p. 156-169. In F. C. Nordhaug, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schneider, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: applications, cellular and molecular biology*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
34. Orfano, R. W., D. J. Channing, B. L. Taylor, and M. F. Umm. 1977. Novel enzyme mechanisms for the metabolism of malate:acetyl phosphate/pyruvate and pyruvate in *Propionium complanatum*. *J. Biol. Chem.* 252:1276-1283.
35. Orfano, F., and R. T. Zimmerman. 1976. Control of symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti* N⁺ assimilation. *Biochem. Biophys. Acta* 414:143-152.
36. Page, W. J. 1969. Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Acetobacter* (acetic acid) strain 1042 during growth on molasses and other complex carbon sources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 3:323-333.
37. Pinner, E. M., and C. R. Long. 1968. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium japonicum* in *Phaseolus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:225-232.
38. Pinner, E. M., and E. L. Schmidt. 1965. Somatic microgroups among 54 strains of *Rhizobium japonicum*. *J. Microbiol. Ser.* 123.
39. Pinner, E. M., E. Hernandez-Lopez, and E. Martinez-Lopez. 1964. Carbon metabolism of *Rhizobium japonicum* nodules. *FEMS Lett.* 1:1-1.
40. Pinner, E. M., C. P. Bland, and E. F. Cannon. 1961. N⁺ genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid. *Plant Cell Growth Differ. Rep.* 10:103-103.
41. Schneider, M., A. Rasmussen, B. R. Johnson, and A. M. Chakrabarty. 1964. Energy metabolism and ultimate biomass in *Phaseolus vulgaris* nodules of the tricarboxylic acid cycle. *J. Bacteriol.* 178:623-629.
42. Neelands, M. C. 1976. Fix control of the conversion of pyruvate to acetyl coenzyme A to malate in various species. *FEMS Lett.* 1:1-1.
43. Neuse, P. G., G. A. Birch, L. G. Wilson, and G. H. Thomas. 1972. The role of oxygen limitation in the formation of poly- β -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Acetobacter butanedi*. *J. Biol. Chem.* 247:1164-1164.
44. Neuse, P. J., and E. A. Downer. 1977. The regulation of poly- β -hydroxybutyrate synthesis in *Acetobacter butanedi*. *FEMS Lett.* 1:1-1.
45. Rhee, H. W., B. Hestey, V. H. Nussbaum, and H. W. Vanderschuer, 1966. Microbiology of *Acetobacter butanedi*. *FEMS Lett.* 1:1-1.
46. Tarr, H. J. 1963. The mechanism of the overall neutral poly- β -hydroxybutyrate and its function in *Limnospira brassicae*. *Can. J. Microbiol.* 11:1-1.
47. Tarr, H. J. 1964. Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Limnospira brassicae*. *Can. J. Microbiol.* 12:1-1.
48. Tomlinson, B., and M. P. Watt. 1967. Poly- β -hydroxybutyrate synthesis and accumulation in the alfalfa *Rhizobium* species *F. M. Sussman*. *Plant Physiol.* 42:206-206.
49. Varga, A. T., and R. H. Graham. 1966. *Rhizobium* carbon utilization and *Rhizobium* nitrogen fixation on soil and pH factors and modulation under acid conditions. *Plant Physiol.* 41:1-1.
50. Williams, B., A. M. Sussman, N. E. Talbot, and R. B. Johnson. 1971. Poly- β -hydroxybutyrate utilization by wild-type (*Rhizobium meliloti*) nodules and development of its role in maintenance of nitrogenase activity. *Plant Physiol.* 47:379-385.

**3.2.- MANUSCRITO DEL ARTICULO "GENETIC AND
PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF A *Brizobium coli*
MUTANT STRAIN UNABLE TO SYNTHESIZE POLY- β -
HYDROXYBUTYRATE.**

Genetic and Physiological Characterization of a *Rhizobium celi* Mutant Strain Unable To Synthesize Poly- β -Hydroxybutyrate

MIGUEL A. CEVALLOS,* SERGIO ENCARNACION, ALFONSO LEBIA, YOLANDA MORA,
and JAIME MORA

Departamento de Ecología Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno,
Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

Received 16 August 1985 Accepted 4 January 1986

Rhizobium celi accumulates poly- β -hydroxybutyrate (PHB) in symbiosis and in free life. PHB is a reserve material that serves as a carbon and/or electron sink when optimal growth conditions are not met. It has been suggested that in symbiotic PHB can prolong nitrogen fixation until the last stages of nod development, but experiments to test this proposition have not been done until now. To address these questions in a direct way, we constructed an *R. celi* PHB-negative mutant by the insertion of an 8.5-km integron within the PHB synthase structural gene (*phbA*). The identification and sequence of the *R. celi* *phbA* gene are also reported here. Physiological studies showed that the PHB-negative mutant strain was unable to synthesize PHB and excreted more lactate, acetate, pyruvate, β -hydroxybutyrate, fumarate, and malate than the wild-type strain. The NAD⁺/NADH ratio in the mutant strain was lower than that in the parent strain. The oxidative capacity of the PHB-negative mutant was reduced. Accordingly, the ability to grow in minimal medium supplemented with glucose or pyruvate was severely diminished in the mutant strain. We propose that in free life PHB synthesis represents reductive power, allowing the tricarboxylate acid cycle to proceed under conditions in which oxygen is a limiting factor. In symbiosis with *Phaseolus vulgaris*, the PHB-negative mutant induced nodules that prolonged the capacity to fix nitrogen.

Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) and other polyhydroxyalkanoates (PHA) are accumulated by a wide range of bacteria as carbon and reduced-power storage compounds. Several species belonging to the genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, and *Azorhizobium* accumulate PHB in free life (40, 43) and in symbiosis (16, 23, 29, 48). In contrast, in other species, such as *Rhizobium nodosum*, the accumulation of PHB is observed only in the free-living state or in the first steps of nodule development but never in nitrogen-fixing bacteroids (20). The physiological role of these compounds in symbiosis is not completely understood. It is known that bacteroids of *Bradyrhizobium japonicum* may accumulate PHB and fix nitrogen simultaneously although both functions require large amounts of reducing power (48). Bergersen et al. (1) proposed that PHB reserves in bacteroids prolong the nitrogen fixation during darkness and prolong the period of nitrogen fixation. Bacteria can also use PHB as a source of energy and reducing power for nitrogen fixation when incubated, *ex vitro*, at a low oxygen concentration (2). In *Rhizobium celi*, PHB is accumulated not only in the stationary phase, like in other bacteria, but also during exponential growth. Moreover, PHB is being synthesized and degraded continuously even under conditions in which none of the polymer accumulates (10). This suggests the presence of a very sensitive regulatory mechanism that controls the accumulation or degradation of PHB, thus allowing rapid modulation of the level of reducing power and of oxidizable substrates. This situation is especially important in organisms with low efficiencies in carboxylate acid (TCA) cycles, as described for *R. celi* (10). Although the accumulation of PHB

consumes energy, carbon, and reducing power that could be utilized in the TCA cycle, their utilization may prevent the inhibition of several enzymes of the TCA cycle. This explains how strict auxotrophs such as *R. celi* can maintain a functional TCA cycle with the low oxygen concentrations required for nitrogen fixation (27).

To elucidate the role of PHB in the free-living state and in symbiosis, we isolated, sequenced, and mutated the PHB synthase gene (*phbA*) of *R. celi*. Here we report the physiological behavior in free life and in symbiosis of an *R. celi* strain unable to synthesize PHB.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. The bacterial strains used are listed in Table 1. Batch cultures of *R. celi* were grown in 250 ml of Yersinia 100s medium containing 100 mg of PY (see below) in 500 ml with shaking at 200 rpm. Bacteria grown on yeast extract were added to fresh media with shaking at 200 rpm with concentrations of 15 mg/l or 100 mg/ml and adjusted to give an initial optical density of 0.25. In order to obtain a minimal medium (MM) (1), 1 ml of six-times-subcultured of MM 24 (M. J. Daniels) was filtered and dialyzed against distilled water. MM contained nitrogen (NH₄⁺) and carbon sources (glucose) at final concentrations of 10 mM except in media of auxotrophs. When any other carbon or nitrogen sources were used, initial amount of ammonia was minimum. The water-soluble fraction of 100 mg/ml yeast extract was used as the carbon source of culture and by determining the protein concentration in the culture by the method of Lowry et al. (25). *E. coli* bacteria were grown in Luria broth (10). *Phaseolus vulgaris* was grown in PY or in the diazotrophic minimal medium of Peoples and Peoples (24). Antibiotics were used at the following concentrations: carbenicillin, 100 mg/ml; tetracycline, 50 mg/ml; streptomycin, 5 mg/ml; kanamycin, 10 mg/ml; streptomycin, 200 mg/ml; and spectinomycin, 100 mg/ml.

Bacterial mutants. An *R. celi* strain consisting of 1.700 nucleotide pairs cloned in a construct of pBR322 was mobilized to *E. coli* strain J (see below) for PHB synthesis by biparental mating with the helper plasmid pBR201 (8).

Strains were selected on PY plates with the following antibiotic concentrations: Division of PHB-producing colonies on plates, 50 mg/ml of carbenicillin, 100 mg/ml of tetracycline, and 100 mg/ml of streptomycin; selection of PHB⁻ colonies, 100 mg/ml of streptomycin, 100 mg/ml of spectinomycin, 100 mg/ml

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Ecología Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 563, Cuernavaca, Morelos, México. Phone: (774) 13 00 24. Fax: (774) 13 00 04. E-lectronic mail address: mac@vni.unam.mx.

CCGCTCTTGAATGCTCCAAATATCCAGTCTGATGCTCTGCGAATCTTFAAAATTTCTCCAGCCCAAAAGCAATAGCACAGCCGATGCTGGCTGGAACT 1800
 TTTTTCTCGTTGGTGCAGCTCTCCAGCAAAAGCTCTCCAGCAAGAGTCTCTCCAGCAAGAGTCTCCAGCAAGAGTCTCCAGCAAGAGTCTCCAGCAAG 1800
 NYVNRIRIKRVLVLPPEENVTDTSKQEGGGK 1800
 AAATGCGCAAGAACCGGCTTTCCAGCCAGCGATCTCAACCCCTATCTTTAAAGGCTCCGAGCCATGCGCATGAAATTTCCCGCCCGCTCGAAAT 1800
 HGDRTGDFDATTDLRPPVLLRDPETFAHAFALH 1800
 CTGACCGAGCCCTCTCCGCTGCTCTCCGCGCGAAGCCGCGAAGTACGAAAGCCGATCGATCTCCGATGAAAGCCATGCTGCAAGCCGCTTTCCA 4000
 LGGQAASAMLA PRERGETETATIDPMTDHWK TLS K 4000
 AGATCAACCAATATGATTTCCGATCTCCCGCCAGCTCTCCGAGCGAGCATAGCTAGTCTGCTCTCTCCGATCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 8000
 IREHIDRDRDRTFRGDTGEMHDFD 8000
 CATCGAGGACCGCTGGATGCGAGCGCCAGCCCTCTCCCGCCAGCCCGACACCCCGAAGGCAAGCGCTCTCTGCGATGAGATTTCCGCAAAAATCCG 8000
 HGQTRGCGGCT 8000
 FTTCGATCTCTCCCGCAOQTATPTCTGCT 7000
 FDFVFPVTFDHWVDRSHTG 7000
 CGGGATCTACGTAAGCAGATACCGAGCCCTCTCCCGAGCACTTCATCTGCTACCAACCACAGCTTTATCGCGAGCCATCCGCGAGCAGCCGCA 8000
 GFYVITAVICAGIAGALSPFHPFIATNPLQVYRETIA SHGE 8000
 AAACCTGCT 9000
 NLVRCGKRLLEADIAAGRGELRLRQTDRTPEAT 9000
 CCGCACGTGCT 10000
 RDMALTFGRVIAAGRDICDIIQVYRABSTFVLRKRF 10000
 TCGTATCTCCCGCTGATACCAAGTGTAGATCTCGAGCTCCAGCCCGCAAAATCTCTGATGAAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 11000
 LICPNMINKFVILDLNLPQKSFIKKCVDDQGVTF 11000
 COTCATCTCTGCT 12000
 VIBWHPDORHREKDNAYAREIDIFALTEIK 12000
 GCGAGCGGAGAGAGGCTCAAGCCCTGCTACTVCTCTCCGCGACGCTGCGACGCTGAAGGAGAGAGAACGCGA 13000
 ATGKEVHNAVGVCGVGTLLAATLALHAREKNRI 13000
 TTAGAGCCGCAAGCTCTCTACACTAGTATTTCCGCTATCCGCGACCTCAAGGTCTCTGCTGAGGAGGAGCACTGCCCGCTCGAAGAGCA 14000
 RTALPFTQGVDFYHAGDLRVEEGLAEH 14000
 TATCGAGCGCGCTGCTATCTGCAAGTCTCGAAGATGCGATGCTTCAAGCATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 15000
 HDAAGVDBKREHAFNHLRABELIWPYVNSY 15000
 CTGAGGCGCAGAGAGCGCT 16000
 LKQJELPFDLFLFNWADSTRNAAANAFYLRNVCY 16000
 ATCTTCCAACCCGCTGACCGAGCAAGATGATCTCGACCGCAAGCCATATCTCGAAGAGCTGAGAGCTCCGATATATATCTGCCAGCGCA 17000
 LRWALTDREHLELDGRRIELKDKVRIPIYHNLATRE 17000
 GATCATGCT 18000
 DHIAPAKSVFLCGKRVFGKVEFVVDGEGHIAGV 18000
 GTCACCGCCCGCAGCAAGAAATATCAATCTTCCGCGCGCGCCCGCCAGCGCAATACGACGCTGCTGCTGAGCCGCGAGCGAGCCGCGAT 19000
 WHPDFRFRVDFWDFDGRERETWLEDRSTFDF 19000
 CATGTGCGCACATGCGACCTGATAGAGACCGATACCGAGACCGCTTCCAGCCGCGAGCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 20000
 WPHFMGAMIEH DGRVRAARKPGGDALNAIEEA 20000
 ACCGGAAATATGATGATGCAAGCTTGAGACCGCGCGAGCATCTTTTGAAGCATCTAAGAAAGCAAGCATATGCGTAAACAAATATGAAANCC 21000
 FGDYVH 21000
 ATAACTGCTACTCTCGGAAACAGTGGAAAGTCCGACCCGCTTAAATTCGGCCCTCTTCCGCTCTTACGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 22000
 GCGCCGCGCT 23000
 TCCCGAGATCC 2313

FIG. 1. Nucleotide sequence of the *R. eth* CE3 *PHB* synthase gene (open) (3 kb). The amino acid sequence of the coding regions is given in standard one-letter code. The stop codon is indicated by an asterisk. The underlining shows the BamHI site utilized to insert the *R*-NotI or *Xba*I-SpeI interposon.

microscopy was used to examine the ultrathin sections. Row and middle complex were fixed in ultrathin (0.1 M phosphate buffer, pH 7.2) for 30 min in 0.1 M cacodylate and for 2 h at atmospheric pressure, washed three times in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2), and postfixed in 1% osmium tetroxide for 15 min in 0.2 M phosphate buffer, pH 7.2. Fixed samples were rapidly washed with distilled water, dehydrated through graded ethanol solutions, and embedded in Epon 812. Ultrathin sections of control samples were obtained as described above.

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the GenBank database under accession number U3462.

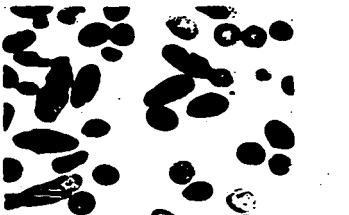
RESULTS

Identification of the *PHB* synthase structural gene. The *PHB* synthase structural gene of *R. eth* CE3 was identified by

heterologous complementation of the *A. eurythys* PHB-4 strain, which lacked *PHB* synthase activity. After the conjugative transfer of an *R. eth* cosmid library to *A. eurythys* PHB-4, two opaque colonies were formed after 7 days of incubation on plates with MM containing 1% fructose and 0.025% NH₄Cl, similar to that known to promote *PHB* accumulation (31). The opacity of the colonies was an indication of *PHB* accumulation. Restriction analysis of the two cosmid clones which complemented *R. eth* *PHB*-4 showed that both cosmid clones contained a *GeoR*I fragment of 9.6 kb (EEL1 fragment) in addition to other fragments which were not identical. Subclones containing only the EEL1 fragment of the cosmid plasmid complemented *A. eurythys* PHB-4 to the same extent as the transconjugant with the complete cosmid.



FIG. 2. Electron micrograph sections of *R. e. coli* CE3 (A) and SAM100 (B) cells. Bacteria were grown for 24 h (first subculture) in MM with pyruvate and potassium nitrate as carbon and nitrogen sources, respectively, washed with distilled water, and processed, fixed, and stained as indicated in Materials and Methods. Bar, 500 nm.



The *Eco*I fragment and its five *Sma*I subfragments were subcloned in the *B*clapSII 5K(+) vector and partially sequenced with reverse and universal primers. Two *Sma*I fragments and one *Eco*RI-*Sma*I fragment, which were contiguous according to the restriction map, contained sequences with high degrees of homology to those of other PHB synthases. The sequences of these fragments were completed. Sequence analysis showed an open reading frame of 1,966 bp, and a molecular mass of 70 kDa was predicted for the translational product (Fig. 1). The primary structure deduced from *R. e. coli* *phbC* revealed a high degree of amino acid identity with other PHB synthases (data not shown).

Glucogen and PHB accumulation. *R. e. coli* CE3 accumulates PHB during subculturing in MM. In each subculture the strain accumulates higher levels of PHB (up to 2.43 mg of PHB per mg of protein). Also, electron microscopy studies of cells grown in MM-succinate potassium nitrate (10 mM), the best medium to promote PHB accumulation (data not shown), confirmed the presence of few, but large, electron-transparent granules, which are typical of PHB. As expected, PHB was undetectable in the mutant strain. However, large amounts of an electron-transparent material, which resembled the glucogen granules described by Tjien and Schmidt (44), were observed in mutant cells (Fig. 2). The presence and accumulation of glucogen in SAM100 was confirmed by determining the glucogen content during subculturing in MM-succinate-ammonium. As shown in Table 2, glucogen accumulated in both strains, but the amount in SAM100 was always larger (3.1- to 50-fold).

Growth characteristics and medium capabilities of SAM100. After 24 h of culture of *R. e. coli* CE3 and SAM100 in PY medium, the growth rate and the biomass produced at the stationary phase were almost the same. In contrast, during subculturing in MM with succinate as carbon source and ammonium chloride as a nitrogen source, both strains decreased their growth rates by half in the second subculture, and practically no growth occurred in the following subculture (10). Some important differences emerged when the strains were grown in MM supplemented with different carbon sources (11, 12). In this respect, SAM100 grew poorly with pyruvate or glucose as the carbon source. The protein yields after 24 h of

subculture in MM, compared with that of the wild type, were 42 and 26.2% when glucose or pyruvate, respectively, was used as the carbon source.

The capacity to oxidize [1,4-¹⁴C]succinate or [U-¹⁴C]glucose was measured as evolution of CO₂ in the mid-log phase of growth (5 h) for *R. e. coli* CE3 and SAM100. The PHB-negative mutant oxidized only 30 and 70% of the amount oxidized by the wild type when glucose and succinate, respectively, were used as carbon sources in MM.

Excretion of organic acids and amino acids. CE3 and SAM100 excreted several organic acids (Table 3) and amino acids as fermentative products (see below). However, the amounts and the patterns of excretion of each product were different for the two strains. The two strains excreted 2-oxoglutarate, fumarate, malate, pyruvate, lactate, and γ -hydroxybutyrate, but the amount of each organic acid excreted by SAM100 was, in

TABLE 2. Glucogen contents of *R. e. coli* CE3 and SAM100 during successive subcultures in MM*

Time (h)	Subculture	Strain	Glucogen (mg/mg of protein) ^b
0	First	CE3	0.017 ± 0.008
		SAM100	0.205 ± 0.076
10	First	CE3	2.22 ± 0.65
		SAM100	2.53 ± 0.325
24	First	CE3	0.126 ± 0.013
		SAM100	0.729 ± 0.177
10	Second	CE3	0.040 ± 0.013
		SAM100	2.033 ± 0.186
24	Second	CE3	0.139 ± 0.022
		SAM100	1.171 ± 0.171

* Cells were subcultured in MM-succinate-ammonium and at the indicated times (h) were processed for glucogen determination as described in Materials and Methods.

^b Expressed as mean ± standard deviation.

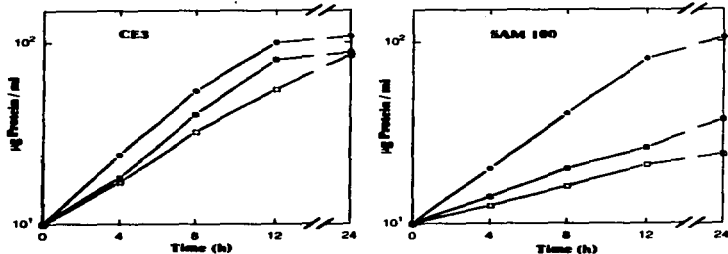


FIG. 3. Growth of the *R. celti* wild-type strain (CE3) and PHE-negative mutant (SAM100) with different carbon sources. CE3 and SAM100 bacteria from the first subculture were grown in MM-succinate-ammonium (□), MM-glucose-ammonium (●), or MM-pyruvate-ammonium (○) as described in Materials and Methods.

general, severalfold higher than that excreted by the wild-type strain. One remarkable difference between the strains was that β -hydroxybutyrate was excreted only by SAM100. The intracellular pools of these metabolites were also determined. The amounts of these metabolites were, in general, severalfold higher in the mutant than in the wild-type strain, but this was insignificant compared with the amounts of the same metabolites excreted to the medium. For example, malate was always detected intracellularly in SAM100 but was detected only in the stationary phase of the second subculture in the wild-type strain. The concentration of malate found under this condition in the wild-type strain was 11.3 nmol/mg of protein, which is 87% of the concentration found inside the cells of the mutant strain. However, the amount of malate excreted by SAM100 under this condition was 575-fold higher than that found inside the cells.

Alanine and glutamic acid were detected as excreted metabo-

lites in the second subculture in MM only in the mutant strain (0.0002 and 0.0086 nmol/mg of protein, respectively).

NAD⁺/NADH ratios. Another important difference between the mutant strain and the wild-type strain was in the quantities of reduced nicotinotides produced. The NAD⁺/NADH ratio in SAM100 was severalfold (2.3- to 17-fold) lower, under all conditions, than that in the wild-type strain (Table 4).

PDH activity. The PDH activities of the PHE-negative mutant and the wild-type strain grown in MM with succinate, glucose, or pyruvate as a carbon source are presented in Fig. 4. These data clearly show that the PDH activities of the PHE-negative mutant grown in MM supplemented with glucose or pyruvate were lower than the activities detected in the wild-type strain.

Symbiotic properties of the PHE-negative mutant. Results of time course studies of plant growth, nodule development, and nitrogen fixation of bean plants inoculated with CE3 or

TABLE 3. Excretion of organic acids by *R. celti* CE3 and SAM100 grown in MM^a

Time (h)	Substrate	Strain	Amt (pmol/mg of protein of							
			Formate	Malate	Pyruvate	Lactate	2-Oxoglutarate	3-Hydroxybutyrate	β -Hydroxybutyrate	Acetate
10	First	CE3	0.7	2.7	ND ^b	0.7	5.6	0.4	ND	ND
		SAM100	5.2	4.9	ND	3.0	12.3	1.9	ND	ND
24	First	CE3	ND	0.1	0.5	ND	0.8	0.3	ND	ND
		SAM100	ND	0.3	7.0	ND	2.1	0.5	0.5	0.3
10	Second	CE3	5.6	10.5	ND	5.0	52.8	0.3	ND	ND
		SAM100	12.3	30.8	n.o.	44.8	99.1	1.2	0.5	1.6
24	Second	CE3	0.3	20.0	0.0	1.0	12.5	0.3	ND	ND
		SAM100	25.8	74.9	0.0	3.0	56.8	1.1	1.3	0.5

^a At the early subculture in MM-succinate-ammonium and at the indicated times, levels of organic acids were determined as described in Materials and Methods. The results shown are from a representative experiment of five.

^b ND, not detected.

TABLE 4. NAD⁺ and NADH contents of *R. etli* CE3 and SAM100 grown in successive subcultures in MM with different carbon sources^a

Time (h)	Subculture	Strain	MM-glucose		MM-succinate	
			Amt (nmol/mg of protein)		Amt (nmol/mg of protein)	
			NAD ⁺	NADH	NAD ⁺	NADH
10	First	CE3	0.276	0.337	0.408	0.403
		SAM100	0.369	1.057	0.268	0.093
24	First	CE3	0.509	0.087	0.089	0.706
		SAM100	0.365	1.179	0.171	0.905
10	Second	CE3	ND ^b	0.231	0.337	0.406
		SAM100	1.055	0.245	0.061	2.298

^a Cells were subcultured in MM supplemented with succinate-aminium or glucose-aminium (10 mM each) and, at the indicated times, levels of NAD⁺ and NADH were determined as described in Materials and Methods. The results shown are representative of triplicate experiments.

^b ND, not detected.

SAM100) are shown in Fig. 5. Nodules elicited by SAM100 emerged at the same time and in the same amount as those induced by the wild-type strain. Examination of nitrogen-fixing nodules induced by SAM100 by electron microscopy revealed that bacteroids of SAM100 lacked the PHB granules characteristic of *R. etli* nitrogen-fixing cells (Fig. 6). The nitrogenase specific activity of nodules elicited by CE3 was lower after day 38 postinoculation and ceased earlier relative to the activity detected in plants inoculated with the mutant strain. Accordingly, the total nitrogen content in plants inoculated with the wild-type strain was lower after day 38 postinoculation.

In greenhouse experiments, plants inoculated with the mutant strain SAM100 and SAM100 had a tendency to produce more seeds per plant. Table 5 shows the results of three experiments in which standard deviations were calculated. In

addition, in two more experiments done with the SAM100 strain, the total yields of seeds were 21 and 37% more than those for the plants inoculated with the wild-type strain. In these experiments the nitrogen contents per milligram (dry weight) of seeds were 48 and 20%, respectively, more than that found in seeds of plants inoculated with CE3. Since these experiments were done in batch, their results are not included in Table 5.

DISCUSSION

The PHB synthase gene of *R. etli* (*phbC*) was identified by phenotypic complementation of a mutant strain of *A. eutrophus* impaired in the synthesis of PHB. Cloning of *R. etli phbC* was confirmed by the analysis of the nucleotide sequence, whose deduced protein sequence had a high degree of identity with those of other PHB synthases. Moreover, a disruption of this gene suppressed PHB accumulation under all conditions tested.

The PHB-biosynthetic pathway described for *A. eutrophus* is probably present in most PHB-accumulating bacteria. The pathway begins with the condensation of two acetyl coenzyme A (acetyl-CoA) molecules catalyzed by a pyruvate-dependent thiolase. An NADPH-dependent acetyl-CoA reductase catalyzes the conversion of acetyl-CoA to β -hydroxybutyryl-CoA. Finally, the resulting β -hydroxybutyryl-CoA is polymerized by a PHB synthase (42).

Mutants unable to synthesize PHB have been isolated from several bacterial species, i.e., *A. eutrophus*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Pseudomonas identitatis*, *Pseudomonas putida*, and *R. meliloti* (21, 22, 32, 37). In all of them, the defect was located on the PHB synthase gene. Until now, the best-characterized PHB-negative mutants have been from *A. eutrophus*.

It has been reported that *R. etli* and other species of *Rhizobium* have a fermentative metabolism when serially subcultured in MSM. This fermentative metabolism is characterized by (i) a reduction in growth rate; (ii) the excretion of organic acids and amino acids; (iii) a diminution in the activities of pyruvate carboxylase, PEPCK, 2-oxoglutarate dehydrogenase, and phosphoenolpyruvate carboxylase; and (iv) the accumulation of PHB (10).

The PHB-negative (*phbC*) mutant strain described in this work did not accumulate PHB under any condition tested; however, during growth in MM it excreted large amounts of

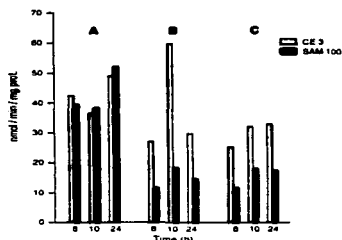


FIG. 4. PHB specific activities of *R. etli* CE3 and SAM100 grown in MM with different carbon sources. Cells were harvested 1 hour from duplicate independent inoculations and measured as culture described in Materials and Methods. Data are the mean \pm SD of three MM experiments. The PHB specific activity in MM is expressed as nmol/mg protein/h.

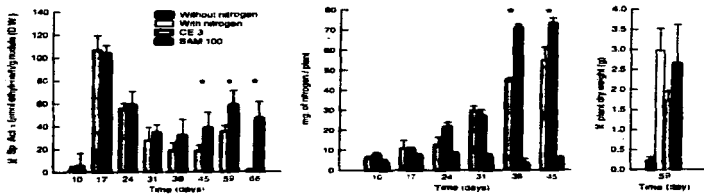


FIG. 4. Specific activities of nitrogenase, total nitrogen contents per plant, and plant air weights of *P. striatum* inoculated with *R. rub.* CE3 and NADH⁺ Specific activities (mg N₂ fixed/mg dry weight/h) and means \pm S.E. standard deviations expressed as micrograms of glucose produced per hour per plant air weight (D.M. 1000 mg/ha). Total nitrogen contents per plant are means \pm S.E. standard deviations expressed as milligrams of nitrogen per plant. Asterisks indicate that the means in the samples are different at the 5% level ($P < 0.05$). These experiments were performed at acid free soils; the results shown are for representative experiments only.

organic acids, and during serial transfer in MM its growth was affected more than that of the wild-type strain.

The *R. rub.* mutant shares some physiological properties with the *M. thermophilus* PHB-negative mutant, such as excretion of organic acids as pyruvate and its growth rate. In both species the excretion of fermentative products was not related to the intracellular content of these acids, since only minor amounts were detected (7, 45, 46).

The remarkable amount of metabolites excreted by the mutant strain is direct evidence that this strain is less capable than the wild-type strain of effectively oxidizing the carbon source. This effect indicates that the PHB-negative mutant developed a stronger fermentative metabolism in MM sucultures. A lower NAD⁺:NADH ratio was observed in the mutant strain, and this increase in reduced cofactors has to be related to the

absence of a sink (PHB) for reducing power. In the same sense, the reduction in succinate and glucose oxidation in the mutant strain could be the result of the increase in the amount of reduced cofactors. It is well known that these cofactors inhibit some of the enzymes of the TCA cycle. For instance, NADH inhibits PDH and 2-oxoglutarate dehydrogenase activities (18, 29, 41). A low activity of PDH in desalted extracts was found in the PHB-negative strain when grown on pyruvate compared with succinate as the carbon source. Taken together, all of these phenomena may explain why the mutant strain grows very poorly in pyruvate or glucose compared with succinate.

Furthermore, we have obtained by transposon mutagenesis of the PHB-negative mutant a strain that grows optimally in pyruvate or glucose and that expresses a PDH activity like that

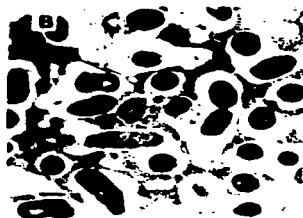


TABLE 5. Yields and nitrogen contents of seeds from plants inoculated with *R. celti* CE3 or SAM101

Expt	Strain	Wt (g) of seeds per plant ^a	No. of samples	Nitrogen content (mg per mg (dw) wt of seeds)
1	CE3	1.523 ± 0.380	18	0.036
	SAM101	1.463 ± 0.794	18	0.041
2	CE3	1.629 ± 0.63	48	0.048
	SAM101	1.702 ± 0.70	33	0.055
3	CE3	1.371 ± 0.58	22	ND ^b
	SAM101	1.549 ± 0.46	34	ND

^a Expressed as mean ± standard deviation.

^b ND, not determined.

of the wild-type strain (unpublished observations). Glucose produces two molecules of pyruvate by the Embler-Doudoroff pathway, so when glucose or pyruvate is used as a carbon source, the latter substrate is provided more efficiently to PDH than is succinate, something that would explain the important increase in reduced cofactors in the SAM101 mutant strain (9). This proposition is partially supported by the observation that pyruvate is excreted poorly compared with other organic acids. Surprisingly, the mutant strain accumulates up to 50-fold more glycogen than the wild-type strain during subcultivation in MM. It has been reported that in some bacteria, glycogen, like PHB (15), is continuously being turned over (10), and this may explain how the carbon of PHB can be easily shuffled to the synthesis of another polymer such as glycogen. Therefore, the synthesis and degradation of the so-called reserve polymers have to be integrated into the basic cell metabolism.

As already proposed for *R. celti*, PHB may be considered a necessary fermentative product that sequesters reductive power, allowing the TCA cycle to operate under microaerobic conditions (10).

In synthesis, the PHB-negative mutant strain induced, on average, the same number of nodules as the wild-type strain. However, the nitrogenase specific activities of these nodules were higher than the activities found in wild-type nodules after 36 days postinoculation. Also, the total nitrogen contents of plants inoculated with SAM101 were higher than those of plants inoculated with the wild-type strain after 38 days postinoculation. Microscopic examination of nodules induced by the mutant strain showed bacteroids which did not contain the PHB granules that characterize wild-type bacteroids. These results showed that PHB does not prolong or sustain nitrogen fixation as suggested by Bergersen et al. (1). In fact, wild-type nodules senesce earlier than the nodules induced by the mutant strain (data not shown). A higher nitrogen content was found in seeds of plants inoculated with the PHB-negative mutant. A definitive result will require field experiments. As mentioned above, the PHB-negative mutant accumulated several-fold more reductive power in nodules induced by the mutant strain could be the result of the channelling of this accumulated reductive power to nitrogen fixation. A demonstration of the competitive effect of nodules induced by the mutant strain (measured as photosynthesis of H₂) for reducing equivalents has been described for *R. sphaeroides*. An *R. sphaeroides* mutant unable to synthesize PHB evolves more H₂ than the wild-type strain when grown in acetate or pyruvate as a carbon source, indicating that the reducing equivalents have been drained to nitrogenase (22).

Recently, a PHB-negative mutant of *R. meliloti* was described (32). Its physiological characterization was not reported, but this mutant is not affected in nitrogen fixation. On the other hand, it is known that most wild-type bacteroids of *R. meliloti* do not accumulate PHB (20). Probably, this is one reason that the association between *R. meliloti* and alfalfa is one of the most symbiotically efficient ones. Alfalfa nodules can derive up to 80% of their nitrogen from air. In contrast, bean nodules derive only 40% of their nitrogen from air (19). To test this proposal, we are conducting experiments to force bacteroids of *R. meliloti* to accumulate PHB and then to determine its effect on their capacity to fix nitrogen.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico (CONACYT) no. N0111074, and partially by DEJAPA-UNAM no. IN302309.

We thank Sandra Contreras for technical support in performing high-pressure liquid chromatography analysis, Carmen Vargas for technical assistance in the construction of the CA91 mutant strain, Patricia Buzare for technical assistance with the automatic sequencer, and Armando Rivera for technical support in the greenhouse experiments. We thank A. Scrimbache for kindly providing the *d. caryophylli* PHB-4 mutant strain. We also thank Michael Dunn for reviewing the manuscript and Gabriela Guerrero for her assistance in the Computer Unit.

REFERENCES

- Bergersen, F. E., M. B. Peoples, and G. L. Yanner. 1961. A role for poly-β-hydroxybutyrate in bacteroids of soybean root nodules. *Proc. R. Soc. London* 258:363-368.
- Bergersen, F. E., and G. L. Yanner. 1961. Bacteroids from soybean root nodules: accumulation of poly-β-hydroxybutyrate during sorghum nodulation and succinate in relation to nitrogen fixation in flow-chamber cultures. *Proc. R. Soc. London* 258:369-380.
- Bergersen, F. E. 1973. *R. lotifera* transfer to *Rhizobium lotiflorum*. J. Gen. Microbiol. 75:119-120.
- Bower, R. W., and R. Buchanan-Walton. 1969. A complementary analysis of the nitrogenase gene of *Rhizobium lotiflorum* (D. J. 346). *Biochem. J.* 114:569-572.
- Brown, A., and J. Mann. 1966. Amino acid assimilation in *Rhizobium phaseoli* in the glutamine synthetase-glutamate pathway. J. Bacteriol. 176:103-108.
- Calderazzo, J., and J. Mann. 1969. Glutamine assimilation pathways in *Syntherisma* strain growing on glutamine as the nitrogen and carbon source. J. Gen. Microbiol. 125:269-277.
- Cook, A. M., and R. G. Selphing. 1979. Metabolic concentrations in *Rhizobium corymbiferum* H16 and a mutant deficient in poly-β-hydroxybutyrate synthesis. *Arch. Microbiol.* 119:231-239.
- Datta, G. B., S. Ghoshal, S. A. Chatterjee, and D. B. Ghoshal. 1980. Fixed low range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti* H16. *Mol. Cell. Biol.* 1:577-584.
- Devesh, B. E., and T. M. Johnson. 1973. NAD-dependent male enzyme of *Rhizobium lotiflorum* is required for nitrogen fixation. *Mol. Microbiol.* 7:269-273.
- Devesh, B. E., M. Ghosh, R. Ghosh, and J. Mann. 1968. Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium lotiflorum*. J. Bacteriol. 179:1916-1920.
- Engel, E. R., J. Jordan, J. R. Bugg, and R. G. Selphing. 1979. Isolation and sequence analysis of the *Rhizobium meliloti* dnfA gene encoding the dnfA protein. *J. Gen. Microbiol.* 113:231-239.
- Engel, E. R., B. B. Buchanan-Walton, J. Mann, and R. G. Selphing. 1980. Glycogen and nitrogenase activity in *Rhizobium caryophylli*. *Arch. Microbiol.* 120:121-124.
- Felley, H., J. Frey, and H. Kortholt. 1967. Interstrain mutagenesis of wild and water producing strains of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 179:1916-1920.
- Fred, J. M., M. S. El Jundi, R. E. Benson, W. E. Skogerboe, and F. M. S. Kowalski. 1972. Construction of a fixed low range serum cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium meliloti* (Cen 75). *Plant Dis.* 56:200-206.
- Gardner, E. J., J. Mann, G. J. Hargreaves, and A. M. Brown. 1962. Isolation of glutamine synthetase gene sequences as shown by the use of H¹⁴C and ¹⁵N. *J. Biol. Chem.* 237:240-244.
- Goodfellow, B. E. 1979. The nitrogenase gene in bacteroids in relation to nitrogen fixation. P. 235-254. In G. H. Bormann, J. F. Harshbarger, and S. W. Lyon (ed.), *International review of nitrogen*. Academic Press, New York.

15. Hoshino, H., 1955 Studies on translocation of Ca^{2+} with plants. *J. Mol. Biol.* 10:47-57.
16. Hoshino, H., G. S. H. Hsu, and J. Bacterio. 1965a. Regulation of polyphosphate accumulation in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* 31:223-234.
17. Hoshino, H., 1965b. Methods for enhancing synthetic nitrogen fixation. *Plant Sci.* 12:21-27.
18. Horsch, A. M., M. Bump, and J. M. Goodrich, 1963. Electron micrograph studies of polyphosphate bodies formed by *Neurospora crassa*. *Bacteriol. Rev.* 27:139-149.
19. Hoshino, H., M. E. Shuman, H. Yoshino, H. Yamamoto, P. Toppin, and H. Watanabe, 1967. Metabolism of polyphosphate-accumulating PHB101. *Journal of Microbiology, Identification and Sequence of Genes, and Effect of the External Medium on the Synthesis and Degradation of PHB.* *J. Bio. Chem.* 242:2191-2195.
20. Hoshino, H., S. Sano, and H. G. Schlegel, 1962. Relationship between the polyphosphatase of *Neurospora* and the accumulation of PHB in nonaccumulating purple bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1:267-273.
21. Huey, D. H., J. R. Ames, F. Inoué, and D. W. Brown, 1962. Studies of the polyphosphatase and other acid phosphatases of *Neurospora crassa*. *Arch. Biochem. Biophys.* 71:1-11.
22. Lane, J. H., and R. A. Shapiro, 1967. Assay of polyphosphatase and *J. Bacteriol.* 123:35-41.
23. Lanyi, J. H., N. J. Bonaventura, A. J. Pitt, and H. J. Hoshino, 1967. Protein management with the blue colored reagent *J. Mol. Chem.* 19:256-272.
24. Malmgren, C. E., and P. M. Sharkey, 1966. The synthetic nitrogen fixation system, p. 263. In S. Yano, Ed., Recent advances in microbial nitrogen fixation. *London Annual Lecture*.
25. Malmgren, C. E., H. M. Griffith, C. P. Ames, and P. M. Sharkey, 1966. Carbon metabolism in *Neurospora crassa* and bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 4:375-380.
26. Mierz, J., H. Hoshino, and S. Sano, 1972. Regulation of arginine activity by intracellular pH in the arginine biosynthetic pathway in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 138:97-101.
27. Nishio, K., N. F. Iqbal, J. Ames, R. Goodrich, and G. Trudler, 1964. Role of modulation in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 119:116-123.
28. Nishio, K., H. Sano, H. F. Iqbal, J. Ames, R. Goodrich, and G. Trudler, 1964. Regulation of polyphosphate synthesis in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 118:116-119.
29. Pridmore, G. P., and J. J. Hoshino, 1966. Polyphosphate-accumulating PHB101 mutants in *Neurospora crassa*. Histo administration and characterization of the PHB synthetase gene (*phbA*). *J. Mol. Biol.* 24:229-245.
30. Pridmore, G. P., J. J. Hoshino, and H. G. Schlegel, 1967. Purification and characterization of mutants of *Neurospora crassa* unable to synthesize poly- β -hydroxybutyrate. *Can. J. Microbiol.* 13:23-29.
31. Pridmore, G. P., and H. M. Brown, 1964. In vivo, intracellular management with a selective DNA reagent. *Can. J. Microbiol.* 10:203-212.
32. Quinn, C. M., H. M. Brown, M. F. Hayes, E. Hoshino, G. Hoshino, and H. W. Patterson, 1962. Regulation of nitrogen fixation gene expression in *Neurospora crassa*. *Nature (London)* 195:22-25.
33. Rasmussen, E. E., 1967. The effect of cell wall on cell wall on an electron transport chain reaction mechanism. *J. Cell Physiol.* 17:203-213.
34. Rasmussen, E. E., J. E. Fritsch, and E. Malmgren, 1966. Molecular cloning a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
35. Schlegel, H. G., H. Lafferty, and J. Ames, 1967. The location of mutants accumulating polyphosphatase and *Arch. Microbiol.* 112:201-204.
36. Schlegel, H. G., H. Sano, and A. Pridmore, 1963. Construction of gene replacement factors for *Neurospora crassa* using a genetically modified *uvrA* gene as a genetic selection marker. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5:305-309.
37. Schlegel, H. G., M. J. Hayes, and H. M. Brown, 1964. Regulation of intracellular polyphosphate metabolism by external inhibition of acetylphosphate dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 24:247-253.
38. Smith, H. W., E. Hayes, S. H. Sano, and H. M. Brown, 1966. A genetic study of polyphosphatase in the purple cultures of *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1:67-72.
39. Sano, H., and H. G. Schlegel, 1966. Expression of polyphosphate mutants of *Neurospora crassa* which are impaired in the accumulation of polyphosphatase. *Arch. Microbiol. Biotechnol.* 3:119-124.
40. Sano, H., and H. G. Schlegel, 1967. Physiology and molecular genetics of polyphosphate-accumulating mutants of *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* 1:141-147.
41. Sano, H., and M. E. Shuman, 1966. Polyphosphate-accumulating mutants and mutants of polyphosphatase in *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1:61-64.
42. Sano, H., C., and E. L. Sano, 1977. Factors in the experimental purple *Neurospora crassa* system. *Can. J. Microbiol.* 23:117-124.
43. Sano, H., H. M. Brown, H. G. Schlegel, 1968. Expression of metabolic mutants in purple bacteria. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2:147-152.
44. Sano, H., H. M. Brown, H. G. Schlegel, 1967. Expression of metabolic mutants in purple bacteria. III. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8:145-152.
45. Sano, H., and H. G. Schlegel, 1967. Expression of metabolic mutants in purple bacteria. III. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 7:252-260.
46. Sano, H., C., J. E. Fritsch, and H. W. Patterson, 1966. Mutants unable to synthesize polyphosphatase in *Neurospora crassa*. *Arch. Microbiol.* 43:149-157.
47. Sano, H., H. M. Brown, H. G. Schlegel, 1967. Polyphosphate inhibition by synthetic systems. *Can. J. Microbiol.* 13:203-207.
48. Sano, H., H. M. Brown, H. G. Schlegel, 1967. In vivo, intracellular management of intracellular activity. *Plant Physiol.* 42:716-724.

**S.S.- MANUSCRITO DEL ARTICULO "PYRUVATE
CARBOXYLASE FROM *Rhizobium etli*: MUTANT
CHARACTERIZATION, NUCLEOTIDE SEQUENCE, AND
PHYSIOLOGICAL ROLE".**

Pyruvate Carboxylase from *Rhizobium etli*: Mutant Characterization, Nucleotide Sequence, and Physiological Role

MICHAEL F. DUNN,¹ SERGIO ENCARNACION, GISELA ARAÚZA, M. CARMEN VARGAS, ARACELI DAVALOS, HUMBERTO TERALTA, YOLANDA MORA, and JAIME MORA

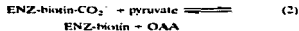
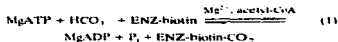
Departamento de Ecología Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

Received 20 May 1996; Accepted 13 August 1996

Pyruvate carboxylase (PVC), a biotin-dependent enzyme which catalyzes the conversion of pyruvate to oxaloacetate, was hypothesized to play an important anaplerotic role in the growth of *Rhizobium etli* during serial subcultures in minimal media containing succinate (S, Encarnación, de, Dunn, R. Williams, and J. Mora, J. Bacteriol. 177:3088-3094, 1995). *R. etli* and *R. tropici* *pyc1*:Tn5-mutants were selected for their inability to grow in minimal medium with pyruvate as a sole carbon source. During serial subcultures in minimal medium with succinate, the *R. etli* parent and *pyc1* mutant strains exhibited similar decreases in growth rate with each subculture. Supplementation of the medium with biotin prevented the growth decrease of the parent but not the mutant strain, indicating that PVC was necessary for the growth of *R. etli* under these conditions. To *in vivo* probe the extent of growth abnormality in subsequent generations of biotin supplementation, the symbiotic phenotypes of the *pyc1* mutants from both species were similar to those of the parent strains. The *R. etli* *pyc1* was cloned, sequenced, and found to encode a 124-kDa protein of 1,154 amino acids. The deduced amino acid sequence is highly homologous to other PVC sequences, and the catalytic domains involved in carboxylation, pyruvate binding, and biotinylation are conserved. The sequence and biochemical data show that the *R. etli* *pyc1* is a member of the α_2 homotrimeric, acetyl-coenzyme A-activated class of PVCs.

The biotin-dependent enzyme pyruvate carboxylase (PVC) (pyruvate:CO₂ ligase [ADP forming] [EC 6.4.1.1]) plays an important anaplerotic role in many organisms by catalyzing the carboxylation of pyruvate to form oxaloacetate (OAA), which is used to replenish tricarboxylic acid cycle intermediates used for energy generation and biosynthesis (for reviews, see references 4 and 54). In bacteria, anaplerotic CO₂ fixation is critical for the maintenance of the OAA pool during growth on compounds that are utilized via pyruvate (1, 28). Although PVC fulfills this function in many prokaryotes (1, 13, 46, 50, 68), eukaryotic bacteria as well as some other groups convert phosphoenolpyruvate (PEP) to OAA in the reaction catalyzed by PEP carboxylase (PCC) (10, 37). These two pathways for OAA synthesis are not mutually exclusive, since some bacteria produce both PVC and PCC (18, 28, 38, 45, 55).

In eukaryotes and some prokaryotes (e.g., a thermophilic *Bacillus* strain [53] and *Rhizobacter capsulatus* [39]), the P₁C holoenzyme is an α_2 homotrimeric complex of 115- to 130-kDa subunits (4). Each subunit polypeptide contains three domains that work in concert to catalyze the overall reaction, which occurs as the sum of the two half-reactions shown below, where ENZ represents the enzyme.



In reaction 1, the ATP-dependent biotin carboxylase domain carboxylates a biotin prosthetic group linked to a specific histidine residue in the biotin carboxyl carrier protein (BCCP) domain. Acetyl coenzyme A (acetyl-CoA) activates reaction 1 by increasing the rate of bicarbonate-dependent ATP cleavage. In reaction 2, the BCCP domain donates the CO₂ to pyruvate in a reaction catalyzed by the transcarboxylase domain (4).

The P₁C holoenzymes from *Pseudomonas citreus* (16) and *Azotobacter vinelandii* are exceptional in having an α_2 structure in which the α subunit (65 kDa) contains the catalytic domains (12, 26, 55). In contrast to the α_2 P₁Cs, all of which require or are activated by acetyl-CoA (13, 39, 42), the α_1 P₁Cs are fully active in the absence of this effector (12, 56). Although bacterial P₁Cs from both structural classes have been studied at the biochemical and physiological levels (12, 13, 26, 38, 39, 49, 55, 60), little genetic characterization has been done and only one nucleotide sequence for a putative prokaryotic P₁C has been obtained (57).

Previous results from this laboratory led us to hypothesize that P₁C plays an important role in determining if strains of *Rhizobium etli* and *R. tropici* display an aerobic or fermentative metabolism in vitro (17, 18). We showed that *R. etli* CE3 develops a fermentative metabolism, with a concomitant decrease in growth rate, during serial subcultures in minimal medium (MM) containing succinate as a sole carbon source. The fermentative metabolism was prevented when the medium was supplemented with biotin or thiamine. The presence of either of these vitamins increased the activities of several carbon-metabolic enzymes, most notably P₁C and pyruvate and oxoglutarate dehydrogenases, during subcultivation. Although the activities of all three enzymes were markedly increased with either supplement, biotin stimulated P₁C to a greater

¹ Corresponding author. Mailing address: Departamento de Ecología Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 565-A, Cuernavaca, Morelos, México; Phone: (731) 130044; Fax: (731) 170044; Electronic mail address: mdunn@cin.unam.mx.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Bacterial characteristics	Reference or source
R. cell strains		
CE3	Derivative of wild-type strain CFN42, Sp ^r NaI ^s Suc ^r Glc ^r Pyr ^r	7
CE3 <i>pyr</i> ⁻ Tn5-mob, Sp ^r NaI ^s Suc ^r Glc ^r Pyr ^r		This study
R. troglis strains		
CFN290	Wild-type strain, Sp ^r NaI ^s Suc ^r Glc ^r Pyr ^r	30
2-176	CFN290 <i>pyr</i> ⁻ Tn5-mob, Sp ^r NaI ^s Km ^r Suc ^r Glc ^r Pyr ^r	This study
E. coli strains		
337-7	294 <i>pyr</i> ⁻ mobilizing strain for Tn5	56
DH5 α	recA1 <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> ^{ΔM15}	Bethesda Research Laboratories
HB101	from strain 12-53; <i>lacI</i> ^q pLA1R1 genomic library	Laboratory stock
Plasmids		
pLA1R1	Broad-host-range cloning vector, Tc ^r	21
pS159011	pBR323 Tn5-mob, Ap ^r Cm ^r Km ^r	36
pBR323	Helper plasmid, Km ^r	20
pBluescript II SK (-)	Cloning vector, Ap ^r	30
pPHD5 ⁺	pBluescript containing the Tn5-mob insertion and flanking regions	This study
pDGI1	pBluescript with an EcoRII fragment containing the Tn5-mob insertion	This study
pDGI-2	from strain 12-53	
p-176	EcoRII-BamHI subclone of pDGI1	This study
p-1	pBluescript with an EcoRII fragment containing the Tn5-mob insertion	This study
p-2	from strain 2-176	
p-176	EcoRII-BamHI subclone of p-2-176	This study
pPC1	pLA1R1 harboring 15.2 kb of R. cell genomic DNA containing <i>pyr</i> ⁻ Tc ^r	This study
pPC1	EcoRII deletion subclone of pPC containing R. cell <i>pyr</i> ⁻	This study

⁺ Suc, sucrose; Glc, glucose; Pyr, pyruvate; - , normal growth; 2, reduced growth; -, no growth.

degree than it did the dehydrogenases, whereas thiamine had the opposite effect. In contrast to R. cell, R. troglis CFN290 maintained high levels of these activities during subcultivation in unsupplemented MM and did not develop a fermentative metabolism (18). We chose to further test the effect of biotin supplementation on the growth of R. cell and to test our hypothesis that PVC was the major site at which biotin acts in promoting an aerobic metabolism in this species (15, 18). A corollary to this hypothesis is that R. troglis might maintain its growth in unsupplemented medium because it does not lose PVC activity under these conditions. Our approach, as reported here, was to inactivate the *pyr*⁻ gene in R. cell and R. troglis and characterize the free-living and symbiotic phenotypes of the mutants. To begin a comparative genetic and biochemical analysis of the two species, we also constructed, we cloned and sequenced the R. cell *pyr*⁻ and also report some characteristics of the enzyme.

† Preliminary reports of part of this work were presented previously [15, 17].

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions. Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *R. troglis* was grown either in PVC medium (18) or in MM (18) containing 0.1 μ M biotin and 0.1 μ M thiamine for each experiment. In preparative MM plates, carbon sources were added to a final concentration of 20 mM. *R. cell* was grown in MM containing 1.5% (indicated for Merck, Darmstadt) glycine for the growth of *R. troglis* strains in which carbon sources and media were uninduced and incubated as described previously (15). In synthetic rich, in the presence of 1-methylated biotin, 100 μ M succinate, 100 μ M containing 10% of 1-methylated biotin plus 10% of 100 μ M *pyr*⁻ was used and incubated for 18 h on a described previously (18) except that 1 liter of medium in a 2-liter flask was used. Strains of R. cell were grown in LB medium (51). Cultures of *R. troglis* *pyr*⁻ or R. cell were supplemented with antibiotics at the following concentrations: 100 μ M tetracycline, 200 μ M streptomycin, 200 μ M nalidixic acid, 20 μ M tetracycline, 10 μ M kanamycin, 10 μ M carbenicillin, 10 μ M.

Manipulation of *R. troglis* and subculture of *pyr*⁻ mutants. Cells were manipulated by standard methods using a 100 μ l pipet (Pipet 100) in the presence of 4 mM sodium acetate, 10% (v/v) glycerol in the spreading dilutions of 2.5 \times 10⁷ cells/ml onto PV medium containing spectinomycin or strep-

tomycin for strains CFN290 or CE3, respectively), nalidixic acid, and kanamycin. After incubation for 3 days at 30°C, colonies were picked onto MM containing succinate or pyruvate as a sole carbon source. Clones able to grow on succinate but unable to grow on pyruvate were selected and further characterized.

Isolation of the R. cell *pyr*⁻ gene. A genomic DNA bank (14) prepared from R. cell CE3 was mobilized to E. coli and screened 2,176 (Table 1), using pBR323 as a helper strain. Mutant colonies were incubated on PV medium for 24 h at 30°C, resuspended in 100 μ l NaCl, and spread onto MM with glucose or pyruvate as a sole carbon source and containing spectinomycin, nalidixic acid, and kanamycin. The colonies appearing on a MM-glucose plate after 3 days of incubation was purified by restreaking and used for further studies. The complementary plasmid isolated from this clone was designated pPC1 (Table 1). DNA manipulations. Routine DNA manipulations were performed by standard techniques (51). Synthetically labeled DNA substrates were prepared by standard procedures. Restriction DNA manipulations were performed using a Microgram 54 (Amersham International) and were performed as described previously (15). Indigestion plasmids from the *pyr*⁻ mutants were isolated and electrophoretically separated by the 1 kb ladder procedure (18). The DNA fragment containing the EcoRII insertion in R. troglis 2-176 (Table 1) was isolated by completely digesting genomic DNA with EcoRII, ligating the EcoRII fragments, and selecting carbonilium and kanamycin-resistant transformants of E. coli DH5 α by the identical method as described previously. The Tn5-mob insertion in R. cell 12-53 was cloned by a similar strategy except that parallel EcoRII digests of the genomic DNA were used so that the insertion site in several contiguous EcoRII fragments were cloned. This plasmid was designated pPHD5⁺. The EcoRII fragment containing the insertion was amplified and sequenced (18) (14). The EcoRII fragment containing the Tn5-mob insertion in p-2-176 and p-1 were subcloned as HindIII-EcoRII fragments where the HindIII site is within the Tn5-mob insertion and the EcoRII site is within the genomic DNA. HindIII-EcoRII fragments were ligated into the EcoRII site of pBluescript II SK (-) by using the EcoRII site of p-176 as a template. The nucleotide sequence of 180 bp by near the Tn5-mob insertion subcloned from R. troglis 2-176 (labeled as p-1) was determined by using an EcoRII primer and was 50% identical to a segment of the cloned R. cell *pyr*⁻ sequence. In correlating this information with the details of the sequenced portion from the Tn5-mob insertion in p-1, the probable site of the insertion was determined. The approximation is based on the assumption that the R. troglis *pyr*⁻ is similar in size to Suc⁻ (Disqueaux and Springer, 1987) and that the insertion was at the EcoRII site. The EcoRII site was localized by sequencing the 138-bp from pHEI-2 with a primer specific for the EcoRII site located near the breaker of the insertion. The DNA sequencing described above was performed by the Sanger's alkaline method (51). Double-stranded sequencing of the R. cell *pyr*⁻ was performed by Molecular Cloning, Manual 9 (Sambrook et al., 1989) using all appropriate BamHI-EcoRII sites. A 375-bp DNA sequencing system. Nucleotide and protein sequence homologies were made by using the BLAST program (23) via the National Institute for Health-

TABLE 2. Effect of culture carbon source and butyrate supplementation on PVC activity in *R. coli* CE3^a

Carbon source	Culture butyrate (mM) (ppm)	PVC activity (nmol/min/mg protein)
Succinate	0	6.2 ± 0.5 (11.3)
	0.1 (100)	9.2 ± 1.5 (16.8)
	0.1 (100) + 0.1 (100)	24.2 ± 6.5 (39.8)
	0.5	26.2 ± 4.7 (44.4)
	1.0	27.3 ± 2.8 (43.3)
	2.0	26.2 ± 2.6 (42.9)
Glucose	1.0	10.5 ± 1.6 (17.9)
	1.0	28.0 ± 3.3 (42.8)
Pyruvate	1.0	16.8 ± 2.3 (25.4)
	1.0	32.4 ± 2.8 (52.5)

^a Cells were grown for 16 h in MM containing the indicated carbon source at 100 mM with or without butyrate supplement as indicated. Activities are the means ± standard errors for values obtained in two to three replicate experiments. For each carbon source, values in parentheses are normalized to the means of cells cultured without added butyrate set at unity.

scopy. Information server. Multiple protein sequence alignments were made with Clustal W version 1.9 (6) at the Baker Centre of Medicine/Human Genome Centre server.

Enzyme and protein assays. For enzyme assays, cells grown for 3 days on PY plates containing the appropriate antibiotics were washed to free of viable PY and used to inoculate 100 ml of PY medium to an initial A_{600} of 0.05. Cultures were incubated at 37°C for 16 h with shaking at 200 rpm. The late-log-phase cells were harvested by centrifugation (500g × 5 min) and washed twice on 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.5% NaCl. The cells were resuspended in 5 ml of cell lysis buffer (10 mM potassium phosphate [pH 7.2], 5 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1 mM dithiothreitol, 0.7% glycerol) and lysed by sonication as described previously (10). To prepare protein extracts from cells grown in the presence of ³⁵S-methionine, the final portion of PVC activity was harvested and stored as described above, resuspended in 10 ml of cell lysis buffer per 5 fresh weights and sonicated in 10 1-min bursts using a MSE sonicator (Dunelm Scientific Ltd., London, United Kingdom) with a 1-min pulse at 70% of maximum power, with cooling of the sample to 5°C between bursts. Cell-free extracts were obtained by centrifugation at 10,000g × 5 min at 4°C in a Beckman GSW rotor. Enzyme assays were performed as described previously, with except that PVC activity was assayed in the presence of 20 mM acetate. Protein contents of culture biomass and cell lysates were determined as described previously (10).

Partial purification of PVC from *R. coli*. High activities of strain CE3 PVC (Table 1) were grown for 16 h in a total of 3 liters of MM-pyruvate 30 mM containing butyrate 100 mg/ml and streptomycin. Cell extracts were prepared as described above and proteins were precipitated at 4°C in the addition of solid (NH₄)₂SO₄. Following equilibration for 20 min at each final salt concentration, precipitates were collected by centrifugation at 10,000g × 10 min. The precipitate from the 40% w/v saturation fraction contained the majority of the PVC activity and was resuspended in 100 μl of 20 mM potassium phosphate [pH 7.2], 5 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 0.7% glycerol and dialyzed in a Sephadex G-25 column equilibrated in EQB. The dialyzed sample was chromatographed on a DEAE-cellulose column (16 × 14 cm) equilibrated in EQB and eluted at 1 ml/min. Following the elution of nonbinding proteins, the column was eluted with a linear 20 to 250 mM gradient of KCl in EQB over 150 min. Fractions containing PVC activity were pooled and precipitated with 10% (v/v) (NH₄)₂SO₄. The precipitate was centrifuged and resuspended in a small volume of 20 mM NaCl (unbuffered) and dialyzed in a G-25 column equilibrated in the dialysis buffer. The protein pellet was resuspended in a volume of 100 μl of the final PEP molecular weight (Bio-Rad) Corporation buffer. Cell-free extracts of *R. coli* grown in MM-pyruvate 30 mM with 100 mg/ml butyrate were pooled, precipitated and stored as described above. Before use in enzyme assays the precipitates were dialyzed into the same buffer and dialyzed against the same buffer. All purification steps were carried out at 4°C.

Detection of butyrate-containing proteins in Western blots. Immunoblotting and ³⁵S-labeling reactions. Proteins in cell extracts were separated on sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gels (12) and electrophoretically onto nitrocellulose for 1 h at 400 mA as described by Towbin et al. (20). HRP-conjugated anti-PVC antibody was used at a dilution of 1:1000. The HRP-conjugated secondary antibody (Dianova Co., Los Angeles) was used by the manufacturer but containing the protein biotinylated step as was our protein stan-

dards containing butyrate would bind the streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (Bio-Rad) were incubated with a pH 7.4 DakoLinker and Dylight 488 substrate (pH 7.4; Dako, Ely, Huntingdon, Cambs., U.K.). Protein bands were manually outlined prior to quantitation. Radioactivity in butyrate-containing proteins prepared from cultures grown in the presence of ³⁵S-methionine was quantified by excising the bands, incubating them in 5 ml of scintillation fluid (9), and counting in a scintillation counter. Portions of membrane excised from areas of the lanes not containing bound protein were included as background checks. Specific radioactivity was calculated by dividing the counts per minute obtained for a band by its counter counts (units of optical density [OD] multiplied by area [square millimeters]) obtained by scanning densitometry.

Isolation and immunoblotting analysis. Cells of *R. coli* strains CE3, Negro genome were surface sterilized and grown as described previously (13). Cultures of the *avr* mutants and their respective parent strains were grown to saturation on YG media containing the appropriate antibiotics (Table 1), washed once in 0.85% NaCl, and resuspended in an 0.10 M NaCl solution. One milliliter of this suspension was used to inoculate 3-day-old seedlings, and plants were maintained aseptically under greenhouse conditions. At 15, 18, 25, 32, 40, and 58 days postinoculation, plants were harvested and analyzed for PVC activity as described previously (13). Seed yields were determined at 130 days postinoculation. Nucleolar morphological occupancy was determined at 100 days postinoculation using whole homogenates on PY medium with or without the antibodies (Table 1) required to differentiate each strain.

Nucleotide sequence numbers. The nucleotide sequence data presented in this report are available under GenBank accession number U1439.

RESULTS

Physiological and biochemical characterization of the PVC from *R. coli* CE3. Because PVC activity in strain CE3 is significantly affected by growth conditions (17, 18), we examined the effects of culture carbon source and butyrate supplementation on the production of PVC in this strain (Table 2). In cells cultured in MM without added butyrate, PVC activities were 2.7-fold higher in pyruvate than in succinate, while glucose-grown cells had an intermediate level of activity. Supplementation of the media with 1 μg of butyrate per ml increased PVC activities, relative to unamplified media, 4.2-fold in succinate, 2.6-fold in glucose, and 2.5-fold in pyruvate. In cells grown in MM-streptomycin, a 100-fold increase in butyrate concentration was sufficient to increase PVC activity to near maximal levels (Table 2).

For use as a standard on Western blots, PVC was partially purified from *R. coli* CE3 by ion-exchange chromatography (14). On Western blots developed to detect biotinylated proteins, this preparation gave an intense band which migrated with an apparent molecular weight (MW) of 120 kDa (Fig. 1). In blots of extracts prepared from cells grown in MM-succinate



FIG. 1. Effect of culture carbon source and butyrate on the production of PVC-containing proteins in *R. coli* CE3. Biotinylating proteins were detected in the Western blot as described in Materials and Methods. Lane 1, biotinylated protein standards with molecular weights indicated; lane 2, extract purified from *R. coli* CE3 grown in MM-succinate 100 mg/ml butyrate; lane 3, extract from cells grown in MM-pyruvate 100 mg/ml butyrate without added butyrate. Lanes 1 and 2 were each loaded with 100 μg of total protein.

TABLE 3. Effect of assay reaction mixture composition on the activity of PFC from *R. celi*

Reaction mixture ^a	Activity (nmol P _i /min)	Relative rate
Standard	43.22	1.00
Standard + pyruvate	0.89	0.02
Standard + ATP	0.89	0.02
Standard + HCO ₃ ⁻	1.84	0.04
Standard + MgCl ₂	N/A ^b	0.00
Standard + acetyl-CoA	1.72	0.04
Standard + 2 μM acetyl-CoA	2.75	0.06
Standard + 5 μM acetyl-CoA	4.49	0.14
Standard + 20 μM acetyl-CoA ^c	44.03	1.00
Standard + 50 μM acetyl-CoA	43.73	1.00
Standard + 20 μM acetyl-CoA	4.22	0.10
Standard + 1 mM L-Asp	0.89	0.02
Standard + 5 mM L-Asp	4.22	0.10
Standard + 10 mM L-Asp	21.16	0.49
Standard + 10 mM 2-OG	49.89	1.00
Standard + 10 mM L-Glu	65.72	1.00

^a The standard reaction mixture contained (per 0.050 ml): *M. 2*-thiothiazolone, 2.0 μM; PFC, 20 μg; ATP, 10 mM; MgCl₂, 10 mM; ATP, 2.5 mM; NaHCO₃, 20 mM; NaH₂PO₄, 2 mM; acetyl-CoA, 20 μM; malate dehydrogenase, 0.5 U; and pyruvate, 10 mM. Substrates and assays of organic acid stocks used in the reactions were prepared as 50 mM 100:50:50 buffer (pH 7.2).

^b One unit of activity catalyzes the reduction of 1 μmol of NADPH per min. The specific activity of the enzyme preparations used in all assays was 2,370 nmol/mg of protein.

^c N/A, no activity detected.

^d Note that this reaction mixture is identical to that used in the standard assay.

without added biotin. PFC accounted for greater than 99% of the total biotin-containing protein detected in a 51-kDa protein (see below) comprising the remainder of the biotinylated protein in the sample (Fig. 1). In extracts obtained from cells cultured in the presence of biotin, the quantity of PFC protein increased 5.3-fold (Fig. 1), an fairly close agreement with the 4.2-fold increase in enzymatic activity observed under the same conditions (Table 2). Two additional biotin-containing proteins with MWs of 51,000 and 14,000 were induced to easily detectable levels when cells were grown in biotin-supplemented medium (Fig. 1). By scanning densitometry, PFC and the 51- and 14-kDa proteins accounted for 79, 19.4, and 1.6%, respectively, of the total biotinylated protein in the sample.

When strain CE3 was grown in MM-succinate supplemented with [¹⁴C] biotin, the quantity of biotin in the media was reduced 50% after 18 h of growth. On Western blots prepared from these cultures, specific radioactivities for PFC and the 51- and 14-kDa bands were in the range of 800 to 6,000 cpm/OD × mm², while background levels in the same blots were prepared as described in Materials and Methods, were less than 1% of these values.

PFC-PVC was overproduced when strain CE3 containing plasmid-borne copies of the *R. celi* *pac* (pFC1; Table 1) was grown in biotin-containing media. The enzyme was purified 12-fold to a specific activity of 2,370 nmol/min/mg of protein. The activity of the enzyme was substantially dependent on the presence of substrates (pyruvate, MgATP, and bicarbonate) in the reaction mixture. In the absence of acetyl-CoA, the enzyme retained 4% of its activity relative to that measured in the standard assay (Table 3). From these data, we calculate that the acetyl-CoA concentration necessary for half-maximal activation of the enzyme is 8.8 μM. The enzyme was inhibited 50% by 2.0 mM L-isortipate but was not inhibited by 2-oxoglutarate or L-glutamate (Table 3). When CE3 pFC1 was grown in MM-succinate lacking biotin, virtually all of the PFC produced was present in the apo form (14).

Genetic and phenotypic characterization of the *M. 2* biotin mutants. Putative *pac* mutants were selected from populations of Tn5-mob-containing clones on the basis of their inability to grow on solid MM-pyruvate. Enzyme assays showed that two clones (of 617 screened) with this phenotype isolated from *R. celi* CFN290 were both PFC negative, and one strain 2-176 (Table 1), was used in further studies. For *R. celi* CE3, 6,500 clones were screened and 3 having a pyruvate-negative phenotype were isolated. Of these three clones, only strain 12-53 (Table 1) lacked PFC activity.

Hybridization of a Tn5-mob probe against *Eco*RI fragments of genomic DNA prepared from the *pac* mutants and the parent strains showed that each mutant contained a single Tn5-mob insertion, and no hybridization was observed against DNA isolated from the parent strains. The hybridizing band for mutant 12-53 was approximately 62 kb, while that for mutant 2-176 was 8.0 kb. By correlating the size of the hybridizing fragment from *R. celi* 12-53 with the restriction enzyme map of pHPDg (Table 1) (47), we found that the DNA surrounding the insertion had the same restriction sites as the cloned *R. celi* *pac* (47) and that the insertion site was in a fragment corresponding to the 0.86-kb *Eco*RI fragment of pFC (see Fig. 6a). When indigenous plasmids from the *pac* mutants were separated on Eckhardt gels and hybridized with Tn5-mob, no hybridization was observed. As a positive control, plasmids isolated from an *R. celi* mutant with a Tn5-mob insertion in the *h* plasmid (61) were run in the same gel and gave a strong hybridization signal (19).

The Tn5-mob-containing DNA fragments cloned from both mutants were analyzed by partial sequencing. The insertion site in *R. celi* 2-176 was approximated as described in Materials and Methods and is estimated to occur approximately midway in the *pac* open reading frame (15). The insertion site by hybridization is very near the 5' end of the gene (following nucleotide 17) and in the same *Eco*RI fragment created by hybridization and restriction enzyme mapping.

Genotypes for the mutant and parent strains in MM-pyruvate (10 mM) show that other mutants of either species were unable to grow on this carbon source except when it was supplemented with 1 mM L-aspartate (Fig. 2A). In MM-glucose, the *R. celi* and *R. celi* *pac* mutants grew slowly and gave

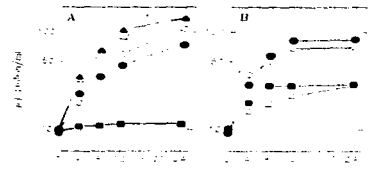


Fig. 2. Growth of *M. 2* biotin wild-type and *pac* mutant strains in MM-pyruvate (10 mM) with and without 1 mM L-aspartate (Asp) and in MM-glucose (10 mM) with and without 1 mM L-aspartate. *R. celi* (filled circles), *R. celi pac* mutant (open triangles), *R. celi pac* mutant 12-53 (open squares), and *M. 2* (open circles). Growth is significantly enhanced in the presence of 1 mM L-aspartate. Culture conditions: 2,370 cpm/OD × mm² open triangles, 2,370 cpm/OD × mm².

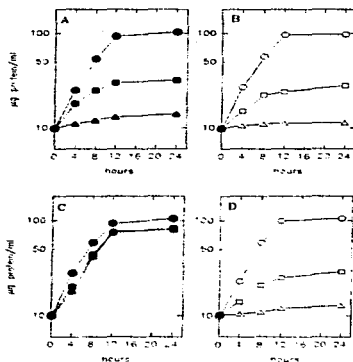


FIG. 3. Growth of *R. celi* parent strain CE3 (closed symbols) and *pvc* mutant 12-53 (open symbols) during subculture assays in MM containing 30 mM succinate with or without 1 μ g of biotin per ml. (A) Strain CE3 without biotin; (B) strain 12-53 without biotin; (C) strain CE3 with biotin; (D) strain 12-53 with biotin. Symbols: circles, first subculture; squares, second subculture; triangles, third subculture.

final cell yields of 41 and 34% in comparison with the respective parent strains (Fig. 2B). Supplementation of the pyruvate or glucose minimal medium with biotin (1 μ g/ml) or thiamine (10 μ g/ml) did not allow growth of the mutants (19).

During aeral subcultivation in MM containing 10 or 30 mM succinate without added biotin, the *R. proper* parent strain

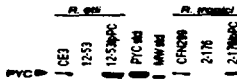


Fig. 4. Western blot analysis of PVC produced by the *Ribobium pro* mutants and complemented strains. Cells were grown in MM biotin-supplemented media as indicated in Materials and Methods. The presence of PVC and the 116-kDa protein standard are indicated. Sample lanes were loaded with 12.5 μ g of total protein.

and *pvc* mutant showed no differences in growth rate or final cell yield (19). In MM containing 10 (19) or 30 mM (Fig. 3A and B) succinate without added biotin, *R. celi pvc* mutant 12-53 decreased its growth rate in a manner similar to that of the parent strain. In biotin-supplemented MM containing 10 mM succinate, both the mutant and the parent strain grew well, with the mutant having only a slightly lower final cell yield in the third subculture (19). Under these conditions, thiamine supplementation of the MM also allowed good growth of strain 12-53 in subcultures (19). A physiological effect of the *pvc* mutation in *R. celi* was much more apparent during subculturing in MM containing 30 mM succinate, in which case addition of biotin to the medium allowed continuous growth of the parent strain (Fig. 3C) but not of the mutant (Fig. 3D). The effect of thiamine supplementation on the growth of the mutant has not been determined under these conditions.

Enzyme activities in the *pvc* mutants. Preliminary PVC activity assays of cell extracts detected a low to intermediate level of apparent PVC activity in preparations from both *pvc* mutants. We therefore assayed PVC in assay reaction mixtures with and without ATP in order to differentiate true, ATP-dependent PVC activity from nonspecific background activity (Table 4). The apparent PVC activity detected in the mutant strains is contrast to that of the parent strains, was not significantly decreased when ATP was excluded from the assays of cell lysates prepared from cells grown in PW or MM-succinate (Table 4), indicating that this apparent PVC activity is actually due to an ATP-independent enzyme and not to PVC. The lack of detectable, biotinylated PVC protein on Western blots of proteins prepared from the mutants (Fig. 4) supports this conclusion. The activities of several additional carbon-metabolic enzymes were assayed and did not differ significantly in the mutants and their respective parent strains (Table 5).

TABLE 4. PVC-specific activities in *Ribobium* wild-type and *pvc* mutant strains

Strain	Mean (mmol units of protein) \pm SE*					
	PW (rich) medium			MM-succinate (10 mM) + biotin (1 μ g/ml)		
	Assay + ATP	Assay - ATP	ATP-independent activity	Assay + ATP	Assay - ATP	ATP-independent activity
<i>R. celi</i>						
CE3	43.5 \pm 1.7	13.2 \pm 0.8	30.3	26.6 \pm 2.0	4.5 \pm 0.5	23.9
12-53	9.9 \pm 1.6	13.0 \pm 1.6	NA ^b	0.95 \pm 0.95	3.1 \pm 3.4	NA
<i>R. proper</i>						
CFN299	57.1 \pm 1.3	22.0 \pm 1.6	35.1	55.2 \pm 1.3	15.6 \pm 2.0	39.6
2-17b	9.8 \pm 0.7	7.3 \pm 0.9	2.5	11.8 \pm 2.6	13.0 \pm 0.5	NA

* Assay + ATP is the standard PVC assay (see Table 3); assay - ATP (lack of ATP; ATP-independent activity) is the difference between these two values.

^b NA, no activity detected.

TABLE 5. Activities of selected carbon-metabolic enzymes in the parent and *pyc* mutant strains^a

Enzyme	Activities (total amount of product)			
	<i>R. ell</i>		<i>R. trypsi</i>	
	CB-3	12-53	CFN-29	2-176
PDH	20 ± 8	24 ± 2	21 ± 4	20 ± 3
MDH	24 ± 2	24 ± 2	24 ± 13	58 ± 9
MDH	2,142 ± 645	2,421 ± 861	3,516 ± 631	4,108 ± 845
PCK	108 ± 2	170 ± 20	53 ± 5	168 ± 20
PCK	130 ± 11	122 ± 15	161 ± 16	168 ± 28
PCK	108 ± 2	170 ± 20	53 ± 5	168 ± 20
ME (NAD ⁺)	154 ± 21	144 ± 20	103 ± 2	20 ± 2
ME (NADP ⁺)	68 ± 43	97 ± 24	97 ± 7	86 ± 3

^aDuplicate *Py* cultures were harvested at 16 h and lysates prepared from each were assayed in duplicate. Results are the means (standard errors) from six separate experiments. Abbreviations: PDH, pyruvate dehydrogenase (EC 1.2.2.3); MDH, malate dehydrogenase (EC 1.1.1.40); PCK, phosphoenolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31); ME, malate enzyme (assayed with NAD⁺ [EC 1.1.1.40] or NADP⁺ [EC 1.1.1.41] as indicated).

Cloning and characterization of the *PYC* gene from *R. ell*. Plasmid pPC (Table 1) was isolated from an *R. ell* genomic DNA bank on the basis of its ability to restore the growth phenotype of *R. trypsi* 2-176. As expected, the presence of pPC in either *pyc* mutant 2-176 or *pyc* mutant 12-53 restored the normal growth phenotype in MM-pyruvate (Fig. 5). In MM-succinate (10 mM) supplemented with biotin, the level of ATP-dependent *PYC* activity produced by the complemented *R. trypsi* mutant was 84 U/mg of protein, or about twofold higher than that of the parent strain (Table 4). When pPC was introduced into the *ell* mutant, the ATP-dependent *PYC* activity was 182 U/mg of protein, a 7.6-fold increase over that produced by the parent strain (Table 4). In Western blots of cell extracts prepared from the complemented strains, a *PYC* band, absent in the mutants, was restored (Fig. 4). Densitometric quantitation of the *PYC* protein produced by the complemented mutants relative to the parent strains (Fig. 4) revealed 3.2- and 6.8-fold increases for strains 2-176 pPC and 12-53 pPC, respectively. These values are in fairly close agreement with the increase in *PYC* activity determined in the enzyme assays.

The growth phenotypes and *PYC* activities of the *R. trypsi* mutant containing subclones of pPC are shown in Fig. 6. Partial nucleotide sequencing of *Eco*RI fragments derived from subclone pPC1 indicated that the putative *PYC*-coding region was located in the 2' half of the fragment, and subsequent sequencing of this region localized the *pyc* open reading frame as shown in Fig. 6b. The 3,462-bp sequence of the *R. ell* *pyc* is predicted to encode a protein of 1,154 amino acids with an MW of 126,008, which is similar to the subunit MW of 120,000 estimated in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (Fig. 1). The putative initiation codon (ATG) is preceded by a ribosomal binding site (GGAGG) [25] 9 nucleotides upstream.

Nucleotide sequence similarity comparisons showed that the *R. ell* *pyc* had significant homology only to *pyc* or other biotin carboxylase sequences in the databases (14). The deduced amino acid sequence of the *R. ell* *pyc* is 44% identical to that of the putative *Mycobacterium tuberculosis* *PYC* and 47% identical to sequences of biotin carboxylase *PYC* (Fig. 7). The *S. typhimurium* is 77% identical to the first 20 amino acid residues of the *R. capsulatus* *PYC* recently determined by amino

acid sequencing (39) (Fig. 7). The *R. ell* *PYC* sequence (1,154 amino acids) is intermediate in length between those of yeast and human *PYC*'s (both containing 1,178 amino acids including the leader sequence) and the putative *M. tuberculosis* (1,124 residues) *PYC* (Fig. 7 and 8).

A comparison of substrate-binding-site motifs in the *R. ell* sequence (Fig. 7) with those found in related proteins is shown schematically in Fig. 8. In the amino-terminal segment of the *R. ell* *PYC*, the hexapeptide GGCGGG matches the GGCGG (R/K)G sequence (found in all biotin-containing enzymes (67) and is believed to function as ATP binding (22, 46) (Fig. 7) and H). A variant of this motif also occurs in carboxylphosphate synthetase, which shares some mechanistic properties with *PYC* (4) but does not require a biotin cofactor (29) (Fig. 8). A Cys residue (Cys-237 [Fig. 7]) is conserved 62 residues downstream of the ultimate Gly residue in this site and is believed to be involved in the CO₂ fixation reaction catalyzed by biotin-dependent carboxylases (32) (Fig. 7 and 8). A second region proposed to be involved in ATP binding is present in carboxylphosphate synthetase and biotin-dependent carboxylases (24) and is also conserved in the *R. ell* sequence (Fig. 7). In the intermediate region of the protein, a putative pyruvate-binding motif, FLYEDPWER, has significant homology with those found in the transcarboxylase domain of *Mycobacterium*, yeast, and human *PYC*'s (Fig. 7) as well as in the *Propionibacterium shermanii* 56 subunit of transcarboxylase (Fig. 8). Tryptophan fluorescence studies with transcarboxylase indicate that the Trp residue present in this motif is involved in pyruvate binding (20). In the carboxy-terminal segment of the enzyme, a putative biotin-binding site (AMKMG) is identical to those found in the other *PYC*'s (Fig. 7) as well as the BCCP domains of other biotin-dependent enzymes (68). Beginning 290 residues upstream of the biotin-binding site in all of the *PYC* sequences (Fig. 7) and in the α subunit of propionyl-CoA carboxylase (Fig. 8), a PKPRA sequence occurs; this sequence is proposed to be involved in the recognition and biotinylation of the biotin carboxylases (32).

Subcellular localization of the *pyc* mutants in *homo* plants. All and *R. trypsi* *pyc* strains were statistically indistinguishable from those of the parent strains by the criteria of nitrogen

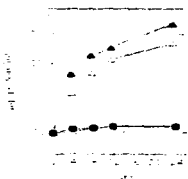


FIG. 5. Phenotypic complementation of the *Rhodospirillum rubrum* *pyc* mutants for growth in MM-pyruvate (10 mM) when complemented with the cloned *pyc* gene (pPC) from *R. ell*. Strains include wild-type *R. ell* *pyc* mutant 12-53 (open circles), 2-176 pPC (open squares), *R. trypsi* *pyc* mutant 2-176 (filled circles), and 12-53 pPC (filled squares). Growth curves for the mutant strains are reproduced from Fig. 2A.

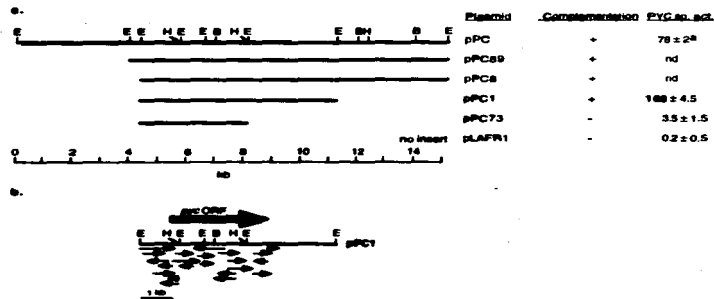


FIG. 1. (a) Subcloning of the *R. rubi* *pyr* gene. Subclones were generated by deleting *Eco*RI fragments from plasmid pPC (Table 1). Complementation refers to the restoration of the wild-type growth phenotype on an MM-pyruvate. PFC specific activities (nanomoles per minute per milligram of protein) were determined in 12-h PY (10% pPC) or MM-succinate plus biotin (all others) cultures with cell extracts from strain 2-176 containing the indicated plasmid. E, *Eco*RI; B, *Bam*HI; H, *Hae*III; nd, not detected. (b) Sequencing strategy and the location of the *R. rubi* *pyr* open reading frame (ORF) in pPC1.

biotin activity, number of nodules formed, and nodule and plant dry weights. Final seed yields of plants inoculated with the mutant or parent strains were indistinguishable (40). Microorganisms isolated from nodules at all time points retained the expected antibiotic resistances.

DISCUSSION

Biotin stimulates the growth of a variety of fast-growing *Mycobacterium* species under laboratory conditions (19, 38, 60), and the enzyme activities affected by this vitamin have been investigated in *R. rubi* and *R. tropici* (18). We now extend these observations by showing that in biotin-supplemented MM, *R. rubi* CE3 produces three biotinylated polypeptides, the 120-kDa PFC subunit and the 51- and 14-kDa proteins, neither of which we have identified (Fig. 1). The unidentified biotin proteins were also produced by *pyr* mutant strain 12-53 (14), indicating that they are not degradation products of PFC. Extracts of *R. tropici* contained biotinylated proteins with sizes very similar to those produced by *R. rubi* (14), and because the *pyr* mutant 2-176 lacked only a 120-kDa protein produced by the wild-type strain (Fig. 4), this protein probably represents the PFC subunit in this species. Thus, it appears that the PFCs of *R. rubi* and *R. tropici* are similar in size. The results of our hybridization studies indicate that the *pyr* genes in these species are not borne on any of their indigenous plasmids but are instead chromosomal.

When strain CE3 was grown in MM-succinate without added biotin, PFC was easily detected in Western blots but at a level of less than 20% of that produced in biotin-containing

cultures (Fig. 1). Our data show that strain CE3 can effectively take up exogenously supplied biotin from the medium and incorporate it into PFC and the other biotin-containing proteins. However, under some conditions in which biotin is limiting, this strain appears to produce insufficient biotin to fully biotinylate PFC (Fig. 1) (19). It is important to note several lines of evidence suggesting that *R. rubi* CE3 is not a biotin autotroph. (i) The growth arrest observed when strain CE3 is subcultured in MM without added biotin occurs only after two successive subcultures (18, 19), whereas biotin autotrophs show no or very little growth when inoculated into medium lacking the vitamin (24, 59). (ii) *Rhizobium meliloti* 1021, like *R. rubi* CE3, decreases its growth rate in successive MM subcultures in the absence of biotin (18, 19). Nevertheless, strain 1021 is a biotin prototroph from which genetically defined biotin autotrophs have been isolated. These autotrophs do not grow in minimal media lacking biotin (59). (iii) The activity of acetyl-CoA carboxylase, a biotin-requiring enzyme, is maintained in *R. rubi* during subculturing in MM lacking biotin (18), suggesting that sufficient biotin is being produced to maintain the enzyme in its active (biotinylated) form. (iv) Pimelec acid (10 μ g/ml), the earliest known precursor in the biotin biosynthetic pathway (24), can substitute for biotin in allowing strain CE3 to grow in subcultures (14). This finding suggests that *R. rubi* is capable of synthesizing biotin *de novo*. Collectively, these data indicate that *R. rubi* CE3 is a biotin prototroph which regulates biotin synthesis (or the efficiency of its ligation to biotin-requiring carboxylases) during growth on succinate. We note parenthetically that thiamine, which can substitute for

allowing some growth of the mutants. In contrast, *psc* mutants of *R. solisoli* do not grow on glucose probably because PFC is not produced by this species (13). The *Rhizobium* mutants failed to grow on pyruvate (Fig. 2A) as demonstrated for *psc* mutants isolated from other species (13, 46, 68). Our failure to detect PEP synthase, or pyruvate or orthophosphate dikinase (either of which can convert pyruvate to PEP [14]), in *R. coli* and *R. tropici* indicates that neither of these enzymes (via PEP) can occur and prevents the growth of the mutants on this carbon source. We believe that the *Rhizobium* mutants are able to grow in pyruvate media supplemented with aspartate (Fig. 2A) because OAA is produced by the action of aspartate aminotransferase (54), for which there is considerable activity in *R. coli* and *R. tropici* (14). The production of OAA catalyzed by malate dehydrogenase appears to be possible in the *psc* mutants (Table 5), although it has been proposed that during growth on C₂ or C₃ substrates, this reaction produces insufficient OAA for both energy generation (via the tricarboxylic acid cycle) and biosynthesis. Consequently, the anaplerotic activity of PFC is necessary for growth under these conditions (13). Finally, the production of C₂ metabolites via the glyoxylate shunt is unlikely to occur in the *psc* mutants, since the enzymes required for this pathway in *R. coli* C23 (14) and *R. tropici* CF2209 (27) are present at significant levels only during growth in acetate-containing media, as previously documented for other bacterial systems (43).

Our hypothesis that PFC is the enzyme upon which biotin acts in preventing the fermentative metabolism in *R. coli* was based on results of experiments using MM containing 10 mM succinate (18). Under these conditions, biotin promoted almost equally good growth of the *psc* mutant and parent strains in subsultures, suggesting that a biotin-dependent system, distinct from PFC, is the site for biotin action in the mutant. We do not know, however, if this alternative biotin-dependent system is also the site at which biotin acts in the mutant, or whether it merely compensates for a lack of PFC in the mutant. PFC does appear to have a clear role in allowing *R. coli* (but not *R. tropici*) to grow continuously in serial subcultures in media containing 30 mM succinate (Fig. 3). This conclusion is based on the fact that biotin supplementation was not able to restore the growth of the *R. coli* mutant during subculturing, indicating that PFC is responsible for the growth-maintaining effect of biotin under these conditions. Although a requirement for PFC during growth on succinate appears to be inconsistent with the generally accepted metabolic role for this enzyme (see above), we speculate that growth in higher concentrations of succinate might cause a greater flux via malic enzyme, of succinate-derived carbon to pyruvate rather than to OAA (via malate) for energy generation. Thus, PFC and biotin could be essential in generating sufficient OAA for biosynthetic and energy-generating purposes. This hypothesis remains to be tested.

The deduced amino acid sequence of the *R. coli psc* has significant similarity to the PFC sequences in a diverse group of organisms (Fig. 7) which contains a biotin carboxylase domain in its N-terminal region, a BCCP domain in its C-terminal region, and a transcarboxylase domain, with a binding site specific for the BCCP region (Fig. 8). The estimated MW of the protein as determined by SDS-PAGE or as predicted from the deduced amino acid sequence of the cloned gene is similar to that reported (Fig. 8). This finding extends the observation that there is a strong evolutionary conservation among biotin-containing carboxylases (29, 52) and a prokaryotic consensus sequence (29, 52) which indicate that the putative *M. tuberculosis psc* (57) does indeed encode an α PFC.

Putative *psc* mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii (50) and *R. leguminosarum* bv. viciae (43) were reported to be symbiotically proficient on clover and pea plants, respectively. The findings from our in planta experiments are consistent with these data and support the generally accepted proposal that the major carbon sources used by bacteroids are dicarboxylic acid such as malate or succinate (58). Interestingly, by using very low inoculum densities, the importance of biotin in the infective capability of *R. meliloti* was recently demonstrated, although the biochemical basis for this effect was not determined (59). Because the activity of PFC in *R. coli* is greatly affected by biotin, it would be of interest to determine if our mutant strain is altered in competitiveness or growth in the bean rhizosphere.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Patricia Babin for technical assistance in DNA sequencing, Armando Rivera and Antonia Jimenez for performing the plant experiments, and Gabriela Cuatrecasas for assistance with digitized images. For suggestions on succinate analysis, we acknowledge Miguel Cavalho; for helpful comments on the manuscript, we thank Alberto Mendoza and the two anonymous reviewers. We gratefully acknowledge the superior work done by Brigitte Gormier of Meadiene in the final nucleotide sequence determinations.

This work was supported by a grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia, Mexico CONACYT no. N9114-0984, and by DGAPA-UNAM no. IN2023/85 and IN2130/85.

REFERENCES

- Mason, B. M., and P. J. Wain, 1978. Activities of anaplerotic enzymes and acetyl coenzyme A carboxylase in biotin-deficient *Bacillus pasteurii*. *J. Gen. Microbiol.* 100:203-209.
- Muehl, R. W., G. W. Gish, W. Miller, R. W. Myers, and J. L. Lipman, 1981. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 157:131-140.
- Arpa, R., A. L. Glenn, G. A. McKee, and M. J. Bannister, 1986. Properties of several mutants of *Rhizobium leguminosarum* which are defective in the synthesis of biotin and other biotin-dependent metabolites. *J. Bacteriol.* 157:2747-2749.
- Amid, R. S., 1983. The structure and the mechanism of action of pyruvate carboxylase. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2:7231-249.
- Amid, R. S., 1984. Regulation of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 116:176-196.
- Brown, D. S., M. S. Johnson, and S. M. Stone, 1985. Biotin synthesis from *Escherichia coli*: an investigation of the low molecular weight and protein components of biotin synthase. *J. Bacteriol.* 156:1915-1918.
- Brown, S. B., Beverly, and J. Moran, 1985. Introduction of the biotin gene into *Escherichia coli* for the production of biotin. *Gene* 40:149-155.
- Black, L., and J. Moran, 1985. Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* via the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J. Bacteriol.* 170:1760-1765.
- Bren, G. A., 1984. A simple efficient liquid centrifuge for counting aquatic organisms in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.* 132:265.
- Brodeur, G. A., and L. B. Sanderson, 1979. Biochemistry of phosphoenolpyruvate carboxylase in the extremophile thermophile *Thermotoga maritima*. *J. Bacteriol.* 122:1211-1213.
- Crabtree, M. S., S. Encarnacion, A. Ledin, V. Mager, and J. Moran, 1986. Genetic and physical characterization of the *Escherichia coli* biotin gene unable to synthesize poly-biotin derivatives. *J. Bacteriol.* 170:1614-1619.
- Cohen, B. E., J. C. Lane, H. Bergant, and M. R. Evers, 1979. Characterization of pyruvate carboxylase from *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* 254:9215-9220.
- Dierckx, M., and E. Fresse, 1973. Role of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxylase, and malate dehydrogenase during growth and sporulation of *Helicobacter*. *J. Biol. Chem.* 248:6927-6933.
- Dunn, M. F., and J. Moran, 1983. Biochemical and genetic characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase and malate dehydrogenase from *Thermotoga maritima*. *J. Biol. Chem.* 258:1076-1081.
- Dunn, M. F., and J. Moran, 1985. Biochemical and genetic characterization of pyruvate carboxylase and aspartate aminotransferase from *Thermotoga maritima*. *J. Biol. Chem.* 260:1076-1081.
- Edwards, E. P., 1978. A rapid method for the determination of plasma digoxin levels by immunochemical means. *Am. J. Clin. Pathol.* 67:103-107.
- Encarnacion, S., M. Dixon, S. Ledin, M. C. Bergant, H. Bergant, and J. Moran, 1986. Alternative metabolic pathways for the synthesis of biotin. In: *Biotin* (Ed. by M. S. Johnson, S. A. Provenza, A. L. Robinson, and W. L. Newton), I. Nitrogen

- bioactive fundamentals and applications. Elsevier Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1984.
18. Eisenberger, M., M. Shum, G. Williams, and J. Mann. 1984. Fermentative and anaerobic cellulose hydrolysis. *Microbiol.* 677:305-306.
 19. Eisenberger, M., and M. C. Vergara. Unpublished results.
 20. Uppigeri, D. H., and D. H. Stumm. 1978. Purification of an oxygen-activating derivative of hydrogenase from *Desulfovibrio*. Ph.D. dissertation, University of Illinois, Urbana.
 21. Eisenberger, M., L. E. Le, J. G. Quinn, G. J. Giamberini, and F. M. Amdur. 1982. Construction of a second host range cloning vector and its use in the genetic analysis of bacterial mutants. *Gene* 88:289-296.
 22. Frey, D. C., K. A. Rader, and B. A. Simmons. 1976. ATP-binding site of adenylate kinase: mechanistic implications of its homology with ferredoxin (L2). *J. Biol. Chem.* 251:4097-4111.
 23. Linton, F. H. 1981. Case-control gene electrophoresis. p. 425-441. *In* M. P. Doolittle (ed.), *Cloning to protein purification*. Academic Press, Inc., New York.
 24. Eisenberger, M., L. E. Le, R. G. Smith, C. Latham, S. Burnard, M. Shuman, D. Howard, T. Blinn, R. Kammeyer, and W. Kammeyer. 1980. Cloning and characterization of the *Desulfovibrio* genes encoding the two forms of pyruvate iron hydrogenase. *Gene* 67:9-16.
 25. Laska, E. 1968. Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.* 37:181-233.
 26. James, J. A., N. D. Colton, and M. P. E. 1981. Characterization of the substrate structure of pyruvate carboxylase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 256:11816-11825.
 27. Heremans, J. 1966. Pyruvate carboxylase. *Biochem. Soc. Trans.* 4:165-172.
 28. Hogg, A. E., R. H. M. Sridhar, D. Fouchard, and J. G. Coombs. 1976. CO₂-fixing enzymes of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Gen. Microbiol.* 93:69-74.
 29. Kammeyer, J. R. 1969. The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 38:195-221.
 30. Kammeyer, J. R., P. C. Blinn, M. P. Phillips, and R. G. Wood. 1968. Involvement and identification of a streptomycin residue at the pyruvate binding site of transcarboxylase. *Biochemistry* 7:576-581.
 31. Laska, E., F. Ques, and R. A. Sprunt. 1967. Sequence homology around the biotin-binding site of human pyruvate-COA and pyruvate carboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 125:61-65.
 32. Le, L. E., and J. E. Hansen. 1982. The gene encoding the biotin carboxylase subunit of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* 257:953-963.
 33. Ely, M. T., R. Soudarshan, R. Wargacki, A. C. Chapman, and R. M. W. Lewis. 1978. Pyruvate carboxylase from a thermophilic bacterium: some molecular characteristics. *Biochemistry* 17:3647-3653.
 34. Linn, R. C., P. H. Hays, F. Uffendeller, and J. C. Wallace. 1966. Sequence and domain structure of yeast pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* 241:11493-11497.
 35. Moley, W. L., R. L. Shotton, G. B. Zlotolow, G. Kammeyer, R. G. Wood, L. B. Ericsson, and R. E. Dixon. 1976. Purification and properties of the biotin subunit from transcarboxylase. *J. Biol. Chem.* 251:11615-11622.
 36. Mariani, E., and P. H. Hays. 1967. Nitrogen-binding mechanism induced in hemocyanin monomer-biotin-ferrous ribonucleoside-phosphate complex. *J. Biol. Chem.* 242:115-121.
 37. McAllister, E. E., L. E. Le, and T. E. Smith. 1981. Properties of a mutant *Escherichia coli* pyruvate-dependent carboxylase deficient in cytoplasmic iron. *Microbiol. J. (Lancet)* 146:279-289.
 38. Milder, D. F., R. H. Hogg, and J. G. Coombs. 1976. Some properties of the pyruvate carboxylase from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Gen. Microbiol.* 93:75-81.
 39. Mordak, H. V., and D. A. Roffey. 1985. Acetyl-CoA-dependent pyruvate carboxylase from the photosynthetic bacterium *Rhodospira rubra* capitata: rapid and efficient purification using deoxycholate. *J. Biol. Chem.* 260:2626-2629.
 40. Mordak, H. V., and M. Shum. 1985. Unpublished results.
 41. Mordak, H. V., and T. M. Johnson. 1980. Nucleotide sequence of the *hcbI* gene of *Escherichia coli* Hfr 194. *Gene* 14:67-74.
 42. Mordak, H. V., R. E. Toller, and M. P. E. 1983. Activation of yeast pyruvate carboxylase: interactions between acetyl transcarboxylase, pyruvate, and substrates of the reaction. *Biochemistry* 22:3041-3044.
 43. Nunn, W. B. 1967. Thioester-enzyme compounds and fatty acids as carbon sources. p. 293-310. *In* C. N. Scudlark, E. E. Ingraham, R. H. Low, H. Magasanik, M. Schaechter, and H. L. Ingraham (eds.), *Escherichia coli and Salmonella* microbiology and molecular biology, vol. 2. American Society for Microbiology, Washington, DC.
 44. Peterson, M. L., R. B. Broglio, E. C. Williams, and G. S. Langst. 1983. Characterization and derivation of the gene coding for mitochondrial carboxyl phosphatase of *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem.* 258:1200-1204.
 45. Peterson, M. L., W. D. T. Channing, R. A. Taylor, and M. P. E. 1987. Novel enzyme machines for the metabolism of malate: pyruvate-dependent pyruvate carboxylase of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biol. Chem.* 262:1215-1219.
 46. Poggio, J. D., and G. E. Moore. 1969. Pyruvate carboxylase in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Gen. Microbiol.* 60:97-101.
 47. Powell, M., and M. Shum. Unpublished results.
 48. Sun, L. E., D. J. Pines, and F. M. Amdur. 1984. Evolution of the functional domain of *Escherichia coli* carboxyl phosphatase by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 259:7742-7747.
 49. Hunter, E. D., and W. W. Bernstein. 1972. Characterization and regulation of pyruvate carboxylase of *Bacterium thermophilus*. *J. Bacteriol.* 109:76-79.
 50. Hunter, E. D., and B. P. Pringle. 1976. Carboxylase induction in *Bacterium infelix*: identification and biosynthetic properties of mutants. *J. Gen. Microbiol.* 112:17-26.
 51. Kammeyer, J. R., F. Freich, and T. Mammala. 1969. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 52. Kammeyer, J. R., G. Thompson, S. A. Murray, G. B. Kammeyer, F. C. Howe, and R. G. Wood. 1968. Evolutionary conservation among biotin enzymes. *J. Biol. Chem.* 243:614-618.
 53. Kanger, F., S. Nielsen, and B. C. Coulson. 1973. DNA sequencing with chemically modified substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:348-352.
 54. Kammeyer, M. C. 1978. Fine control of the expression of pyruvate (phosphatase) related to transcarboxylase in various species. *FEBS Lett.* 101:1-3.
 55. Kammeyer, M. C., and R. A. Taylor. 1974. Isolation and characterization of pyruvate carboxylase from *Desulfovibrio radiolarius* 41P. *Arch. Biochem. Biophys.* 164:81-84.
 56. Kammeyer, M. C. 1984. High frequency modulation of gram-negative bacterial genes by the *lac* operator-controlled Tc^r-mutagenesis. *Mol. Gen. Evol.* 1:113-121.
 57. Kammeyer, M. C. 1984. Cellulose accession number 148824.
 58. Kammeyer, M. C. 1981. Transport and metabolism of carbon and nitrogen in aquatic bacteria. *Microbiol.* 101:219-187.
 59. Kammeyer, M. C., W. J. Joseph, and A. Phillips. 1980. Biotin and other cofactor requirements for the synthesis of pyruvate carboxylase in *Bacterium infelix* H121. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:336-338.
 60. Kammeyer, M. C. 1974. Physicochemical study of pyruvate carboxylase in a laboratory strain. *J. Bacteriol.* 120:307-315.
 61. Kammeyer, M. C. Personal communication.
 62. Kammeyer, M. C., M. Shuman, and M. P. E. 1978. The control of the synthesis of pyruvate carboxylase in *Pseudomonas fluorescens*: evidence from double mutants. *J. Biol. Chem.* 253:790-793.
 63. Thompson, J. D., B. G. Higgins, and T. J. Gillham. 1984. Cloning DNA sequences and the multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 12:407-432.
 64. Thomson, C. G., G. B. Kammeyer, F. C. Howe, S. F. B. Phillips, M. C. Kammeyer, W. J. Joseph, R. G. Wood, and B. P. Pringle. 1973. Primary structure of the N-subunit of transcarboxylase as deduced from the genomic DNA sequence. *FEBS Lett.* 40:191-195.
 65. Taylor, R. A., R. E. Toller, and J. Kammeyer. 1978. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3701-3704.
 66. Ward, P. D., and P. W. Wilson. 1984. Biotin as a growth stimulant for the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* 8:157-167.
 67. Wessler, I. D., W. D. M. M. V. Duggan, R. M. Mordak, G. E. Roffey, B. V. Rang, M. P. E. 1985. Purification and properties of pyruvate carboxylase from *Escherichia coli* Hfr 194. *Gene* 41:227-232.
 68. Williams, G. C. 1968. Pyruvate and acetate metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodospira rubra* capitata. *J. Gen. Microbiol.* 136:249-249.

**3.4.- MANUSCRITO DEL ARTICULO "GLUTAMINE
BIOSYNTHESIS AND THE UTILIZATION OF SUCCNATE AND
GLUTAMINE BY *Rhizobium sili* AND *Rhizobium mallei*."**

GLUTAMINE BIOSYNTHESIS AND THE UTILIZATION OF SUCCINATE AND GLUTAMATE BY *Rhizobium etli* AND *Rhizobium meliloti*

Sergio Encarnación¹, Jorge Calderón², Alan S. Gelbard³, Arthur J. L. Cooper³ and Jaime Mora⁴

¹Departamento de Ecología Molecular, Centro de Investigación Sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México; ²Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 7028, México, D. F., Departments of ³Biochemistry and ⁴Neurology and Neuroscience, Cornell University Medical College, New York, NY., U.S.A.

The cycling of glutamine through its synthesis and degradation has been reported to occur in *Neurospora crassa* (Mora, J., Microbiol. Reviews, 54:293-304, 1990). This cycle is a necessary requirement for the optimal utilization of carbon.

Isotopic studies with ¹⁴C- and ¹⁵N-labeled compounds demonstrated that in *Rhizobium meliloti* 1021 and *Rhizobium etli* CE3 strains, glutamine nitrogen and carbon are turned over to ammonium and CO₂; some of the ammonium released is assimilated back into glutamine. Glutamine catabolism results in the production and labelling of γ and β -hydroxybutyrate something that indicates a new catabolic pathway for this amino acid in *Rhizobium*. On the other hand, the 2-oxoglutarate derived from glutamine is converted to succinate in glutamine medium. In contrast with *Rhizobium meliloti* 1021 and *Rhizobium etli* CE3 (wild-type strains that oxidize succinate preferentially over glutamine), an *R. meliloti* double mutant that lacks glutamine synthetases (GS) I and II oxidizes glutamine more readily than succinate. GSII activity is induced in *Rhizobium* grown in succinate-glutamine medium and this enzyme participates in the cycling of glutamine. However, GSII activity is very low when glutamine is the only carbon source in both *R. meliloti* and *R. etli* CE 3 wild-type strains. The present findings indicate that glutamine synthesis helps to drive the utilization of succinate. The restriction in glutamine synthesis (and its cycling), demonstrated through the mutants, allows the utilization of other carbon sources as glutamine.

INTRODUCTION

Evidence for a glutamine cycle in *Neurospora crassa* has previously been presented (Mora, 1990). Glutamine is converted through the cycle to glutamate by glutamate synthase (GGAT). Glutamine is also catabolized by the glutamine transaminase- α -amidase pathway, whose products (i.e., 2-oxoglutarate and ammonium) are the substrates for NADPH-dependent glutamate dehydrogenase (GDH), which synthesizes glutamate (Calderón et al., 1985). In the final step, ammonium is assimilated into glutamine amide by the action of glutamine synthetase (GS). The glutamine cycle is not futile, because it is necessary to drive an effective carbon flow that supports growth (Serranós & Mora, 1986; Serranós et al., 1989).

It is of considerable interest to determine whether the glutamine cycle operates also in microorganisms other than *N. crassa*. Our

interest has focused on two species of *Rhizobium*, namely *Rhizobium etli* and *Rhizobium meliloti*. In contrast with most prokaryotes, these species of *Rhizobium* associate with leguminous plants and have three GS. GS I and GSII (Brewer & Keefe, 1977; de Bruijn et al., 1989) apparently function under different nutritional conditions (Brewer & Mora, 1988). GS I activity is induced when the organism is grown on a rich medium and GSII activity is induced and regulated by nitrogen in minimal medium (MM) (Brewer & Mora, 1988). A third GS has recently been reported, but the physiological conditions for expression of GSIII activity in the rhizobiasae have not yet been determined (Carlson et al., 1987; de Bruijn et al., 1989; Beggs et al., 1990). In *R. etli*, glutamine is assimilated by the enzymes of the glutamine transaminase- α -amidase pathway and additionally is degraded by a glutaminase which catalyzes the hydrolytic deamidation of glutamine to glutamate and ammonium (Durán & Calderón, 1995; Durán

et al. 1989).

We undertook a study to determine whether cycling of glutamine carbon and nitrogen occurs in *R. coli* CBS and in *R. meliloti* 1021 strains. *R. meliloti* was included in the present study to take advantage of the GSI-, GSII-, and GS-:GSII- mutants that are available (de Bruijn et al. 1989). Since we found that glutamine carbon and nitrogen are indeed recycled by these organisms, we explored the metabolism of this amino acid and of succinate, when glutamine is utilized as a carbon and/or nitrogen source.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. The bacterial strains used in the present work are the following: *Rhizobium cili* CBS (Beuve & Basse, 1968); *Rhizobium meliloti* strains: 1021 (wild-type, Smr); 1-20, glnA::Tn5, SmrKmr, (GSI- mutant strain) (de Bruijn et al. 1989); 2-37, glnII::Tn5, SmrKmr, (GSII- mutant strain) (de Bruijn et al. 1989); and 4-15, glnA (MudIIIP44)glnIII::Tn5, SmrKmrQmr, (GS-:GSII- double mutant strain) (de Bruijn et al. 1989). The *R. meliloti* mutant strains were kindly provided by F. J. de Bruijn.

Growth conditions. Bacterial strains were grown at 30°C in 250 ml flasks containing 150 ml of minimal medium (MM) (Beuve & Mora, 1968) and shaken at 200 rpm. The bacteria used as inocula were previously grown overnight on P-8 rich medium (Beuve & Mora, 1968), washed twice, and diluted to 0.05 OD₅₄₀. In the cultures grown on MM medium, 10 mM succinate was used as the carbon source, and 10 mM ammonium chloride or 10 mM glutamine was used as the nitrogen source, as indicated in the text.

Measurement of ¹⁵N-labeled metabolites. The cultures were inoculated at 0.2 OD₅₄₀ after growth in succinate-ammonium medium for 8 h; 3 ml of this medium was centrifuged, decanted and the pellet suspended in 100 µl of MM (succinate-ammonium medium), plus 200 µl of L-[amide-¹⁵N]glutamine (1 to 5 µCi [50 to 100 µM]). L-[amide-¹⁵N]glutamine and [¹⁵N]ammonia were prepared as previously described (Caldwell et al. 1989). The cell suspension was then incubated for 30 min

and uptake of label was stopped by adding 2 ml of water. Further treatment of the sample, preparation of extracts, and analysis of ¹⁵N-labeled metabolites by HPLC were carried out as previously described (Caldwell et al. 1989). For experiments with [¹⁵N]ammonium, the growth conditions and the concentration of label were the same as those noted above, except that cells were resuspended in 100 µl of MM (plus 10 mM succinate but without an external nitrogen source), incubated for 5 min, and subjected to the same procedure as described above.

¹⁴CO₂ evolution and labeling of amine acids. The ¹⁴CO₂ released from labeled succinate was determined after the addition of 0.2 µCi/ml of [1,4-¹⁴C]succinate (specific activity, 230,000 cpm/µmol) to a sample of a culture grown for 5 h in flasks containing 50 ml of MM plus succinate with ammonium or glutamine. The ¹⁴CO₂ released after addition of NaOH was collected for 30 min and quantified according to the method of Mora et al. (Mora et al. 1972). ¹⁴CO₂ released after the addition of 0.2 µCi/ml of [U-¹⁴C]glutamine (specific activity, 620,000 cpm/µmol) to cultures grown on succinate-glutamine was determined as described above. Experiments with ¹⁴C-labeled compounds were repeated at least twice. Units of ¹⁴CO₂ evolution are expressed as cpm/mg of protein. Since air was bubbled during CO₂ collection (Mora et al. 1972), the specific radioactivity of CO₂ was not determined. Therefore, it was not possible to make direct comparisons between the specific activities of label evolved as CO₂. Labeled cell- and medium samples (150 and 20 ml, respectively) were withdrawn from cultures grown in succinate (10 mM)-glutamine (10 mM) medium (or in other defined media as indicated in the Results). The samples were then prepared as described previously (Beuve & Basse, 1968). Thereafter, samples of the medium were concentrated by lyophilisation, resuspended in 1 ml of 2.5 mM HClO₄ containing propionic acid as internal standard, and centrifuged at 16,000 x g for 10 min at 4°C. The supernatants were filtered through membranes (type HA, 0.45 µm; Millipore Corp., Milford, MA) and used for organic acid and amino acid analyses. Amino acids were separated as their 9-

fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) derivatives by reverse phase chromatography on a Waters Nova-Pak C-18 column (150 x 3.9 mm I. D.) and quantified fluorometrically. Derivatization was carried out in capped 15-ml capacity polypropylene tubes. An aliquot (50 μ l) of sample (or standard) was added to 1.05 ml of 0.025 M sodium borate solution, followed by addition of 1.0 ml of HPLC-grade acetone, and by 10 μ l of 0.01 M FMOC in acetone. The tube was shaken and maintained at room temperature (22 - 26°C) for 10 min. After this time, a 2-ml aliquot of a 1:1 solution of hexane/ethyl acetate was added to the sample and the mixture was shaken vigorously. Finally, 10 μ l from the aqueous layer was injected into the HPLC apparatus. Elution of the FMOC amino acids was effected with an 18-60% gradient of acetonitrile: buffer A (0.05 M sodium acetate, pH 3.5, adjusted with acetic acid) at a flow rate of 1 ml/min at 45°C. The eluted FMOC amino acid were detected fluorometrically by means of a Waters 470 Scanning Fluorescence Detector (254 nm_{ex}, 313 nm_{em}). The determination of amino acids was repeated at least twice.

Labeling and determination of organic acids. Labeled cell- and medium samples (150 and 20 ml, respectively) were withdrawn from cultures grown in succinate (10 mM), glutamine (10 mM) medium (or in other defined media as indicated in the Results). At 5 h of growth, a 30 min pulse of 0.2 μ Ci/ml of [1,4-¹⁴C]succinate plus 0.2 μ Ci/ml of [2,3-¹⁴C]succinate was applied such that the final specific activity was 2-fold to that of labeled succinate used in the experiments in which ¹⁴CO₂ was measured. The samples were then prepared as described for amino acid analysis as above. Organic acids from cell- and medium samples were separated and quantified by injecting 10 μ l- and 50 μ l aliquots, respectively, into a Waters Model 50 Chromatography [Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford, MA] equipped with a Waters model 490 programmable multiwavelength detector. The separation was performed on three Shodex Ion-Pak-811 (Waters Chromatography Division) columns (300 x 8 mm I.D.) connected in series. The column temperature was 60°C and the flow rate was 0.9 ml/min.

Organic acids were eluted with 2.5 mM HClO₄ and detected at 436 nm by the color change on contact with a solution containing 0.2 mM bromothymol blue, and 15 mM Na₂PO₄ - 2 mM NaOH buffer (pH 10.5) within the reaction coil. Experiments of labeling and determination of organic acids were repeated at least twice.

Determination of poly- β -hydroxybutyrate. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) was assayed by the spectrophotometric method of Law and Stepecky (Law & Stepecky, 1961). The method yields a single, symmetrical absorption peak for crotonic acid centered at 235 nm, indicating that other reaction products do not interfere with the assay.

Determination of [¹⁴C]PHB. Batch cultures of *Rhizobium* were grown as described above in succinate-glutamine medium. After 5 h of growth, a 30 min pulse of 0.2 μ Ci/ml of [1,4-¹⁴C]succinate plus 0.2 μ Ci/ml of [2,3-¹⁴C]succinate, or of [U-¹⁴C]glutamine (0.2 μ Ci/ml), was applied. Specific activity was the same as above. After pulse labeling, the cultures were centrifuged, washed as described under "growth conditions" and the pellet processed for the determination of PHB (Law & Stepecky, 1961) with the following modification: After solubilization of PHB with chloroform, two 10- μ l aliquots were removed. One portion was analyzed for unlabeled PHB by the spectrophotometric method described above (Law & Stepecky, 1961). The other portion was subjected to liquid scintillation counting in a Beckman LS6005C System. The determination of [¹⁴C]PHB was performed at least twice.

Ammonia determination. Preparation of medium samples (10 ml) and measurement of ammonia content with an Orion (Cambridge, MA, USA) electrode were as described previously (Espia *et al.*, 1979.). Ammonia determination was repeated at least twice.

Glutamine synthetase determination. Centrifuged cells were resuspended in 1 ml of 10 mM imidazole hydrochloride buffer (pH 7.4) containing 1 mM MgCl₂. After sonication (Soniprep 150, New Brunswick, USA) at 4°C with four 45-sec pulses, GS activity was measured in the crude homogenate. In some

experiments, 0.5 mM L-methionine-S-R-sulfoximine (MS) was added to the culture medium together with labeled glutamine. MS is a potent inhibitor of GS (Ressie & Huisman, 1968). GS was measured (synthetase activity) as described by Bender et al. (Bender et al., 1977). The specific activity of GS is expressed as nanomoles of γ -glutamylhydroxamate formed per min per mg of protein. GSI and GSII activities were distinguished by their relative heat stabilities as described previously (Dereew & Knecht, 1977). GS determination was determined at least twice.

RESULTS

Glutamine metabolism in *R. etli* CE3 and in *R. meliloti* 1021 wild-type strains in the presence of L-[amide- ^{15}N]glutamine and ^{15}N ammonium. Incorporation of label derived from L-[amide- ^{15}N]glutamine into amino acids and into ammonium in *R. etli* CE3 wild-type strain was determined for cells grown in succinate-ammonium medium. The relative content of label in glutamine was found to decrease over thirty minutes following addition of the pulse. By 30 min. the label in glutamate, alanine, and ammonium amounted to 1.1, 11.3, and 64%, respectively, of the total (Table 1). Of interest is the finding that label in the α -amino group of glutamine at 30 min was 18.4% of the total label in glutamine (Table 1). Apparently, as glutamine is catabolized its amide nitrogen is liberated as ammonium (Dereew & Calasorda, 1969; Swain et al., 1995). In addition, via the action of GOGAT (Lewin et al., 1967) and a transaminase some of this labeled amide nitrogen is incorporated into the α -amino groups of glutamate and alanine, respectively. (Reductive ^{15}N -amination of 2-oxoglutarate is unlikely to occur because *R. etli* CE does not contain functional NADPH-dependent GDH (Owens et al., 1988). L-[amide- ^{15}N]glutamine is then generated from L-[^{15}N]glutamate by the action of GS. In summary, these findings indicate that ammonium is a source of both glutamine nitrogens in *Rhizobium etli*.

Additional evidence that ammonium nitrogen is a source of both glutamine nitrogens was obtained from analysis of the distribution of label after a pulse of ^{15}N ammonium was added to cultures of *R.*

etli and *R. meliloti* wild-type strains. After growth on succinate-ammonium medium the cells were centrifuged and resuspended in succinate medium lacking an external nitrogen source (see Methods). Five minutes after the pulse, considerable label was incorporated into glutamate, alanine and glutamine (Table 1, columns 2 and 3). Additionally, almost half the label in glutamine was present in its α -amino group. This finding is in accord with the fact that GOGAT is present in both *R. etli* (above) and in *R. meliloti* (Osburn & Slinger, 1980). Low expression of NADPH-dependent GDH occurs in *R. meliloti*, and the enzyme is non-functional since it does not grow in ammonium in the presence of 5 mM of methionine sulfone, an inhibitor of GOGAT activity (Bravo et al., 1988). Thus, as with *R. etli*, reductive ^{15}N -amination of 2-oxoglutarate is probably not a factor in the production of ^{15}N glutamate from ^{15}N ammonia in *R. meliloti*.

Succinate and glutamine oxidation in *R. etli* CE 3, *R. meliloti* 1021 wild-type and GS-mutants. The oxidation of succinate in the presence of glutamine was reduced by 25% in *R. etli* CE 3 and by 40% in *R. meliloti* 1021 strain compared with oxidation in the presence of ammonium. Moreover, after 5 h of growth, the 1021 strain had consumed 1348 μmol of succinate per mg of protein from the medium, whereas only 654 μmol of glutamine per mg of protein had been utilized. This finding suggests that succinate is oxidized preferentially over glutamine in the strains studied.

As noted above, the synthesis of glutamine and its cycling are necessary for optimal utilization of carbon sources (Serrano & Moss, 1988; Serrano et al., 1986; Mira, 1990.). The possibility that glutamine synthesis plays a similar role in *R. meliloti* 1021 wild-type and GS- mutants of this strain was investigated. *R. meliloti* wild type strain and the *R. meliloti* GS- mutant strain were grown on succinate-glutamine medium and the oxidation of [1,4- ^{14}C]succinate to $^{14}\text{CO}_2$ by these organisms was measured. Quantitative data are presented in Fig. 1A for the oxidation of succinate to CO_2 by cultures grown for 5 h after a 30 min pulse of labeled

succinate. A minor effect was observed on the amount of succinate oxidized by the mutant lacking GSI. In contrast, lack of GSII resulted in a 45% decrease in succinate oxidation. Succinate oxidation was decreased by 63% in the mutant that lacked both GSI and GSII (Fig. 1A). When MS was added to inhibit GSIII activity (Segda et al., 1990) in the double mutant, a small, further decrease (to 70% inhibition relative to control) in succinate oxidation was observed (Fig. 1A; see also below). The presence of exogenous glutamine and the lack of glutamine synthesis resulted in a reduction of succinate oxidation to 18% of that which occurred when succinate was the only carbon source (and ammonium is the nitrogen source), and *R. meliloti* is growing optimally.

The GS- mutant strains of *R. meliloti* 1021 growing on succinate-glutamine medium reduce succinate oxidation and increase their ability to oxidize glutamine. Glutamine is oxidized in the wild-type strain in the presence of succinate, and as mentioned above, succinate oxidation is reduced by 40% in succinate-glutamine medium compared to that in succinate-ammonium medium (Fig. 1B). Relatively more glutamine is oxidized to CO₂ in the absence of GSI, slightly more if GSII is lacking, and in a mutant lacking both enzymes the oxidation of this amino acid is increased by 76% over that of the wild-type strain (Fig. 1B). Oxidation of glutamine increases slightly when MS is added to the double mutant (Fig. 1B). In addition, the double mutant excretes more ammonium than does the wild-type strain grown in the presence of succinate-glutamine medium (Table 2). Therefore, when the synthesis of glutamine is limited, this amino acid is preferentially oxidized in comparison with succinate. This effect is reflected by a 2-fold increase in glutamine utilization (from 694 to 1389 μmol/mg of protein/5 h) and by a decrease in succinate utilization (from 1346 to 237 μmol/mg of protein/5 h) in the GSI:GSII- mutant strain. Importantly, in the presence of glutamine-only medium, a substantial increase (4-fold) occurs in glutamine oxidation compared with that in the presence of succinate-only medium (see legend to Fig. 1).

The growth rate of the *R. meliloti* GSI:GSII- double mutant strain in succinate-glutamine medium was 40% (i.e., 5 h doubling time) that of the wild-type strain. The lower growth rate of the double mutant was not due to lack of glutamine. The intracellular glutamine pool after 5 h growth is 50% higher than that of the wild-type strain. In addition, more ammonium was excreted by the GSI:GSII- double mutant than by the wild-type strain (Table 2). Therefore, some internal carbon limitation must be responsible for the suboptimal growth in succinate-glutamine medium of the double mutant GSI:GSII- strain. The present data indicate that the oxidation of succinate contributes less than that of glutamine to the growth of the double mutant in the presence of both substrates. The oxidation (albeit at a slow rate) of succinate in this double mutant strain may conceivably be due to the presence of another GS, namely GSIII (Segda et al., 1990). The addition of MS to the double mutant, however, resulted in only slightly lowered succinate oxidation (Fig. 1B). It is expected that GSIII will provide glutamine in only very limited amounts as indicated by the low rate of growth (8 h D.T.) of the double mutant in succinate-ammonium medium (data not shown).

Synthesis of glutamine and incorporation of label derived from [¹⁴C]succinate into amino acids. The synthesis of glutamine stimulated the incorporation of label derived from [1,4-¹⁴C]succinate into various amino acids (Fig. 1C). As a corollary, the incorporation of label into some amino acids was decreased in the GSI- mutant compared with that in the wild-type strain, and it was decreased further in the GSI:GSII- strain for all the amino acids determined (asp, thr, ser, glu, gly, and ala). In the GSI:GSII- double mutant strain the relative incorporation of label into all the amino acids (except glycine) was decreased by 80% or more compared with that of the wild-type control. The presence of MS resulted in even lower incorporation of ¹⁴C into amino acids in the double mutant strain. As found for *N. crassa* (Caldwell et al., 1989; Caldwell & Moore, 1985), the data obtained for *R. meliloti* wild-type strain regarding the incorporation of ¹⁴C from [1,4-¹⁴C]succinate into glutamine in the presence

of glutamine (Fig. 1C), is additional evidence that this amino acid is recycled (Calderon & More, 1985). The catabolism of glutamine provides ammonium which is assimilated by GS back into this amino acid; the glutamate formed from 2-oxoglutarate (which is derived from succinate through the TCA cycle), supplies the labeled precursor of glutamine. A decrease in overall activity of GS must therefore result in less incorporation of ^{14}C into glutamine. Indeed, such a decrease was observed for the various GS mutants as shown in Fig. 1C. As noted above, both *R. etli* and *R. meliloti* lack functional NADPH-dependent GDH and ammonium is assimilated in these organisms by the GS-GOGAT pathway.

Glutamine biosynthesis and incorporation of succinate- and glutamine carbon into organic acids. The GSI:GSI⁻ strain grown in succinate-glutamine excreted 4- to 6-fold larger amounts of 2-oxoglutarate than did the wild-type strain and 9- to 12-fold greater amounts than did the single mutant strains in the absence and presence of MS, respectively (Table 3). Moreover, almost 2-fold increase of malic acid occurred in the GSI:GSI⁻ strain in the presence of MS (Table 3). In addition, the GSI:GSI⁻ mutant excreted more γ -hydroxybutyric acid (γ -OHB) than did the single mutant GSI⁻ strain. The amount excreted was 3- and 9-fold higher in the absence and in the presence of MS, respectively (Table 3). γ -OHB is derived from glutamine through the consecutive conversion of glutamate to γ -aminobutyric acid (γ -aba), succinic acid semialdehyde (SAS) and finally to γ -OHB (Pierce-Semanago et al., 1983).

As reported elsewhere (Sasaraei et al., 1995), *R. meliloti* 1021, with other species of *Rhizobium*, accumulates poly- β -hydroxybutyrate (PHB) when grown in the presence of succinate with ammonium or with glutamine (see also Table 4). A greater amount of the polymer is accumulated by the GSI:GSI⁻ mutant strain than by the wild-type strain (Table 4) (Sasaraei et al., 1995). Thus, impairment of glutamine synthesis promotes the conversion of this amino acid not only to γ -OHB but also to β -hydroxybutyryl-CoA (β -OHB) (the precursor of

PHB) (Sasaraei & Stadman, 1983). γ -OHBbutyryl-CoA can be converted to β -hydroxybutyryl-CoA (β -OHB-CoA) (Sasaraei & Stadman, 1983). The incorporation of label derived from succinate into several of the above mentioned organic acids after 5 h growth was determined (Table 4). Labeling of β -OHB by succinate was greater than that by glutamine in the wild-type strain 1021. This finding is in accord with the preferential conversion of succinate to acetyl CoA and to β -OHB (Table 4) (Schubert & Sahlgren, 1991). In contrast, when the GSI:GSI⁻ mutant strain was treated with MS, label transfer from ^{14}C succinate to β -OHB was diluted by 50-fold compared with that of the untreated wild-type strain. The opposite occurred with the label derived from ^{14}C glutamine. In this case, label in β -OHB was increased by 60-fold compared with that in the untreated wild-type strain. Label in β -OHB in the untreated GS⁻ mutant strains was intermediate between that of the wild-type and that of the double mutant strain treated with MS (Table 4). The decrease in label incorporated from ^{14}C succinate into 2-oxoglutarate, γ -OHB and β -OHB in the GSI:GSI⁻ double mutant strains with and without MS, when compared with the wild-type strain, can only partially be explained as a consequence of the increase in these acids that results from a higher rate of catabolism of glutamine (Table 4). For example, the dilution of label was 65-fold in 2-oxoglutaric acid and 50-fold in β -OHB. However, the concentration of these organic acids was increased 7- and 5-fold, respectively. Similarly, label in γ -OHB was diluted 10-fold but its concentration was increased 2-fold (Table 4). In contrast, the label in succinic acid was reduced 3-fold, but its concentration did not change appreciably. The data presented herein indicate that glutamine carbon is incorporated into different organic acids and that impairment of glutamine synthesis increases the rate of degradation of this amino acid. Indeed, under conditions of impaired glutamine synthesis, carbon necessary for the synthesis of 2-oxoglutarate, γ -OHB, and β -OHB is derived more readily from glutamine than from succinate. The idea that glutamine is a more direct precursor of these organic acids than is succinate is supported by the fact that in the GSI:GSI⁻

strain, incorporation of label derived from ^{14}C succinate into γ -OHB and β -OHB in the presence of glutamine is diminished. The increase in labeling of β -OHB in the presence of succinate plus ^{14}C glutamine is also in accord with the greater utilization of glutamine in the double mutant.

One explanation for the fact that glutamine oxidation to CO_2 is lower than that of succinate in the wild type *Rhizobium* is that this amino acid can be converted to glutamate and then decarboxylated to γ -aba, which in turn is converted to SAS, γ -OHB, β -OHBCoA and PHB (Meyer & Hageman, 1990; Miller et al., 1991). The 2-oxoglutarate derived from glutamine is a precursor of succinate in *Rhizobium*. When grown in the presence of glutamine, succinate is present in *R. meliloti* and is excreted in high amounts to the medium after 10 h (data not shown).

The role of GSI and GSI1 in using glutamine as a nitrogen and/or carbon source. Glutamine synthase occurs even when glutamine and succinate are present in the medium. *R. meliloti* 1021 strain grows in succinate-glutamine medium with a 3 h D. T. Under these conditions, GSI is induced during the first 8 h. During this time, GSI activity is decreased. At later times, when GSI activity is diminished, GSI1 activity is induced (Fig. 2A). Similar changes in GS activity occur with *R. etli* CE 3 strain (Fig. 2A) except that GSI and GSI1 activities are higher. Evidently, GSI is induced when glutamine, in addition to succinate, is present. However, when *R. meliloti* 1021 and *R. etli* CE 3 wild-type strains are cultured in the presence of glutamine as the sole carbon and nitrogen sources, growth is slower (5 h D.T.), almost no induction of GSI occurs, and GSI activity decreases during the first 12 h to increase slightly thereafter (Fig. 2B). Under these conditions of growth in glutamine-only medium, and in contrast to the case in which succinate and glutamine are present, ammonium is excreted into the medium (Table 2) (Meyer & Calderon, 1990). In addition, more ammonium and 2-oxoglutarate are excreted when *R. meliloti* GSI:GSI1 is grown in the presence of glutamine-only medium than in the presence of glutamine-succinate medium (data not

shown).

DISCUSSION

In contrast to many other bacteria, succinate is a good carbon source in *Rhizobium* and is effectively oxidized to CO_2 . *R. etli* CE 3 and *R. meliloti* 1021 strains grow optimally on MM supplemented with succinate-ammonium and only slightly less well if ammonium is replaced by glutamine. Glutamine when used as a nitrogen source in the presence of succinate is also oxidized to CO_2 (Fig. 1 and Table 4). In the presence of glutamine, succinate oxidation to CO_2 is decreased by 25 and 40% in *R. etli* and in *R. meliloti*, respectively. Apparently, oxidation of glutamine substitutes for that of succinate. Of importance is the finding that when glutamine is used as the sole nitrogen source only minor amounts of ammonium are excreted to the medium (Table 2). If glutamine is utilized as the carbon and nitrogen source the growth rate of the CE 3 and 1021 strains is 40% of that which occurs in the presence of succinate and ammonium, and ammonium is excreted to the medium (Table 2). This finding indicates that a limitation to carbon use occurs in the presence of glutamine-only medium. The data clearly show that succinate is a better carbon source than is glutamine.

The fate of the label derived from L-isotidyl-glutamine and from ^{13}C ammonium shows that nitrogen in the amide group of glutamine has two fates: a) incorporation into the α -amino groups of glutamate, alanine and glutamine, and b) removal as ammonium and efficient reincorporation into the amide group (recycling) (Table 1). This metabolic fate of the amide nitrogen is in accord with the presence of a glutamine transaminase- α -amidase pathway, glutaminase (Borin & Calderon, 1990; Borin et al., 1990), GCOAT (Beeve & Meyer, 1988), and a transaminase. Labeling of the α -amino groups of glutamate and glutamine does not require the presence of GDH and, as mentioned above, functional biosynthetic NADPH-dependent GDH activity is absent in *R. etli* CE 3 (Beeve et al., 1988; Beeve & Meyer, 1988). Thus, recycling of glutamine occurs in CE 3 in a similar fashion to that in *N. crassa*. As is the case with *N. crassa*, intracellular glutamine is labeled

when a pulse of [1,4-¹⁴C]succinate is applied to *R. meliloti* growing in the presence of glutamine (Fig. 1C). This finding is also evidence for simultaneous synthesis and degradation of glutamine in *R. meliloti* (Fig. 1C). The labeling of glutamine was drastically reduced in the GS⁻ mutant strains. In this context, it is relevant to note that in *R. meliloti* and *R. etli* wild-type strains grown in succinate-glutamine medium, GSI activity is decreased whereas GSII activity is induced compared to the levels exhibited by these organisms grown on succinate-ammonium medium (Fig. 2A) (Brave & More, 1988). However, when glutamine is the sole carbon and nitrogen source neither enzyme is induced (Fig. 2B). Under these conditions, glutamine is degraded but its synthesis is reduced, a process that may spare carbon and energy for other metabolic needs (Calders & More, 1989). The lack of induction of GSII in the absence of succinate suggests a role for this organic acid in the induction of this enzyme. The data also emphasize the coupling of carbon utilization to the synthesis of glutamine primarily by GSII (Fig. 2A and B, and see below). It is also relevant that in *R. etli*, GSII activity (but not GSI activity) is induced in the presence of ammonium as sole nitrogen source (Brave & More, 1988).

The excretion of γ -OHB in the 1021 and CE 3 strains (Table 3 and data not shown) indicates that glutamine after conversion to glutamate (Durrán & Calderón, 1995) is decarboxylated and that the α -keto formed is the source of this hydroxy acid (Wassenaar & Stadman, 1963; Miller et al., 1991). Accumulation of PHB in the succinate-glutamine medium (Table 4) is due to the conversion of γ -OHB to β -OHB (Wassenaar & Stadman, 1963).

Metabolism of glutamine and succinate is interlinked as indicated by the way glutamine synthesis affects succinate oxidation. In the presence of glutamine, succinate oxidation is reduced in the *R. meliloti* GS⁻ mutant strains (GSI⁻, GSII⁻ and GSI⁻:GSII⁻) compared with that of the wild-type strain (Fig. 1A). In the presence of glutamine, but absence of GS activity, succinate oxidation is greatly reduced compared with the condition in which

succinate is the only carbon source and ammonium is the only nitrogen source. Absence of GS activity affects not only succinate oxidation but also glutamine catabolism. This phenomenon is reflected by an increase in ammonium excretion, 2-oxoglutarate production and glutamine oxidation by the GSI⁻:GSII⁻ mutant strain (Tables 2, 3 and Fig. 1B).

The double mutant GSI⁻:GSII⁻ grows with a doubling time of 5 h in succinate-glutamine medium. This rate is similar to that exhibited by the wild-type strain grown in glutamine-only medium. The GSI⁻:GSII⁻ mutant utilizes the succinate present in the medium, although at a lower rate than that of the wild-type strain (Fig. 1A and Table 4). In glutamine medium the wild-type strain can still couple succinate oxidation with some glutamine synthesis (Fig. 2B), something that can not happen in the double mutant whereas glutamine synthesis is greatly curtailed. Then the low rate of growth of the GSI⁻:GSII⁻ strain grown in glutamine-only medium (7 h D. T.) may be rationalized if it is assumed that the double mutant can not synthesize glutamine, which in turn impairs oxidation of the limited amount of succinate derived from glutamine.

The considerable dilution of label from succinate to some organic acids in the GSI⁻:GSII⁻ mutant strain (Table 4) is presumably due to enhanced glutamine utilization and catabolism and to a lower utilization of succinate. The relative increase in the amount of intracellular organic acids in the double mutant grown in the presence of succinate-glutamine is several-fold lower than the relative dilution of the label in the extracellular organic acids derived from [¹⁴C]succinate (Table 4). Simple dilution does not explain the decrease in specific radioactivity. The level of glutamine and its synthesis are two factors regulating the utilization of succinate and co-ordination of the regulation of these two substrates. However, other factors may be involved in this regulation. For example, pyruvate dehydrogenase activity in *Rhizobium leguminosarum* is decreased by glutamate (Arnes et al., 1986). Moreover, glutamate is excreted to the medium when *R. meliloti* and

E. coli wild-type strains are grown on succinate-glutamine medium (data not shown).

Two glutamine cycles may operate in *Rhizobium*. Glutamine may be catabolized to CO_2 and NH_4^+ , and the NH_4^+ so formed may be reincorporated into glutamine amide by the action of GS. The GS-GOGAT pathway provides for the reynthesis of the glutamine carbon skeleton and its α -amino group. Energy is expended when the carbons and nitrogens of glutamine are turned over in the GS-GOGAT pathway (Melling, 1994). This pathway also consumes 2-oxoglutarate. Indeed, this organic acid is excreted in large amounts in the GS- mutant strains (Table 3). The expenditure of energy and consumption of 2-oxoglutarate are two demanding processes that must be considered in any comprehensive theory that links glutamine cycling (and especially its synthesis) to utilization and oxidation of succinate carbons (Mora, 1990.). Impairment of the conversion of succinate carbon to CO_2 in the GSII:GSIII- strain and the slow rate of growth of this mutant in succinate-ammonium medium are in accord with the importance of 2-oxoglutarate as a cofactor for the oxidation of succinate through the TCA cycle. Presumably, the mutant cells are still viable because of the presence of low levels of GSIII. Interestingly, the double mutant grown on succinate-ammonium medium accumulated more PHB (5 mg) than did the wild-type strain (2-3 mg) over a period of 17 h. Evidently, the reduction in the utilization of 2-oxoglutarate by the GS-GOGAT pathway results in greater production of acetyl-CoA for PHB synthesis.

Amino acid cycling may be relatively widespread among microorganisms. For example, in the presence of glucose, *E. coli* simultaneously synthesizes and degrades tryptophan (Wessely et al., 1991). In another example, glutamine cycling has been proposed to play a role in regulating glycolytic flux in *S. cerevisiae* (Fleiss-Korenshagen et al., 1993).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by DGAPA Grant No IN304-4487 and IN303-393 from the Universidad

Nacional Autónoma de México and by NIH grant DK 16739 (to A.J.L.C.).

We thank Georgina Hernández and Yolanda Mora for critically reviewing the manuscript, to Sandra Contreras and Lus Ma. Martínez for technical assistance in the determination of organic acids and amino acids, and to Samantha Zapata for helping in the preparation of the manuscript. We also wish to thank Dr. Ronald Finn for providing ^{15}N isotope and the Cyclotron Facility Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York.

REFERENCES

- Arceo, R., Glenn, A. R., McKay, I. A. & Edwards, M. J. (1993). Properties of double mutants of *Rhizobium leguminosarum* which are defective in the utilization of dicarboxylic acids and sugars. *J Gen Microbiol* 139, 2743-2747.
- Bender, R. A., Jansson, K. A., Baumick, A. D., Stummgenberg, M., Fear, P. & Magasanik, B. (1977). Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* 130, 1001-1009.
- Breve, A., Becerra, E. & Mora, J. (1988). Introduction of the *Escherichia coli* *gdhA* gene into *Rhizobium phaseoli*: Effect on nitrogen fixation. *J Bacteriol* 170, 945-948.
- Breve, A. & Mora, J. (1988). Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J Bacteriol* 170, 980-984.
- Calderón, J., Mieret, E. & Mora, J. (1988). m-Amidase pathway in the degradation of glutamine in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* 161, 807-809.
- Calderón, J., Cooper, A. J. L., Goffard, A. S. & Mora, J. (1988). ^{15}N isotope studies of glutamine assimilation pathways in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* 171, 1772-1774.
- Calderón, J. & Mora, J. (1988). Glutamine cycling in *Neurospora crassa*. *J Gen Microbiol* 131, 3237-3242.
- Calderón, J. & Mora, J. (1989). Glutamine assimilation pathways in *Neurospora crassa* growing on glutamine as sole nitrogen and carbon source. *J Gen Microbiol* 133, 2699-2707.
- Calderón, T. A., Martín, G. B. & Chasin, B. E. (1987). Differential transcription of the two glutamine synthetase genes of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 169,

3881-3882

- Barrow, R. A. & Koets, R. E. (1977). Two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria. *Biochem Biophys Res Commun* 79, 554-559.
- de Bruijn, F. J., Rosbach, S., Schneider, H., Bostel, F., Meeser, B., Sarto, W. W., Sauerbrey, F. H. & Schell, J. (1989). *Rhizobium meliloti* 1021 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *J Bacteriol* 171, 1673-1682.
- Evans, B. & Caldwell, J. (1985). Role of the glutamine transaminase α -amidase pathway and glutaminase in glutamine degradation in *Rhizobium ckl*. *Microbiol* 141, 589-595.
- Evans, G., Du Pont, G., Huerto-Zepeda, A. & Caldwell, J. (1988). The role of glutaminase in *Rhizobium ckl*: Studies with a new mutant. *Microbiol* 141, 2883-2890.
- Evans, G., Sánchez-Linares, L., Huerto-Zepeda, A., Du Pont, G., Huerto-Zepeda, A. & Caldwell, J. (1989). Identification of two glutaminase in *Rhizobium ckl*. *Biochem Gen* 59, 483-495.
- Escarotolan, A., Dunn, M., Wilms, K. & Hove, J. (1988). Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium ckl*. *J Bacteriol* 177, 3056-3061.
- Evans, G., Marero, S., Wild, M., Hove, R. & Leachman, H. (1988). A previously unrecognized glutamine synthetase expressed in *Rhizobium putinarum*: from the *glnT* locus of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Gen Genet* 209, 513-516.
- Evans, G., Palacios, R. & Mora, J. (1979). Glutamine metabolism in nitrogen-starved cells of *Neurospora crassa*. *J Gen Microbiol* 115, 59-66.
- Florez-Samaniego, B., Olivera, H. & González, A. (1988). Glutamine synthesis is a regulatory signal controlling glucose catabolism in *Aspergillus oryzae* strains. *J Bacteriol* 170, 7703-7706.
- Marcano, J. E. & Stadman, T. C. (1988). Metabolism of α -amino acids. IV. γ -Aminobutyrate fermentation by cell-free extracts of *Clostridium aminobutyricum*. *J Biol Chem* 263, 208-2083.
- Meising, R. E. (1984). Why does *Escherichia coli* have two primary pathways for synthesis of glutamate? *J Bacteriol* 170, 4084-4088.
- Novadinos, G. & Mora, J. (1988). Glutamine synthesis regulates sucrose catabolism in *Neurospora crassa*. *J Gen Microbiol* 132, 3315-3323.
- Novadinos, G., Mora, Y. & Mora, J. (1986). Regulation of glutamine synthesis by glycine and serine in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* 158, 133-138.
- Loer, J. H. & Moscopy, R. A. (1981). Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *J Bacteriol* 82, 33-36.
- Leunika, A., Caldwell, J., Novadinos, G. & Mora, J. (1987). Functional analysis of ammonium assimilation enzymes in *Neurospora crassa*. *J Gen Microbiol* 132, 2333-2340.
- Motzer, E. & Halpern, Y. G. (1980). In vivo cloning and characterization of the *gabCTDP* gene cluster of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 173, 3250-3255.
- Milner, R. W., Moore, D. G. & Joy, K. (1981). Glutamate and γ -aminobutyrate metabolism in isolated *Rhizobium meliloti* bacteroids. *Mol Plant-Microbe Interact* 4, 37-45.
- Mora, J. (1988). Glutamine metabolism and cycling in *Neurospora crassa*. *Microbiol Rev* 54, 293-304.
- Mora, J., Sánchez, R. & Sánchez, S. (1972). Regulation of arginine activity by intermediates of the arginine biosynthetic pathway in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* 119, 670-677.
- Osburn, M. S. & Slinger, E. E. (1980). Ammonium assimilation in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 140, 1234-1240.
- Reade, R. A. & Bister, A. (1988). Phosphorylation of methionine sulfoxime by glutamine synthetase. *Proc Natl Acad Sci* 85, 164-170.
- Schamber, A. & Schlegel, H. G. (1981). Physiology and molecular genetics of poly(β -hydroxy-alkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol Microbiol* 5, 749-757.
- Taniguchi, C., Horn, V. & Gotschek, P. (1981). Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173, 6008-6017.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Determination of $^{14}\text{CO}_2$ and ^{14}C incorporated into amino acids from wild-type and GS mutant strains of *R. meliloti*. Cells were grown in 10 mM succinate-10 mM glutamine medium for 5 h and the label was added to a sample of the cultures for 30 min as stated in Methods. Panel a: $^{14}\text{CO}_2$ from [1,4- ^{14}C]succinate. Panel b: $^{14}\text{CO}_2$ from [U- ^{14}C]glutamine. $^{14}\text{CO}_2$ evolution in the wild-type strain was 392,211 and 92,211 c.p.m. (mg protein) $^{-1}$, respectively. These values were taken as 100 %. Panel c: ^{14}C incorporated into amino acids from [1,4- ^{14}C]succinate. Wild-type specific activity (c.p.m. nmol $^{-1}$) of amino acids was: 1. Aspartate: 7,710; 2. Threonine, plus serine: 3,700; 3. Glutamate: 650; 4. Glutamine: 650; 5. Glycine: 2,540, and 6. Alanine: 1,810. wild-type specific activity incorporated into amino acids was taken as 100 % with the exception of 1. Aspartate: 8,742 and 6. Alanine: 1,886, respectively, which were higher in the GS1-mutant strain.

Fig. 2. GS specific activities during growth of *R. meliloti* GS1 and *R. etli* CES under different conditions. Specific activities of GS1 (○, ⊙) and GSII (□, ■) measured by its synthetase activity, during growth of *R. meliloti* 1021 (open symbols) and *R. etli* CES (closed symbols). Panel a: growth on MM with 10 mM succinate-10 mM glutamine medium. Panel b: growth on MM with glutamine as sole nitrogen and carbon source.

TABLE 1. ^{15}N Distribution of label derived from L-(amide- ^{15}N)glutamine and [^{15}N]ammonium among various metabolites*.

Metabolite	Percentage of label		
	From L-(amide- ^{15}N)glutamine	From [^{15}N]ammonium	
	<i>R. celi</i> CES 30 min label	<i>R. celi</i> CES 5 min label	<i>R. meliloti</i> 1021 5 min label
Glutamine†	3.3	14.2	6.0
Glutamate	1.1	19.6	16.2
Alanine	11.3	21.9	7.7
Ammonium	84.3	33.9	58.7
Glutamine (amine)	(18.4)§	(49.3)§	(44.0)§

* Growth, labelling and sampling as stated in Methods.

† ^{15}N label in amine plus amide.

§ Percentage of label in glutamine present in the α -amino group.

The total label incorporated into amino acids and ammonium was taken as 100 %.

TABLE 2. Ammonium excretion from different *Rhizobium* strains.

Conditions*	Strains					
	<i>R. meliloti</i> 1021		<i>R. meliloti</i> O67;O69		<i>R. celi</i> CES	
	4	8	4	8	4	8
	$\mu\text{mol (mg protein)}^{-1}$					
Succinate-Glutamine	0.2	0.1	9.0	18.0	0.1	0.2
Glutamine [†]	3.9	3.7	N.D. [‡]	N.D.	0.8	2.3

- *Rhizobium* strains were grown in 10 mM succinate- 10 mM glutamine medium as described in Methods.
- † Not determined.
- ‡ Glutamine (10 mM) as carbon and nitrogen source.

Table 2. Labelling and accumulation of organic acids in *R. solisoli* 1031 and G8- mutant strains grown in [¹⁴C]succinate-glutamine medium*.

Intracellular Organic acids	Strains									
	1031		G8-		G8E-		G8-,G8E-		G8-,G8E- +BB+	
	a ^b	b ^c	a	b	a	b	a	b	a	b
2-oxoglutaric acid	4.05	9.64	4.00	12.78	--	--	0.12	4.26	0.06	28.0
succinic acid	30.00	193.00	38.70	112.00	43.20	120.00	22.20	498.00	17.30	82.00
γ-OH butyric acid	4.36	10.00	3.42	5.41	2.99	11.70	0.44	17.00	0.32	20.00
β-OH butyric acid	2.98	7.80	1.10	11.60	0.67	14.80	0.19	24.70	0.06	32.50
β-OH butyric acid	0.04	7.00	0.11	10.20	0.35	13.70	1.76	25.70	2.48	35.60

- * *R. solisoli* strains were grown in 10 mM succinate and 10 mM glutamine medium. At 5 h, 0.2 μCi ml⁻¹ (7.4 kBq ml⁻¹) each of [1,4-¹⁴C] and [2,3-¹⁴C]succinate were added and 30 minutes later the amount of organic acids and the radioactivity were measured.
- Methionine sulfonium concentration was 1.0 mM.
- a. Specific radioactivity is expressed in c.p.m. nmol⁻¹.
- b. Concentration is expressed as nmol (mg protein)⁻¹.
- γ-OH butyric acid present in poly-β-hydroxybutyrate (PHB) labelled with [¹⁴C]succinate as above.
- β-OH butyric acid present in PHB labelled with [¹⁴C]glutamine as described in Methods.

TABLE 4. Excretion of organic acids from *R. solitoli* 1031 and GS- mutant strains grown in succinate-glutamine medium.

Extracellular Organic Acids	Strain ^a				
	1031	GS-	GS-	GS-,GS-	GS-,GS- +MS ^b
Concentration in $\mu\text{mol (mg protein)}^{-1}$					
2-Oxoglutaric acid	2.05	1.35	1.17	8.94	12.10
Malic acid	1.15	0.81	0.95	1.59	2.03
γ -OHB	N.D. ^c	0.39	0.25	0.96	3.23

^a *R. solitoli* strains were grown in 10 mM succinate and 10 mM glutamine medium as described in Methods.

^b Methionine sulfonamide 1.0 mM.

^c Not detected.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

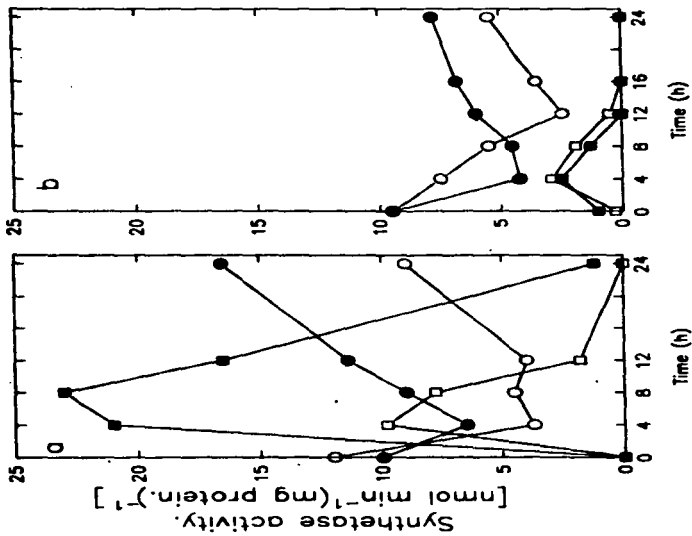


Fig. 2

4.- RESULTADOS ADICIONALES.

**4.1- AVANCES DEL TRABAJO DE INVESTIGACION
TTULADO: "EL PAPEL DE LA SINTESIS DE
POLIBETAHIDROXIBUTIRATO (PHB) EN EL METABOLISMO
DE CARBONO DE *Rhizobium sili*".**

4.1.- EL PAPEL DE LA SÍNTESIS DE POLIHETANIDROXIBUTIRATO (PHB) EN EL METABOLISMO DE CARBONO DE Rhizobium sp.

Una gran variedad de microorganismos acumulan compuestos para almacenamiento de carbono y energía, uno de estos compuestos ampliamente distribuido es el poli- β -hidroxibutirato (PHB). El conocimiento del papel que el PHB juega como un polímero de reserva en la sobrevivencia, proliferación, fijación de nitrógeno, metabolismo de carbono de las rhizobacterias en la rizosfera es de importancia fundamental.

A pesar de que no todas las bacterias son capaces de acumular PHB se ha observado que con la expresión heteróloga de las vías de síntesis de PHB, de manera interesante, algunas cepas bacterianas que originalmente no pueden acumularlo, se vuelven hábiles para sintetizarlo cuando son cultivadas en fuentes de carbono tales como gluconato, lactato, glicerol y hexosas (Anderson et al., 1990; Timm et al., 1990; Nuijberts et al., 1992). Esto sugiere que, en principio, todo organismo, hasta posiblemente plantas y animales, pueden ser capaces de sintetizar PHB si se adicionan un limitado número de genes a través de las técnicas de ingeniería genética, que incluyen phbA, phbB y phbC.

La síntesis de PHB involucra a tres enzimas codificadas por tres genes ampliamente representados en todas las bacterias que sintetizan PHB. La tiolasa (producto de phbA) que cataliza la reacción enzimática que es negativamente regulada por uno de sus productos, la coenzimaA (NACoA), la cual es también un producto cuando la acetyl-CoA entra al ciclo TCA en condiciones óptimas de crecimiento. Dos moléculas de Acetyl-CoA son convertidas en acetoacetyl-CoA por esta enzima el gene phbB que codifica para una acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADPH. Esta enzima es diferente de la reductasa descrita en la degradación β -oxidativa de los ácidos grasos, y por último, el producto del gene phbC que es la polimerasa que utiliza como sustrato el producto de la acetoacetyl-CoA reductasa produciendo PHB y liberando coenzimaA. En algunas instancias, un cuarto gene ha mostrado ser necesario en la óptima acumulación de PHB, phbX, este gene ha sido reportado en Shewanella stans y Thermotoga kansas y su papel parece estar relacionado en la polimerización del PHB (Liebergesell et al., 1992, 1993). Recientemente el producto de un ORF, que está cerca del locus del gene de la PHB sintasa fué localizado en la superficie del gránulo (Pieper-Furst et al., 1994). Mutantes en genes no directamente involucrados en la síntesis de PHB que acumulan niveles más bajos que las cepas silvestres (Pries et al., 1991, 1992) y la presencia de ORFs estructuralmente ligados a phbA, phbB y phbC (Steinbachel et al., 1992) sugieren que otros genes están involucrados en la síntesis de PHB.

A la fecha, en algunas bacterias como Escherichia coli han sido identificadas tres vías principales en la síntesis de PHB y polihidroxicarboxilatos (PHA) (Nuijberts et al., 1992; 1994), además de la ruta clásica. La presencia de estas rutas ha sido observada en células cultivadas en una fuente de carbono simple como glucosa y/o ácidos grasos. Las rutas mencionadas son las siguientes: 1) La

"elongación de la cadena de ácidos grasos" que es comparable a la ruta principal para la síntesis de monómeros de PHB, en la cual la acil-CoA es una de las dos moléculas de acetyl-CoA. En esta ruta se ha encontrado que las unidades monoméricas del PHB son incluso más largas que los ácidos grasos que son utilizados como sustratos (Brandt et al., 1988; Nuisman et al., 1989); ii) La degradación de ácidos grasos por medio de la β -oxidación; es la vía principal cuando los ácidos grasos son usados como sustratos; iii) La biosíntesis "de novo" de ácidos grasos; es la ruta principal cuando las fuentes de carbono en que son cultivadas las bacterias son fuentes de carbono simples.

La acumulación del poliéster de reserva PHB ha sido ampliamente documentada (Anderson et al., 1990). La presencia de éste en varias especies de *Rhizobium* durante la simbiosis (Wong y Evans 1971; Goodchild D.J. 1966; McDermott et al., 1989) y en vida libre (de Vries et al., 1986; Tombolini y Nuti 1989; Tavernier et al., 1997) ha sido reportada. A pesar de que se han propuesto numerosos papeles para el PHB en *Rhizobium*, hasta el momento ninguno de estos ha sido claramente demostrado.

Sabemos que en *R. loti* el PHB es sintetizado en la fase estacionaria y que en la fase exponencial es sintetizado y degradado continuamente en condiciones en las cuales no se acumula éste polímero (Encarnación, et al., 1995). Esto sugiere la presencia de un mecanismo regulatorio muy sensible que controla la acumulación y degradación de PHB.

Esta situación es especialmente favorable en organismos con una baja eficiencia en el ciclo TCA. La acumulación de PHB consume energía, carbono y poder reductor, esta utilización puede prevenir la inhibición por NADH de varias enzimas del ciclo de Krebs. Esto explicaría como aeróbicos estrictos como *R. loti*, pueden mantener un ciclo de Krebs funcional con la baja concentración de oxígeno requerida para la fijación de nitrógeno (Encarnación et al., 1995).

Nosotros hemos reportado que *R. loti* y otros *Rhizobium* tienen un metabolismo de tipo fermentativo cuando son subcultivados en MM (Encarnación et al 1995). Este metabolismo se caracteriza por: 1) una reducción en la tasa de crecimiento; 2) Excreción de ácidos orgánicos; 3) disminución en la actividades de la enzima piruvato carboxilasa (PC), piruvato deshidrogenasa (PDH), oxoglutarato deshidrogenasa (OGDH), y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PCKA); 4) acumulación de PHB; y 5) agregación celular.

Para el análisis del papel de la síntesis de PHB en *R. loti* hemos utilizado la mutante en la PHB-sintasa CAR1 (Fig.2) (Cevallos et al., 1996) la cual fue construida por inserción del cassette :*QSP* en el gene de la PHB sintasa (Fig.1).

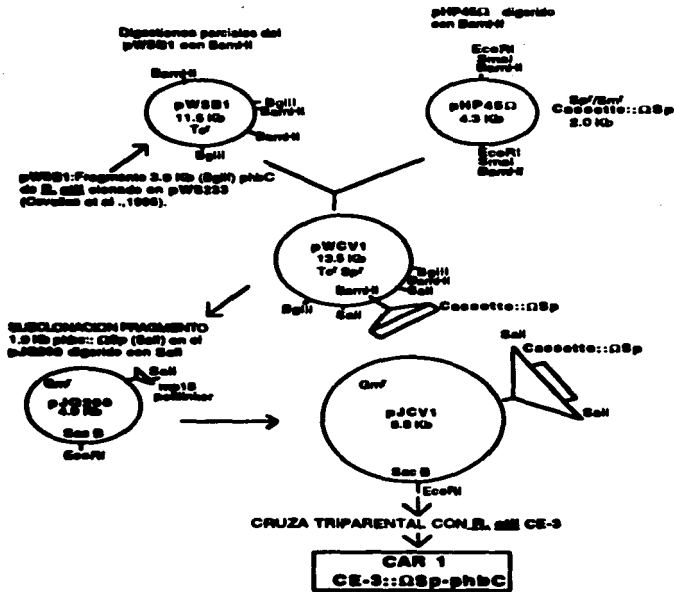


Fig.1 Obtención de la mutante PHB- por inserción del cassette::ΩSp en el gene *phbC* de *R. sol.*

Esta mutante no acumula PHB en ninguna de las condiciones probadas, excreta al medio altas concentraciones de aminoácidos y ácidos orgánicos, (Cevallos et al., 1996) y lo más sobresaliente es que crece pobremente en piruvato o glucosa como fuente de carbono, los cuales oxida en un 30 y 70%, respectivamente (Fig.2).

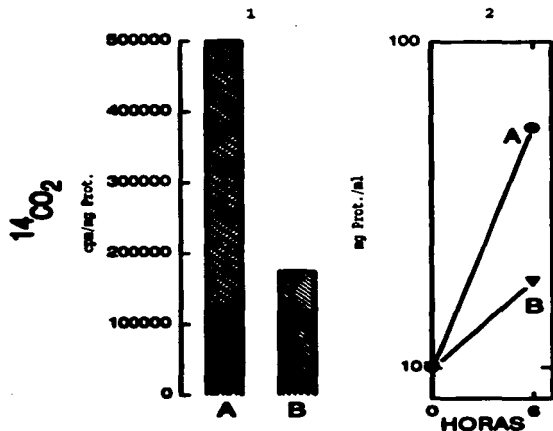


Fig.2. Oxidación de ^{14}C -Glucosa de las cepas de *E. COLI* CE3 y la mutante *phbC*- (CARI). Las cepas se crecieron en ^{14}C -Glucosa y NH_4Cl 10 mM c/u, a las 6h se midió el crecimiento y la incorporación de ^{14}C en $^{14}\text{CO}_2$. (1) Cuentas por min/mg Prot. de [^{14}C] glucosa- CO_2 ; (2) Crecimiento en mg Prot./ml de la cepa silvestre CE3 (A) y la mutante *phbC*- (B).

Además presenta una baja relación de NAD^+/NADH , algo que hemos relacionado con la síntesis nula de PHB ya que ha sido documentado que la presencia de nucleótidos reducidos en altas concentraciones en el interior de la célula producen inhibición de las enzimas del ciclo TCA, como la piruvato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa, citrato sintasa, e isocitrato deshidrogenasa. La cepa mutante *phbC*-, CARI, crecida en piruvato o glucosa presenta una baja actividad de PDM, lo que puede explicar el crecimiento deficiente de la cepa mutante en piruvato o glucosa como fuente de carbono. (Fig.3)

Con la finalidad de conocer cuales son los posibles mecanismos regulatorios que impiden a esta cepa crecer en piruvato o glucosa como fuente de carbono hemos mutagenizado al azar con el

pSUP5011 (Tn5 Mob) a la cepa CAR1 obteniendo tres aislados, (VEM58, VEM57 y VEM34). Estas cepas no acumulan PHB y crecen óptimamente en piruvato o glucosa, incluso mejor que la cepa silvestre (Fig.3).

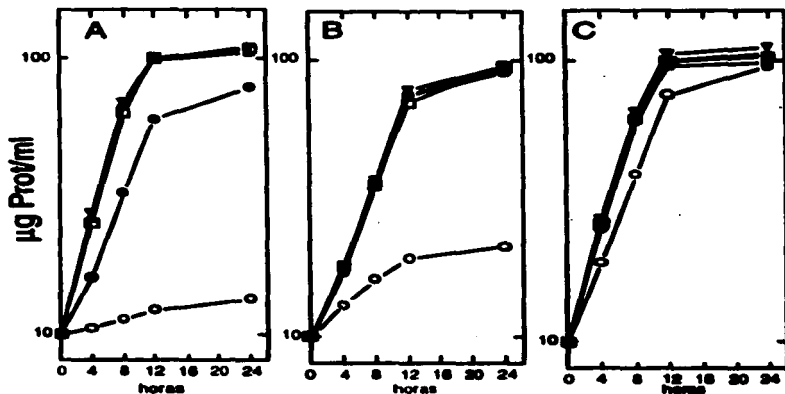


Fig. 3. Crecimiento de las cepas de *E. coli* CE3, *phbC*-, VEM-58, VEM-57, VEM-34 en MM con diferentes fuentes de carbono. Panel A: Piruvato-amonio (10mM c/u); Panel B: Glucosa-amonio (10mM c/u); Panel C: Succinato-amonio (10mM c/u). Cepa silvestre CE3 (●); mutante *phbC* (○); *phbC*::*Dep.tn5* (VEM34) (□); *phbC*::*Dep* (VEM57) (△); *phbC*::*Dep* (VEM58) (▽).

Además de expresar una mayor actividad de piruvato deshidrogenasa (PDM) (Fig.4).

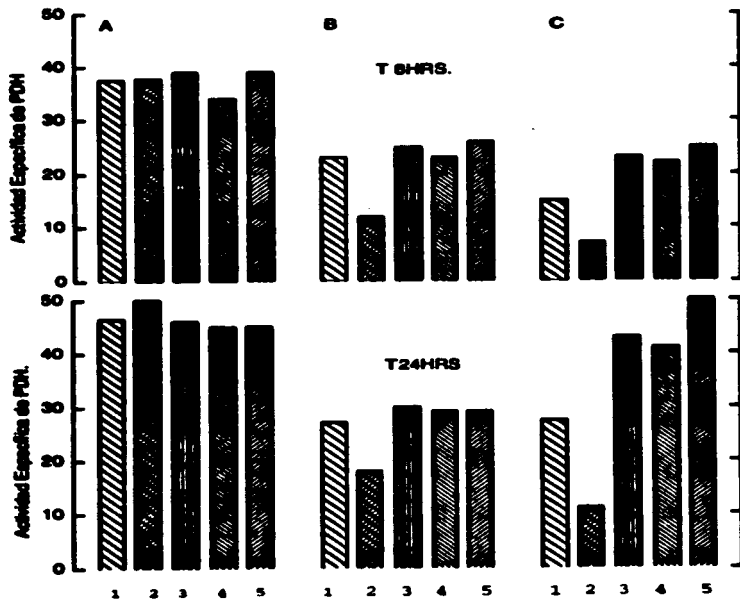


Fig.4 Actividades especificas de piruvato deshidrogenasa de *S.cerevisiae*, *phbC*⁻ y derivadas crecidas en diferentes fuentes de carbono. Panel A: Crecimiento en succinato-amonio 10mM c/u; Panel B: Crecimiento en glucosa-amonio 10mM c/u. La actividad especifica de la PDH es expresada como nanomolas de producto formado por minuto por miligramo de proteina. (1) Cepa silvestre CE3; (2) Mutante *phbC*⁻ (CAR1); (3) Mutante *phbC*⁻::*Gep*,*tn5* (VM58); (4) *phbC*⁻::*Gep* (VM57); (5) *phbC*⁻::*Gep* (VM34).

Estas segundas mutaciones fueron subclonadas, obteniendo mutantes que sólo contienen la segunda mutación. (Fig.5)

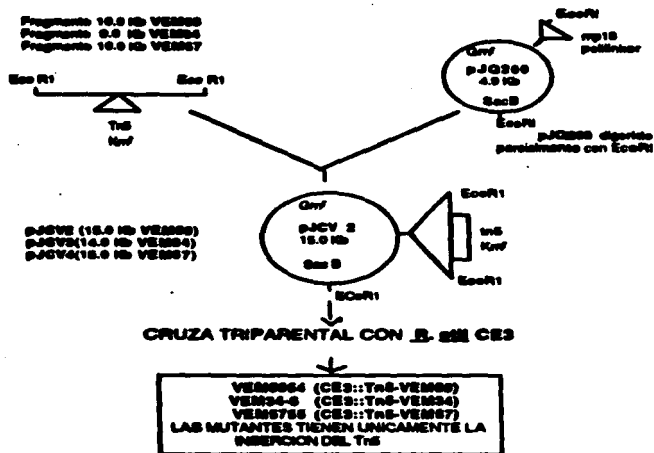


Fig.5 Clonación de la segunda mutación a partir de la digestión de DNA total de las cepas VE265, 57 y 34 con EcoRI, los fragmentos que contienen la inserción del transposón Tn5 fueron clonados en el pJQ200 y mediante cruce triparental se movilizaron a la cepa silvestre.

El patrón de hibridación de DNAs totales digeridos con EcoRI revela que las tres mutantes hibridizan con el plásmido pMSB1 que contiene el gene *phbC* (Cevallos et al., 1996), presentando en las tres cepas obtenidas una banda de mayor tamaño que la presente en la cepa silvestre, lo que nos sugiere la presencia del cassette *isp* en el

gene *pbhC* (Fig.6A). Por otro lado podemos observar al hibridar las mismas mutantes con el pSUP5011 (Tn5Mob), que las bandas obtenidas en las cepas VEM57 y VEM58 son del mismo tamaño y diferentes de la observada en la cepa VEM34 (Fig.6B), lo que fué corroborado después por la secuencia de los genes interrumpidos en los fragmentos clonados.

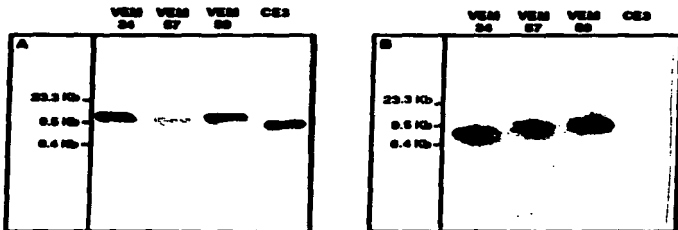


Fig.6. Hibridación del genoma de *E.coli* CES y mutantes CES::*Qsp-pbhC*, Tn5, usando como detectores en A) el plásmido pSUP5011 que es un fragmento de 3.0kb (*hgiII*) que contiene al gene *pbhC* de *E.coli* clonado en dicho vector, y B) pSUP5011 Tn5 Mob

Los fragmentos que contienen los Tn5 de cada una de las cepas fueron clonados en el pJQ200 y mediante una cruce triparental las mutaciones fueron transferidas a la cepa silvestre obteniendo las mutantes VEM58-54, VEM57-55, VEM34-6 (Fig.5). Esto se hizo con la finalidad de estudiar el fenotipo de las mutaciones con tñ5 en la cepa silvestre, observando que la acumulación de PHE en dos de las mutantes sencillas (VEM58-54 y VEM57-55) fué sólo el 40% de la observada en la cepa silvestre.

Como mencionamos en el párrafo anterior los fragmentos conteniendo los Tn5 de éstas dos mutantes fueron clonados y secuenciados, en el fragmento clonado de la mutante VEM58 se identificaron dos fases de lectura abierta (ORF), el ORF1 (574 pb) contiene la inserción del Tn5, y su secuencia nucleotídica presenta un 80% de homología con el ORF1 de *E.coli* (Tombolini et al., 1995) (Fig.7) y alta homología con el ORF4 encontrado en *Stromotolium vivianum* y *Shigella flexneri* (Liebergesell y Steinbüchel, 1992; 1993).

orf R.mal	MNSKQKQVI KQKNSRLAN TGSTAVTLQ DLAMNNGE DFTVQDKG	50
orf R.etli	MNSKQKQVI KQKNSRLAN TGSTAVTLQ DLAMNNGE DFTVQDKC	50
Consensus	M..NSKQKQVI KQKNSRLAN TGSTAVTL. DL.A.NNNGE DF.VQDK..	50
orf R.mal	KDTNSMLRQ IIFQREKNG MLLPISFLR QLIETVYQDM QMVAFTLKH	100
orf R.etli	KDTNSMLRQ IIFQREKNG MLLPISFLR QLIETVYQDM QMVAFTLKH	100
Consensus	.KDTNSMLRQ IIFQREKNG MLLPISFLR QLI..YQDM QMVAFTS.LKH	100
orf R.mal	SNAPTRQQA QNSQITKAF GQYPIGNLK VPLQVW-ED VNSVTSPIQ	149
orf R.etli	SNAPTRQQA QNSQMAVAF GQYPIGNLQ LKPNQPMK FAANTLPIQ	150
Consensus	SN.APTRQQA QNSQ...AF G.TP.GNL. .P.Q..... ..NTE.F.Q	150
orf R.mal	AKQSFPTWA APPAKETWA ENKIDELKE QLNALQWLD NLG	192
orf R.etli	AKQSFPTWA PPAKGA-KT ENKIDELKE HAVLN-KLD NL-	190
Consensus	AKQSFPTWA .P.AK..... ENKIDELKE ..R....KLD NL.	193

Fig.7 Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias nucleotídicas del ORF 1 de *E.coli* cepa CE3 y del ORF de *E.coli* (Tomblini et al.,1994).

En estas bacterias, a diferencia de *E.coli* y *E.etli*, el ORF4 se encuentra localizado entre los genes *gbbA* y *gbbB*. Al ser clonado el ORF1 de *E.coli* en *E.coli*, se observó la presencia de una proteína de 22 kDa. Por otro lado en *E.coli* el peso molecular (PM) deducido de la secuencia de nucleótidos de este ORF da un producto de 17 kDa. Cabe señalar que a pesar de haberse reportado la presencia de este ORF en 3 géneros diferentes aún no ha sido posible asignarsele ninguna función. La secuencia nucleotídica del ORF de *E.coli* presenta el inicio de transcripción, la posible zona de unión a *Ribosome* (Shine Dalgarno). El segundo ORF (ORF2) presenta homología con genes de β -cristalinas (Fig.8) lo que sugiere un posible papel del ORF1 en la síntesis del PHB.

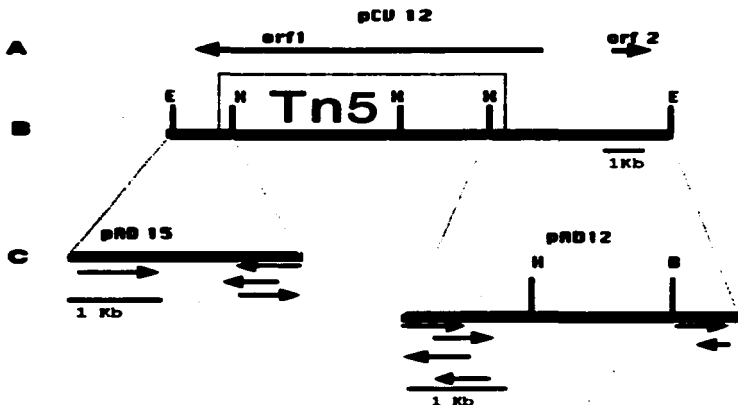


Fig.8 Organización del plásmido pCU12 clonado de la cepa VEM58, éste plásmido contiene el ORF1 interrumpido por el *tn5* y un ORF que tiene homología con el gene *nhbA* de *S.maltophilia*. En (A) podemos observar la posición y orientación de las fases de los ORFs, (B) el mapa físico del plásmido y sitios de restricción identificados, y en (C) la estrategia de la secuencia de DNA.

Actualmente se realizan estudios que permitirán dilucidar la función de este ORF1 en la acumulación de PNB y en el papel de éste en el metabolismo de carbono en *Miscobacter stii*. La presencia de este ORF estructuralmente ligado, al menos al gene *nhbA*, (Fig.8), y la disminución en la acumulación de PNB en la cepa VEM 58-54 y VEM 57-55, las cuales presentan el gene interrumpido por *tn5*, sugiere un papel de este gene en la regulación de la biosíntesis del PNB.

Como mencionamos anteriormente, *S.maltophilia* al ser subcultivado en *MM* cambia su metabolismo de aeróbico a fermentativo (Encarnación et al., 1995), presentando una serie de cambios morfofisiológicos, dejando de crecer al ser subcultivado en *MM*. Sin embargo, al subcultivar a *S.maltophilia* cepa VEM58 en *MM*-piruvato, condición en la cual la cepa de *S.maltophilia* CE3 deja de crecer en el segundo subcultivo, observamos que ésta doble mutante contiene una mutación en el ORF1 y que mantiene su crecimiento en el segundo subcultivo (Fig.9).

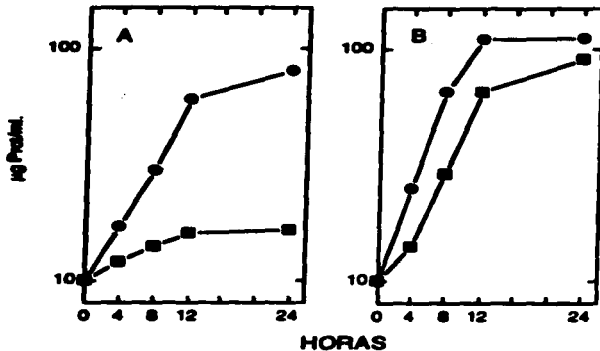


Fig. 9 Crecimientos de las cepas de *E. coli* CE3 y VEM55 (p_{hbc}::G_{esp}, ORF1::tn5) en subcultivas en MM con piruvato-amonio. Panel A: cepa silvestre CE3; Panel B: mutante VEM55 (p_{hbc}::G_{esp}, ORF1::tn5). (●) Primer subcultivo; (■) Segundo subcultivo.

Esto nos sugiere que éste ORF puede tener un papel central en la biosíntesis de PHB regulando el flujo de carbono en virtud de que como mencionamos anteriormente, el PHB además de ser sintetizado de la manera clásicamente descrita, también lo hace a partir de ácidos grasos, o precursores de éstos y compete con la síntesis de ellos, lo que podría ser señalado como un indicador de cambio de metabolismo de aeróbico a fermentativo. Es importante mencionar que cuando *E. coli* deja de crecer durante la fase estacionaria, sufre una disminución en la concentración de los ácidos grasos que constituyen su membrana (El-Khani et al., 1981). Para apoyar esta proposición es conveniente señalar que la cepa de *E. coli* CE3 al ser subcultivada en MM (succinato-amonio) suplementado con ácidos grasos como palmítico y esteárico, es capaz de crecer continuamente. Como ya se mencionó; la biotina que es cofactor de una de las enzimas que participan en la síntesis de ácidos grasos, impide el cambio del metabolismo en *E. coli*. Por otro lado en *Escherichia coli* W-15, esta misma vitamina produce un efecto inhibitorio en la síntesis de PHB (Chowdhury et al., 1996). Por lo anterior, además del efecto descrito sobre la piruvato carboxilasa que impide la acumulación de PHB, (Dunn et al., 1996), evitando el cambio del metabolismo de aeróbico a fermentativo, la biotina también podría tener un efecto en la regulación del flujo de carbono hacia ácidos grasos, evitando que éste sea acumulado como PHB.

como sucede en condiciones fermentativas (Encarnación et al., 1995). En este contexto y apoyándonos en la evidencia de que la mutación en el ORF produce una disminución de hasta un 60% en la acumulación de PHB, el papel del ORF sería el de regular el flujo de carbono hacia PHB, compitiendo por el carbono que en condiciones de crecimiento exponencial pretende ser llevado al ciclo TCA y a la síntesis de ácidos grasos.

Por último, como ya lo hemos propuesto con anterioridad y pudimos corroborar con el presente trabajo, el PHB debe ser considerado como un producto de fermentación que secuestra poder reductor, necesario para la operación del ciclo TCA bajo condiciones microaeróbicas.

4.1.- AVANCES DEL TRABAJO DE INVESTIGACION
TITULADO: "CLONACION Y REGULACION DE LA CATALASA-
PEROXIDASA DE *Escherichia coli*".

4.2.- CLONACION Y REGULACION DE LA CATALASA-PEROXIDASA DE *Bifidobium coli*.

El estrés oxidativo ocurre cuando la concentración de especies activas de oxígeno en la célula son más abundantes que los mecanismos de defensa de la célula y el daño al DNA, RNA, proteínas y lípidos puede ocurrir. En consecuencia, virtualmente todos los organismos aeróbicos cuentan con sistemas de defensa.

La respuesta bacteriana al estrés oxidativo ha sido extensamente demostrada en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Un grupo de genes y sus productos, que son responsables de la respuesta al estrés oxidativo han sido identificados, éstos incluyen catalasas, peroxidasas, superóxido dismutasas, enzimas reparadoras de DNA, etc.

En bacterias fijadoras de nitrógeno poco se conoce acerca de su respuesta al estrés oxidativo o sobre su habilidad para sobrevivir a diversas condiciones en el suelo y menos se sabe la manera de cómo les afecta, particularmente, el estrés oxidativo en la actividad celular durante el establecimiento de la simbiosis.

Es importante mencionar que no sólo en presencia de oxígeno en bacterias aeróbicas o aeróbicos facultativos se generan especies oxidantes dañinas al metabolismo general de estas bacterias. También en bacterias anaeróbicas, por medio de la reacción de Fenton, el peróxido de hidrógeno libre, reacciona con metales en transición para formar el más poderoso y altamente reactivo oxidante, el radical hidroxilo (OH \cdot) (Halliwell et al., 1990; Ayan et al., 1992). El anión superóxido y el peróxido de hidrógeno pueden también ser generados por autooxidación de deshidrogenasas, tioles, flavinas, oxidasas y por radiación de luz UV (Farr et al., 1991).

En numerosos estudios realizados con bacterias anaeróbicas han demostrado que especies sensibles a oxígeno tienen diferentes rangos de tolerancia frente a este compuesto y que no responden a él de una manera uniforme. Por ejemplo, se han reportado algunos tipos de bacterias que permanecen viables por largos períodos en presencia de oxígeno y/o radicales libres (Finegold et al., 1989; Morris J.G., 1980). En el caso específico del nódulo que es donde se aloja *Bifidobium* durante la simbiosis, la presencia y acción de varias proteínas requeridas durante ésto proceso como son la ferróxidasa, uricasa, hidrogenasa y leghemoglobina (Dalton et al., 1991) están sujetas a un proceso de autooxidación generando especies altamente reactivas (Puppo et al., 1981). Por esto se ha sugerido que en algunas bacterias microaeróbicas, como en organismos aeróbicos, la presencia de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa juegan un papel importante en la detoxificación de especies reactivas generadas por el metabolismo aeróbico por la reacción de Fenton (Morris J.G., 1980; Rocha et al., 1996). Nuestro interés es conocer en *B. coli* cuál es el papel de la catalasa, no sólo en vida libre, sino también en simbiosis.

Bifidobium ha sido clasificado como un organismo microaeróbico porque sólo fija nitrógeno en microaerobiosis. Una

ventaja de vivir en microaerobiosis es que en éste estado la bacteria se protege contra el daño oxidativo. Hemos observado que *M. tuberculosis* es muy sensible al daño por peróxido de hidrógeno cuando crece en un medio completo (PY), sin embargo cuando lo hace en MM, condición que induce al metabolismo fermentativo, esta bacteria se vuelve resistente a este agente. Asimismo cuando la bacteria se cultiva en MM con suplementos como biotina o tiamina (Fig.1), condiciones que mantienen el metabolismo aeróbico, *M. tuberculosis* responde haciéndose muy sensible al daño por peróxido de hidrógeno. De la misma manera una cepa de *M. tuberculosis* mutada en el gene *rscA* (Martínez-Salazar et al., 1991), la cual presenta una mayor sensibilidad al daño a DNA que puede ser producido entre otros agentes por el peróxido de hidrógeno, fue más resistente al H₂O₂ con solo cultivarla previamente en MM (Fig.1).

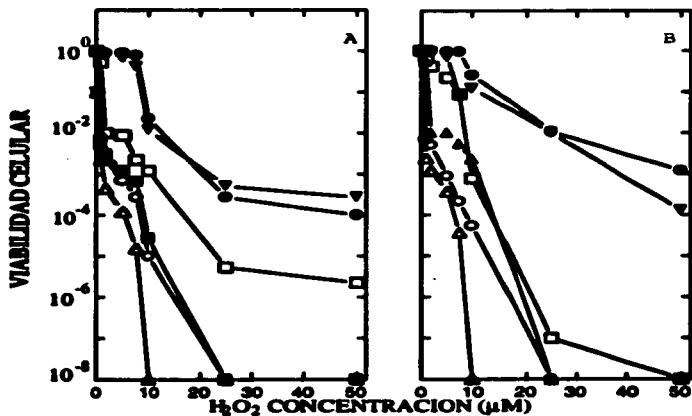


Fig.1 Viabilidad celular de la cepa silvestre CB3 y Sec A⁻ de *M. tuberculosis* contra concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) después de crecer en diferentes medios. La exposición de las células contra H₂O₂ se hizo por 15 minutos, después de las 12h (A) y 24h (B) de crecimiento. Las células de la cepa CB3 se cultivaron en: PY (○); MM (●); MM inoculando con D.O. de 0.003 (■); MM-tiamina (10 µg/ml) (△); MM-biotina (1 µg/ml) (□). Las células de la cepa SecA⁻ se incubaron en: PY (○); MM (▽).

Otra condición donde R. solii presenta un cambio en la sensibilidad a H₂O₂ es cuando iniciamos un cultivo en MM con un bajo inóculo (0.003 B.C.) en lugar de 0.05 B.C. En esta condición el crecimiento es óptimo, el cambio al metabolismo fermentativo no se observa y la bacteria es muy sensible a este agente oxidante.

En función a lo anterior se decidió estudiar el papel de la enzima catalasa en lo relacionado a la resistencia de R. solii al peróxido de hidrógeno, en particular si es resistente a este compuesto cuando crece en MM.

Por lo anterior nos planteamos que la misma concentración de la catalasa podría ser más efectiva cuando la bacteria lleva a cabo el cambio del metabolismo aeróbico al fermentativo que conlleva la agregación celular y los procesos antes mencionados, además de que en estas condiciones la difusión del H₂O₂ se reduce. En un reporte relativamente reciente se presenta evidencia en R. solii de que cuando se incrementa la concentración celular se observa agregación bacteriana y en estas condiciones la misma concentración de la catalasa reduce el H₂O₂ del medio mejor de lo que lo hace en células no agregadas (Ma y Eaton, 1992). Evidencias preliminares sugieren que algo parecido puede estar pasando en R. solii.

En R. solii existe una incompatibilidad en expresar una óptima capacidad oxidativa y una adecuada resistencia contra el daño oxidativo (Fig. 1). En este contexto R. solii debe ser considerado un organismo microaerófilico, y así ha sido clasificado sólo por su capacidad para fijar nitrógeno en condiciones microaeróbicas (Krieg et al., 1986). Sobre este tema se ha reportado que en los nódulos de plantas leguminosas se expresan varias enzimas necesarias para detoxificar agentes superoxidantes (Becana et al., 1986, 1989; Dalton et al., 1991). La alta sensibilidad de R. solii al H₂O₂ cuando crece aeróbicamente, podría ser un factor importante para que este organismo entre en simbiosis con la planta.

La agregación celular, al crear un ambiente microaeróbico y un estado fermentativo, contribuye a la protección contra el H₂O₂ en R. solii cepa CE3 cuando crece en MM.

Como ya mencionamos anteriormente, un mecanismo anti-oxidante que elimina especies reactivas generadas por el metabolismo aeróbico, es mediado por la actividad de catalasas y peroxidasas. Algunos microorganismos presentan más de una isoenzima de catalasa y sabemos que en R. solii se encuentra presente una sola forma, sin importar la condición de crecimiento y el tipo de estrés al que es sometida la bacteria (Fig. 2).

Escherichia coli

RAMCES

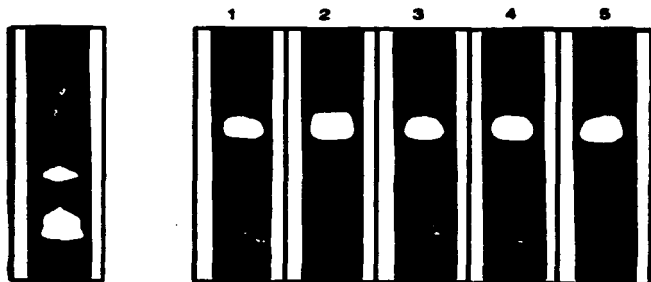


Fig.2. A diferencia de otras bacterias como *Escherichia coli* que posee más de una catalasa. *E. coli* presenta una sola actividad electroforética, sin importar las condiciones metabólicas a las que es sometida la bacteria. Condiciones de cultivo: 1.- Medio Rico (RY), 2.-Medio mínimo (RM) en fase estacionaria, 3.-RM en fase exponencial, 4.-Previo estrés por alta temperatura, 5.-Previo estrés por pérdida de hidrógeno (15 μ M). (El método utilizado fue reportado por de Woodbury et al., 1971).

E. coli presenta dos isoenzimas al igual que las cepas de *E. coli* biotipo I (299) y biotipo II (899) (Fig.3).

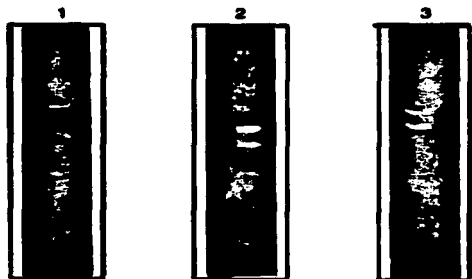


Fig.3. *Rhizobium meliloti* (1), *Rhizobium lotii* subgrupo A, cepa 299 (2), y subgrupo B, cepa 899 (3). Estas especies presentan dos catalasas las cuales se expresan dependiendo de las condiciones de crecimiento.

R. lotii presenta un incremento de la actividad de catalasa en la fase estacionaria de crecimiento en MM (Fig.4).

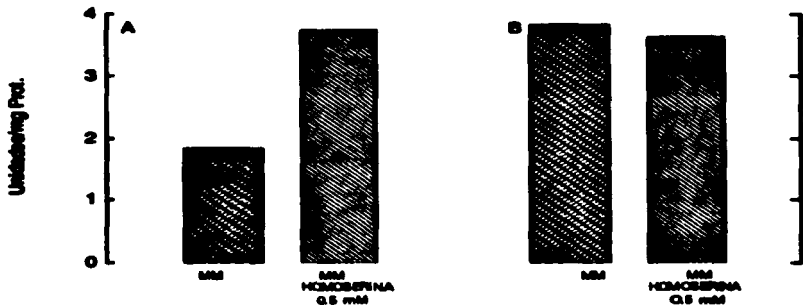


Fig. 4. Actividad de la enzima catalasa en *R. lotii* cepa CE3 cultivada en MM y MM Homocistina en fase exponencial y estacionaria. Panel A: Las células se cultivaron en MM y en MM-homocistina durante 8h; Panel B: Las células se cultivaron durante 24h en iguales condiciones que A. (El método utilizado fue reportado por de Abi et al., 1994).

En *E. coli* se observa una sola actividad de catalasa en MM, pero al adicionar homoserina se presenta otra actividad de catalasa (Fig.5). En *E. coli* no observamos ningún efecto de la homoserina en la regulación de las dos isoenzimas que presenta esta bacteria (Fig.5).

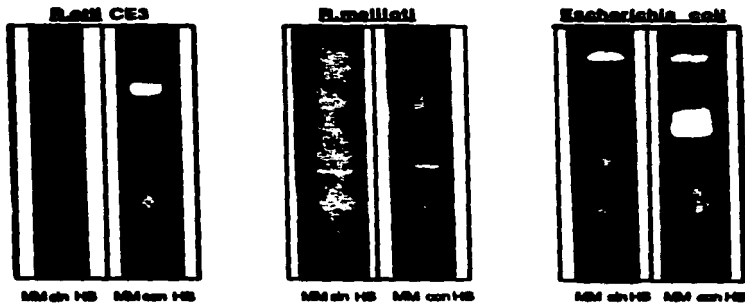


Fig.5. En bacterias cultivadas en MM suplementadas con homoserina (1 mM). La homoserina regula la actividad y la aparición de diversas entidades electroforéticas. De esta forma en *E. coli* la actividad de la única enzima presente es más del doble, en *E. coli* aparece una segunda actividad electroforética, al igual que en *Escherichia coli*.

En *E. coli* la regulación de la catalasa muy posiblemente es a través de homoserinas lactonas, al igual que ha sido recientemente descrito en *E. coli* (Shellhorn et al., 1995) donde se regula la actividad de catalasa principalmente en la fase estacionaria. Algo similar hemos observado en *Shigella*, en la fase exponencial, en presencia de homoserina. (Fig.4)

Para conocer con más detalle el papel de la catalasa en *E. coli* hemos obtenido en el laboratorio por mutagénesis al azar, con el pSUP5011 (Tn5 Mob), una mutante sin esta actividad (VEM 16-73) (Fig.6), la cual utilizamos para la complementación con el banco genómico de *E. coli* del cual se obtuvieron 6 plásmidos (Fig.6)

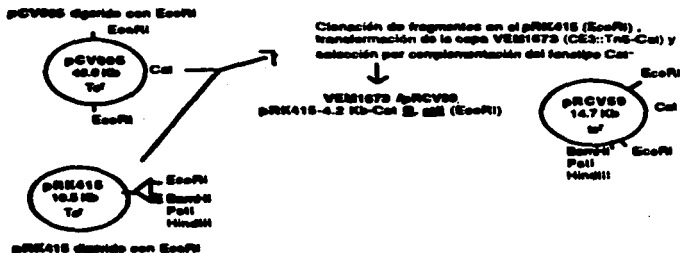


Fig.7 Subclonación del gene de catalasa de *Rhizobium etli* cepa CE3 y mapeo con enzimas de restricción de la región clonada.

Mediante hibridación con el pSUP5011 comprobamos que el *tn5* se encuentra localizado en esta banda (Fig.8).

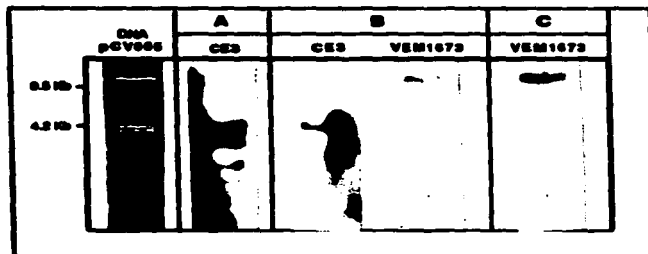


Fig.8. Hibridación en condiciones de alta severidad de DNA's genómicos de *R. etli* cepa CE3 y la mutante VEM 16-73 usando como detectores A) pCV005 (pLAFRI-20 kb BamHI-Cat, b) pRCV59 (pPRK415-4.2 kb EcoRI-Cat, C) pSUP5011 (Tn5 Mob).

De la misma manera al complementar a la mutante VEM 16-73 con el plásmido de 20 kb (pCV005) o el fragmento pequeño de 4.2 kb (pRCV59) la mutante recupera la actividad de catalasa, como se puede observar en un gel de poliacrilamida en condiciones nativas (Fig.9).

cual al ser secuenciado presentó una alta homología con el gene *oxyE* de *E. coli*, miembro de la familia de reguladores transcripcionales tipo *lyxR*. En *E. coli* y *Styobacterium* este gene regula a la catalasa HPI (Tao et al., 1989; Christman et al., 1989) que es una catalasa peroxidasa parecida a la catalasa-peroxidasa que encontramos en *E. coli*. Así, se ha clonado no sólo el gene que codifica para la enzima catalasa, sino también su regulador. Por otro lado se ha descrito con anterioridad que 9 proteínas necesitan el producto de *oxyE* para su inducción durante el estrés oxidativo (Christman et al., 1989), y existe el reporte de que este gene es también necesario en el cambio morfológico de las colonias bacterianas y la habilidad para autoagregarse que normalmente presenta *E. coli*. (Warne et al., 1990).

Se ha reportado también, que durante el crecimiento, las células tienen capacidad para responder rápidamente a cambios ambientales regulando la expresión de grupos de genes en respuesta a diferentes tipos de estrés. Este tipo de regulación es controlada por los productos de los genes *oxyA* o *oxyR* (Dempse, B., 1995; Neidhardt et al., 1987; Siegel y Koltter, 1992). Además, recientemente se ha descrito la presencia en *E. coli* de una proteína que se pega al DNA la cual es abundante en células privadas de nutrientes y es importante en la defensa a diversos tipos de estrés, observando que los niveles de RNAM de esta proteína son controlados además de *oxyS* y la proteína IHF, por el activador transcripcional *oxyE* (Altuvia et al., 1994).

Será muy interesante definir en *E. coli* los genes regulados y el papel del producto de *oxyE* en la defensa a diversos tipos de estrés y su papel durante la fase estacionaria.

Recientemente ha sido reportada la clonación del gene *katA* de *E. coli* (Mérout et al., 1996). Este gene codifica para una catalasa que se induce por peróxido de hidrógeno. Este estudio revela la presencia de un segundo gene, aún no clonado, lo que ha impedido a los autores tener una mutante total en esta actividad enzimática y conocer el fenotipo en vida libre y en simbiosis. En *E. coli* como mencionamos anteriormente, sólo se presenta una actividad enzimática de la cual tenemos el gene clonado y la mutante respectiva nos ubica en una posición inmejorable para describir el papel de esta enzima tanto en vida libre, como en simbiosis. Por otro lado sabemos que en *E. coli* la presencia en el medio de cultivo de homoserina un precursor de homoserinas lactonas, (Huisman et al., 1994), que son consideradas señales de densidad celular, regula la velocidad de crecimiento de la bacteria y la actividad enzimática de la catalasa, incrementando su actividad en fase exponencial al doble, respecto al control sin homoserina.

Observamos que un óptimo funcionamiento y operación del TCA resulta en que las bacterias se hagan sensibles al oxígeno, mientras que, en contraste, la operación deficiente de este ciclo de algún modo puede protegerlas contra el daño oxidativo.

Proponemos que en *E. coli* en condiciones de metabolismo aeróbico, el papel de las bacterias que protegen contra el estrés oxidativo, entre ellas la catalasa, es directo. En el metabolismo fermentativo, la agregación celular, la reducción en la producción de donadores de electrones y el decremento en el nivel y la actividad

respiratoria durante la disminución del crecimiento, es parte integral del sistema de defensa en contra de los radicales libres producidos.

**4.2.- AVANCES DEL TRABAJO DE INVESTIGACION
TTULADO: "SEÑALES DE DENSIDAD TIPO ACIL-
HOMOSERINAS LACTONAS Y ANALISIS ESTRUCTURAL DE
UN GENE HOMOLOGO A LA FAMILIA DE AUTOINDUCTORES
TIPO *inxR* EN *Brizobium coli*".**

4.3.- SEÑALES DE DENSIDAD TIPO ACIL-HOMOSERINAS LACTONAS Y ANALISIS ESTRUCTURAL DE UN GENE HOMOLOGO A LA FAMILIA DE AUTOINDUCTORES TIPO *luxR* EN *Rhizobium* *soli*.

La superfamilia de proteínas respuesta-reguladores tienen un módulo activador, carboxilo-terminal (Dorman et al., 1992; Russo et al., 1993; Haiminoff et al., 1988). La conservación de homología con la secuencia amino-terminal del módulo regulador, ha definido una serie de subclases que corresponden a diferentes mecanismos de regulación. Un grupo, incluye, por ejemplo, *FixJ* y *NarX* (Stock et al., 1989), los cuales son activados a través de fosforilación por una cinasa sensora, en respuesta a estímulos ambientales. Otra subclase incluye *LuxR*, *Tral*, *LasR* y *CarR*, las cuales son activadas por la interacción con acil homoserinas lactonas (acil-HSLs) que son reguladores de respuesta, asociados funcionalmente a homólogos de *LuxI*, algunos de los cuales ya han sido identificados.

La localización propuesta para el producto de *luxR* es, unido a la superficie interna de la membrana citoplasmática, con el dominio amino-terminal (sitio de unión al autoinductor) en contacto con la membrana y la región carboxilo-terminal (activador transcripcional) extendido dentro del citoplasma (Koblichurck et al., 1993). Esto tiene paralelo con el sistema *EnvZ-OmpR* descrito en *Escherichia coli* K-12 (Dorman et al., 1992; Parkinson, J.S., 1993). En esta bacteria *EnvZ* es una proteína localizada dentro de la membrana y sensa directamente la osmolaridad del medio pasando la señal al fosforilar el activador transcripcional *OmpR*.

En el sistema *luxR*-acilHSL, los sensores responden a un estímulo "secundario" que tiene su origen en las células vecinas. Esto permite la rápida respuesta a una señal dirigida a una población, independiente de la estimulación directa o continua a células individuales por los estímulos ambientales primarios como, cambios de pH, privación de nutrientes, etc. En este sistema autoinducible, con una señal de difusión se proporciona una rápida y posiblemente irreversible modulación de la expresión genética.

La activación genética dependiente de la densidad celular por reguladores transcripcionales de la familia *luxR*-*luxI* es común a diversos grupos de bacterias gram-negativas. Este mecanismo involucra la interacción de señales extracelulares producidas por estos organismos, llamados autoinductores que se acoplan con proteínas activadoras de la transcripción. Debido a que un autoinductor es normalmente acumulado, se requiere una concentración umbral la cual sólo se obtiene después de que una densidad celular ha sido lograda. La familia de activadores transcripcionales involucra entre otros a *luxR* (el cual regula la bioluminiscencia en *Vibrio fischeri*) (Greenberg et al., 1979; Hanzelka et al., 1995). Entre otros están *lasR* (activa la virulencia en *Pseudomonas aeruginosa*, Gambello et al., 1991) y *traR* (el cual regula la conjugación en *Agrobacterium tumefaciens*) (Pirhonen et al., 1993; Piper et al., 1993; Gambello et

al., 1991; Devine et al., 1988; McGowan et al., 1995).

Así, la producción por bacterias gram negativas de un gran rango de acil-MSLs tiene una importante implicación para el control espacial y temporal de la expresión génica. Es claro que los múltiples homólogos de *luxI* pueden responder cada uno a un tipo dado de acil-MSL pero con diferentes grados de activación. Existe la posibilidad adicional de que un solo tipo de bacteria pueda producir múltiples acil-MSLs como parece ser el caso de *E. coli*, cepa CE3, dando el potencial de una complejidad considerable. Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas de esas moléculas determinan sus características de difusión y el camino de esta partición entre compartimentos celulares (tales como la cápsula, periplasma, membrana y citoplasma). Por lo tanto, diferentes señales moleculares pueden tener diferentes papeles de comunicación intracelulares y/o extracelulares, dependiendo de la naturaleza de la matriz de crecimiento y de la localización del regulador de respuesta, permitiendo la integración de las sofisticadas redes de señales de comportamiento de tipo bacteriano-multicelular.

El mecanismo de señales intercelulares involucrado en el comportamiento multicelular por bacterias reta nuestro enfoque tradicional acerca de la biología de células bacterianas. Antes que ser una identidad individual y autónoma, las células bacterianas son intrínsecamente dependientes de sus vecinas para adquirir información. La producción de un rango de moléculas mensajeras tipo *luxI*, es claramente central, subrayando los sistemas de comunicación involucrados en algunos de los aspectos más fundamentales del comportamiento de bacterias gram negativas. La distribución ubicua de los genes homólogos de *luxI* sugiere que este sistema puede ser universal entre las bacterias gram negativas. Las ventajas en el control bacteriano de especies patógenas, y el conocimiento de este lenguaje universal puede ser una clave para la manipulación bacteriana.

Como se puede documentar en el artículo "Fermentative and aerobic metabolism in *Shibobium*" (Encarnación et al., 1995), las cepas de *Shibobium coli*, *S. melibiose* y *S. tronci* disminuyen su capacidad para crecer después de varios subcultivos sucesivos en MM, con un patrón característico para cada especie, sin embargo si *S. coli* se inocula a baja densidad celular, este organismo es capaz de crecer continuamente sin acumular FMS (Fig.1).

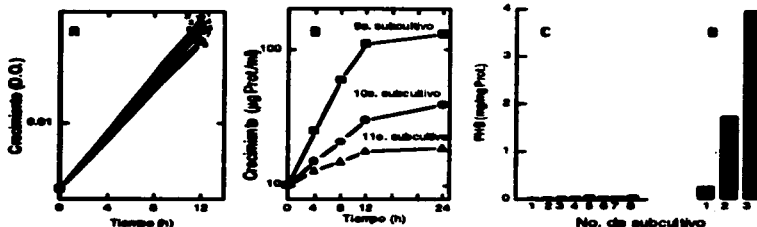


Fig.1. Crecimiento y acumulación de PNB en *Rhizobium* después de varios subcultivos en MM. panel A: Crecimiento de la cepa silvestre CE3 con un inóculo bajo (0.003 D.O.) en MM (succinato-amonió, 10 mM c/u), durante 3 subcultivos; Panel B: Crecimiento de la cepa silvestre CE3 igual que en A pero al final del 3o. subcultivo se incubó con un inóculo inicial alto (0.05 D.O.) y se subcultivó 3 veces más; Panel C: Acumulación de PNB al final de cada subcultivo de acuerdo al crecimiento de A; Panel D: acumulación de PNB al final de cada subcultivo de acuerdo al crecimiento de B.

Esta observación la hemos relacionado con el cambio de metabolismo de aeróbico a fermentativo. Recientemente se ha demostrado que muchos procariotes son capaces de modular su crecimiento y en algunos casos, sensar la densidad celular por la producción de señales moleculares extracelulares llamadas autoinductores (Ulitzur et al., 1989; Dorman et al., 1992; Stock et al., 1989; Parkinson et al., 1992, 1993; Russo et al., 1993; Salmond et al., 1995).

Rhizobium leguminosarum bv. *viciae* contiene un activador transcripcional, *RhIR* que es miembro de la familia de activadores transcripcionales tipo *lamB*. *RhIR* activa un operón de genes expresados en la rizósfera (el operón *RhIRAC*) el cual juega un importante papel en la nodulación (Cubo et al., 1992). Este operón se encuentra adyacente al gene *rhIR* en el plásmido simbiótico (Dibb et al., 1984).

La regulación de *luxS* requiere como autoinductor una señal molecular difusible del tipo de las N-acil-L-homoserinas lactonas (AHLs), también llamadas autoinductores (Bainton et al., 1992; Williams et al., 1992; Fuqua et al., 1994).

En *Rhizobium* ha sido detectada la producción de estas moléculas las que han sido identificadas como bacteriocinas (Schripsema et al., 1996), las cuales inhiben el crecimiento en varias especies y cepas. La presencia de este tipo de moléculas es característica de este género de bacterias, las cuales tienen además, la típica propiedad que es la de fijar nitrógeno, en asociación con plantas leguminosas, por lo que consideramos que es posible que estas dos propiedades estén relacionadas.

Como ya mencionamos anteriormente, *S. celli* disminuye su capacidad de crecimiento en MM después de subcultivos sucesivos, pasando de un metabolismo aeróbico a uno fermentativo. Sin embargo si el medio es inoculado a baja densidad (Fig.1) el organismo es capaz de crecer continuamente. Proponemos que el cambio de metabolismo es disparado por señales de densidad celular, resultando en la regulación de las enzimas del ciclo TCA. La presencia de un homólogo de *luxR* en *S. lacustris* (Cubo et al., 1992) hace posible que el producto de este gene sea un intermediario en la regulación a través de una señal de densidad celular que serían AHLs.

La homoserina, un precursor de homoserina lactona regula el crecimiento y la acumulación de PHB de *S. celli* (Fig.2) y *S. pallidus* en MM, además, de mantener aeróbicamente el crecimiento de estas especies.

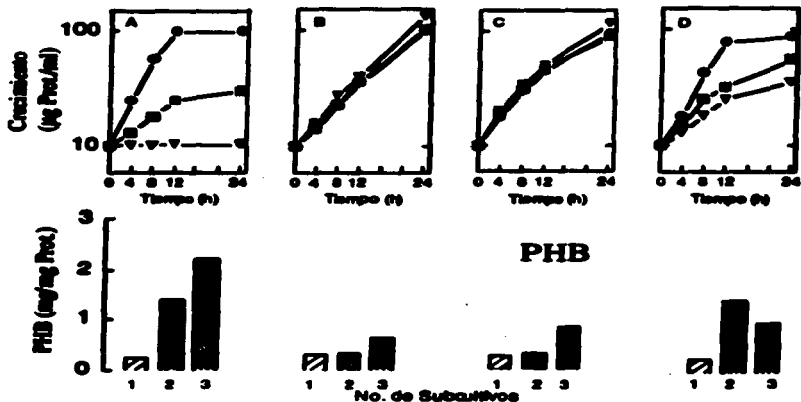


Fig 2. Crecimiento y acumulación de PHB de la cepa silvestre de *S. celli* C23 en MM y con homoserina. En todos los casos la cepa se subcultivó en MM (succinato-amonió 10 mM c/u). Pánel A: MM; Pánel B: MM + 1.0 mM de homoserina; Pánel C: MM + 0.5 mM de homoserina; Pánel D: MM + 0.1 mM de homoserina. (●) Primer subcultivo; (■) Segundo subcultivo; (▼) Tercer subcultivo. Abajo de cada pánel se observa la acumulación de PHB después de cada subcultivo.

En *E. coli* se clonó un fragmento de 1.4 kb que se encuentra cercano al gen que codifica para la enzima piruvato carboxilasa (PC) (Dunn et al., 1996). Este fragmento de 1.4 kb contiene una fase de lectura abierta (ORF). Posteriormente, se procedió a secuenciar este fragmento (Fig.3), encontrando que presenta una alta homología con genes de la familia de autoinductores, *luxR*, *traR*, *adiA*, *lasR* y *xisR*, además de presentar la secuencia conservada hélice-vuelta-hélice, característica de esta familia de reguladores. Este ORF tiene un tamaño de 735 pb. (Fig.3).

```

AAGCCGCTTACCGATCAACTGTAACACAGCCGCCAACCGCCCTCGATCGCCGCTCAGGTCGCGGCAAGAGGCGCTATTCT -78
GTGATGTGATCTTTAAATCAATGCTTATATCTCTGGAGATGCGCCAAATCGCCGACCCCTCTGCGCCAAATCTC
VHINSLIQLLVILE ECPNPDAVVAEKL 26
GCGCTTCCAGCTTCCGCTTCCGATATATACCTTCTCGGATTTCTGACAAAGAACCCGCGACGAGAT 156
EQVLEHGSGQFEYVQLLRHLQONPAQON 52
ATCGACCTGCGCCGCTTGGCCGCGCTGGCGAACAATGCTACAGATATATGCGCCAAAATAATATGTC 234
IELRAAPLAGRWFEQWLVIYAAKVIY 78
CGATGTCGCGATGCTTATCTTCGCGCATGCGCAAGCCCTTTCGCTGCGCGGAGACGACGACGCTGCGAC 312
RI D P M V R Y L A H A Q R P F E W R E S N A F D 104
GTCGACCGCTACCGCCGCTGAGCAATGATGTCGATGCTTCGCGCCAGGATGCGAGGACGCTATCTCTTT 390
GDANQRNEQNMVDAFGHLEGGYLF 130
CGATGTCGCGCATGCTTTCGCGCCGCTCACCTCTCGCGCCAAACAATGCGCTTTCGCGCGTGGAAATC 468
F I G R N G I L G S L T L G K P F D L S P V E E 156
GCGCTTCCGAGCCCTTCCGAGAGGCTTTCGCGCATCTCTGACTCGACCGCGCGCTGAGGCTCGAAAC 546
ALLLEAVARKSFPWRLDLDTGEAAELET 162
GCTGCGCGAGGCGCCGCTTCCGCGCGGAGATGGAAGATCTCCACTATCTCGCGCAATGCGCTGCGATG 624
V L P T E T P L T R R E M E I L H Y L A E G N T S M 208
GAGCTCGCAGAGTCTGAGATCTCAATATCACTCCGCTGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 702
E I S E H L E I S H N T V D M V W N G L Q N F L K A 234
AAGACCGCAGCAGCAGTGGCCCTGCTCTCGCTCACGCTGATATAACTAGCTCTCTTTATCGCCCTCGAA 780
K N R Q Q A V A L A F R H G L I S 251

```

Fig.3. Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos del gen homólogo a *luxR* de *E. coli*.

1. De <i>luxR</i> homólogo	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
2. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
3. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
4. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
5. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
6. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
7. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
8. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
9. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
10. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
11. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
12. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
13. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
14. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
15. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
16. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
17. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
18. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
19. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
20. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
21. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
22. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
23. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
24. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
25. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
26. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
27. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
28. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
29. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
30. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
31. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
32. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
33. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
34. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
35. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
36. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
37. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
38. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
39. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
40. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
41. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
42. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
43. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
44. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
45. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
46. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
47. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
48. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
49. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
50. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
51. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
52. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
53. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
54. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
55. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
56. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
57. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
58. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
59. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
60. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
61. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
62. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
63. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
64. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
65. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
66. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
67. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
68. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
69. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
70. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
71. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
72. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
73. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
74. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
75. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
76. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
77. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
78. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87
79. <i>traR</i> de <i>Salmonella</i>	-----VHINSLIQ	LVILRLVHFDVAVA	ELRNLVHGRFPEYV	LIRNLVHGRFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	LRAPLQAPFPEYV	QIVANRIVRDI-PE	87</

Adyacentes a este gene, pero transcribiéndose en sentido inverso localizamos 2 ORFs los cuales presentan homología con los genes de *S.maltophilia* *ndvA* y *ndvB* (Fig.5).

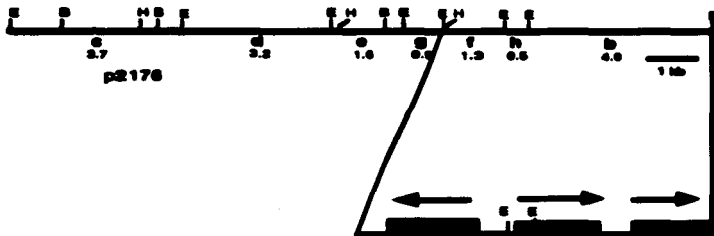


Fig.5. Mapa físico del plásmido p2176 de *S.maltophilia* que contiene a los genes similares a *luxA*, *ndvA* y *ndvB*.

Nosotros clonamos el fragmento de 1.4 kb en el vector pSK (EcoRI) e interrumpido el gene con el cassette::Gus-Sp que confiere resistencia a espectinomicina y además que contiene el gen reportero de β -glucuronidasa (*gus*). Esta construcción fue clonada en el pJG200 y está siendo homogenizada para la obtención de la mutante respectiva y así podremos analizarla fisiológicamente en vida libre y en simbiosis (Fig.6).

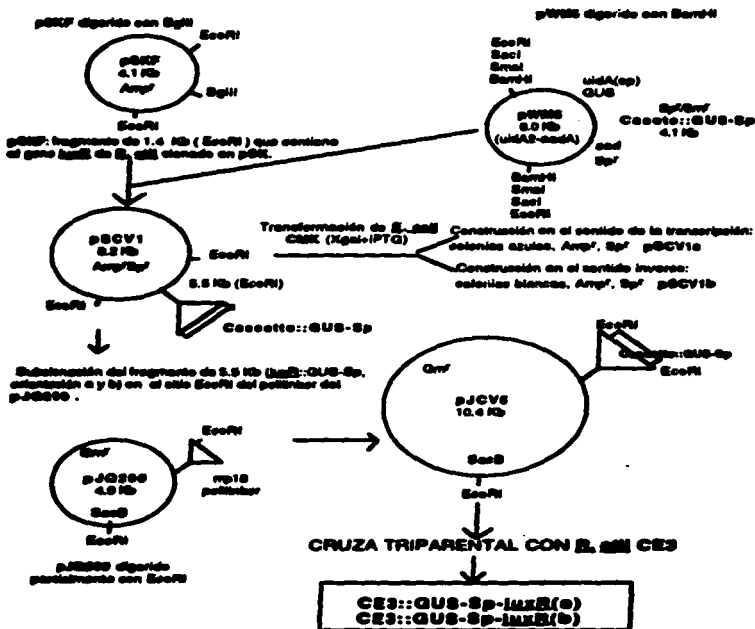


Fig.6 Construcción de la mutante en el gene homólogo a *luxR*, por la interrupción del mismo con un cassette *GUS-sp*.

Con la ayuda de una cepa reportera de *Aerobacterium tumefaciens* que contiene la fusión *KAG::lacZ* (Ferrand et al., 1996) la cual responde a la presencia de inductores tipo AHLs, se probaron sobrenadantes de MM en los cuales previamente fueron cultivadas bacterias de *E. coli*, esto con la finalidad de identificar señales de

densidad celular presentes en *E. coli*. Observamos que la cepa reportera al ser cultivada en MM responde a la presencia de autoinductores en el sobrenadante de *E. coli*, lo cual nos indicó la existencia de al menos una aHSL. Esta señal es más fuerte en células que provienen de fase pre-estacionaria y estacionaria. Posteriormente, con esta evidencia, procedimos a purificar de los sobrenadantes antes mencionados los inductores que producen la señal en la cepa reportera. La extracción del sobrenadante fue realizada con una triple extracción con 50 ml/litro de cultivo de una mezcla de cloroformo-metanol (97.5/2.5, vol/vol). El extracto crudo conteniendo los productos extraídos del sobrenadante fue disuelto en acetonitrilo-H₂O (50-50, vol/vol) y la purificación fue llevada a cabo por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en fase reversa con una columna C₁₈ eluida con un gradiente de acetonitrilo-H₂O. Las fracciones fueron monitoreadas a 200 nm (Fig.7).

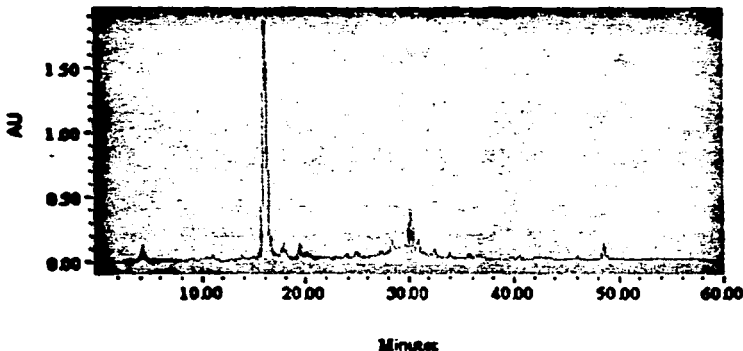


Fig.7. Perfiles de elución de la purificación de aHSL del sobrenadante de *E. coli* por medio de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Los picos-fracción presentes en los minutos 16 y 31 fueron activos al bioensayo para aHSL.

Se observó en el perfil de elución una serie de picos los cuales fueron sometidos a una segunda cromatografía para posteriormente probarlos con el ensayo arriba mencionado que contiene a la cepa reportera. Hasta ahora hemos identificado dos picos con actividad de aHSL, los cuales serán analizados por espectrofotometría de masas. Posteriormente serán probados en células crecidas en MM que contengan la fusión de nuestro gen homólogo a luxR, para analizar la respuesta de este gen a la presencia en el medio de los compuestos

provenientes de la purificación.

Hasta la fecha hemos observado en *E. coli* la presencia de aHSLs. Estas moléculas son conocidas como autoinductores y como sensores de densidad celular que actúan como factores de co-transcripción (Dibb, et al., 1984). De la misma manera hemos descrito la presencia de un gene homólogo a la familia de autoinductores tipo *luxR* y mediante la fusión construida con el gen homólogo a *luxR*, podemos monitorear o determinar el efecto de la aHSL (Gray et al., 1996). Así mismo mediante la construcción de una fusión al gene *ndvA* que se encuentra adjunto, pero transcribiéndose en sentido inverso al gen homólogo a *luxR*, pretendemos probar el efecto de las aHSLs purificadas sobre este gen como inductor y también la probable regulación del gen homólogo a *luxR* sobre la transcripción del operón *ndvA-ndvB*. Esto último lo haremos analizando la posible inducción de estos genes en fase de crecimiento estacionario, cuando la concentración celular es mayor. Por otro lado probaremos el efecto inhibitorio de los compuestos purificados (aHSLs) sobre el crecimiento de *E. coli*. Posteriormente determinaremos el papel de estas moléculas cuando las bacterias entran en simbiosis con la planta. Considerando que las aHSLs juegan un papel importante en la interacción con otros microorganismos (Fuqua et al., 1994), esperamos que lo mismo suceda en *E. coli* y que estos compuestos tengan un efecto regulador importante.

Es del conocimiento general que en bacterias, tanto el estrés nutricional, como otro tipo de presiones ambientales, tales como la temperatura, luz UV, salinidad, etc., conducen a la inducción de un gran número de genes relacionados. Por ejemplo, en *E. coli* el gen *ropS* codifica un factor sigma relacionado al estrés que involucra la transcripción de al menos 30 genes relacionados (Huisman et al., 1994).

En *E. coli* esperamos probar el efecto de las aHSLs purificadas y el efecto de la homoserina en los subcultivos en NS₄, en el cambio de metabolismo de aeróbico a fermentativo, utilizando la fusión del gene de la catalasa, para estudiar la regulación de este gene en *E. coli*. Esperamos probar a que tipo de señal de densidad celular responde la catalasa, que como se mencionó anteriormente, incrementa su actividad al doble en fase estacionaria. De esta manera será posible dilucidar si esta regulación se debe a las aHSLs a través del homólogo de *luxR* o por una señal dentro de la célula producida por homoserinas lactonas a través de *CpxR* o *KatF*.

Si consideramos que la formación del nódulo se lleva a cabo bajo condiciones de limitación de nitrógeno y otras limitaciones, el estudio de la aHSL y genes homólogos a la familia de *luxR* pueden ser de gran importancia en estudios de morfogénesis del nódulo (Gray et al., 1996).

6.- DISCUSSION.

5.-DISCUSION.

Este proyecto ha consistido en investigar en Rhizobium, fuera de la planta, en condiciones definidas previamente, los estados metabólicos de este organismo, antes y durante la simbiosis con la planta, para conocer los elementos que son responsables del establecimiento de la interacción y el intercambio de nitrógeno por carbono.

Previamente reportamos que diversas especies de Rhizobium dejan de crecer después de varios subcultivos sucesivos en MM y que este crecimiento desbalanceado está asociado con un cambio de un metabolismo aeróbico a uno fermentativo (Encarnación et al., 1993).

Estos cambios pueden ser resumidos de la siguiente manera; 1) La bacteria deja de proliferar; 2) hay un decremento en la actividad de algunas enzimas del ciclo TCA y enzimas auxiliares (anapleróticas); 3) existe excreción de ácidos orgánicos; 4) se presenta aumento en la acumulación de PHB; y 5) ocurre agregación celular.

La adición de algunos suplementos al medio mínimo como biotina, tiamina, glutamina, ácidos grasos (palmitico y esteárico), malato y fumarato, así como el crecimiento en condiciones especiales de cultivo, como inocular a una baja densidad celular o el mantener en el MM, mediante burbujeo, una concentración de oxígeno entre 18 y 20%, previenen la respuesta fermentativa y mantienen el metabolismo aeróbico.

Durante los subcultivos se observa una disminución en la actividad de algunas enzimas del ciclo TCA como CS, IDM y MDM o la desaparición de algunas actividades enzimáticas del TCA o enzimas auxiliares (anapleróticas) como PC, EDM y OGDM. Estos resultados indican que uno de los blancos metabólico en el fenómeno observado, de dejar de crecer, es el metabolismo de carbono.

Como se ha mencionado, uno de los marcadores del cambio de un metabolismo de aeróbico a uno fermentativo es la acumulación de PHB, el cual no se presenta si el MM es suplementado con biotina o tiamina. En el caso particular de las células crecidas en MM-biotina, la actividad de la cetotiolasa, primera enzima en la síntesis de PHB, disminuye, en comparación con la actividad observada en MM sin suplementar. Al estudiar dos de las enzimas que utilizan como cofactores biotina, como son la PC y la ACC, se observó que en MM-biotina la primera actividad se incrementó en los subcultivos, sin embargo la segunda enzima permaneció sin modificación en su actividad, lo que indica que la PC es la enzima blanco de ésta vitamina.

Por otro lado, en MM suplementado con tiamina la cepa silvestre de R. etli CE3 mantiene niveles elevados de EDM y OGDM. Estas dos enzimas utilizan tiamina pirofosfato (TPP) y a esto puede deberse que la tiamina, precursor de este compuesto, tenga su efecto en el crecimiento en MM.

Pudimos observar que al igual que R. coli durante la privación de nutrientes, R. etli sufre en los subcultivos en MM

cambios morfológicos que se manifiestan en un aumento de tamaño de las células y en pleomorfismo. Esto podría ser resultado de cambios en la composición de la membrana, lo que posiblemente se debe a que la síntesis de PHB esta secuestrando, no sólo poder reductor, sino también acetil-CoA, que es el precursor de la biosíntesis de ácidos grasos. Esto esta apoyado por el hecho de que la adición de ácidos grasos (palmitico y esteárico) impiden el cambio a un metabolismo fermentativo y mantienen el metabolismo aeróbico.

La transcripción dirigida por factores sigma alternativos del tipo σ_{24} (Lange et al., 1991) también puede ser un factor importante en E.coli, al igual que en S.saliv. (Coseriu, 1985) en virtud de que ambas bacterias dejan de crecer y se vuelven más resistentes a diversos tipos de estrés, entre ellos el oxidativo. Además en E.coli y S.saliv. la catalasa participa en la protección contra el estrés oxidativo. Otro factor común es la acumulación de polímeros de reserva, aunque en este caso es PHB y no glucógeno, como sucede en S.saliv. (Damotte et al., 1968). Sin embargo S.saliv. en condiciones en las cuales no puede acumular PHB, como en la mutante que carece de la PHB-sintasa, el polímero que se acumula es glucógeno (Cevallos et al., 1996). Aún no logramos definir cual es la razón de la excreción de compuestos al medio, pero es conveniente mencionar que algo parecido sucede en enterobacterias cuando entran en fase estacionaria y dejan de crecer (Luli et al., 1990), ya que también se observa una alta excreción de α -cetoglutarato y acetato al medio, producto de la inhibición de algunas enzimas del TCA específicamente la OGDH (Amarasingham et al., 1965).

Además de la acumulación de PHB, otros productos de fermentación fueron sintetizados por S.saliv. cuando se cultiva en MM. Ácidos orgánicos como acetato, lactato, fumarato, 2-oxoglutarato, y β -hidroxibutirato, así como aminoácidos como glutamato se excretaron al medio (Encarnación et al., 1995). Algo semejante sucede en S.saliv. cuando deja de crecer debido a que excreta también al medio de crecimiento acetato y glutámico (Luli et al., 1990). La excreción de compuestos por S.saliv. no sólo puede estar promoviendo un proceso de agregación celular que en algunos organismos es dirigido por la presencia de ácidos dicarboxílicos o aminoácidos en el medio, como creemos sucede en S.saliv., sino que la presencia de estos productos de excreción podrían a su vez promover la expresión de un regulador transcripcional de genes del tipo knob, que se expresan cuando S.saliv. deja de crecer.

En S.saliv. la desaparición de algunas actividades enzimáticas como la OGDH y la EDH durante los subcultivos en MM no afecta la fijación de nitrógeno, ya que no parecen necesarias estas actividades enzimáticas durante la fijación. En Bradyrhizobium japonicum recientemente se publicó que una mutante que carece de OGDH no se ve afectada en su capacidad de fijar nitrógeno (Green et al., 1997). Para el caso de la EDH, en S.saliv. se ha observado que no existe actividad de esta enzima en los bacteroides de la cepa silvestre CE3 a los 18 días después de la infección de plantas de frijol. Inclusive cepas mutantes en la síntesis de tiamina (cofactor de la EDH y OGDH) fijan nitrógeno al igual que la cepa silvestre (datos no publicados Taboada et al.,). Por otro lado, la desaparición de la actividad de EC tampoco afecta la fijación de nitrógeno en S.saliv., como se puede

observar en una cepa mutante que carece de la actividad de esta enzima (Dunn et al., 1996).

Como conclusión final de esta parte de la investigación podemos mencionar que hemos logrado reproducir, fuera de la planta, algunos procesos metabólicos que semejan los que ocurren en los bacteroides, como es el de proliferar y dejar de hacerlo y el cambio de un metabolismo aeróbico a uno fermentativo, que también ocurre en la microsimbiosis a que esta sujeto *Rhizobium* durante la simbiosis.

Electromicrografías tomadas durante los diversos subcultivos en N₂ de diferentes *Rhizobium* y principalmente de *R. lotii*, cuando el crecimiento esta desbalanceado, establecieron la semejanza morfológica entre estas bacterias grandes, pleomórficas y con abundantes gránulos de PNB, en comparación con los bacteroides presentes en los nódulos de plantas de frijol infectadas con *R. lotii*.

Rhizobium lotii y en general la familia Rhizobiaceae, acumula PNB como polímero de reserva tanto en vida libre, como en simbiosis (Tombolini et al., 1989; Stam et al., 1986; Karr et al., 1984; Goodchild D.J., 1966; Wong et al., 1971). La acumulación de este polímero es el indicador metabólico más fuerte de un programa genético que consiste en la expresión del metabolismo fermentativo que opera en bajo oxígeno y que está relacionado estrechamente con la vida en microaerobiosis que tiene esta bacteria en simbiosis.

Han sido sugeridas una serie de funciones para la acumulación de PNB, tanto en vida libre, como en simbiosis (Bergensen et al., 1990, 1991; Anderson et al., 1990), sin embargo ninguna ha sido demostrada. Algunas preguntas como: ¿Cual es el papel de la acumulación de PNB en *R. lotii* durante la simbiosis y en vida libre?, ¿como es la infección, nodulación y fijación de nitrógeno en cepas que no sintetizan PNB?, no habían sido contestadas de manera concluyente. La obtención de una mutante en la PNB sintasa por el Dr. Miguel Angel Cevallos hizo posible contestar estas preguntas (Cevallos et al., 1996).

La mutante en la PNB-sintasa *pnbC⁻*, no acumula PNB y excreta al medio una concentración mayor de ácidos orgánicos entre los más sobresalientes están piruvato y β -hidroxibutirato, lo que indica que existe una menor capacidad para oxidar la fuente de carbono. Esto se debe a que la alta concentración de poder reductor, que se acumula porque no es secuestrado en la síntesis de PNB, podría estar inhibiendo algunas actividades enzimáticas del TCA y de algunas enzimas auxiliares como la PDB, la cual presenta una baja actividad en la mutante *pnbC⁻* comparada con la cepa silvestre (Cevallos et al., 1996).

Las demandas fisiológicas de la bacteria varían de acuerdo a su medioambiente, y tales demandas serán reflejadas por cambios en el metabolismo central mediado por efectores positivos y negativos (Samuel B.D., 1970; Weitzman P.D.J., 1966, 1972, 1981; Senior et al., 1971; Kornfeld et al., 1977). Por ejemplo, si el transporte de electrones es saturado con NADH, como ocurre bajo limitaciones temporales de oxígeno, el potencial redox de la célula inmediatamente

decrece y la relación NADH/NAD se incrementa (Jackson et al., 1976). Esto resulta en una desaceleración del TCA debido a una inhibición de la citrato sintasa, NADP-isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa, por la acumulación de nucleótidos reducidos (Senior et al., 1971; Jackson et al., 1976). La regulación de esas enzimas constituye un mecanismo de retroalimentación (feedback), y si tales condiciones continúan, la célula responderá posteriormente reprimiendo la síntesis de las enzimas involucradas. Así, cuando *Amarastratum halimifolium* es cambiado de metabolismo aeróbico a anaeróbico, los niveles de NADP-isocitrato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa decrecen un 30% y 70%, respectivamente (Jackson et al., 1976). En *E. coli* bajo condiciones anaeróbicas, debido a la represión de la α -cetoglutarato deshidrogenasa el TCA se vuelve un sistema de dos brazos, no cíclico (Amarasingham et al., 1965). Todas las enzimas del TCA en *E. coli* son reprimidas bajo condiciones anaeróbicas (Gray et al., 1966), siendo la isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa especialmente sensibles. Como se menciona en párrafos anteriores, un componente importante de la respuesta fermentativa es la acumulación de PHB. Este polímero acumula carbono y "desintoxica" de poder reductor al ser utilizado en su síntesis, previniendo la inhibición de algunas enzimas claves del TCA y enzimas anapleróticas como la PDM. Lo anterior es importante en bacterias fijadoras de nitrógeno, como *Rhizobium* que es un aerobio estricto, las cuales, en bajas concentraciones de oxígeno tienen que generar energía para la fijación de nitrógeno.

Una de las conclusiones de este estudio es que en *Rhizobium* en vida libre la síntesis de PHB sirve para secuestrar poder reductor, lo que permite el funcionamiento del TCA en condiciones en que el oxígeno es un factor limitante (Encarnación et al., 1995).

La PDM de *R. lotum*, cepa 311B-143 la cual una la glicólisis al TCA, muestra estimulación por la presencia del piruvato y es inhibida por NADH (Emerich D.W., 1985). En la mutante sin PHS-sintasa se elevó el contenido de NADH y perdió la capacidad de crecer en piruvato o glucosa como fuente de carbono, disminuyendo la oxidación del succinato hasta en un 30% y la de glucosa en un 70%. Como propusimos anteriormente, en *Rhizobium* en vida libre es necesaria la síntesis del PHB debido a que es una forma de secuestrar el poder reductor, permitiendo el funcionamiento del TCA. Por mutagénesis al azar con tns5 de la mutante *dhbC-* se han obtenido cepas que crecen óptimamente en piruvato o glucosa las cuales presentan una actividad de PDM, incluso mayor que la observada en la cepa silvestre. A través del estudio de esta mutante podremos explicar los mecanismos regulatorios que hacen necesaria la acumulación de PHB para el eficiente funcionamiento del TCA, (los datos son presentados en el resumen titulado, El papel de la síntesis de PHB en el metabolismo de Carbono en *Rhizobium* en este proyecto también colaboran Ma. del Carmen Vargas, Araceli Dávalos, Yolanda Mora y Jaime Mora).

Respecto al papel de la mutante en la PHS-sintasa *dhbC-* en los fenómenos de infección, nodulación y fijación de nitrógeno, el efecto más relevante fue que se incrementó la fijación de nitrógeno y el contenido de éste elemento en la semilla de frijol. Sugerimos que la alta fijación de nitrógeno puede deberse a que el poder reductor que no es secuestrado en la síntesis de PHB es canalizado a la fijación de

nitrógeno, lo que explica una mayor fijación del N₂ y una mayor cantidad de nitrógeno en la semilla y la planta (Cevallos et al., 1996). La discusión esta contenida en el artículo "Genetic and Physiological Characterization of a *Rhizobium lotii* Mutant Strain Unable To Synthesize Poly- β -hydroxybutyrate" (Cevallos et al., 1996).

Como se menciona al inicio, un hallazgo importante fué que el cambio del metabolismo aeróbico al fermentativo en *R. lotii* no se presenta cuando se agregan al medio mínimo pequeñas concentraciones de biotina o tiamina (Encarnación et al., 1995). Nuestra caracterización del metabolismo celular en cultivos suplementados con estas vitaminas, mostraron un incremento en las actividades enzimáticas que las requieren como cofactor ellas son la EC, la PDM y ODM. De tal manera que estas son las enzimas que resultan favorecidas en su actividad por la presencia de las vitaminas y que son responsables de dirigir el flujo de carbono al ciclo TCA y mantener un metabolismo aeróbico en una bacteria que, por otro lado, es un aerobio estricto.

En el caso de la biotina la actividad que se observa incrementada es la EC. Por esta razón escogimos a esta enzima como objeto de estudio para probar nuestra hipótesis de que la EC es el sitio principal donde biotina actúa promoviendo el metabolismo aeróbico (Encarnación et al., 1995).

En colaboración con el Dr. Michael Dunn, en *R. lotii* se caracterizó y analizó el papel de la EC. Los resultados de este trabajo están incluidos en el trabajo "Pyruvate Carboxylase from *Rhizobium lotii* Mutant Characterization, Nucleotide Sequence, and Physiological Role". Entre los puntos a resaltar que de mayor interés fue la presencia en *R. lotii*, en el primer cultivo en MM-biotina de tres péptidos biotinilados, uno de 120 kDa que fué identificado como una subunidad de la EC y otros de 51 y 14 kDa, respectivamente, ninguno de los cuales fué identificado. Cuando *R. lotii* fue cultivado en MM-succinato sin biotina, también se detectó la presencia del péptido de 120 kDa en "western blot" pero el nivel de expresión sólo fué de 20% respecto al observado en células cultivadas en MM-biotina. En la discusión del artículo antes mencionado se exponen argumentos que sostienen que *R. lotii* no es un auxótrofo de biotina, que este organismo es capaz de sintetizar biotina "de novo" y que la síntesis de esta vitamina puede estar siendo regulada negativamente en algún momento del crecimiento en MM. Las mutantes en esta enzima no son capaces de crecer en piruvato a diferencia de lo que sucede en otras especies (Modak et al., 1995 y Wilson, J.C., 1988) que pueden convertir oxaloacetato (OAA) a partir de piruvato. Sin embargo si se cultiva a la mutante de *R. lotii* en MM-piruvato más aspartato, es capaz de crecer, siendo el OAA producido a partir de aspartato, vía una aspartato aminotransferasa.

Se observó en la cepa mutante sin EC que esta enzima no es necesaria para el crecimiento en succinato (10mM) ya que en estas condiciones la biotina endógena es capaz de promover un crecimiento casi igual al de la cepa padre. Sin embargo si la cepa mutante es subcultivada en succinato 30 mM se observa que ésta es incapaz de crecer aún en presencia de biotina en medio mínimo. Esto sugiere que esta enzima es el blanco de la biotina cuando se subcultiva *R. lotii* en presencia de esta vitamina, indicando que esta enzima es responsable

del crecimiento de la bacteria al ser subcultivada en MM suplementado con biotina. Sabemos que un requerimiento de la EC durante el crecimiento en MM-succinato podría ser considerado menor y no estaría muy de acuerdo con el papel metabólico que en estas condiciones de cultivo proponemos para esta enzima, sin embargo sugerimos que el crecimiento de *R. solis* en estas condiciones, puede causar un gran flujo de carbono a piruvato a través de la enzima mállica (Makay et al., 1985; Driscoll et al., 1993) y no a OAA por la vía de la malato deshidrogenasa, en virtud de que esta enzima disminuye su actividad durante los subcultivos en MM (Encarnación et al., 1995). En este caso la EC sería esencial para generar OAA a partir de piruvato y mantener el crecimiento de *R. solis* en MM-succinato, durante los subcultivos.

Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el amonio es asimilado en vida libre en *Rhizobium* por la vía glutamino sintetasa (GS)- glutamato sintasa (GGAT) (Bravo et al., 1988). Debido a que encontramos que la presencia de glutamina en los subcultivos en MM impide que *Rhizobium* entre en un metabolismo fermentativo (datos no publicados); se decidió estudiar el papel de este aminoácido en la utilización del succinato como fuente de carbono.

Primero, mediante estudios con compuestos marcados con ^{14}C y ^{15}N demostramos que tanto en *R. solis* como en *R. solis* la glutamina se encuentra ciclando, es decir, se sintetiza y se degrada al mismo tiempo. Nuestros resultados indicaron que el succinato en contraste con otras bacterias, es una buena fuente de carbono para *Rhizobium* y que es eficientemente oxidado a CO_2 y preferentemente oxidado frente a la glutamina, en los dos tipos de *Rhizobium* probados. Sin embargo en una mutante de *R. solis* que carece de la GSI y GSII la glutamina fué oxidada en un grado mayor que el succinato, lo que indica que se requiere el ciclaje de glutamina para la utilización de una fuente de carbono primaria. Cuando la bacteria es cultivada en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno, la actividad de la GSII es casi imperceptible. La pérdida de esta actividad enzimática nos sugiere que el succinato tiene un importante papel en la inducción de la GSII. También podemos concluir que la síntesis de glutamina y su ciclaje regulan la distribución de acetyl-CoA para la síntesis de PHB o para el TCA, ya que la doble mutante mencionada deja de crecer en el segundo subcultivo en MM debido a la acumulación de PHB, algo que sólo sucede en la cepa silvestre en el cuarto subcultivo. En conclusión, al describir la interacción entre los metabolismos de carbono y nitrógeno que ocurre en *Rhizobium*, en ausencia de la planta, hemos descrito también otro sistema regulador de la concentración intracelular del poder reductor y de la energía. El ciclaje de glutamina vía GS-GGAT, al resintetizar glutamina lo hace previa síntesis de su esqueleto carbonado y su grupo α -amino con el consiguiente consumo de 2-oxoglutarato, energía y poder reductor, contribuyendo así en la oxidación de la fuente de carbono, al impedir la inhibición de algunas enzimas del TCA, convirtiéndose en un gastador de energía permanente que permite la utilización continua de la fuente de carbono (J. Mora., Microbiology Reviews)

Como se menciona en la introducción y al inicio de la discusión, la mutante en QGDM de *Bradyrhizobium japonicum* fija

nitrógeno en simbiosis al igual que la cepa silvestre. Se ha propuesto la presencia de una vía de γ -aminobutírico a succinato (Salmán, et al., 1990) que puede compensar la falta de OGDH durante la simbiosis. El glutámico al ser descarboxilado produciría γ -aminobutírico, produciendo en un siguiente paso semialdehído succínico que al ser oxidado, daría succinato, lo que implicaría suplir la falta de OGDH completando el TCA en la mutante en esta enzima. Esta parte del "shunt" de γ -aminobutírico ha sido demostrada en *E. coli*, (Encarnación et al., enviado a publicación), ya que el catabolismo de glutamina resulta en la producción de γ -hidroxibutirato indicando una nueva ruta catabólica de este aminoácido. Proponemos que la producción de γ -hidroxibutirato se realiza a partir de la reducción del semialdehído succínico que al oxidarse produce succinato (Kahn et al., 1985) cuya existencia hemos demostrado en *E. coli*.

Sugerimos que la bacteria deja de crecer a causa de una señal de alta densidad celular que se presenta cuando este organismo se cultiva en MM, ya que en MM a baja densidad celular se puede subcultivar continuamente (Encarnación et al., 1995). Esta señal de densidad celular en *Shigella* puede ser la responsable de la regulación de algunas enzimas del TCA y determinar finalmente, el cambio de metabolismo de aeróbico a fermentativo. Es por esto que decidimos explorar la síntesis de n-acil-L-homoserinas lactonas (Sainton et al., 1992; Williams et al., 1992; Fuqua et al., 1994), durante el crecimiento en MM y así detectamos la presencia en *E. coli* de al menos 2 posibles moléculas con estas características. Esto último nos llevó al análisis de los genes de la familia luxR (Toder et al., 1991; Letifi et al., 1995; Gambello et al., 1991; 1993) que responden a estas moléculas. Los resultados de esta investigación se pueden consultar en el resumen titulado "Señales de densidad celular tipo acil-homoserinas lactonas y análisis estructural de un gene homólogo a la familia de autoinductores tipo luxR en *Shigella coli*". En este trabajo también participan Araceli Divallos, Ma. del Carmen Vargas, Sandra Contreras, Michael Dunn y Jaime Mora.

Al subcultivar a *E. coli* en MM, este organismo incrementa su resistencia a diferentes tipos de estrés. Hemos estudiado en particular el estrés oxidativo que se presenta en *E. coli* en MM donde se observó que las células provenientes de cultivos en MM aumentan su resistencia a cantidades crecientes de peróxido de hidrógeno, en comparación con las células de estos estudios indicados. *E. coli* tiende a favorecer el metabolismo aeróbico como por ejemplo, si previo al reto por peróxido de hidrógeno el organismo se crece en MM suplementado con tiamina, biotina o en medio rico (PY).

Sugerimos que una bacteria como *E. coli* que tiene una alta sensibilidad al estrés oxidativo, al cambiar en su entorno la concentración de oxígeno, tiende a la formación de agregados celulares. Los resultados de estos estudios indican que *E. coli* tiende a diferenciarse dejando de crecer aeróbicamente y entrando en simbiosis. Esto último sería con dos finalidades: la primera para adquirir una alta protección contra el estrés oxidativo a través de dejar de crecer y agregarse, estado que semeja una microaerobiosis cuando se encuentra en vida libre y la segunda en microaerobiosis, como en la simbiosis, donde el daño producido por el oxígeno es menor debido al metabolismo fermentativo.

Esto nos llevó a clonar y estudiar la regulación de una enzima central en el metabolismo del oxígeno, la catalasa (Deisseroth y Dounce, 1970; Dunford y Stillman, 1976) la cual demostramos es regulada por la señal de alta densidad celular y por la presencia de hemerina, un precursor de HSL. Los resultados obtenidos involucran a esta enzima en la defensa contra el estrés oxidativo durante el paso del metabolismo aeróbico al fermentativo. El grado de avance de este proyecto es presentado en el reporte "Clonación, Secuencia y Regulación de la Catalasa-Peroxidasa de Rhizobium etli por los autores Vargas Ma. del Carmen, Encarnación Sergio, Dávalos Araceli y Mora Jaime.

Se ha logrado reproducir en Rhizobium fuera de la planta, un fenómeno parecido al que ocurre en los bacteroides durante la simbiosis en cuanto a proliferar y dejar de hacerlo.

Hemos descrito la interacción entre los metabolismos de carbono y de nitrógeno que ocurre en Rhizobium en ausencia de la planta. Esta interacción consiste en la utilización preferencial del succinato, que es la forma molecular en que la planta le proporciona el carbono al bacteroide.

Como puede observarse el análisis de los mecanismos que R. etli lleva a cabo cuando se subcultiva en MM, con y sin suplementos, no sería posible si solamente nos circunscribiéramos al estudio del metabolismo de carbono, aunque sin duda es el centro de los cambios presentados por R. etli. De esta manera nuestro análisis interrelacionando los dos metabolismos, es necesario, para entender los complejos cambios presentados por Rhizobium que quizás lo predisponen a entrar en simbiosis.

Sumado a lo anterior sabemos que un objetivo central en Biología ha sido el entender el genoma en términos funcionales, algo que seguramente no podrá ser llevado a cabo en un tiempo corto, pero existe ahora la posibilidad de analizar al menos los productos de éste y acercarnos a ese futuro. Un análisis en gels de doble dimensión de las proteínas que R. etli sintetiza en diferentes condiciones fisiológicas, nos puede ayudar a entender los diferentes eventos fisiológicos y la regulación de éstos. Hemos realizado en R. etli (CE3) experimentos de expresión del genoma en MM, en donde se expresa el cambio del metabolismo aeróbico a fermentativo. Además, se han realizado estudios en condiciones de estrés como son: alta sal, peróxido de hidrógeno, metales pesados, etc. Este estudio nos ayudará a establecer la fracción de las proteínas celulares que están sujetas a reguladores globales. Un mapa de expresión del genoma de R. etli podrá ser una fuente más fidedigna que la secuencia del genoma. Dadas las 1000 a 1200 proteínas comúnmente expresadas por R. etli (CE3), el mapa puede proveer un rápido conducto hacia los genes, abriendo la puerta al análisis genético-molecular a través de "la genética reversa". En éste momento hemos podido establecer varios grupos de proteínas las cuales se expresan dependiendo de la fase de crecimiento de la bacteria, el metabolismo aeróbico o fermentativo de la misma, además de proteínas que sólo son expresadas en condiciones particulares de estrés. En la siguiente parte del análisis identificaremos las proteínas en función a su composición de

aminoácidos y/o mediante microsecuencia.

De esta manera este trabajo da inicio a un proyecto que pretende estudiar el complejo de redes y grupos de proteínas que son reguladas en el complejo sistema transcripción-traducción, el proyecto pretende, que es el análisis de las proteínas sintetizadas por el genoma de S. pombe.

C.- BIBLIOGRAFIA.

6.-BIBLIOGRAFIA.

- Arusa, G., Ebeling, S. and Hennecke, H. Cloning, sequencing, and mutational analysis of the *Brachyrihobium japonicum* fumC-like gene: evidence for the existence of two different fumarases. 1997. J. Gen. Microbiol.
- Aebi, H. Catalase in vitro. 1984. Meth. Enzymol. 105:121-126
- Allen, R.J. and Scott, G.K. Biosynthesis and turnover of outer-membrane proteins in *Escherichia coli* ML308-225. 1979. Biochem. J. 182:407-412.
- Altuvia, S., Almiron, N., Nuisman, G., Kelter, R. and Sters, G. The dps promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and sigma S in stationary phase. 1994. Mol. Microbiol. 13:265-272.
- Amarasingham, C.R. and Davis, B.D. Regulation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase formation in *Escherichia coli*. 1965. J. Biol. Chem. 240:3664-3668.
- Angler, C.D., Cho, M. and Matsumura, P. Multiple factors underlying the maximum motility of *Escherichia coli* as cultures enter post-exponential growth. 1993. J. Bacteriol. 175:6238-6244.
- Anderson, A.J. and Daves, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. 1990. Microbiol. Rev. 54:450-472.
- Arias, A., Cardiel, A. and Martinez-Drets, G. Transport and catabolism of D-mannose in *Rhizobium meliloti*. 1982. J. Bacteriol. 151:1069-1072.
- Arias, A. and Martinez-Drets, G. Glycerol metabolism in *Rhizobium*. 1976. Can. J. Microbiol. 22:150-153.
- Arusa, R., McKay, I.A., Rowney, F.R.P., Dilworth, M.J. and Glenn, A.R. Properties of organic acid utilization mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 300. 1985. J. Gen. Microbiol. 131:2059-2066.
- Bainton, N.J., Bycroft, B.W., Chhabra, S.R., Stead, P., Gladhill L., Hill, P.J., Rees, C.E., Winsom, M.K., Salmond, G.P., Stewart, G.S. A general role for the lux autoinducer in bacterial cell signalling: control of antibiotic biosynthesis in *Erwinia*. 1992. Gene 116:87-91.
- Bainton, N.J., Stead, P., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Salmond, G.P., Stewart, G.S. and Williams, P. N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. 1992. Biochem. J. 288:997-1004.

Bosana, M., Aparicio-Teje, P., Irigoyen, J.J. and Sánchez-Díaz, M. Some enzymes of hydrogen peroxide metabolism in leaves and root nodules of *Medicago sativa*. 1986. *Plant Physiol.* 82:1169-1171.

Bosana, M. and Klüss, R.V. Transition metals in legume root nodules: iron-dependent free radical production increases during nodule senescence. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:8958-8962.

Bosana, M., Paris, F.J., Samalio, L.M. and Del Rio, L.A. Isoenzymes of superoxide dismutase in nodules of *P. vulgaris* L., *Pisum sativum* L., and *Vigna unguiculata* (L) Walp. 1989. *Plant Physiol.* 90:1286-1292.

Bergersen, F.J. and Turner, G.L. Nitrogen fixation by the bacteroid fraction of breis of soybean root nodules. 1967. *Biochim. Biophys. Acta* 161:507-515.

Bergersen, F.J. and Turner, G.L. Supply of O₂ regulates O₂ demand during utilization of reserves of poly-β-hydroxybutyrate in N₂-fixing soybean bacteroids. 1992. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 249:143-148.

Brandl, C.J., Deber, R.B., Hsu, L.C., Weelley, G.A., Young, E.E. and Deber, C.M. Evidence for similar function of transmembrane segments in receptor and membrane-anchored proteins. 1988. *Biopolymers* 27:1171-1182.

Breve, A. and Mora, J. Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. 1988. *J. Bacteriol.* 170:980-984.

Brewin, N.J. In: edited by Gresshoff, F.M., Chapman, and Hall. *New York, NY: Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives.* 1990, p. 227-234.

Bret, N. and Weisbach, H. Chemistry and biology of *E. coli* ribosomal protein L12. 1981. *Mol. Cell Biochem.* 36:47-63.

Calderón, J., Cooper, A.J., Gelbard, A.S. and Mora, J. 13N isotope studies of glutamine assimilation pathways in *Neurospora crassa*. 1989. *J. Bacteriol.* 171:1772-1774.

Calderón, J. and Mora, J. Glutamine cycling in *Neurospora crassa*. 1985. *J. Gen. Microbiol.* 131:3237-3242.

Calderón, J. and Mora, J. Glutamine assimilation pathways in *Neurospora crassa* growing on glutamine as sole nitrogen and carbon source. 1989. *J. Gen. Microbiol.* 135:2699-2707.

Cao, J.G. and Weighen, H.A. Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio Harveyi*. 1989. *J. Biol. Chem.* 264:21670-21676.

Cevallos, M.A., Esmaracines, S., Leija, A., Mora, T. and Mora, J. Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant

- strain unable to synthesize poly- β -hydroxybutyrate. 1996. *J. Bacteriol.* 178:1646-1654.
- Ghandrasekharan, P.T. and Shetha, Y.I. Purification and properties of an NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase from *Rhizobium meliloti*. 1976. *Antonie Van Leeuwenhoek* 42:471-482.
- Chang, T.Y., Wang, A.Y. and Green, J.S. Expression of *Escherichia coli* pyruvate oxidase (PoxB) depends on the sigma factor encoded by the *spoA*(*Half*) gene. 1994. *Mol. Microbiol.* 11:1019-1028.
- Ching, T.M., Hedtke, S. and Newcomb, W. Isolation of bacteria, transforming bacteria, and bacteroids from soybean nodules. 1977. *Plant Physiol.* 60:771-774.
- Chirassat, M., Mess, R., Lara, M., Lahn, A., Defes, R., Jaegering, M. and Sepin G. The *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli *glnT* gene, encoding glutamine synthetase III. 1992. *Gene* 119:1-8.
- Christman, M.P., Morgan, R.W., Jacobson, F.S. and Ames, B.W. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. 1985. *Cell* 41:753-762.
- Christman, M.P., Sters, G. and Ames, B.W. *OxyR*, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3484-3488.
- Claiborne, A. and Fridovich, I. Chemical and enzymatic intermediates in the peroxidation of *o*-dianisidine by horseradish peroxidase. 1. Spectral properties of the products of dianisidine oxidation. 1979. *Biochem.* 18:2324-2329.
- Claiborne, A., Malinowski, D.P. and Fridovich, I. Purification and characterization of hydroperoxidase II of *Escherichia coli* B. 1979. *J. Biol.Chem.* 254:11664-11668.
- Cooper, A.J.L. and Meister, A. The glutamine transaminase- α -amidease pathway. 1977. *Crit. Rev. Biochem.* 4:281-303.
- Copeland, L., Guinnell, R.G. and Day, D.A. Malic enzyme activity in bacteroids from soybean nodules. 1989. *J. Gen. Microbiol.* 135:2005-2011.
- Crookford, A.J., Davis, G.A. and Williams, M.D. Evidence for cell-density-dependent regulation of catalase activity in *Rhizobium leguminosarum* by phaseoli. 1995. *Microbiology* 141:843-851.
- Cube, M.F., Seemose, A., Murphy, C., Johnston, A.W. and Dennis, J.A. Molecular characterization and regulation of the rhizosphere-expressed genes *rhiABCX* that can influence nodulation by

- Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. 1992. *J. Bacteriol.* 174:4026-4035.
- Baltes, D.A., Langeberg, L. and Freneman, H.C. Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules. 1993. *Physiol. Plant* 87:367-370.
- Baltes, D.A., Pest, C.J. and Langeberg, L. Effects of ambient oxygen and of fixed nitrogen on concentrations of glutathione, ascorbate and associated enzymes in soybean root nodules. 1991. *Plant Physiol.* 96:812-818.
- Bonetto, M., Cattaneo, J., Sigal, M. and Pais, J. Mutants of *Escherichia coli* K 12 altered in their ability to store glycogen. 1968. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32:916-920.
- Barrow, B.A. and Kmetz, B.R. Two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria. 1977. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78:554-559.
- Davis, B.D., Leger, S.M. and Tai, P.C. Role of ribosome degradation in the death of starved *Escherichia coli* cells. 1986. *J. Bacteriol.* 166:439-445.
- de Bruijn, F.J., Rosbach, S., Schneider, M., Katet, P., Messner, S., Smeto W.W., Anubel P.H. and J. Schnell. *Rhizobium majidi* 1021 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. 1989. *J. Bacteriol.* 171:1673-1682.
- de Vries, G.E., In't Veld, P. and Rijse, J.W. Production of organic acids in *Pisum sativum* root nodules as a result of oxygen stress. 1980. *Plant Sci. Lett.* 20:115-123.
- de Vries, G.E., van Brussel, A.A. and Guisgel, A. Mechanism of regulation of glucose transport in *Rhizobium leguminosarum*. 1982. *J. Bacteriol.* 149:872-879.
- de Vries, W., Stan, E., Deyo, J.C., Lichtenberg, A.J., Simons, L.S. and Steuthamer, A.H. The effect of the dissolved oxygen concentration and anabolic limitations on the behaviour of *Rhizobium CR5571* in chemostat cultures. 1986. *Antonie Van Leeuwenhoek* 52:85-96.
- Deisseroth, A. and Deacon, A.L. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. 1970. *Physiol. Rev.* 50:319-375.
- Sample, B. Enzyme structures. DNA repair flips out. 1995. *Curr. Biol.* 5:719-721.
- Sample, B. and Amabile-Cuevas, C.F. Redox redux: the control of oxidative stress responses. 1991. *Cell* 67:837-839.

Sample, S. and Halbrook, J. Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. 1983. *Nature* 304:466-468.

Severean, J., Haeberli, P. and Smithies, O. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. 1984. *Nucl. Acids Res.* 12:387-395.

Sevins, J.H., Countryman, C. and Salóvia, F.O. Nucleotide Sequence of the *luxR* and *luxI* Genes and Structure of the Primary Regulatory Region of the *lux* Regulon of *Vibrio fischeri* ATCC 7744. 1988. *Biochem.* 27:837-842.

Sibb, N.J., Beattie, J.A. and Brewin, N.J. Identification of a rhizosphere protein encoded by the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum*. 1984. *J. Bacteriol.* 158:621-627.

Silverth, M.J., Arvas, R., McKay, I.A., Sareso, S. and Glenn, A.R. Pentose metabolism in *Rhizobium leguminosarum* MBF300 and in cowpea *Rhizobium* MGR234. 1986. *J. Gen. Microbiol.* 132:1733-1742.

Silverth, M.J. and Glenn, A.R. Control of carbon substrate utilization by rhizobia. In: *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*, edited by Gibson, A.N. and Newton, W.E. Canberra.: Australian Academy of Sciences., 1981, p. 244-251.

Silverth, M.J. and Glenn, A.R. Transport in *Rhizobium* and its significance to the legume symbiosis. In: *Nitrogen Fixation and Photosynthesis*, edited by Ludden, P.W. and Burris, J.E. New York.: Elsevier., 1985, p. 53-61.

Silverth, M.J., McKay, I.A., Franklin, M. and Glenn, A.R. Catabolite effects on enzyme induction and substrate utilization in *Rhizobium leguminosarum*. 1983. *J. Gen. Microbiol.* 129:359-366.

Donald, R.O. and Ludwig, R.A. *Rhizobium* sp. strain ORS571 ammonium assimilation and nitrogen fixation. 1984. *J. Bacteriol.* 158:1144-1151.

Berman, C.J. and Mc Shraim, W. In: edited by Morasche, C.E., Penn, C.W. and Smyth, C.J. Cambridge University Press: *Molecular Biology of Bacterial Infection (SGM Symp. 49)*, 1992, p. 193-230.

Briceall, S.T. and Fines, F.M. NAD(+)-dependent malic enzyme of *Rhizobium meliloti* is required for symbiotic nitrogen fixation. 1993. *Mol. Microbiol.* 7:865-873.

Bunce, N.J. Arabinose metabolism in rhizobia. 1979. *J. Gen. Microbiol.* 113:415-419.

Bunce, N.J. and Fraenkel, D.G. Alpha-Ketoglutarate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*. 1979. *J. Bacteriol.* 137:415-419.

Bunn, M.P., Encarnacion, S., Araisa, G., Vargas M.C., Bávalos, A., Soraita, H., Mora, Y., and J. Mora. Pyruvate carboxylase from

- Rhizobium etli*: mutant characterization, nucleotide sequence, and physiological role. 1996. *J. Bacteriol.* 178:5960-5970.
- Burán, S. and Calderón, J. Role of the glutamine transaminase α -amidase and glutaminase in glutamine degradation in *Rhizobium etli*. 1995 *Microbiol.* 141:589-595.
- Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Szonyi, G.L., Medina, R.H. and Oppenheimer, M.J. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. 1981. *Biochem.* 20:2444-2449.
- El-Din, A.K. A succinate transport mutant of *Bradyrhizobium japonicum* forms ineffective nodules on soybeans. 1992. *Can. J. Microbiol.* 38:230-234.
- El-khami, M.A. and Stretton, R.J. Effect of growth medium on the lipid composition of log and stationary phase cultures of *Salmonella typhimurium*. 1981. *Microbios.* 31:161-169.
- Elkan, G.H. and Ruykendaal, L.D. Carbohydrate metabolism, in Nitrogen Fixation. In: Broughton, W.J. Oxford: Clarendon Press, 1982, p. 147-166.
- Emerich, D.W. Characterization of carbon metabolism in *Rhizobium japonicum* bacteroids, in Nitrogen Fixation and CO₂ Metabolism. In: Ludden, P.W. and Burris, J.E. New York, N. Y.: Elsevier Science Publishing Co., 1985, p. 21-30.
- Emerich, D.W., Anthon, G.E., Hayes, R.R., Karr, D.B., Liang, L., Preston, G.G., Sait, M.T., and Waters, J.E. Metabolism of *Rhizobium*-leguminous plant nodules with an emphasis on bacteroid carbon metabolism, in Nitrogen fixation: Hundred Years After. In: Bothe, H., de Bruijn, F.J., and Newton, W.E. New York, N. Y. Gustav Fischer, 1988, p. 539-546.
- Emeraeson, S., Dunn, M., Willis, K. and Mora, J. Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium etli*. 1995. *J. Bacteriol.* 177:3058-3066.
- Epim, G., Morano, S., Wild, M., Mesa, R. and Taccarino, M. A previously unrecognized glutamine synthetase expressed in *Klebsiella pneumoniae* from the *glnT* locus of *Rhizobium leguminosarum*. 1990. *Mol. Gen. Genet.* 223:513-516.
- Farr, S.B. and Segona, F. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. 1991. *Microbiol. Rev.* 55:561-565.
- Farrand, S.R., Evans, I. and Cook, S.M. The *tra* region of the nopaline-type Ti plasmid is a chimera with elements related to the transfer systems of RSF1010, RP4, and F. 1996. *J. Bacteriol.* 178:4233-4247.

- Feng, J., Atkinson, M.R., McCleary, W., Stock, J.B., Wanner, B.L. and Miafa, A.J.** Role of phosphorylated metabolic intermediates in the regulation of glutamine synthetase synthesis in *Escherichia coli*. 1992. *J. Bacteriol.* 174:6061-6070.
- Finan, T.M., Oresnik, I. and Bottacin, A.** Mutants of *Rhizobium meliloti*: Defective in succinate metabolism. 1988. *J. Bacteriol.* 170:3396-3403.
- Finan, T.M., Wood, J.M. and Jordan, D.C.** Symbiotic properties of C₄-dicarboxylic acid transport mutants of *Rhizobium leguminosarum*. 1983. *J. Bacteriol.* 154:1403-1413.
- Finogold, S.M.** Mechanisms of resistance in anaerobes and new developments in testing. 1989. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* 12:1175-1205.
- Florez-Samaniego, B., Olivera, M. and Gonzalez, A.** Glutamine synthesis is a regulatory signal controlling glucose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. 1993. *J. Bacteriol.* 175:7705-7706.
- Francis, A.J. and Alexander, M.** Catalase activity and nitrogen fixation in legume root nodules. 1972. *Can. J. Microbiol.* 18:861-864.
- Fuchs, B.L. and Reister, D.L.** Identification of two glutamine synthetases in *Agrobacterium*. 1980. *J. Bacteriol.* 141:996-998.
- Fugua, W.C., Wisnes, S.C. and Greenberg, E.P.** Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. 1994. *J. Bacteriol.* 176:269-275.
- Gambello, M.J. and Iglewski, B.M.** Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. 1991. *J. Bacteriol.* 173:3000-3009.
- Gambello, M.J., Kaye, S. and Iglewski, B.M.** LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. 1993. *Infect. Immun* 61:1180-1184.
- Gardiel, A., Arias, A., Cervenansky, C., Gaggero, C. and Martinez-Drets, G.** Biochemical characterization of a fructokinase mutant of *Rhizobium meliloti*. 1980. *J. Bacteriol.* 144:12-16.
- Gardiel, A.E., Truchet, G.L. and Dasso, F.S.** Requirement of succinate dehydrogenase activity for symbiotic bacteroid differentiation of *Rhizobium meliloti* in alfalfa nodules. 1987. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1947-1950.
- Georgiev, C.D., Dueveke, T.J. and Gennis, R.B.** Regulation of expression of the cytochrome d terminal oxidase in *Escherichia coli* is transcriptional. 1988. *J. Bacteriol.* 170:961-966.

- Gilson, L., Kuo, A. and Dunlap, P.V. Ains and a new family of autoinducer synthesis proteins. 1995. *J. Bacteriol.* 177:6946-6951.
- Glesbreck, J., Ichige, A. and Walker, G.C. A *Rhizobium meliloti* homolog of the *Escherichia coli* peptide-antibiotic transport protein HMA is essential for bacteroid development. 1993. *Genes Dev.* 7:1485-1497.
- Gleim, A.R. and Brevin, M.J. Succinate-resistant mutants of *Rhizobium leguminosarum*. 1981. *J. Gen. Microbiol.* 126:237-241.
- Gleim, A.R., McKay, I.A., Arvas, R. and Silwerth, M.J. Sugar metabolism and the symbiotic properties of carbohydrate mutants of *Rhizobium leguminosarum*. 1984. *J. Gen. Microbiol.* 130:239-245.
- Gleim, A.R., Poole, P.S. and Hudman, J.F. Succinate uptake by free-living and bacterial forms of *Rhizobium leguminosarum*. 1980. *J. Gen. Microbiol.* 119:267-271.
- Goldberg, I. and Hochman, A. Purification and characterization of a novel type of catalase from the bacterium *Klebsiella pneumoniae*. 1989. *Biochim. Biophys. Acta* 991:330-336.
- Goodchild, B.J. and Bergersen, F.J. Electron microscopy of the infection and subsequent development of soybean nodule cells. 1966. *J. Bacteriol.* 92:204-213.
- Graham, P.S. Studies on the utilization of carbohydrates and Krebs cycle intermediates by rhizobia using an agar plate method. 1964. *Antonie Van Leeuwenhoek* 30:68-72.
- Gray, C.T., Wimpey, J.W., Hughes, D.E. and Messam, M.R. Regulation of metabolism in facultative bacteria. I. Structural and functional changes in *Escherichia coli* associated with shifts between the aerobic and anaerobic states. 1966. *Biochim. Biophys. Acta* 117:22-32.
- Gray, E.W., Pearson, J.P., Downie, J.A., Beheys, B.E. and Greenberg, E.P. Cell-to-cell signaling in the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium leguminosarum*: autoinduction of a stationary phase and rhizosphere-expressed genes. 1996. *J. Bacteriol.* 178:372-376.
- Green, L.S. and Emerich, D.W. *Bradyrhizobium japonicum* Does Not Require alpha-Ketoglutarate Dehydrogenase for Growth on Succinate or Malate. 1997. *J. Bacteriol.* 179 No. 1:194-201.
- Greenberg, E.P., Hastings, J.W. and Ulitsur, S. 1979. *Arch. Microbiol.* 120:87-91.
- Greenberg, J.T. and Dangle, B. A global response induced in *Escherichia coli* by redox-cycling agents overlaps with that induced by peroxide stress. 1989. *J. Bacteriol.* 171:3933-3939.

Groot, R.C., Schults, J.E., Sychlinsky, E., Beckman, A. and Matin, A. Starvation proteins in *Escherichia coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival. 1986. *J. Bacteriol.* 168:486-493.

Halliwell, B. How to characterize a biological antioxidant. 1990. *Free. Radic. Res. Commun.* 9:1-32.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. 1986. *Arch. Biochem. Biophys.* 246:501-514.

Salgan, Y.S. Control of transport and utilization of nitrogen sources in bacteria. In: Nitrogen Source Control of Microbial Processes, edited by Sánchez-Esquivel, S. USA: Boca Raton: CRC Press, 1988, p. 21-58.

Samselka, B.L. and Greenberg, E.F. Evidence that the N-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein constitutes an autoinducer-binding domain. 1995. *J. Bacteriol.* 177:815-817.

Sengge-Arenas, R. Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. 1993. *Cell* 72:165-168.

Seminoff, S., Naugha, G.W., Calvo, J.M. and Wallace, J.C. A large family of bacterial activator proteins. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6602-6606.

Somero, M., Kalusa, R., Theay, S., Fuhrmann, M., Ludwig, W. and Stachbrandt, S. Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in *Rhizobium* species and other nitrogen fixing bacteria. 1985. *Arch. Microbiol* 142:342-348.

Soriano-Lucas, I., Parde, M.A., Segovia, L., Miranda, J. and Martínez-Bonero, B. *Rhizobium tropici* chromosomal citrate synthase gene. 1995. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3992-3997.

Soriano, G. and Mora, J. Glutamine synthesis regulates sucrose catabolism in *Neurospora crassa*. 1986. *J. Gen. Microbiol.* 132:3315-3323.

Szala, B., Stigter, J. and Ausubel, F.M. The central domain of *Rhizobium leguminosarum* DctD functions independently to activate transcription. 1992. *J. Bacteriol.* 174:1428-1431.

Uijbarts, G.H., Eggink, G., de Waard, P., Huismans, G.W. and Witholt, B. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:536-544.

Uuimans, G.W., de Leeuw, O., Eggink, G. and Witholt, B. Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. 1989. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1949-1954.

Swieman, G.W. and Kelter, A. Sensing starvation: a homoserine lactone-dependent signaling pathway in *Escherichia coli*. 1994. *Science* 265:537-539.

Szwedart, D., Sigaud, S., Moreau, S., Frensd, P., Touati, D. and Pugs, A. Cloning and Characterization of the *KatA* Gene of *Rhizobium meliloti* Encoding a Hydrogen Peroxide-Inducible Catalase. 1996. *J. Bacteriol.* 178:6802-6809.

Ivanova, A., Miller, C., Glinksky, G. and Eisenstark, A. Role of *rpoS* (*KatF*) in *oxyR*-independent regulation of hydroperoxidase I in *Escherichia coli*. 1994. *Mol. Microbiol.* 12:571-578.

Jachson, P.A. and Dawes, E.A. Regulation of the tricarboxylic acid cycle and poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Asotobacter beijerinckii* grown under nitrogen or oxygen limitation. 1976. *J. Gen. Microbiol.* 97:303-312.

Jakubowski, H. and Goldman, E. Editing of errors in selection of amino acids for protein synthesis. 1992. *Microbiol. Rev.* 56:412-429.

Jenkins, D.E., Aeger, E.A. and Matin, A. Role of *RpoH*, a heat shock regulator protein, in *Escherichia coli* carbon starvation protein synthesis and survival. 1991. *J. Bacteriol.* 173:1992-1996.

Jenkins, D.E., Chaisson, S.A. and Matin, A. Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. 1990. *J. Bacteriol.* 172:2779-2781.

Jimenez-Bardo, J.I., Garcia-Rodriguez, F.M. and Toro, H. The *Rhizobium meliloti* *putA* gene: its role in the establishment of the symbiotic interaction with alfalfa. 1997. *Mol. Microbiol.* 23:85-93.

Jim, H.H., Dilwerth, M.J. and Gleam, A.R. 4-Aminobutyrate is not available to bacteroids of cowpea *Rhizobium* MNF2030 in snake bean nodules. 1990. *Arch. Microbiol.* 153:455-462.

Jim, H.H., Gleam, A.R. and Dilwerth, M.J. How does L-glutamate transport relate to selection of mixed nitrogen sources in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* and cowpea *Rhizobium* MNF2030. 1990. *Arch. Microbiol.* 153:448-454.

Jones, S., Yu, B., Bainton, W.J. The *lux* autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. 1993. *EMBO J* 12:2477-2482.

Kahn, M.L., Kraus, J. and Somerville, J.E. A model of nutrient exchange in the *Rhizobium*-legume symbiosis. In: *Nitrogen Fixation Research Progress*, edited by Evans, H.J., Bottomley, P.J. and Newton, W.E. Nijhoff, Dordrecht: Martinus Nijhoff, Dordrecht, 1985, p. 193-199.

Kaiser, D. and Losick, R. How and why bacteria talk to each other. 1993. *Cell* 73:873-885.

- Salusa, K., Fahrman, M., Sahn, M., Regensburger, B. and Hennecke, H. In *Rhizobium japonicum* the nitrogenase genes *nifH* and *nifDK* are separated. 1983. *J. Bacteriol.* 155:915-918.
- Sarr, D.S., Waters, J.E. and Emerich, D.W. Analysis of poly- β -hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion exclusion high-pressure liquid chromatography and UV detection. 1984. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:1339-1344.
- Sarr, D.S., Waters, J.E., Sasaki, Y. and Emerich, D.W. Enzymes of the poly- β -hydroxybutyrate and citric acid cycles of *Rhizobium japonicum* bacteroids. 1984. *Plant Physiol.* 75:1158-1162.
- Seth, J. and Regsted, R. Futile cycles in the metabolism of glucose. 1976. *Curr. Top. Cell. Regul.* 10:237-289.
- Seth, J. and Regsted, R. Futile cycling in glucose metabolism. 1978. *Trends Biochem. Sci.* 3:171-174.
- Sohl, D.E., Schubert, K.R., Carter, M.B., Nagedera, C.H. and Shearer, G. Proline metabolism in N₂-fixing root nodules: energy transfer and regulation of purine synthesis. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2036-2040.
- Solomonson, D. and Greenberg, S.P. The *Vibrio fischeri* luminescence gene activator *luxA* is a membrane-associated protein. 1993. *J. Bacteriol.* 175:7307-7312.
- Solter, R., Siegel, D.A. and Teruo, A. The stationary phase of the bacterial life cycle. 1993. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:855-874.
- Sorenfeld, S., Bensman, M. and Milner, Y. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex of *Acetobacter xylinum*. Purification and regulatory properties. 1977. *J. Biol. Chem.* 252:2940-2947.
- Suzuki, H., Fakai, K., Katagiri, H., Minamide, K. and Tajima, S. Isolation and enzymological characterization of infected and uninfected cell protoplasts from root nodules of *Glicine max*. 1988. *Physiol. Plant.* 73:327-334.
- Szies, H.H. and Soffman, P.S. Microaerophily and oxygen toxicity. 1986. *Ann. Rev. Microbiol.* 40:107-130.
- Szies, W.O.W. and LaRue, T.A. Citric acid cycle enzymes and nitrogenase in nodules of *Pisum sativum*. 1977. *Can. J. Microbiol.* 23:1197-1200.
- Lange, R. and Henge-Aronis, R. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. 1991. *Mol. Microbiol.* 5:49-59.
- Lange, R. and Henge-Aronis, R. The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at

- the levels of transcription, translation, and protein stability. 1994. *Genes Dev.* 8:1600-1612.
- Latifi, A., Winson, M.K., Foglino, M. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. 1995. *Mol. Microbiol.* 17:333-343.
- Lavina, M., Fugsley, A.P. and Moreno, F. Identification, mapping, cloning and characterization of a gene (*sbmA*) required for microcin B17 action on *Escherichia coli* K12. 1986. *J. Gen. Microbiol.* 132:1685-1693.
- Levin, D.S., Hollstein, M., Christman, M.F., Schwiers, E.A. and Ames, B.N. A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. 1982. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7445-7449.
- Li, C. and Clarke, S. A protein methyltransferase specific for altered aspartyl residues is important in *Escherichia coli* stationary-phase survival and heat-shock resistance. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9885-9889.
- Liebergesell, M., Schmidt, B. and Steinbuechel, A. Isolation and identification of granule-associated proteins relevant for poly(3-hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in *Chromatium vinosum* D. 1992. *FEBS Microbiol Lett.* 78:227-232.
- Liebergesell, M. and Steinbuechel, A. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyric acid) biosynthetic genes of *Thiocystis violacea*. 1993. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:493-501.
- Loewen, P.C. and Hengge-Aronis, R. The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation. 1994. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:53-80.
- Loewen, P.C. and Switala, J. Purification and characterization of catalase-1 from *Bacillus subtilis*. 1987. *Biochem. Cell Biol.* 65:939-947.
- Loewen, P.C. and Switala, J. Multiple catalases in *Bacillus subtilis*. 1987. *J. Bacteriol.* 169:3601-3607.
- Loewen, P.C., Switala, J. and Triggs-Baine, B.L. Catalases HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently. 1985. *Arch. Biochem. Biophys.* 243:144-149.
- Long, S., McCune, S. and Walker, G.C. Symbiotic loci of *Rhizobium meliloti* identified by random *TnphoA* mutagenesis. 1988. *J. Bacteriol.* 170:4257-4265.
- Long, S.R. *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. 1989. *Cell* 56:203-214.
- Long, S.R. and Staskawicz, B.J. Prokaryotic plant parasites. 1993. *Cell* 73:921-935.

- Lali, G.W. and Strohl, W.R. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. 1990. Appl. Environ. Microbiol. 56:1004-1011.
- Ma, M. and Eaton, J.W. Multicellular oxidant defense in unicellular organisms. 1992. Proc.Natl.Acad.Sci. 89:7924-7928.
- Martin, G.D., Chapman, K.A. and Cheln, B.K. Role of the *Sadyrhizobium japonicum* ntrC gene product in differential regulation of the glutamine synthetase II gene (*glnII*). 1988. J. Bacteriol. 170:5452-5459.
- Martinez-Salas, J.M., Romero, D., Girard, M.L. and Davila, S. Molecular cloning and characterization of the *recA* gene of *Rhizobium phaseoli* and construction of *recA* mutants. 1991. J. Bacteriol. 173:3035-3040.
- McCann, M.P., Kidwell, J.P. and Matin, A. The putative sigma factor KatF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. 1991. J. Bacteriol. 173:4188-4194.
- McDermott, T.R. and Kaba, M.L. Cloning and mutagenesis of the *Rhizobium meliloti* isocitrate dehydrogenase gene. 1992. J. Bacteriol. 174:4790-4797.
- McCowan, S., Sebailia, M., Jones, S., Yu, B., Bainton, N., Chan, P.F., Bycroft, B., Stewart, G.S., Williams, F. and Salmond, G.P. Carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora* is regulated by CarR, a homologue of the LuxR transcriptional activator. 1995. Microbiol. 141:541-550.
- McKay, I.A., Dilworth, M.J. and Glenn, A.R. C4-Dicarboxylate metabolism in free-living and bacteroid forms of *Rhizobium leguminosarum* MNF3841. 1988. J. Gen. Microbiol. 134:1433-1440.
- McKay, I.A., Dilworth, M.J. and Glenn, A.R. Carbon metabolism in continuous cultures and bacteroid forms of *Rhizobium leguminosarum* MNF3841. 1989. Arch. Microbiol. 152:606-610.
- McKay, I.A., Glenn, A.R. and Dilworth, M.J. Gluconeogenesis in *Rhizobium leguminosarum* MNF3841. 1985. J. Gen. Microbiol. 131:2067-2073.
- McKay, I.A., Glenn, A.R. and Dilworth, M.J. C4-dicarboxylate metabolism in free-living and bacteroid forms of *Rhizobium leguminosarum* MNF3841. 1988. J.Gen.Microbiol 134:1433-1440.
- Neighon, E.A. Molecular biology of bacterial bioluminescence. 1991. Microbiol. Rev. 55:123-142.

- Neller, R.D.** Bacteroids in the *Rhizobium-Legume* Symbiosis Inhabit a Plant Internal Lytic Compartment: Implications for other Microbial Endosymbioses. 1989. *J. Exp. Botany* 40 No. 217:831-839.
- Nedak, H.V. and Kelly, D.J.** Acetyl-CoA-dependent pyruvate carboxylase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*: rapid and efficient purification using dye-ligand affinity chromatography. 1995. *Microbiol.* 141:2619-2628.
- Nere, J.** Glutamine metabolism and cycling in *Neurospora crassa*. 1990. *Microbiol. Rev.* 54:293-304.
- Nere, M.L., Singer, L.D., Stryker, J.L., Fagua, C., Eberhard, A. and Wisans, S.C.** Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. 1996. *Science* 272:1655-1658.
- Neustafa, S. and Leong, C.K.** Effect of adenosine nucleotides on NAD-dependent isocitrate dehydrogenases in rhizobia and bacteroids of legume root nodules. 1975. *Biochim. Biophys. Acta* 391:9-14.
- Nakata, M., Matsuzaka, M., Kashiwabara, Y., Okada, W. and Sasaki, C.** Nucleotide sequence of the *Mycobacterium leprae* *katG* region. 1997. *J. Bacteriol.* 179:3053-3057.
- Neidhardt, F.C.** What the bacteriologists have learned about heat shock. 1987. *Gen. Develop.* 1:109-110.
- Neuhof, S.A., Challiss, A.J. and Crabtree, B.** Substrate cycles: their role in improving sensitivity in metabolic control. 1984. *Trends Biochem. Sci.* 9:277-280.
- Nystrom, T.** The glucose-starvation stimulus of *Escherichia coli*: induced and repressed synthesis of enzymes of central metabolic pathways and role of acetyl phosphate in gene expression and starvation survival. 1994. *Mol. Microbiol.* 12:833-843.
- Nystrom, T., Flardh, K. and Kjelleberg, S.** Responses to multiple-nutrient starvation in marine *Vibrio* sp. strain CUG 15956. 1990. *J. Bacteriol.* 172:7085-7097.
- Nystrom, T. and Neidhardt, F.C.** Expression and role of the universal stress protein, *UspA*, of *Escherichia coli* during growth arrest. 1994. *Mol. Microbiol.* 11:537-544.
- Nystrom, T.** In: *Starvation in Bacteria*, edited by Kjelleberg, S. Plenum Press: Starvation in Bacteria, 1993, p. 129-149.
- Nystrom, T.** 1994. *Gen. Genet.* 245:355-362.
- Osteras, M., Finns, T.W. and Stanley, J.** Site-directed mutagenesis and DNA sequence of *pckA* of *Rhizobium* NGR234, encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase: gluconeogenesis and host-dependent symbiotic phenotype. 1991. *Mol. Gen. Genet.* 230:257-269.

Ogaki, M., Wada, A., Fujita, N. and Ishihama, A. Growth phase-dependent modification of RNA polymerase in *Escherichia coli*. 1991. Mol. Gen. Genet 230:17-23.

Sarda, M.A., Legunes, J., Miranda, J. and Martinez, M. Modulating ability of *Rhizobium tropici* is conditioned by a plasmid-encoded citrate synthase. 1994. Mol. Microbiol. 11:315-321.

Parke, D. and Orston, L.M. Enzymes of the β -ketoacid pathway are inducible in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. and constitutive in *Bradyrhizobium* spp. 1986. J. Bacteriol. 165:288-292.

Parkinson, J.S. Signal transduction schemes of bacteria. 1993. Cell 73:857-871.

Parkinson, J.S. and Kofoid, E.C. Communication modules in bacterial signaling proteins. 1992. Annu. Rev. Genet. 26:71-112.

Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L. and Iglewski, S.M. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. 1993. Science 260:1127-1130.

Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:197-201.

Pearson, J.P., Passador, L., Iglewski, S.M. and Greenberg, E.P. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. 1995. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1490-1494.

Pedrosa, F.O. and Hancock, G.T. L-Arabinose metabolism in *Rhizobium japonicum*. 1974. J. Bacteriol. 119:336-338.

Pfeifer-Furst, U., Madkour, M.M., Mayer, F. and Steinbuechel, A. Purification and characterization of a 14-kilodalton protein that is bound to the surface of polyhydroxyalkanoic acid granules in *Rhodococcus ruber*. 1994. J. Bacteriol. 176:4328-4337.

Piper, E.R., Beck von Bodman, S. and Ferrand, S.K. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates T1 plasmid transfer by autoinduction. 1993. Nature 362:448-450.

Pishonen, M., Flege, D., Heikkinen, R. and Palva, E.T. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. 1993. EMBO J 12:2467-2476.

Poole, P.S., Franklin, M., Glenn, A.R. and Dilworth, M.J. The transport of L-glutamate by *Rhizobium Leguminosarum* involves a common amino acid carrier. 1986. J. Gen. Microbiol. 131:1441-1448.

Preisig, O., Anthamatten, D. and Hennecke, M. Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are

essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3309-3313.

Preston, G.G., Seiber, C., Wall, J. and Emerich, D.W. Acetate-activating enzymes of *Bradyrhizobium japonicum* Bacteroids. 1989. Appl. Environ. Microbiol 55:165-170.

Prezley, A.P. and Cole, S.T. β -Galactosidase and alkaline phosphatase do not become extracellular when fused to the amino-terminal part of colicin M. 1986. J. Gen. Microbiol. 132:2297-2307.

Puppe, A., Rigaud, J. and Job, D. Role of the superoxide anion in the leghemoglobin autoxidation. 1981. Plant Sci. 22:353-360.

Rasmussen, L.J., Møller, P.L. and Atlung, T. Carbon metabolism regulates expression of the *pfl* (pyruvate formate-lyase) gene in *Escherichia coli*. 1991. J. Bacteriol. 173:6390-6397.

Ravetherne, S., Minchin, P.R., Summerfield, R.J., Cookson, C. and Coombe, J. Carbon and nitrogen metabolism in legume root nodules. 1980. Phytochem. 19:341-355.

Reeve, C.A., Amy, P.S. and Matin, A. Role of protein synthesis in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* K-12. 1984. J. Bacteriol. 160:1041-1046.

Ritchie, G.A., Senior, F.J. and Daves, E.A. The purification and characterization of acetoacetyl-coenzyme A reductase from *Asotobacter beijerinckii*. 1971. Biochem. J. 121:309-316.

Roche, E.R., Selby, T., Coleman, J.P. and Smith, C.J. Oxidative stress response in an anaerobe, *Bacteroides fragilis*: a role for catalase in protection against hydrogen peroxide. 1996. J. Bacteriol. 178:6895-6903.

Rosen, C.W., Lyttleton, P. and Robertson, J.G. C4-dicarboxylate transport mutants of *Rhizobium trifolii* from ineffective nodules on *Trifolium repens*. 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:4284-4288.

Rosen, C.W. and Primrose, S.B. Carbohydrate metabolism in *Rhizobium trifolii*: Identification and symbiotic properties of mutants. 1979. J. Gen. Microbiol. 112:77-88.

Roszbach, S., Schell, J. and de Bruijn, P.J. The *ntrC* of *Agrobacterium tumefaciens* C58 controls glutamine synthetase (GSII) activity, growth on nitrate and chromosomal but not T1-encoded arginine catabolism pathways. 1987. Mol. & Gen. Genet. 209:419-426.

Rossi, M., Dejon, R., Chiarassi, M., Lamberti, A., Puggi, A. and Lascarino, M. Regulation of glutamine isoenzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae*. 1989. J. Gen. Microbiol. 135:629-637.

- Emse, F.D. and Silhavy, T.J.** The essential tension: opposed reactions in bacterial two-component regulatory systems. 1993. *Trends Microbiol* 1:306-310.
- Ryan, T.P. and Aust, S.D.** The role of iron in oxygen-mediated toxicities. 1992. *Crit. Rev. Toxicol.* 22:119-141.
- Edlin, M. and Warner, D.** Regulation of the β -ketoadipate pathway in *Rhizobium japonicum* and bacteroids by succinate. 1985. *Arch. Microbiol.* 140:375-379.
- Selaiman, S.O. and Streeter, J.G.** Involvement of glutamate in the respiratory metabolism of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. 1987. *J. Bacteriol.* 169:495-499.
- Salsmond, G.P., Bycroft, B.W., Stewart, G.S. and Williams, P.** The bacterial "enigma": cracking the code of cell-cell communication. 1995. *Mol. Microbiol.* 16:615-624.
- Samuel, B.D.** Allosteric controls of amphibolic pathways in bacteria. 1970. *Bacteriol. Rev.* 34:20-39.
- Saroso, S., Dilworth, M.J. and Glenn, A.R.** The use of activities of carbon catabolic enzymes as a probe for the carbon nutrition of snake bean nodule bacteroids. 1986. *J. Gen. Microbiol.* 132:243-249.
- Schaefer, A.L., Hantselka, B.L., Eberhard, A. and Greenberg, E.P.** Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs. 1996. *J. Bacteriol.* 178:2897-2901.
- Schellhorn, M.S.** Regulation of hydroperoxidase (catalase) expression in *Escherichia coli*. 1995. *FEMS Microbiol. Lett.* 131:113-119.
- Schripsema, J.** In: Edinburgh, Abstract no. 71. Seventh International Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions, 1994.
- Schripsema, J., de Sudder, R.E., van Vliet, T.B., Lambhorst, P.P., de Vries, E., Rijse, J.W. and van Brussel, A.A.** Bacteriocin small of *Rhizobium leguminosarum* belongs to the class of N-acyl-L-homoserine lactone molecules, known as autoinducers and as quorum sensing co-transcription factors. 1996. *J. Bacteriol.* 178:366-371.
- Schultze, M.** 1994. *Int. Rev. Cytol.* 156:1-75.
- Schultze, M. and Kondorosi, A.** What makes nodulation signals host-plant specific? 1995. *Trends Microbiol.* 3:370-372.
- Seeh, T.C., Shatti, A.R. and Kaplan, J.G.** Novel catalytic proteins of bakers' yeast. I. An atypical catalase. 1973. *Can. J. Biochem.* 51:1551-1555.
- Seeh, T.C. and Kaplan, J.G.** Purification and properties of the catalase of bakers' yeast. 1973. *J. Biol. Chem.* 248:2889-2893.

Senior, P.J., Beech, G.A., Ritchie, G.A. and Daves, B.A. The role of oxygen limitation in the formation of poly- β -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. 1973. *Biochem. J.* 128:1193-1201.

Senior, P.J. and Daves, B.A. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. 1971. *Biochem. J.* 125:55-66.

Shatters, R.G., Liu, Y. and Kahn, M.L. Isolation and characterization of a novel glutamine synthetase from *Rhizobium meliloti*. 1993. *J. Biol. Chem.* 268:469-475.

Shatters, R.G., Somerville, J.B. and Kahn, M.L. Regulation of glutamine synthetase II activity in *Rhizobium meliloti* 104A14. 1989. *J. Bacteriol.* 171:5087-5094.

Siegele, D.A. and Koltter, R. Life after log. 1992. *J. Bacteriol.* 174:345-348.

Sitnikov, D.M., Schineller, J.B. and Baldwin, T.O. Transcriptional regulation of bioluminescence genes from *Vibrio fischeri*. 1995. *Mol. Microbiol.* 17:801-812.

Speeter, M.P. and Cubitt, C.L. Starvation-inducible loci of *Salmonella typhimurium*: regulation and roles in starvation-survival. 1992. *Mol. Microbiol.* 6:1467-1476.

Speeter, M.P. and Foster, J.W. In: Kjelleberg, S. Plenum Press: Starvation in Bacteria, 1993, p. 201-224.

Sponzo, J., Cegielska, A. and Georgopoulos, C. Role of *Escherichia coli* heat shock proteins DnaK and HtpG (C62.5) in response to nutritional deprivation. 1990. *J. Bacteriol.* 172:7157-7166.

Stadman, E.R. A note on the significance of glutamine in intermediary metabolism. In: *The Enzymes of Glutamine Metabolism*, edited by Prusiner, S. and Stadman, E.R. New York, NY: Academic Press, 1973, p. 1-6.

Steinbuechel, A., Hustedte, B., Liebergesell, M., Pieper, W., Tims, A. and Valentini, M. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. 1992. *FEMS Microbiol. Rev.* 9:217-230.

Stock, J.B., Miafa, A.J. and Stock, A.M. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. 1989. *Microbiol. Rev.* 53:450-490.

Stors, G., Vartaglia, L.A., Farr, S.B. and Ames, B.N. Bacterial defenses against oxidative stress. 1990. *Trends Genet.* 6:363-368.

Streeter, J.G. and Salminen, S.O. Carbon metabolism in legume nodules. In: *Nitrogen Fixation Research Progress*, edited by Evans, H.J.,

- Bottomley, P.J. and Newton, W.E. Dordrecht: Martinus Nijhoff, Dordrecht., 1985, p. 277-283.
- Uejima, S., Kousai, K. and Kimura, I. NAD(P)/NAD(P)H ratio and energy charge in succinate degrading soybean nodule bacteroids, in Nitrogen Fixation: Hundred Years After. In: Bothe, H., de Bruijn, F.J. and Newton, W.E. New York, N. Y.: Gustav Fischer., 1988, p. 564.
- Suzuka, K., Takayama, Y., Fujita, S., Ishihama, A. and Takahashi, H. Heterogeneity of the principal sigma factor in *Escherichia coli*: The *spoS* gene product, sigma³⁸, is a second principal sigma factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*. 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3511-3515.
- Yoo, K., Makino, K., Yonei, S., Nakata, A. and Shinagawa, S. Molecular cloning and nucleotide sequencing of *oxyR*, the positive regulatory gene of a regulon for an adaptive response to oxidative stress in *Escherichia coli*: homologies between OxyR protein and a family of bacterial activator proteins. 1989. Mol. Gen. Genet. 218:371-376.
- Savernier, P., Portais, J.C., Nava Saucedo, J.E., Courtois, J., Courtois, S. and Barbotin, J.M. Exopolysaccharide and Poly-β-Hydroxybutyrate Coproduction in Two *Rhizobium meliloti* Strains. 1997. Appl. Environ. Microbiol. 63, No. 1.:21-26.
- Thöny-Meyer, L. and Kussler, P. The *Bradyrhizobium japonicum* acetonitase gene (*acnA*) is important for free-living growth but not for an effective root nodule symbiosis. 1996. J. Bacteriol. 178:6166-6172.
- Vinn, A. and Steinbüchel, A. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. 1990. Appl. Environ. Microbiol. 56:3360-3367.
- Voder, D.S., Gambello, M.J. and Iglewski, B.H. *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of lasK. 1991. Mol. Microbiol. 5:2003-2010.
- Venbolini, R., Devoile, J., Buson, A., Squartini, A. and Nuti, M.P. Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) biosynthetic genes in *Rhizobium meliloti* 41. 1995. Microbiol. 141:2553-2559.
- Triggs-Raine, B.L., Doble, B.W., Mulvey, M.R., Sorby, P.A. and Leewen, P.C. Nucleotide sequence of *KatG*, encoding catalase MPI of *Escherichia coli*. 1988. J. Bacteriol. 170:4415-4419.
- Tsuparova, D.L., Socrat, O.N., Oslova, E.V., Kaiseler, N.A., Peshkin, A.V., Shifelova, G.S., Solovieva, N.A., Svtigneeva, S.G. and Kratovich, W.L. Electron microscopy of multi forms of glutamine synthetase from bacteroids and the cytosol of yellow Lupin root nodules. 1987. Biochim. Biophys. Acta 913:368-376.
- Ugvardi, M.K. and Kahn, M.L. 1992. Symbiosis 14:87-101.

- Ulltsrus, S. The regulatory control of the bacterial luminescence system - a new view. 1989. *J. Biolumin. Chemilumin.* 4:317-325.
- van Rhijn, P., Luyten, E., Vlaspolder, K. and Vanderleyden, J. Isolation and characterization of a pSym locus of *Rhizobium* sp. BR816 that extends nodulation ability of narrow host range *Phaseolus vulgaris* symbionts to *Leucaena leucocephala*. 1996. *Mol. Plant Microbe Interact.* 9:74-77.
- VanSegelen, R.A., Sankar, P., Clark, R.L., Sogon, J.A. and Weidhardt, F.C. The gene-protein database of *Escherichia coli*: edition 5. 1992. *Electrophoresis* 13:1014-1054.
- von Ossowski, I., Mulvey, M.R., Leco, P.A., Borys, A. and Loewen, P.C. Nucleotide sequence of *Escherichia coli* katE, which encodes catalase HPII. 1991. *J. Bacteriol.* 173:514-520.
- Warne, S.R., Varley, J.M., Boulnois, G.J. and Norton, M.G. Identification and characterization of a gene that controls colony morphology and auto-aggregation in *Escherichia coli* K12. 1990. *J. Gen. Microbiol.* 136:455-462.
- Waters, J.R., Karr, D.B. and Emerich, D.W. Malate dehydrogenase from *Rhizobium japonicum* 3IIb-143 bacteroids and Glycine max root-nodule mitochondria. 1985. *Biochem.* 24:6479-6486.
- Weitsman, P.D. Regulation of citrate synthase activity in *Escherichia coli*. 1966. *Biochim. Biophys. Acta* 128:213-215.
- Weitsman, P.D. Unity and diversity in some bacterial citric acid-cycle enzymes. 1981. *Adv Microb Physiol* 22:185-244.
- Weitsman, P.D. and Jones, D. Regulation of citrate synthase and microbial taxonomy. 1968. *Nature* 219:270-272.
- Weitsman, P.D. Regulation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase activity in *Acinetobacter*. 1972. *FEBS Lett.* 22:323-326.
- Werner, D., Wilcockson, J. and Kalkowski, B. Nitrogen-fixing activities in *Rhizobium japonicum* separated from plant cell cultures. 1975. *Z. Naturforsch.* 30:678-688.
- Westerhoff, H.V., Mellinger, R.J. and Van Dam, R. Thermodynamic efficiency of microbial growth is low but optimal for maximal growth rate. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:305-309.
- Williams, P., Sinton, M.J., Swift, S., Chhabra, S.R., Winson, M.K., Stewart, G.S., Salmond, G.P. and Sycroft, B.W. Small molecule-mediated density-dependent control of gene expression in prokaryotes: bioluminescence and the biosynthesis of carbapenem antibiotics. 1992. *FEMS Microbiol. Lett.* 79:161-167.

Wong, P. and Evans, M.J. Poly- β -hydroxybutyrate utilization by soybean (*Glycine max merr.*) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. 1971. *Plant Physiol.* 47:750-755.

Woodbury, W., Spencer, A.K., and Stahmann, M.A. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. 1971. *Annals. Biochem.* 44:33-41.

Zambrano, M.M. and Klotter, R. GASPing for life in stationary phase. 1996. *Cell* 86:181-184.

Zhang, L., Murphy, P.J., Kerr, A. and Tate, M.E. *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones. 1993. *Nature* 362:446-448.