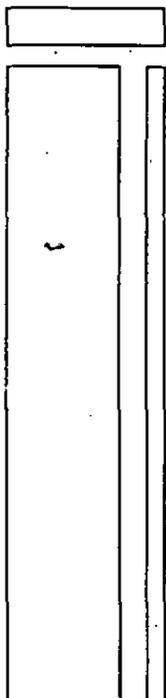




Universidad de la República
FACULTAD DE AGRONOMIA



21 MAYO 1996



ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA Y UTILIZACION DEL NITRATO POR RIZOBIOS QUE NODULAN LOTUS

P. DIAZ - O. BORSANI - F. MILNITSKY - J. MONZA

BOLETIN DE INVESTIGACIONES Nº 44

MONTEVIDEO

1995

URUGUAY

FACULTAD DE AGRONOMIA

DEPARTAMENTO DE DOCUMENTACION Y BIBLIOTECA

Las solicitudes de adquisición y de intercambio con esta publicación deben dirigirse al Departamento de Documentación, Facultad de Agronomía, Garzón 780, Montevideo-URUGUAY

Comisión de Publicaciones:

Ing. Agr. Osvaldo del Puerto (egresado)

Ing. Agr. Hugo Petrocelli (docente)

Ing. Agr. Héctor González (docente)

Ing. Agr. Virginia Rossi (docente)

Bach. Marcelo Nougue (estudiante)

Bach. Mario Lema (estudiante)

Bach. Gustavo Uriarte (Editor)

Actividad nitrato reductasa y utilización del nitrato por rizobios que nodulan lotus / P. Díaz, O. Borsani, F. Milnitsky y J. Monza -- Montevideo: Facultad de Agronomía, 1995. -- 11 p.-- (Boletín de Investigación; 44)

NITRATO REDUCTASA

RHIZOBIUM LOTI

Díaz, P

Borsani, O, coaut.

Milnitsky, F, coaut

Monza, J, coaut.

CDU 577.1

ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA Y UTILIZACION DEL NITRATO POR RIZOBIOS QUE NODULAN LOTUS.¹

P. Díaz,^{2,3} O. Borsani,³ F. Milnitsky³ y J. Monza.³

RESUMEN

Se estudió la utilización del nitrato, actividad nitrato reductasa constitutiva (ANRc) y tiempo de inducción de la nitrato reductasa inducida (NRi) en 9 cepas nativas de *Rhizobium loti*, en la cepa usada como inóculante comercial y en un *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*.

Las cepas de crecimiento rápido no exhibieron ANRc y el período de inducción de la NRi, para la concentración de nitrato utilizada, fue de 2 h. Los valores de actividad NRi (ANRi) en las cepas T₁ y T₂ fueron, al menos, un orden de magnitud mayor respecto al promedio de la actividad encontrada en el resto de las cepas. El perfil de ANRi de las cepas de crecimiento rápido se correlacionó con la utilización de nitrato y liberación de nitrito al medio, lo que confirma que se trata de la forma inducible de la enzima.

Todas las cepas utilizaron nitrato como única fuente de nitrógeno en medio definido.

Palabras clave: nitrato reductasa, utilización de nitrato, *R. loti*.

SUMMARY

Nitrate utilization, constitutive nitrate reductase activity (cNRA) and time of induction nitrate reductase (iNR) were studied in 9 *Rhizobium loti* native strains, the commercial inoculant strain and one *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*.

The fast-growing strains did not exhibit cNRA and induction time of iNR was 2 hours for the nitrate concentration utilized. The iNRA level was greater in T₁ and T₂ strains than in the others strains tested. The correlation between the fast-growing strains NRA profiles with the nitrate uptake and nitrite production, confirmed the induced form of this enzyme.

All strains tested used nitrate as the sole source of nitrogen in defined medium.

Keys words: nitrate reductase, nitrate uptake, *R. loti*

Recibido el 19 de febrero, 1992

Aprobado el 24 de mayo, 1993

⁽¹⁾ Financiamiento S.A.R.E.C.

⁽²⁾ Unidad Asociada Fijación Biológica de Nitrógeno y Hongos Micorrizicos - Facultad de Ciencias

⁽³⁾ Cátedra de Bioquímica - Facultad de Agronomía.

INTRODUCCIÓN

La nitrato reductasa es la enzima responsable de catalizar la reducción de nitrato a nitrito, primera reacción en la vía de reducción del nitrato en plantas y bacterias.

En bacterias, dos formas de nitrato reductasas (NRs) han sido descritas por Pichinoty y Piechaud (1968). La forma A (NR A) corresponde a una proteína asociada a membrana y la forma B (NR B) a una proteína soluble cuya síntesis es inducida por el sustrato. La NR A en condiciones de anaerobiosis utiliza el nitrato como aceptor final de la cadena transportadora de electrones, con la consecuente formación de ATP. De esta forma, la NR A es la primer enzima de la secuencia de reacciones que en anaerobiosis conduce a la formación de los productos de la desnitrificación (N_2O y N_2) (O'Hara and Daniel, 1985; Payne, 1981). Recientemente se ha encontrado que *B. japonicum* cepa CB 1809 asimila y desnitrifica nitrato simultáneamente (Vairinhos *et al.*, 1989). En general, el género *Bradyrhizobium* presenta mayor capacidad desnitrificadora que el género *Rhizobium* con las excepciones de algunas cepas de *R. meliloti* y *R. trifolii* (Daniel *et al.*, 1982). Se ha propuesto que la desnitrificación producida por los rizobios podría ser equivalente al nitrógeno fijado por la simbiosis (O'Hara and Daniel, 1985).

La forma B de la NR es el mejor ejemplo de una enzima inducible por sustrato. El nitrato promueve la transcripción y traducción de la enzima (Beevers and Hageman, 1980), cuya actividad es inhibida por clorato y azida. El paso catalizado por esta enzima ha sido descrito como la etapa limitante en la vía de reducción de nitrato (Beevers and Hageman, 1980) y utiliza el poder reductor proveniente del catabolismo glucídico.

Las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son capaces de crecer en medios que contienen nitrato como única fuente nitrogenada (Jordan, 1984). Sin embargo, en un estudio preliminar, que incluyó varias especies de rizobios, se encontró que *R. lupini* no crece en medios definidos con nitrato como única fuente de nitrógeno (Manhart and Wong, 1979). En ese estudio no se incluyeron cepas de rizobios que nodularan lotus.

Los objetivos de este trabajo fueron: a) determinar la NRc y el tiempo de inducción de la NRi en cepas de la población nativa de *Rhizobium* que nodula lotus y b) determinar la capacidad de estas cepas de crecer en medio con nitrato como única fuente de nitrógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bacterias

Los microorganismos utilizados en este estudio y sus características más relevantes se indican en la Tabla 1.

TABLA 1. CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS.

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>R. loti</i>		
B816 (U226)	inoculante comercial	(Sicardi y Labandera, 1979)
T ₁	a.n.* serogrupo U226	(Monza <i>et al.</i> 1992)
T ₂	“ “ “ “	(“)
T ₇	“ “ “ “	(“)
S ₂	“ “ “ “	(“)
Se ₄	“ “ “ “	(“)
Su ₁	“ “ “ “	(“)
M _{1,4}	“ “ “ “	(“)
G ₄	“ “ “ “	(“)
Y ₃	“ “ “ “	(“)
<i>B. sp (Lotus)</i>		
CC814s (NZP2309)	“ “ “ “	(Pankhurst <i>et al.</i> 1986)

a.n.*, aislamiento nativo.

Medios y condiciones de cultivo

Las cepas se mantuvieron en medio M79-agar a 4°C (Vincent, 1970). Para obtener cultivos frescos, las cepas crecieron en medio TY (Beringer, 1974) durante 10 horas incubándose en agitación a 28°C. Estos precultivos cuando llegaron a una densidad de 10⁷ cél./ml, se usaron para inocular matraces que contenían 125 ml de medio LMB (Lim and Shanmugan, 1979) modificado, a razón de 1 ml de suspensión bacteriana por cada 50 ml. de medio. El medio LMB modificado contenía concentraciones mM de los siguientes compuestos: KH₂PO₄, 2.2; Na₂HPO₄, 0.8; MgSO₄, 0.4; CaCl₂, 0.3; manitol, 5.5; glutamato monosódico, 5.3; H₃BO₃, 0.2; y en concentraciones uM de ZnSO₄, 3.5; CuSO₄, 2.0; MnO₂, 3.1; MoO₄Na₂, 0.4; FeCl₃, 0.4 y biotina, 0.8. Se ajustó pH a 7.0 con KOH y se esterilizó en autoclave. Para determinar el crecimiento en medio con nitrato como única fuente de nitrógeno se sustituyó el glutamato monosódico por KNO₃, 10 mM.

Medio de inducción para la N.R.

Acido 3-N-Morfolino propanosulfónico (MOPS), 50 mM, pH 7.5 ajustado con KOH (MOPS-KOH); KNO₃, 0.5 mM; glucosa, 5.0 mM y succinato disódico, 5.0 mM. La glucosa y el succinato se esterilizaron por filtración (Millipore 0.45 um).

Determinación de la ANR in vivo

La actividad enzimática se evidenció por aparición de nitrito en la mezcla de ensayo: MOPS-KOH, 50 mM, pH 7.5; KNO_3 , 0.6 mM; succinato disódico, 6.5 mM y glucosa, 6.5 mM (Delgado *et al.*, 1990).

Determinación de nitrito

Se realizó según la técnica propuesta por Nicholas y Nason (1969) modificada. A 0.5 ml de muestra se le agregaron 2.0 ml de sulfanilamida, 60 mM, en HCl 2M y 2.0 ml de N-naftiletildiamina.2HCl, 0.8 mM. Se leyó la absorbancia a 540 nm. NaNO_2 fue utilizando como estándar.

Determinación de nitrato

Se siguió el método de nitración del salicílico descrito por Cataldo *et al.* (1975). A 0.2 ml de muestra se le agregaron 0.8 ml de ácido salicílico 0.36 M en H_2SO_4 concentrado y después de 20 min. se adicionaron 19 ml de NaOH 2M. Se leyó la absorbancia a 410 nm. Se usó KNO_3 como estándar.

Determinación de proteínas

Se siguió el método propuesto por Bradford (1976) con modificaciones. Un volumen de 0.1 ml de muestra se trató con igual volumen de NaOH 0.1 M y se llevó a ebullición durante 5 min. Posteriormente, a 0.1 ml de la muestra así tratada se le agregaron 5.0 ml de una mezcla conteniendo: Azul de Comassie G250, 0.12 mM; etanol, 0.81 M y H_3PO_4 , 1.48 M. La absorbancia se leyó a 595 nm y se utilizó seroalbúmina bovina Sigma Fracción IV como estándar.

Procedimiento experimental

Las bacterias se crecieron en medio LMB a 28°C en agitación hasta fase exponencial tardía. Se centrifugaron durante 10 min. a 5000 r.p.m., 5°C, se lavaron 2 veces con MOPS-KOH 50 mM, pH 7.5 y se resuspendieron en 8 ml del mismo buffer.

Para determinar la ANR, se transfirieron 4 ml del resuspendido a 16 ml de medio de inducción lográndose las concentraciones descritas en el medio de inducción y permanecieron en agitación durante 18 horas. Las determinaciones se realizaron al momento de iniciar el ensayo (t_0) y a las 2, 4, 8, 12 y 18 h. La determinación a t_0 se utilizó para evidenciar la ANRc. En cada tiempo se tomaron 2 ml de la suspensión de bacterias del medio de inducción y se centrifugaron a 10.000 r.p.m. durante 3 min. Para cuantificar la utilización de nitrato y la liberación de nitrito al medio se determinó nitrato y nitrito en el sobrenadante y los valores se expresaron como los nmol de NO_3^- consumido/mg de prot. y nmol de NO_2^- formado/mg de prot. respectivamente. El sedimento se resuspendió en 0.7 ml de mezcla de ensayo *in vivo* y la ANR se expresó

como los $\text{nmol NO}_2^-/\text{mg}$ de prot. h. En cada tiempo se tomaron alícuotas de 0.1 ml para determinar proteínas.

Los resultados son medias de dos repeticiones y el experimento con cada cepa se realizó dos veces.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las cepas ensayadas fueron capaces de crecer en medio definido con nitrato como única fuente de nitrógeno. Esto indica que cualquiera de las cepas, en condiciones de aerobiosis, posee las enzimas de la vía de reducción nitrato y es capaz de transformar el nitrato en formas asimilables por la bacteria.

Ninguna de las cepas de *R. loti* estudiadas exhibieron ANRc, después de crecidas en medio definido con glutamato (Fig. 1), a diferencia de la cepa CC814s de *B. sp.* (*Lotus*) que mostró ANRc (Fig 3). En un medio definido sin nitrato y en condiciones de aerobiosis, las cepas nativas de *R. loti* estudiadas se comportaron en forma similar a lo ya encontrado en dos cepas de *R. loti* (Monza *et al.*, 1992) y a *R. leguminosarum* (Manhart and Wong, 1979).

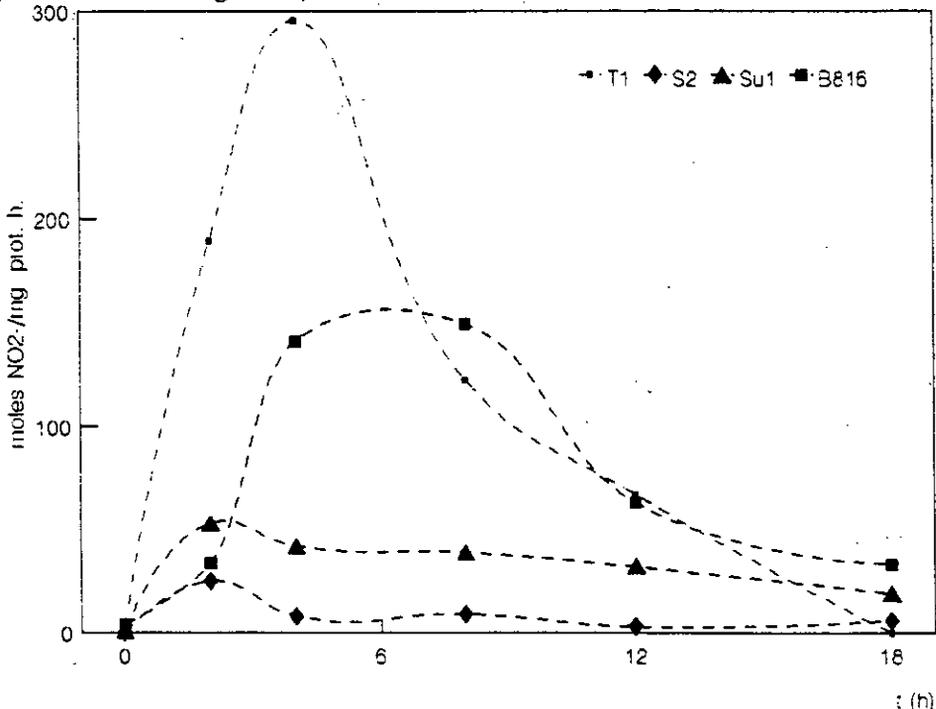


Fig. 1. ANR de cepas de *R. loti* representativas de cada uno de los grupos presentados en resultados y discusión.

Las cepas de *R. loti* estudiadas mostraron inducción de la ANR a las 2 horas de iniciado el ensayo, en el medio de inducción utilizado. Sin embargo, la máxima actividad enzimática en las distintas cepas se observó en diferentes momentos (Tabla 2). Esto sería consecuencia de diferencias en los tiempos de inducción y síntesis de la enzima en las distintas cepas. Por otra parte, también fueron diferentes los valores máximos absolutos de ANRi para las diferentes cepas.

Teniendo en cuenta el perfil de ANRi encontrado en estas cepas se pueden establecer tres grupos, el primero comprende a las cepas que presentan la máxima ANRi entre las 2 y 8 horas en forma mantenida (T_7 , B816, Y_3 , M_{1-4} , Su_1 y Se_4). Dentro de este grupo, Su_1 y Se_4 mostraron valores de ANRi constantes durante 18 h. mientras que en las restantes cepas de este grupo la ANRi fue muy baja después de las 12 h. El segundo grupo (T_1 y T_2), exhibió un rápido aumento de la actividad enzimática, con el máximo de actividad a las 4 h., y un brusco descenso de la misma. Estos valores fueron un orden de magnitud mayor que el promedio de las actividades del grupo anterior. El tercer grupo (G_4 y S_2) incluye cepas con valores máximos de ANRi entre las 2 y 8 h.. Sin embargo, las ANRi de este grupo no superaron el 50% de los valores de ANRi promedio del primer grupo (Fig 1). Los valores de ANRi encontrados en todos los grupos fueron menores al de la ANRc de *B. sp* (*Lotus*) cepa CC814s.

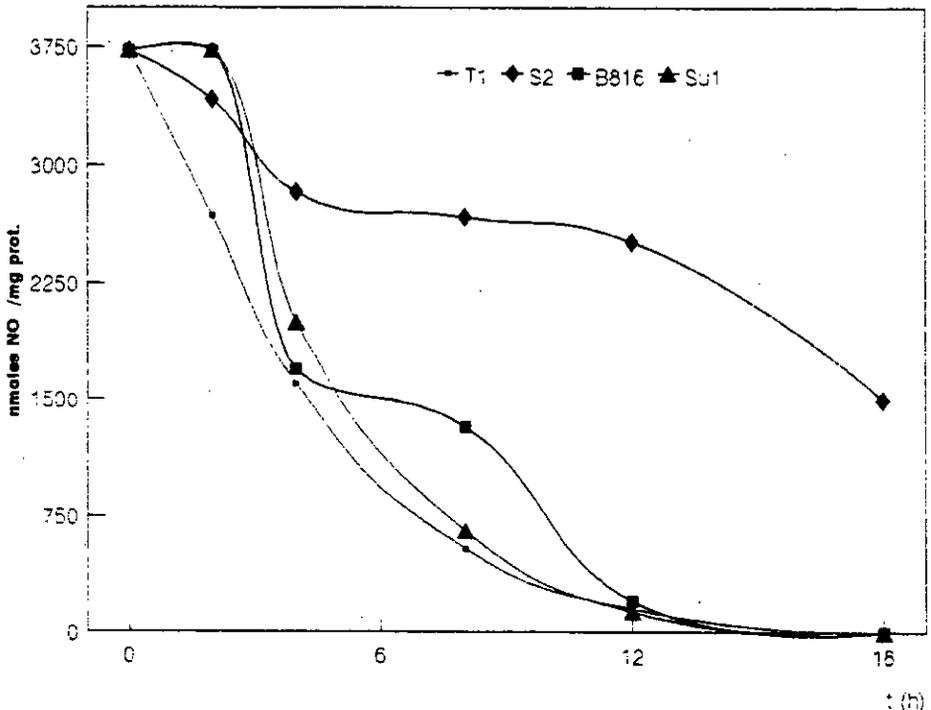


Fig 2. Utilización de nitrato por cepas de *R. loti* representativas de cada uno de los grupos presentados en resultados y discusión

**TABLA 2. VALORES MÁXIMOS DE ANRi Y TIEMPO EN QUE SE
 LOGRÓ DICHA ACTIVIDAD.**

Cepa	ANRi máxima*	Tiempo en que se obtuvo el máximo valor ANRi (h)
<i>R. loti</i>		
T ₁	295.0 ± 15.0	4
T ₂	256.0 ± 8.5	4
B816	150.0 ± 3.5	8
T ₇	116.0 ± 1.0	2
M ₁₋₄	42.7 ± 47.2	2
Y ₃	59.0 ± 9.5	2
Su ₁	53.0 ± 12.0	2
Se ₄	66.0 ± 1.0	8
G ₄	8.0 ± 11.3	8
S ₂	25.0 ± 5.0	2
<i>B. sp (Lotus)</i>		
CC814s	1518.0 ± 56.0	18

*La ANRi se expresa en nmol NO₂ formados/mg prot. h. Los valores son medias de dos repeticiones ± desvío estandar.

A las 2 h. de iniciado el ensayo de inducción, 6 de las cepas de *R. loti* habían consumido menos del 15% del nitrato que utilizaron a lo largo de todo el experimento. Por otra parte, 3 cepas (T₇, Su₁ y B816) no produjeron variaciones en la concentración de nitrato en el medio de inducción durante las dos primeras horas. Un comportamiento particular lo presentaron las cepas T₁ y T₂ que consumieron en ese tiempo más del 15% del nitrato presente en el medio de inducción. Estas cepas además, fueron las únicas que a las 4 h. habían consumido más del 50% del total del nitrato consumido en todo el experimento (Fig. 2). En las cepas del segundo grupo (T₁ y T₂), el máximo valor de ANRi fue coincidente con el descenso del 50% del nitrato del medio. Las cepas del tercer grupo, mostraron una capacidad muy baja de reducir nitrato en las

condiciones de ensayo. Esto se confirma tanto por los valores de ANR exhibidos así como por la baja utilización de nitrato en el período ensayado. El perfil de ANRi de las cepas fue consistente con la utilización de nitrato, lo que confirma que se trata de la forma inducible de la enzima.

En las cepas de crecimiento rápido los valores de ANRi se correlacionaron con la aparición de nitrito en el medio. Sin embargo, la concentración de nitrito en el medio siempre fue mayor a los valores de ANRi (datos no mostrados).

La desaparición de nitrato y la variación de la concentración de nitrito en el medio de inducción (datos no mostrados), fueron semejantes a lo observado por Ishizawa (1980) en *Rhizobium* sp (*Mimosa*).

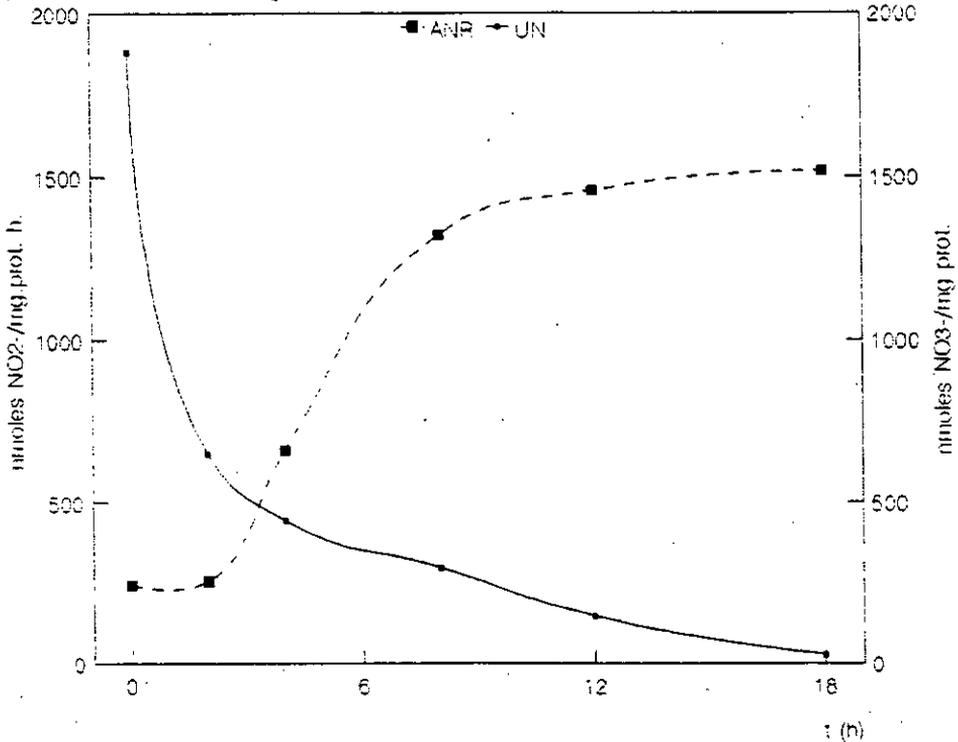


Fig. 3. Actividad nitrato reductasa y utilización de nitrato en *B. sp.* (*Lotus*)

La cepa de crecimiento lento presentó a las 2 h., iguales valores de ANR que a t_0 , e indujo significativamente la síntesis de NR después de ese tiempo. El mayor tiempo de inducción de la enzima en esta cepa, respecto a las cepas de crecimiento rápido, puede ser una característica metabólica más que permita diferenciar *Rhizobium* de *Bradyrhizobium*.

Por otra parte, esta cepa presentó al final del ensayo valores al menos 5 veces mayores que el de ANRc (Fig 3), no detectándose nitrato en el medio de inducción.

Esto permite suponer que la vida media de esta NRi es mayor que las cepas cuya actividad descendía a las 12 h.

BIBLIOGRAFÍA

- Beevers, L. and Hageman, R.. 1980. Nitrate and Nitrite Reduction. En: The Biochemistry of Plants. P. Stumpf and E. (Eds.) . Vol 5:116-168.
- Beringer, J.. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. **84**:188-198.
- Bradford, M.. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**:248-254.
- Cataldo, D.; Haroon, M.; Schrader, L. and Youngs, V.. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue. Commun. Soil Sci. Plant Anal. **6**:71-80.
- Daniel, R. Limmer, A. Steele, K. Smith, I.. 1982. Anaerobic growth nitrate reduction and denitrification in 46 *Rhizobium* strain. J. Gen. Microbiol. **128**:1811-1855.
- Delgado, M; Fernández-López, M; Olivares, J. and Bedmar, E.. 1990. Nitrate utilization by *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. Symbiosis **9**:229-232.
- Ishizawa, S.. 1980. Note on nitrate reduction in *Rhizobium*. Soil Sci. Plant Nutr. **26**:447-450.
- Jordan, D.. 1984. Rhizobiaceae. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. **1**:234-258.
- Lim , S. and Shanmugan, K. 1979. Regulation of H₂ utilization in *Rhizobium japonicum* and energy efficiency of cyclic AMP. Biochem. Biophys. Acta **584**:479-492.
- Manhart, J. and Wong, P.. 1979. Nitrate Reductase Activities of Rhizobia and the Correlation Between Nitrate Reduction and Nitrogen Fixation. Can. J. Microbiol. **25**:1169-1174.
- Monza, J.; Delgado, M. y Bedmar, E.. 1992. Nitrate Reductase and Nitrite Reductase Activity in Free-Living Cells and Bacteroids of *Rhizobium loti*. Plant Soil **139**:203-207.
- Monza, J.; Fabiano, E. and Arias, A.. 1992. Characterization of an indigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. Soil. Biol. Biochem. **3**:241-247.
- Nicholas, D. and Nason, A.. 1969. Determination of nitrate and nitrite. En: Methods in Enzymology. S. Colowick and N. Kaplan (Eds.). Academic Press. New York. Vol. **3**:981-984.
- O'Hara, G. and Daniel, R.. 1985. Rhizobial Denitrification: A Review. Soil Biol. Biochem. **17**:1-9.

- Pankhurst, C.; MacDonald, P. and Reeves, J.. 1986. Enhanced Nitrogen Fixation and Competitiveness for Nodulation of *Lotus Pedunculatus* by a Plasmid-cured Derivate of *Rhizobium loti*. J. Gen. Microb. **132**:2321-2328.
- Payne, W.. 1981. Denitrification. New York: Wiley 79-89.
- Pichinoty, F. et Piechaud, M.. 1968. Recherche des nitrate-reductase bacterienes A et B: Méthodes. Ann. Inst. Pasteur **114**:77-98.
- Sicardi de Mallorca, M. y Labandera, C.. 1979. Control de calidad de inoculantes comerciales de leguminosas en Uruguay (1963-1975). Montevideo-Uruguay. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Boletín Técnico N° 1:1-17.
- Vairinhos, F. ; Wallace, W. and Nicholas, D.. 1989. Simultaneous assimilation and denitrification of nitrate by *Bradyrhizobium japonicum*. J. Gen. Microbiol. **135**:189-193.
- Vincent, J.. 1970. A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. Burgess and son Ltd. (Eds.) 163 pp.