

UN MÉTODO NUEVO PARA AISLAR E IDENTIFICAR DIRECTAMENTE MUTANTES Nit- EN *Escherichia coli* K12

Mariemma Ortega de López

Laboratorio Organización y Expresión del Gen. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela. E-mail: mol@ciens.ula.ve

Resumen

Los métodos para aislar e identificar mutantes defectivos en la respiración anaeróbica del nitrato (Nit-) tienden a ser más específicos para ciertos genes mutados. En el presente trabajo se desarrolló un método denominado TNC, basado en una modificación del publicado por Fimmel y Haddock (1979), pero con mayores ventajas: no fue necesario incubar en anaerobiosis estricta, permitió ampliar el espectro de genes mutados (incluyendo *mol* y *fnr*) y detectar la aparición de colonias rojas muy rápidamente, en sólo 24 horas de crecimiento. La frecuencia de mutantes Nit- y la distribución de genes mutados fueron superiores, al usarlo comparativamente con el método de selección por resistencia al clorato. El TNC resultó muy sensible y con reproducibilidad para identificar diferencialmente clones mutantes Nit- (TNC+) y silvestres Nit+ (TNC-); además fue eficiente para caracterizar cepas bacterianas y en los análisis genéticos. En el presente trabajo también se estableció y evaluó un criterio de clasificación fisiológica para agrupar preliminarmente a los mutantes pleiotrópicos Nit- Gas- en cuatro subclases genotípicas, al observar que las mutaciones en *moe* revertían fenotípicamente con molibdato, en forma tardía.

Palabras claves: Nit- Gas- identificación; Nit- Gas- aislamiento; molibdato reversión; *mol*; *fnr*; *narC*

Abstract

A new method for the direct isolation and identification of nit-mutants in *Escherichia coli* K12

The methods to isolate and to identify defective mutants in the nitrate anaerobic respiration (Nit-) tend to be preferential for certain mutated genes. This work presents a method denominated TNC, based in a modification of Fimmel and Haddock published in 1979, but with highest advantages: it was not necessary to incubate with strict anaerobiosis, permitted both to amplify the spectre of mutated genes (including *mol* and *fnr*) and to detect very quickly the appearing red colonies, in only 24 hours of growth. Using it comparatively with the method of selection for chlorate resistance, the frequency of Nit- mutants and the distribution of genes mutated were higher. The TNC showed to be very sensitive and with reproducibility to identify differently Nit- mutants (TNC+) and Nit+ wild type (TNC-) clones; furthermore, it was efficient for the characterisation of bacteria strains and the genetic analysis. In the present work it was also established and evaluated a criteria of physiologic classification for preliminary grouping pleiotropic Nit- Gas- mutants in four genotypic subclass, by observing that *moe* mutations could be reverted phenotypically in late form with molybdate.

Key words: Nit- Gas- identification; Nit- Gas- isolation; molybdate reversion; *mol* ; *fnr* ; *narC*

INTRODUCCIÓN

Los estudios con cepas mutantes han representado un gran aporte para el conocimiento de los fenómenos biológicos, de allí la importancia de contar con métodos eficientes que permitan el aislamiento e identificación de las mismas. En el caso de *E. coli*, la pérdida de actividad Nitrato Reductasa A (NRA) ocasiona la aparición de mutantes defectivos en la respiración anaeróbica del nitrato (fenotipo Nit-) (Showe y Demoss 1968, Piéchaud et al. 1969). La NRA es una molibdoenzima (apoNRA + molibdocofactor MoCo); su actividad respiratoria puede ser afectada por mutaciones que mapean en al menos tres

clases distintas de genes, y sus efectos son diversos. Mutaciones en los operones *nar C* (*narGHJI*) y *narXL*, afectan particularmente la biosíntesis de la apoNRA (Bonney-Orth et al. 1981, Stewart y MacGregor 1982, Edwards et al. 1983, Sodergren y Demos 1988, Stewart 1988, Bachman 1990, Stewart 1993). Por su parte, las mutaciones *mol* (anteriormente *chl*) (Piéchaud et al. 1969; Shanmugan et al 1992) incluyen los operones *moa*, *mob*, *mod*, *moe*, los genes *mog* y *molR*, y afectan pleiotrópicamente la activación de diferentes molibdoenzimas, reductasas y deshidrogenasas, que comparten el mismo MoCo, como ejemplos la NRA y la

FDH-L (fenotipo Nit- Gas-) (Johnson y Rajagopalan 1987, Bachman 1990, Lee et al. 1990, Baker y Boxer 1991, Rivers et al. 1993, Iobbi-Nivol et al. 1995, Maupin-Furlow et al. 1995). Mutaciones en el gen *fnr* también ocasionan pleiotropía, al afectar la biosíntesis de las molibdoenzimas NRA y trimetil amino N-óxido reductasa (TMAO), además de las no molibdoenzimas fumarato y nitrito reductasas (fenotipo Nit- Tor- Frd- Nir-) (Lambden y Guest 1976, Stewart y MacGregor 1982, Stewart 1988, Spiro y Guest 1990, Takahashi et al. 1994).

Los métodos desarrollados para aislar e identificar mutantes Nit- de *E. coli*, tienden a ser preferenciales para ciertos genes mutados, tal como se indica a continuación:

1. Selección directa por resistencia al clorato (Piéchaud et al. 1969). Se basa en la sobrevivencia frente a la toxicidad que conlleva la reducción anaeróbica de este compuesto. Fue el primer método desarrollado y es el más extensamente utilizado; la gran mayoría de los mutantes Chl^R (98%) están afectados en los genes *mol*, particularmente en los operones *moa* (*chlA*) y *mob* (*chlB*) (Puig et al. 1969, Case 1970, Glaser y Demos 1972).

2. Identificación por incapacidad de crecer anaeróbicamente con nitrato como aceptor final. Se utilizan los medios sintéticos:

- i. Lactato-Nitrato, diseñado específicamente para mutaciones en el operón *narC* (Venables y Guest 1968) y
- ii. Glicerol-Nitrato, se usa para los Nit- en general (Lambden y Guest 1976).

3. Identificación por incapacidad de reducir anaeróbicamente el nitrato a nitrito. Utilizando la glucosa, se identifican los mutantes Nit- en general (Showe y Demos 1968, Piéchaud et al. 1969), pero el formiato tiende a ser preferencial para los afectados en el operón *narC* (Glaser y Demos 1972).

4. Identificación por coloración roja de las colonias, durante el crecimiento anaeróbico estricto en medio sintético suplementado con nitrato y tetrazolio. Fue diseñado específicamente para mutaciones en el operón *narC* (Fimmel y Haddock 1980), pero usando cepas merodiploides homocigotas para *mog+* (*chlG+*) se obtienen mutantes afectados en este gen (Jenkins y Haddock 1980).

Considerando las restricciones de los métodos arriba escritos, el presente trabajo estuvo dirigido a desarrollar un método nuevo que, permitiera incrementar la posibilidad de aislar e identificar la gran diversidad de genes mutados, responsables del fenotipo Nit-. Este método fue denominado TNC y tuvo como base el reportado por Fimmel y Haddock (1979). Se ensayó comparativamente con el de resistencia al clorato, para evaluar su capacidad de ampliar la frecuencia y diversidad de genes mutados.

También se evaluó su confiabilidad como un método sencillo y rápido para distinguir eficientemente entre cepas Nit+ (TNC-) y Nit- (TNC+).

METODOLOGÍA

1. Cepas y condiciones de crecimiento. Las cepas bacterianas de *E. coli*, de fagos y plásmidos utilizadas se describieron en la Tabla 1. Las bacterianas se incubaron a 30° C. Los cultivos anaeróbicos se prepararon sembrando en tubos totalmente llenos con el medio de cultivo, e incubando sin agitación; la anaerobiosis estricta se realizó bajo atmósfera de hidrógeno y dióxido de carbono, utilizando el sistema Gas-Pack.

2. Medios de cultivo. La composición del medio sintético y los suplementos adicionados fueron descritos en la Tabla 2. La composición de los medios ricos y diferenciales fue reportada (Miller 1972). Cuando se indicó fueron añadidos: 20mM de KNO_3 , 1mM de Na_2Mo_4 , 16 mM de KClO_3 , 40 mM de fumarato de sodio, 2 mg/ml de casaminoácidos, 0,05 mg/ml de ampicilina, 0,1 mg/ml de 2,3,5 trifenil tetrazolio cloruro (TTC). Como fuente de carbono en los medios sintéticos se agregó 2 mg/ml de glucosa o lactosa y 4 mg/ml de glicerol, según el caso.

3. Experimentos genéticos. (3.1) Ensayos de ligamiento. La localización de la mutación pleiotrópica Nit- Gas- de las cepas MA se determinó por transducción generalizada con el fago P1_{vir}, siguiendo el procedimiento de Lennox descrito por Miller (1972). Las cepas MA se utilizaron como donante para transducir a las receptoras LCB413 y LCB559, según el cruce. Antes de sembrar, las mezclas de transducción fueron lavadas por centrifugación y concentradas diez veces. Los transductantes Gal+ fueron aislados en medio diferencial y los Met+ en medio sintético selectivo; una vez purificados en ese mismo medio fueron sometidos a los ensayos fisiológicos y fenotípicos indicados. El grado de ligamiento de la mutación se expresó como el porcentaje de Nit- Gas- respecto al total de clones transductantes ensayados Gal+ o Met+, según el caso.

(3.2) Obtención y caracterización de merodiploides heterocigotas. Una preparación conteniendo ADN del plásmido pSJE100 (*moa+*), obtenida por lisis alcalina de la cepa SE5000, se utilizó para transformar a la cepa RK5200, siguiendo las metodologías descritas (Sambrook et al. 1989). Transformantes Nit+ Ap^R fueron aislados por el método TNC aquí desarrollado y algunos clones independientes reaislados se sometieron a ensayos fenotípicos y fisiológicos. La presencia física del plásmido fue verificada en geles de agarosa al 1%, según la metodología descrita (Sambrook et al. 1989).

Tabla 1. Lista de cepas utilizadas. La cepa 376 es HfrP4X; las AD9 y RW420 (ti31) son HfrH. Las cepas MA son mutantes Ap^R inducidas por transducción mutagénica (Ortega de L, Orozco de S 1982) usando el fago MudI (Casadaban, Cohen 1979). Los genes *chl(A, B, D, E y G)* fueron renombrados como *mo(a, b, d, e y g)*, respectivamente (Shanmugan et al. 1992), y el operón *chlC* como *narGHJI* (Stewart, MacGregor 1982, Sodergren, Demos 1988). O.E.G. = Laboratorio Organización y Expresión del Gen. L.C.B. = Laboratoire de Chimie Bacterienne, CNRS.

Cepa	Genotipo / Fenotipo	Referencia o procedencia
<i>Escherichia coli</i> K12: PC90	$\Delta(lac-pro) \Delta(his-gnd) gyrA$	Colección OEG
MM78	PC90, nar-MM78 / Chl ^R Nit-	Ball y Ortega 1985
LCB356	<i>thr leu pro arg ade thi his lacY gal ara mtl xyl</i>	Colección OEG
LCB376	<i>metB moa</i> $\lambda+$ / Chl ^R Nit- Gas-	J. Puig
LCB413	W604 (<i>leu bio rpsL lac ara mtl xyl gal</i>)	Colección OEG
LCB426	<i>thi-1 leu-6 suc-10 galT-27 rpsL-129 chlC-8</i> / Chl ^R Nit-	Puig et al. 1969
LCB471	<i>leu bio lacY galT rpsL moa</i> / Chl ^R Nit- Gas-	J. Puig
LCB559	<i>ilv met pro his lac gal rpsL</i>	Colección OEG
OEG46	AD9: $\Delta(gal-bio) argI argF rpsL thi$ / Nit- Gas-	A. Kikuchi
ES2001	MC4100, <i>fnr-250 zcj-637::Tn10</i>	Sodergren y Demos 1988
SE5.000	MC4100 <i>recA-56</i> con pSJE100	D. Boxer
OM350	RK5200 con pSJE100 / Ap ^R Nit+ Gas+	Este trabajo
LCB356-16	<i>moe</i>	Dagert y Puig, 1976
Derivados Chl ^R Nit- Gas- de la LCB356 (J. Puig):		
LCB356-16	<i>moe</i>	Dagert y Puig 1976
LCB356-22	<i>mod</i>	J. Puig
LCB382	<i>moa</i>	Puig et al. 1969
LCB442	<i>mob</i>	Case 1970
Derivados de la RK4353 (Stewart y MacGregor 1982):		
RK5200	<i>moaA-200::Mucls</i> / Nit- Gas-	Rivers et al. 1993
RK5201	<i>moeA-201::Mucls</i> / Nit- Gas-	Reiss et al. 1987
RK5228	<i>moeB-225::Mucls</i> / Nit- Gas-	Reiss et al. 1987
Derivados MudI(<i>bla, lac</i>) de la PC90:		
MA14	Lac+ Ts+ Nit- Gas-	Este trabajo
MA17	Lac+ Ts+ Nit- Gas-	Este trabajo
MA25	Lac+ Ts+ Nit- Gas-	Este trabajo
MA31	Lac+ Ts+ Nit- Gas-	Este trabajo
MA36	Lac+ Ts+ Nit- Gas-	Este trabajo
MA45	Lac+ Ts+ Nit- Gas-	Este trabajo
Fagos y plásmidos		
P1vir		Colección OEG
pSJE100	pUC9 con 4,8 Kb <i>Pmoa moa(A-E)+</i> / Ap ^R Moa+	Rivers et al. 1993

Tabla 2. Descripción comparativa de la

composición de los medios Fimmel-Haddock y TNC. a. Sales medio mínimo (MM) de Vogel y Bonner (1956). b. TTC = 2,3,5 trifenil tetrazolio cloruro.

Composición (g/l)	Fimmel-Haddock ^a	
TNC		
<u>Sales MM:</u>		
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2	0,31
Acido cítrico. H ₂ O	2,0	---
Citrato de sodio. 2 H ₂ O	---	1,12
K ₂ HPO ₄	10,0	---
K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O	---	10,18
KH ₂ PO ₄	---	5,98
NaH ₂ NH ₄ PO ₄	3,5	---
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	---	2,0
<u>Suplementos:</u>		
TTC ^b	0,05	0,1
Glucosa	2,0	2,0
KN ₃	10,1	2,0
Aminoácidos	0,4	---
Casaminoácidos	---	2,0
Vitamina B1	0,04	0,04

4. Ensayos fisiológicos. (4.1) Crecimiento por resistencia al clorato (Chl^R), se modificó el método original (Piéchaud et al. 1969) sembrando las bacterias en superficie o por rayado (Ortega de L. 1982). **(4.2)** Crecimiento utilizando nitrato como aceptor final de electrones, se sembró en superficie sobre medio sintético conteniendo glicerol y nitrato, e incubó en anaerobiosis estricta por 4 a 5 días (Lambden y Guest 1976). **(4.3)** Reducción del nitrato a nitrito (Nit+), se determinó espectrofotométricamente agregando reactivo de nitritos a cultivos crecidos anaeróticamente en caldo nutritivo glucosado conteniendo nitrato (Showe y Demos 1968); en medio sólido se utilizaron colonias crecidas por rayado sobre agar nutritivo conteniendo glucosa, luego se colocó un papel filtro impregnado con nitrato y, después de 20 a 30°C, se reemplazó por otro impregnado con reactivo de nitritos. **(4.4)** Reversión fenotípica por molibdato, se procedió igual al punto anterior pero suplementando el medio con molibdeno (Glaser y Demos 1971). **(4.5)** Reducción del nitrito (Nit+), se procedió igual que en 4.3 pero el nitrato se reemplazó por nitrito para verificar su desaparición con el crecimiento del cultivo (Abou-Jaoude et al. 1978). **(4.6)** Aparición de colonias rojas (TNC+), se evaluó durante el crecimiento usando el método TNC aquí desarrollado. **(4.7)** Liberación de gas (Gas+), se evidenció durante el crecimiento

anaeróbico en tubos durham conteniendo caldo nutritivo glucosado (Puig et al. 1969). (4.8) Crecimiento utilizando fumarato como aceptor final de electrones (Frd+), se sembró en superficie sobre medio sintético conteniendo glicerol y fumarato, e inoculó en anaerobiosis estricta por 4 a 5 días (Lambden y Guest 1976).

5. Ensayos fenotípicos. Los requerimientos nutricionales, fermentación de azúcares, resistencia a drogas, inmunidad a fagos y termosensibilidad fueron ensayados según Miller (1972).

6. Ensayos enzimáticos. La actividad NRA fue cuantificada espectrofotométricamente en células enteras inducidas crecimiento en anaerobiosis con nitrato), siguiendo la reacción de oxidación del donador artificial bencil viológeno (BV-H), dependiente del nitrato y bajo las condiciones descritas (Jones y Garland 1977); la concentración de nitritos producidos se cuantificó usando una curva de calibración. Las proteínas totales se determinaron según Lowry et al. (1951), y se usó una curva de calibración elaborada con albúmina bovina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo y estandarización del TNC como método nuevo para identificar mutantes Nit- afectados en cualquiera de los genes *nar*, *mol* y *fnr*.

Fimmel y Haddock (1979) desarrollaron un método muy eficiente para aislar, en forma directa y selectiva, mutaciones en *chlC* (operon *narGHJ*). Las cepas bacterianas mutantes se coloreaban de rojo, a diferencia de las silvestres y mutantes pleiotrópicas Nit- Gas- afectadas en *chlA(moa)* y *chlB(mob)* que permanecían incoloras después de 6 días de crecimiento en anaerobiosis estricta, en cajas de medio sintético (Vogel-Bonner) conteniendo glucosa, nitrato y tetrazolio (TTC).

En el presente trabajo, el método anterior fue sometido a una serie de modificaciones para ampliar su espectro de especificidad y lograr identificar una mayor variedad de genes mutados. Los cambios más importantes fueron los siguientes:

1. La composición del medio de cultivo. En la fórmula del medio sintético de Vogel-Bonner (Vogel y Bonner 1956), los aminoácidos fueron reemplazados por una solución de casaminoácidos libre de vitaminas. Se ensayaron concentraciones crecientes de tetrazolio (0,025 hasta 0,250 mg/ml), nitrato (1 hasta 2 mg/ml) y glucosa (1 hasta 4 mg/ml).

2. Las condiciones de aereación. Las cajas fueron incubadas con y sin anaerobiosis estricta, durante tiempos crecientes (1 hasta 6 días).

Cada modificación fue valorada comparando el

comportamiento de capas de *E. coli* Nit-, seleccionadas por resistencia al clorato (Tabla 1, colección J. Puig) y sus respectivas isogénicas silvestres. Tres métodos de siembra fueron ensayados:

i. Agotamiento; ii. Rayado; iii. Siembra en superficie de una mezcla preparada a partir de dos cultivos de igual concentración celular, correspondientes a una cepa mutante y otra silvestre Nit+.

La mejor condición fue denominada TNC (tetrazolio nitrato casaminoácidos) (Tabla 2) y se escogió porque permitió evidenciar, más rápida y claramente, la coloración roja de las colonias (fenotipo TNC+), indistintamente de la mutación llevada por cada una de las cepas mutantes ensayadas; las cepas silvestres utilizadas como control permanecieron incoloras (fenotipo TNC-). Los resultados obtenidos fueron totalmente reproducibles en más de diez ensayos independientes. Esto también fue observado cuando se utilizaron mutaciones de delección y de inserción en diferentes genes (Tabla 1).

Por lo tanto, el método TNC aquí desarrollado resultó ser más sencillo y presentó las siguientes ventajas adicionales: i. Es eficiente para detectar directamente mutantes Nit-, en cualquier gen *nar*, *mol* y *fnr*; ii. El color rojo de las colonias puede observarse tempranamente, a partir de las 24 hr. de incubación; los mejores resultados en la siembra de superficie son obtenidos con cantidades máximas de 2.000 colonias por caja; iii. No es necesario incubar bajo condiciones de anaerobiosis estricta.

Los resultados aquí obtenidos dejan sin validez la hipótesis de trabajo propuesta por Fimmel y Haddock (1979), para explicar bioquímicamente la no reducción del TTC en las cepas con mutaciones diferentes a *chlC*-. Según esos autores, la citocromo oxidasa es inhibida por el bajo pH resultante de la acumulación del ácido fórmico producido durante el crecimiento anaeróbico, en ausencia de un sistema Formiato Hidrógeno Liasa (FHL) funcional.

Todos los mutantes aquí utilizados (Tabla 1) se chequearon previamente para los fenotipos Nir, Nit, reversión fenotípica por molibdato y Frd, a tiempos crecientes de incubación en los medios de cultivo: 24, 48 y 72 horas. Los resultados se correspondieron con lo esperado (Stewart 1988), excepto para los mutantes afectados en el operón *moe (chlE)* que fueron capaces de revertir con molibdato después de las 48 h de incubación. Esto último permitió establecer un criterio preliminar de clasificación fisiológica para los mutantes Nit- Gas- basado en cuatro subclases genotípicas (Tabla 3).

Tabla 3. Criterio de clasificación fisiológica preliminar de los mutantes pleiotrópicos Nit- Gas-, en diferentes subclases genotípicas. Mob = molibdeno.

Gen mutado	Características fisiológicas adicionales
<i>moa</i> o <i>mob</i> Mob	ir+, No revierte fenotípicamente con Mob
<i>mod</i> 24 h	Nir+, Revierte fenotípicamente con Mob a las 24 h
<i>moe</i> las 48 h	Igual a <i>mod</i> , pero revierte después de las 48 h
<i>fnr</i> Mob	Nir-, Frd-, no revierte fenotípicamente con Mob

Tabla 4. Distribución de los mutantes Ap^R aislados por dos métodos alternativos. Un centenar de mutantes independientes, aislados por cada método indicado, fueron ensayados para los fenotipos Nit-, TNC+ y Chl^R, respectivamente. La frecuencia corregida de mutantes verdaderamente Nit- fue 6,2 x 10⁻³ para TNC+ y 2,6 x 10⁻³ para Chl^R.

Método de aislamiento de mutantes	Porcentaje fenotipos	Distribución de los aislamientos		
		Nit-	TNC+	Chl ^R
TNC+	1,2%	52%	100%	89%
Chl ^R	0,4%	66%	80%	100%

Comparación del método TNC con el de resistencia al clorato, para aislar mutantes Nit.

La resistencia al clorato (Chl^R) es un método de alta eficiencia que, permite seleccionar directamente mutantes Nit-, por su capacidad de crecer en agar nutritivo con glucosa y clorato, en un lapso de 4 a 5 días de incubación en anaerobiosis estricta (Piéchaud et al. 1969). Es tradicionalmente utilizado para tal fin, pero la mayoría de los mutantes Chl^R llevan mutaciones en los genes *mol* (*moa*, *mod* o *moe*) y preferencialmente en *moa* o *mob* (Piéchaud et al. 1969, Case 1970, Glaser y DeMoss 1972).

Sin embargo, el método TNC aquí desarrollado ofrece otras ventajas: i. Se basa en el uso de un medio semisintético diferencial, lo cual evita la presencia de compuestos bacterianos tóxicos como manera de ejercer una presión selectiva, ii. Los resultados se observan una presión selectiva, ii. Los resultados se observan

Tabla 5. Clasificación fisiológica preliminar de los mutantes Ap^R aislados, en diferentes subclases genotípicas. Los mutantes independientes Nit- fueron agrupados preliminarmente según el posible gen mutado, aplicando el criterio de clasificación fisiológica descrito en la Tabla 3.

Método de aislamiento	Subclase genotípica			
	<i>moa</i> o <i>mob</i>	<i>moe</i>	<i>mod</i>	<i>fnr nar</i>
TNC 21%	17%	22%	39%	1%
21% Nit	79%		Nit-	Gas-
Chl ^R 1,5%	80%	8%	10%	0,5%
1,5% Nit	98,5%		Nit-	Gas-

tempranamente, durante el crecimiento de las colonias, iii. No se requiere anaerobiosis estricta.

Con el propósito de valorar la aplicación del TNC, como un método nuevo y alternativo al de resistencia al clorato, ambos fueron utilizados para aislar mutantes Ap^R previamente inducidos por mutagénesis biológica (Ortega de L. y Orozco de S. 1982) usando el fago MudI (Casadaban y Cohen 1979).

El porcentaje de clones Ap^R TNC+ fue considerablemente superior al de Ap^R Chl^R: 1,2% y 0,4%, respectivamente (Tabla 4), y, es posible atribuirlo a la presión selectiva ejercida por el clorato. Cientos de clones independientes aislados por cada método fueron retenidos y relacionados como MA. Se escogieron aquellos que cumplían con las características de la receptora, y se examinaron los fenotipos Nit-, TNC+ y Chl^R. La correspondencia observada entre esos tres fenotipos fue inferior al 100% (Tabla 4), por lo tanto, ninguno de los dos métodos fue totalmente específico para aislar mutantes Nit-. Sin embargo, el valor corregido de la frecuencia de mutantes Nit- TNC+ fue 6,2 x 10⁻³ que, es aproximadamente 3 veces superior a 2,6 x 10⁻³ obtenido con el método Chl^R.

Valoración del TNC como método que permite aislar un mayor espectro de genes mutados.

Los mutantes MA que resultaron Nit-, se clasificaron preliminarmente en diferentes subclases genéticas (Tabla 5), aplicando el criterio descrito en la Tabla 3.

Efectivamente, el método de resistencia al clorato fue de mayor especificidad para aislar mutantes pleiotrópicos Nit- Gas- (98,5%). Por su parte, el TNC permitió aislar

eficientemente mutantes no pleiotrópicos (21%) y pleiotrópicos (79%), con una mayor distribución de genes mutados. Con ambos métodos se aislaron posibles mutantes en *fur*, pero el TNC mostró el mayor porcentaje. Todos los mutantes pleiotrópicos ensayados conservaron la capacidad de crecer anaeróbicamente en medio sintético a expensas de glucosa, lo cual descartó la presencia de una mutación *ana* (30). Doce mutantes pleiotrópicos, excluyendo los posibles *mod-*, fueron ensayados bioquímicamente y todos resultaron defectivos en la actividad enzimática de la NRA. Seis de ellos fueron analizados genéticamente transduciendo la mutación a una cepa receptora que presentaba un marcador de aislamiento (*gal* o *met*, según el cruce), ligado al posible gen mutado (Tabla 6).

Clones recombinantes para el marcador respectivo fueron aislados y caracterizados: todos los TNC+ fueron Nit-Gas- y todos los TNC- permanecieron Nit+ Gas+. El valor de cotransducción de Nit- Gas- se comparó con criterios previamente establecidos: entre 20% y 32% con *gal+* indicaba mutaciones *moa* (2,18,31), entre 9% y 17% con *met+* eran *mob* (15) y un 3% con *gal+* eran *moe* (2,18,32,33). Los valores obtenidos en los distintos cruces realizados (Tabla 6) mostraron una estrecha correspondencia con el tipo de mutación estimada según la clasificación fisiológica preliminar (Tabla 3), lo cual aportaba confiabilidad a este criterio. Las cepas donantes MA14, 31 y 45 habían sido aisladas como mutantes Ap^R TNC+, entonces fue posible proponer al TNC como un método alternativo pero que permite alcanzar una mayor frecuencia y distribución de genes mutados, detectando simplemente la aparición de colonias rojas.

Aplicación del método TNC para otros fines genéticos.

Clones merodiploides heterocigotas *moa+* / *moa-* se construyeron transformando una cepa mutante *moaA-200::Mu_{cts}* (RK5200) con el plásmido pSJE100 que porta el operón *moa+*. El fenotipo TNC- (colonias incoloras) se utilizó en combinación con el marcador Ap^R del plásmido, para aislar transformantes silvestres Nit+ Gas+. De doce clones independientes reaislados, todos ellos mostraron restauración en *trans* de ambos fenotipos; la presencia del plásmido fue comprobada físicamente.

Transformantes merodiploides heterocigotas para el operón *narC*, se han aislado aplicando el método TNC, observándose además que, la intensidad del color de las colonias variaba, según el porcentaje de restauración del fenotipo Nit+ (datos no presentados).

Tabla 6. Cotransducción del fenotipo pleiotrópico Nit- Gas- de algunos mutantes Ap^R clasificados fisiológicamente. El fago P1^{vir} se utilizó para cotransducir el fenotipo pleiotrópico Nit- Gas- con los marcadores de selección directa, Gal+ o Met+, según el cruce. Todos los transductantes Gal+ Nit-Gas- adquirieron el fenotipo Bio+ (Bachman 1990).

Clasificación fisiológica	Cepas donante	Cepas receptora	Porcentaje de cotransducción
<i>moa-</i>	MA25	LCB413	20% con <i>gal</i>
	MA31	LCB413	28% con <i>gal</i>
	MA17	LCB413	32% con <i>gal</i>
<i>mob-</i>	MA36	LCB559	9% con <i>met</i>
	MA45	LCB559	17% con <i>met</i>
-			
<i>moe-</i>	MA14	LCB413	3% con <i>gal</i>

El método TNC se ha valorado ampliamente con fines genéticos diversos, obteniéndose muy buenos resultados (Ortega de L. 1982,1985, Ortega de L. y Ball 1985, Ortega de L. y Díaz 1995).

CONCLUSIONES

1. El método TNC aquí desarrollado es recomendable por su sencillez, eficiencia y confiabilidad para aislar, identificar y cotransferir fenotipos Nit+ (TNC-) y Nit-(TNC+) de procedencia genómica o plasmídica.

2. Por lo tanto, puede ser utilizado con diferentes propósitos, entre otros:

- Construir simplemente cepas bacterianas nuevas;
- Estudios de ligamiento dirigidos a mapear mutaciones TNC+ recién aisladas;
- Estudios fisiológicos y de regulación;
- Análisis de estructura fina.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. J. Puig (Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela) por la generosa donación de sus cepas. Igualmente agradezco al Dr. M. Chippaux (L.C.B., C.N.R.S., Marsella, Francia) por suministrarme la cepa SE5000 del Dr. D. Boxer, y al Dr. M. Dubourdieau (Facultad de Ciencias, U.L.A., Mérida, Venezuela) por las cepas del Dr. V. Stewart. El apoyo financiero de este trabajo fue suministrado por el CDCHT-ULA, Venezuela, a través de distintos proyectos.

REFERENCIAS

- Abou-Jaoude M, Pascal MC, Casse F, Chippaux M.** 1978. Isolation and phenotypes of mutants from *Escherichia coli* K-12 defective in nitrite-reductase activity. FEMS Microbiol. Lett. 3: 235-239.
- Amy NK, Rajagopalan KV.** 1979. Characterization of the molybdenum cofactor in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 140: 114 - 124.
- Bachmann BJ.** 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, Edition 8. Microbiol. Rev. 54: 130-197.
- Baker K, Boxer D.** 1991. Regulation of the *chlA* locus of *Escherichia coli* K12: Involvement of the molybdenum cofactor. Mol. Microbiol. 5: 901-907.
- Ball M, Ortega de L M.** 1985. Aislamiento y caracterización de mutantes de *Escherichia coli* K12 *chl::Tn10(Tet^R)*. Acta Científica Venezolana 36 (Supl): XXXV Convención Anual de AsoVAC, Venezuela.
- Bonnefoy Orth V, Lepelletier M, Pascal MC, Chipaux M.** 1981. Nitrate reductase and cytochrome b-nitrate reductase structural genes as parts of the nitrate reductase operon. Mol. Gen. Genet. 181: 535-540.
- Casadaban M, Cohen S.** 1979. Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a *Mu-lac* bacteriophage: *in vitro* probe for transcriptional control sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4530-4533.
- Case F.** 1970. Mapping of the genes *chlB* controlling membrane-bound nitrate reductase and formic hydrogen lyase activities in *Escherichia coli* K12. Biochim. Biophys. Acta 39: 429-436.
- Dagert M, Puig J.** 1976. Mapeo del gen *chlE* en *Escherichia coli* K12. Acta Cient. Venez. 27: 85-87.
- Edwards E, Rondeau S, DeMoss J. 1983. *chlC* (*nar*) operon of *Escherichia coli* includes structural genes for and subunits of nitrate reductase. J. Bacteriol. 153: 1513-1520.
- Fimmel A, Haddock B.** 1979. Use of *chlC-lac* Fusions to Determine Regulation of gene *chlC* in *Escherichia coli* K12. J. Bacteriol. 138: 726-730.
- Glaser JH, DeMoss JA.** 1971. Phenotypic restoration by molybdate of nitrate reductase activity in *chlD* mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 108: 854-860.
- Glaser, JH, DeMoss JA.** 1972. Comparison of nitrate reductase mutants of *Escherichia coli* selected by alternative procedures. Mol. Gen. Genet. 116: 1-10.
- Iobbi-Nivol Ch, Palmer T, Whitty P, McNairm E, Boxer D.** 1995. The *mob* locus of *Escherichia coli* K-12 required for molybdenum cofactor biosynthesis is expressed at very low levels. Microbiol. 141: 1663-1671.
- Jenkins H, Haddock B.** 1980. A specific method for the isolation of *chlG* mutants of *Escherichia coli* K12. FEMS Microbiol. Lett. 9: 293-296.
- Johnson M, Rajagopalan K.** 1987. Involvement of *chlA*, *E*, *M*, and *N* loci in *Escherichia coli* molybdopterin synthesis. J. Bacteriol. 169: 117-125.
- Jones R, Garlan P.** 1977. Sites and specificity of the reaction of bipyridylum compounds with anaerobic respiratory enzymes of *Escherichia coli*. Effects of permeability barriers imposed by the cytoplasmic membrane. Biochem. J. 164: 199-211.
- Lambden PR, Guest JR.** 1976. Mutants of *Escherichia coli* K12 unable to use fumarate as an anaerobic electron acceptor. J. Gen. Microbiol. 97: 145-160.
- Lee JH, Wendt JC, Shanmugan KT.** 1990. Identification of a new gene, *molR*, essential for utilization of molybdate by *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 172:2079-2087.
- Li J, Kustu S, Stewart V.** 1944. *In vitro* interaction of nitrate-responsive regulatory protein NarL with DNA target sequences in the *fdnG*, *narG*, *narK* and *frdA* operon control regions of *Escherichia coli* K-12. J. Mol. Biol. 241: 150-165.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R.** 1951. Protein determination with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 265-275.
- Maupin-Furlow J, Rosentel J, Lee J, Deppenmeier U, Gunsalus R, Shanmugan K.** 1995. Genetic analysis of the *modABCD* (molybdate transport) operon of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 177: 4851-4856.
- Mejean V, Iobbi NC, Lepelletier M, Giordano, G, Chippaux M, Pascal MC.** 1944. TMAO anaerobic respiration in *Escherichia coli*: involvement of the *tor* operon. Mol. Microbiol. 11: 1169-1179.
- Miller JH.** 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
- Noho T, Kasai Y, Saito T.** 1988. Cloning and sequencing of the *Escherichia coli chlEN* operon involved in molybdopterin biosynthesis. J. Bacteriol. 107: 4097-4102.
- Ortega de LM.** 1982. Obtención y caracterización preliminar de clones transductantes de *Escherichia coli* K12 llevando fusiones *chl::MudI*, seleccionados utilizando tres métodos diferentes. Tesis de Maestría en Biología Molecular. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.
- Ortega de LM.** 1985. Regulación fisiológica de los genes *chl* de *Escherichia coli* K12, llevando mutaciones espontáneas y de fusión *chl::lac*. Trabajo de Ascenso. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.
- Ortega de LM.** 1998. El gen *narG* y el operón *moa(ABCDE)* como posibles reguladores de la respiración anaeróbica del nitrato, en *Escherichia coli* K12. MedULA 7: 5-12.
- Ortega de LM, Díaz J.** 1995. Caracterización de una mutación *nar* y su efecto sobre la expresión transcripcional de una fusión *moa::lac* en *Escherichia coli* K12. MedULA 4: 31-39.

- Ortega de LM, Orozco de SA.** 1982. Fusión de los genes *lac* del fago Mud1 a los genes *chl* del sistema nitrato reductasa de *Escherichia coli* K-12. Acta Científica Venezolana 33 (Supl).
- Pascal MC, Chippaux M, Abou-Jaoude A, Blaschkowski H, Knappe J.** 1981. Mutants of *Escherichia coli* K12 with defects in anaerobic pyruvate metabolism. J. Gen. Microbiol. 124: 35-42.
- Piéchaud M, Pichinoty F, Azoulay E, Couchoud-Beaumont P, Gendre J.** 1969. Recherches sur des mutants bactériens ayant perdu les activités catalytiques liées a la nitrate-reductase A. I. Description des méthodes d'isolement. Ann. Inst. Pasteur (Paris) 116: 276-287.
- Puig J, Azoulay E, Gendre J, Richard E.** 1969. Etude génétique des mutans de la région *chlA* chez l'*Escherichia coli* K-12. C. R. Acad. Sci. (Paris) 268: 183-184.
- Puig J, Azoulay E, Pichinoty F, Gendre J.** 1969. Genetic mapping of the *chlC* gene of the nitrate reductase A system in *Escherichia coli* K12. Biochem. Biophys. Res. Comm. 35: 659-662.
- Reiss J, Kleinhofs A, KlingMuller W.** 1987. Cloning of seven differently complementing DNA fragments with *chl* functions from *Escherichia coli* K12. Mol. Gen. Genet. 206: 352-355.
- Rivers SL, McNairm E, Blasco F, Giordano G, Boxer DH.** 1993. Molecular genetics analysis of the *moa* operon of *Escherichia coli* K-12 required for molybdenum cofactor biosynthesis. Mol. Microbiol. 8: 1071-1081.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T.** 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
- Shanmugan KT, Boxer DH, Cole JA, Chippaux M, DeMoss JA, Giordano G, Guest J, Gunsalus RP, Lin ECC, Rajagopalan KV, Stewart V.** 1992. Proposed nomenclature for the genes involved in molybdenum metabolism in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Mol. Microbiol. 6: 3452-3454.
- Shimokawa O, Ishimoto M.** 1979. Purification and some properties of inducible tertiary amine N-oxide reductase from *Escherichia coli*. J. Biochem. 86: 1709-1717.
- Showe M, DeMoss J.** 1968. Localization and regulation of synthesis of nitrate reductase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 95: 1305-1313.
- Sodergren EJ, DeMoss JA.** 1988. *NarI* region of the *Escherichia coli* nitrate reductase (*nar*) operon contains two genes. J. Bacteriol. 170: 1721-1729.
- Spiro S, Guest J.** 1990. FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Rev. 75: 399-428.
- Stewart V.** 1988. Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in *Enterobacteria*. Microbiol. Rev. 52: 190-232.
- Stewart V, MacGregor C.** 1982. Nitrate Reductase in *Escherichia coli* K12: involvement of *chlC*, *chlE* and *chlG* loci. J. Bacteriol. 151: 788-799.
- Takahashi K, Hattori T, Nakanishi T, Nohno T, Fujita N, Ishihama A, Taniguchi S.** 1944. Repression of *in vitro* transcription of the *Escherichia coli* *fur* and *narX* genes by FNR protein. FEBS Lett. 340: 59-64.
- Venables W, Guest J. 1968. Transduction of nitrate reductase loci of *Escherichia coli* by phages P1 and λ . Mol. Gen. Genetics 103: 127-140.
- Vogel H, Bonner D.** 1956. Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. J. Biol. Chem. 218: 97-106.