

UNIVERSIDAD DE GRANADA



FACULTAD DE CIENCIAS

**Aislamiento, Purificación y  
Caracterización del Enzima Nitrato  
Reductasa de las Membranas de Cepas  
de *Bradyrhizobium Japonicum* deficientes  
en el Metabolismo del Nitrato**

Manuel Fernández López

TESIS DOCTORAL

1992

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

**AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CARACTERIZACION  
DEL ENZIMA NITRATO REDUCTASA DE LAS MEMBRANAS  
DE CEPAS DE *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*  
DEFICIENTES EN EL METABOLISMO DEL NITRATO.**

MANUEL FERNANDEZ LOPEZ

TESIS DOCTORAL  
1992

**AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CARACTERIZACION DEL ENZIMA NITRATO  
REDUCTASA DE LAS MEMBRANAS DE CEPAS DE *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*  
DEFICIENTES EN EL METABOLISMO DEL NITRATO.**

Memoria que presenta el Licenciado en Ciencias  
Biológicas D. Manuel Fernández López, para aspirar al  
grado de Doctor.

Fdo. Manuel Fernández López

Vº Bº

El director

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

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

**A los buenos amigos que nunca se  
podrán olvidar, especialmente Paco.**

A Mercedes, mi mujer, por su ánimo y las muchas horas que este trabajo le ha robado. A mis padres y hermanas por su cariño.

Al finalizar esta Tesis Doctoral, deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que de una forma u otra han contribuido a su realización.

Al Ministerio de Educación y Ciencia que me concedió una beca predoctoral y una ayuda para una estancia de 3 meses en el Departamento de Microbiología, Universidad de Karlsruhe (R. F. Alemania)

Especialmente al Dr Eulogio J. Bedmar, director de esta Tesis, por su consejo y estímulo en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. J. Olivares, jefe de la U.E.I. de Microbiología, por su apoyo en la finalización de esta Tesis.

Al profesor W.G. Zumft por aceptarme en su departamento, así como a los miembros del mismo por su cálida acogida.

A D. Manuel Martínez, por el trabajo de delineación de las gráficas y figuras.

A los miembros del U.E.I. de Microbiología, sobre todo a Jesús, Pepe, Juan, Isabel, María José, Miguel Angel, María Jesús, Fernando, Mari Carmen y Pablo por los buenos momentos compartidos.

INDICE	Pg
<b>Introducción</b>	1
1. Fijación biológica de nitrógeno	3
1.2. Actividades de la nitrogenasa	3
1.3. Oxidación de hidrógeno en nódulos de leguminosas	5
2. Efectos del nitrato sobre la nodulación y la fijación de dinitrógeno	7
2.1. Inhibición de la nodulación por nitrato	8
2.2. Inhibición de la fijación de dinitrógeno por nitrato	11
3. Metabolismo del nitrógeno en el suelo por microorganismos	12
3.1. Nitrificación	13
3.2. Metabolismo del nitrato	14
3.2.1. Asimilación de nitrato	14
3.2.2. Desnitrificación del nitrato	16
4. El enzima nitrato reductasa respiratorio	22
4.1. Bioquímica del enzima nitrato reductasa respiratorio	23
4.2. Genética del enzima nitrato reductasa respiratorio	27
4.3. Regulación del enzima nitrato reductasa respiratorio	28
5. Actividad nitrato reductasa en <i>Bradyrhizobium</i>	30
<b>Objetivos del trabajo</b>	35
<b>Material y Métodos</b>	38
1. Material biológico	39
1.1. Bacterias	39
1.2. Material vegetal	39

2. Reactivos y productos	39
3. Aparatos	40
4. Medios de cultivo	42
4.1. Medios	42
4.2. Antibióticos	43
5. Crecimiento de plantas en condiciones bacteriológicamente controladas	44
5.1. Esterilización de semillas y germinación	44
5.2. Solución nutritiva para el cultivo de plantas	44
5.3. Cultivo de plantas	45
6. Métodos genéticos y de biología molecular	46
6.1. Mutagénesis de <i>B. japonicum</i> PJ17, selección y caracterización de transconjugantes deficientes en la utilización de nitrato	46
6.2. Aislamiento de ADN total de <i>B. japonicum</i>	48
6.3. Minipreparación del plásmido pJQ18	49
6.4. Digestión total de ADN	49
6.5. Separación de fragmentos de restricción	50
6.6. Revelado de geles y fotografía	50
6.7. Transferencia de ADN a filtros de nitrocelulosa	50
6.8. Recuperación de ADN de geles de agarosa	51
6.9. Marcaje de sondas de ADN para hibridación	52
6.10. Hibridación ADN-ADN	52
7. Cultivo de células de <i>B. japonicum</i>	53
7.1. Cultivo de células de <i>B. japonicum</i> PJ17 para determinación de actividad NR	53
7.2. Cultivo de células de <i>B. japonicum</i> para purificación de enzimas NR	54

7.3. Incubación de células para inducción de actividad NR	54
7.4. Cultivos microaeróbicos de <i>B. japonicum</i> PJ17	55
8. Determinación de actividades enzimáticas	55
8.1. Determinación de actividad NR	55
8.2. Determinación de actividades de la nitrogenasa	56
9. Determinación de nitrito y proteína	57
9.1. Determinación de nitrito	57
9.2. Determinación de proteína	58
10. Purificación de los enzimas nitrato reductasa de las membranas de <i>B. japonicum</i>	59
10.1. Obtención del extracto crudo	59
10.2. Solubilización de las membranas	60
10.3. Cromatografía de intercambio iónico	60
10.4. Cromatografía de exclusión molecular	61
11. Electroforesis en geles de poliacrilamida	62
11.1. Electroforesis en geles nativos (no desnaturalizantes)	63
11.2. Electroforesis en geles desnaturalizantes	64
11.3. Electroelución	64
11.4. Enfoque isoelectrico	65
12. Detección de enzimas nitrato reductasa y de proteínas en geles de poliacrilamida	65
12.1. Detección de actividad NR	66
12.2. Detección de proteínas	66
12.3. Determinación del tamaño molecular en geles de poliacrilamida	68
13. Digestión parcial con tripsina de los enzimas NR	69

14. Hibridación de los enzimas nitrato reductasa con anticuerpos policlonales	69
14.1. Transferencia de las subunidades de los enzimas NR a filtros de nitrocelulosa	69
14.2. Detección de complejos antígeno-anticuerpo (inmunorevelado)	70
15. Caracterización de los enzimas nitrato reductasa	71
15.1. Cinética enzimática	71
15.2. Efecto de inhibidores enzimáticos	71
15.3. Determinación de la actividad del cofactor del molibdeno	72
15.4. Espectro de absorción de los enzimas nitrato reductasa	72
<b>Resultados</b>	<b>73</b>
1. Obtención, selección y caracterización de mutantes de <i>B. japonicum</i> deficientes en la utilización de nitrato	74
2. Actividad nitrato reductasa en <i>B. japonicum</i> PJ17	78
2.1. Efecto de la fuente de nitrógeno	78
2.2. Efecto de la microaerobiosis	79
3. Actividad nitrato reductasa, en <i>B. japonicum</i> PJ17 y mutantes, inducida microaeróbicamente en presencia de nitrato	82
4. Detección de enzimas nitrato reductasa en las membranas de <i>B. japonicum</i> PJ17 y mutantes	84
5. Efecto del oxígeno y del nitrato sobre la expresión de actividad nitrato reductasa en membranas de <i>B. japonicum</i> PJ17	88
6. Reducción de acetileno, producción de hidrógeno y actividad nitrato reductasa en <i>B. japonicum</i> PJ17 y mutantes en simbiosis con <i>Glycine max</i>	91

7. Purificación de los enzimas nitrato reductasa de las membranas de <i>B. japonicum</i>	93
8. Composición en subunidades de los enzimas nitrato reductasa	104
9. Composición en péptidos de los enzimas nitrato reductasa	109
10. Hibridación de los enzimas nitrato reductasa con anticuerpos policlonales	112
11. Caracterización de los enzimas nitrato reductasa	112
11.1. Punto isoeléctrico	112
11.2. Cinética enzimática	113
11.3. Inhibidores	113
11.4. Actividad del cofactor de molibdeno	114
11.5. Espectro de absorción	114
<b>Discusión</b>	122
<b>Conclusiones</b>	143
<b>Bibliografía</b>	145

El presente trabajo tiene como objetivo principal analizar el rol de la tecnología en el desarrollo de las organizaciones, considerando tanto los aspectos teóricos como prácticos. Se explorará cómo la innovación tecnológica puede ser un motor de crecimiento y competitividad en un entorno globalizado y altamente dinámico. Se abordarán temas como la gestión del conocimiento, la transformación digital y el impacto de la inteligencia artificial en los procesos organizacionales.

La investigación se fundamenta en un enfoque teórico-práctico, donde se relacionan los conceptos académicos con casos reales de aplicación. Se utilizarán fuentes primarias y secundarias para validar las hipótesis planteadas. El estudio se estructura en capítulos que abarcan desde la fundamentación teórica hasta la implementación de estrategias tecnológicas en diferentes sectores económicos. Se espera que este análisis contribuya a la comprensión de las tendencias actuales y futuras en el mundo corporativo, proporcionando herramientas útiles para la toma de decisiones gerenciales.

## INTRODUCCION

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para todos los seres vivos, ya que forma parte de moléculas esenciales para la vida como son las proteínas, los ácidos nucleicos, las vitaminas y los coenzimas. Es, además, con la excepción del agua, el nutriente limitante más común en la práctica de la Agricultura. La mayoría de los elementos, que junto con el N, intervienen en la composición de los seres vivos, carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y azufre (S), están sometidos a procesos cíclicos en la biosfera por los que se renuevan continuamente.

De todos esos elementos, el N presenta la paradoja de que aunque en forma molecular ( $N_2$ ) representa el 78% de la composición de la atmósfera terrestre, la demanda de nitrógeno fijado excede su disponibilidad. El ciclo del N en la biosfera, una de cuyas representaciones se muestra en la Fig. A, nos muestra que para que pueda ser utilizado por las plantas y el resto de seres vivos, el  $N_2$  ha de ser fijado. Este proceso puede ocurrir tanto de forma espontánea en la atmósfera, como por procesos industriales o por procesos biológicos. Desde un punto de vista cuantitativo, se puede establecer que la fijación de nitrógeno en la biosfera representa, aproximadamente,  $280 \times 10^6$  Tm por año. De esta cantidad, se podrían atribuir  $180 \times 10^6$  Tm a la fijación biológica,  $70 \times 10^6$  Tm a la fijación industrial (proceso de Haber-Bosch) y  $30 \times 10^6$  Tm a la fijación espontánea debida a procesos físicos de la biosfera (Postgate, 1987; Martínez Toledo, 1992).

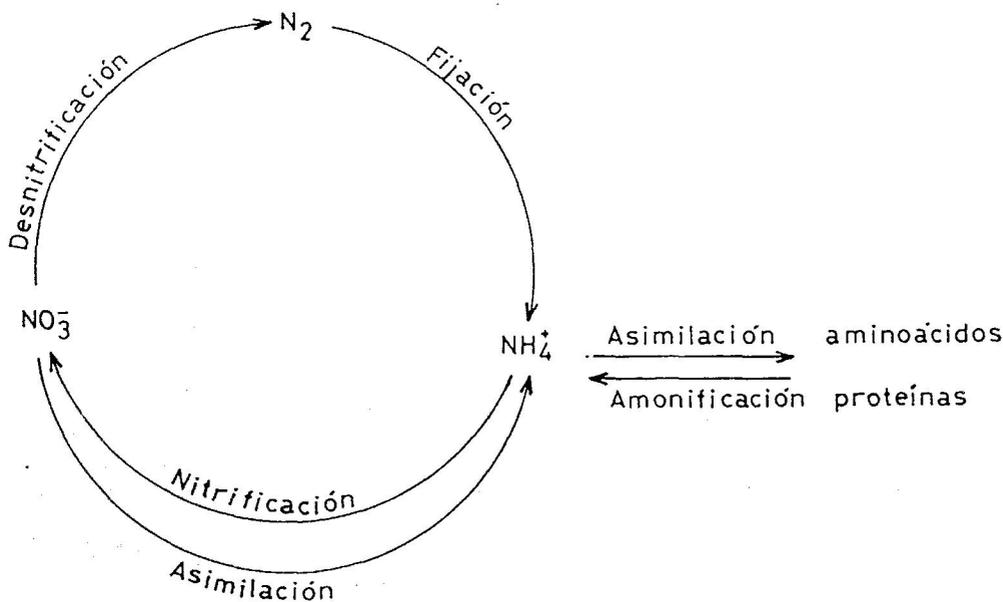


Figura A. Representación esquemática del ciclo del N en la biosfera.

## 1. Fijación biológica de nitrógeno.

Por fijación biológica de nitrógeno se entiende la reducción de dinitrógeno molecular a amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) catalizada por el enzima nitrogenasa. Únicamente los organismos de los reinos *Eubacteria* y *Archaeobacteria* son capaces de llevar a cabo esta reducción, mientras que ningún eucariota tiene la habilidad de fijar  $\text{N}_2$ . Dentro de las eubacterias las hay que pueden fijar nitrógeno en vida libre, en asociaciones mutualistas (simbiosis) o en ambas condiciones. De los sistemas fijadores de  $\text{N}_2$ , la simbiosis mutualista que establecen las leguminosas y las bacterias de la familia *Rhizobiaceae* es la de mayor significación agrícola, no sólo por el interés de las plantas implicadas, sino también por la cantidad de N que este sistema incorpora al suelo por unidad de superficie.

Desde que las bacterias de la familia *Rhizobiaceae* se encuentran en el suelo, junto a la raíz de una leguminosa, hasta llegar a la fijación de  $\text{N}_2$ , se suceden una serie de etapas, en las que de una manera más o menos específica, interaccionan bacteria y planta induciendo mutuamente la expresión fenotípica del carácter que corresponde a cada momento. El conjunto de etapas se pueden resumir en las llamadas propiedades simbióticas: especificidad, infectividad y efectividad o capacidad de fijar dinitrógeno. De la especificidad son responsables los flavonoides, compuestos de bajo peso molecular, derivados del metabolismo de los fenoles, que inducen, a bajas concentraciones, los genes *nod* (*nol*) responsables, en cada especie de la familia *Rhizobiaceae* de la síntesis de un compuesto específico formado básicamente por tetrasacáridos de glucosamina modificados, que junto con los lipopolisacáridos, exopolisacáridos y oligosacáridos cíclicos pueden dar lugar a la formación de los nódulos (revisado por Caetano-Anollés y Gresshoff, 1991).

### 1.1. Actividades de la nitrogenasa.

En la última etapa, ya en el interior de los nódulos, las formas vegetativas se transforman en células especializadas llamadas bacteroides. Estos son los encargados de sintetizar el enzima nitrogenasa, que lleva a cabo la reducción del  $\text{N}_2$  a  $\text{NH}_4^+$ . La estructura, composición y propiedades del complejo enzimático nitrogenasa son similares en todas las

especies de las que se ha aislado. Este complejo se compone de dos proteínas: molibdoferroproteína (componente I o nitrogenasa) y ferroproteína (componente II o nitrogenasa reductasa). Separados el uno del otro, ningún componente es activo por sí mismo. En algunas especies de *Azotobacter* se ha demostrado la existencia de un complejo nitrogenasa alternativo que consta también de dos unidades, de las cuales el componente I contiene vanadio en vez de Mo (Bishop *et al.* 1980; Robson *et al.* 1986; Bishop *et al.* 1988). También se ha descrito la existencia de otra nitrogenasa en la que el Fe es el único metal que forma parte del centro activo (Bishop *et al.* 1988; Bishop *et al.* 1990).

En una atmósfera de  $N_2$ , el enzima nitrogenasa de todos los microorganismos de los que se ha aislado, cataliza, además, la reducción de protones ( $H^+$ ) a hidrógeno ( $H_2$ ) de forma simultánea a la reducción de  $N_2$  a  $NH_3$ . Este proceso es dependiente de ATP (Bulen y LeCompte, 1966) y representa una pérdida de energía y electrones, por lo que disminuye la eficiencia de la fijación de  $N_2$ . Sin embargo, la reducción de  $H^+$  por la actividad nitrogenasa es un hecho inevitable ya que incluso bajo una presión de 50 atmósferas de  $N_2$  se sigue produciendo  $H_2$  (Simpson y Burris, 1984). El mecanismo más aceptado para explicar la producción de hidrógeno concomitante a la fijación de  $N_2$  fue propuesto inicialmente por Chatt (1980) y revisado posteriormente por Thorneley y Lowe (1982) y Eisbrenner y Evans (1983). En el modelo citado (ver revisión de Thorneley, 1990), los dos componentes del enzima nitrogenasa se asocian y se disocian cada vez que se transfiere un electrón de la ferroproteína a la molibdoferroproteína. La transferencia sucesiva de 3 electrones y de 3 protones a la MoFe-proteína generaría un trihidruro ligado a Mo, con pasos intermedios de mono y dihidruro. El  $N_2$  desplazaría dos átomos de hidrógeno del trihidruro, recibiendo posteriormente, en ciclos sucesivos, los 5 electrones restantes necesarios para su conversión en  $NH_3$ .

El modelo descrito predice una estequiometría de 1 mol de  $H_2$  producido por mol de  $N_2$  fijado, lo que implica, según la ecuación general propuesta para la fijación de dinitrógeno, que el 25% de la energía que se emplea en la fijación de  $N_2$  se consume en generar  $H_2$ , hecho que supone una importante fuente de ineficiencia del complejo nitrogenasa. La distribución de electrones hacia  $N_2$  o  $H^+$  está condicionada por factores

tales como la temperatura (Hwang y Burris, 1972), la proporción de los dos componentes de la nitrogenasa (Hageman y Burris, 1980) y la relación ATP/ADP (Hageman *et al.* 1980). Estas variables, junto con el nivel de compuestos reducidos que llegan a la nitrogenasa, afectan a la capacidad de reciclaje de la MoFe-proteína, lo que influye directamente en la cesión de electrones a los sustratos.

Schubert y Evans (1976) diseñaron un método para estimar la proporción del flujo de electrones que se utiliza para reducir dinitrógeno basado en las siguientes observaciones: a) en presencia de concentraciones saturantes de acetileno, no hay producción de hidrógeno y, por tanto, el flujo de electrones a través de la nitrogenasa viene dado por la velocidad de reducción de acetileno a etileno; b) en atmósfera de dinitrógeno, el flujo de electrones se reparte entre el dinitrógeno y los protones y c) en atmósfera de argón, el flujo de electrones es proporcional al nivel de reducción de acetileno. Estos conceptos permitieron definir el parámetro llamado eficiencia relativa (ER) como medida para estimar la capacidad energética relativa con la que se realiza la fijación de dinitrógeno:

$$ER = 1 - (\text{H}_2 \text{ producido en aire} / \text{C}_2\text{H}_4 \text{ producido en atmósfera de acetileno}).$$

## 1.2. Oxidación de hidrógeno en nódulos de leguminosas.

Phelps y Wilson (1941) detectaron la actuación de un enzima capaz de oxidar H<sub>2</sub> en nódulos de guisante. Estas observaciones fueron confirmadas por Dixon (1967) quien demostró que la actividad de consumo de hidrógeno (actividad Hup) se localizaba en los bacteroides (Dixon, 1968). Desde entonces, se han analizado muchas cepas de rizobios con el fin de determinar la presencia o ausencia de actividad Hup. Los resultados de estos ensayos se han recopilado en distintas revisiones (Evans *et al.* 1987; O'Brian y Maier, 1989; Arp, 1990, 1992), y de ellos es de destacar la baja frecuencia de cepas que poseen el sistema hidrogenasa. Ninguna de las cepas de *R. meliloti* analizadas y sólo el 8% y el 13% de las cepas de *Rhizobium sp. (Sesbania)* y *R. leguminosarum* biovar *viciæae*, respectivamente, expresan actividad hidrogenasa. Tampoco se ha detectado actividad Hup en *R. loti* (Monza *et al.* 1989) ni en *Rhizobium sp. (Cicer)* (Minguez y Ruiz Argüeso, 1980). En *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* se ha descrito la existencia de cepas con alta

eficiencia relativa (Hungria y Neves, 1986). La presencia de actividad Hup está más extendida en las especies de lento crecimiento, ya que entre el 19% y el 25% de las cepas de *B. japonicum* y el 70% de las de *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) analizadas poseen un sistema de oxidación de hidrógeno, que en la mayoría de los casos es capaz de reciclar todo el hidrógeno producido por la nitrogenasa (Arp, 1992).

La expresión de la actividad hidrogenasa en los bacteroides está regulada por una serie de factores entre los que se incluyen: edad de la planta, nivel de iluminación y concentración de sodio en la solución nutritiva (Bethlenfalvay y Phillips, 1979; Sheikholeslam *et al.* 1980; Kapulnik y Phillips, 1986), además de las condiciones propias de los nódulos como son la microaerobiosis y el aporte controlado de fuentes carbonadas desde la planta.

Por otra parte, la capacidad de oxidar hidrógeno por los bacteroides está fuertemente influenciada por la especie de leguminosa hospedadora, ya que una misma especie de *R. leguminosarum* expresa distinto nivel de actividad Hup en simbiosis con *P. sativum*, *V. faba* o *V. bengalensis* (Dixon, 1972). Aún más, este efecto también se observa cuando se utilizan variedades diferentes de una misma especie de leguminosa (Bedmar *et al.* 1983).

El sistema hidrogenasa puede representar una serie de beneficios para la simbiosis como son: a) proteger a la nitrogenasa de la inactivación por el oxígeno, b) impedir la competición entre hidrógeno y nitrógeno por la nitrogenasa y c) recuperar parte del ATP perdido durante la producción de hidrógeno, mediante el acoplamiento de la síntesis de ATP a la oxidación del hidrógeno (Dixon, 1972). A partir de estos efectos beneficiosos, observados *in vitro*, se ha establecido en soja (*Glycine*) y en "cowpea" (*Vigna*) que la inoculación de estas plantas con cepas de *B. japonicum* que poseen actividad hidrogenasa produjo un incremento de la fijación de dinitrógeno y un aumento del peso seco y del contenido en N de las plantas, en relación con aquellas que fueron inoculadas con cepas que carecían de actividad Hup (Evans *et al.* 1987; Arp, 1990). Sin embargo, no se ha podido demostrar que el empleo como inoculantes de cepas con o sin actividad Hup de *R.*

*meliloti* (pIJ108, Hup<sup>+</sup>) o de *R. leguminosarum* produzca en alfalfa o guisante efectos similares a los descritos en soja (Bedmar *et al.* 1984; Cunningham *et al.* 1985).

Sin embargo, el papel fisiológico que desempeña la actividad hidrogenasa se ha puesto en entredicho ya que se ha indicado que el consumo de oxígeno durante la oxidación del hidrógeno representa una deficiencia energética. Esto sería debido a que, en condiciones limitantes de oxígeno, como las que ocurren en los nódulos (aproximadamente 10 mM, Witenberg, 1980; Appleby, 1984), los equivalentes de reducción que podrían originarse a través de la cadena respiratoria por la oxidación de los sustratos endógenos utilizando oxígeno como aceptor final de electrones, son menores que los que pueden producirse si ese oxígeno se emplea en la oxidación de hidrógeno (Stam *et al.* 1987; Delgado *et al.* 1991).

## **2. Efectos del nitrato sobre la nodulación y la fijación de dinitrógeno.**

Los nódulos de las leguminosas pueden considerarse como órganos especializados donde ocurre la fijación de dinitrógeno por los bacteroides de las células infectadas, de igual modo que las hojas de las plantas son los órganos especializados donde se lleva a cabo la fijación de CO<sub>2</sub> por los cloroplastos u otros plastidios.

La tasa de fijación de dinitrógeno en las leguminosas noduladas depende de las especies hospedadoras, además del microsimbionte y de otros factores generales como tipo de suelo, temperatura, macronutrientes, micronutrientes y régimen de agua. Las leguminosas herbáceas con importancia agrícola como alfalfa o trébol tienen las tasas más elevadas de fijación de dinitrógeno, que están en torno a 250 kg de N por Ha y año, seguidas del guisante, 150 Kg de N, mientras que los valores para soja o lenteja oscilan alrededor de los 100 kg de N. En leguminosas leñosas, los valores de fijación de dinitrógeno varían alrededor de los 150 Kg de N por Ha y año y, excepcionalmente, se ha descrito que *Sesbania rostrata* puede alcanzar hasta 700 Kg de N por Ha y año (Werner, 1992). A pesar de estas tasas de fijación, la importancia de una determinada simbiosis vendrá dada por la extensión de su cultivo, es decir, por la amplitud de su utilización en

la Agricultura mundial. Así la simbiosis con soja al ser utilizada tanto como fuente de alimento humano como para pienso en ganadería o como semilla productora de aceite, resulta ser la de mayor importancia a nivel global (Smith y Huyser, 1987).

Aunque la capacidad de las leguminosas para formar simbiosis efectivas fijadoras de dinitrógeno con bacterias de la familia *Rhizobiaceae* reducen sus requerimientos por el nitrógeno del suelo, el máximo desarrollo y rendimiento de esos cultivos no puede alcanzarse en ausencia de nitrógeno combinado (Hageman, 1979). De hecho, se ha demostrado tanto en soja (Thibodeau y Jaworski, 1975), como en judía (Franco *et al.* 1979) y en guisante (Dejong *et al.* 1982) que esas plantas pueden beneficiarse del efecto complementario de los procesos de fijación de dinitrógeno y reducción del nitrato. Cuando ambas fuentes están disponibles, la contribución de la fijación de dinitrógeno a la nutrición nitrogenada de la planta varía dependiendo de las condiciones de cultivo (Duc, 1980), del genotipo de la planta (Duc, 1980) y del nivel de nitrógeno combinado en el suelo (Bello *et al.* 1980). En soja, el porcentaje de dinitrógeno fijado varía entre el 25% en suelos muy fértiles y el 80% en suelos áridos (LaRue y Paterson, 1981). En alfalfa, del 40% al 70% del total del nitrógeno utilizado por la planta puede provenir de la simbiosis (Heichel *et al.* 1981) y hasta un 87% en *Vicia faba* (Richard y Soper, 1978). En soja, se han descrito valores de hasta 300 Kg de N fijado por Ha y año (Werner, 1992; Keyser y Li, 1992). Sin embargo, un exceso de nitrato en el suelo puede resultar en una disminución, o incluso la inhibición, tanto de la nodulación como de la fijación de dinitrógeno.

## **2.1. Inhibición de la nodulación por nitrato.**

Aunque diversos factores edáficos, pH, agua, temperatura, deficiencia de nutrientes toxicidades, etc. que pueden afectar la nodulación como consecuencia de un efecto negativo sobre la planta hospedadora, el nitrato es el único que, generalmente, no tiene efecto inhibitor del crecimiento de la planta (Lie, 1974). La inhibición por nitrato de la nodulación ocurre en todas las etapas en las que se ha investigado, es decir: adhesión de los rizobios a la raíz, inducción de la curvatura del pelo radical, formación del canal de infección y nivel de lectinas inmunológicamente detectable en la superficie radical

(Darbyshire, 1966; Munns, 1968; Dazzo y Brill, 1978; Sherwood *et al.* 1984; Malik *et al.* 1987). El nitrato también disminuye el número de nódulos que se forman, el desarrollo de los mismos y, además, puede inducir la senescencia prematura de los nódulos maduros (Wong, 1980; Carroll y Gresshoff, 1983; Schuller *et al.* 1986).

La reducción del nitrato, desde un punto de vista energético, es menos costosa que la reducción de dinitrógeno (Raven 1985; Streeter, 1988) y para algunos autores esta puede ser la razón de la inhibición de la nodulación por nitrato. Sin embargo, Harper (1987) estimó que en condiciones de campo, la diferencia de coste energético era insuficiente para influir en el rendimiento de plantas de soja. Otro tipo de consideraciones, de tipo ecológico y de desarrollo, que hay que tener en cuenta, son que el nitrato puede ser asimilado en cualquier órgano vegetal mientras que la fijación de dinitrógeno sólo puede ocurrir en nódulos bien formados. Por tanto, en un contexto de competencia con otras plantas, la reducción de nitrato por las leguminosas significa reducir el nitrato del suelo disponible para otras plantas no simbióticas que también compiten por el resto de nutrientes. Así, la reducción preferencial de nitrato sobre la fijación puede suponer una ventaja de las leguminosas al disminuir la capacidad competitiva de otras especies que no forman simbiosis fijadoras de dinitrógeno (Carroll y Mathews, 1990).

El mecanismo por el que ocurre la inhibición de la nodulación no está claro todavía. Wilson, en 1917, demostró que la formación de nódulos de soja sólo se inhibía en aquellas partes de la raíz que estaban en contacto directo con el nitrato, concluyendo que era un efecto localizado. En plantas de soja, este efecto se debe a la concentración externa de nitrato en sí misma, más que a la tasa de utilización de nitrato, por lo que se ha propuesto que el nitrato tiene efecto regulador *per se* sobre la aparición de los nódulos (Gibson y Harper, 1985).

Una línea distinta de investigación es la que se ha desarrollado mediante el empleo de plantas cuya nodulación es tolerante al nitrato (mutantes supermodulantes, *nts*), tales como las obtenidas en guisante (Messenger, 1985), habichuela (Park y Buttery, 1988) o soja (Gremaud y Harper, 1989). En las plantas de genotipo silvestre la nodulación es un proceso

autorregulado, ocurriendo un número mucho mayor de infecciones que de nódulos formados, efecto que se debe a un bloqueo en los primeros estadios de la ontogenia nodular (Mathews *et al.* 1989).

Los trabajos desarrollados por Pierce y Bauer (1983) y por Olsson *et al.* (1989) con plantas normales de soja mostraron que la autorregulación de la inhibición de la formación de nuevos nódulos ocurría al producirse las primeras infecciones, que era previa a la formación del nódulo y del desarrollo de la actividad nitrogenasa y que la inhibición por autorregulación aumentaba si se aplicaba nitrato en concentraciones tales que no afectaran la nodulación. Las mutantes supernodulantes, que han perdido la capacidad de autorregulación, son también tolerantes al nitrato, lo que implica que ambos procesos deben regularse coordinadamente. Además, tales mutantes nodulan más rápidamente que la parental (Alva *et al.* 1988). Basándose en estos datos se ha propuesto un modelo de regulación de la formación de nódulos según el cual al ocurrir las primeras infecciones se produciría una señal que se traslocaría al tallo, el cual produciría como respuesta un inhibidor que se transportaría sistémicamente a la raíz y, desde allí, paralizaría el desarrollo de la división celular de la subepidermis infectada que daría lugar al nódulo. La presencia de nitrato en el medio de enraizamiento incrementaría el efecto debido al inhibidor, actuando el nitrato de forma sinérgica con la señal responsable de la producción del inhibidor de la nodulación y, consecuentemente, disminuyendo el número de nódulos. De acuerdo con esta hipótesis, el efecto del nitrato sobre la nodulación no se debe, por tanto, a un efecto directo del nitrato sino a su capacidad para aumentar la eficiencia del inhibidor de la autorregulación. La ausencia de efecto del nitrato en las mutantes supernodulantes se debería, consecuentemente, a la no existencia del inhibidor de nodulación (Carroll y Mathews, 1990). La naturaleza del agente inhibidor no se conoce todavía, pudiendo ser una fitohormona como ácido abscísico (Phillips, 1971), giberelina (Williams y Sicardi de Mallorca, 1984) o etileno (Ligero *et al.* 1987, 1991).

## 2.2. Inhibición de la fijación de dinitrógeno por nitrato.

La inhibición de la fijación de dinitrógeno por nitrato en nódulos de leguminosas ha sido objeto de numerosos estudios y controversias, no existiendo todavía un modelo claro que explique cómo ocurre el efecto negativo del nitrato sobre la fijación. Entre las hipótesis propuestas cabe destacar: a) disminución en el aporte de carbohidratos a los nódulos (Small y Leonard, 1969; Oghoghorie y Pate, 1971; Latimore *et al.* 1977), b) efecto del nitrito sobre la síntesis o actividad de la nitrogenasa (Roberts y Brill, 1981; Trinchant y Rigaud, 1984) o sobre la síntesis y función de la leghemoglobina (Rigaud y Puppo, 1977; Bisseling *et al.* 1978; Kanayama *et al.* 1990; Kanayama y Yamamoto, 1990a, b, c, 1991), c) descarga de compuestos nitrogenados en el xilema (Streeter, 1982; Zengbé *et al.* 1984; Streeter, 1985; Schuller *et al.* 1986) y d) competición por poder reductor entre la nitrato reductasa y la respiración a nivel de los bacteroides o de las mitocondrias (Heckman *et al.* 1989).

Las investigaciones más recientes sugieren la existencia de un mecanismo común de inhibición de la nitrogenasa, incluso partiendo de hipótesis distintas. Este mecanismo adscribe un papel central al suministro de oxígeno a los bacteroides, de manera que la limitación en el aporte de oxígeno a la zona infectada de los nódulos llevaría aparejada una disminución en la provisión de ATP a la nitrogenasa (revisado por Vessey y Waterer, 1992). Así, sea cual fuere el agente causante, según las diversas teorías propuestas, la consecuencia sería la puesta en marcha de una barrera de difusión al oxígeno que impediría la entrada del mismo al interior del nódulo (Carroll *et al.* 1985; Minchin *et al.* 1986; Witty *et al.* 1986; Hunt *et al.* 1987). La existencia de esa barrera se ha comprobado mediante el empleo de microelectrodos (Witty *et al.* 1987) y el análisis de la ultraestructura nodular (Sheehy *et al.* 1985; Hunt *et al.* 1988; Layzell *et al.* 1988). Estos estudios señalan que las observaciones experimentales podrían explicarse asumiendo que la barrera de difusión al O<sub>2</sub> consiste en una o varias capas de células, localizadas en el córtex interno próximo a la endodermis, cuyos espacios intercelulares están parcialmente rellenos de agua, de modo que los cambios en la resistencia de la barrera podrían deberse a variaciones en el volumen de agua que ocupan dichos espacios intercelulares (Sheehy *et al.* 1985; Layzell *et al.* 1988).

Para algunos autores el control de la difusión de O<sub>2</sub> podría estar mediado por glucoproteínas presentes en los espacios intercelulares (James *et al.* 1990), mientras que para otros la barrera de difusión se regula por un mecanismo osmótico que implica a la sacarosa como soluto (Vessey *et al.* 1988a, b; Layzell y Hunt, 1990; Hunt *et al.* 1990).

La limitación del O<sub>2</sub> disponible para los bacteroides está implicada en la inhibición de la fijación de N<sub>2</sub> no sólo por el tratamiento con nitrato de las leguminosas noduladas, sino también con la defoliación, exposición de las plantas a oscuridad continua, inundación, sequía o bajas temperaturas (Witty *et al.* 1986; Durand *et al.* 1987; Carrol *et al.* 1987; Minchin *et al.* 1988). Excelentes revisiones sobre el tema se han publicado recientemente por Vessey y Waterer (1992) y Walsh y Carrol (1992).

### **3. Metabolismo del nitrógeno en el suelo por microorganismos.**

El nitrógeno y el carbono constituyen, aproximadamente, el 2% y el 40% del peso seco del material vegetal. Basándonos en las estimaciones de Galston (1961), que indican que a nivel mundial la cantidad de carbono fijado anualmente se aproxima a las 200 x 10<sup>9</sup> Tm, se puede calcular que 10 x 10<sup>9</sup> Tm de nitrógeno han de incorporarse al material vegetal. Puesto que la fijación biológica supone 2 x 10<sup>8</sup> Tm, se puede concluir que el resto del N presente en las plantas procede de la asimilación del amonio o del nitrato (Guerrero *et al.* 1981; Gallon y Chaplin, 1987). El nitrato es la forma predominante de N inorgánico capaz de ser asimilado por plantas y microorganismos ya que, aunque los fertilizantes amoniacales son también muy utilizados, el amonio es oxidado a nitrato por los microorganismos del suelo. Por tanto, desde un punto de vista global, la asimilación de nitrato es la principal vía de conversión de nitrógeno inorgánico a formas orgánicas (Solomonson y Barber, 1990), aún más si se tiene en cuenta que una fuente de N en forma asimilable es, a menudo, el factor limitante para el crecimiento y desarrollo de las plantas.

La fertilización basada en el uso de nitratos se ha utilizado ampliamente para incrementar el rendimiento de los cultivos agrícolas. Sin embargo, el uso de esos fertilizantes lleva aparejadas una serie de desventajas como son: 1) su coste, 2) la

liberación a la atmósfera de gases tóxicos y 3) su lixiviación, lo que produce la contaminación de los acuíferos, que repercute, a su vez, en la contaminación de las aguas para consumo humano y en la eutrofización de lagos y ríos.

Desde un punto de vista microbiológico, y partiendo del nitrato presente en el suelo, el mismo está sometido a todos los procesos indicados en la Fig. A con la única intervención de los microorganismos. Así, en condiciones aeróbicas lo pueden asimilar, de igual manera que lo hacen las plantas, o bien desasimilar en condiciones de microaerobiosis.

### 3.1. Nitrificación.

El nitrato del suelo, además del aporte exógeno que se obtiene por la fertilización nitrogenada, se obtiene por medio del proceso de nitrificación (Fig. A). La conversión del amonio en nitrato se realiza en la naturaleza, principalmente, por dos grupos altamente especializados de bacterias quimioautotróficas estrictas. La nitrificación tiene lugar en dos etapas: en la primera, el amonio es oxidado a nitrito y en la segunda, el nitrito es oxidado a nitrato. La primera reacción se lleva a cabo por las "nitrosobacterias" (*Nitrosomonas*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosococcus*, ...) que poseen el enzima amonio-monooxigenasa que cataliza la reacción:



La naturaleza exacta del agente reductor de esta reacción no se conoce (Wood, 1986). La hidroxilamina da lugar a la formación de un segundo intermediario, el radical nitrosil (NOH). Se cree que el  $\text{NO}_3^-$  puede reaccionar con el grupo NOH para formar nitrohidroxilamina, la cual se rompe para dar dos moléculas de  $\text{HNO}_2$ . En un paso posterior el  $\text{NO}_2^-$  es oxidado a nitrato por las "nitrobacterias", representadas por el género *Nitrobacter*. La oxidación del  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$  implica la participación de  $\text{O}_2$ , pero únicamente como transportador de electrones, ya que el átomo de oxígeno del  $\text{NO}_3^-$  se obtiene de una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  y no del  $\text{O}_2$  (Paul y Clark, 1989).

La energía que se obtiene de estas reacciones es de 65 kcal/mol y de 18.2 kcal/mol para la oxidación de 1 mol de  $\text{NH}_4^+$  y de  $\text{NO}_2^-$ , respectivamente, que se utiliza para mantener las actividades vitales que desarrollan estas bacterias (revisado por Stevenson, 1986; Paul y Clark, 1989). Aunque los microorganismos citados son poco abundantes en cualquier tipo de ambiente y poseen un tiempo de generación de, aproximadamente, 20-40 h, tienen gran importancia ecológica ya que pueden procesar de 35 a 100 N por cada  $\text{CO}_2$  fijado. Esto implica que muy pocas células pueden procesar un gran número de moléculas de N combinado, lo que está de acuerdo con las altas tasas de nitrificación que se detectan en el suelo (Sprent, 1987).

### **3.2. Metabolismo del nitrato.**

El nitrato puede sufrir dos vías metabólicas divergentes. Aunque el primer paso de su utilización es la reducción a nitrito, este proceso se puede catalizar por dos sistemas enzimáticos diferentes. Así, algunos microorganismos que utilizan el nitrato como fuente de nitrógeno no pueden utilizarlo en la respiración microaeróbica, otros, que lo utilizan para obtener energía, son capaces, además, de desviar la reacción y utilizarlo como única fuente de nitrógeno. Finalmente, hay microorganismos que son capaces de asimilar y desnitrificar simultáneamente. Estos procesos van asociados, generalmente, a condiciones determinadas de disposición de oxígeno, de manera que la aerobiosis conlleva la asimilación de nitrato a amonio, mientras que la microaerobiosis da lugar a su respiración y posterior amonificación o desnitrificación.

#### **3.2.1. Asimilación del nitrato.**

Las reacciones enzimáticas que ocurren en aerobiosis van dirigidas a la asimilación del nitrato. El proceso de reducción asimilatoria del ión nitrato comienza con el transporte del mismo al interior celular. Butz y Jackson (1977) postularon que la NR catalizaría el transporte de nitrato y su reducción posterior a nitrito. Sin embargo, el aislamiento de una proteína de 45 kDa de la membrana citoplasmática de la cianobacteria *Synechococcus* PCC 7942 crecida con nitrato, junto con la clonación del gen y la obtención de mutantes que

no sintetizaban esa proteína, indicó que la incorporación y reducción de nitrato son catalizadas por proteínas diferentes, y que dicha incorporación es activa si la concentración de nitrato es menor a 1 mM (Omata y Ogawa, 1986; Omata *et al.* 1989, 1990). Esa proteína podría ser similar a una proteína de *Anacystis nidulans* de 47 kDa cuya presencia en la membrana citoplasmática se correlaciona con el transporte de nitrato y cuya síntesis se inhibe por amonio y no requiere nitrato como inductor, a diferencia del enzima NR (Sivak *et al.* 1989; Lara *et al.* 1987; Syrett, 1988; Guerrero *et al.* 1990).

La nitrato reductasa asimilatoria requiere para su funcionamiento dos electrones. Aunque en eucariotas el NADH es el donador de electrones más común, se han encontrado enzimas biespecíficas que pueden utilizar tanto NADH como NADPH y otras específicas de NADPH. De hecho, se han identificado hasta tres isoenzimas nitrato reductasa asimilatorias codificadas, consecuentemente, por tres genes diferentes (Caboche y Rouzé, 1990). Los procariotas pueden utilizar tanto NADH (*Rhodobacter capsulatus*, Martínez-Luque *et al.* 1991), como ferredoxina (bacteroides de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*), Alikulov *et al.* 1980) y determinados intermediarios respiratorios (enterobacterias, Stewart, 1988), aunque es frecuente tener que emplear donadores no fisiológicos de electrones para poner de manifiesto la actividad nitrato reductasa.

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

Además de la actividad total nitrato reductasa, en la que el flujo de electrones ocurre desde el NADH al nitrato vía FAD, citocromo  $b_{557}$  y MoCo, el enzima posee dos actividades parciales: una diaforasa o NADH-deshidrogenasa que funciona sin la participación del MoCo, y otra actividad terminal reductora de nitrato que puede ponerse

de manifiesto sin la presencia del FAD y utilizando donadores artificiales de electrones (ver revisiones de Campbell, 1989; Solomonson y Barber, 1990; Hoff *et al.* 1992; Cathala *et al.* 1992).

La nitrito reductasa asimilatoria de bacterias utiliza NAD(P)H como donador de electrones mientras que en algas y plantas superiores el enzima funciona con ferredoxina reducida (Sprent, 1987). La reducción de nitrito a amonio implica la transferencia de 6 electrones en una reacción que transcurre en un sólo paso, sin la formación de intermediarios. La nitrito reductasa es una proteína monomérica de tamaño molecular 61-63 kDa que contiene un sirohemo y un centro sulfoférico [4 Fe-4 S] como grupo prostético (Guerrero *et al.* 1981). El sirohemo es una tetrahidroporfirina de hierro que se une al grupo sulfoférico por un átomo de S de un resto de cisteína, produciéndose un solapamiento electrónico que dificulta el estudio del flujo de electrones desde el NAD(P)H o la ferredoxina reducida al nitrito (Campbell y Kinghorn, 1990).

### **3.2.2. Desnitrificación del nitrato.**

La utilización de nitrato en condiciones microaeróbicas implica el uso de este ión como aceptor final de electrones de la cadena respiratoria. Al proceso por el cual el nitrato se reduce a nitrito se le llama respiración del nitrato, para diferenciarlo de aquel por el cual el nitrato es incorporado a los componentes proteicos celulares (Stouthamer, 1976). Cuando el nitrato es la única fuente de nitrógeno disponible, la respiración puede iniciar tanto la reducción desasimilatoria del mismo, proceso por el cual el nitrato se reduce a amonio, como la desnitrificación, que conduce a la formación de óxidos de nitrógeno (NO, N<sub>2</sub>O) e incluso a nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>) (Delwiche, 1981; Payne, 1981; Stewart, 1988). Aunque desnitrificación y reducción desasimilatoria ocurren en condiciones de baja concentración de O<sub>2</sub>, el primero resulta en la pérdida de nitrógeno combinado, mientras que el segundo lo conserva (Aparicio-Tejo *et al.* 1991).

En la reducción desasimilatoria de nitrato intervienen dos enzimas, la primera una NR respiratoria ligada a membrana y la segunda una NiR asimilatoria citosólica que

cataliza la reducción del nitrito a amonio. A este proceso algunos autores lo han denominado amonificación del nitrato (Reddy y Lodha, 1986, 1988).

En la desnitrificación, la sucesión de reacciones es:



(revisado por Cuypers y Zumft, 1992). Durante muchos años la posición, en la secuencia de la reacción, del óxido nítrico (NO) así como la de la óxido nítrico reductasa fue causa de distintas controversias, con la sugerencia de diferentes rutas para el proceso de desnitrificación. Las bacterias desnitrificadoras de uso normal en los laboratorios (*Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*,...) no producen cantidades significativas de NO a partir de  $\text{NO}_2^-$ , de manera que no aparece  $^{15}\text{NO}$  en un conjunto de  $^{14}\text{NO}$  cuando las células se incuban con  $^{15}\text{NO}_2^-$  (Garber y Hollocher, 1981). Así, durante bastante tiempo se especuló con que el nitrito podría ser reducido, en un único paso enzimático, a óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ). Sin embargo, recientemente el NO ha sido reconocido, por métodos cinéticos y bioquímicos, como un componente intermediario con una concentración muy baja (Goretski y Hollocher, 1990; Goretski *et al.* 1990) y ha sido atrapado extracelularmente por hemoglobina exógena (Goretski y Hollocher, 1988; Carr *et al.* 1989).

Por otra parte, se han obtenido mutantes, por inserción del transposón Tn5, de *P. stutzeri* deficientes en nitrito reductasa (citocromo *cd<sub>1</sub>*) que no eran capaces de reducir  $\text{NO}_2^-$  a NO, pero sí NO a  $\text{N}_2\text{O}$ , lo que indica claramente que nitrito reductasa y óxido nítrico reductasa son enzimas diferentes (Zumft *et al.* 1988a). Además, cuando se reemplazan los genes de la NO reductasa, se obtiene una cepa con un fenotipo letal al acumularse NO debido a la reducción del  $\text{NO}_2^-$  (Braun y Zumft, 1991). Por tanto, queda establecido que la desnitrificación es la sucesión lineal de una serie de reacciones con la participación obligatoria de los enzimas NiR y NO reductasa para la transformación del  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{N}_2\text{O}$ , con NO como un intermediario libre.

El enzima NO reductasa de *P. stutzeri* es un heterodímero compuesto por dos polipéptidos de 38 kDa y 17 kDa, que se asocia con hemo *b* y hemo *c*, no contiene citocromo *cd<sub>1</sub>*, se localiza en la membrana citoplasmática y permite la síntesis de ATP (en *Pa. denitrificans*) al generar un gradiente electroquímico de protones (Heiss *et al.* 1989; Carr *et al.* 1989).

La reducción del óxido nitroso a N<sub>2</sub> está acoplada a la producción de ATP, ya que hay microorganismos que pueden crecer con N<sub>2</sub>O como único oxidante, estando su respiración acoplada a la traslocación de protones y la generación de un potencial de membrana (Boogerd *et al.* 1981; Bazylinski y Hollocher, 1985; Bryan *et al.* 1985; McEwan *et al.* 1985). La N<sub>2</sub>O reductasa ha sido purificada a homogeneidad y caracterizada en distintos microorganismos como *P. stutzeri*, *Pa. denitrificans*, *Achromobacter denitrificans* (*Alcaligenes*) (Coyle *et al.* 1985; Snyder y Hollocher, 1987; Matsubara y Sano, 1985). Es un enzima que se localiza en el espacio periplásmico (Zumft *et al.* 1990; Körner y Mayer, 1992) y está compuesto por dos subunidades idénticas que contienen aproximadamente 8 átomos de cobre por dímero de 120 kDa (Coyle *et al.* 1985). Su espectro de EPR y secuencia aminoacídica revelaron que tiene similitudes con la subunidad II del complejo respiratorio de la citocromo oxidasa *aa<sub>3</sub>* (Riester *et al.* 1989; Kroneck *et al.* 1990; Scott *et al.* 1989; Viebrock y Zumft, 1988). No se conoce, sin embargo, el sitio de unión del Cu activo, ni el mecanismo de acción catalítica ni su donador fisiológico de electrones, aunque se ha especulado con la posibilidad de que sea un citocromo *c* tanto en *P. stutzeri* como en *Pa. denitrificans* (Zumft *et al.* 1988b; Boogerd *et al.* 1981).

### Genética de la desnitrificación.

Los genes estructurales de las oxidoreductasas que catalizan la desnitrificación han sido mapeados y aislados en *P. stutzeri*. Su localización es cromosómica, donde junto con genes de funciones auxiliares constituyen 3 subgrupos de aproximadamente 30 kb (Cuypers y Zumft, 1992). En *Alcaligenes eutrophus* H16, la mayoría de los genes de desnitrificación, incluyendo un locus para una NR soluble, *nap*, se localizan en plásmidos, mientras que los

loci para la reducción del nitrato respiratoria (*narD*) y asimilatoria (*nas*) se localizan en el cromosoma (Warnecke *et al.* 1991).

Para hablar de la organización molecular de los genes que intervienen en la desnitrificación nos limitaremos a *P. stutzeri* cepa ZoBell, ya que en este microorganismo se han identificado todos los genes que intervienen en dicho proceso, a excepción de los del enzima nitrato reductasa. Una excelente revisión sobre el tema se puede encontrar en Zumft (1992). La subgrupación de genes *nir* se compone de 7 loci conocidos. El gen estructural para la nitrito reductasa es *nirS*, que está seguido por 4 genes cada uno de los cuales codifica la información para la síntesis de una proteína hémica: *nirT* para un citocromo tetrahémico, *nirB* para el citocromo *c<sub>552</sub>*, *nirM* para el citocromo *c<sub>551</sub>* (donador fisiológico de electrones para la NiR), y el ORF5 para un citocromo tipo *c* monohémico. El gen *nirD* está implicado en la biosíntesis del citocromo *d<sub>1</sub>* o en alguna etapa de su procesamiento para formar parte de la NiR (Zumft *et al.* 1988a), mientras que el ORF8 codifica un producto que afecta tanto a la reducción de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> como a la de NO. Además de este gen, la síntesis del enzima NO reductasa, heterodímero unido a membrana, requiere los citocromos *b* y *c* codificados por los genes *norB* y *norC*, respectivamente. Todos esos genes se localizan por debajo del subgrupo de genes *nir*.

En el subgrupo de los genes *nos*, que ocupa unas 8 kb, se han identificado y caracterizado claramente 5 genes. El gen *nosZ* es el gen estructural del enzima N<sub>2</sub>O reductasa. Por debajo de él se localizan los genes *nosDFY* que posiblemente forman un operón y están implicados en la obtención de Cu o en su incorporación al enzima. Se ha propuesto un modelo de funcionamiento de los productos de este operón basado en los sistemas de transporte de pequeñas moléculas, lo que incluiría una proteína de unión a nucleótidos, NosF, perteneciente a ATPasas de transporte (Zumft *et al.* 1990). Este modelo también incluiría a NosA, una proteína formadora de poros y que contiene Cu, necesaria para la biosíntesis del enzima N<sub>2</sub>O reductasa en *P. stutzeri* JM300 (Lee *et al.* 1991). La proteína NosA no se ha identificado todavía en *P. stutzeri* cepa ZoBell. Por encima del gen *nosZ* se localiza *nosR*, que codifica una proteína de regulación positiva (activadora) de 765 aminoácidos (Mr 86.5 kDa) y que presenta 7 segmentos transmembrana, por lo que se la

clasifica como una proteína integral de membrana. En su extremo carboxilo terminal NosR contiene dos grupos de cisteína, similares a los de las ferredoxinas bacterianas, que podrían estar implicados en la unión a metales con una posible función de sensor redox (Cuypers y Zumft, 1992).

### Regulación de la desnitrificación.

Aunque se ha considerado como un axioma que la desnitrificación requería una exclusión de O<sub>2</sub> estricta (Payne, 1981), el estudio inmunológico detallado realizado por Körner y Zumft (1989) en *P. stutzeri* con anticuerpos contra los distintos enzimas que intervienen en la desnitrificación reveló que, en condiciones aeróbicas, la N<sub>2</sub>O reductasa era constitutiva, y que existía en concentraciones basales, mientras que NR y NiR no se expresaban en una concentración de oxígeno superior a 5 mg/l. Además de la anaerobiosis, la síntesis de los enzimas requiere la presencia de algún óxido de nitrógeno. Así, la presencia de nitrato indujo los máximos niveles tanto de NR como de NiR y de N<sub>2</sub>O reductasa. Sin embargo, la presencia de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> o N<sub>2</sub>O sólo indujo la síntesis de NiR o N<sub>2</sub>O reductasa, respectivamente. En determinados microorganismos como *Azospirillum*, *Alcaligenes* o *B. japonicum* la actividad NR se expresa en condiciones microaeróbicas incluso en ausencia de nitrato (Danneberg *et al.* 1989; Warnecke *et al.* 1991; Delgado *et al.* 1992), y otros, como *Thiosphaera pantotropha* o *Aquaspirillum magnetotacticum* son capaces de desnitrificar incluso en condiciones aeróbicas (Bazylnski y Blakemore, 1983; Robertson y Kuenen, 1984).

Los datos obtenidos recientemente por distintos autores parecen sugerir un circuito de regulación jerárquica para el control de la desnitrificación. Así, existirían reguladores específicos de un determinado grupo de genes, como *nosR*, y reguladores generalizados como Fnr y RpoN ( $\sigma^{54}$ ) que regularían más de un subgrupo de genes o incluso toda la ruta. Otro tipo de regulación sería el constituido por un sistema regulador de dos componentes, que pueden actuar coordinadamente con  $\sigma^{54}$  (Cuypers y Zumft, 1992).

En condiciones microaeróbicas, un regulador positivo es el producto del gen *fnr*, la proteína Fnr, que es un activador transcripcional de la síntesis de distintas enzimas como NR, fumarato reductasa, formato deshidrogenasa, NiR,... (Stewart, 1988; Unden y Trageser, 1991; Egan y Stewart, 1991). Fnr es un homodímero, cuyas subunidades tienen un tamaño molecular de 30 kDa y muestran una secuencia típica y homóloga a otras proteínas reguladoras que se unen a ADN (Bothe *et al.* 1991). Fnr se encuentra, aproximadamente, en la misma concentración en células cultivadas aeróbicamente o microaeróbicamente, por lo que debe existir un mecanismo que convierte a Fnr en una forma activa en ausencia de O<sub>2</sub> (Unden y Trageser, 1991). Los genes que se activan por Fnr presentan una secuencia consenso de 22 bp (caja Fnr), la cual está presente en los genes *nirS*, *nirM*, *norC*, *nosR*, *nosZ* y ORF8 de *P. stutzeri* (Cuypers y Zumft, 1992). El descubrimiento de un gen homólogo a *fnr* en las pseudomonadaceas y la presencia de diversas cajas Fnr distribuidas a lo largo de toda la agrupación de genes de la desnitrificación, a distancias críticas de los sitios de iniciación transcripcional, han revelado el primer mecanismo molecular de control por oxígeno en la desrepresión individual de las reductasas que intervienen en la desnitrificación (Körner y Zumft, 1989).

El otro tipo de circuito regulador, en *P. stutzeri*, es el que depende del factor  $\sigma^{54}$  producto del gen *rpoN* (*ntrA*). Los genes bajo control de  $\sigma^{54}$  presentan una secuencia consenso en la posición -12/-24 (Beynon *et al.* 1983; Hunt y Magasanik, 1985). El mapeo de la subagrupación de genes *nos* mostró que *nosR*, *nosZ* y *nosD* pueden tener motivos similares a los de los genes bajo control de  $\sigma^{54}$  (Cuypers y Zumft, 1991). En *A. eutrophus* una mutación en el gen *rpoN* impide el crecimiento anaeróbico en nitrato, efecto, que sin embargo, no ocurre en *P. aeruginosa* (Friedrich *et al.* 1990; Totten *et al.* 1990).

Un tercer tipo de regulación descrito para el enzima NR de *E. coli*, es el basado en un sistema regulador de dos componentes. En este modelo, uno de los componentes es una proteína de membrana, normalmente con actividad quinasa, que es capaz de reconocer un estímulo ambiental y activar por fosforilación al componente regulador. El regulador fosforilado activa la transcripción de los genes que están bajo su control. Este sistema no

está bajo control del gen *rpoN*, pero se cree que es operativo en las bacterias desnitrificantes (Cuypers y Zumft, 1992).

Un cuarto tipo de regulación sería el que ocurre a un nivel específico para cada proteína; en la agrupación de genes de la desnitrificación de *P. stutzeri* estos serían los genes *nosR* y el ORF8. Como se ha indicado anteriormente, *nosR* es una proteína reguladora que al mismo tiempo actuaría como un sensor redox, ejerciendo su función reguladora sobre *nosZ* en *trans* dependiente de  $\sigma^{54}$ . Hay que indicar, sin embargo, que la consideración de proteína integral de membrana de NosR da lugar a la paradoja de cómo un único polipéptido puede tener al mismo tiempo funciones de sensor y de activador, por lo que se ha sugerido su posible interacción con un hipotético segundo componente (Cuypers y Zumft, 1992).

La proteína codificada por el ORF8, al igual que NosR, presenta en su extremo carboxilo terminal un motivo hélice-giro-hélice, similar al de otras proteínas reguladoras, que se transcriben en sentido opuesto al de los genes que regulan (Beck y Warren, 1988; Cuypers y Zumft, 1992). Además, este gen, ORF8, tiene homología con otros reguladores como XylR, NifA, NtrC, DctD y HrpS (Jüngst y Zumft, 1991). Kustu *et al.* (1989) han propuesto que los reguladores del tipo NtrC son activadores que confieren especificidad a la transcripción dependiente de  $\sigma^{54}$ . Aunque en el caso de *nosR* sí se ha identificado la secuencia consenso -12/-24, todavía no se tienen datos sobre el ORF8.

#### **4. El enzima nitrato reductasa respiratorio.**

El enzima nitrato reductasa de tipo respiratorio mejor conocido es el de *Escherichia coli*. Quastel, en 1925, demostró que el nitrato puede sustituir al oxígeno, permitiendo el crecimiento anaeróbico. Posteriormente, Stickland (1931) determinó la influencia de distintas presiones parciales de oxígeno en la reducción de nitrato a nitrito. Desde entonces, las investigaciones realizadas han permitido purificar el enzima, determinar su estructura, obtener mutantes de *E. coli* deficientes en actividad nitrato reductasa e identificar los genes que codifican la proteína y establecer la regulación y fisiología de dicho enzima. En el

presente capítulo, partiendo de *E. coli* como modelo, intentaremos dar una visión generalizada del enzima nitrato reductasa, para, posteriormente, abordar los conocimientos actuales sobre el enzima nitrato reductasa de *B. japonicum*.

#### 4.1. Bioquímica del enzima nitrato reductasa respiratorio.

Los trabajos pioneros de Showe y DeMoss (1968) demostraron que el enzima se halla en la fracción particulada -membranas- de las células. Posteriormente, el enzima se purificó bien solubilizando las membranas a pH alcalino a 60°C (MacGregor *et al.* 1974; Lund y DeMoss, 1976) bien solubilizándolas con Triton X-100 (MacGregor, 1975; Clegg, 1976) o con deoxicolato (Enoch y Lester, 1975; van't Riet y Planta, 1975). En estos primeros experimentos se comprobó que el enzima se componía, al menos, de 2 subunidades:  $\alpha$ , con un tamaño molecular de 150 kDa, y  $\beta$ , con un tamaño molecular de 60 kDa. Estas dos subunidades estarían en proporción 1:1.

La purificación mediante solubilización con deoxicolato permitió identificar una tercera subunidad ( $\gamma$ ), con un tamaño molecular de 20 kDa (Enoch y Lester, 1975). Esta subunidad también se obtiene cuando la solubilización se realiza con Triton X-100, encontrándose los componentes  $\alpha:\beta:\gamma$  en proporción 1:1:2. La purificación de otros enzimas con actividad nitrato reductasa respiratoria de distintas bacterias, se presenta en la Tabla A. Una detallada revisión sobre la respiración del nitrato en relación al metabolismo anaeróbico en enterobacterias ha sido proporcionada por Stewart (1988).

En *E. coli*, la subunidad  $\alpha$  tiene un 37% de residuos hidrofóbicos, contiene Mo, grupos [Fe-S] y el sitio activo de la proteína. Su localización en la membrana plasmática es hacia el citoplasma, ya que su presencia sólo se puede detectar en vesículas vueltas del revés; además, donadores de electrones no fisiológicos, como FMN o metil viológeno que no pueden atravesar la membrana, sólo sirven para determinar la actividad en células rotas, mientras que el benzil viológeno, que sí atraviesa la membrana, sirve para medir actividad NR en células enteras (Jones y Garland, 1977). Esta subunidad está codificada por el gen *narG*.

**Tabla A.** Purificación de enzimas nitrato reductasa respiratorios de distintos microorganismos.

Característica	<i>E.coli</i>	<i>P.stutzeri</i>	<i>R.sphaeroides</i>	<i>B.halodenitrificans</i>	<i>H.denitrificans</i>
Tamaño molecular (kDa)	200-800	140	180	226	176
Composición en subunidades (kDa)	150 60 20	112 60	120 60	145 58 23	116 60
Purificación mediante:	Calor, I.I. <sup>a</sup> , F.G. <sup>c</sup> , P.F. <sup>d</sup>	Calor, I.I.,F.G.	Calor, I.I., F.G.	Triton, I.I., Hp., F.G.	I.I., Hp <sup>b</sup> , I.I.
Metales	Fe-S, Mo	Fe-S,Mo	Mo	Fe, S, Mo	Mo?
Inhibidores	N <sub>3</sub> <sup>-</sup> , CN <sup>-</sup>	N <sub>3</sub> <sup>-</sup> ,CN <sup>-</sup>		NaCl	N <sub>3</sub> <sup>-</sup> ,CN <sup>-</sup> , ClO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Tiocianato
Referencia	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)

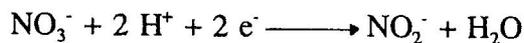
<sup>a</sup>) Intercambio iónico; <sup>b</sup>) Hidroxilapatito; <sup>c</sup>) Filtración en gel; <sup>d</sup>) Precipitación fraccionada.  
Referencias: (1) MacGregor, 1975; (2) Blümle y Zumft, 1991; (3) Byrne y Nicholas, 1987; (4) Ketchum *et al.* 1991; (5) Hochstein y Lang, 1991.

La subunidad  $\beta$  tiene un 41% de residuos hidrofóbicos, está desprovista de metales y se fragmenta específicamente por tripsina para dar un polipéptido de 43 kDa. El polipéptido restante de 17 kDa, y por tanto toda la subunidad  $\beta$ , está implicado en las interacciones entre las subunidades y en la asociación a la membrana. Su localización en la membrana es hacia el citoplasma, según se desprende de estudios de marcaje y de que sólo se digiere con tripsina en vesículas vueltas del revés (Graham y Boxer, 1980). Se codifica por el gen *narH*.

La subunidad  $\gamma$  contiene un 45% de residuos hidrofóbicos, tiene grupos hemo y, por su espectro de absorción, presenta las características de un citocromo  $b_{556}$ . Solamente se digiere por la acción de la tripsina, y no de otras proteasas, originando dos polipéptidos de igual tamaño molecular. Por métodos de marcaje químico, se ha determinado que su orientación en la membrana es hacia el periplasma, ya que su marcaje sólo se consigue en esferoplastos (MacGregor y Christopher, 1978). Esta subunidad está codificada por el gen *narI*.

Aunque hubo cierta confusión sobre la estructura del enzima nativo debido a los problemas de asociación-disociación del mismo (Lund y DeMoss, 1976), el descubrimiento de la subunidad  $\gamma$  y las evidencias posteriores sugieren, que el enzima nitrato reductasa en forma nativa, integrado en la membrana, es una proteína multimérica del tipo  $\alpha_2\beta_2\gamma_4$  (Stewart, 1988). Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se sintetizan como precursores solubles en el citoplasma y deben, posteriormente, interaccionar para formar un complejo  $\alpha\beta$ . Dentro del operón *nar* se ha identificado un cuarto gen, *narJ* (Sodergren y DeMoss, 1988), cuyo producto, la proteína NarJ, es indispensable para la biogénesis del enzima nitrato reductasa a la membrana (Dubourdieu y DeMoss, 1992). La proteína NarJ estaría, así implicada en la maduración del complejo  $\alpha\beta$  soluble activo, y en facilitar su interacción con la subunidad  $\gamma$  unida a la membrana. NarJ se ha relacionado también con la protección de la subunidad  $\alpha$  frente a la degradación proteolítica, lo que indicaría la existencia de un mecanismo de adición o modificación del cofactor de molibdeno o de un mecanismo para facilitar la asociación con la subunidad  $\beta$  (Dubourdieu y DeMoss, 1992).

La reacción catalizada por el enzima NR tiene la siguiente estequiometría:



Esta reacción se asocia a la formación de un gradiente electroquímico de protones a través de la liberación de 2 H<sup>+</sup> al periplasma acoplada al consumo de dos protones en el citoplasma, mientras que los electrones se transfieren a través del enzima desde el periplasma hacia el citoplasma (Jones *et al.* 1980; Stewart, 1988)). La cesión de electrones al enzima, en condiciones fisiológicas, es a través del citocromo *b*<sub>556</sub>, ya que la proteólisis parcial con tripsina que genera la separación de la subunidad  $\gamma$ , da como resultado una falta de actividad enzimática cuando se usa un ubiquinol, donador fisiológico de electrones, y no cuando se utilizan derivados del viológeno (Morpeth y Boxer, 1985). Por tanto, se ha sugerido que el enzima nitrato reductasa contiene dos sitios distintos e independientes: uno en la subunidad  $\gamma$ , hacia el periplasma, que oxida quinol, y otro en la subunidad  $\alpha$ , hacia el citoplasma, que reduce nitrato. No hay evidencias sobre el papel que desempeña la subunidad  $\beta$  en el transporte de e<sup>-</sup> entre  $\alpha$  y  $\gamma$ , y quizás tenga un papel únicamente estructural.

Para que el nitrato pueda ser reducido debe, en primer lugar, atravesar la membrana plasmática y después interaccionar con la subunidad catalítica ( $\alpha$ ) del complejo nitrato reductasa. El nitrito que se forma durante la respiración del nitrato se excreta rápidamente al medio y sólo cuando se consume todo el nitrato se toma de nuevo el nitrito y se reduce a amonio (Cole, 1978). Con estas premisas de partida y con la evidencia de que mutantes en el gen *narK* no acumulan nitrito, aunque tienen igual actividad nitrato reductasa que la cepa parental, Noji *et al.* (1989) caracterizaron el gen *narK*. De la secuencia de este gen, concluyeron que la proteína NarK es una proteína transmembrana de 49 kDa que puede adquirir una configuración de canal, por lo que sugirieron que podría estar implicada en el transporte de nitrato, de tipo facilitado más que activo, acoplado a un antiporte de nitrito. Posteriormente, DeMoss y Hsu (1991) han concluido que aunque NarK puede catalizar el transporte de nitrato, no es indispensable para el mismo. Esto se explica porque a concentraciones menores de 10 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> las tasas iniciales de formación de nitrito

fueron significativamente menores en una mutante *narK* que en la cepa parental, lo que sugiere que *narK* codifica un sistema de transporte de  $\text{NO}_3^-$  de alta afinidad, el cual incrementa la incorporación de  $\text{NO}_3^-$  cuando está en baja concentración (DeMoss y Hsu, 1991).

#### 4.2. Genética del enzima nitrato reductasa respiratorio.

Desde los primeros trabajos de Pichinoty y Piéchaud (1968) en los que describen que el enzima nitrato reductasa respiratorio puede usar clorato como sustrato, este compuesto se ha utilizado para la obtención de mutantes (llamadas *chl*) deficientes en actividad NR. Este método se basa en que la reducción del clorato ( $\text{ClO}_3^-$ ) por el enzima nitrato reductasa da como producto clorito ( $\text{ClO}_2^-$ ), el cual es tóxico para las células. Por tanto, sólo aquellas cepas deficientes en actividad nitrato reductasa serán capaces de crecer en un medio con clorato. Aunque esta técnica de mutagénesis ha dado lugar a una amplia colección de mutantes: *chlA*, *chlB*, *chlC*, *chlE*, *chlG*, *chlM* y *chlN* (ver revisión de Stewart, 1988), todos los mutantes, a excepción de *chlC*, son deficientes en el metabolismo del molibdeno, bien en la síntesis del cofactor (*chlA*), en la incorporación del cofactor al apoenzima (*chlB*), en el transporte de Mo (*chlD*), en la actividad del cofactor (*chlG*), etc.

Sólo el 2% de las mutantes *chl* son *chlC* y es en este locus donde se encuentran los genes estructurales del enzima nitrato reductasa (Guest, 1969; Puig *et al.* 1969). En este locus se localizaron posteriormente los genes *narI* (Bonney-Orth *et al.* 1981), *narG* y *narK* (Stewart y MacGregor, 1982), *narH* (Edwards *et al.* 1983), *narL* y *narX* (Stewart y Parales, 1988). Todos estos genes ocupan una región del cromosoma de, aproximadamente, 12 kb. Los genes *narG*, H, J e I se organizan en un solo operón y en este orden, ocupando, aproximadamente, 6 kb. El gen *narK* se transcribe en la misma dirección que *narGHJI*, y tiene un tamaño aproximado de 1.5 kb. Los genes *narX* y *narL* se transcriben conjuntamente y en dirección opuesta a todos los anteriores. *narX* codifica para una proteína de 66 kDa, cuya secuencia muestra homología con proteín-quinasa (Nohno *et al.* 1989) y *narL* codifica para una proteína de 28 kDa, que es un regulador positivo de la

expresión de los operones *narGHJI* y *fdnGHI* (formato deshidrogenasa-N) al mismo tiempo que represor del operón *frdABCD* (fumarato reductasa) (Stewart y Parales, 1988).

Recientemente, se ha identificado un gen (*narQ*) cuyo producto muestra un tamaño similar al de *narX*, igual hidrofobicidad y secuencia, en la que hay residuos de histidina altamente conservados que son comunes a las proteínas sensores-transmisores (Chiang *et al.* 1992).

Delante del gen *narK*, y entre este y el operón *narGHJI* se encuentra una secuencia típica para unión de Fnr ("caja de anaerobiosis"), así como una secuencia a la que podría unirse la proteína NarL (Li y DeMoss, 1987). Esta última secuencia podría ser un elemento para la inducción por nitrato en *cis* y se le ha denominado "caja de nitrato" (Noji *et al.* 1989). Por otra parte, entre *narK* y *narG* se ha identificado un terminador, lo que sugiere que el operón *narGHJI* se transcribe independientemente del gen *narK*.

#### **4.3. Regulación del enzima nitrato reductasa respiratorio.**

La expresión de actividad nitrato reductasa está controlada por la presencia de oxígeno y de nitrato. El nitrato induce la síntesis de nitrato reductasa sólo en condiciones anaeróbicas. La presencia de oxígeno causa la inhibición reversible del enzima que vuelve a ser activo cuando se restauran las condiciones anaeróbicas (Pichinoty y D'Ornano, 1961). Por tanto, la síntesis de nitrato reductasa está sometida a un control doble: la inducción por nitrato y la inhibición por oxígeno.

La inhibición por oxígeno tiene un primer nivel de actuación en el transporte de nitrato. Hernández y Rowe (1987) y Noji y Taniguchi (1987) demostraron que el transporte de nitrato sólo ocurría en condiciones anaeróbicas, de manera que este podría ser el principal mecanismo de regulación de la desnitrificación. Además, sugirieron que, en *E. coli*, la inhibición de la actividad nitrato reductasa sería un mecanismo de exclusión del inductor, ya que la ausencia de nitrato en el interior celular impediría la inducción.

Posteriormente, se ha visto que este es un mecanismo general regulador en la respiración del nitrato (Hernández y Rowe, 1988).

Delante del gen *narK* y del operón *narGHJI* hay una caja Fnr, al igual que ocurre en los genes de la desnitrificación, de manera que el oxígeno no sólo es un inhibidor de la actividad nitrato reductasa, sino también de la transcripción de estos genes. La proteína Fnr es un activador positivo de la transcripción de numerosos genes que codifican para proteínas anaeróbicas como nitrato reductasa, formato deshidrogenasa-N, fumarato reductasa, enzimas de la desnitrificación, etc. (Egan y Stewart, 1991). En *E. coli* se ha demostrado que los mecanismos de control de oxígeno y de nitrato están separados, y que el efecto del oxígeno es dominante (Stewart, 1988). Una vez que se han establecido las condiciones anaeróbicas y Fnr se ha unido a sus secuencias consenso (como se ha indicado para la desnitrificación), entra en funcionamiento un segundo nivel de regulación, basado en un sistema regulador de dos componentes, implicando un sensor y un regulador.

En *E. coli* se ha demostrado la presencia de dos proteínas sensores para la presencia de nitrato, NarX y NarQ. Estas dos proteínas de membrana se activan en presencia de nitrato se activan y fosforilan a NarL, la cual, a su vez, se une a secuencias específicas de ADN para activar la transcripción de los genes relacionados con el metabolismo anaeróbico y para reprimir la transcripción de los genes de la fumarato reductasa y aquellos otros relacionados con la fermentación (Chiang *et al.* 1992). Este patrón de regulación génica permite a la célula utilizar preferentemente el sustrato respiratorio del cual obtiene más energía (Cotter y Gunsalus, 1992). La transcripción simultánea de *narGHJI* y *fdnGHI* ocurre debido a que las proteínas que codifican, constituyen una cadena de respiración anaeróbica que acopla la oxidación de formato a la reducción de nitrato (Egan y Stewart, 1991). La transcripción de *narK* supone la presencia de nitrato en el interior celular para que pueda ser reducido por el enzima nitrato reductasa.

La presencia de dos proteínas sensores, NarX y NarQ, capaces de activar independientemente a NarL implicaría la existencia de un sistema redundante de sensores. Se ha comprobado, sin embargo, que NarX-NarL intervienen, de alguna manera, en el

metabolismo del molibdeno (Iuchi y Lin, 1987), función todavía no descrita para NarQ-NarL.

### **5. Actividad nitrato reductasa en *Bradyrhizobium*.**

Los estudios sobre el metabolismo del nitrato en los rizobios, tanto en vida libre como en simbiosis, se remontan a 1938 cuando Rajagopalan demostró la capacidad de los nódulos de las leguminosas para desnitrificar. Posteriormente, Evans (1954) demostró la presencia de un sistema activo de reducción de nitratos en nódulos de soja. Desde entonces, se ha prestado gran interés al metabolismo del nitrato en las bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, tanto por sus implicaciones en la nodulación y fijación de N<sub>2</sub> como por la capacidad de las mismas para eliminar el N fijado y por el interés que suponen los estudios comparativos, a nivel fisiológico, bioquímico, genético, etc., entre células en vida libre y en simbiosis.

Los primeros estudios relativos a la caracterización de la actividad nitrato reductasa en células en vida libre y en bacteroides de rizobios se deben a Cheniae y Evans (1960) y a Lowe y Evans (1964). Posteriormente, Kennedy *et al.* (1975) demostraron la existencia de actividad nitrato reductasa tanto en la fracción soluble como en la particulada de bacteroides de *B. japonicum* y además, indicaron que el enzima soluble tenía un tamaño molecular, estimado por filtración en Sephadex G-150, de 70 kDa. El enzima fue incapaz de utilizar NADPH, NADH o FAD como donadores de electrones y el ditionito inhibió su actividad, inactivación que pudo prevenirse con metil viológeno. Aunque el enzima nitrato reductasa asociado a las membranas de los bacteroides presentó unas constantes cinéticas diferentes a las del enzima NR soluble, dado que ambos enzimas presentaron igual sensibilidad al ditionito y el metil viológeno previno la inactivación del enzima, (Kennedy *et al.* 1975) concluyeron que los enzimas nitrato reductasa soluble y particulado de bacteroides eran el mismo.

En ese mismo estudio (Kennedy *et al.* 1975), el enzima nitrato reductasa del citosol de células de *B. japonicum* cultivadas aeróbicamente con glutamato presentó un tamaño

molecular de 70 kDa, al igual que los bacteroides. Además, el comportamiento del enzima de las células cultivadas aeróbicamente con glutamato, respecto a donadores de electrones y sensibilidad al ditionito, fue similar al del enzima de los bacteroides, por lo que se sugirió que se trataba de la misma proteína (Kennedy *et al.* 1975).

Posteriormente, Daniel y Gray (1976) estimaron el tamaño molecular de la nitrato reductasa del citosol de bacteroides de *B. japonicum* en 69 kDa, lo que coincidió con las observaciones previas de Kennedy *et al.* (1975). En este mismo trabajo, Daniel y Gray (1976) determinaron el tamaño molecular de la nitrato reductasa soluble de células cultivadas microaeróbicamente con nitrato en 69 kDa, similar al de los bacteroides. Sin embargo, en el citosol de células cultivadas aeróbicamente con nitrato se identificó un enzima nitrato reductasa de 170 kDa. Teniendo en cuenta los trabajos de Lowe y Evans (1964) y de Kennedy *et al.* (1975) se sugirió que en *B. japonicum* los enzimas nitrato reductasa solubles de bacteroides y de células cultivadas aeróbica o microaeróbicamente eran idénticos, y que las diferencias entre ellos en tamaño molecular, sensibilidad al oxígeno e inhibición por cianuro serían debidas a una interacción diferente entre sus subunidades (Daniel y Gray, 1976).

Recientemente se ha realizado el primer estudio sobre el enzima nitrato reductasa asociado a las membranas de *B. japonicum* (Delgado *et al.* 1992). El tamaño molecular, estimado por filtración en Sephacryl S-200, del enzima en células cultivadas aeróbicamente con glutamato fue de 78 kDa. Sin embargo, cuando las células se cultivaron con nitrato, aeróbica o microaeróbicamente y, cuando después de crecidas en glutamato, se incubaron en condiciones de microaerobiosis, con o sin nitrato, el tamaño molecular estimado fue de 236 kDa (Delgado *et al.* 1992). Basándose en las diferencias en tamaño molecular entre los enzimas procedentes de membranas de células cultivadas con glutamato y las procedentes del resto de tratamientos, así como la distinta afinidad de los mismos por el nitrato y la sensibilidad a varios inhibidores, se ha sugerido que el enzima de las células crecidas con glutamato es diferente a todos los demás y que puede no ser funcional en condiciones fisiológicas (Delgado *et al.* 1992).

Daniel y Gray (1976) fueron los primeros en demostrar que el oxígeno controla la actividad nitrato reductasa en células cultivadas de *B. japonicum*, ya que dicha actividad aumentaba en microaerobiosis. Posteriormente, se comprobó que el papel del oxígeno era primordial para la síntesis y actividad del sistema de reducción de nitrato y que la inducción de los enzimas implicados en el proceso estaba controlada por el nivel de oxígeno y no por el de nitrato (O'Hara *et al.* 1983). Sin embargo, posteriores estudios han demostrado que aunque la exclusión de oxígeno puede inducir actividad nitrato reductasa, los máximos valores de dicha actividad sólo se alcanzan en microaerobiosis y cuando el nitrato está presente en el medio (Vairinhos *et al.* 1989; Delgado *et al.* 1992). Además, en *B. japonicum* la presencia de oxígeno inhibe el transporte de nitrato al interior celular, al igual que ocurre en otros microorganismos con capacidad de desnitrificar (Hernández y Rowe, 1988).

Aunque tanto las células en vida libre como los bacteroides pueden llevar a cabo la desnitrificación del nitrato (O'Hara y Daniel, 1985; Vairinhos *et al.* 1989; Arrese-Igor, 1990; Delgado *et al.* 1991), no existen referencias bibliográficas sobre los enzimas que intervienen en el proceso de desnitrificación por las cepas de la familia *Rhizobiaceae*. En general, las bacterias del género *Bradyrhizobium* tienen mayor capacidad de desnitrificar que los rizobios de rápido crecimiento, con la excepción de *R. meliloti* (Daniel *et al.* 1982; Arrese-Igor y Aparicio-Tejo, 1992). Aunque se ha indicado que la disminución en la tensión de oxígeno es el principal factor responsable de la síntesis de los enzimas implicados en el proceso de desnitrificación (O'Hara *et al.* 1983), ambas circunstancias, ausencia de oxígeno y presencia de nitrato, son necesarias para la expresión óptima de la actividad desnitrificante (van Berkum y Keyser, 1985; Smith y Smith, 1986). De hecho, Vairinhos *et al.* (1989) han establecido que la desnitrificación es dependiente de la presencia de nitrato y en bacteroides de *R. meliloti* dicha actividad es dependiente exponencialmente de la concentración de nitrato (Arrese-Igor y Aparicio-Tejo, 1992).

En los últimos años se ha prestado atención a la desnitrificación en bacteroides de rizobios ya que:

a) Es un proceso capaz de generar energía mediante la traslocación de  $H^+$ , en las membranas, durante la desnitrificación del nitrato, tanto en bacteroides de *B. japonicum* como en vida libre (Bhandari *et al.* 1984).

b) La capacidad de desnitrificación puede permitir a los bacteroides sobrevivir durante periodos de anoxia producidos por sequía o encharcamiento (Zablotowicz y Foch, 1979).

c) Permite eliminar el nitrito y los óxidos de nitrógeno producidos, todos ellos muy tóxicos para la planta, ya que pueden inhibir la actividad nitrogenasa e inactivar funcionalmente a la leghemoglobina (O'Hara y Daniel, 1985; Arrese-Igor y Aparicio-Tejo, 1992).

Desde un punto de vista aplicado, se ha especulado con que la actividad desnitrificante de los rizobios puede significar una importante pérdida de nitrato en los suelos (Daniel *et al.* 1980). Sin embargo, las tasas de desnitrificación son relativamente bajas comparadas con otros organismos desnitrificadores (Smith y Smith, 1986), y el número de rizobios es relativamente bajo comparado con estos últimos (Gamble *et al.* 1977). Por otra parte, el empleo de cepas de *B. japonicum* como inóculo no aumenta la pérdida de N disponible para la planta ni contrarresta las posibles ventajas que les puede proporcionar dicha capacidad desnitrificante tanto en vida libre como en simbiosis (Breitenbeck y Bremner, 1989).

En la familia *Rhizobiaceae* la utilización de mutantes deficientes en actividad nitrato reductasa no se ha dirigido, en ningún caso, a estudios genéticos sobre los enzimas implicados en la utilización de nitrato, sino que estuvieron motivados por las implicaciones de dicha actividad en la fisiología de la simbiosis. Así, la obtención mediante tratamiento con nitrosoguanidina de mutantes de *R. meliloti* carentes de actividad nitrato reductasa que eran incapaces, a su vez, de fijar  $N_2$  en simbiosis, llevó a Kondorosi *et al.* (1973) a proponer que la nitrato reductasa y la nitrogenasa tenían en común la subunidad a la que se unía el cofactor de molibdeno. Pagan *et al.* (1977) y Gibson y Pagan (1977) emplearon mutantes de *Bradyrhizobium* sp., incapaces de utilizar nitrato mediante selección por resistencia al clorato, para demostrar que el nitrito, producto de la reducción del nitrato, no era el responsable de la inhibición de la fijación de  $N_2$  por nitrato, ya que la actividad

nitrogenasa disminuía tanto cuando las plantas se inoculaban con la cepa parental como con las mutantes.

El uso de mutantes deficientes en actividad nitrato reductasa, obtenidas mediante resistencia al clorato (de Vasconcelos *et al.* 1980) o por inserción de transposones (Howitt *et al.* 1988; Maier y Graham, 1990) han permitido demostrar que la actividad nitrato reductasa no puede utilizarse como parámetro para determinar la capacidad de fijar  $N_2$  y que no existe relación entre la actividad nitrato reductasa y nitrogenasa, a pesar de que algunas mutantes puedan expresar mayor capacidad de fijar  $N_2$  que la cepa parental (Manhart y Wong, 1979; de Vasconcelos *et al.* 1980; Maier y Graham, 1990).

## **OBJETIVOS DEL TRABAJO**

*Bradyrhizobium japonicum* es un microorganismo bien conocido por su capacidad para infectar las células radicales de algunas especies de leguminosas y dar lugar a simbiosis fijadoras de dinitrógeno atmosférico. En vida libre, esto es, fuera del estado simbiótico, esos microorganismos, como otras muchas bacterias, hongos y virtualmente todas las algas y plantas superiores utilizan nitrato, la fuente más abundante de N inorgánico en el suelo, para su nutrición.

*B. japonicum* es muy versátil en cuanto a la utilización de nitrato ya que, en aerobiosis, puede asimilarlo e incorporarlo a los componentes nitrogenados celulares y, además, en ausencia de oxígeno, puede emplear nitrato como aceptor final de electrones de la cadena respiratoria reduciéndolo hasta la formación de óxidos de nitrógeno e incluso nitrógeno molecular. Este último proceso, la desnitrificación de nitrato, representa una forma alternativa de generación de energía (ATP) y su existencia se ha demostrado tanto en células en vida libre como en bacteroides de *B. japonicum*.

Sin embargo, los conocimientos sobre los enzimas que intervienen en este proceso son, prácticamente nulos. Baste decir que no existe información sobre el enzima nitrato reductasa responsable de la respiración del nitrato, proceso que abre la ruta metabólica de utilización de nitrato en condiciones microaeróbicas, y que, por tanto, se desconocen los mecanismos implicados en la síntesis y regulación de dicho enzima.

Por el interés de la reducción respiratoria del nitrato en si mismo, y porque la utilización microaeróbica de este ión por células en vida libre podría utilizarse como modelo para estudiar el metabolismo del nitrato en bacteroides que, no hay que olvidar, se encuentran en un ambiente donde la presión parcial de oxígeno es del orden de 10 nM, en el presente trabajo de investigación se establecieron los siguientes objetivos:

1. Identificación de enzimas con actividad nitrato reductasa en las membranas de *Bradyrhizobium japonicum*.
2. Obtención de mutantes deficientes en la utilización microaeróbica del nitrato.
3. Estudios sobre la regulación fisiológica de los enzimas nitrato reductasa y posible aislamiento, purificación y caracterización de tales enzimas.

## **MATERIAL Y METODOS**

## 1. Material biológico.

### 1.1. Bacterias.

El microorganismo utilizado en este trabajo ha sido *Bradyrhizobium japonicum* PJ17. Esta cepa es un resistente espontáneo a estreptomicina y kanamicina, derivada de *B. japonicum* USDA 122DES (Lepo *et al.* 1981).

En los experimentos de mutagénesis se utilizó como cepa donadora *Escherichia coli* S17-1. Esta cepa es portadora el plásmido pJQ18, construido a partir del plásmido suicida pSUP5011 cambiando el marcador de resistencia a kanamicina por el de tetraciclina (Hynes *et al.* 1989).

### 1.2. Material vegetal.

Se ha utilizado la variedad Williams de *Glycine max* L. (Merr.). Las semillas de soja fueron amablemente suministradas por los Drs. R. Orive y F. Temprano, C.I.D.A. Las Torres y Tomejil, Alcalá del Río, Sevilla.

## 2. Reactivos y productos.

- Agar: Difco.
- Acrilamida: Sigma.
- Antibióticos: Sigma y Boehringer.
- Bisacrilamida: Boehringer.
- Dietil-amino-etil-celulosa (DEAE-celulosa): Schleicher y Schuell.
- Dodecil sulfato sódico (SDS): Boehringer.
- Etilén-diamino-tetraacetato sódico (EDTA): Sigma.
- Extracto de levadura: Oxoid.
- Proteínas patrón para determinación de tamaño molecular mediante electroforesis: Pharmacia.

- Proteínas patrón preteñidas para determinación de tamaño molecular mediante electroforesis: Sigma.
- Sephacryl tipo S-200: Pharmacia.
- Sepharosa tipo Q HiLo, FF: Pharmacia.
- Tris(hidroximetil)amino-metano (Tris): Sigma.
- El resto de reactivos y productos empleados en este trabajo han sido de grado analítico y de las marcas Fluka, Merck, Panreac, Probus, Serva y Sigma, con predominancia de esta última.

### **3. Aparatos.**

Los aparatos empleados en la realización de esta tesis han sido de las marcas y modelos siguientes:

- Agitador de tubos Selecta Reax 2000.
- Agitador magnético SBS A-06.
- Aplicador de muestra SA-5 Pharmacia.
- Arcones congeladores Koxka AC-85200 (-70°C) y Zanussi (-20°C).
- Autoclave vertical Herman.
- Balanza AND FX-320.
- Balanza de precisión Mettler AE-260.
- Baños de incubación Tecam y Unitronic 320.
- Bomba de pecera Sirocco D-2.
- Bomba de vacío Millipore XX5522050.
- Bombas peristálticas P1 (Pharmacia) y Masterflex.
- Bomba peristáltica de gran volumen Masterflex 7529-20.
- Centrífuga de sobremesa Beckman GPR.
- Centrífuga refrigerada Sorvall RC5C con rotores GSA y SS34.
- Colector de fracciones RediFrac (Pharmacia).
- Columna de vidrio C26/100 y adaptadores (Pharmacia).
- Columna preempaquetada HiLo de Q-Sepharosa (Pharmacia).
- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 con detector de conductividad térmica.

- Cromatógrafo de gases Perkin-Elmer F33 con detector de ionización de llama.
- Cubeta de electroforesis LKB 2050.
- Cubeta de electroforesis Mini-protean II (Bio-Rad).
- Densitómetro Shimadzu CS-9000.
- Equipo de electroelución Bio-Rad 422.
- Equipo de filtración tangencial (Centrasette 5, Filtron).
- Espectrofotómetro Shimadzu UV-160.
- Estufa Selecta Digitronic.
- Fuente de electroforesis LKB 2197.
- Fuente de electroforesis Bio-Rad 1000/500.
- Horno de esterilización Tarma.
- Incubador orbital Gallenkamp.
- Mezclador de gradiente 2117 (Farmacia).
- Microcentrífuga Heraeus Biofuge A.
- Nevera Cointra (4°C).
- pH-metro Crison micropH 2000.
- Registradores LKB 6520-4.
- Reservorio de empaquetamiento RC26 (Farmacia).
- Sonicador Braun-Biotech Labsonic 2000.
- Termostato LKB 2219.
- Transiluminador TF-45 WL.
- Ultracentrífuga Beckman Optima con rotores 60Ti y SW65Ti.
- Ultracentrífuga de sobremesa Beckman TL-100 con rotor TLA-100.
- Uvicord LKB 8300.
- Válvula de 4 vías LV-4 (Farmacia).

## 4. Medios de cultivo.

### 4.1. Medios.

Como medio completo para el crecimiento de *Bradyrhizobium japonicum* se utilizó el medio YEM (Vincent, 1970).

Manitol	.....	5.0 g
Extracto de levadura	.....	1.0 g
NaCl	.....	0.1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	.....	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	.....	0.2 g
Agua (desionizada)	.....	1000 ml
Agar (para medio sólido)	.....	15 g

Como medio definido se ha empleado el medio LMB descrito por Lim y Shanmugan (1979):

#### Macroelementos

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	.....	0.3 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	.....	0.3 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	.....	0.1 g
CaCl <sub>2</sub>	.....	0.05 g
Manitol	.....	1.0 g
Extracto de levadura	.....	1.0 g

#### Microelementos

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	.....	0.01 g
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	.....	0.001 g
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	.....	0.0005 g
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	.....	0.0005 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	.....	0.0001 g
FeCl <sub>3</sub>	.....	0.0001 g
Biotina	.....	0.0002 g
Agua (desionizada)	.....	1000 ml
Agar purificado (medio sólido)	.....	15 g

Todos los medios se prepararon ajustando el pH a 6.8-7.2 y se esterilizaron en autoclave a 115°C durante 30 min.

Para el empleo del medio LMB en la obtención de grandes volúmenes de cultivo se sustituyó el extracto de levadura por glutamato monosódico (10 mM). Cuando se utilizó como medio selectivo, según se indica en el texto, el extracto de levadura se sustituyó por KNO<sub>3</sub> (10 mM), NH<sub>4</sub>Cl (10 mM), NaNO<sub>2</sub> (1 mM) o hipoxantina (7.5 mM).

Los cultivos de *Escherichia coli* se realizaron en el medio completo de Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972).

Triptona	.....	10 g
Extracto de levadura	.....	5 g
NaCl	.....	5 g
Agua (desionizada)	.....	1000 ml
Agar (medio sólido)	.....	15 g

El medio se esterilizó de manera habitual a 115°C durante 30 min.

#### 4.2. Antibióticos.

Los antibióticos que se emplearon, esterilizados mediante filtración a través de filtro Millipore de 0.45 µm de tamaño de poro, se adicionaron a los medios respectivos de *B. japonicum* a las concentraciones finales siguientes: estreptomycin (Sm) 220 mg/l, kanamicina (Km) 100 mg/l, tetraciclina (Tc) 50 mg/l y cloranfenicol (Cm) 100 mg/l. Para *E. coli*, los antibióticos y las concentraciones finales en el medio fueron: ampicilina (Ap) 200 mg/l, cloranfenicol (Cm) 100 mg/l y tetraciclina (Tc) 10 mg/l. Todos los antibióticos se prepararon en soluciones concentradas en agua desionizada estéril, excepto la Tc que se preparó en etanol al 50% (v/v) para *E. coli* o etanol al 100% (v/v) para *B. japonicum*, y el Cm que se preparó, en ambos casos, en etanol al 50% (v/v).

## 5. Crecimiento de plantas en condiciones bacteriológicamente controladas.

### 5.1. Esterilización de semillas y germinación.

Las semillas de soja se esterilizaron en superficie mediante inmersión en etanol al 96% (v/v) durante 3 min. Después de lavar 5-6 veces con agua estéril, se dejaron en imbibición durante 2-3 h. Posteriormente, las semillas se colocaron asépticamente en placas Petri que contenían papel de filtro humedecido con 2.5 ml de agua estéril y, finalmente, se germinaron en oscuridad a 28°C durante 48 h.

### 5.2. Solución nutritiva para el cultivo de plantas.

Para el cultivo de soja se ha utilizado la solución mineral descrita por Rigaud y Puppo (1975), cuya composición es la siguiente:

#### Macroelementos

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	.....	0.2	g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	.....	0.2	g
KCl	.....	0.2	g
$\text{CaSO}_4$	.....	0.12	g
EDTA férrico (Secuestrene)	.....	0.025	g
Agua	.....	1000	ml

#### Microelementos

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	.....	4	mg
$\text{H}_3\text{BO}_3$	.....	1.86	mg
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	.....	2.23	mg
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	.....	2.90	mg
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	.....	2.40	mg

### 5.3. Cultivo de plantas.

Una vez germinadas, las plántulas de soja con un grado de desarrollo uniforme, aproximadamente 2.5 cm de radícula, se cultivaron en jarras Leonard (Leonard, 1943). De los dos componentes que forman este sistema, el superior se rellenó con vermiculita lavada previamente con abundante agua y el inferior contenía la solución mineral de Rigaud y Puppo (1975). Las jarras así preparadas se esterilizaron en autoclave a 115°C durante 30 min. En cada jarra se sembraron dos plántulas que se inocularon en el momento de la siembra con 1 ml de una suspensión de la cepa adecuada de *B. japonicum*.

Posteriormente, las plántulas se cubrieron con una capa de perlita que previene la posible contaminación ambiental y refleja la luz incidente, evitando un excesivo calentamiento que pudiera impedir el adecuado desarrollo de las semillas pregerminadas. Las jarras se envolvieron con papel de confitero o de aluminio para evitar que la luz incidiera sobre las raíces.

Las jarras así preparadas se trasladaron a una cámara de crecimiento para plantas, mantenida en las siguientes condiciones: 500  $\mu$ Einstein/m<sup>2</sup> x s (400-700 nm) de intensidad luminosa, fotoperiodo de 16/8 h de luz/oscuridad, 25/18°C temperatura día/noche y 50% de humedad relativa.

Los inóculos de todas las cepas de *B. japonicum* se realizaron a partir de cultivos en medio YEM que fueron resuspendidos en agua estéril. La densidad final de cada inóculo fue, aproximadamente, de 10<sup>9</sup> células/ml.

## 6. Métodos genéticos y de biología molecular.

### 6.1. Mutagénesis de *Bradyrhizobium japonicum* PJ17, selección y caracterización de transconjugantes deficientes en la utilización de nitrato.

#### 6.1.1. Mutagénesis de *B. japonicum* PJ17.

La mutagénesis se llevó a cabo por transferencia, mediante conjugación, del plásmido autotransmisible pJQ18 desde la cepa donadora *E. coli* S17-1 a la receptora *B. japonicum* PJ17. Para ello, a partir de cultivos en fase logarítmica de la cepa donadora y en fase estacionaria de la receptora, ambas cepas, en proporción 1:1, se mezclaron en un tubo eppendorf; el tubo se centrifugó durante 1 min en una microfuga (10000 rpm) y el sedimento se resuspendió en 0.1-0.2 ml de medio YEM. La suspensión celular se utilizó para impregnar un filtro Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y 2.5 cm de diámetro, previamente depositado sobre medio YEM sólido. La placa Petri que contenía las células se incubó durante una noche a 28°C. Finalmente, las células se recogieron en 5 ml de medio YEM líquido suplementado con Tc, Km y Sm a las concentraciones adecuadas, y se cultivaron durante 8 h a 28°C en agitación.

#### 6.1.2. Selección de transconjugantes.

Realizada la mutagénesis y el enriquecimiento de los posibles transconjugantes, las células se recogieron, lavaron y resuspendieron en medio LMB con 10 mM de  $\text{KNO}_3$ , como única fuente de nitrógeno, adicionado de los antibióticos correspondientes, y se incubaron durante una noche a 28°C. Pasado este tiempo, se adicionó Ap al medio a una concentración final de 2 mg/ml, continuándose la incubación durante otras 8 h. Finalmente se recogió la mezcla y las células se sembraron, previa dilución, en medio selectivo LMB sólido con 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , como fuente de nitrógeno, adicionado de los antibióticos adecuados, y se incubaron a 28°C hasta la aparición de colonias de posibles clones transconjugantes ( $\approx$  20-30 d).

### 6.1.3. Caracterización de cepas de *Bradyrhizobium japonicum* PJ17 deficientes en la utilización de nitrato.

Las colonias que crecieron en el medio selectivo se picaron en medio YEM utilizando palillos de dientes estériles y se incubaron a 28°C. Las colonias que crecieron ( $\approx 7$  d) se picaron de nuevo en medio LMB con  $\text{KNO}_3$  y se incubaron tanto en condiciones aeróbicas como microaeróbicas durante, aproximadamente, 15 d y 30 d, respectivamente. Para el crecimiento en microaerobiosis, las placas Petri sembradas con los transconjugantes se colocaron en recipientes provistos de entrada y salida de gases y cierre hermético. La exclusión de  $\text{O}_2$  se consiguió haciendo pasar una corriente de  $\text{N}_2$  a través de los recipientes hasta observar el cambio de color azul a blanco de tiras indicadoras de anaerobiosis (sistema GasPak, BBL) dispuestas en el interior de los mismos.

Los transconjugantes incapaces de crecer en condiciones microaeróbicas se repicaron en placas Petri réplica que contenían medio YEM y se cultivaron, de nuevo, aeróbicamente en medio sólido LMB con  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , glutamato o hipoxantina como única fuente de nitrógeno. Después de estos procesos, se seleccionaron como mutantes deficientes en la utilización de nitrato aquellos transconjugantes incapaces de crecer microaeróbicamente con nitrato que fueran o no capaces de crecer en medio definido LMB con  $\text{KNO}_3$  y, simultáneamente, capaces de crecer en LMB con las otras fuentes de nitrógeno empleadas. Como paso posterior de caracterización se comprobó, en las cepas mutantes seleccionadas, el funcionamiento de la citocromo oxidasa terminal (citocromo  $\text{aa}_3$ ) de la cadena transportadora de electrones. Para ello, las mutantes se sembraron en medio YEM y, una vez crecidas, cada colonia se cubrió con una mezcla en proporción 1:1 de 1% de  $\alpha$ -naftol (p/v) en etanol y 1% de N,N,-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD) en agua (reactivo de Nadi) (O'Brian *et al.* 1987). En presencia de  $\text{O}_2$ , *B. japonicum* y otras bacterias (El Mokadem y Keister, 1982; Marrs y Gest, 1973) catalizan la formación de azul de indofenol, a partir de  $\alpha$ -naftol y DMPD, debido a la actividad de la citocromo oxidasa. Por tanto, se eliminaron aquellas cepas que no se colorearon de azul.

## 6.2. Aislamiento de ADN total de *Bradyrhizobium japonicum*.

El aislamiento de ADN total se efectuó según un método diseñado especialmente para (*Brady*)*rhizobium* desarrollado en el Departamento de Genética de la Universidad de Bielefeld (República Federal de Alemania).

La obtención de ADN se realizó a partir de 1.5 ml de un cultivo en fase logarítmica de cada cepa de *B. japonicum*. Las células se recogieron por centrifugación durante 2 min en una microfuga (10000 rpm), se lavaron con 500 µl de tampón TE (Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) adicionado de sarcosil al 0.1% y, finalmente, se resuspendieron en 1 ml de NaCl 1 M. Las células se incubaron en agitación 1 h a 4°C y posteriormente se centrifugaron durante 2 min, eliminándose el sobrenadante resultante. El sedimento se resuspendió hasta homogeneidad en 250 µl de tampón TE suplementado con sacarosa al 20%. A esta suspensión se adicionó 250 µl de TE con lisozima (5 mg/ml) y RNasa (1 mg/ml), se agitó en vórtex y se incubó durante 30 min a 37°C. Pasado este tiempo, se adicionaron de nuevo 100 µl de TE con sarcosil al 5% y pronasa (10 mg/ml) y se incubó 1 h a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 70 µl de acetato sódico 3 M, pH 5.2 y 200 µl de fenol/cloroformo\* seguidos de otros 200 µl de fenol. Esta mezcla de acetato sódico, fenol/cloroformo y fenol se agitó durante 2 min y se centrifugó durante 5 min. Posteriormente, la fase superior acuosa se recogió y después de adicionarle 300 µl de cloroformo se agitó y se centrifugó durante 5 min. La fase superior se recogió en un nuevo tubo y se mezcló con 700 µl de isopropanol enfriado a -20°C, dejándose después durante 5 min a -70°C. Posteriormente, se centrifugó durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 500 µl de etanol al 70% a -20°C; sin agitar se centrifugó de nuevo durante 5 min. Finalmente, después de eliminar el sobrenadante con cuidado, se secó al vacío y el ADN se resuspendió en 100 µl de agua bidestilada.

\*La mezcla fenol/cloroformo se preparó en proporción 1:1 a partir de: a) fenol al 100% (p/v) en Tris/HCl 0.1 M, pH 8, adicionado de 8-hidroxiquinoleína al 0.1% (p/v). b) alcohol isoamílico:cloroformo (1:24, v/v).

### 6.3. Minipreparación del plásmido pJQ18.

El aislamiento rápido y en pequeña escala del plásmido pJQ18 se llevó a cabo según el método de Ish-Horowicz y Burke (1981) descrito en el manual de Sambrook *et al.* (1989), específico para plásmidos de  $M_r \leq 60$  kb. Para ello, células de *E. coli* S17-1 se cultivaron en medio líquido LB, adicionado de los correspondientes antibióticos, hasta principio de la fase estacionaria. De este cultivo se tomaron 1.5 ml y se centrifugaron en una microfuga (10000 rpm) durante 1 min. Después de retirar el sobrenadante cuidadosamente, las células se resuspendieron en 100  $\mu$ l de la solución I (glucosa 50 mM, Tris/HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8, lisozima 4 mg/ml) y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución anterior se suplementó con 200  $\mu$ l de la solución II (NaOH 200 mM, SDS 1%), se mezclaron por inversión rápida 3-4 veces y la solución resultante se incubó en hielo durante 5 min. Después se adicionaron 150  $\mu$ l de acetato potásico 5 M, pH 4.8, previamente enfriado a 4°C, y el tubo en posición invertida se agitó durante 10 s, incubándose de nuevo en hielo durante 5 min. Posteriormente, la suspensión se centrifugó durante 5 min, se recogió el sobrenadante y, en un nuevo tubo, se mezcló con 1 volumen de fenol/cloroformo para extraer el ADN. La fase superior acuosa, conteniendo el ADN, se pasó a un nuevo tubo y se mezcló, por inversión, con 2.5 volúmenes de etanol del 100% (v/v) enfriado a -20°C, incubándose a -70°C durante 15 min. Pasado este tiempo, la mezcla se centrifugó durante 15 min, y el precipitado resultante se lavó con etanol del 70% (v/v) enfriado a -20°C, se desecó al vacío y se resuspendió, finalmente, en 50  $\mu$ l de tampón TE.

### 6.4. Digestión total de ADN.

La digestión del ADN, tanto del plásmido pJQ18 como del cromosoma de cada cepa de *B. japonicum*, se realizó mediante el empleo de enzimas de restricción. Los tampones y temperaturas utilizadas fueron los recomendados por los fabricantes (Boehringer). Se utilizó, aproximadamente, 1  $\mu$ g ADN en un volumen final de 20  $\mu$ l de mezcla de reacción. El ADN total de cada cepa de *B. japonicum* se cortó siempre con el

enzima *Eco* RI, mientras que el ADN plasmídico se cortó bien con *Eco* RI para linearizar el plásmido pJQ18 o bien con *Hpa* I para aislar el inserto de Tn5.

### **6.5. Separación de fragmentos de restricción.**

La separación de los fragmentos de ADN, procedentes del plásmido pJQ18 o del cromosoma de las cepas de *B. japonicum* utilizadas, se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.7% en tampón TBE (Tris 89 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 2.5 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 89 mM, pH 8.2). Las muestras de ADN (5 µl) se mezclaron con 2 µl de solución de carga (urea 4 M, sacarosa 50%, EDTA 50 mM, pH 7.0 y azul de bromofenol 0.1%), y se sometieron a electroforesis. El desarrollo de las muestras se realizó con el gel sumergido en tampón TBE durante 2-3 h a 100 V de diferencia de potencial eléctrico.

### **6.6. Revelado de geles y fotografía.**

Los geles de agarosa se revelaron sumergiéndolos, durante 20-30 min, en agua a la que se adicionaron unas gotas de una solución de bromuro de etidio (1 mg/ml) y observándolos en un transiluminador de luz ultravioleta (260 nm).

La fotografía de los geles se realizó con una cámara Nikon FE2 y película Tri-X pan de 400 ASA con luz ultravioleta como fondo.

### **6.7. Transferencia de ADN a filtros de nitrocelulosa.**

Después de su separación en geles de agarosa, la transferencia de los fragmentos de restricción del ADN total de cada cepa de *B. japonicum* o del plásmido pJQ18 linearizado a filtros de nitrocelulosa se realizó según el método descrito por Southern (1975). Antes de su transferencia el ADN se sometió a depurinación ácida por inmersión del gel en una solución de HCl 0.25 M, 2 veces durante 10 min cada vez. Posteriormente, el ADN se desnaturalizó mediante inmersión del gel en una solución compuesta por NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M dos veces consecutivas de 15 min cada una. Finalmente, el ADN se

neutralizó mediante inmersión en una solución formada por Tris/HCl 0.5 M, NaCl 3 M, pH 7.0 durante 20 min y, antes de pasar a la siguiente etapa, el gel se lavó con agua destilada.

Para realizar la transferencia, el gel se colocó sobre un papel Whatman 3MM humedecido en tampón SSC 20 veces concentrado (20 x SSC; 1 x SSC: NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM, pH 7.0) dispuesto sobre una superficie regular y horizontal. El gel se cubrió con un filtro de nitrocelulosa y 2 piezas de papel Whatman 3MM del mismo tamaño previamente saturadas mediante inmersión en tampón 20 x SSC durante 30 min. Sobre todo el sistema se colocó papel secante y sobre éste un peso de aproximadamente 1 kg. Durante la transferencia, el papel secante se puede sustituir cuando se haya humedecido o bien se puede poner nuevo papel encima del ya humedecido. El primer papel Whatman 3MM se conectó a un reservorio de tampón 20 x SSC para permitir un flujo continuo de tampón a través de todo el sistema durante el tiempo necesario para realizar la transferencia del ADN, que se estimó en 14 h.

Pasado este tiempo, se comprobó que todo el ADN se había transferido al filtro de nitrocelulosa mediante la visualización del gel. Posteriormente, el filtro se lavó dos veces con 6 x SSC para eliminar los restos de agarosa, se secó a temperatura ambiente y se coció al vacío durante 2 h a 80°C.

## **6.8. Recuperación de ADN de geles de agarosa.**

Para aislar el fragmento de ADN correspondiente al transposón Tn5 del plásmido pJQ18, después de la restricción con *Hpa* I y la electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos de restricción se visualizaron y se identificó el correspondiente al Tn5 por su tamaño (5.6 kb). Para recuperar el transposón se practicó un corte en el gel, en el sentido de la migración de la electroforesis, justo delante del fragmento y se introdujo una membrana de DEAE-celulosa ocupando todo lo ancho de la banda de migración y cuyo grosor fue ligeramente superior al del gel. Posteriormente, el gel se sometió de nuevo a

electroforesis y cuando se comprobó que el ADN estaba adherido a la membrana, se cortó la corriente eléctrica. Una vez que se retiró del gel, la membrana se introdujo en un tubo eppendorf con la parte del ADN hacia la luz del tubo, se adicionaron 300  $\mu$ l de tampón de elución (Tris/HCl 20 mM, NaCl 1.5 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5) y se incubó un tiempo mínimo de 1 h a 68°C, agitando de vez en cuando manualmente. Después de comprobar que no quedaba ADN en la membrana, ésta se retiró y se adicionaron al tubo 750  $\mu$ l de etanol absoluto, dejando precipitar el ADN un mínimo de 5 h a -20°C. Transcurrido este tiempo, la mezcla se centrifugó durante 15 min, se descartó con cuidado el sobrenadante y el sedimento se lavó con etanol al 70% preenfriado a -20°C. Finalmente el ADN se secó al vacío y se resuspendió en el volumen adecuado de TE (pH 7.6) para su posterior marcaje con dioxigenina.

### **6.9. Marcaje de sondas de ADN para hibridación.**

El ADN digerido o de fragmentos aislados de geles de agarosa se marcó según la técnica no radioactiva comercializada por Boehringer (Mannheim, R.F. de Alemania). Esta técnica consiste, en esencia, en la síntesis parcial de ADN a partir del ADN molde que se quiere usar como sonda. Para ello se utiliza una mezcla de hexanucleótidos como cebador, ADN-polimerasa I (fragmento "Klenow") y la incorporación de dioxigenina-dUTP como nucleótido marcado. La presencia de este nucleótido sintético en el ADN se puede detectar mediante una reacción inmunológica específica.

### **6.10. Hibridación ADN-ADN.**

La hibridación ADN-ADN se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante de los reactivos de hibridación (Boehringer). Para ello, el filtro de nitrocelulosa, al que se ha transferido el ADN que se quiere detectar, se introdujo en una bolsa de plástico y se le adicionó la solución de prehibridación: 5 x SSC, "reactivo de bloqueo" al 5% (p/v), sarcosil al 0.1% (p/v), SDS al 0.02% (p/v) y formamida al 50% (v/v), incubándose un mínimo de 1 h a 42°C. Después, esta solución se sustituyó por la solución de hibridación, que es la misma que la de prehibridación a la que se ha adicionado el ADN sonda desnaturalizado

por ebullición durante 10 min, y se incubó un tiempo mínimo de 6 h a 42°C. Terminado el proceso de hibridación, el filtro se lavó dos veces durante 5 min a temperatura ambiente con una solución compuesta por 2 x SSC y SDS al 0.1% (p/v) y, posteriormente, 2 veces más a 68°C durante 15 min con una solución 0.1 x SSC y SDS al 0.1%. Una vez seco el filtro se procedió a la detección inmunológica del ADN hibridado usando anticuerpos específicos contra la dioxigenina. Estos anticuerpos están conjugados con fosfatasa alcalina que, en presencia de un sustrato quimioluminiscente, 3-(2'-Spiroadamantano)-4-metoxi-4-(3''-fosforiloxi)-fenil-1,2-dioxietano (AMPPD), produce un compuesto inestable que, a su vez, se descompone formando el anión metil-meta-oxibenzoato, el cual emite luz a una longitud de onda de 477 nm. La emisión de luz se detectó poniendo en contacto directo el filtro, tras cubrirlo con papel de celofán, con una película autoradiográfica Kodak X-Omat y tras un tiempo mínimo de 20 min. El tiempo de exposición dependerá de la cantidad de ADN, del grado de homología y de la eficiencia del marcaje de la sonda.

## **7. Cultivo de células de *Bradyrhizobium japonicum*.**

La obtención de células de *B. japonicum* se realizó a partir de un precultivo de las distintas cepas en 2 ml de medio YEM líquido. Las células se incubaron aeróbicamente sobre un agitador orbital (180 rpm) durante 24 h a 28°C.

### **7.1. Cultivo de células de *B. japonicum* PJ17 para determinación de actividad NR.**

Los precultivos obtenidos se utilizaron para inocular (proporción 1:100) matraces que contenían medio LMB modificado mediante la sustitución del extracto de levadura por 10 mM de glutamato monosódico, como única fuente de nitrógeno en el medio, y las células se incubaron durante 4 d. La determinación de actividad NR se realizó cada 24 h a partir del segundo día debido a la falta de masa celular a las 24 h de cultivo. Las células (650 ml, 150 ml y 100 ml para el segundo, tercer y cuarto día de cultivo, respectivamente) se recogieron por centrifugación a 8000 x g durante 10 min a 4°C, se lavaron dos veces con tampón Tris/HCl 50 mM, pH 7.5, y se resuspendieron, finalmente, en 2.5 ml del mismo tampón.

En experimentos paralelos, para estudiar el efecto que otras fuentes de nitrógeno podrían ejercer sobre la expresión de actividad NR, al tercer día de cultivo se adicionó al medio bien  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  o  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a la concentración final de 10 mM, determinándose la actividad NR al cuarto día de cultivo. En otros casos, el medio LMB adicionado de  $\text{KNO}_3$  o  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  se suplementó con cloranfenicol (100  $\mu\text{g/ml}$ ).

## **7.2. Cultivo de células de *B. japonicum* para purificación de enzimas NR.**

Cuando se cultivaron células en grandes volúmenes (20 l) para los experimentos de purificación, a partir del primer precultivo se realizó un segundo precultivo en 50 ml de medio YEM líquido (proporción de inoculación 1:50) que se incubó durante 24 h y, a su vez, se utilizó para inocular 5 l de LMB con glutamato monosódico. En este caso, la agitación se sustituyó por burbujeo de aire mediante una bomba de pecera conectada por un tubo de goma a un filtro (Acro 50, Gelman) de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. El filtro, a su vez, se unía por otro tubo de goma con una varilla de vidrio hueca que se sumergía en el cultivo. Todo el sistema se esterilizaba antes de la inoculación en autoclave a 115°C durante 50 min. La inoculación se realizó en una cámara de flujo laminar para evitar las posibles contaminaciones. Las células se incubaron durante 4 días a 28°C y se recogieron empleando un sistema de filtración tangencial provisto de una membrana (0.16  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro) de canal abierto. Las células recogidas se lavaron 2 veces con tampón Tris/HCl 50 mM, pH 7.5, y finalmente se resuspendieron en un volumen adecuado del mismo tampón. Todos los procesos de centrifugación y lavado se realizaron a 4°C.

## **7.3. Incubación de células para inducción de actividad NR.**

La inducción de actividad NR, tanto en la cepa parental PJ17 como en las mutantes, se llevó a cabo partiendo de las células que, después de cultivadas en LMB con glutamato durante 4 días se habían recogido, lavado y finalmente resuspendido en tampón Tris/HCl 50 mM, pH 7.5 (2.5 ml/l de cultivo original). Las suspensiones celulares así preparadas se incubaron en un medio que contenía (por ml): 0.65 ml de tampón Tris/HCl 50 mM, pH 7.5, 0.05 ml de  $\text{KNO}_3$  100 mM, 0.1 ml de una mezcla de glucosa 50 mM y succinato

sódico 50 mM, y 0.2 ml de células ( $\approx$  0.3-0.5 mg de proteína). En algunos casos, como se indica en el texto, a la mezcla de incubación se le adicionó cloranfenicol (100  $\mu$ g/ml). Para determinar el tiempo óptimo de inducción de actividad NR, las células se incubaron a 28°C durante 40 h, bien en condiciones aeróbicas (agitación orbital 180 rpm) o microaeróbicas. La microaerobiosis se consiguió gaseando la mezcla de incubación con argón (Ar) durante 5-15 min, dependiendo del volumen de cultivo, empleándose filtros (Acro 50, Gelman) de 0.16  $\mu$ m de tamaño de poro para evitar posibles contaminaciones. Durante el periodo de incubación, a intervalos regulares de tiempo (5 h) se tomaron alícuotas de 2 ml, que después de centrifugar y lavar, hasta la desaparición del nitrito del sobrenadante, se resuspendieron en 1 ml de Tris/HCl 50 mM, pH 7.5.

#### **7.4. Cultivos microaeróbicos de *B. japonicum* PJ17.**

Las células de la cepa parental PJ17 también se cultivaron en condiciones microaeróbicas. Para ello, a partir de un precultivo en medio YEM se inocularon matraces de 1 l de capacidad, provistos de cierre hermético perforable, que contenían medio LMB con 10 mM de KNO<sub>3</sub> como única fuente de nitrógeno. La exclusión de oxígeno del medio se consiguió, como se indicó en el apartado anterior, gaseando el medio con Ar durante 5-15 min. La inoculación se realizó mediante el empleo de jeringas hipodérmicas estériles. Las células se incubaron a 28°C, en reposo, durante 12-15 días.

### **8. Determinación de actividades enzimáticas.**

#### **8.1. Determinación de actividad NR.**

La actividad NR se determinó utilizando dos tipos de ensayo:

- Ensayo *in situ*. Esta metodología permite determinar la actividad NR en células enteras (células en vida libre y bacteroides) que se han permeabilizado con metil-trimetil bromuro de amonio (MTAB). La mezcla de reacción ha sido descrita por Delgado *et al.* (1989):

0.2 ml de tampón Tris/HCl 500 mM, pH 7.5  
0.1 ml de KNO<sub>3</sub> 100 mM  
0.1 ml de metil viológeno 2 mM  
0.1 ml de agua destilada  
0.1 ml de ditionito sódico 46 mM (en Tris/HCl 500 mM, pH 7.5)  
0.4 ml de células (0.3-0.5 mg de proteína)  
50 µg de MTAB

- Ensayo *in vitro*. Estos ensayos se utilizan para estimar la actividad NR en los extractos libres de células que se obtienen después de la rotura de las mismas mediante sonicación (ver el apartado 10.1 de Material y Métodos). En estos ensayos se utiliza la misma mezcla de reacción que en el ensayo *in situ*, omitiendo el MTAB.

En ambos tipos de ensayos, la reacción se inició con la adición del ditionito y se mantuvo a 30°C durante 10-30 min. Los controles se obtuvieron agitando las mezclas de reacción vigorosamente hasta la completa desaparición del color azul, debido al ditionito, antes de la adición de la proteína.

## 8.2. Determinación de las actividades de la nitrogenasa.

Las actividades de la nitrogenasa (producción de H<sub>2</sub> y reducción de N<sub>2</sub>) se analizaron en raíces de plantas de soja noduladas, cortadas a nivel del nudo cotiledonar, siguiendo esencialmente el método descrito por Bedmar y Olivares (1979) y Bedmar *et al.* (1983) utilizando cromatografía gaseosa.

### 8.2.1. Determinación de la producción de H<sub>2</sub>.

Para analizar la producción de hidrógeno, concomitante con la reducción de N<sub>2</sub> por la nitrogenasa, las raíces noduladas se lavaron y colocaron en frascos de 100 ml de capacidad provistos de un tapón de rosca que permite el cierre hermético de los frascos y la inyección y extracción de gases mediante un disco de silicona. A los 10 min de incubación, a temperatura ambiente, se tomó una muestra de 0.5 ml de la atmósfera

gaseosa y se inyectó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 equipado con un detector de conductividad térmica y una columna metálica (2 m x 2 mm) empaquetada con Molecular Sieve 5A de 60-80 mesh. Las temperaturas del horno, inyector y detector fueron 60°C, 90°C y 150°C, respectivamente. Como gas portador se utilizó Ar a un flujo de 30 ml/min.

### 8.2.2. Determinación de la actividad nitrogenasa.

La actividad nitrogenasa se determinó midiendo la velocidad de reducción de acetileno a etileno después de analizar la producción de H<sub>2</sub>. Los frascos se abrieron para renovar la atmósfera, se taparon de nuevo y se sustituyó el 10% del volumen gaseoso de los frascos por acetileno. A los 10 y 20 min de incubación, a temperatura ambiente, se tomaron muestras de 200 µl de la atmósfera interior y se inyectaron en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer F-7 equipado con un detector de ionización de llama y una columna de vidrio (45 cm x 1.75 mm) empaquetada con alúmina de 80 mesh. La temperatura del horno fue de 115°C, mientras que las del inyector y detector fue de 150°C. Como gas portador se utilizó N<sub>2</sub> a un flujo de 50 ml/min.

A partir de los valores calculados de producción de hidrógeno y de reducción de acetileno se puede calcular la eficiencia relativa (ER) de la nitrogenasa, según la ecuación propuesta por Schubert y Evans (1976):  $ER = 1 - [H_2 \text{ (producido en atmósfera de aire)} / C_2H_4 \text{ (producido en atmósfera de acetileno)}]$ .

## 9. Determinación de nitrito y proteína.

### 9.1. Determinación de nitrito.

Para la valoración del nitrito se utilizó la reacción de diazotación de Griess-Ylosway, según la técnica de Snell y Snell (1949), que emplea la sulfanilamida y el ácido N-naftil-etilen-diamino (NNEDA) como reactivos. Más detalles sobre el empleo de esta reacción colorimétrica pueden estudiarse en Nicholas y Nason (1957) y Hageman y Hucklesby (1971).

#### Procedimiento:

A un volumen de muestra se adicionan volúmenes iguales de sulfanilamida y NNEDA. Se agita en vórtex e incuba a temperatura ambiente durante 20 min. Después se determina la absorbancia a 540 nm de longitud de onda. Cuando se emplearon muestras de células enteras (ensayos *in situ*), las mismas se sedimentaron por centrifugación antes de la determinación espectrofotométrica de la concentración de nitrito.

La sulfanilamida se preparó disolviendo 5 g de sulfanilamida en 100 ml de ácido clorhídrico concentrado (12 N). Posteriormente se diluyó hasta 500 ml con agua destilada. El reactivo NNEDA se obtuvo disolviendo 100 mg de este producto en 500 ml de agua destilada. Ambos reactivos deben preservarse de la luz, manteniéndolos en frascos color topacio o envueltos en papel negro o de aluminio.

#### 9.2. Determinación de proteína.

El contenido de proteína se determinó siguiendo el método de Markwell *et al.* (1978). Para muestras que contenían Triton X-100 se utilizó el ensayo descrito por Wang y Smith (1975).

##### Método de Markwell *et al.* (1978).

A alícuotas de 50  $\mu$ l de muestra se adicionan 950  $\mu$ l de NaOH 0.4 N y 3 ml de reactivo A. Se agita e incuba a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente se adicionan 0.3 ml de reactivo de Folin-Cicolteau diluido 1:1 en agua destilada y se incuba a temperatura ambiente durante 30 min. Se lee la absorbancia a 660 nm (preferible a 750 nm para muestras diluidas).

El reactivo A contiene 100 partes de reactivo B y 1 de reactivo C. El reactivo B consta de: 2.0% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.4% de NaOH, 0.16% de tartrato sódico potásico y 1.0% de SDS, expresado como p/v. El reactivo C contiene 4.0% (p/v) de  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ .

### Método de Wang y Smith (1975).

A 200 µl de muestra se le adiciona 1 ml de la solución A. Se agita y se incuba durante 15 min a temperatura ambiente. Después se adiciona 1 ml de SDS al 10% y tras agitar se añaden 200 µl del reactivo de Folin-Cicolteau diluido 1:1 en agua destilada. Se agita y se incuba durante 45 min a temperatura ambiente. La absorbancia se lee a 500 nm de longitud de onda, o bien a 750 nm para muestras diluidas.

El reactivo A consta de: 260 mg de  $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 120 mg de  $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 20 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 4 g de NaOH y agua destilada hasta 1 litro.

La concentración de proteína presente en las muestras ensayadas, independientemente del método utilizado, se calculó por interpolación respecto a una curva estándar que se preparó con albúmina bovina. Cuando se empleó el método de Wang y Smith (1975) la curva patrón incluyó Triton X-100 al 4% (p/v).

## **10. Purificación de los enzimas nitrato reductasa de las membranas de *Bradyrhizobium japonicum*.**

### **10.1. Obtención del extracto crudo.**

La obtención de membranas de *B. japonicum* se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Delgado *et al.* (1992). Las células se rompieron mediante oscilación sónica empleando una sonda de 60 vatios de potencia. Las células se sometieron a 5 pulsos de 1 min, con intervalos de 1 min, a una temperatura de 4°C. El extracto celular resultante se centrifugó a 10000 x g durante 10 min para sedimentar las células que no se habían roto y el sobrenadante se recentrifugó a 250000 x g durante 1 h a 4°C. El sedimento resultante, conteniendo las membranas, se lavó 2 veces con tampón Tris/HCl 50 mM, pH 7.5. Antes de la última centrifugación se tomó una alícuota de 500 µl para determinación de actividad NR y concentración de proteína (apartados 8.1 y 9.2 de este capítulo, respectivamente). El resto de membranas obtenidas se utilizó como extracto crudo a partir del cual se inició el proceso de purificación.

## **10.2. Solubilización de las membranas.**

La extracción de los posibles enzimas con actividad NR se realizó solubilizando las membranas sedimentadas mediante tratamiento con Triton X-100 al 4% (p/v) en tampón Tris/HCl 50 mM, pH 7.5, e incubación en hielo durante 15 min. Este tratamiento se realizó manteniendo la proporción 250  $\mu$ l de tampón/l de cultivo original. La posterior centrifugación a 270000 x g durante 20 min del extracto resultante permitió obtener las membranas solubilizadas en el sobrenadante, quedando en el sedimento el material insoluble al Triton X-100.

## **10.3. Cromatografía de intercambio iónico.**

Como segundo paso de purificación se utilizó cromatografía de intercambio aniónico. Para ello se empleó una columna preempaquetada de Q-Sepharosa (2.6 cm x 10 cm, HiLo, FF, Pharmacia) cuya matriz presenta el grupo amino cuaternario como intercambiador de iones. La columna estaba conectada a un cargador de muestra (modelo SA-5, Pharmacia), una bomba peristáltica (P1, Pharmacia) y un colector de fracciones (RediFrac, Pharmacia). Antes de su empleo, la matriz se equilibró con dos volúmenes (120 ml) de tampón Tris/HCl 50 mM, Triton X-100 al 1% (p/v) y NaCl 50 mM, pH 7.5. Las muestras de membranas solubilizadas ( $\approx$  5 ml) se suplementaron con el 25% (v/v) de glicerol al 100% y se inyectaron en la columna pasando, de nuevo, dos volúmenes de tampón. La elución de la proteína se llevó a cabo haciendo pasar a través de la columna 300 ml de un gradiente de NaCl de 50 mM a 650 mM preparado en un mezclador de gradiente (GM-1, Pharmacia). Se recogieron fracciones de 5 ml a un flujo de 2 ml/min. En cada fracción se analizó tanto la actividad NR como la concentración de proteína (apartados 8.1 y 9.2 de este capítulo, respectivamente). Las fracciones activas se reunieron y se concentraron, a 4°C, mediante ultrafiltración hasta un volumen final aproximado de 5 ml. Para ello se empleó una célula de presión Amicon provista de una membrana tipo YM de 100 kDa de tamaño de poro sobre la que se aplicó una presión de 70 psi proporcionada por una bala de N<sub>2</sub>.

Todos los reactivos empleados en este tipo de cromatografía fueron de la máxima pureza y el agua utilizada en la preparación de los distintos tampones de calidad ultrapura, tipo Milli-Q (Millipore Corp.).

#### **10.4. Cromatografía de exclusión molecular.**

Como último paso de purificación se utilizó cromatografía de exclusión molecular. En estos experimentos se empleó una columna de vidrio (2.6 cm x 100 cm) rellena de Sephacryl S-200. El montaje y preparación de la columna se realizó de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Pharmacia), utilizando bomba peristáltica, una válvula de 4 vías y reservorios específicos para la carga del gel y de las muestras como se ha descrito en el apartado anterior. Una vez empaquetado el gel en la columna, la matriz se estabilizó haciendo pasar dos volúmenes ( $\approx 1$  l) de tampón Tris/HCl 50 mM, NaCl 50 mM y Triton X-100 al 1% (p/v), pH 7.5, a un flujo de 0.5 ml/min. A las muestras obtenidas después de la cromatografía de intercambio iónico se les adicionó un 25% (v/v) de glicerol al 100% antes de su inyección en el cargador de muestra. La elución de la muestra se llevó a cabo con el mismo tampón a un flujo de 0.5 ml/min. Después de eliminar el volumen muerto de la columna se recogieron fracciones de 5 ml, en las que se determinó tanto la actividad NR como la concentración de proteína (apartados 8.1 y 9.2 de este capítulo, respectivamente). De nuevo, las fracciones con actividad se reunieron y se concentraron, como se describe en el apartado anterior, hasta un volumen aproximado de 5 ml.

A partir del extracto crudo, el grado de purificación alcanzado después de cada paso del proceso de purificación se comprobó en alícuotas de 100  $\mu$ l de las diferentes muestras. Las alícuotas se utilizaron tanto para detectar enzimas con actividad NR (apartado 12.1 de este capítulo) como la presencia de proteínas contaminantes (apartado 12.2 de este capítulo) después del desarrollo de las muestras en geles de poliacrilamida.

## 11. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

La electroforesis en geles de poliacrilamida se empleó para detectar enzimas con actividad NR, determinación de tamaños moleculares de proteínas, mapeo de péptidos, enfoque isoeléctrico y como primer paso para la transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa. Los geles se prepararon a partir de una solución madre de acrilamida al 30% (p/v) y N,N'-metilén-bisacrilamida (bisacrilamida) al 0.8% (p/v) según la siguiente fórmula:

		4%	7%	10%	15%
H <sub>2</sub> O	(ml)	24.1	20.1	9.4	-
Tampón (4 X)	(ml)	10.0	10.0	10.0	10.0
Acril-Bis	(ml)	5.3	9.3	13.3	20.0
Glicerol	(ml)	-	-	6.7	9.4
PSA (10%)	(ml)	0.6	0.6	0.6	0.6
TEMED	( $\mu$ l)	40	30	20	20
Volumen final	(ml)	<u>40</u>	<u>40</u>	40	40

Los geles que se emplearon fueron siempre en gradiente continuo del 4% al 10% o del 7% al 15%, como se especifica en el texto. Las soluciones de poliacrilamida se desgasaron mediante vacío durante 10 min y los gradientes se formaron empleando un mezclador de gradientes 2117 (Pharmacia). Los catalizadores (N,N,N',N'-tetrametiletilén diamina, TEMED y persulfato amónico, PSA) se adicionaron a cada solución de acrilamida antes de iniciar la formación del gradiente.

La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta vertical (2001-001, Pharmacia-LKB) refrigerada a 8°C mediante circuito cerrado de refrigeración (2219 Multitemp II, Pharmacia). Los moldes para la formación del gel consistieron en dos placas de vidrio de 16 cm x 18 cm separadas por un espaciador de 1.5 mm. En otras ocasiones, la electroforesis se realizó en cubeta vertical tipo Miniprotean II (Bio-Rad) que utiliza como

moldes para el gel placas de vidrio de 7.3 cm x 10.2 cm y espaciadores de 0.75 mm. En el primer caso, la intensidad y voltaje de la corriente eléctrica para el desarrollo de la electroforesis la proporcionó una fuente de alimentación 2197 (LKB-Pharmacia) y en el segundo, una fuente tipo 1000/500 (Bio-Rad). Los tampones y tiempo de desarrollo, así como la preparación de las muestras y los marcadores de tamaño molecular (LMW y HMW, Pharmacia) se indican en el texto correspondiente a la condición, nativa o desnaturizante, de la electroforesis realizada.

### **11.1. Electroforesis en geles nativos (no desnaturizantes).**

Las electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas (no desnaturizantes) se realizaron en gradiente del 4% al 10% siguiendo las instrucciones del proveedor (Pharmacia-LKB). El tampón (4 X) utilizado para preparar los geles fue Tris 0.36 M,  $H_3BO_3$  0.32 M,  $Na_2EDTA$  3.72 g/l y Triton X-100 al 0.4% (p/v), pH 8.4. Este mismo tampón, en concentración 1 X, se empleó para rellenar la cubeta de electroforesis. Antes de cargar las muestras, el gel se sometió a una preelectroforesis durante 20 min aplicando una corriente continua de 10 mA. Una vez cargadas las muestras, la electroforesis se inició manteniendo una intensidad constante de 10 mA durante 15-20 min, para facilitar el desarrollo de las proteínas en el gel. Posteriormente, la intensidad de la corriente se incrementó a 20 mA y la electroforesis se mantuvo hasta que el frente alcanzó el extremo del gel.

Las muestras y marcadores de tamaño molecular, antes de aplicarlos a los pocillos de gel, se prepararon mezclandolas con un 25% de volumen de tampón de carga formado por el tampón antes descrito adicionado de 50% de glicerol y 20% de azul de bromofenol. El tiempo de desarrollo fue de 16 h para el sistema de Pharmacia y de 2 horas para el de Bio-Rad.

## **11.2. Electroforesis en geles desnaturalizantes.**

Este tipo de electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida del 7% al 15% preparados en tampón Tris/HCl 1.5 M y SDS al 2.5% (p/v), pH 8.8. Como tampón de desarrollo se empleó el descrito por Laemmli (1970): Tris 3 g/l, glicina 14.4 g/l, pH 8.3 con SDS al 0.1% (p/v). Las muestras se prepararon adicionando un 25% de su volumen de tampón de carga, que se compone de Tris/HCl 125 mM, SDS al 0.6% (p/v), pH 6.8, glicerol al 10% (p/v), 2-mercaptoetanol al 5% (v/v) y azul de bromofenol al 0.02% (p/v). Las muestras así preparadas se sumergieron en agua hirviendo durante 5 min para conseguir la desnaturalización de las proteínas. Hasta el momento de su carga en el gel, las muestras se conservaron a una temperatura de 4°C.

La electroforesis se realizó empleando un voltaje constante de 100 V desde el inicio hasta el final. Los sistemas utilizados fueron los mismos que para las electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, empleandose una cubeta vertical (LKB 2001-001 o Bio-Rad Miniprotean II). El tiempo de electroforesis fue de 6 h para el sistema de Pharmacia y de 1 hora para el sistema de Bio-Rad.

## **11.3. Electroelución.**

Este proceso se empleó para recuperar los enzimas NR de los geles de poliacrilamida. Se llevó a cabo utilizando un equipo de electroelución (422 Electro-Eluter, Bio-Rad). En primer lugar, los enzimas purificados se sometieron a electroforesis en geles nativos de poliacrilamida y después de su detección (apartado 12.1 de este capítulo), sin fijarlos, se cortaron, con ayuda de un escalpelo, aquellos fragmentos del gel que contenían los enzimas. Los fragmentos con proteínas de igual tamaño molecular se reunieron, trocearon y se colocaron en tubos de vidrio provistos de una membrana de 3.5 kDa de tamaño de poro y un sistema de polipropileno poroso que separa los trocitos de acrilamida del reservorio de recuperación de proteínas. Los tubos de vidrio se introdujeron en la cubeta de electroelución, que se rellenó con el tampón descrito para la electroforesis en geles nativos de poliacrilamida (apartado 11.1 de este capítulo). La electroelución se realizó

aplicando durante 5 h una corriente de 10 mA por cada tubo de vidrio montado en el sistema. La corriente fue proporcionada por una fuente de alimentación 1000/500 (Bio-Rad). Los enzimas se recuperaron, finalmente, en un volumen aproximado de 400-600  $\mu$ l del tampón indicado.

#### **11.4. Enfoque isoeléctrico.**

El pH isoeléctrico de los enzimas NR purificados se determinó utilizando la técnica de enfoque isoeléctrico en gel de poliacrilamida. Para ello se emplearon geles (2 mm de grosor) de poliacrilamida al 7% adicionados del 5% de las anfolinas (Pharmacia) adecuadas para formar un rango de pH de 3.5 a 10. La electroforesis se desarrolló en una cubeta horizontal (Multiphor II, Pharmacia). En primer lugar se realizó un preelectroenfoque, sin muestras, a una potencia de 25 W durante 1 h para permitir la formación del gradiente de pH. Mientras tanto, se prepararon las muestras en glicina al 1% (p/v) y se colocaron sobre piezas de papel Whatman 3MM de 0.5 cm x 1 cm. Las muestras así preparadas se colocaron sobre el gel y se desarrollaron a 25 W, 600 V y 15 mA durante 6 h. Pasado este tiempo, una zona del gel, de 0.5 cm de ancho y exenta de muestra, se cortó longitudinalmente en el sentido ánodo-cátodo y se dividió en fragmentos de 0.5 cm. Estos fragmentos (0.5 cm x 0.5 cm) se incubaron durante 15 h a 4°C en tubos que contenían 1 ml de una solución de KCl 50 mM. Posteriormente, se determinó el pH de la solución de cada tubo para establecer el gradiente formado durante el electroenfoque.

#### **12. Detección de enzimas nitrato reductasa y de proteínas en geles de poliacrilamida.**

Ambos procesos se realizaron, habitualmente, en el mismo gel. Para ello, una vez finalizada la electroforesis, la mitad del gel se utilizó para detectar la actividad NR, mientras que la otra mitad, réplica de la primera, se empleó para visualizar las proteínas presentes en las muestras sometidas a desarrollo electroforético.

## 12.1 Detección de actividad NR.

La detección de actividad NR en geles nativos de poliacrilamida se realizó siguiendo el método de tinción negativa descrito por Lund y DeMoss (1976), con modificaciones para fijar la banda de proteína con actividad NR. Para ello, tras la electroforesis, el gel se sumergió en tampón Tris/HCl 50 mM, pH 7.5, adicionado de metil viológeno 5 mM y ditionito sódico 1 mg/ml y se incubó, a temperatura ambiente, durante 10 min en agitación suave. Transcurrido este tiempo, al tampón de incubación se le adicionó KNO<sub>3</sub> 100 mM (1 ml/50 ml de tampón) y se incubó de nuevo durante 15-30 min. Siguiendo esta metodología, el gel se tiñe de azul por efecto del ditionito, excepto en aquella zona donde se oxida el reductor debido a la actividad del enzima que aparece de color blanco.

La posibilidad de que otros enzimas con actividad reductasa pudieran ser responsables de la oxidación del ditionito se eliminó, ya que la omisión de nitrato en la mezcla de incubación de los geles resultó en la ausencia de expresión de bandas de proteína con actividad NR. Después de la aparición de la(s) banda(s) de oxidación, la decoloración del gel se detuvo mediante inmersión del mismo en una solución de cloruro de trifetil tetrazolio al 5% durante 20 min. Posteriormente, el gel se conservó en ácido acético glacial al 7%.

## 12.2. Detección de proteínas.

La detección de las proteínas, previamente separadas mediante electroforesis, presentes en los geles se realizó mediante la tinción con azul Coomassie R-250 o con AgNO<sub>3</sub>, siendo esta última, al menos, 50 veces más sensible que la primera.

### Tinción con azul Coomassie.

Se realizó por inmersión del gel en una solución de fijación y teñido simultáneo compuesta por etanol:ácido acético glacial:agua destilada (50:10:40) que contenía azul Coomassie R-250 al 0.2%. Después de la incubación del gel durante 1 h en agitación suave

a temperatura ambiente, se procedió a su decoloración con una solución de metanol:acético glacial:agua (5:15:80). Posteriormente, el gel se conservó en ácido acético glacial al 7%.

#### Tinción con nitrato de plata.

Se siguió la metodología indicada por Blum *et al.* (1987). Después de la electroforesis, el gel se fijó por inmersión en una solución de metanol:acético glacial:agua (50:12:38) con formaldehído al 37% (0.5 ml/l de solución) e incubación durante un mínimo de 1 h en agitación suave al menos durante 30 min. Posteriormente, el gel se lavó 3 veces durante 20 min con etanol al 50% y después se incubó en una solución de tiosulfato sódico 0.8 mM durante 1 min, en agitación. Después de lavar con agua desionizada 4 veces durante 20 s cada vez, el gel se impregnó con  $\text{AgNO}_3$  (2 g/l) y formaldehído al 37% (0.75ml/l) durante 20 min, en agitación y protegido de la luz. El revelado de las bandas de proteína se llevó a cabo, después de lavar con agua desionizada 2 veces durante 20 s cada vez, mediante inmersión del gel en una solución de revelado compuesta por carbonato sódico (60 g/l), formaldehído al 37% (0.5 ml/l) y tiosulfato sódico (16  $\mu\text{M}$ ) en agitación hasta la aparición de las bandas. Después de lavar el gel con agua desionizada durante 1 min, las bandas se fijaron sumergiendo el gel en una solución de metanol:acético glacial:agua (50:12:38) durante 15 min. El gel se conservó a 4°C en metanol al 50%.

En el caso de geles de poliacrilamida sometidos a enfoque isoeléctrico, es necesario eliminar las anfóteras antes de teñir las proteínas con  $\text{AgNO}_3$ . Para ello, después del electroenfoque, el gel se incubó en una solución de metanol al 30%, ácido tricloroacético al 10% (p/v) y ácido sulfosalicílico al 3.5% (p/v) durante 1 h en agitación. Posteriormente, se lavó con una solución de metanol al 30% y ácido tricloroacético al 12% durante un tiempo mínimo de 2 h, cambiando la solución cada 15-20 min.

En algunas ocasiones, como se indica en el texto, los geles de poliacrilamida teñidos con  $\text{AgNO}_3$  se procesaron en un densitómetro (Shimadzu, CS-9000) capaz de proporcionar tanto el registro gráfico de las proteínas del gel como el área correspondiente a cada proteína registrada.

### 12.3. Determinación del tamaño molecular en geles de poliacrilamida.

El tamaño molecular relativo ( $M_r$ ) de los enzimas NR de las membranas de *B. japonicum* se determinó según su movilidad relativa (Rf) en geles de poliacrilamida después de la electroforesis y revelado de las proteínas de los geles. El Rf se calculó mediante la fórmula:  $R_f = \text{distancia de migración de la proteína desde el origen} / \text{distancia desde el origen al punto de referencia}$ . Como punto de referencia se puede utilizar el frente de electroforesis (azul de bromofenol), el extremo del gel o la proteína patrón que más haya migrado.

Como proteínas patrón para electroforesis en geles nativos se utilizaron las siguientes: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalasa (232 kDa), lactato deshidrogenasa (140 kDa) y albúmina (67 kDa) (Pharmacia). Para electroforesis en geles desnaturizantes se emplearon las siguientes: fosforilasa b (94 kDa), albúmina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20.1 kDa) y  $\alpha$ -lactalbúmina (14.4 kDa) (Pharmacia). Para el cálculo del  $M_r$  en filtros de nitrocelulosa, se utilizaron las siguientes proteínas patrón preteñidas:  $\alpha_2$ -macroglobulina (180 kDa),  $\beta$ -galactosidasa (116 kDa), fructosa-6-fosfato kinasa (84 kDa), piruvato kinasa (58 kDa), fumarasa (48.5 kDa), lactato deshidrogenasa (36.5 kDa) y triosa fosfato isomerasa (26.6 kDa) (Sigma). Las dos primeras mezclas de proteínas liofilizadas se reconstituyeron en 100  $\mu$ l de agua bidestilada y la tercera en 100  $\mu$ l de tampón de carga (apartado 11.2 de este capítulo). La preparación de las proteínas patrón para electroforesis se indica en los apartados 11.1 y 11.2 de este capítulo.

El cálculo del  $M_r$  se basó en las rectas de calibrado construidas representando en el eje de ordenadas el logaritmo decimal del tamaño molecular de las proteínas patrón y en el eje de abcisas el valor correspondiente de Rf.

### **13. Digestión parcial con tripsina de los enzimas NR.**

La proteólisis parcial de los enzimas purificados se llevó a cabo según el método descrito por Burke y Lascelles (1979), con las modificaciones realizadas por Blümle y Zumft (1991). Muestras de cada enzima se mezclaron en proporción 1:1 con tripsina (5 mg/ml) preparada en HCl 1 N, y se incubaron a 30°C durante 30 min. Pasado este tiempo, una alícuota de cada muestra se preparó para electroforesis en geles nativos (apartado 11.1 de este capítulo) con el objeto de comprobar las posibles diferencias en la migración de los enzimas NR. Otra alícuota se preparó para electroforesis en geles desnaturizantes (apartado 11.2 de este capítulo) para determinar la composición en péptidos de cada enzima.

### **14. Hibridación de los enzimas nitrato reductasa con anticuerpos policlonales.**

Se ha determinado la posible reacción cruzada entre las subunidades que componen cada enzima NR y anticuerpos desarrollados contra el enzima nitrato reductasa respiratorio de las membranas de *Pseudomonas stutzeri* cepa ZoBell (ATCC 14405). Para ello los enzimas NR de las membranas de *B. japonicum* se hibridaron con anticuerpos policlonales anti-NR de *P. stutzeri*, amablemente proporcionados por el Prof. Dr. Walter G. Zumft, Departamento de Microbiología, Universidad de Karlsruhe (República Federal de Alemania), como se describe a continuación.

#### **14.1. Transferencia de las subunidades de los enzimas NR a filtros de nitrocelulosa.**

La transferencia de las subunidades, previamente separadas mediante electroforesis en geles desnaturizantes, a una membrana de nitrocelulosa (NC) de 0.45 µm de tamaño de poro (Millipore) se realizó según la técnica de Towbin *et al.* (1979), con modificaciones. Para ello, tanto el gel como la membrana se preequilibraron en tampón de transferencia (Tris 125 mM, glicina 192 mM, pH 8.3, con metanol al 20% (v/v) durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación se formó una unidad de transferencia compuesta por

5 capas de papel de filtro empapadas en tampón de transferencia, la membrana de NC, el gel de poliacrilamida y otras 5 capas de papel de filtro. La unidad de transferencia se colocó sobre una cubeta horizontal Multiphor II (LKB-Pharmacia) equipada con dos placas de grafito (NovaBlot, LKB-Pharmacia). Este sistema semiseco permite la transferencia de proteínas aplicando a su través una corriente de 200 mA, aproximadamente 70 voltios, durante 1 h. Acabada la transferencia se procedió a la detección de los posibles complejos antígeno-anticuerpo o bien se dejó secar y se conservó a 4°C hasta el momento de su utilización.

#### **14.2. Detección de complejos antígeno-anticuerpo (inmunorevelado).**

Todo el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación suave. El filtro de NC se equilibró durante 5 min en tampón TBS (Tris/HCl 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5) y después se sumergió en el mismo tampón adicionado del 5% de leche en polvo desnatada durante un tiempo mínimo de 30 min, con el fin de bloquear los sitios de enlace inespecíficos. Posteriormente, el filtro de NC se lavó durante un tiempo mínimo de 10 min con tampón TTBS (500 µl de Tween 20/l de TBS) y se incubó durante 1 h en una dilución 1:1000 de suero anti-nitrato reductasa en TTBS adicionado de gelatina al 3%, como agente bloqueante. Pasado este tiempo, el filtro se lavó 4 veces, durante 5 min cada vez, con TTBS y se incubó durante 1 h con anti-inmunoglobulina de conejo (desarrollada en cabra) conjugada a peroxidasa y diluida 1:1000 en TTBS con gelatina al 1%. El filtro se volvió a lavar 2 veces como antes con TTBS y se equilibró 5 min en TBS. Finalmente, la presencia de complejos antígeno-anticuerpo se reveló incubando el filtro en una solución de 4-cloro-1-naftol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> preparada en el momento (4-Cl-1-naftol 50 mg/17 ml de etanol; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µl/85 ml TBS). La incubación se llevó a cabo en oscuridad, sin agitación, durante un tiempo mínimo de 5 min y un máximo de 40 min.

## **15. Caracterización de los enzimas nitrato reductasa.**

### **15.1. Cinética enzimática.**

Los estudios sobre cinética de los enzimas NR purificados se abordaron determinando, en primer lugar, el tiempo óptimo de reacción de cada uno de ellos. Se utilizaron muestras de concentración conocida y constante cuya actividad se determinó, como se indica en el apartado 9.1 de este capítulo, durante 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min. Los valores de actividad obtenidos permitieron calcular el tiempo óptimo de incubación de manera que la actividad del enzima, esto es, la producción de nitrito fuera lineal durante el tiempo de incubación.

Conocido el tiempo óptimo de reacción de cada enzima, se determinó la velocidad de la reacción catalizada por cada uno de ellos en función de la concentración de sustrato. Para ello, las muestras se incubaron en presencia de 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 ó 2 mM de  $\text{KNO}_3$ . Una vez calculados los valores de actividad NR, se representó la velocidad de la reacción en el eje de ordenadas y la concentración de sustrato en el de abcisas. El cálculo de la  $K_M$  y de la velocidad máxima ( $V_{\max}$ ) se realizó mediante la representación de los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk, siendo la  $K_M$  el inverso del punto de intersección de la recta con el eje de abcisas y la  $V_{\max}$  el inverso del punto de corte con el eje de ordenadas.

### **15.2. Efecto de inhibidores enzimáticos.**

El efecto de los inhibidores enzimáticos se determinó en condiciones óptimas de tiempo, concentración de sustrato y de enzima. Los inhibidores utilizados fueron azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) y cianuro potásico ( $\text{KCN}$ ) a las concentraciones de 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25 y 0.5 mM. Cada enzima se incubó en presencia de los distintos inhibidores a temperatura ambiente durante 10 min y posteriormente se adicionó ditionito para iniciar la reacción. Después de 10 min de incubación a  $30^\circ\text{C}$ , se valoró el nitrito producido en cada reacción.

### 15.3. Determinación de la actividad del cofactor de molibdeno.

La determinación de la actividad del cofactor de molibdeno se realizó de acuerdo a Mendel (1983) y Hawkes y Bray (1984), utilizando el ensayo de complementación de la NR de la cepa *nit-1* de *Neurospora crassa*. Para ello, 30  $\mu$ l de muestra se mezclaron con 30  $\mu$ l de tampón fosfato 50 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM y ascorbato sódico 1.5 mM, y se incubaron a 70°C durante 90 s. Después de enfriar a 0°C durante 2 min, se adicionaron 120  $\mu$ l de una mezcla compuesta por: extracto de *N. crassa nit-1*:NADPH (5 mg/3 ml de tampón): $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  100 mM, en proporción 4:1:1. Posteriormente se incubó durante 24 h a 4°C o, alternativamente, durante 1 h a 20°C, y se adicionaron 100  $\mu$ l de  $\text{KNO}_3$  100 mM y 100  $\mu$ l de FAD 0.1 mM. Después de incubar a 30°C durante 30 min, la muestra se sometió a ebullición durante 20 min, valorandose después el nitrito producido según se describe en el apartado 9.1 de este capítulo. El extracto de *N. crassa nit-1* fue amablemente suministrado por los Drs. N. L'vov y S. Bursakov del Instituto A.N. Bach de Bioquímica, Academia de Ciencias de Rusia, Moscú.

### 15.4. Espectro de absorción de los enzimas NR.

El registro de los espectros de absorción visible-UV de los enzimas NR se llevó a cabo a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Beckman DU-7 equipado con un registrador. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de longitud de paso de luz y se empleó como referencia el tampón en el que estaban presentes las muestras (Tris/HCl 50 mM, NaCl 50 mM, Triton X-100 1% (p/v), pH 7.5). En primer lugar, se realizó un barrido con una absorbancia de 0.3 y una longitud de onda entre 280 y 700 nm. Posteriormente, manteniendo la longitud de onda, se seleccionó una absorbancia de 0.05 para poder establecer claramente los máximos de absorción.

Resultados de la encuesta

## **RESULTADOS**

El 75% de los encuestados

considera que el servicio

## **1. Obtención, selección y caracterización de mutantes de *Bradyrhizobium japonicum* deficientes en la utilización de nitrato.**

La obtención de cepas mutantes de *Bradyrhizobium japonicum* PJ17 se llevó a cabo mediante mutagénesis al azar con el transposón Tn5 localizado en el plásmido suicida pJQ18 presente en *Escherichia coli* S17-1 (Hynes *et al.* 1989). La transferencia de Tn5 se realizó por conjugación entre la cepa donadora *E. coli* S17-1 y la receptora *B. japonicum* PJ17, como se describe en los apartados 6.1.1 y 6.1.2 de Material y Métodos. Como medio selectivo se utilizó medio sólido LMB con 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl, como única fuente de nitrógeno, adicionado de kanamicina, estreptomycinina y tetraciclina a las concentraciones adecuadas. De los tres cruces realizados se obtuvieron en total 95 clones, lo que resultó en una frecuencia de aparición de transconjugantes de  $(1.07 \pm 0.13) \times 10^7$ /célula receptora.

La caracterización de los transconjugantes obtenidos se realizó, en primer lugar, comprobando su capacidad de crecimiento en medio sólido LMB con 10 mM de KNO<sub>3</sub>, como única fuente de nitrógeno, tanto en condiciones aeróbicas como microaeróbicas, de la manera que se indica en el apartado 6.1.3 de Material y Métodos. De los 95 transconjugantes, 80 no crecieron en microaerobiosis, y de éstos, 12 sí crecieron en condiciones aeróbicas. No se obtuvo ningún transconjugante capaz de crecer en microaerobiosis e incapaz, simultáneamente, de hacerlo en aerobiosis. A los 12 transconjugantes capaces de crecer aeróbicamente y no microaeróbicamente con KNO<sub>3</sub> como única fuente de nitrógeno se les denominó GRF1 a GRF12. A los 68 transconjugantes restantes, incapaces de crecer tanto en aerobiosis como en microaerobiosis, se les denominó GRF101 a GRF168.

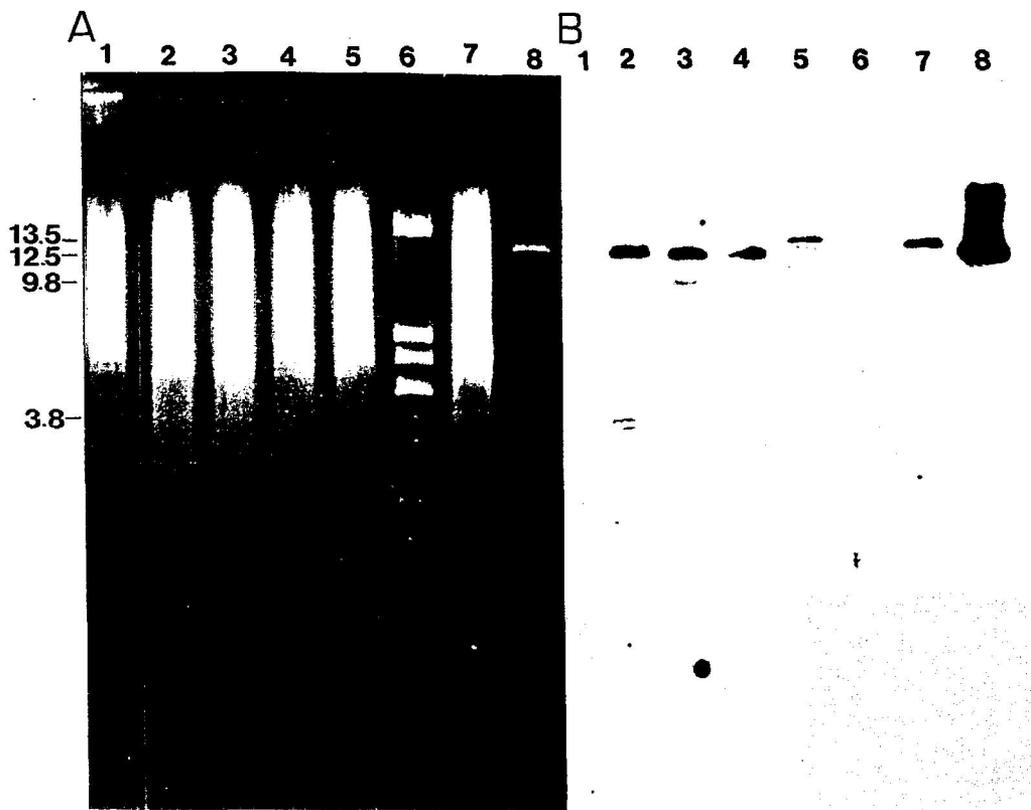
La caracterización de los 80 transconjugantes seleccionados se continuó, en segundo lugar, comprobando su capacidad de crecimiento en medio sólido LMB con NH<sub>4</sub>Cl, KNO<sub>2</sub> (1 mM, concentraciones superiores inhibieron el crecimiento de *B. japonicum* PJ17) o hipoxantina (7.5 mM, una concentración mayor resultó en la precipitación del medio) como única fuente de N. El tiempo de aparición de colonias visibles en los distintos medios fue de 10 días para la hipoxantina, 15 para el amonio y 20 días para el nitrito. En todos los

casos se empleó medio sólido LMB con glutamato para obtener réplicas de los transconjugantes. A cada medio se adicionó tetraciclina para mantener la presión selectiva sobre el transposón Tn5. Sólo 32 transconjugantes, 8 de la serie GRF1 a GRF12 y 24 de la serie GRF101 a GRF168 crecieron en medio LMB con nitrito, amonio o hipoxantina como única fuente de nitrógeno.

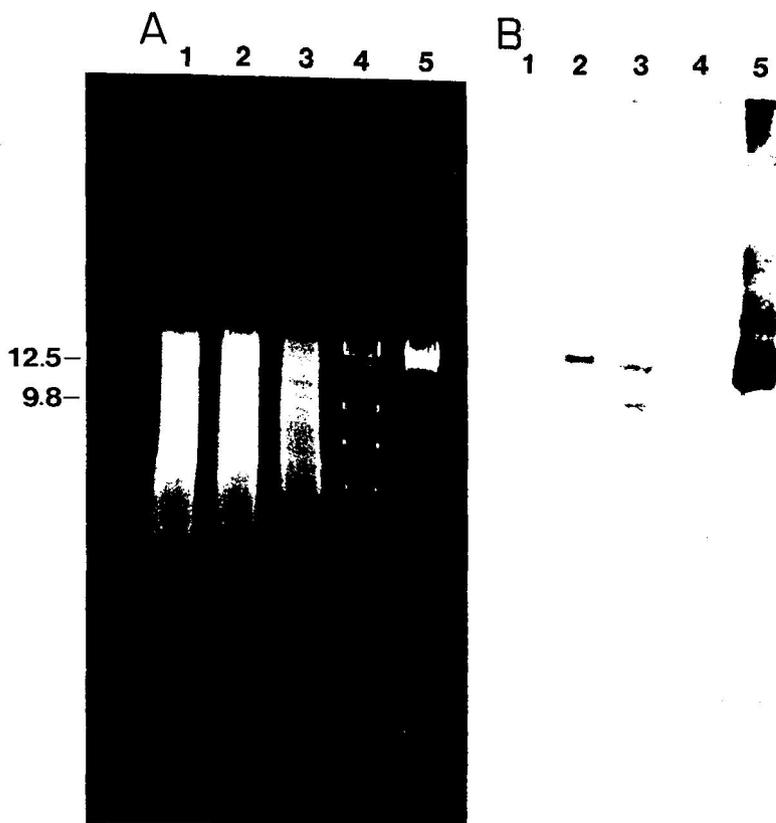
El empleo del reactivo de Nadi, como se indica en el apartado 6.1.3 de Material y Métodos, permitió comprobar que 4 transconjugantes, 2 de cada serie, presentaban algún tipo de alteración en la cadena transportadora de electrones, por lo que se procedió a su eliminación.

Finalmente, la caracterización de los transconjugantes se completó comprobando la presencia del transposón Tn5 en el cromosoma de los mismos mediante hibridación ADN-ADN, utilizando como sonda el plásmido pJQ18 digerido con *Eco* RI (apartados 6.9 y 6.10 de Material y Métodos). El ADN total de cada uno de los 28 transconjugantes seleccionados dió señal de hibridación. Como ejemplo, en la Fig. 1, se muestra el perfil de ADN digerido, así como la señal de hibridación del ADN de los transconjugantes GRF3, GRF4, GRF104, GRF110 y GRF116. En general, los transconjugantes se clasificaron en dos grupos según las señales de hibridación de su ADN, uno que presentó señal en un fragmento correspondiente a 12.5 kb, representado por los transconjugantes GRF3, GRF4 y GRF104, y el segundo, con señal en un fragmento de 13.5 kb, representado por los transconjugantes GRF110 y GRF116. De manera excepcional las cepas GRF3 y GRF4 presentaron una señal más de hibridación correspondiente a fragmentos de ADN de 3.8 kb y 9.8 kb, respectivamente. Posteriores experimentos de hibridación ADN-ADN, utilizando como sonda sólo el transposón Tn5 separado del vector, tras una digestión del plásmido pJQ18 con *Hpa* I (apartados 6.4, 6.9 y 6.10 de Material y Métodos), permitió comprobar la existencia de una sola señal de hibridación en la cepa GRF3, mientras que se mantuvieron constantes las dos señales de hibridación en la cepa GRF4 (Fig. 2).

Cada una de las mutantes seleccionadas conservó la capacidad de infectar soja, ya que su inoculación en plantas de *Glycine max* var. Williams resultó en la aparición de nódulos y en el crecimiento de las plantas en un medio carente de N combinado.



**Figura 1.** Detección del transposón Tn5 en el cromosoma de *Bradyrhizobium japonicum* PJ17 y mutantes. A, ADN bacteriano y plasmídico digerido con *EcoRI*. B, señales de hibridación del ADN bacteriano con el ADN del plásmido pJQ18 digerido con *EcoRI*. Los carriles corresponden al ADN de las siguientes cepas de *B. japonicum* : 1, PJ17; 2, GRF3; 3, GRF4; 4, GRF104; 5, GRF110; 6, fago lambda digerido con *EcoRI* y *HindIII* (marcador de tamaño molecular); 7, GRF116; 8, plásmido pJQ18. Los números indican el tamaño, en kb, de las señales de hibridación.



**Figura 2.** Detección del transposón Tn5 en el cromosoma de las cepas mutantes *B. japonicum* GRF3 y GRF4. A, ADN bacteriano y plasmídico digerido con *EcoRI*. B, señales de hibridación ADN bacteriano con el ADN del transposón Tn5 después de la digestión del plásmido pJQ18 con *HpaI*. Los carriles corresponden al ADN de las siguientes cepas de *B. japonicum* : 1, PJ17; 2, GRF3; 3, GRF4; 5, pJQ18; y 4, fago lambda digerido con *Hind III*, utilizado como marcador de tamaño molecular. Los números indican el tamaño, en kb, de las señales de hibridación.

## 2. Actividad nitrato reductasa en *Bradyrhizobium japonicum* PJ17.

Dada la incapacidad de las cepas mutantes de *B. japonicum* PJ17 para utilizar nitrato en condiciones microaeróbicas, era necesario desarrollar un método que permitiese analizar las posibles diferencias en la presencia y/o expresión de actividad NR entre la cepa parental y las mutantes. Para ello se estudió:

### 2.1. Efecto de la fuente de nitrógeno.

Se determinó tanto la expresión de actividad NR en *B. japonicum* PJ17 cultivado en medio líquido LMB con glutamato, como el efecto que podrían ejercer otras fuentes de N sobre la expresión de dicha actividad (apartado 7.1 de Material y Métodos). No se pudo determinar actividad NR a las 24 horas de cultivo debido a la ausencia de masa celular. Dicha actividad sí se detectó al segundo día, y la misma disminuyó a lo largo del tiempo de cultivo hasta que no fue posible su detección al cuarto día (Fig. 3).

La adición al medio LMB con glutamato, al comienzo del tercer día de cultivo, de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no afectó la actividad NR, mientras que la de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  o de  $\text{KNO}_3$  incrementó la actividad en un 149% o en un 358%, respectivamente (Fig. 3). La adición de nitrato amónico o nitrato potásico junto con un antibiótico inhibidor de la síntesis proteica (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cloranfenicol) inhibió la expresión de actividad NR (Fig. 3A).

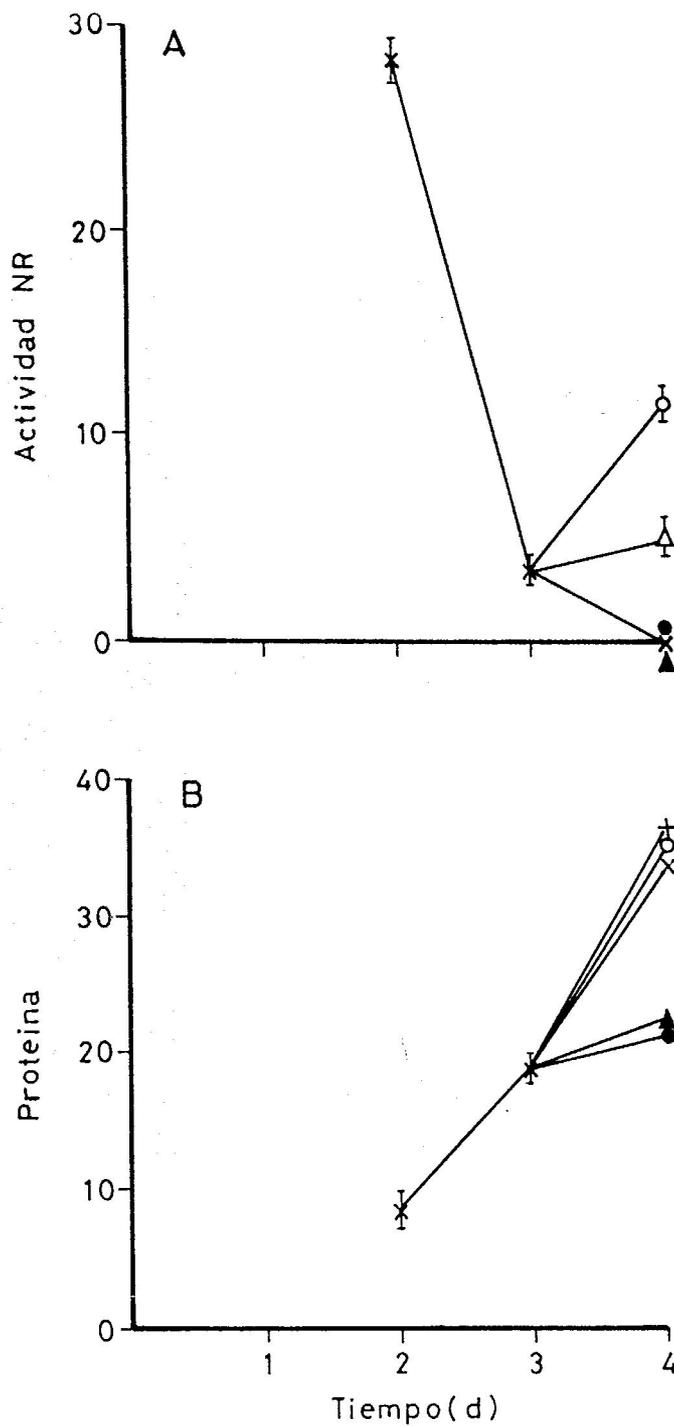
La presencia de las distintas fuentes de N en el medio LMB con glutamato no afectó el crecimiento celular, oscilando la concentración de proteína entre 33  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para el glutamato y 36  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para el amonio (Fig. 3B). La inclusión de Cm en cada uno de los medios disminuyó el crecimiento celular aproximadamente en un 38%, independientemente de la fuente de N empleada (Fig. 3B).

## 2.2. Efecto de la microaerobiosis.

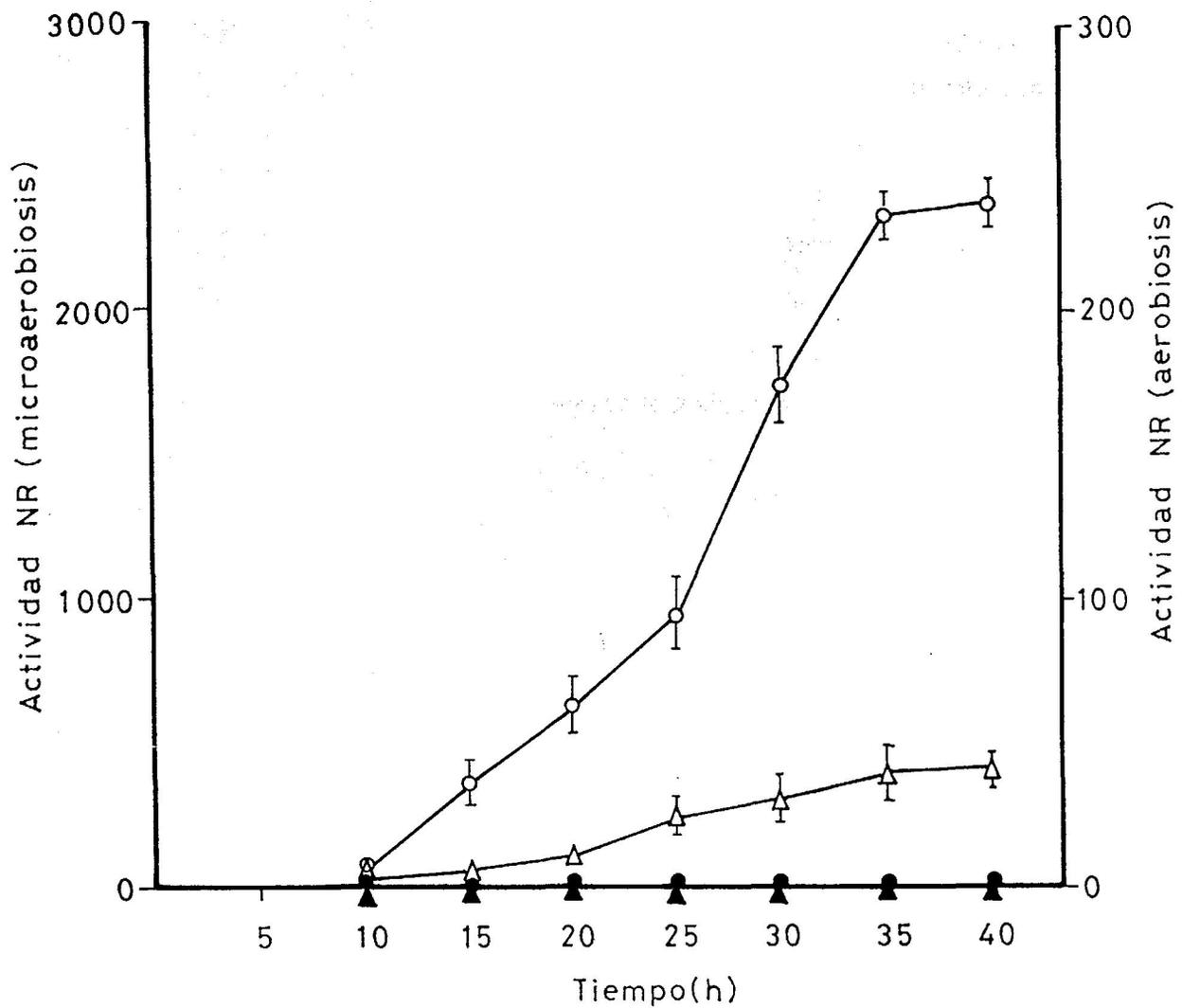
Puesto que se había observado la capacidad del nitrato para inducir actividad NR (Fig. 3A), se examinó, de forma más detallada, el efecto de ese anión sobre la expresión de tal actividad. Para ello, la cepa parental *B. japonicum* PJ17 se cultivó durante 4 días en medio líquido LMB con glutamato y, posteriormente, las células se incubaron durante 40 h, en presencia de nitrato, tanto en condiciones aeróbicas como microaeróbicas (apartado 7.3 de Material y Métodos).

Cuando las células se incubaron en microaerobiosis, la expresión de actividad NR ocurrió entre las 5 h y 10 h de incubación (27.3 nmol de  $\text{NO}_2^-/\text{mg prot.} \times \text{h}$ , a las 10 h), e incrementó paulatinamente a lo largo del tiempo de incubación (3601 nmol de  $\text{NO}_2^-/\text{mg prot.} \times \text{h}$ , a las 35 h) (Fig. 4).

Durante la incubación en condiciones aeróbicas, la actividad NR se detectó entre las 5 h y las 10 h de incubación (1.21 nmol de  $\text{NO}_2^-/\text{mg prot.} \times \text{h}$ , a las 10 h) (Fig. 4), al igual que ocurrió en condiciones microaeróbicas. Pasadas las 10 h de incubación, las tasas de actividad aumentaron con el tiempo de incubación (38 nmol de  $\text{NO}_2^-/\text{mg prot.} \times \text{h}$ , a las 35 h) (Fig. 4). Los valores de actividad NR durante la incubación aeróbica fueron siempre muy inferiores a los correspondientes a los determinados durante la incubación microaeróbica (Fig. 4). La inclusión de cloranfenicol (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en la mezcla de incubación resultó en la ausencia de expresión de actividad NR, tanto cuando las células se incubaron microaeróbicamente como aeróbicamente (Fig. 4). Idénticos resultados se obtuvieron cuando se sustituyó el cloranfenicol por rifampicina (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (no se presentan los resultados).



**Figura 3.** Actividad nitrato reductasa (NR) (Fig. 3A) y concentración de proteína (Fig. 3B) en células de *Bradyrhizobium japonicum* PJ17 cultivadas en medio LMB con glutamato (-x-x-), y suplementado con NH<sub>4</sub>Cl (---+), NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> ± Cm (-Δ-Δ-, -▲-▲-) o KNO<sub>3</sub> ± Cm (-o-o-, -●-●-). La actividad NR se determinó mediante ensayos *in situ* y se expresa en nmol de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/mg de prot x ml. La concentración de proteína se expresa en µg/ml. Se presentan valores medios de tres repeticiones. Las barras indican el error estándar y sólo se incluyen cuando su tamaño fue mayor que el de los símbolos utilizados.



**Figura 4.** Actividad nitrato reductasa (NR) en células de *Bradyrhizobium japonicum* PJ17. Las células se cultivaron en LMB con glutamato y, posteriormente, se incubaron microaeróbicamente  $\pm$  Cm (-o-o-, -●-●-) o aeróbicamente  $\pm$  Cm (-Δ-Δ-, -▲-▲-) durante 40 h en presencia de nitrato. La actividad NR se expresa en  $\text{nmol NO}_2^-/\text{mg prot} \times \text{h}$ . Los valores representan la media de tres repeticiones. Las barras indican el error estándar y sólo se incluyen cuando su tamaño fue mayor que el de los símbolos utilizados.

### **3. Actividad nitrato reductasa, en *Bradyrhizobium japonicum* PJ17 y mutantes, inducida microaeróbicamente en presencia de nitrato.**

De manera similar a la cepa parental PJ17, la capacidad de las distintas mutantes para inducir actividad NR se examinó después de su cultivo en LMB con glutamato y posterior incubación durante 35 h en condiciones microaeróbicas con nitrato como única fuente de nitrógeno. Para estos experimentos se seleccionaron las 12 mutantes que se indican en la Tabla 1. En esta selección se incluyeron las 6 mutantes que crecían aeróbicamente con nitrato (GRF1 a GRF6) y otras 6, elegidas al azar entre las mutantes que no crecían aeróbicamente con nitrato. Después de la inducción, las células se rompieron por sonicación, el citosol y las membranas se separaron por centrifugación diferencial y, posteriormente, las membranas se solubilizaron con Triton X-100 (apartados 10.1 y 10.2 de Material y Métodos).

Todas las mutantes expresaron actividad NR tanto en el citosol como en las membranas, aunque se observaron variaciones respecto a la cepa parental (Tabla 1). En 11 de las 12 mutantes, y en ambas fracciones, la actividad NR fue menor que en la cepa parental (Tabla 1). La disminución de la actividad llegó a ser del 91% en el citosol de la cepa GRF121 y del 76% en las membranas de la cepa GRF3. De forma excepcional, la cepa GRF6 expresó un 696% de actividad en el citosol y un 172% en las membranas, respecto a la cepa parental PJ17 (Tabla 1).

**Tabla 1.** Actividad nitrato reductasa (NR) en el citosol y en las membranas solubilizadas de *Bradyrhizobium japonicum* PJ17 y mutantes. Las células se cultivaron en LMB con glutamato y se incubaron microaeróbicamente con nitrato durante 35 h. La actividad NR se determinó mediante ensayos *in vitro* y se expresa en nmol de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/mg prot. x h. Los valores de actividad de las mutantes se indican en porcentaje respecto a los de la parental.

Cepa	Fracción celular	
	Citosol	Membranas solubilizadas
PJ17	100 (13.9 ± 0.09)	100 (216 ± 1.52)
GRF1	66	47
GRF2	22	24
GRF3	41	76
GRF4	75	30
GRF5	76	91
GRF6	696	172
GRF102	51	46
GRF104	68	98
GRF110	95	30
GRF112	47	73
GRF116	95	77
GRF121	9	30

#### **4. Detección de enzimas nitrato reductasa en las membranas de *Bradyrhizobium japonicum* PJ17 y mutantes.**

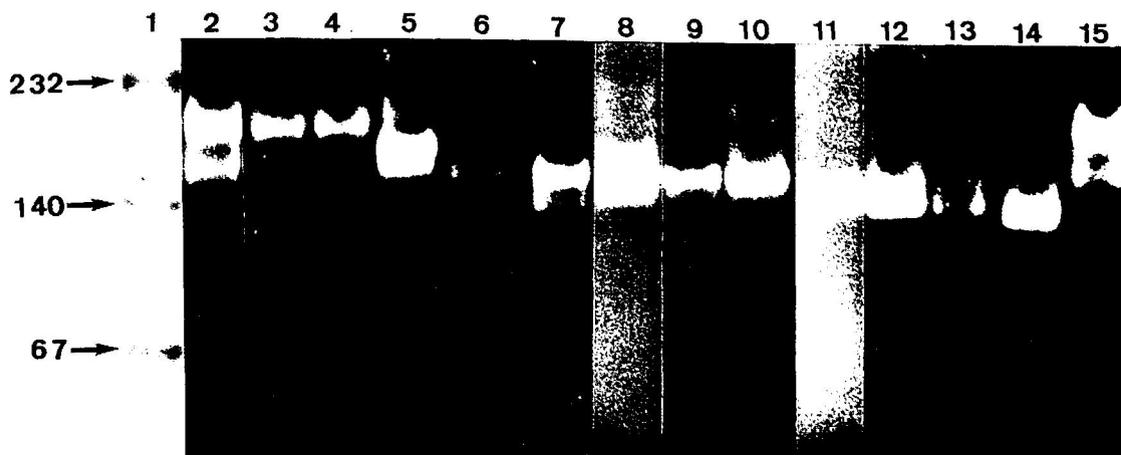
De acuerdo con los resultados anteriores, dada la posibilidad de inducir actividad NR en células de *B. japonicum* después del cultivo de las mismas en medio LMB con glutamato y posterior incubación en condiciones microaeróbicas y presencia de nitrato, se llevó a cabo el estudio comparativo sobre las posibles diferencias en actividad NR asociada a las membranas entre la cepa parental PJ17 y las mutantes deficientes en la utilización de nitrato.

La presencia de enzimas con actividad NR en membranas solubilizadas con Triton X-100 se determinó sometiendo las mismas a electroforesis en geles nativos de poliacrilamida (apartado 11.1 de Material y Métodos). Se utilizaron alícuotas que contenían, tanto para la cepa parental como para las mutantes, aproximadamente 570 µg de proteína. Después de la electroforesis, se procedió a la detección de la actividad enzimática en el gel como se describe en el apartado 12.1 de Material y Métodos.

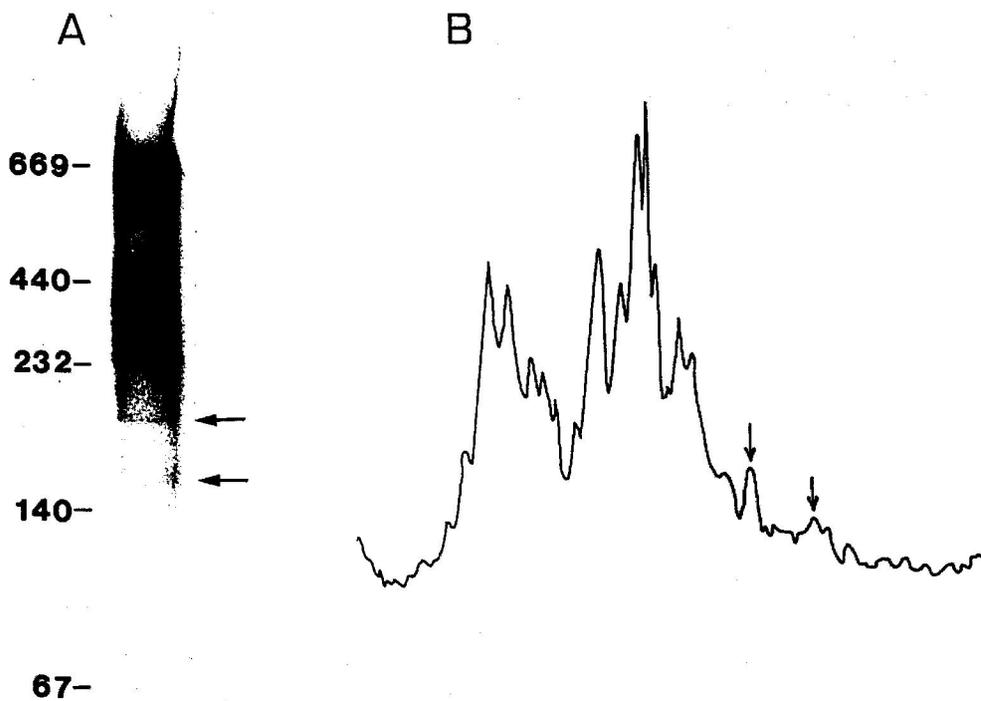
Las membranas de la cepa parental presentaron dos enzimas NR catalíticamente activos cuyos tamaños moleculares relativos (Mr) aparentes fueron de 200 kDa y 160 kDa (Fig. 5). Ninguna de las membranas de las mutantes mostró más de un enzima NR, ya que las de las mutantes GRF3 y GRF4 (Fig. 5) contenían únicamente el enzima correspondiente a 200 kDa y las de las mutantes GRF2, GRF5, GRF104, GRF110, GRF116, GRF102 y GRF112 sólo expresaron el enzima de 160 kDa (Fig. 5). Excepcionalmente, las membranas de las mutantes GRF121 y GRF1 (Fig. 5) sólo mostraron una banda de actividad NR correspondiente a una proteína cuyo Mr estimado fue de 120 kDa.

Las membranas de la cepa parental PJ17 obtenidas después del cultivo de las células en condiciones microaeróbicas con nitrato como única fuente de N (apartado 7.4 de Material y Métodos) mostraron, al igual que las membranas de las células cultivadas con glutamato e incubadas microaeróbicamente con nitrato, dos enzimas NR de idéntico Mr (200 kDa y 160 kDa; Fig. 5).

Para calcular la concentración relativa de los enzimas con actividad NR en las membranas de la cepa parental PJ17 se utilizaron muestras ( $\approx 25 \mu\text{g}$  de proteína) de membranas solubilizadas, que se sometieron a electroforesis en geles nativos de poliacrilamida. Las proteínas presentes en los geles se detectaron mediante tinción con nitrato de plata (apartado 12.2 de Material y Métodos) (Fig. 6A) y su registro se realizó por densitometría de los mismos (apartado 12.2 de Material y Métodos) (Fig. 6B). Basándonos en el área correspondiente a cada una de las proteínas registradas, se pudo estimar que, en la cepa parental PJ17, el enzima NR de 200 kDa representó el 1.75% del total de proteínas presentes en las membranas, mientras que el de 160 kDa correspondió al 0.30%. Por tanto, la concentración de enzimas con actividad NR representa, aproximadamente, el 2.05% del total de proteínas presentes en las membranas solubilizadas con Triton X-100 de *B. japonicum* PJ17.



**Figura 5.** Detección de enzimas nitrato reductasa en las membranas solubilizadas con Triton X-100 de *B. japonicum* PJ17 y mutantes. Las muestras ( $\approx 570 \mu\text{g}$  de proteína) se analizaron mediante electroforesis en geles nativos de poliacrilamida (4% al 10%) en presencia de 0.1% de Triton X-100. Los enzimas se detectaron por actividad y se fijaron en 5% de cloruro de trifenil tetrazolio. El carril 1 muestra las proteínas patrón y los restantes carriles corresponden a membranas de las siguientes cepas de *B. japonicum* cultivadas en LMB con glutamato e incubadas microaeróbicamente con nitrato durante 35 h: 2, PJ17; 3, GRF3; 4, GRF4; 5, GRF6; 6, GRF2; 7, GRF5; 8, GRF104; 9, GRF110; 10, GRF116; 11, GRF102; 12, GRF112; 13, GRF121; 14, GRF1; 15, membranas de *B. japonicum* cultivadas microaeróbicamente con nitrato. Las flechas indican la localización en el gel de las siguientes proteínas patrón: catalasa (232 kDa), lactato deshidrogenasa (140 kDa) y albúmina bovina (67 kDa).



**Figura 6.** Contenido en proteínas (Fig. 6A) y densitograma correspondiente (Fig. 6B) de las membranas solubilizadas con Triton X-100 de *B. japonicum* PJ17. Las muestras (25  $\mu$ g de proteína) se analizaron mediante electroforesis en geles nativos de poliacrilamida (4% al 10%) en presencia de 0.1% de Triton X-100. Las proteínas se detectaron mediante tinción con nitrato de plata y la densitometría se realizó empleando una longitud de onda de 560 nm. Las flechas indican la posición de los enzimas nitrato reductasa. Los números indican el tamaño de las siguientes proteínas patrón: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalasa (232 kDa), lactato deshidrogenasa (140 kDa) y albúmina bovina (67 kDa).

## **5. Efecto del oxígeno y del nitrato sobre la expresión de actividad nitrato reductasa en membranas de *Bradyrhizobium japonicum* PJ17.**

Para estudiar el efecto que la microaerobiosis y/o el nitrato podrían ejercer sobre la expresión de actividad NR en las membranas de *B. japonicum* PJ17, después del cultivo en LMB con glutamato, las células se incubaron en condiciones aeróbicas o microaeróbicas y, en cada caso, en presencia y en ausencia de nitrato. Posteriormente, las células se rompieron por sonicación, las membranas se obtuvieron por centrifugación diferencial, se solubilizaron mediante tratamiento con Triton X-100 y se sometieron a electroforesis en geles nativos de poliacrilamida (apartados 10.1, 10.2 y 11.1 de Material y Métodos).

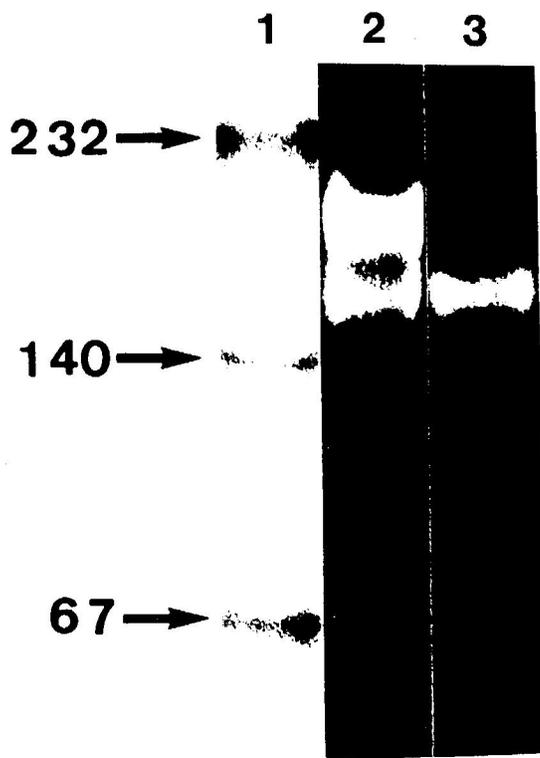
Cuando las células se incubaron en microaerobiosis, y no se incluyó  $\text{KNO}_3$  en la mezcla de incubación, prácticamente toda la actividad NR (99%) se localizó en las membranas, aunque una mínima actividad se detectó en el citosol (Tabla 2). La presencia de nitrato durante la incubación microaeróbica incrementó 4 veces la actividad NR de las membranas, en donde también se localizó la mayoría (97%) del total (citosólica y de membranas) de la actividad NR (Tabla 2).

No se pudo detectar actividad NR en las membranas cuando la incubación se realizó en condiciones aeróbicas, independientemente de la ausencia o presencia de nitrato en la mezcla de incubación (Tabla 2). En ausencia de nitrato tampoco se detectó actividad NR en el citosol, mientras que en presencia de nitrato sí hubo cierta expresión de actividad NR en el citosol. Esta actividad fue inferior a la detectada en condiciones microaeróbicas en ausencia de nitrato (Tabla 2).

La electroforesis en geles nativos de poliacrilamida de membranas solubilizadas ( $\approx 570$   $\mu\text{g}$  de proteína) procedentes de células incubadas microaeróbicamente con nitrato reveló la presencia de dos enzimas NR cuyos Mr fueron de 200 kDa y 160 kDa, respectivamente, mientras que las membranas de células incubadas microaeróbicamente sin nitrato sólo mostraron un enzima NR cuyo MR fue de 160 kDa (Fig. 7).

**Tabla 2.** Actividad nitrato reductasa (NR) en el citosol y en las membranas solubilizadas de *Bradyrhizobium japonicum* PJ17. Las células se cultivaron en LMB con glutamato y, posteriormente, se incubaron microaeróbicamente en presencia o ausencia de nitrato durante 35 h. La actividad NR se determinó mediante ensayos *in vitro* y se expresa en nmol de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ mg prot. x min. Los valores representan la media de tres repeticiones seguidos del error estándar.

Condiciones de incubación	Actividad NR	
	Citosol	Membranas
Microaerobiosis - KNO <sub>3</sub>	0.60 ± 0.06	53.77 ± 0.30
Microaerobiosis + KNO <sub>3</sub>	7.46 ± 0.56	223.83 ± 16
Aerobiosis - KNO <sub>3</sub>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Aerobiosis + KNO <sub>3</sub>	0.12 ± 0.02	0.0 ± 0.0



**Figura 7.** Detección de enzimas nitrato reductasa en membranas solubilizadas con Triton X-100 de *Bradyrhizobium japonicum* PJ17. Las muestras ( $\approx 570 \mu\text{g}$  de proteína) se analizaron mediante electroforesis en geles nativos de poliacrilamida (4% al 10%) en presencia de 0.1% de Triton X-100. Los enzimas se detectaron por actividad y se fijaron en 5% de cloruro de trifenil tetrazolio. Los carriles corresponden a membranas solubilizadas de células de *B. japonicum* PJ17 cultivadas en LMB con glutamato e incubadas microaeróbicamente durante 35 h en presencia de nitrato (carril 2) y ausencia de nitrato (carril 3). En el carril 1 se indica el tamaño molecular de las proteínas patrón descritas en la Fig. 5.

## 6. Reducción de acetileno y producción de hidrógeno en *Bradyrhizobium japonicum* PJ17 y mutantes en simbiosis con *Glycine max*.

Aunque se ha indicado anteriormente que todas las mutantes fueron capaces de infectar plantas de soja (*Glycine max* var. Williams), se seleccionaron 5 mutantes para analizar, de forma comparativa respecto a la cepa parental PJ17, los posibles efectos que la alteración en el metabolismo de nitrato podrían ocasionar en las actividades de la nitrogenasa de los bacteroides. Para estos estudios se seleccionaron las mutantes GRF3 y GRF4 que sólo expresan el enzima NR correspondiente a 200 kDa y las mutantes GRF102, GRF110 y GRF116 que sólo expresan el enzima correspondiente a 160 kDa.

La actividad nitrogenasa, medida como reducción de acetileno, de los nódulos formados por la cepa parental PJ17 fue estadísticamente ( $P \leq 0.05$ ) igual a la de los nódulos formados por cuatro (GRF3, GRF4, GRF110 y GRF116) de las cinco mutantes empleadas (Tabla 3). Sólo la mutante GRF102 produjo nódulos cuya actividad nitrogenasa fue inferior ( $P \leq 0.05$ ) a la de los formados tanto por la cepa parental como a la de los producidos por las otras cuatro mutantes (Tabla 3). Por el contrario, la producción de hidrógeno por los nódulos formados por cada una de las cinco mutantes fue significativamente ( $P \leq 0.05$ ) superior a la de los nódulos de la cepa parental (Tabla 3). También se observaron diferencias significativas en la producción de  $H_2$  entre las mutantes (Tabla 3). Dada la mayor producción de  $H_2$  por los nódulos de las mutantes y la igualdad en la actividad de reducción de acetileno entre la parental y las mutantes, la eficiencia relativa (ER) de la nitrogenasa de la cepa parental PJ17 fue estadísticamente superior ( $P \leq 0.05$ ) a la ER de cada una de las mutantes (Tabla 3).

**Tabla 3.** Reducción de acetileno y producción de hidrógeno en nódulos formados por *Bradyrhizobium japonicum* PJ17 y mutantes. Las plantas de soja (*Glycine max* var. Williams) se inocularon con cada una de las cepas de *B. japonicum* y se cultivaron durante 35 d en ausencia de N combinado. La reducción de acetileno se expresa en nmol de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> producido/planta. La producción de H<sub>2</sub> se expresa en nmol H<sub>2</sub> producido/planta. La eficiencia relativa (ER) de la nitrogenasa de cada simbiosis se calculó mediante la fórmula: ER= 1 - (H<sub>2</sub>/C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>). Los valores representan la media de seis repeticiones y aquellos seguidos de distinta letra son significativamente (P ≤ 0.05) diferentes, según el test de Tuckey.

Cepa	Reducción de acetileno	Producción de H <sub>2</sub>	ER
PJ17	7.22 a	2.19 a	0.70 a
GRF3	6.45 a	3.77 bc	0.42 b
GRF4	6.93 a	3.87 c	0.44 b
GRF102	5.16 b	2.94 b	0.43 b
GRF110	6.95 a	5.24 d	0.25 c
GRF116	7.36 a	4.09 c	0.45 b

## **7. Purificación de los enzimas nitrato reductasa de las membranas de *Bradyrhizobium japonicum* PJ17.**

Aunque, en principio, se abordó la purificación de los enzimas NR empleando membranas de la cepa parental PJ17, la complejidad de los resultados obtenidos, así como las dificultades para un correcto análisis de los mismos, hizo aparente la necesidad de emplear cepas mutantes para intentar la purificación de los dos enzimas NR. De las dos mutantes (GRF3 y GRF4) que contenían únicamente el enzima de 200 kDa (Fig. 5), se seleccionó la mutante GRF3 por presentar una sola inserción del transposón Tn5 (Fig. 2). De las mutantes que sólo expresaron el enzima de 160 kDa (Fig. 5) se eligió, al azar, la cepa GRF110.

La purificación se inició con la solubilización de las membranas mediante tratamiento con Triton X-100 al 4% (apartado 10.2 de Material y Métodos). Aproximadamente el 87% de la actividad enzimática correspondiente a la proteína de 160 kDa (Tabla 4) y el 83% de la actividad de la de 200 kDa (Tabla 5), pero sólo el 24% de la proteína total de las membranas de la primera (Tabla 4) y el 21 % de las membranas de la segunda (Tabla 5), se recuperó en la fracción de membranas solubilizadas. El tratamiento con Triton X-100 incrementó la actividad NR específica en la fracción soluble 3.7 veces para el enzima de 160 kDa (Tabla 4) y 3.9 veces para el enzima de 200 kDa (Tabla 5).

Como segundo paso de purificación se empleó cromatografía de intercambio iónico (apartado 10.3 de Material y Métodos), utilizando alícuotas de 5 ml ( $\approx$  30 mg de proteína) de las membranas solubilizadas. Los enzimas NR se liberaron de la matriz de la columna mediante elución con NaCl en una concentración que varió en gradiente continuo desde 50 mM hasta 650 mM (apartado 10.3 de Material y Métodos). La determinación de actividad NR en el eluido correspondiente a las membranas solubilizadas de la mutante GRF110 (proteína de 160 kDa) demostró la presencia de un sólo pico de actividad cuyo máximo valor se detectó a una concentración de NaCl de 280 mM (Fig. 8). Cuando se emplearon membranas solubilizadas de la mutante GRF3 (proteína de 200 kDa) se obtuvieron dos picos de actividad cuyos valores máximos correspondieron a concentraciones de NaCl de

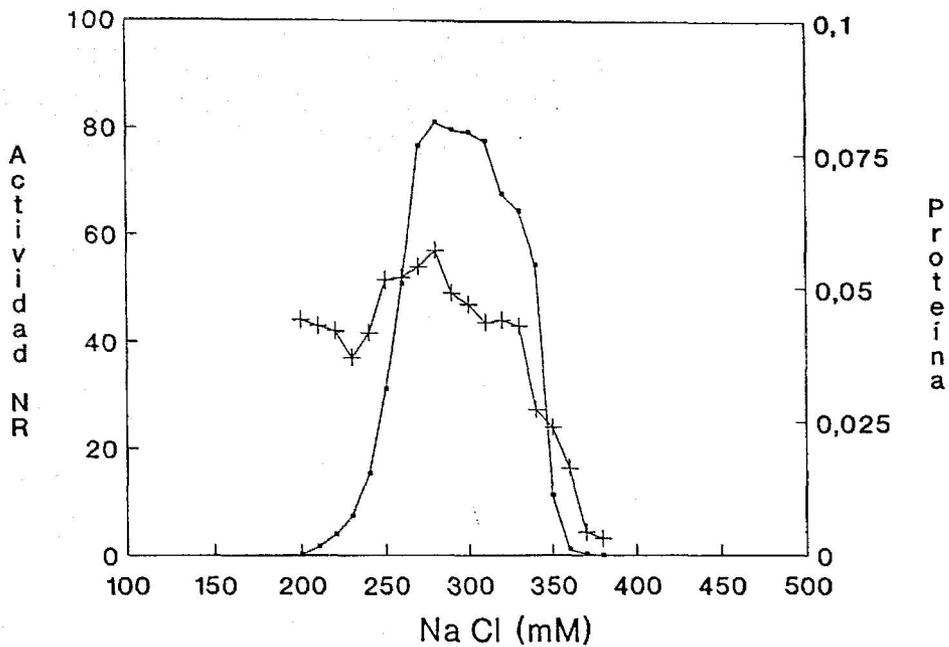
290 mM y 330 mM (Fig. 9). En las fracciones del eluido que mostraron actividad NR se observó una correlación significativa entre los valores de dicha actividad y la concentración de proteína de las mismas (Figs. 8 y 9). La cromatografía de intercambio iónico incrementó la actividad específica del enzima de 200 kDa 12.3 veces (Tabla 4), y 10 veces la del enzima de 160 kDa (Tabla 5), consiguiéndose rendimientos de purificación que oscilaron entre el 36% y el 40% para cada uno de ellos (Tablas 4 y 5).

Después de la cromatografía de intercambio iónico, las fracciones con elevada actividad NR ( $\geq 10$  nmol de  $\text{NO}_2$ /mg prot. x min) se recogieron, se concentraron mediante ultrafiltración (apartado 10.3 de Material y Métodos) hasta un volumen aproximado de 5 ml (4-5 mg de proteína) y se sometieron a cromatografía de exclusión molecular (apartado 10.4 de Material y Métodos). La determinación de actividad NR en el eluido correspondiente al fraccionamiento en columna de Sephacryl S-200 de las muestras de la mutante GRF110 (proteína de 160 kDa), obtenidas después de la cromatografía de intercambio iónico, puso en evidencia la presencia de un pico de actividad NR cuyo valor máximo se detectó a los 125 ml de eluido (Fig. 10). Similarmente, el fraccionamiento de muestras de las membranas parcialmente purificadas de la mutante GRF3 (proteína de 200 kDa) a través de Sephacryl S-200 resolvió dos picos de actividad NR que presentaban, respectivamente, valores máximos a los 100 ml y 125 ml del eluido correspondiente (Fig. 11). Después de la cromatografía en Sephacryl S-200, la actividad NR específica del enzima de 200 kDa fue 16.2 veces superior a las de las membranas, mientras que la del enzima de 160 kDa incrementó 21.5 veces (Tablas 4 y 5, respectivamente). El rendimiento del proceso de purificación tras la cromatografía de exclusión molecular fue similar para ambos enzimas, concretamente 26.7% para la de 200 kDa (Tabla 4) y 27.6% para la de 160 kDa (Tabla 5).

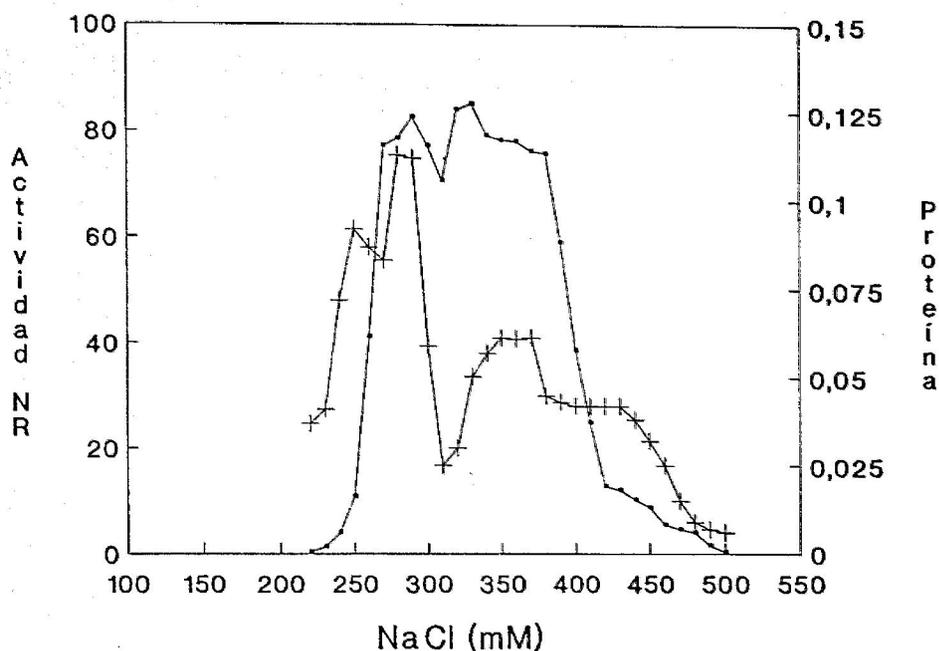
El grado de purificación alcanzado en cada paso del proceso se comprobó determinando, en geles de poliacrilamida, tanto la actividad NR como la presencia de proteínas en las muestras utilizadas (Figs. 12 y 13). En la mutante GRF110 sólo se detectó, tanto en membranas solubilizadas como en membranas solubilizadas y sometidas a cromatografía de intercambio iónico primero y a cromatografía de exclusión molecular

después, un único enzima NR de 160 kDa (Fig. 12). Por el contrario, aunque en las membranas solubilizadas de la mutante GRF3 se visualizó un solo enzima NR de 200 kDa (Fig. 13), después de someter las mismas a cromatografía de intercambio iónico se observó, de forma reiterada, la presencia de dos enzimas NR de 160 kDa y 120 kDa, respectivamente (Fig. 13). La presencia de ambos enzimas se mantuvo tras la cromatografía de exclusión molecular (Fig. 13). Cuando las membranas solubilizadas de la mutante GRF3 se sometieron primero a cromatografía de exclusión molecular, igualmente, se detectó la presencia de dos enzimas NR que se mantuvieron después de la cromatografía de intercambio iónico (no se muestran los resultados).

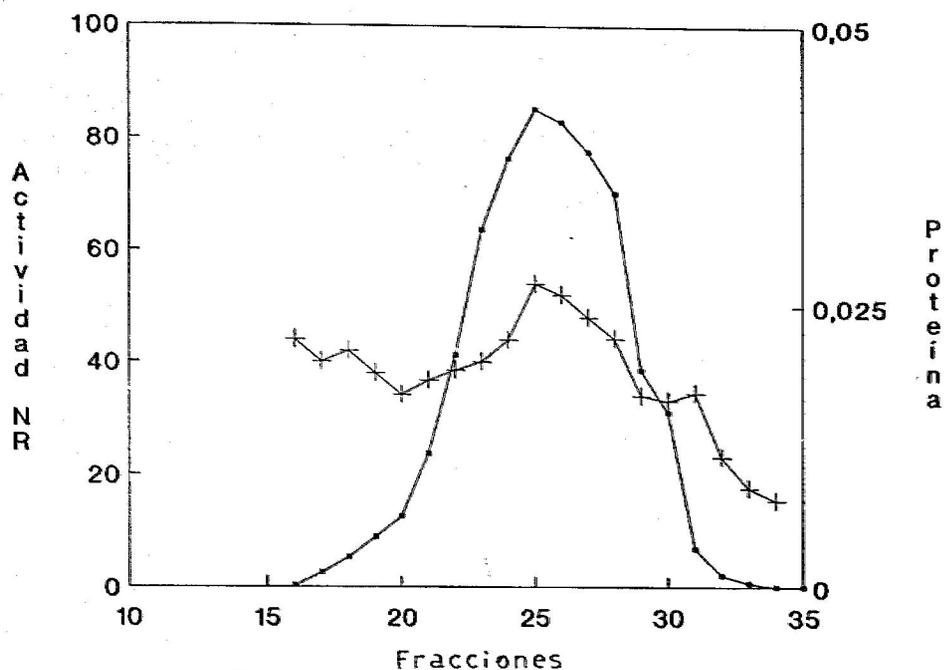
La detección de proteínas mediante tinción con  $\text{AgNO}_3$  de los geles de poliacrilamida correspondientes a la electroforesis de membranas solubilizadas de la mutante GRF110 demostró la presencia de proteínas contaminantes después de someterlas a cromatografía de intercambio iónico, y la purificación a homogeneidad del enzima NR de 160 kDa tras la cromatografía de exclusión molecular de las mismas (Fig. 12). Igualmente, la electroforesis de membranas solubilizadas de la mutante GRF3 puso en evidencia la existencia de otras proteínas contaminantes después de la cromatografía de intercambio iónico y la presencia exclusiva de dos polipéptidos de 160 kDa y 120 kDa tras la cromatografía de exclusión molecular (Fig. 13). El tamaño molecular de cada polipéptido purificado, calculado después de la tinción de los geles con  $\text{AgNO}_3$ , coincidió exactamente con los calculados cuando los geles se trataron para detectar actividad NR (Figs. 12 y 13).



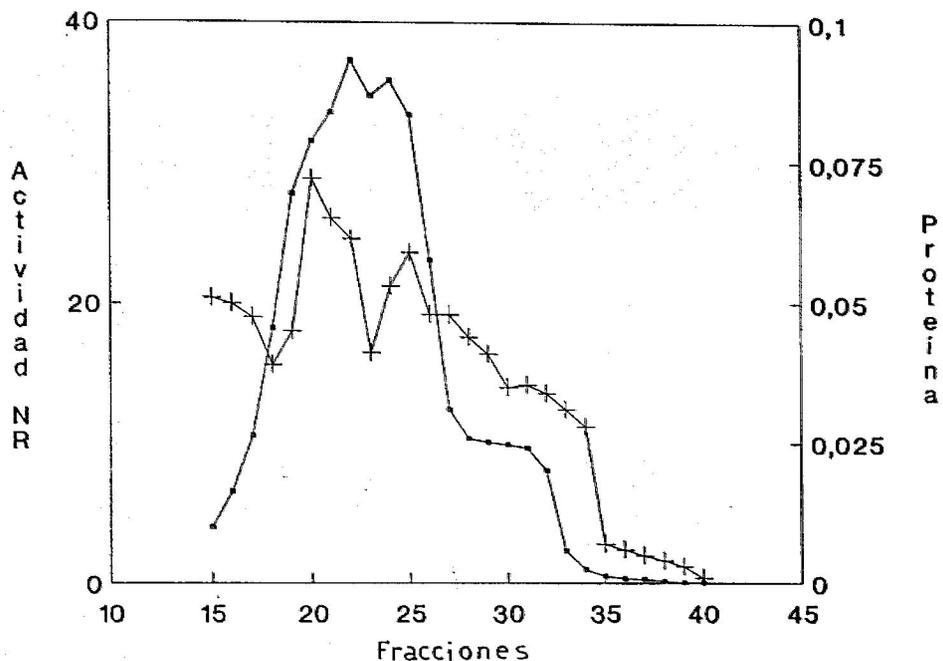
**Figura 8.** Fraccionamiento de las membranas solubilizadas con Triton X-100 de *Bradyrhizobium japonicum* GRF110 tras cromatografía de intercambio aniónico en Q-Sepharosa. A la columna se aplicaron aproximadamente 30 mg de proteína y el enzima se eluyó utilizando un gradiente lineal de NaCl desde 50 mM hasta 650 mM. Se recogieron fracciones de 5 ml en los que se determinó la actividad nitrato reductasa (-■-■-, nmol de NO<sub>2</sub>/ml x min) y la concentración de proteína (-+-+-, mg/ml).



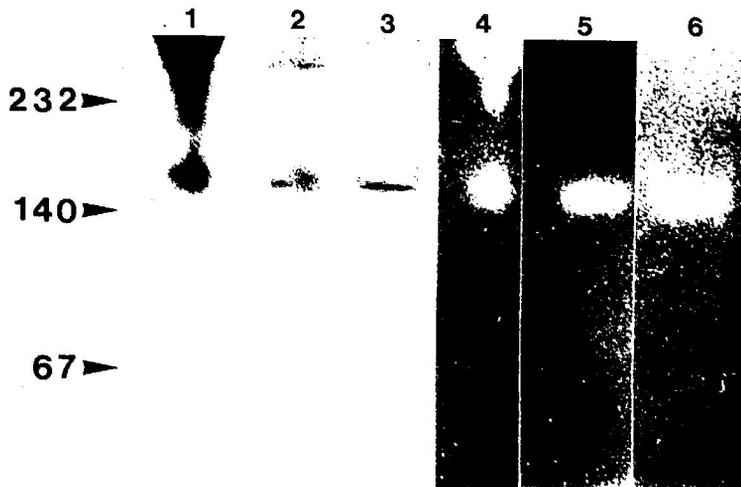
**Figura 9.** Fraccionamiento de las membranas solubilizadas con Triton X-100 de *Bradyrhizobium japonicum* GRF3 tras cromatografía de intercambio aniónico en Q-Sepharosa. A la columna se aplicaron aproximadamente 30 mg de proteína y el enzima se eluyó utilizando un gradiente lineal de NaCl desde 50 mM hasta 650 mM. Se recogieron fracciones de 5 ml en las que se determinó la actividad nitrato reductasa (-■-■-, nmol de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ml x min) y la concentración de proteína (-+-+-, mg/ml).



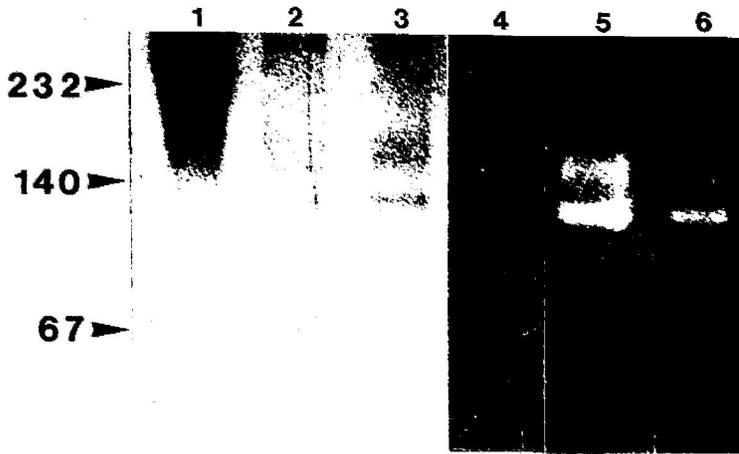
**Figura 10.** Fraccionamiento de las membranas de *B. japonicum* GRF110 tras cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-200. A la columna se aplicaron muestras de aproximadamente 5 mg de proteína obtenidas después de la cromatografía de intercambio iónico y previa concentración de las mismas. El enzima se eluyó utilizando tampón Tris/HCl 50 mM, NaCl 50 mM y Triton X-100 al 1%, pH 7.5. Se recogieron fracciones de 5 ml en las que se determinó la actividad nitrato reductasa (-■-■-, nmol de NO<sub>2</sub>/ml x min) y la concentración de proteína (-+-+-, mg/ml).



**Figura 11.** Fraccionamiento de las membranas solubilizadas de *B. japonicum* GRF3 tras cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-200. A la columna se aplicaron muestras de aproximadamente 4 mg de proteína obtenidas después de la cromatografía de intercambio iónico y previa concentración de las mismas. El enzima se eluyó utilizando tampón Tris/HCl 50 mM, NaCl 50 mM y Triton X-100 al 1%, pH 7.5. Se recogieron fracciones de 5 ml en las que se determinó la actividad nitrato reductasa (-●-●-, nmol de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ml x min) y la concentración de proteína (-+-+-, mg/ml).



**Figura 12.** Detección de proteínas y actividad nitrato reductasa en membranas de *B. japonicum* GRF110 durante la purificación del enzima de 160. Las células se cultivaron en LMB con glutamato y se incubaron microaeróbicamente con nitrato durante 35 h. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles nativos de poliacrilamida (4% al 10%) en presencia de 0.1% de Triton X-100. El enzima se detectó por actividad (carriles 4 a 6) y se fijó con 5% de cloruro de trifenil tetrazolio. Las proteínas (carriles 1 a 3) en las muestras de membranas solubilizadas se detectaron mediante tinción con azul Coomassie y las muestras obtenidas después de cada cromatografía mediante tinción con nitrato de plata. Carriles 1 y 4, membranas solubilizadas con Triton X-100; carriles 2 y 5, muestras obtenidas después de cromatografía de intercambio iónico; carriles 3 y 6, muestras obtenidas después de cromatografía de exclusión molecular. Las flechas indican el tamaño molecular de las proteínas patrón descritas en la Fig. 5.



**Figura 13.** Detección de proteínas y actividad nitrato reductasa en membranas de *B. japonicum* GRF3 durante la purificación del enzima de 200 kDa. Las células se cultivaron en LMB con glutamato y se incubaron microaeróbicamente con nitrato durante 35 h. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles nativos de poliacrilamida (4% al 10%) en presencia de 0.1% de Triton X-100. El enzima se detectó por actividad (carriles 4 a 6) y se fijó con 5% de cloruro de trifenil tetrazolio. Las proteínas (carriles 1 a 3) en las muestras de membranas solubilizadas se detectaron mediante tinción con azul Coomassie y las de las muestras obtenidas después de cada cromatografía mediante tinción con nitrato de plata. Carriles 1 y 4, membranas solubilizadas con Triton X-100; carriles 2 y 5, muestras obtenidas después de cromatografía de intercambio iónico; carriles 3 y 6, muestras obtenidas después de cromatografía de exclusión molecular. Las flechas indican el tamaño molecular de las proteínas patrón descritas en la Fig. 5.

**Tabla 4.** Purificación del enzima NR de 160 kDa de las membranas de *Bradyrhizobium japonicum* GRF110.

Paso de purificación	Proteína total(mg)	Actividad total	Actividad específica	Rendimiento (%)	Purificación
Membranas	132.6	28536	215	100	1
Membranas solubilizadas	31.3	24806	792	86.9	3.7
Q-Sepharosa	5.3	11412	2153	40.0	10.0
Sephacryl S-200	1.7	7884	4638	27.6	21.5

La actividad específica se expresa en U/mg de prot. La actividad total se expresa en U.  
 U= nmol de NO<sub>2</sub>/min.

**Tabla 5.** Purificación del enzima NR de 200 kDa de las membranas de *Bradyrhizobium japonicum* GRF3.

Paso de purificación	Proteína total(mg)	Actividad total	Actividad específica	Rendimiento Purificación (%)	Purificación
Membranas	136.7	37134	272	100	1
Membranas solubilizadas	28.6	30827	1078	82.9	3.9
Q-Sepharosa	4.0	13411	3353	36.1	12.3
Sephacryl S-200	2.3	9926	4316	26.7	15.9

La actividad específica se expresa en U/mg de prot. La actividad total se expresa en U.  
 U= nmol de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/min.

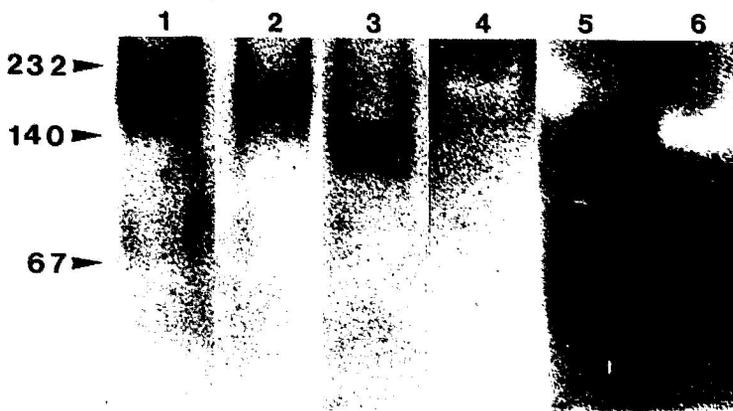
## 8. Composición en subunidades de los enzimas nitrato reductasa.

Antes de iniciar el estudio relativo a la composición en subunidades de cada uno de los tres polipéptidos con actividad NR fue necesario obtener, por separado, las proteínas de 160 kDa y 120 kDa de las membranas de la mutante GRF3 (Fig. 13). Para ello, las fracciones con actividad NR ( $\geq 10$  nmol de  $\text{NO}_2^-/\text{mg prot.} \times \text{min}$ ) obtenidas después de la cromatografía de exclusión molecular de las membranas de la mutante GRF3 se concentraron mediante ultrafiltración (apartado 10.3 de Material y Métodos) hasta un volumen aproximado de 5 ml ( $\approx 2$  mg de proteína). De ese volumen se tomaron alícuotas de 60  $\mu\text{l}$  (24  $\mu\text{g}$  de proteína) que se emplearon para cargar cada uno de los pocillos de un gel nativo de poliacrilamida. Después de la electroforesis (apartado 11.1 de Material y Métodos) el gel se empleó para detectar los enzimas NR (apartado 12.1 de Material y Métodos). Mientras los enzimas fueron visibles, debido a la oxidación del ditionito, las bandas correspondientes del gel se cortaron con un escalpelo, se reunieron aquellas del mismo Mr y se sometieron a electroelución (apartado 11.3 de Material y Métodos). Las muestras purificadas del enzima de 160 kDa de las membranas de la mutante GRF110 también se sometieron a similares procesos de concentración, electroforesis en geles nativos de poliacrilamida (alícuotas de 30  $\mu\text{l}$ , 12  $\mu\text{g}$  de proteína) y electroelución, de modo que los tres enzimas NR estuvieron sometidos a idénticos procesos.

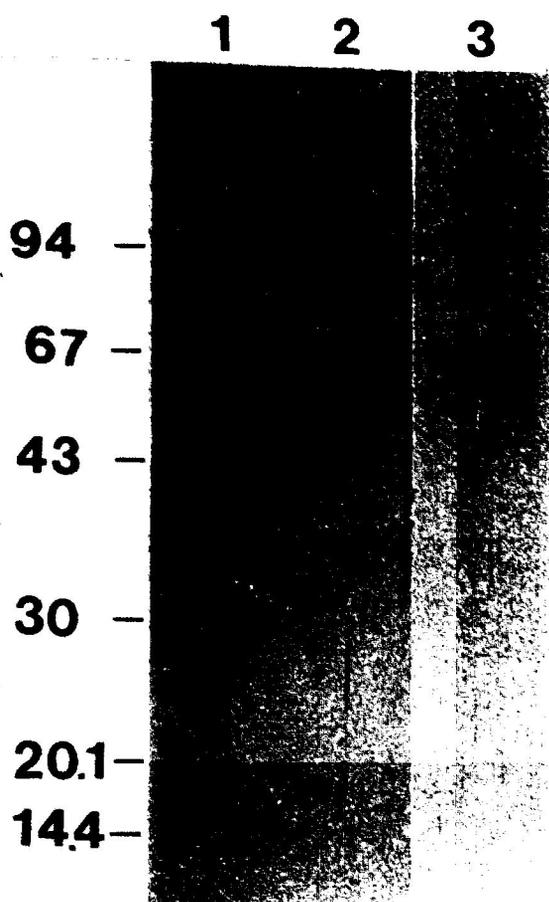
Después de la electroelución, cada proteína, recogida en un volumen de eluido de alrededor de 400  $\mu\text{l}$ , se ajustó a una concentración final aproximada de 260  $\mu\text{g/ml}$  y se comprobó de nuevo, mediante electroforesis en geles nativos de poliacrilamida, la presencia, expresión y pureza de cada enzima NR (Fig. 14). A partir de las muestras obtenidas después de la electroelución, la electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (apartado 11.2 de Material y Métodos) de alícuotas que contenían 0.4-0.6  $\mu\text{g}$  de proteína de cada uno de los enzimas NR reveló que los polipéptidos de 160 kDa y 120 kDa de las membranas de GRF3 se componían cada uno de 4 subunidades cuyos Mr calculados fueron de 117 kDa, 68 kDa, 59 kDa y 56 kDa (Fig. 15). No obstante, la concentración relativa de cada subunidad, calculada en base a la correspondiente área parcial obtenida mediante análisis densitométrico del gel, varió en cada enzima (Fig. 16).

Así, la subunidad de 117 kDa representó el 70% y el 34% del total de los polipéptidos de los enzimas de 160 kDa y 120 kDa, respectivamente (Fig. 16). Igualmente, mientras que el polipéptido de 59 kDa apenas fue representativo (2%) en el enzima de 160 kDa, constituyó el 24% del enzima de 120 kDa (Fig. 16). Los polipéptidos de 68kDa y 56 kDa presentaron menores diferencias en cuanto a su participación relativa en la composición de cada uno de los dos enzimas (Fig. 16).

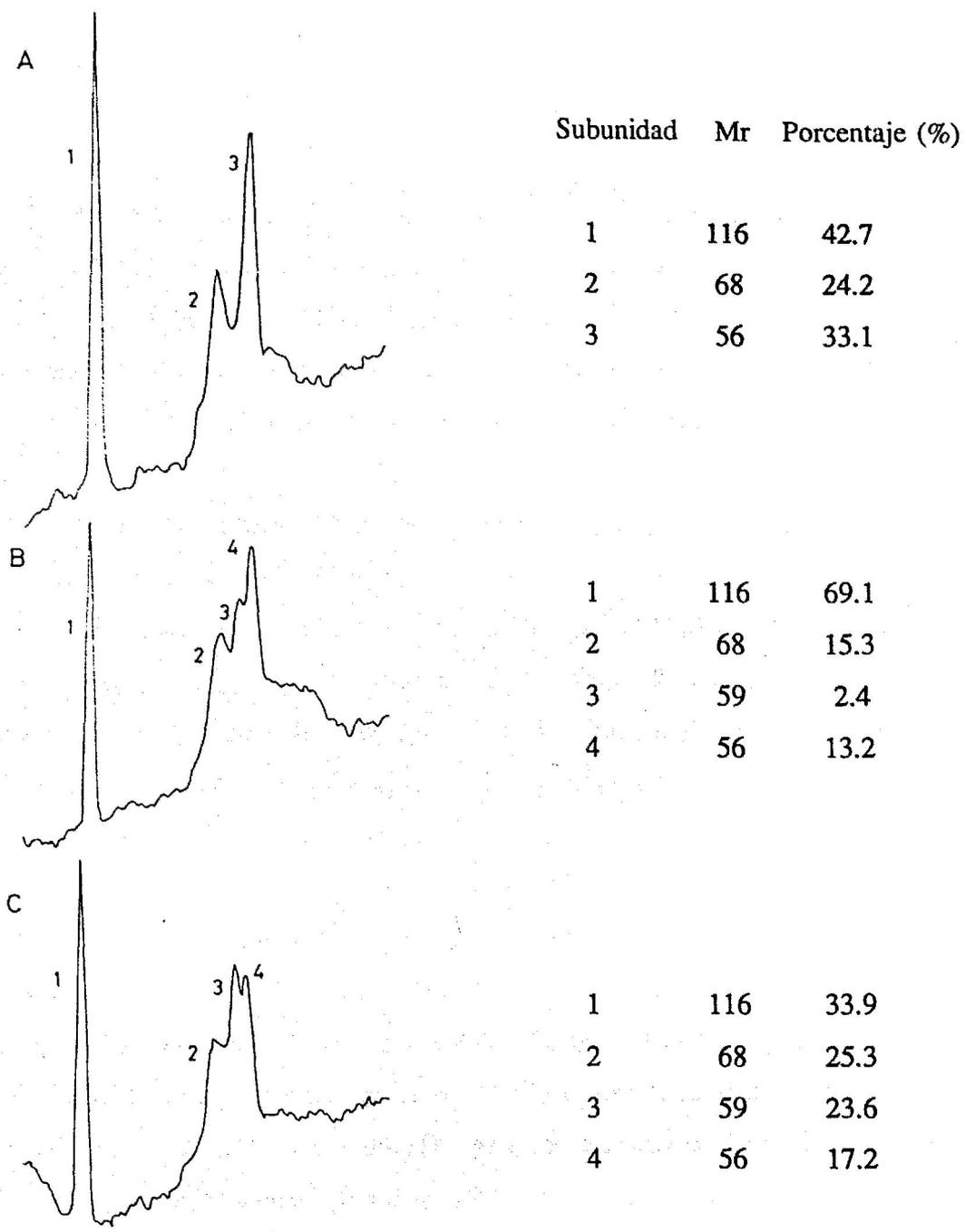
Por otra parte, el enzima de 160 kDa de las membranas de la mutante GRF110 estuvo formado por tres subunidades cuyos Mr calculados fueron de 117 kDa, 68 kDa y 56 kDa (Fig. 15), no pudiéndose detectar, a pesar de los esfuerzos realizados, el polipéptido de 59 kDa (Fig. 15). La concentración relativa de cada polipéptido fue también diferente a la de la correspondiente subunidad de los enzimas de la mutante GRF3 (Fig. 16).



**Figura 14.** Detección del enzima de 160 kDa y de las dos especies activas (160 kDa y 120 kDa) del enzima de 200 kDa. Las muestras (24  $\mu\text{g}$  de proteína) de los enzimas de 160 kDa y 200 kDa purificados después de cromatografía de exclusión molecular se sometieron a electroforesis en geles nativos de poliacrilamida (4% al 10%) en presencia de 0.1% de Triton X-100. Las bandas con actividad nitrato reductasa se cortaron del gel y se sometieron a electroelución. Las muestras de cada enzima ( $\approx 0.5 \mu\text{g}$  de proteína) después de la electroelución se sometieron a electroforesis. Las proteínas se revelaron mediante tinción con nitrato de plata (carriles 1 a 3). Los enzimas se detectaron por actividad (carriles 4 a 6). Carriles 1 y 4, enzima de 160 kDa; carriles 2 y 5, forma de 160 kDa del enzima de 200 kDa; carriles 3 y 6, forma de 120 kDa del enzima de 200 kDa.



**Figura 15.** Composición en subunidades del enzima de 160 kDa y de las dos especies (160 kDa y 120 kDa) del enzima de 200 kDa. Las muestras ( $\approx 0.5 \mu\text{g}$  de proteína) de cada enzima purificado se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes (SDS) de poliacrilamida (7% al 15%). Carriles: 1, enzima de 160 kDa; 2, especie de 160 kDa del enzima de 200 kDa; 3, especie de 120 kDa del enzima de 200 kDa. Los números indican el tamaño molecular de las siguientes proteínas patrón: fosforilasa *b* (94 kDa), albúmina bovina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20.1 kDa) y  $\alpha$ -lactalbúmina (14.4 kDa).



**Figura 16.** Densitogramas representativos de la composición en subunidades de los enzimas de 160 kDa (A) y de las especies de 160 kDa (B) y de 120 kDa (C) del enzima de 200 kDa. La densitometría se realizó empleando una longitud de onda de 560 nm. Los números indican las subunidades de cada enzima. Se incluye el tamaño molecular de cada subunidad así como su concentración relativa expresada en porcentaje.

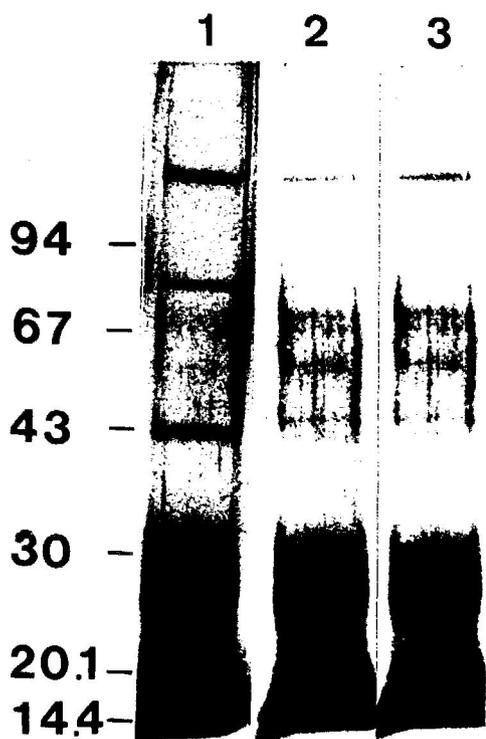
## 9. Composición en péptidos de los enzimas nitrato reductasa.

La composición peptídica de los enzimas NR se determinó después de tratar alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  ( $\approx$  25  $\mu\text{g}$  de proteína) de cada uno de los enzimas purificados con igual volumen de tripsina (apartado 13 de Material y Métodos), someter muestras de 15  $\mu\text{l}$  a electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (apartado 11.2 de Material y Métodos) y teñir los geles con  $\text{AgNO}_3$  (apartado 12.2 de Material y Métodos).

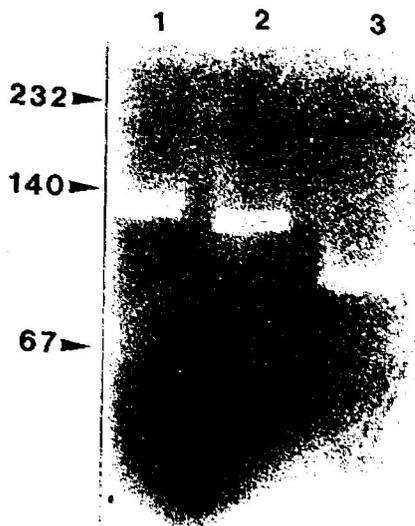
El tratamiento con tripsina fragmentó el enzima de 160 kDa de la mutante GRF110 en cinco péptidos de  $M_r$  117 kDa, 78 kDa, 68 kDa, 57 kDa y 43 kDa (Fig. 17). Similarmente, la tripsina convirtió los enzimas de 160 kDa y 120 kDa de la mutante GRF3, en ambos casos, en seis péptidos de idéntico  $M_r$ : 117 kDa, 78 kDa, 68 kDa, 57 kDa, 46 kDa y 43 kDa (Fig. 17). De estos 6 péptidos, 5 de ellos fueron idénticos en su desarrollo electroforético a los 5 péptidos del enzima de 160 kDa de la mutante GRF110, mientras que el sexto péptido, de 46 kDa, no se pudo detectar en este último enzima (Fig. 17).

Después del tratamiento con tripsina, la electroforesis en geles nativos de poliacrilamida de muestras de 15  $\mu\text{l}$  de cada uno de los enzimas, y posterior tinción de los geles para revelar actividad NR, indicó que los tamaños moleculares de los polipéptidos que retenían la actividad catalítica fueron de 130 kDa para el enzima de 160 kDa de la mutante GRF110 y de 118 kDa y 89 kDa, para los enzimas de 160 kDa y 120 kDa, respectivamente, de la mutante GRF3 (Fig. 18).

Aunque es posible que el tratamiento con tripsina de los enzimas NR pudiera originar péptidos de  $M_r$  inferior a 30 kDa, no se pudo realizar el análisis comparativo entre ellos debido a la presencia de tripsina ( $M_r \approx$  23 kDa) en las muestras (Fig. 17).



**Figura 17.** Composición en péptidos del enzima de 160 kDa y de las dos especies (160 kDa y 120 kDa) del enzima de 200 kDa. Después del tratamiento con tripsina, las muestras (1.9  $\mu\text{g}$  de proteína) se sometieron a electroforesis en geles desnaturalizantes (SDS) de poliacrilamida (7% al 15%). Los péptidos se detectaron mediante tinción con nitrato de plata. Carriles: 1, enzima de 160 kDa; 2, especie de 160 kDa del enzima de 200 kDa; 3, especie de 120 kDa del enzima de 200 kDa. Los números indican el tamaño molecular de las proteínas patrón descritas en la Fig. 15.



**Figura 18.** Detección de los polipéptidos con actividad nitrato reductasa después del tratamiento con tripsina del enzima de 160 kDa y de las especies (160 kDa y 120 kDa) del enzima de 200 kDa. Las muestras (1.9  $\mu$ g de proteína) se sometieron a electroforesis en geles nativos de poliacrilamida (4% al 10%) en presencia de 0.1% de Triton X-100. Las muestras se revelaron por actividad. Carriles: 1, enzima de 160 kDa; 2, especie de 160 kDa del enzima de 200 kDa; 3, especie de 120 kDa del enzima de 200 kDa. Las flechas indican el tamaño molecular de las proteínas patrón descritas en la Fig. 5.

## **10. Hibridación de los enzimas nitrato reductasa con anticuerpos policlonales.**

Se emplearon muestras de 20  $\mu$ l ( $\approx$  5  $\mu$ g de proteína) obtenidas después de la electroelución. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y, posteriormente, se transfirieron a filtros de nitrocelulosa (apartado 14.1 de Material y Métodos). El inmunorevelado de los filtros de nitrocelulosa (apartado 14.2 de Material y Métodos) con anticuerpos anti-nitrato reductasa respiratoria de *P. stutzeri* mostró que dichos anticuerpos reconocieron la subunidad de 117 kDa del enzima de 160 kDa de la mutante GRF110 (Fig. 19) así como el polipéptido de 59 kDa del enzima de 120 kDa de la mutante GRF3 (Fig. 19). No se observó reacción cruzada de los anticuerpos con ninguna subunidad del enzima de 160 kDa de la mutante GRF3 (Fig. 19).

## **11. Caracterización de los enzimas nitrato reductasa.**

### **11.1. Punto isoelectrico.**

La determinación del pH isoelectrico (pI) se efectuó utilizando la técnica de enfoque isoelectrico en gel de poliacrilamida (apartado 11.4 de Material y Métodos), empleando muestras de 20  $\mu$ l ( $\approx$  5  $\mu$ g de proteína) después de la electroelución. En la Fig. 20 se muestra un desarrollo electroforético representativo de los enzimas NR purificados después de revelar los geles mediante tinción con nitrato de plata. El pI se calculó utilizando como referencia la recta de calibrado que se obtuvo relacionando los valores del gradiente de pH establecido con su distancia relativa al ánodo. La interpolación de la distancia de migración al ánodo de cada enzima permitió calcular el punto isoelectrico correspondiente a cada uno de ellos, que fue de 6.42 para el enzima de 160 kDa de la mutante GRF110, 6.61 para el enzima de 160 kDa de la mutante GRF3 y 6.75 para el enzima de 120 kDa de la mutante GRF3.

## 11.2. Cinética enzimática.

Estos estudios se abordaron con el objeto de conocer la constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) de la reacción catalizada por cada uno de los enzimas NR. Para ello, se utilizaron muestras obtenidas después de la electroelución que contenían aproximadamente 52  $\mu\text{g}$  de proteína. Las muestras se incubaron en condiciones óptimas de ensayo durante tiempos diferentes. En los tres casos, los resultados obtenidos fueron similares, por lo que sólo se representa la cinética del enzima de 160 kDa de la mutante GRF110 (Fig. 21). La producción de nitrito, como se puede observar en la Fig. 21, fue lineal en función del tiempo hasta los 10 min de incubación.

Para el estudio de la cinética enzimática de cada enzima en función del sustrato se utilizaron, igualmente, muestras de 52  $\mu\text{g}$  de proteína que se incubaron durante 10 min en presencia de diferentes concentraciones de  $\text{KNO}_3$ . Los dos enzimas presentaron una cinética normal (hiperbólica) de Michaelis-Menten (Figs. 22A y 23A). La representación doble recíproca del efecto de la concentración de nitrato sobre la actividad NR permitió calcular la  $K_M$  de cada enzima que fue de  $3 \times 10^{-4}$  M para el enzima de 160 kDa de la mutante GRF110 (Fig. 22B) y de  $4.3 \times 10^{-4}$  M para el enzima de 200 kDa de la mutante GRF3 (Fig. 23B).

## 11.3. Inhibidores.

Se emplearon cianuro potásico y azida sódica como compuestos inhibidores del enzima NR. Los experimentos se realizaron, como en el apartado anterior, utilizando muestras de 52  $\mu\text{g}$  de proteína de cada uno de los enzimas. Las muestras se preincubaron durante 10 min en presencia de distintas concentraciones (0-0.5 mM) de cada inhibidor antes de proceder a la determinación de actividad NR (apartado 15.1 de Material y Métodos).

La azida afectó drásticamente la actividad NR de cada uno de los dos enzimas ya que la menor concentración utilizada (0.01 mM) disminuyó la actividad de los mismos en

más del 90% (Tabla 6). A una concentración de 0.05 mM el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática, independientemente del enzima utilizado, superó el 95% (Tabla 6).

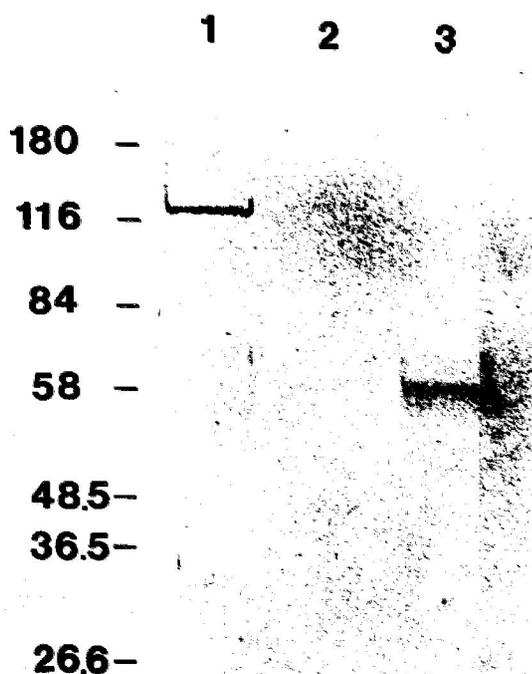
El efecto del cianuro sobre la actividad NR no fue tan intenso como el de la azida y varió con el enzima utilizado (Tabla 6). A una concentración de 0.01 mM, el porcentaje de inhibición de la actividad NR no superó el 10% (Tabla 6), aunque llegó a ser de aproximadamente del 75% cuando el cianuro se empleó a una concentración de 0.5 mM (Tabla 6).

#### **11.4. Actividad del cofactor de molibdeno.**

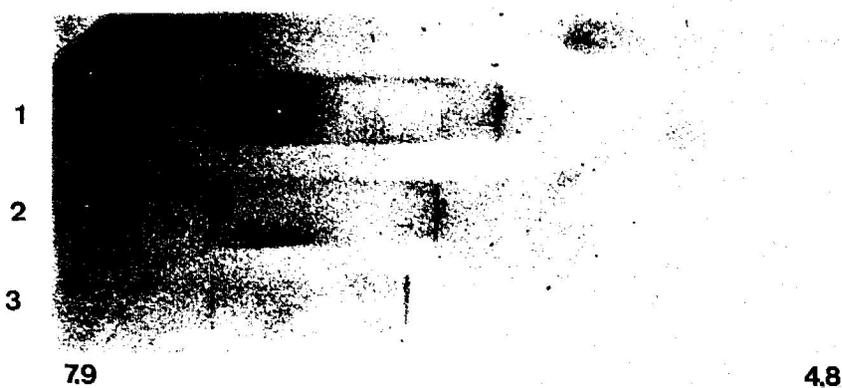
La determinación de la actividad del cofactor de molibdeno, realizada mediante el ensayo de complementación de la mutante *nit-1* de *Neurospora crassa* (apartado 15.3 de Material y Métodos), se determinó en muestras de cada enzima obtenidas después de cromatografía de exclusión molecular ( $\approx 350 \mu\text{g}$  de prot/ml). A efectos comparativos se utilizaron también muestras de la cepa parental *B. japonicum* PJ17. Los enzimas de la cepa parental expresaron los mayores valores de actividad del cofactor de molibdeno (23.3 nmol de  $\text{NO}_2^-/\text{mg}$  de prot x min), seguido de los enzimas de la mutante GRF3 (8.6 nmol de  $\text{NO}_2^-/\text{mg}$  de prot x min) y, en último lugar, el enzima de la mutante GRF110 (5.7 nmol de  $\text{NO}_2^-/\text{mg}$  de prot x min).

#### **11.5. Espectro de absorción.**

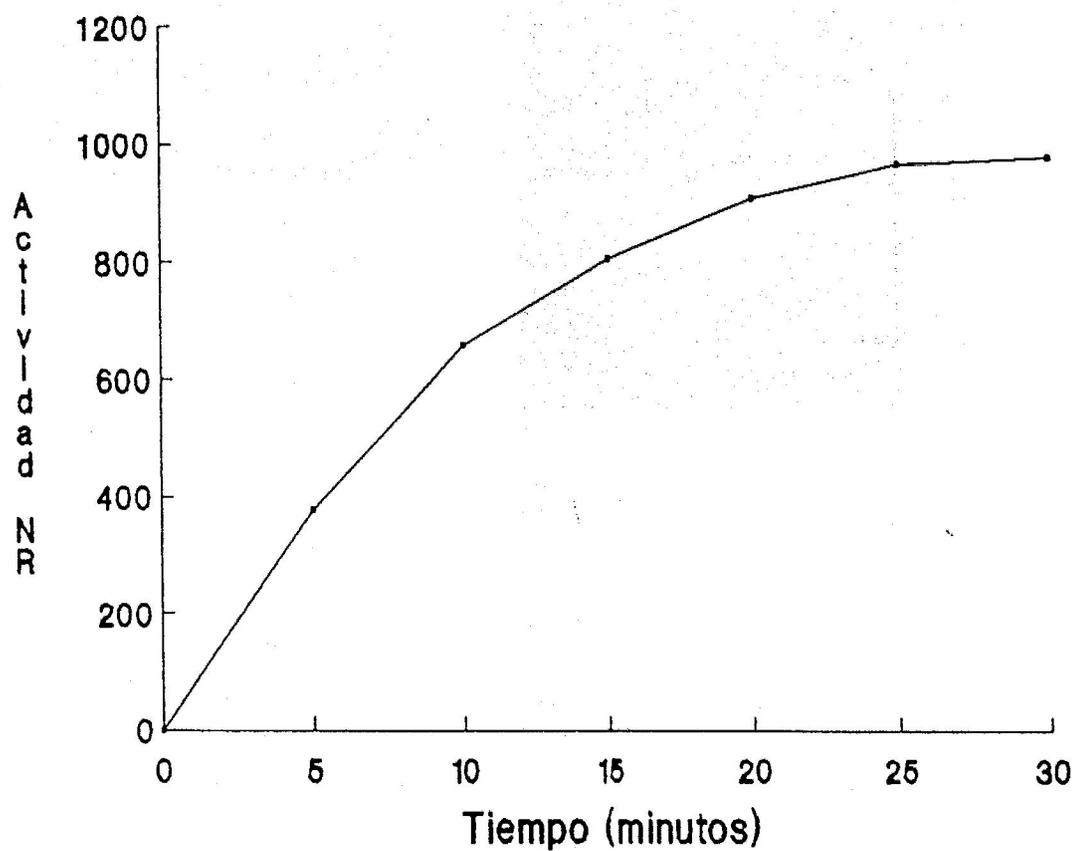
Los espectros de absorción visible-UV de muestras de los enzimas de las mutantes GRF110 y GRF3 obtenidas, como en el apartado anterior, después de cromatografía de exclusión molecular, se representan en la Fig. 24. En ambos casos, apareció un máximo de absorbancia a 412 nm, típico de proteínas que contienen grupos sulfo-férricos y no se pudo detectar ningún pico de absorción en la zona de los 550 nm, que hubiera sido indicativo de la presencia de un citocromo.



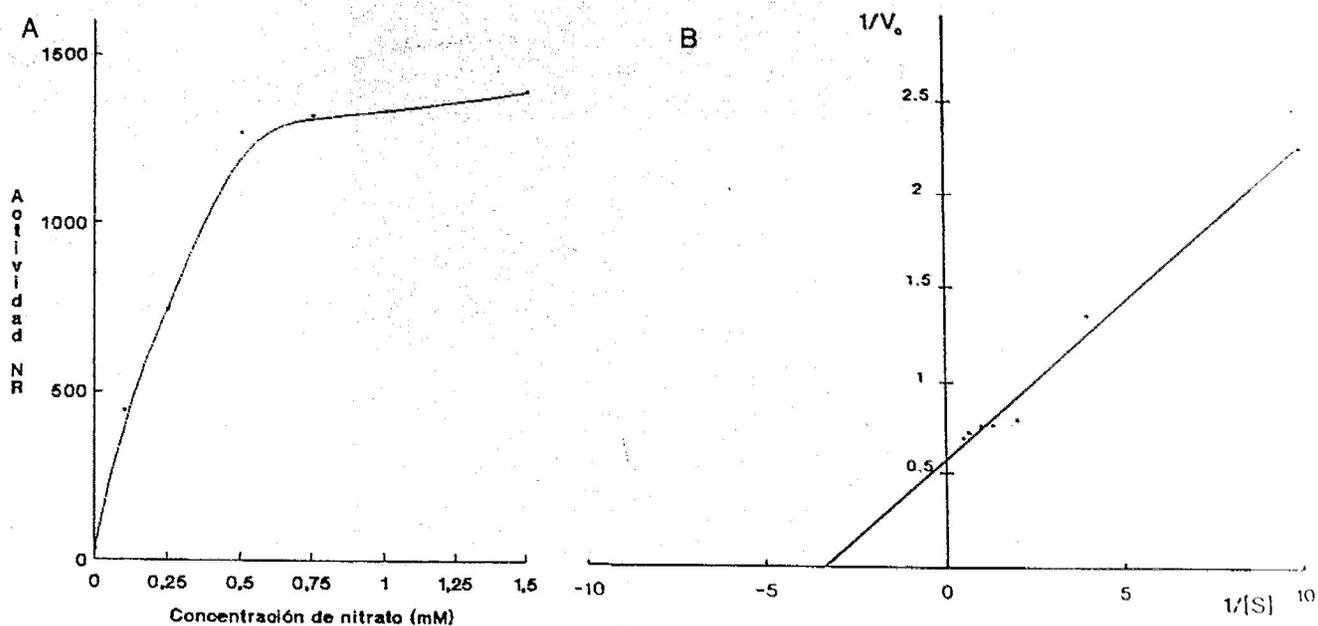
**Figura 19.** Reacción cruzada del enzima de 160 kDa y de las dos especies (160 kDa y 120 kDa) del enzima de 200 kDa con anticuerpos anti-nitrato reductasa respiratoria de *Pseudomonas stutzeri*. Las muestras (5 µg de proteína) se sometieron a electroforesis en geles desnaturalizantes (SDS) de poliacrilamida (7% al 15%). Después de la transferencia de las subunidades a filtros de nitrocelulosa y tratamiento con anti-nitrato reductasa de *P. stutzeri*, los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron mediante inmunorevelado con anti-IgG de conejo conjugada a peroxidasa. Carriles: 1, enzima de 160 kDa; 2, especie de 160 kDa del enzima de 200 kDa; 3, especie de 120 kDa del enzima de 200 kDa. Los números indican el tamaño molecular de las siguientes proteínas patrón:  $\alpha_2$ -macroglobulina (180 kDa),  $\beta$ -galactosidasa (116 kDa), fructosa-6-fosfato quinasa (84 kDa), piruvato quinasa (58 kDa), fumarasa (48.5 kDa), lactato deshidrogenasa (36.5 kDa) y triosa-fosfato isomerasa (26.6 kDa).



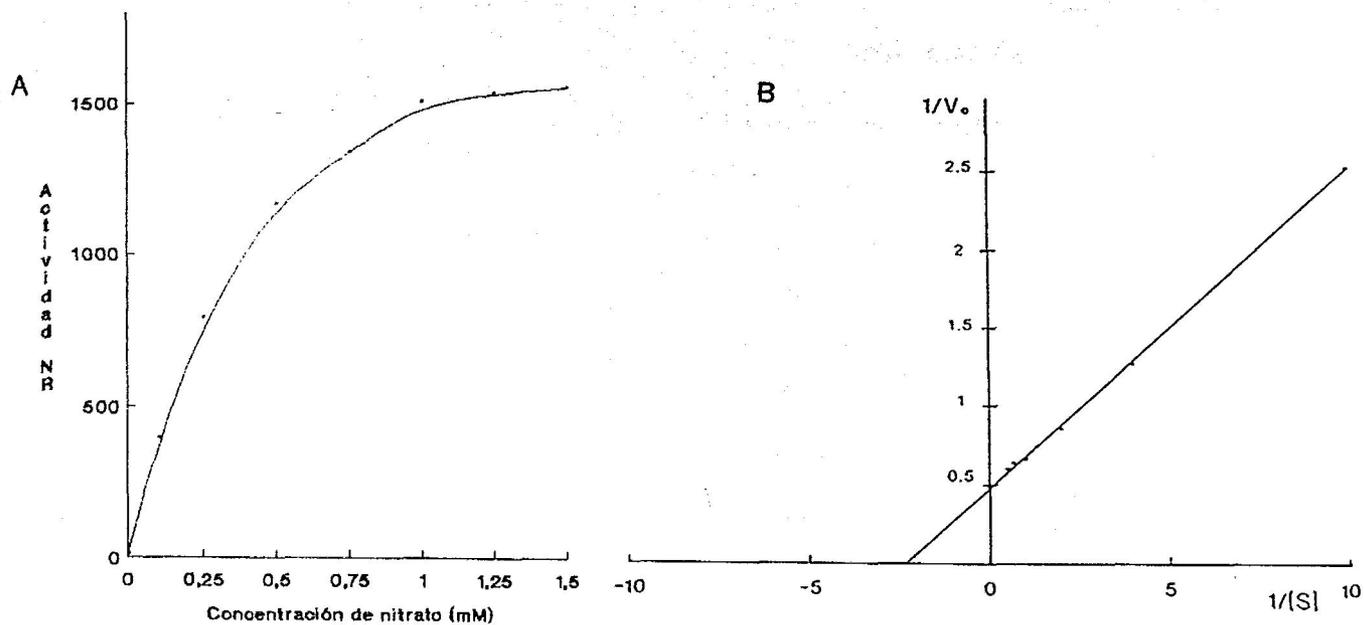
**Figura 20.** Enfoque isoelectrico del enzima de 160 kDa y de las dos especies (160 kDa y 120 kDa) del enzima de 200 kDa. Las muestras (5  $\mu$ g de proteína) se sometieron a electroforesis en geles nativos de poliacrilamida (7%) en presencia de 5% de anfolinas (rango de pH 3.5-10). Los enzimas se detectaron mediante tinción con nitrato de plata después de eliminar las anfolinas. Carriles: 1, enzima de 160 kDa; 2, especie de 160 kDa del enzima de 200 kDa; 3, especie de 120 kDa del enzima de 200 kDa.



**Figura 21.** Cinética en función del tiempo del enzima de 160 kDa. Las muestras (52  $\mu\text{g}$  de proteína) se incubaron durante 30 min en condiciones óptimas de ensayo. La actividad se expresa en  $\text{nmol de NO}_2/\text{mg prot.} \times \text{min}$ . Los valores que se indican representan la media de tres determinaciones independientes con tres repeticiones cada una.



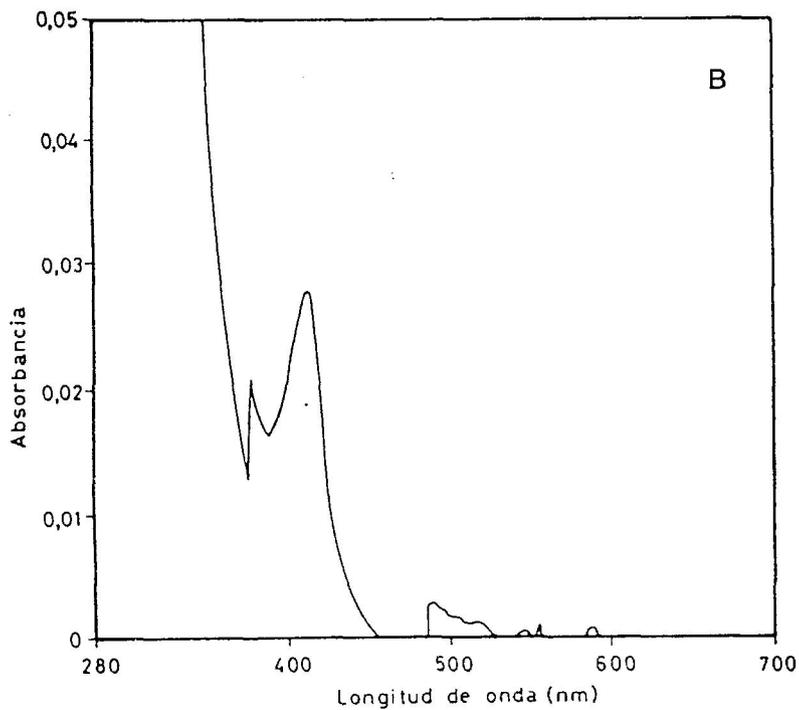
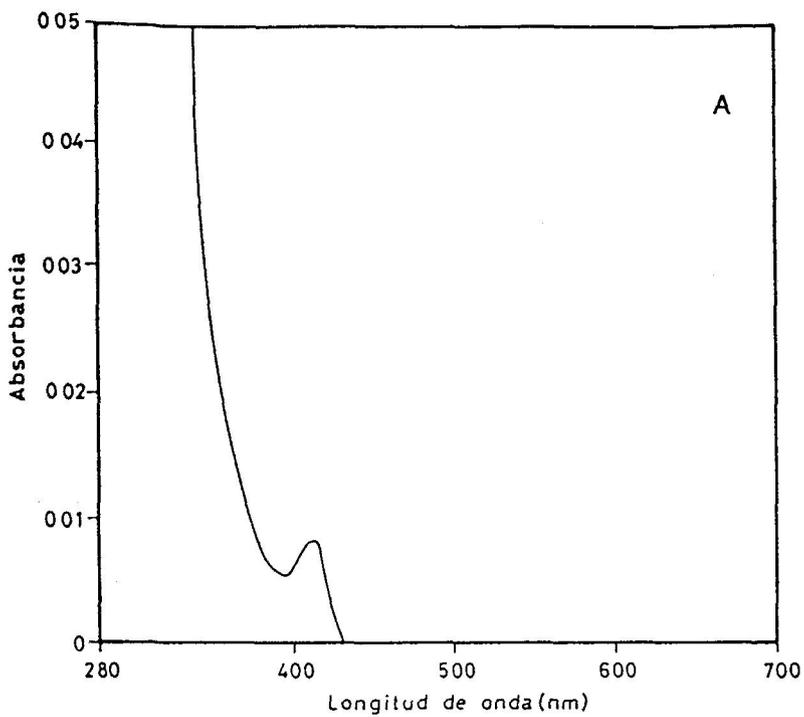
**Figura 22.** A. Cinética en función de la concentración de nitrato del enzima de 160 kDa. B. Determinación de la  $K_M$  del enzima mediante la representación gráfica de la ecuación de Lineweaver-Burk. Las muestras (52  $\mu$ g de proteína) se incubaron durante 10 min en condiciones óptimas de ensayo. La actividad se expresó en nmol de  $\text{NO}_2$ /mg prot x min. Los valores que se indican representan la media de tres determinaciones independientes con tres repeticiones cada una.



**Figura 23.** A. Cinética en función de la concentración de nitrato del enzima de 200 kDa. B. Determinación de la  $K_M$  del enzima mediante la representación gráfica de la ecuación de Lineweaver-Burk. Las muestras (52  $\mu\text{g}$  de proteína) se incubaron durante 10 min en condiciones óptimas de ensayo. La actividad se expresó en  $\text{nmol de NO}_2^-/\text{mg prot} \times \text{min}$ . Los valores que se indican representan la media de tres determinaciones independientes con tres repeticiones cada una.

**Tabla 6.** Efecto del cianuro y de la azida sobre la actividad de los enzimas de 160 kDa y 200 kDa de las membranas de *B. japonicum*. La actividad se expresa en porcentaje respecto a la del control (nmol de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/mg prot. x min). Los valores que se indican representan la media de tres determinaciones independientes con tres repeticiones cada una.

Tratamiento	Concentración (mM)	Inhibición (%)	
		Enzima de 160 kDa	Enzima de 200 kDa
NaN <sub>3</sub>	0	0 (1274)	0 (1305)
	0.01	91.1	90.3
	0.05	95.4	97.1
	0.10	96.3	97.8
	0.25	96.4	98.2
	0.50	96.6	98.3
	KCN	0	0 (1274)
0.01		0	0
0.05		10.2	3.9
0.10		25.4	26.2
0.25		53.0	52.5
0.50		73.6	76.9



**Figura 24.** Espectro de absorción visible-UV del enzima de 160 kDa (A) y del de 200 kDa (B). Se emplearon muestras de 460  $\mu$ g de proteína. Como referencia se utilizó el mismo tampón en el que se eluyeron las muestras (Tris/HCl 50 mM, NaCl 50 mM y 1% de Triton X-100).

## **DISCUSSION**

Las células de *Bradyrhizobium japonicum* PJ17 expresaron actividad nitrato reductasa (NR) constitutiva cuando se cultivaron en medio definido LMB con glutamato como única fuente de nitrógeno (Fig. 3). Aunque otros autores han demostrado la expresión de tal actividad en otras especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Manhart y Wong, 1979; Becana *et al.* 1989), nuestros resultados amplían esos conocimientos al indicar que la actividad NR fue transitoria, ya que disminuyó con el tiempo de cultivo hasta que no fue posible su detección (Fig. 3). Estos datos coinciden con los presentados por Howitt *et al.* (1988) quienes observaron que la actividad NR constitutiva de *Bradyrhizobium (Parasponia)* sp. ANU289 fue mayor al inicio de la fase logarítmica de crecimiento que al final de dicha etapa de crecimiento.

El papel que desempeña la actividad NR constitutiva es desconocido, y no parece que sea funcional en condiciones fisiológicas. Esta sugerencia se basa, primero, en que fue necesaria la presencia en el medio de incubación de un inductor, el nitrato, para la síntesis de actividad NR asimilatoria (Fig. 3), y, segundo, en que la inclusión en el medio de un antibiótico inhibidor de la síntesis proteica impidió la expresión de tal actividad (Fig. 3). Idénticos resultados se obtuvieron cuando las células se incubaron aeróbica o microaeróbicamente, en presencia de nitrato, con y sin antibiótico en el medio de incubación (Fig. 4). Estos hechos indican que la asimilación de nitrato por *B. japonicum* PJ17 requirió la síntesis *de novo* del enzima NR implicado en su reducción y no se debió a la actividad de otros enzimas preexistentes en las células. A favor de la hipótesis de la no funcionalidad del enzima NR constitutivo está la demostración de que el tamaño molecular relativo (Mr), estimado mediante cromatografía de exclusión molecular, del enzima NR de células de *B. japonicum* L-236 cultivadas con glutamato fue de 78 kDa, mientras que el del enzima NR de células cultivadas aeróbicamente con nitrato fue de 236 kDa (Delgado *et al.* 1992). El nitrato fue un inductor efectivo de la síntesis de NR ya que su adición al medio al tercer día de cultivo incrementó la actividad NR 3.6 veces respecto a la de las células no tratadas con nitrato (Fig. 3). La adición de amonio no indujo actividad NR, mientras que la presencia simultánea de nitrato y amonio en el medio de incubación aumentó la actividad 1.5 veces respecto a la de células cultivadas con glutamato (Fig. 3). En cianobacterias, bajas concentraciones (10-50  $\mu$ M) de amonio inhiben la

utilización de nitrato, debiéndose este efecto negativo no al amonio *per se* sino a los componentes orgánicos nitrogenados resultantes de su asimilación (Flores *et al.* 1980; Herrero *et al.* 1985). Por otra parte, el amonio también inhibe el transporte de nitrato al interior de *Synechococcus* sp. y *Anacystis nidulans* al reprimir la síntesis de un polipéptido de  $\approx$  45-48 kDa implicado en el transporte activo de ese anión (Madueño *et al.* 1988; Omata *et al.* 1989; Sivak *et al.* 1989). Igualmente, se ha demostrado que el amonio reprime tanto la síntesis de la NR (Mérida *et al.* 1990; Vega-Palas *et al.* 1990) como su actividad (Florencio *et al.* 1987; Mérida *et al.* 1990). Por tanto, aunque el  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  indujo actividad NR en *B. japonicum* PJ17 (Fig. 3), es posible que el efecto del amonio sobre la actividad NR de *Bradyrhizobium japonicum* sea similar al descrito en cianobacterias, y que el incremento de actividad observado se debiera a la entrada, por difusión pasiva a favor del gradiente de concentración, del nitrato al interior celular y la consecuente inducción por sustrato de la actividad NR.

El efecto inductor del nitrato sobre la actividad NR de *B. japonicum* PJ17 fue mucho mayor cuando las células, una vez cultivadas en presencia de glutamato, se incubaron en microaerobiosis que cuando la inducción se llevo a cabo en aerobiosis (Fig. 4). Los estudios posteriores sobre la localización, citosólica o asociada a las membranas, de la actividad NR indicaron que toda la actividad se encontró en la fracción soluble de las células cuando las mismas se incubaron aeróbicamente con nitrato, no pudiéndose detectar actividad NR en las membranas (Tabla 2). Por el contrario, la incubación en condiciones microaeróbicas alteró la distribución de la actividad NR ya que la misma se localizó preferentemente (97%) en las membranas (Tabla 2).

Es interesante destacar que la microaerobiosis *per se* indujo actividad NR en las membranas de *B. japonicum* PJ17, aunque las tasas de actividad fueron 4 veces menores que las detectadas cuando el nitrato estuvo presente durante la incubación microaeróbica (Tabla 2). Este resultado coincide con los publicados por otros autores (Hochstein y Tomlinson, 1988; Delgado *et al.* 1992) que indican que la presencia de nitrato (o de otros óxidos de nitrógeno) no es siempre necesaria para la inducción de actividad NR en las

membranas y que ciertos niveles de actividad pueden inducirse como consecuencia de la exclusión de oxígeno.

Se ha indicado que el oxígeno es el principal factor que controla la expresión de actividad NR en células en vida libre de *B. japonicum* (Daniel y Appleby, 1972; Daniel y Gray, 1976) y que la síntesis de los enzimas implicados en la utilización de nitrato en *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* cultivadas aeróbicamente, microaeróbicamente o en simbiosis está controlada por oxígeno y no por nitrato (O'Hara *et al.* 1983). Sin embargo, no se ha demostrado con exactitud si la baja tensión de oxígeno en el medio desreprime completamente la actividad NR o es necesario para ello la presencia de nitrato. De los resultados que se presentan en la Tabla 2 se puede sugerir que aunque la microaerobiosis indujo actividad NR en las membranas y en el citosol de las células, ambos factores (microaerobiosis y nitrato) fueron necesarios para la expresión de los mayores niveles de actividad NR detectados. Vairinhos *et al.* (1989) y Delgado *et al.* (1992) también han observado que, en condiciones microaeróbicas, la máxima expresión de actividad NR depende de la presencia de nitrato.

No es de extrañar que en condiciones microaeróbicas el valor de actividad NR de las membranas sea más elevado que el detectado en el citosol. Este hecho, muy probablemente, se derive de que la producción de ATP cuando se emplea nitrato como aceptor final de electrones de la cadena respiratoria es, aproximadamente, 2.5 veces menos eficiente que cuando el oxígeno actúa como aceptor terminal (O'Hara y Daniel, 1985). De hecho, células de la cepa CB1809 de *B. japonicum* cultivadas en condiciones microaeróbicas utilizaron el 95% del  $^{15}\text{NO}_3^-$  suministrado para producir  $^{15}\text{N}_2$  y sólo el 5% para formar  $^{15}\text{NH}_4^+$  (Vairinhos *et al.* 1989).

En las membranas de *B. japonicum* PJ17 cultivado en medio LMB con glutamato e incubado, posteriormente, en condiciones microaeróbicas (2%  $\text{O}_2$ , v/v) con nitrato durante 35 h fue posible detectar dos enzimas con actividad NR cuyos tamaños moleculares relativos (Mr), estimados mediante electroforesis en geles nativos de poliacrilamida, fueron de 200 kDa y 160 kDa (Fig. 5 y Fig. 7). Estos dos enzimas representaron,

aproximadamente, el 2% del total de proteínas extraídas de las membranas mediante solubilización con Triton X-100 (Fig. 6). Previamente, se había descrito en membranas de *B. japonicum* L-236 cultivadas microaeróbicamente con nitrato la existencia de un sólo enzima NR de Mr, calculado después de cromatografía de exclusión molecular, de 236 kDa (Delgado *et al.* 1992). Se comprobó, por tanto, la posibilidad de que el número y el Mr de los enzimas NR de las membranas de *B. japonicum* PJ17 pudiese diferir según las condiciones de cultivo. Para ello, se analizó: a) los enzimas NR de células de PJ17 cultivadas microaeróbicamente con nitrato y b) cultivadas en LMB con glutamato e incubadas posteriormente en condiciones microaeróbicas con nitrato. Los resultados obtenidos (Fig. 5) mostraron que, en ambos casos, hubo dos enzimas NR de Mr 200 kDa y 160 kDa.

Si bien el cultivo de células de *B. japonicum* PJ17 en medio LMB con glutamato e inducción en microaerobiosis con nitrato resultó en la detección de dos enzimas NR (Fig. 7), la exclusión del nitrato del medio de incubación, en el que se mantuvieron las condiciones microaeróbicas, provocó la detección de un sólo enzima NR, concretamente el correspondiente a un Mr de 160 kDa (Fig. 7). Se puede deducir, por tanto, que la expresión de actividad NR en las membranas de *B. japonicum* PJ17 está sometida a una regulación doble e independiente, de modo que la ausencia de oxígeno sería el factor responsable de la síntesis del enzima de 160 kDa, mientras que ambos factores -la exclusión de oxígeno y la presencia de nitrato- serían necesarios para la síntesis del enzima de 200 kDa (Fig. 7). Estos resultados corroboran los indicados anteriormente (Vairinhos *et al.* 1989; Delgado *et al.* 1992) que indicaban que la máxima expresión de actividad NR en *B. japonicum* es dependiente no sólo de la microaerobiosis sino también de la presencia de nitrato.

El oxígeno parece tener un efecto dominante en la expresión de actividad NR, sobre la que ejercería un efecto represor, ya que cuando las células se incubaron aeróbicamente en presencia de nitrato no se pudo detectar actividad en las membranas (Tabla 2).

En *E. coli*, la aerobiosis previene tanto la síntesis de nitrato reductasa y de fumarato reductasa, enzimas que intervienen en el metabolismo respiratorio, como de formato-hidrógeno-liasa y alcohol deshidrogenasa, implicados en procesos fermentativos (Stewart y Berg, 1988; Egan y Stewart, 1991), mientras que, en microaerobiosis, el nitrato inhibe la síntesis de fumarato reductasa e induce la transcripción de formato deshidrogenasa-N y nitrato reductasa (Egan y Stewart, 1991). A este tipo de regulación escalonada de la actividad NR, esto es inhibición por oxígeno e inducción por anaerobiosis y nitrato, se le ha llamado regulación jerárquica (Showe y DeMoss, 1968; para revisiones sobre el tema ver Lin y Kuritzken, 1987; Stewart, 1988).

El control de la síntesis de actividad NR en *E. coli* por anaerobiosis y nitrato son independientes ya que mientras la inducción microaeróbica requiere el producto del gen *fnr* (proteína Fnr), la inducción por nitrato está mediada por el producto del gen *narL* (proteína NarL) (Stewart, 1982; Stewart y Parales, 1988; Stewart *et al.* 1989; Egan y Stewart, 1991). NarL es un activador positivo de la transcripción del operón *narGHJI* (Stewart, 1982; Stewart y Parales, 1988) y se ha identificado como una proteína reguladora perteneciente al grupo de proteínas reguladoras de respuesta de dos componentes (Gunsalus *et al.* 1989; Nohno *et al.* 1989; Stewart *et al.* 1989). Fnr es un regulador transcripcional del operón *narGHJI* (Spiro y Guest, 1990; Iuchi y Lin, 1991; Uden y Trageser, 1991) y muestra homología con CRP, que es la proteína receptora del cAMP (Shaw *et al.* 1983; De Crombrughe *et al.* 1984; Uden y Duchêne, 1987). Fnr es inactiva en condiciones aeróbicas y se convierte en forma activa cuando se elimina el oxígeno del medio. Aunque el mecanismo por el que se lleva a cabo esta conversión no se conoce con exactitud, se ha sugerido que la capacidad de Fnr para actuar como sensor de oxígeno se debe a su habilidad para captar Fe a través de algunos restos de cisteína localizados en el extremo amino terminal de la proteína (Spiro y Guest, 1988; Trageser y Uden, 1989; Hennecke, 1990; Green *et al.* 1991; Uden y Trageser, 1991). Las proteínas de la familia Crp-Fnr poseen en el extremo carboxilo terminal de la proteína una secuencia "hélice-giro-hélice" característica de unión al ADN (Uden y Trageser, 1991; Bothe, 1991).

Proteínas reguladoras del tipo Fnr también se han encontrado en algunas especies de la familia *Rhizobiaceae*, concretamente FixK de *R. meliloti* (Batut *et al.* 1989; 1991), FixK de *Azorhizobium caulinodans* (Kaminski *et al.* 1991) y FnrN de *R. leguminosarum* biovar *viciae* (Colonna-Romano *et al.* 1990). El gen *fixK* se identificó originalmente en *R. meliloti* como parte del complejo sistema que regula la expresión de los genes implicados en la fijación de N<sub>2</sub> (Batut *et al.* 1989). En condiciones de baja tensión de oxígeno, la proteína FixL actúa como sensor de tales condiciones y activa a la proteína FixJ, que, funcionando como un regulador de respuesta, activa a su vez, a los genes *nifA* y *fixK* (Gilles-González *et al.* 1991). NifA activa la transcripción de los operones *nifHDKE* (genes estructurales de la nitrogenasa) y *fixABCX* (implicados en el transporte de electrones hacia la nitrogenasa), mientras que FixK funciona como activador de la expresión del gen *fixN*, y como un represor de su propia síntesis y de la de *nifA* (David *et al.* 1988).

A diferencia de *R. meliloti*, la regulación de los genes *nif* y *fix* en *B. japonicum* no se conoce todavía con exactitud. La proteína NifA está presente en concentraciones basales en condiciones aeróbicas (Thöny *et al.* 1987) y parece no estar regulada por FixLJ (Anthamatten y Hennecke, 1991), por lo que se admite que la expresión de la nitrogenasa y de otros operones o genes *nif* y *fix* está directamente regulada por NifA (Fisher y Hennecke, 1987; Thöny *et al.* 1989). Además, en *B. japonicum* no se había demostrado la existencia de *fixK*. Recientemente, los trabajos de Anthamatten y Hennecke (1991) y Anthamatten *et al.* (1992) han puesto de manifiesto que en *B. japonicum* existe un gen *fixK* dependiente de FixLJ, y cuya proteína podría actuar como regulador de respuesta al oxígeno de forma similar a Fnr de *E. coli* y NifA de *B. japonicum* (Fisher *et al.* 1988; Hennecke, 1990; Green *et al.* 1991). Además, sugieren la existencia de un gen homólogo en función a *fixK*, también dependiente de FixLJ y posiblemente implicado en la regulación de la fijación de N<sub>2</sub> (Anthamatten *et al.* 1992).

Por otra parte, en la familia *Rhizobiaceae*, al igual que en *K. pneumoniae*, el metabolismo del nitrógeno (no nitrato) está regulado por el sistema *ntr* y genes homólogos a *ntrA*, *ntrB* y *ntrC* de *K. pneumoniae* se han localizado en *R. meliloti* (Ausubel *et al.* 1985; Nixon *et al.* 1986; Ronson *et al.* 1987; Szeto *et al.* 1987), *A. caulinodans*

(Pawlowski *et al.* 1987), *B. (Parasponia)* (Udvardi *et al.* 1992) y *B. japonicum* (Martin *et al.* 1988; Kullik *et al.* 1991). Existen, sin embargo, algunas diferencias ya que mientras en *K. pneumoniae* la transcripción de los genes *nif* y *glnA* y la utilización de algunos aminoácidos como prolina, arginina e histidina están bajo control de *ntrC*, este gen no interviene ni en la regulación de los genes *nif* ni controla la utilización de aminoácidos en los fijadores simbióticos (Gussin *et al.* 1986; Szeto *et al.* 1987; Pawloski *et al.* 1987; Martin *et al.* 1988), aunque *ntrC* sí controla la síntesis de la glutamina sintetasa II (Carlson *et al.* 1987; Martin *et al.* 1988; Shatters *et al.* 1989).

Tanto *nifA* como *ntrC* necesitan para su actividad el producto del gen *ntrA* que es el factor  $\sigma^{54}$  necesario para la unión de la ARN polimerasa a los promotores respectivos de los genes *nifA* y *ntrC* (Hirschman *et al.* 1985; Gussin *et al.* 1986).

El interés en estudiar en la familia *Rhizobiaceae* los genes que intervienen en el control de la fijación de  $N_2$  y en la regulación de la asimilación de nitrógeno surge al considerar que mutaciones en alguno de esos genes pueden resultar en la incapacidad de los mutantes para utilizar nitrato como única fuente de N. Una cepa mutante *ntrC* de *R. meliloti* fue incapaz de fijar  $N_2$  y, a su vez, no creció en medios definidos con nitrato (Szeto *et al.* 1987). Igualmente, una cepa de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* afectada en la producción de melanina, cuya expresión depende del gen *ntrA* fue también incapaz de fijar  $N_2$  y de crecer a expensas de nitrato (Hawkins *et al.* 1991). Otra mutante *ntrC* de *Bradyrhizobium* sp. (*Parasponia*) no expresó actividad NR (Udvardi *et al.* 1992) y mutantes *fixL* y *fixJ* de *B. japonicum* no crecen microaeróbicamente con nitrato (Anthamatten y Hennecke, 1991). Sin embargo, un mutante *fixK* de *B. japonicum* fue infectivo en plantas de soja y utilizó nitrato como aceptor final de electrones de la cadena respiratoria cuando se cultivó microaeróbicamente.

En este sentido, todas las cepas mutantes utilizadas en este estudio fueron infectivas y efectivas en plantas de soja, por lo que puede considerarse que la mutación no afectó a ninguno de los genes implicados en la regulación de la fijación de  $N_2$ . Además, las mutantes no crecieron microaeróbicamente en medio definido LMB con nitrato como única

fuerza de nitrógeno, por lo que habría que descartar, de acuerdo a los resultados de Anthamatten *et al.* (1992), que la mutación afectara al gen *fixK*.

Dicha incapacidad de crecer microaeróbicamente con nitrato no puede atribuirse, por otra parte, a deficiencias en la utilización de nitrito, amonio o glutamato, ni a alteraciones en la cadena transportadora de electrones ya que, durante el proceso de selección se eliminaron todos los transconjugantes que no cumplían tales requisitos (ver apartado 1 de Resultados).

Las cepas mutantes seleccionadas en este trabajo resultaron ser deficientes en la expresión de una de las dos enzimas nitrato reductasa presentes en las membranas de la cepa parental PJ17 de *B. japonicum* (Fig. 5), lo que fue debido a mutaciones de naturaleza puntual producidas por inserción del transposón Tn5 en el cromosoma (Fig. 1). Esta carencia de actividad nitrato reductasa puede residir en la mutación del gen/es estructural/es de la apoproteína, en genes responsables de la utilización del molibdeno y síntesis del cofactor de Mo, o en genes reguladores de la expresión de cualquiera de esos genes.

El cofactor de molibdeno se requiere para la actividad no sólo de la nitrato reductasa sino de otras enzimas como la xantina deshidrogenasa (para una revisión sobre el tema ver Hinton y Dean, 1990; Rajagopalan y Johnson, 1992), por lo que la habilidad para crecer con hipoxantina como única fuente de nitrógeno se utiliza frecuentemente como diagnóstico para determinar si una mutación afecta la síntesis del cofactor de molibdeno o los genes estructurales o reguladores de la nitrato reductasa. Este hecho, sin embargo, debe utilizarse con precaución ya que, recientemente, se ha demostrado que la xantina deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa* contiene la forma molibdopterina del cofactor de molibdeno, mientras que la nitrato reductasa contiene, probablemente, la forma molibdopterina-guanina-dinucleótido del cofactor de molibdeno (Rajagopalan y Johnson, 1992). Además, mutantes de *K. pneumoniae* M5a1 deficientes en el cofactor de molibdeno pueden usar hipoxantina como única fuente de N (Garzón *et al.* 1992).

En nuestro caso, las mutantes seleccionadas crecieron en LMB con hipoxantina como única fuente de N (ver apartado 1 de Resultados) y, además, las mutantes GRF3 y GRF110, que se emplearon para purificar los enzimas nitrato reductasa de las membranas, mostraron actividad del cofactor de molibdeno (ver apartado 10.4 de Resultados), por lo que la mutación no afectó, en ningún caso, los genes responsables de la utilización del molibdeno.

Las 28 mutantes obtenidas en este estudio fueron deficientes en la utilización microaeróbica del nitrato, por lo que, manteniendo la terminología empleada en el caso de las *Enterobacteriaceae*, se podría establecer que todas mostraron un fenotipo  $\text{Nar}^-$ . De las 28 mutantes, seis (21%) fueron capaces de asimilar nitrato en condiciones aeróbicas (fenotipo  $\text{Nas}^+$ ). Puesto que estas 6 mutantes  $\text{Nar}^- \text{Nas}^+$ , como se ha indicado anteriormente, presentaron una sola inserción del transposón Tn5, excepto la GRF4, y no parecen estar afectadas en genes reguladores de la expresión de actividad nitrato reductasa en microaerobiosis (gen *fixK* homólogo a *fnr*) ni en aquellos relacionados con el metabolismo del nitrógeno (genes *nif* y *fix*), se puede sugerir que la mutación producida por Tn5 ocurrió, probablemente, en los genes estructurales que codifican la apoproteína de la nitrato reductasa.

Excepto en las cepas GRF1 a GRF6, las demás mutantes (78%) no asimilaron nitrato en condiciones aeróbicas, por lo que se pueden clasificar como  $\text{Nas}^-$ . Tales mutantes de fenotipo pleiotrópico  $\text{Nar}^- \text{Nas}^-$  se podrían deber a alteraciones en un gen de carácter regulador implicado, simultáneamente, en la respiración microaeróbica del nitrato y en la asimilación del mismo en condiciones aeróbicas. Alternativamente, las mutantes  $\text{Nar}^- \text{Nas}^-$  podrían ser portadoras de una mutación de efectos polares, lo que sería indicativo de que los genes estructurales de los enzimas nitrato reductasa respiratorio y asimilatorio se organizan en un mismo operón. También es posible que el producto del gen mutado participe en la composición o sea necesario para el funcionamiento de ambos enzimas. En un reciente estudio (Delgado *et al.* 1992) se ha demostrado que el Mr de la nitrato reductasa de las membranas de *B. japonicum* L-236 cultivado aeróbicamente con nitrato fue similar ( $\approx 236$  kDa) al de la nitrato reductasa del citosol de las mismas células

cultivadas microaeróbicamente con nitrato. No existen, sin embargo, referencias acerca de las posibles diferencias o similitudes entre ambas enzimas, desconociéndose si se trata del mismo enzima, si son enzimas diferentes o distintas formas del mismo enzima.

No se ha encontrado ninguna relación entre la localización del transposón Tn5 y la capacidad de las mutantes para crecer o no aeróbicamente con nitrato ni con la expresión de una u otra nitrato reductasa. Así, en las mutantes GRF3 y GRF4, que sólo presentaron el enzima de 200 kDa (Fig. 5), el transposón Tn5 se localizó en un fragmento de 12.5 kb (Fig. 1) y crecieron aeróbicamente con nitrato. Sin embargo, la mutante GRF104 que presentó sólo el enzima de 160 kDa y la señal de hibridación con Tn5 en 12.5 kb, no fue capaz de utilizar nitrato en condiciones aeróbicas. Por el contrario, las mutantes GRF110 y GRF116 expresaron el enzima de 160 kDa, no crecieron aeróbicamente con nitrato y presentaron el inserto de Tn5 en un fragmento de 13.5 kb (Fig. 2).

Los dos enzimas nitrato reductasa presentes en las membranas de *B. japonicum* PJ17, el de 160 kDa que se induce en respuesta a la microaerobiosis y el de 200 kDa, que requiere para su síntesis condiciones microaeróbicas y la presencia de nitrato (Fig. 7), son necesarios para la utilización microaeróbica del nitrato, ya que la ausencia de uno cualquiera de ellos resultó en la incapacidad de las mutantes para crecer en tales condiciones. De hecho, todas las mutantes seleccionadas, excepto la GRF6 en la que hubo sobreexpresión de actividad, mostraron menor actividad nitrato reductasa en el citosol y en las membranas que la cepa parental PJ17 (Tabla 1). Igualmente, la actividad del cofactor de molibdeno en las membranas de las mutantes GRF3 y GRF110, como se ha descrito previamente, fue menor que la de la cepa parental (ver apartado 10.4 de Resultados).

Basándonos en el concepto propuesto por Maier y Brill (1978) de que cepas de la familia *Rhizobiaceae* genéticamente alteradas podrían incrementar el flujo de electrones a la nitrogenasa, y dado que nitrogenasa y nitrato reductasa pueden competir por los electrones disponibles, diversos autores han examinado el efecto que la incapacidad para utilizar nitrato podría ejercer sobre la fijación de N<sub>2</sub>. Así, Scott *et al.* (1979) obtuvieron una cepa mutante NR<sup>-</sup> de *B. japonicum* que poseía un 100% más de actividad nitrogenasa que

la cepa parental USDA 110, y Williams y Phillips (1983) demostraron que la inoculación de esa cepa en plantas de soja incrementó el rendimiento de las mismas en la producción de semillas, en relación con las plantas inoculadas con la cepa parental. Igualmente, de Vasconcelos *et al.* (1980) aislaron mutantes deficientes en actividad nitrato reductasa de *B. japonicum* y comprobaron que la actividad nitrogenasa de las mutantes fue igual o superior a la de la cepa parental. Hay que indicar sin embargo, que en todos los casos, las mutantes NR<sup>-</sup> fueron obtenidas mediante resistencia al clorato (Gibson y Pagan, 1977; Scott *et al.* 1979; de Vasconcelos *et al.* 1980) o empleando nitrosoguanidina (Kiss *et al.* 1979), que pueden producir mutaciones pleiotrópicas, y en ningún caso mutaciones puntuales, que son las que permitirían el correcto análisis bioquímico y genético de las mutaciones obtenidas. Por otra parte, aunque el clorato se ha utilizado frecuentemente para obtener mutantes deficientes en actividad nitrato reductasa, las evidencias experimentales actualmente disponibles indican que todas las mutantes NR<sup>-</sup> aisladas mediante resistencia al clorato presentan deficiencias en la síntesis del cofactor del molibdeno, bien por alteraciones en el transporte del molibdeno al interior celular, o en su incorporación a la nitrato reductasa (ver revisión de Stewart, 1988). En la bibliografía consultada, sólo se ha encontrado un trabajo relativo a la obtención de mutantes NR<sup>-</sup> mediante inserción del transposón Tn5. En ese trabajo (Howitt *et al.* 1988), las dos mutantes deficientes en actividad nitrato reductasa asimilatoria analizadas presentaron valores de actividad nitrogenasa inferiores a los de la parental.

Todas las mutantes, GRF3, GRF4, GRF102, GRF110 y GRF116, empleadas en este trabajo para inocular plantas de soja mostraron valores de actividad nitrogenasa (medida como reducción de acetileno) similares a los de la cepa parental (Tabla 3). Consecuentemente, el valor de eficiencia relativa (ER) de la nitrogenasa de cada una de las mutantes fue inferior al de la cepa parental (Tabla 3). Hay que señalar que la cepa PJ17 de *B. japonicum* carece de actividad hidrogenasa (Lepo *et al.* 1980), por lo que el hidrógeno producido por la nitrogenasa no puede oxidarse. En tal situación, el valor de eficiencia relativa se considera como un parámetro indicativo de cómo el total de electrones disponibles por la nitrogenasa se distribuyen para reducir N<sub>2</sub> o H<sup>+</sup>, los dos sustratos de la nitrogenasa (Burns y Hardy, 1975). Teniendo en cuenta que en presencia de

concentraciones saturantes de acetileno, como es la que se utilizó en los ensayos de determinación de la actividad nitrogenasa (apartado 8.2.2 de Material y Métodos), el total de electrones disponibles por la nitrogenasa es proporcional al nivel de reducción de acetileno (Schubert y Evans, 1976). Por tanto, en todas las simbiosis establecidas hubo el mismo flujo de electrones hacia la nitrogenasa, aunque aproximadamente el 60% de esos electrones en el caso de las mutantes y sólo el 30% en la cepa parental, se empleó para reducir protones y no  $N_2$  (Tabla 3). La distribución de electrones hacia uno u otro sustrato de la nitrogenasa está condicionado por factores tales como la temperatura (Hwang y Burris, 1972), la proporción de los dos componentes de la nitrogenasa (Fe-proteína y MoFe-proteína) (Hageman y Burris, 1980) y la relación ATP/ADP (Hageman *et al.* 1980). Es posible explicar esta alteración en la distribución de electrones si se admite que, en las mutantes, el molibdeno que no se emplea para la síntesis de una u otra NR quedaría disponible para la formación de un mayor número de unidades de la MoFe-proteína constituyente de la nitrogenasa, lo que, a su vez, modificaría la relación Fe-proteína/MoFe-proteína. Tal modificación, que llevaría aparejada un menor flujo de electrones a la MoFe-proteína, se ha descrito que facilitaría la reducción de protones, disminuyendo, simultáneamente, la de  $N_2$  (Hageman y Burris, 1980). Si tal posibilidad fuera correcta, parece poco probable que las mutaciones que ocurrieran en los genes responsables de la utilización de nitrato resultaran en la obtención de cepas con mayor capacidad de fijar nitrógeno.

Hasta la fecha, en la mayoría de los microorganismos capaces de utilizar nitrato en condiciones microaeróbicas se ha descrito la existencia de un único enzima nitrato reductasa asociado a las membranas de los mismos: *E. coli* (McGregor *et al.* 1974), *K. aerogenes* (van't Riet y Planta, 1975), *P. aeruginosa* (Carlson *et al.* 1982), *Rhodobacter sphaeroides* sp. *denitrificans* (Byrne y Nicholas, 1987), *P. stutzeri* (Blümle y Zumft, 1991), *Bacillus halodenitrificans* (Ketchum *et al.* 1991), *Haloferax denitrificans* (Hochstein y Lang, 1991). Sin embargo, nuestros resultados indican que en las membranas de las células de *B. japonicum* PJ17 tanto cultivadas como inducidas microaeróbicamente con nitrato presentaron dos enzimas nitrato reductasa de 200 kDa y 160 kDa catalíticamente activas (Fig. 5). En *Alcaligenes eutrophus* H16 también se ha descrito la existencia de dos enzimas

nitrito reductasa respiratorias (Warnecke *et al.* 1991; ver también Cuypers y Zumft, 1992). Igualmente, en *E. coli* se ha demostrado la existencia de una segunda nitrato reductasa (nitrato reductasa Z) cuya expresión no depende de *fnr*, no se induce por nitrato y no se reprime por oxígeno (Iobbi *et al.* 1987; Blasco *et al.* 1990).

Algunos autores han indicado la posibilidad de que el enzima nitrato reductasa respiratorio puede disociarse en dos o más formas activas durante el proceso de extracción de las membranas como consecuencia de una proteólisis parcial de la misma, lo que de hecho ocurre en *E. coli* (DeMoss *et al.* 1981) y *P. stutzeri* (Blümle y Zumft, 1991). Se hizo, por tanto, necesario comprobar si, en nuestro caso, se trataba de dos enzimas diferentes o de un único enzima que se disociaba en dos especies activas, comprobación que pasaba, obligatoriamente, por la purificación y caracterización de los enzimas de 160 kDa y 200 kDa.

Cada enzima nitrato reductasa de las membranas se purificó por un procedimiento que implicó tres pasos consecutivos: solubilización con Triton X-100, cromatografía en Q-Sepharosa y cromatografía en Sephacryl S-200. El tratamiento con Triton X-100, similar al descrito para la obtención del enzima nitrato reductasa de *E. coli* (McGregor, 1975) y al del aislamiento del enzima hidrogenasa de las membranas de *E. coli* (Ballantine y Boxer, 1985) fue el paso más efectivo de la purificación ya que se consiguió recuperar el 85% de la actividad enzimática y sólo el 22.5% del total de proteínas de las membranas (ver apartado 7 de Resultados). Los procesos de cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular, aunque utilizando diversos grupos intercambiadores de iones el primero (dietilamino-etil, DEAE; etilamino cuaternario, QAE; carboxymetil, CM; sulfopropil, SP, etc.) y polímeros de diferente tamaño de poro el segundo (Bio-Gel, Sephadex, Sephacryl, Sepharosa etc), se utilizan frecuentemente en la purificación de enzimas asociados a membranas con actividad nitrato reductasa (McGregor *et al.* 1974; Byrne y Nicholas, 1987; Hochstein y Lang, 1991; Blümle y Zumft, 1991).

Cuando las membranas solubilizadas de la mutante GRF110 se sometieron a cromatografía de intercambio iónico se observó un único pico de actividad (Fig. 8) que se

mantuvo tras la cromatografía de exclusión molecular (Fig. 10). Mientras que la expresión de actividad nitrato reductasa se mantuvo durante el proceso de purificación (Fig. 12.), la presencia de proteínas contaminantes en las membranas solubilizadas disminuyó progresivamente durante los sucesivos pasos de cromatografía hasta la purificación a homogeneidad del enzima nitrato reductasa de 160 kDa (Fig. 12). Por el contrario, las membranas solubilizadas de la mutante GRF3 presentaron dos picos de actividad después de la cromatografía de intercambio iónico (Fig. 9) que correspondieron a dos proteínas con actividad nitrato reductasa de 160 kDa y 120 kDa, respectivamente (Fig. 13). Dado que la electroforesis en geles nativos de poliacrilamida de las membranas solubilizadas de la mutante GRF3 reveló la existencia de un solo enzima (Fig. 13), hay que admitir que la disociación del enzima de 200 kDa en dos especies activas de 160 kDa y 120 kDa (Fig. 13) no ocurrió como consecuencia de una proteólisis parcial de la misma durante su solubilización de las membranas, sino a la posterior rotura de los enlaces, evidentemente lábiles, entre las dos especies nitrato reductasa. No parece, sin embargo, que esta rotura fuera debida al incremento de fuerza iónica durante el proceso de elución con gradiente de NaCl, ya que cuando el enzima de 200 kDa se sometió primero a cromatografía de exclusión molecular en vez de intercambio iónico, se obtuvieron idénticos resultados (no se presentan los mismos). Los dos picos de actividad nitrato reductasa, visibles después de cromatografía de intercambio iónico (Fig. 9) se correlacionaron con la presencia de dos enzimas activos en geles nativos de poliacrilamida (Fig. 13) y se mantuvieron constantes después de la cromatografía de exclusión molecular (Fig. 11) y su correspondiente identificación en geles de poliacrilamida (Fig. 13). Al igual que la mutante GRF110, las proteínas contaminantes de las membranas de la mutante GRF3 (Fig. 13) se fueron eliminando durante la cromatografía de intercambio iónico y, posteriormente, de exclusión molecular (Fig. 13), después de la cual, los enzimas de 160 kDa y 120 kDa fueron las únicas proteínas observadas en los geles de poliacrilamida. Hay que hacer constar que la detección de proteínas en los geles de poliacrilamida se llevó a cabo mediante tinción con nitrato de plata, técnica lo suficientemente sensible como para descartar la existencia de proteínas contaminantes en nuestras preparaciones. Los resultados de un protocolo representativo de la purificación del enzima de 160 kDa de la mutante GRF110 y del enzima de 200 kDa de la mutante GRF3 (Tablas 4 y 5, respectivamente) indican que

después de la cromatografía de exclusión molecular, las actividades específicas de ambas enzimas fueron 4.6 y 4.3  $\mu\text{mol NO}_2^- / \text{mg proteín} \times \text{min}$ ), lo que representó la consecución de grados de purificación parecidos (21.5 y 15.9, respectivamente) y rendimientos de alrededor del 25%. Estos valores, así como el tamaño molecular de los enzimas son similares a descritos en la bibliografía para otros enzimas nitrato reductasa asociados a membranas (Hochstein y Tomlinson, 1988; Stewart, 1988; Ketchum *et al.*, 1991; Blümle y Zumft, 1991; Hochstein y Lang, 1991).

Aunque hubiera sido deseable realizar la purificación de los enzimas nitrato reductasa utilizando la cepa parental *B. japonicum* PJ17 como material biológico de partida, la disociación en dos formas activas del enzima de 200 kDa hizo prácticamente imposible este proceso. Durante la realización de esos experimentos, nuestros resultados eran difíciles de interpretar ya que la electroforesis en geles de poliacrilamida de las membranas solubilizadas de la cepa parental, después de la cromatografía de intercambio iónico, revelaba la presencia de dos enzimas de Mr 160 kDa y 120 kDa que no coincidía con los esperados de 200 kDa y 160 kDa. La observación, sin embargo, de una sobreexpresión de actividad del enzima de 160 kDa, hizo sospechar la posibilidad de que, presumiblemente, el enzima de 200 kDa pudiera disociarse, durante la cromatografía de intercambio iónico, en especies de menor Mr. Cuando esta posibilidad se confirmó mediante el empleo de las cepas mutantes se descartó la purificación a partir de la cepa parental, ya que, en este caso no se pueden obtener por separado el enzima de 160 kDa y la especie de 160 kDa en la que se disocia el enzima de 200 kDa. Ambas especies nitrato reductasa migraron juntas en geles de poliacrilamida y tampoco se pueden separar mediante cromatografía de intercambio iónico o exclusión molecular (no se muestran los resultados).

Aunque la metodología seguida hizo posible la purificación a homogeneidad del enzima de 160 kDa (Fig. 12) y de las dos especies del enzima de 200 kDa (Fig. 13), no permitió, sin embargo, la obtención por separado de las citadas especies de 160 kDa y 120 kDa del enzima de 200 kDa (Fig. 13). Para resolver este problema, la estrategia empleada fue, como se indica en el apartado 8 de Resultados, la de separar ambas formas activas mediante electroforesis preparativa en geles nativos de poliacrilamida, cortar de forma

independiente, las dos zonas del gel en donde se localizaba la actividad enzimática y extraer, posteriormente, los enzimas mediante electroelución. Esta estrategia permitió la obtención por separado de las dos especies activas de 160 kDa y 120 kDa del enzima de 200 kDa (Fig. 14). Igualmente, a idéntico protocolo de electroelución se sometió el enzima de 160 kDa, de forma que, en sentido estricto, los tres enzimas estuvieron sometidos a idénticos tratamientos. La presencia, expresión y pureza de cada enzima es patente en la Fig. 14.

La electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida de muestras de cada uno de los tres enzimas purificados permitió comprobar, por una parte, que cada una de las especies de 160 kDa y 120 kDa del enzima de 200 kDa estaban formadas por el mismo número (4) de subunidades (Fig. 15) y, por otra, que el enzima de 160 kDa estaba compuesto por 3 subunidades (Fig. 15). Sorprendentemente, los tres enzimas presentaron tres polipéptidos comunes (116 kDa, 68 kDa y 56 kDa) que fueron, a su vez, los polipéptidos constituyentes del enzima de 160 kDa (Fig. 15). El cuarto polipéptido, de 59 kDa, fue específico del enzima de 200 kDa y estuvo presente en las dos especies de dicho enzima (Fig. 15). Las nitrato reductasa respiratorias de los microorganismos de los que se ha purificado, son proteínas heteroméricas formadas por dos o tres subunidades. La tercera subunidad corresponde, invariablemente, a un citocromo del tipo *b* y su presencia depende del método que se emplea para la solubilización de las membranas. Así, en *E. coli* y *Bacillus halodenitrificans*, la nitrato reductasa purificada está compuesta por dos subunidades cuando se emplea deoxicolato para extraer el enzima y por tres subunidades si la solubilización se realiza con detergentes no iónicos del tipo Tritón X-100 (Stewart, 1988; Hochstein y Tomlinson, 1988). En este sentido, ninguna de las subunidades de la nitrato reductasa de 160 kDa (heterotrímero) ni de las de 200 kDa (heterotetrámero) pudo asociarse con un citocromo de tipo *b*, como lo indicó el espectro de absorción de los mismos (apartado 10.5 de Resultados). La función de cada una de las subunidades de los enzimas de 160 kDa y 200 kDa es, por el momento, desconocida.

Las diferencias entre el enzima de 160 kDa y las dos formas del enzima de 200 kDa se mantuvieron después del tratamiento de los mismos con tripsina. Esta proteasa, que

sólo cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos en los que la función carbonilo la aportan los restos de lisina o arginina de la secuencia aminoacídica, fragmentó el enzima de 160 kDa en 5 péptidos (117 kDa, 78 kDa, 68 kDa, 57 kDa y 43 kDa) los cuales, a su vez, estuvieron presentes en las dos formas del enzima de 200 kDa en donde, además, se detectó un sexto péptido de 59 kDa que no se pudo localizar en el enzima de 160 kDa (Fig 17). Por otra parte, los enzimas de 160 kDa y 200 kDa presentaron distinta reacción cruzada con los anticuerpos anti-nitrato reductasa respiratoria de *P. stutzeri* (Fig. 19), punto isoeléctrico (apartado 10.1 de Resultados) y afinidad por el sustrato (apartado 11.2 de Resultados). Estos datos, junto con los resultados anteriores, esto es, la diferente composición en subunidades y mapa de péptidos, indican que los enzimas de 160 kDa y 200 kDa son diferentes y que la presencia de ambos en geles nativos de poliacrilamida no se debe a una posible disociación en dos especies catalíticamente activas de un único enzima. La demostración, además, de que cada enzima se sintetiza en respuesta a condiciones fisiológicas distintas (Fig. 7) y el hecho de que es posible obtener mutantes deficientes en una u otra enzima (Fig. 5), permite establecer la existencia de dos isoenzimas nitrato reductasa en las membranas de *B. japonicum* PJ17 cuando esas células se cultivan o se inducen microaeróbicamente con nitrato como única fuente de nitrógeno).

Si bien las dos especies del enzima de 200 kDa presentaron igual composición en subunidades (Fig. 15) e idéntico mapa peptídico (Fig. 17), se observaron algunas diferencias durante su caracterización. En primer lugar, el tamaño molecular de los péptidos que mantuvieron la actividad catalítica después del tratamiento con tripsina fue de 117 kDa para la especie de 160 kDa y de 89 kDa para la especie de 120 kDa (Fig. 17). Este hecho, sin embargo, podría ser de esperar ya que ambas especies nitrato reductasa migraron de forma separada en geles nativos de poliacrilamida después de la cromatografía de exclusión molecular (Fig. 13), por lo que después del tratamieto con tripsina, si los cortes de la proteasa en las cadena polipeptídicas fueron equivalentes, debería de mantenerse la diferencia en el tamaño molecular, y, por tanto, la migración en el gel nativo. En segundo lugar, hay que indicar que ninguna de las subunidades de la especie de 160 kDa presentó reacción cruzada con los anticuerpos anti-nitrato reductasa de *P. stutzeri* (Fig. 19), mientras que tales anticuerpos sí reconocieron la subunidad de 59 kDa de la especie de 120 kDa

(Fig. 19). Es posible, no obstante, que, en el primer caso, la ausencia de reconocimiento se debiera a la escasa concentración de la subunidad de 59 kDa, que no superó el 2% del total de proteína (Fig. 16). En tercer lugar, el punto isoeléctrico de la especie de 160 kDa fue de 6.61 y de 6.75 el de la especie de 120 kDa (Fig. 20), lo que parece sugerir que ambas especies podrían, en realidad, ser dos isoenzimas. Hay que indicar, sin embargo, que cuando ambas especies se mezclaron y se sometieron juntas a isoelectroenfoque, el posterior revelado de los geles, bien por actividad bien por proteína, no detectó la migración por separado de ambos enzimas, sino que su localización en el gel fue conjunta. Es posible, por tanto, que el diferente valor de punto isoeléctrico observado sea consecuencia de la distinta concentración relativa de las subunidades que constituyen cada uno de los enzimas (Figs. 16A y 16B). Teniendo en cuenta estas consideraciones, es difícil concluir si lo que hasta ahora se ha denominado especies de 160 kDa y 120 kDa del enzima de 200 kDa son dos enzimas diferentes (isoenzimas) o de un único enzima capaz de disociarse en dos formas activas (isoformas). Se ha descrito que la nitrato reductasa respiratoria de *E. coli* y la nitrato reductasa asimilatoria de *Chlorella* pueden presentarse como formas multiméricas activas (dímeros o tetrámeros) y que esa capacidad de asociación-disociación depende de la concentración del enzima purificado (Lund y de Moss, 1976; Stewart, 1988; Solomonson y Barber, 1990; Hoff *et al.* 1992). Por otra parte, es posible la obtención de especies nitrato reductasa de menor tamaño molecular que el del holoenzima correspondiente, lo que se ha demostrado tanto en la nitrato reductasa respiratoria de *E. coli* y *P. stutzeri* como en la asimilatoria de espinaca, debiéndose este fenómeno, en todos los casos, a una degradación proteolítica que lleva aparejada un incremento en el número de péptidos (Lund y De Moss, 1976; Blümle y Zumft, 1991; Solomonson y Barber, 1990). Dado que en nuestros experimentos las especies nitrato reductasa de 160 kDa y 120 kDa del enzima de 200 kDa presentaron tanto el mismo número de subunidades (Fig. 15) como de péptidos (Fig. 17) se podría sugerir que ambas especies son, aparentemente, dos isoformas del mismo enzima en los que la diferencia de tamaño molecular podría atribuirse no a la disociación completa de una determinada subunidad, esto es, a la disociación de todas las repeticiones de esa subunidad, sino a la de algunas de esas repeticiones de la subunidad de que se trate. Concretamente, si se considera que las subunidades de 68 kDa y de 56 kDa forman parte de ambas especies de

160 kDa y 120 kDa en proporciones, aproximadamente, equivalentes (Figs. 16B y 16C), la isoforma de 120 kDa podría originarse como consecuencia de la pérdida de un número (no determinado) de repeticiones de la subunidad de 117 kDa de la isoforma de 160 kDa (Figs. 16B y 16C).

Todos los enzimas nitrato reductasa respiratorios se inhiben típicamente por cianuro y azida, que actúan quelando el molibdeno que forma parte del centro activo de los mismos. De hecho, la afinidad de esos enzimas por la azida es casi 1000 veces mayor que por el nitrato (Hochstein y Tomlinson, 1988; Stewart, 1988).

Los dos isoenzimas de 160 kDa y 200 kDa se inhibieron fuertemente por cianuro y azida (Tabla 6), lo que, junto con el hecho de su aislamiento de las membranas de *B. japonicum*, indica claramente que se trata de enzimas de tipo respiratorio. Además, tanto la cepa parental como las mutantes GRF110 y GRF3 fueron capaces de llevar a cabo el proceso de desnitrificación (determinado como capacidad para producir óxido nitroso; experimentos previos realizados en colaboración con P. Aparicio del Departamento de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, Pamplona, y J. I. Plazaola, del Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Universidad del País Vasco, Bilbao). Por otra parte, ambos isoenzimas fueron incapaces de utilizar NADH, NADPH o ferredoxina como donador de electrones.

El molibdeno fue, como se ha descrito para otros enzimas nitrato reductasa (Hinton y Dean, 1990; Rajagopalan y Johnson, 1992) parte integrante de los enzimas de 160 kDa y 200 kDa, como lo demuestran los ensayos de complementación de la mutante *nit-1* de *N. crassa* (apartado 16.3 de Resultados).

Finalmente, indicar que, basándose en el espectro de absorción visible-UV (Fig. 6), los isoenzimas nitrato reductasa de las membranas de *B. japonicum* GRF110 y GRF3 no contienen citocromos de tipo *b* en su molécula, lo que los diferencia del enzima de *E. coli* (Stewart, 1988) y de *B. halodenitrificans* (Ketchum *et al.* 1991) y los asemeja a los enzimas de *R. sphaeroides f. sp. denitrificans* (Byrne y Nicholas, 1987), *H. denitrificans*

(Hochstein y Lang, 1991) y *P. stutzeri* (Blümle y Zumft, 1991).

## **CONCLUSIONES**

- 1<sup>a</sup> Las membranas de las células de *Bradyrhizobium japonicum* PJ17 cultivadas o incubadas microaeróbicamente en nitrato expresan dos isoenzimas nitrato reductasa cuyos tamaños moleculares relativos fueron de 160 kDa y 200 kDa.
- 2<sup>a</sup> El enzima de 160 kDa se expresa en respuesta a la microaerobiosis por si sola, mientras que la expresión del enzima de 200 kDa requiere la presencia simultánea de condiciones microaeróbicas y nitrato.
- 3<sup>a</sup> Ambos enzimas, el de 160 kDa y el de 200 kDa, son necesarios para la utilización microaeróbica del nitrato, ya que la ausencia de uno cualquiera de ellos resulta en la incapacidad de *B. japonicum* PJ17 para crecer en tales condiciones.
- 4<sup>a</sup> El enzima de 160 kDa está compuesto por tres subunidades de tamaño molecular 116 kDa, 68 kDa y 56 kDa. El enzima de 200 kDa se disocia en dos posibles isoformas activas de tamaño molecular 160 kDa y 120 kDa, cada una de las cuales está formada por 4 subunidades de tamaño molecular 116 kDa, 68 kDa, 59 kDa y 56 kDa.
- 5<sup>a</sup> Los dos isoenzimas nitrato reductasa son proteínas que contienen grupos [S-Fe] y molibdeno; no habiéndose detectado la presencia de citocromos tipo *b*.
- 6<sup>a</sup> En simbiosis con plantas de soja (*Glycine max*), la eficiencia relativa de la nitrogenasa de las mutantes GRF3 y GRF4, que no contienen el enzima de 160 kDa, y de las mutantes GRF102, GRF110 y GRF116, que carecen del enzima de 200 kDa, fue menor que la de la cepa parental PJ17. La disminución de la eficiencia relativa es consecuencia de la mayor producción de hidrógeno por la nitrogenasa de las cepas mutantes.

19. 2010

20. 2010

## **BIBLIOGRAFIA**

**Alikulov, Z.A.; S.H.S. Burikhanov; N.S. Sergeev; P. L'vov y V.L. Kretovich.** 1980. Nitrate reductase of lupine root nodule bacteroid. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol. (Transl.)* 16: 372-376.

**Alva, A.K.; D.G. Edwards; B.J. Carroll; C.J. Asher y P.M. Gresshoff.** 1988. Nodulation and early growth of soybean mutants with increased nodulation capacity under acid soil infertility factors. *Agron. J.* 80: 836-841.

**Anthamatten, D.; B. Scherb y H. Hennecke.** 1992. Characterization of a *fixLJ*-regulated *Bradyrhizobium japonicum* gene sharing similarity with the *Escherichia coli fnr* and *Rhizobium meliloti fixK* gene. *J. Bacteriol.* 174: 2111-2120.

**Anthamatten, D. y H. Hennecke.** 1991. The regulatory status of the *fixL* and *fixJ*-like genes in *Bradyrhizobium japonicum* may be different from that in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 225: 38-48.

**Antoun, H.; J.M. Bordeleau; D. Prevost y R.A. Lachance.** 1980. Absence of a correlation between nitrate reductase and simbiotic nitrogen fixation efficiency in *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Plant. Sci.* 60: 209-212.

**Aparicio-Tejo, P.M.; J.I. Peña y C. Arrese-Igor.** 1991. Desnitrificación en *Rhizobium* spp. En: Aportaciones a la biología de la fijación del nitrógeno atmosférico. M. Megias, A.J. Palomares y F. Ruíz Berraquero (Eds.), pp. 127-140. Publicaciones de la Universidad de Sevilla.

**Appleby, C.A.** 1984. Leghemoglobin. En: *The biology of nitrogen fixation*. A. Quispel (Ed.), pp. 521-554. Noth Holland. Amsterdam.

**Arp, D.J.** 1990. Hydrogen cycling in  $N_2$  fixation: past, present and future outlook. En: *Nitrogen fixation: Achievements and objectives*. P.M. Gresshoff, L.E. Roth, G. Stacey y W.E. Newton (Eds.), pp. 67-75. Chapman and Hall. New York.

**Arp, D.J.** 1992. Hydrogen cycling in symbiotic bacteria. En: Biological nitrogen fixation. G. Stacey, R.H. Burris y H.J. Evans (Eds.). pp. 432-460. Chapman and Hall. New York.

**Arrese-Igor, C.** 1990. Implicaciones del nitrato y del oxígeno en la fijación de nitrógeno en alfalfa. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad del País Vasco.

**Arrese-Igor, C. y P.M. Aparicio-Tejo.** 1992. Denitrification and respiration in *Rhizobium meliloti* bacteroids and lucerne nodules as affected by nitrate supply. J. Plant Physiol. 139: 373-378.

**Ausubel, F.M.; W.J. Buikema; C.D. Earl; B.T. Klingensmith; B.T. Nixon y W.W. Szeto.** 1985. Organization and regulation of *Rhizobium meliloti* and *Parasponia Bradyrhizobium* nitrogen fixation genes. En: Nitrogen fixation research progress. H.J. Evans, P.J. Bottomley y W.E. Newton (Eds.). pp. 167-179. Martinus Nijhoff. Dordrech. Holanda.

**Ballantine, S.P. y D.H. Boxer.** 1985. Nickel-containing hydrogenase isoenzymes from anaerobically grown *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 163: 454-459.

**Batut, J.; M.-L. Daveran-Mingot; M. David; J. Jacobs; A.M. Garnerone y D. Kahn.** 1989. *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. EMBO J. 8: 1279-1286.

**Batut, J.; E. Santero y S. Kustu.** 1991. In vitro activity of the nitrogen fixation regulatory protein FixJ from *R. meliloti*. J. Bacteriol. 173: 5914-5917.

**Bazylnski, D.A. y T.C. Hollocher.** 1985. Evidence from the reaction between trioxodinitrate (II) and nitrogen-15-labeled nitric oxide that trioxodinitrate (II) decomposed into nitrosyl hydride and nitrite in neutral solution. Inorg. Chem. 24: 4285-4288.

- Bazylnski, D.A. y R.P. Blakemore.** 1983. Denitrification and assimilatory nitrate reduction in *Aquaspirillum magnetotacticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1118-1124.
- Becana, M.; F.R. Minchin y J. Sprent.** 1989. Short-term inhibition of legume N<sub>2</sub> fixation by nitrate. I. Nitrate effects on nitrate-reductase activities of bacteroids and nodule cytosol. *Planta* 180: 40-45.
- Beck, C.F. y R.A.J. Warren.** 1988. Divergent promoters, a common form of gene organization. *Microbiol. Rev.* 52: 318-326.
- Bedmar, E.J.; N.J. Brewin y D.A. Phillips.** 1984. Effect of plasmid pIJ1008 from *Rhizobium leguminosarum* on symbiotic function of *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 876-878.
- Bedmar, E.J.; S.A. Edie y D.A. Phillips.** 1983. Host plant cultivar effects on hydrogen evolution by *Rhizobium leguminosarum*. *Plant Physiol.* 72: 1011-1015.
- Bello, A.B.; W.A. Cerón-Díaz; C.D. Nickell; E.O. El Sherif y L.C. Davis.** 1980. Influence of cultivar, between row spacing, and plant population on fixation of soybeans. *Crop. Sci.* 20: 751-755.
- Bethlenfalvay, G.J. y D.A. Phillips.** 1979. Variation in nitrogenase and hydrogenase activity of Alaska pea root nodules. *Plant Physiol.* 63: 816-820.
- Beynon, J.; M. Cannon; V. Buchanan-Wollaston y F. Cannon.** 1983. The *nif* promoters of *Klebsiella pneumoniae* have a characteristic primary structure. *Cell* 34: 665-671.
- Bhandari, B.; M.S. Maik y D.J.D. Nicholas.** 1984. ATP production coupled to the denitrification of nitrate in *Rhizobium japonicum*, grown in cultures and in bacteroids from *Glycine max*. *FEBS Letts.* 168: 321-326.

**Bishop, P.E.; S.I. MacDougal; E.D. Wolfinger y C.L. Shermer.** 1990. Genetics of alternative nitrogen fixation systems in *Azotobacter vinelandii*. En: Nitrogen fixation: achievements and objectives. P.M. Gresshoff, L.E. Roth, G. Stacey y W.E. Newton (Eds.). pp. 789. Chapman and Hall. New York.

**Bishop, P.E.; R. Premakumar; R.D. Joerger; M.R. Jacobson; D.A. Dalton; J.R. Chisnell y E.D. Wolfinger.** 1988. Alternative nitrogen systems in *Azotobacter vinelandii*. Resúmenes 7º International congress on nitrogen fixation. Colonia, R.F. Alemania. pp. 71-79.

**Bishop, P.E.; D.M.L. Jarlenski y D.R. Hetherington.** 1980. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7342-7346.

**Bisseling, T.; R.C. Van den Bos y A. Van Kammem.** 1978. The effect of ammonium nitrate on the synthesis of nitrogenase and the concentration of leghemoglobin in pea root nodules induced by *Rhizobium leguminosarum*. Biochim. Biophys. Acta 539: 1-11.

**Blum, H.; H. Beier y H.J. Gross.** <sup>1987</sup> Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8: 93-99.

**Blümle, S. y W.G. Zumft.** 1991. Respiratory nitrate reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*, purification, properties and target of proteolysis. Biochim. Biophys. Acta 1057: 102-108.

**Bonnefoy-Orth, V.; M. Lepelletier; M.C. Pascal y M. Chippaux.** 1981. Nitrate reductase and cythochrome *b*<sub>nitrate reductase</sub> structural genes as parts of the nitrate reductase operon. Mol. Gen. Genet. 181: 535-540.

**Boogerd, F.C.; H.W. Van Verseveld y A.H. Stouthamer.** 1981. Respiration-driven proton translocation with nitrite and nitrous oxide in *Paracoccus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta* 638: 181-191.

**Bothe, H.** 1991. Metabolism of inorganic nitrogen compounds. En: *Progress in botany*. H.D. Behnke, K. Esser, (Eds.). pp. 122-137. Springer-Verlag. Berlin.

**Braun, C. y W.G. Zumft.** 1991. Marker exchange of the structural genes for nitric oxide reductase blocks the denitrification pathway of *Pseudomonas stutzeri* at nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 266: 22785-22788.

**Breitenbeck, G.A. y J.M. Bremner.** 1989. Ability of free-living cells of *Bradyrhizobium japonicum* to denitrify in soils. *Biol. Fert. Soils.* 7: 219-224.

**Brewin, N.J.** 1984. Hydrogenase and energy efficiency in nitrogen-fixing symbionts. En: *Genes involved in plant-microbe interactions*. D.P.S. Verma y T.Hohn (Eds.). pp. 179-203. Springer-Verlag. New York.

**Bryan, B.A.; R.M. Jeter y C. Carlson.** 1985. Inability of *Pseudomonas stutzeri* denitrification mutants with the phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* to grow in nitrous oxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1301-1003.

**Bulen, W.A. y J.R. LeCompte.** 1966. The nitrogenase system from *Azotobacter*: two enzyme requirement for nitrogen reduction, ATP-dependent H<sub>2</sub> evolution, and ATP hidrolisis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 56: 979-984.

**Burke, K.A. y J. Lascelles.** 1979. Partial purification and some properties of the *Staphylococcus aureus* cytoplasmic nitrate reductase. *J. Bacteriol.* 139: 120-125.

**Burns, R.C. y R.W.F. Hardy.** 1975. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. pp. 121-132. Springer. New York.

- Butz, R.G. y W.A. Jackson.** 1977. A mechanism for nitrate transport and reduction. *Phytochemistry* 16: 409-417.
- Byrne, M.D. y D.J.D. Nicholas.** 1987. A membrane-bound dissimilatory nitrate reductase from *Rhodobacter* f. sp. *denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta* 915: 120-124.
- Caboche, M. y P. Rouzé.** 1990. Nitrate reductase: a target for molecular and cellular studies in higher plants. *Trends Genet.* 6: 187-192.
- Caetano-Anollés, G. y P.M. Gresshoff.** 1991. Plant genetic control of nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 345-382.
- Campbell, W.H.** 1988. Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants. *Physiol. Plant.* 74: 214-219.
- Campbell, W.H. y J.R. Kinghorn.** 1990. Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases. *TIBS* 15: 315-319.
- Carlson, T.A.; G.B. Martin y B.K. Chelm.** 1987. Differential transcription of the two glutamine synthetase genes of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 169: 5861-5866.
- Carlson, C.A.; L.P. Ferguson y J.L. Ingraham.** 1982. Properties of dissimilatory nitrate reductase purified from the denitrifier *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol* 151: 162-171.
- Carr, G.J.; N.D. Page y S.J. Ferguson.** 1989. *Eur. J. Biochem.* 179: 5694-5699.
- Carrol, B.J. y A. Mathews.** 1990. Nitrate inhibition of nodulation in legumes. En: *Molecular biology of symbiotic nitrogen fixation*. P.M. Gresshoff (Ed.), pp. 159-180. CRC Press, Boca Raton. Florida.

**Carrol, B.J. y P.M. Gresshoff.** 1983. Nitrate inhibition of nodulation and nitrogen fixation in white clover. *Z. Pflanzenphysiol.* 110: 77-82.

**Carrol, B.J.; D.L. McNeil; D.W. Smith y P.M. Gresshoff.** 1985. Host genetics and physiological studies of nitrate inhibition of nodulation and nitrogen fixation in soybean. En: Nitrogen fixation research progress. H.J. Evans, P.J. Bottomley y W.E. Newton (Eds.). pp. 39-48. Martinus Nijhoff. Dordrech.

**Carroll, B.J.; A.P. Hansen; D.L. McNeil y P.M. Gresshoff.** 1987. Effect of oxygen on nitrogenase activity of nitrate- and dark-stressed soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 14: 679-687.

**Cathala, N; G. Conejero; A. Gojon; L. Passama y P. Rowin.** 1992. Determination of the distribution of three nitrate reductase isoforms in soybean seedlings by chromatography and a simple method based on assay conditions. *Physiol Plant.* 85: 541-548.

**Clegg, R.A.** 1976. Purification and some properties of nitrate reductase (EC 1.7.99.4) from *Escherichia coli* K-12. *Biochem. J.* 153: 533-541.

**Cole, J.A.** 1978. The rapid accumulation of large quantities of ammonia during nitrite reduction by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 4: 327-329.

**Colonna-Romano, S.; W. Arnold; A. Schlüter; P. Boistard; A. Pühler y U.B. Priefer.** 1990. An Fnr-like protein encoded in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* shows structural and functional homology to *Rhizobium meliloti* FixK. *Mol. Gen. Genet.* 223: 138-147.

**Cotter, P.A. y R.P. Gunsalus.** 1992. Contribution of the *fur* and *arcA* gene products in coordinate regulation of the cytochrome *o* (*cyoABCDE*) and *d* (*cydAB*) oxidase genes in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Letts.* 91: 31-36.

**Coyle, C.L.; W.G. Zumft; P.M.H. Kroneck; H. Körner y W. Jakob. 1985. Nitrous oxide reductase denitrifying *Pseudomonas perfectomarina*, purification and properties of a novel multicopper enzyme. Eur. J. Biochem. 153: 459-467.**

**Cunningham, S.D.; Y. Kapulnik; N.J. Brewin y D.A. Phillips. 1985. Uptake hydrogenase activity determined by plasmid pRL6II in *Rhizobium leguminosarum* does not increase symbiotic nitrogen fixation. Appl. Microbiol. 50: 791-794.**

**Cuypers, H. y W.G. Zumft. 1991. Datos sin publicar.**

**Cuypers, H. y W.G. Zumft. 1992. Regulatory components of the denitrification gene cluster of *Pseudomonas stutzeri*. En: *Pseudomonas*, molecular biology and biotechnology. E. Galli, S. Silver y B. Witholt (Eds.), pp. 188-197. American Society for Microbiology, Washington, D.C.**

**Cheniae, G.M. y H.J. Evans. 1960. Physiological studies on nodule nitrate reductase. Plant Physiol. 35: 454-462.**

**Chiang, R.C.; R. Cavicchioli y R.P. Gunsalus. 1992. Identification and characterization of *narQ*, a second nitrate sensor for nitrate-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 6: 1913-1923.**

**Daniel, R.M.; K.W. Steele y A.W. Limmer. 1980. Denitrification by rhizobia. A possible factor contributing to nitrogen losses from soils. N. Z. Agric. Sci. 14: 109-112.**

**Daniel, R.M.; A.W. Limmer; K.W. Steele y I.M. Smith. 1982. Anaerobic growth, nitrate reduction and denitrification in 46 *Rhizobium* strains. J. Gen. Microbiol. 128: 1811-1815.**

**Daniel, R.M. y J. Gray. 1976. Nitrate reductase from anaerobically grown *Rhizobium japonicum*. J. Gen. Microbiol. 96: 247-251.**

**Daniel, R.M. y C.A. Appleby.** 1972. Anaerobic-nitrate, symbiotic and aerobic growth of *Rhizobium japonicum*: effects on cytochrome P<sub>450</sub>, other hemoproteins, nitrate and nitrite reductases. *Biochim. Biophys. Acta* 275: 347-354.

**Dannenberg, G.; W. Zimmer y H. Bothe.** 1985. En: *Azospirillum* III, genetic, physiology, ecology. W. Klingmüller (Ed.). pp. 127-138. Springer. Berlin.

**Darbyshire, J.F.** 1966. Studies on the physiology of nodule formation. IX. The influence of combined nitrogen, glucose, light intensity and day length on root hair infection in clover. *Ann. Bot.* 30: 623-626.

**David, M.; M.L. Daveran; J. Batut; A. Dedieu; O. Domergue; J. Ghai; C. Hertig; P. Boistard y D. Kahn.** 1988. Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell* 54: 671-683.

**Dazzo, F.B. y W.J. Brill.** 1978. Regulation by fixed nitrogen of host-symbiont recognition in the *Rhizobium*-clover symbiosis. *Plant Physiol.* 62: 18-26.

**de Vasconcelos, L.; L. Miller y C.A. Neyra.** 1980. Free-living and symbiotic characteristics of chlorate resistant mutants of *Rhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol.* 26: 338-342.

**De Crombrugge, B.; S. Busby y H. Buc.** 1984. Cyclic AMP receptor protein: role in transcription activation. *Science* 224: 831-838.

**Deibert, E.J.; M. Bijeriego y R.A. Olson.** 1979. Utilization of <sup>15</sup>N fertilizer by nodulating and non-nodulating soybean isolines. *Agron. J.* 71: 717-723.

**Dejong, T.M.; N.J. Brewin; A.W.B. Johnston y D.A. Phillips.** 1982. Improvement of symbiotic properties in *Rhizobium leguminosarum* by plasmid transfer. *J. Gen. Microbiol.* 128: 1829-1838.

- Delgado, M.J.; J. Olivares y E.J. Bedmar.** 1989. Nitrate reductase activity of free-living and symbiotic uptake hydrogenase-positive and uptake hydrogenase-negative strains of *Bradyrhizobium japonicum*. Arch. Microbiol. 151: 166-170.
- Delgado, M.J.; J. Olivares y E.J. Bedmar.** 1992. Constitutive and nitrate-induced, membrane-bound nitrate reductase from *Bradyrhizobium japonicum*. Current Microbiol. 24: 121-124.
- Delgado, M.J.; J.J. Drevon y E.J. Bedmar.** 1991. Denitrification by bacteroids of an uptake hydrogenase negative (Hup<sup>-</sup>) mutant and its isogenic Hup<sup>+</sup> parental strain of *Bradyrhizobium japonicum*. FEMS Microbiol. Letts. 77: 157-162.
- Delwiche, C.C.** 1981. Denitrification, nitrification, atmospheric nitrous oxide. John Wiley and Sons. New York.
- DeMoss, J.A.; T.Y. Fan y R.H. Scott.** 1981. Characterization of subunits structural alterations which occur during purification of nitrate reductase from *Escherichia coli*. Arch. Biochem. Biophys. 206: 54-64.
- DeMoss, J.A. y P. Hsu.** 1991. NarK enhances nitrate uptake and nitrite excretion in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 173: 3303-3310.
- Dixon, R.O.D.** 1967. Hydrogen uptake and exchange by pea root nodules. Ann. Bot. 31: 179-181.
- Dixon, R.O.D.** 1968. Hydrogenase in pea root nodules bacteroids. Arch. Microbiol. 62: 272-279.
- Dixon, R.O.D.** 1972. Hydrogenase in legume roots bacteroids: occurrence and properties. Arch. Microbiol. 85: 193-201.

- Dubourdieu, M. y J.A. DeMoss.** 1992. The *narJ* gene product is required for biogenesis of respiratory nitrate reductase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174: 867-872.
- Duc, G.** 1980. Activité fixatrice d'azote des légumineuses. Possibilités de sélection. Beaucouzé. Angers 24-26 sept.
- Durand, J.L.; J.E. Sheehy y F.R. Minchin.** 1987. Nitrogenase activity, photosynthesis and nodule water potential in soybean plants experiencing water deprivation. *J. Exp. Bot.* 38: 311-321.
- Edwards, E.S.; S.S. Rondeau y J.A. DeMoss.** 1983. *chlC (nar)* operon of *Escherichia coli* includes structural genes for  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of nitrate reductase. *J. Bacteriol.* 153: 1513-1520.
- Egan, S.M. y V. Stewart.** 1991. Mutational analysis of nitrate regulatory gene *narL* in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 173: 4424-4432.
- Eisbrenner, G. y H.J. Evans.** 1983. Aspects of hydrogen metabolism in nitrogen fixing legumes and other plant-microbe associations. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 34: 105-136.
- El Mokadem, M.T. y D.L. Keister.** 1982. Electron transport in *Rhizobium japonicum*. Isolation of cytochrome *c* deficient mutants. *Isr. J. Botany* 31: 102-111.
- Enoch, H.G. y R.L. Lester.** 1975. The purification and properties of formate dehydrogenase and nitrate reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 250: 6693-6705.
- Evans, H.J.** 1954. Diphosphopyridine nucleotide-nitrate reductase from soybean nodules. *Plant Physiol.* 29: 298-301.

**Evans, H.J.; F.J. Hanus; S.A. Russell; A.R. Harker; G.R. Lambert y D.A. Dalton.** 1985. Biochemical characterization, evaluation and genetics of H<sub>2</sub> recycling in *Rhizobium*. En: Nitrogen fixation and CO<sub>2</sub> metabolism. P.W. Ludden y J.E. Burris (Eds.). pp. 3-11. Elsevier Science Publishing Co.

**Evans, H.J.; A.R. Harker; H. Pappen; S.A. Russell; F.J. Hanus y M. Zuber.** 1987. Physiology, biochemistry and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 335-361.

**Evans, H.J.; K. Purohit; M.A. Cantrell; G. Eisbrenner; S.A. Russell; F.J. Hanus y J.E. Lepo.** 1981. Hydrogen losses and hydrogenases in nitrogen-fixing organisms. En: Current perspectives in nitrogen fixation. A.H. Gibson y W.E. Newton (Eds.). pp. 84-96. Australian Academy of Science. Canberra.

**Fisher, H.M.; T. Bruderer y H. Hennecke.** 1988. Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. *Nucleic Acids Res.* 16: 2207-2224.

**Fisher, H.M. y H. Hennecke.** 1987. Direct response of *Bradyrhizobium japonicum* nifA-mediated nif gene regulation to cellular oxygen status. *Mol. Gen. Genet.* 209: 621-626.

**Florencio, F.J.; S. Marques y P. Candau.** 1987. Identification and characterization of a glutamate dehydrogenase in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *FEBS Lett.* 223: 37-41.

**Franco, A.A.; J.C. Pereira y C.A. Neyra.** 1979. Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 63: 421-424.

**Friedrich, B.; C. Böcker; G. Eberz; T. Eitinger; K. Horstmann; C. Kortlüke; D. Römermann; E. Schwartz; A. Tran-Betcke; U. Warnecke y J. Warrelmann.** 1990.

Genes for hydrogen oxidation and denitrification form two clusters on megaplasmid pHG1 of *Alcaligenes eutrophus*. En: *Pseudomonas: Biotransformations, pathogenesis, and evolving biotechnology*. S. Silver, A.M. Chakrabarty, B. Iglewski y S. Kaplan (Eds.). pp. 408-419. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

**Galston, A.W.** 1961. The life of the green plants. E.J. Hewitt y C.U. Cutting (Eds.). pp. 1-14. Academic Press. New York.

**Gallon, J.R. y A.E. Chaplin.** 1987. An introduction to nitrogen fixation. Cassell Press. London.

**Gamble, T.N.; M.R. Betlach y J.M. Tiedje.** 1977. Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 926-939.

**Garber, E.A. y T.C. Hollocher.** 1981. <sup>15</sup>N tracer studies on the role of NO in denitrification. *J. Biol. Chem.* 256: 5459-5465.

**Garzón, A.; J. Li; A. Flores; J. Casadesús y V. Stewart.** 1992. Molybdenum cofactor (chlorate-resistant) mutants of *Klebsiella pneumoniae* M5a1 can use hypoxanthine as the sole nitrogen source. *J. Bacteriol.* 174: 6298-6302.

**Gibson, A.H. y J.D. Pagan.** 1977. Nitrate effects on the nodulation of legumes inoculated with nitrate reductase-deficient mutants of *Rhizobium*. *Planta* 134: 17-22.

**Gibson, A.H. y J.E. Harper.** 1985. Nitrate effect on nodulation of soybean by *Rhizobium japonicum*. *Crop. Sci.* 25: 497-500.

**Gilles-González, M.A.; G.S. Ditta y D.R. Helinski.** 1991. A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature (London)* 350: 170-172.

**Goretski, J. y T.C. Hollocher.** 1990. J. Biol. Chem. 265: 889-895.

**Goretski, J.; O.C. Zafiriou y T.C. Hollocher.** 1990. J. Biol. Chem. 265: 11535-11537.

**Ligero, F.; J.M., Caba; C. Lluch y J. Olivares.** 1991. Nitrate inhibition of nodulation can be overcome by the ethylene inhibitor aminoethoxyvinylglycine. Plant Physiol. 97: 1221-1225.

**Bedmar, E.J. y J. Olivares.** 1980. Effect of chemical inhibitors of photorespiration on nitrogenase activity in nodulated alfalfa plants. Planta 150: 299-302.

**Goretski, J. y T.C. Hollocher.** 1988. Trapping of nitric oxide produced during denitrification by extracellular hemoglobin. J. Biol. Chem. 263: 2316-2323.

**Graham, A. y D.H. Boxer.** 1980. Arrangement of respiratory nitrate reductase in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. Location of  $\beta$  subunit. FEBS Lett. 113: 15-20.

**Green, J.; M. Trageser; S. Six; G. Uden y J.R. Guest.** 1991. Characterization of the FNR protein of *Escherichia coli*, an iron-binding transcriptional activator. Proc. R. Soc. London B Biol. Sci. 244: 137-144.

**Gremaud, M.F. y J.E. Harper.** 1989. Selection and initial characterisation of partially nitrate tolerant nodulation mutants of soybean. Plant Physiol. 89: 169-172.

**Guerrero, M.G.; J.M. Vega y M. Losada.** 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. Ann. Rev. Plant Physiol. 32: 169-204.

**Guerrero, M.G.; J.M. Romero; R. Rodríguez y C. Lara.** 1990. Nitrate transport in cyanobacteria. En: Inorganic nitrogen in plants and microorganisms. Uptake and metabolism. W.R. Ullrich, C. Rigano, A. Fuggi y P.J. Aparicio (Eds.). pp. 79-85. Springer-Verlag. Berlin.

**Guest, J.R.** 1969. Biochemical and genetic studies with nitrate reductase C-gene mutants of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 105: 285-297.

**Gunsalus, R.P.; L.V. Kalman y R.R. Stewart.** 1989. Nucleotide sequence of the *narL* gene that is involved in global regulation of nitrate controlled respiratory genes of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 17: 1965-1975.

**Gussin, G.N.; G.W. Ronson y F.M. Ausubel.** 1986. Regulation of nitrogen fixation genes. *Ann. Rev. Genet.* 20: 267-291.

**Hageman, R.H.** 1979. Integration of nitrogen assimilation in relation to yield. En: Nitrogen assimilation of plants. E.J. Hewitt y C.U. Cutting (Eds.). pp. 591-611. Proc. Long Ashton Symp. Academic Press.

**Hageman, R.H.; W.H. Orme-Johnson y R.H. Burris.** 1980. Role of magnesium adenosine 5'-triphosphate in the hydrogen evolution reaction catalyzed by nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochem.* 19: 2333-2342.

**Hageman, R.H. y R.H. Burris.** 1980. Electron allocation to alternative substrates of *Azotobacter* nitrogenase is controlled by the electron flux through dinitrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.* 591: 63-75.

**Hageman, R.H. y D.P. Hucklesby.** 1971. Nitrate reduction from higher plants. En: Methods in enzymology. A. San Pietro (Ed.). pp. 491-503. Academic Press. New York.

**Harper, J.E.** 1987. Nitrogen metabolism. En: Soybeans: improvement, production and uses. J.R. Wilcox (Ed.). pp. 497-513. American Society of Agronomy, Crop Sciences Society of America, and Soil Sciences Society of America. Madison. WI.

**Harper, J.E.** 1974. Soil and symbiotic nitrogen requirements for optimum soybean production. *Crop. Sci.* 14: 255-260.

**Hawkes, T.R. y R.C. Bray.** 1984. Cuantitative transfer of molybdenum cofactor from xanthine oxidase and from sulfite oxidase to the deficient enzyme of the *nit-1* mutant of *Neurospora crassa* to yield active nitrate reductase. *Biochem. J.* 219: 481-493.

**Hawkins, F.K.L.; C. Kennedy y A.W.B. Johnston.** 1991. A *Rhizobium leguminosarum* gene required for symbiotic nitrogen fixation, melanin synthesis and normal growth on certain growth media. *J. Gen. Microbiol.* 137: 1721-1728.

**Heckman, M.O.; J.J. Drevon; P. Saglio y L. Salsac.** 1989. Effect of oxygen and malate on  $\text{NO}_3^-$  inhibition of nitrogenase in soybean nodules. *Plant Physiol.* 90: 224-228.

**Heichel, G.H.; D.K. Barnes y C.P. Vance.** 1981. Nitrogen fixation of alfalfa in the seedling year. *Crop. Sci.* 21: 330-335.

**Heiss, B.; K. Frunzke y W.G. Zumft.** 1989. Formation of the N-N bond from nitric oxide by a membrane-bound cytochrome *bc* complex of nitrate-respiring (denitrifying) *Pseudomonas stutzeri*. *J. Bacteriol.* 171: 3288-3297.

**Hennecke, H.** 1990. Regulation of bacterial gene expression by metal-protein complexes. *Mol. Microbiol.* 4: 1621-1628.

**Hernández, D. y J.J. Rowe.** 1987. Oxygen regulation of nitrate uptake in denitrifying *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 745-750.

**Hernández, D. y J.J. Rowe.** 1988. Oxygen inhibition of nitrate uptake is a general regulatory mechanism in nitrate respiration. *J. Biol. Chem.* 263: 7937-7939.

**Herrero, A.; E. Flores y M.G. Guerrero.** 1985. Regulation of nitrate reductase cellular levels in the cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Synechocystis* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* 26: 21-25.

- Hinton, S.M. y D. Dean.** 1990. Biogenesis of molybdenum cofactors. *Critical Rev. Microbiol.* 17: 169-188.
- Hirschman, J.; P.-K. Wong; K. Sei; J. Keener y S. Kustu.** 1985. Products of nitrogen regulatory genes *ntrA* and *ntrC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription in vitro: evidence that the *ntrA* product is a  $\sigma$  factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7525-7529.
- Hochstein, L.I. y F. Lang.** 1991. Purification and properties of a dissimilatory nitrate reductase from *Haloferax denitrificans*. *Arch. Biochem. Biophys.* 288: 380-385.
- Hochstein, L.I. y G.A. Tomlinson.** 1988. The enzymes associated with denitrification. *Ann. Rev. Microbiol.* 42: 231-261.
- Hoff, T.; B.M. Stummann y K.W. Henningsen.** 1992. Structure, function and regulation of nitrate reductase in higher plants. *Physiol. Plant.* 84: 616-624.
- Howitt, S.M.; D.A. Day; K.F. Scott y P.M. Gresshoff.** 1988. Mutants of *Bradyrhizobium (Parasponia)* sp. ANU289 affected in assimilatory nitrate reduction also show lowered symbiotic effectiveness. *J. Plant Physiol.* 132: 5-9.
- Hua, S.T.** 1981. Molybdate dependence of nitrate reductase activity in a class of chlorate-resistant mutant of *Rhizobium japonicum* 110. *J. Gen. Microbiol.* 123: 355-357.
- Hungria, M. y M.C.P. Neves.** 1986. Interação entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* e estirpes de *Rhizobium* na fixação e transporte do nitrogênio. *Pesq. Agrop. Bras.* 21: 127-140.
- Hunt, S.; B.J. King; R.F. Denison; H. Kouchi; S. Tajima y D.B. Layzell.** 1990. An osmotic mechanism for diffusion barrier regulation in soybean nodules. En: *Nitrogen fixation: achievements and objectives*. P.M. Gresshoff, L.E. Roth, G. Stacey y W.E. Newton (Eds.). pp. 352. Chapman and Hall. New York.

- Hunt, S.; B.J. King; D.T. Canvin y D.B. Layzell.** 1987. Steady and nonsteady state gas exchange characteristics of soybean nodules in relation to the oxygen diffusion barrier. *Plant Physiol.* 84: 164-172.
- Hunt, S.; S.T. Gaito y D.B. Layzell.** 1988. Characterisation of the diffusion barrier and estimation of the concentrations of CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> in the infected cells. *Planta* 173: 128-141.
- Hunt, T.P. y B. Magasanik.** 1985. Transcription of *glnA* by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and the products of *glnF*, *glnG* and *glnL*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8453-8457.
- Hwang, J.C. y R.H. Burris.** 1972. Inhibition of nitrogenase-catalyzed reactions. *Biochim. Biophys. Acta.* 283: 339-350.
- Hynes, M.F.; J. Quandt; M.P. O'Connell y A. Pühler.** 1989. Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmid using transposon carrying the *Bacillus subtilis sacB* gene. *Gene* 78: 111-120.
- Imsande, J.** 1988. Interrelationship between plant developmental stage, plant growth rate, nitrate utilization and nitrogen fixation in hydroponically grown soybean. *J. Exp. Bot.* 39: 775-785.
- Iobbi, C.; C.L. Santini; V. Bonnefoy y G. Giordano.** 1987. Biochemical and immunological evidence for a second nitrate reductase in *Escherichia coli* K-12. *Eur. J. Biochem.* 168: 451-459.
- Ish-Horowicz, D. y J.F. Burke.** 1981. Rapid and efficient cosmid vector cloning. *Nucleic Acids Res.* 9: 2988-2998.

**Iuchi, S. y E.C.C. Lin.** 1991. Adaptation of *Escherichia coli* to respiratory conditions: regulation of gene expression. *Cell* 66: 5-7.

**Iuchi, S. y E.C.C. Lin.** 1987. A molybdenum effector of fumarate reductase expression and nitrate reductase induction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169: 3720-3725.

**James, E.K.; N.K. Brewin; F.R. Minchin y J.I. Sprent.** 1990. Intercellular location of glycoprotein in soybean nodules: effect of altered rhizosphere oxygen concentration. En: Nitrogen fixation: achievements and objectives. P.M. Gresshoff, L.E. Roth, G. Stacey y W.E. Newton (Eds.). pp. 743. Chapman and Hall. New York.

**Jones, R.W. y P.B. Garland.** 1977. Sites and specificity of the reaction of bipyridilium compound with anaerobic respiratory systems of *Escherichia coli*. Effects of permeability barriers imposed by the cytoplasmic membrane. *Biochem. J.* 164: 199-211.

**Jones, R.W.; A. Lamont y P.B. Garland.** 1980. The mechanism of proton translocation driven by the respiratory nitrate reductase complex in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 190: 79-94.

**Jüngst, A. y W.G. Zumft.** 1991. Datos sin publicar.

**Kaminski, P.A.; K. Mandon; F. Arigoni; N. Desnoues y C. Elmerich.** 1991. Common *cis*-acting region responsible for transcriptional regulation of *Bradyrhizobium japonicum* hydrogenase by nickel, oxygen, and hydrogen. *J. Bacteriol.* 173: 3993-3999.

**Kanayama, Y. y Y. Yamamoto.** 1990c. Effects of nitrate on nucleotide levels in soybean nodules. *Plant Cell Physiol.* 31: 893-895.

**Kanayama, Y.; I. Watanabe y Y. Yamamoto.** 1990. Inhibition of nitrogen fixation in soybean plants supplied with nitrate. 1. Nitrite accumulation and formation of nitrosylhemoglobin in nodules. *Plant Cell Physiol.* 31: 341-346.

**Kanayama, Y. y Y. Yamamoto.** 1990b. Inhibition of nitrogen fixation in soybean plants supplied with nitrate. 3. Kinetics of the formation of nitrosylleghemoglobin and of the inhibition of formation of oxyleghemoglobin. *Plant Cell Physiol.* 31: 603-608.

**Kanayama, Y. y Y. Yamamoto.** 1990a. Inhibition of nitrogen fixation in soybean plants supplied with nitrate. 2. Accumulation and properties of nitrosylleghemoglobin in nodules. *Plant Cell Physiol.* 31: 207-214.

**Kanayama, Y. y Y. Yamamoto.** 1991. Formation of nitrosylleghemoglobin in nodules of nitrate-treated cowpea and pea plants. *Plant Cell Physiol.* 32: 19-24.

**Kapulnik, Y. y D.A. Phillips.** 1986. Sodium stimulation of uptake hydrogenase activity in symbiotic *Rhizobium*. *Plant Physiol.* 82: 494-498.

**Kennedy, J.R.; J. Rigaud y J.R. Trinchant.** 1975. Nitrate reductase from bacteroids of *Rhizobium japonicum*: enzyme assay and characteristics and possible interaction with fixation. *Biochim. Biophys. Acta* 397: 24-35.

**Ketchum, P.A.; G. Denariáz; J. Legall y W.J. Payne.** 1991. Menaquinol-nitrate oxidoreductase of *Bacillus halodenitrificans*. *J. Bacteriol.* 173: 2498-2505.

**Keyser, H.H. y F. Li.** 1992. Potential for increasing biological nitrogen fixation in soybean. *Plant Soil* 141: 119-135.

**Kiss, G.B.; E. Vincze; Z. Kalman; T. Forrai y A. Kondorosi.** 1979. Genetic and biochemical analysis of mutants affected in nitrate reduction in *Rhizobium meliloti*. *J. Gen. Microbiol.* 113: 105-118.

**Kondorosi, A.; I. Barabas; Z. Svab; L. Orosz; F. Sik y R.D. Hotchkiss.** 1973. Evidence for common genetic determinants of nitrogenase and nitrate reductase in *Rhizobium meliloti*. *Nature* 296: 153-154.

**Körner, H. y F. Mayer.** 1992. Periplasmic location of nitrous oxide reductase and its apoform in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. Arch. Microbiol. 157: 218-222.

**Körner, H. y W.G. Zumft.** 1989. Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1670-1676.

**Kroneck, P.M.H.; W.E. Antholine; D.H.W. Kastrau; G. Buse; G.C.M. Steffens y W.G. Zumft.** 1990. Multifrequency EPR evidence for a bimetallic center at the Cu<sub>A</sub> site in cytochrome *c* oxidase. FEBS Lett. 268: 274-276.

**Kullik, I.; S. Fritsche; H. Knobel; J. Sanjuan; H. Hennecke y H.M. Fisher.** 1991. *Bradyrhizobium japonicum* has two differentially regulated, functional homologs of the  $\sigma^{54}$  gene (*rpoN*). J. Bacteriol. 173: 1125-1138.

**Kustu, S.; E. Santero; J. Keener; D. Popham y D. Weiss.** 1989. Expression of  $\sigma^{54}$  (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. Microbiol. Rev. 53: 367-376.

**Ladha, J.K.; R.P. Pareek; R. So y M. Becker.** 1990. Stem-nodule symbiosis and its unusual properties. En: Nitrogen fixation: Achievements and objectives. P.M. Gresshoff, L.E. Roth, G. Stacey y W.E. Newton (Eds.), pp. 633-640. Chapman and Hall. New York.

**Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

**Lara, C.; J.M. Romero y M.G. Guerrero.** 1987. Regulated nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. J. Bacteriol. 169: 4376-4378.

**LaRue, T.A. y T.G. Patterson.** 1981. How much nitrogen do legumes fix? Adv. Agron. 34: 15-39.

**Latimore, M. Jr.; J. Giddens y D.A. Ashley.** 1977. Effect of ammonium and nitrate nitrogen upon photosynthate supply and nitrogen fixation by soybeans. *Crop Sci.* 17: 399-404.

**Layzell, D.B. y S. Hunt.** 1990. Oxygen and the regulation of nitrogen fixation in legume nodules. *Physiol. Plant.* 80: 322-327.

**Layzell, D.B.; S.T. Gaito y S. Hunt.** 1988. Model of gas exchange and diffusion in legume nodules. I. Calculation of gas exchange rates and the energy cost of N<sub>2</sub> fixation. *Planta* 173: 117-127.

**Lee, H.S.; S.H.T. Abdelal; M.A. Clark y J.L. Ingraham.** 1991. Molecular characterization of *nosA*, a *Pseudomonas stutzeri* gene encoding an outer membrane protein required to make copper-containing N<sub>2</sub>O reductase. *J. Bacteriol.* 173: 5406-5413.

**Lepo, J.E.; R.E. Hickok; S.A. Russell y H.J. Evans.** 1981. Revertible hydrogen-uptake deficient mutants of *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 146: 614-620.

**Lepo, J.E.; F.J. Hanus y H.J. Evans.** 1980. Chemoautotrophic growth of hydrogen-uptake positive strains of *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 141: 664-670.

**Li, S.F. y J.A. DeMoss.** 1987. Promoter region of the *nar* operon of *Escherichia coli*: nucleotide sequence and transcription initiation signals. *J. Bacteriol.* 169: 4614-4620.

**Lie, T.A.** 1974. Environmental effects on nodulation and symbiotic nitrogen fixation. En: *The biology of nitrogen fixation.* A. Quispel (Ed.). pp. 555-567. North-Holland. Amsterdam.

**Ligero, F.; C. Lluch y J. Olivares.** 1987. Evolution of ethylene from roots and nodulation rate of alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants inoculated with *Rhizobium meliloti* as affected by the presence of nitrate. *J. Plant Physiol.* 129: 461-465.

**Lim, S.T. y K.T. Shanmugan.** 1979. Regulation of H<sub>2</sub> utilization in *Rhizobium japonicum* by cyclic AMP. *Biochim. Biophys. Acta* 584: 479-492.

**Lin, E.C.C. y D.R. Kuritzkes.** 1987. Pathways for anaerobic electron transport. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H.E. Umbarger (Eds.). pp. 201-221. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

**Lowe, R.H. y H.J. Evans.** 1964. Preparation and some properties of a soluble nitrate reductase from *Rhizobium japonicum*. *Biochim. Biophys. Acta* 85: 377-389.

**Lund, K. y J.A. DeMoss.** 1976. Association-dissociation behavior and subunit structure of heat-released nitrate reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 251: 2207-2216.

**MacGregor, C.H.** 1976. Biosynthesis of membrane-bound nitrate reductase in *Escherichia coli*: evidence for a soluble precursor. *J. Bacteriol.* 126: 122-131.

**MacGregor, C.H.; C.A. Schnaitman; D.E. Normansell y M.J. Hodgins.** 1974. Purification and properties of nitrate reductase from *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* 249: 5321-5327.

**MacGregor, C.H. y A.R. Christopher.** 1978. Assymetric distribution of nitrate reductase subunits in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*: evidence derived from surface labeling studies with transglutaminase. *Arch. Biochem. Biophys.* 185: 204-213.

**MacGregor, C.H.** 1975. Anaerobic cythochrome *b<sub>1</sub>* in *Escherichia coli*: association with and regulation of nitrate reductase. *J. Bacteriol.* 121: 1111-1116.

**Madueño, F.; M.A. Vega-Palas; E. Flores y A. Herrero.** 1988. A cytoplasmic-membrane protein repressible by ammonium in *Synechococcus* R2: altered expression in nitrate assimilation mutants. *FEBS Letts.* 239: 289-291.

- Maier, R.J. y L. Graham.** 1990. Mutants strain of *Bradyrhizobium japonicum* with increased symbiotic N<sub>2</sub> fixation rates and altered Mo metabolism properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2341-2346.
- Maier, R.J. y W.J. Brill.** 1978. Involvement of *Rhizobium japonicum* O antigen in soybean nodulation. *J. Bacteriol.* 133: 1295-1299.
- Malik, N.S.A.; H.E. Calvert y W.D. Bauer.** 1987. Nitrate induced regulation of nodule formation in soybean. *Plant Physiol.* 84: 266-271.
- Manhart, J.R. y P.P. Wong.** 1979. Nitrate reductase activities of rhizobia and the correlation between nitrate reduction and nitrogen fixation. *Can. J. Microbiol.* 25: 169-174.
- Markwell, M.A.K.; S.M. Hass; L.L. Bieber y N.E. Tolberg.** 1979. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination. *Anal. Biochem.* 87: 206-210.
- Marrs, B. y H. Gest.** 1973. Genetic mutations affecting the respiratory electron-transport system of the photosynthesis bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.* 114: 1045-1051.
- Martin, G.B.; K.A. Chapman y B.K. Chelm.** 1988. Role of the *Bradyrhizobium japonicum ntrC* gene product in differential regulation of the glutamine synthetase II gene (*glnII*). *J. Bacteriol.* 170: 5452-5459.
- Martínez Toledo, V.M.** 1992. Biología del nitrógeno. En: Interacción planta-microorganismo: Biología del nitrógeno. C. Lluch Plá y J. González López (Eds.), pp. 25-35. Editorial Rueda. Madrid.
- Martínez-Luque, M.; M.M. Dobao y F. Castillo.** 1991. Characterization of the assimilatory and dissimilatory nitrate-reducing systems in *Rhodobacter*: a comparative study. *FEMS Microbiol. Letts.* 83: 329-334.

- Mathews, A.; B.J. Carroll y P.M. Gresshoff.** 1989. Development of *Bradyrhizobium* infections in a supernodulating and non-nodulating mutants of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Protoplasma* 83: 24-29.
- Matsubara, T. y M. Sano.** 1985. Isolation and some properties of a novel violet copper protein from a denitrifying bacterium, *Alcaligenes* sp. *Chem. Lett.* 7: 1053-1056.
- McEwan, A.G.; A.J. Greenfield; H.G. Wetzstein; J.B. Jackson y S.J. Ferguson.** 1985. Nitrous oxide reduction by members of the family *Rhodospirillaceae* and the nitrous oxide reductase of *Rhodopseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.* 164: 823-830.
- Messenger, A.** 1985. Selection of pea mutants for nodulation and nitrogen fixation. En: *Analysis of the plant genes involved in the legume-Rhizobium symbiosis*. Organization for economic cooperation and development. pp. 52-67. Paris.
- Miller, J.H.** 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. New York.
- Minchin, F.R.; M.I. Minguéz; J.E. Sheehy; J.F. Witty y L. Skot.** 1986. Relationship between nitrate and oxygen supply in symbiotic nitrogen fixation by white clover. *J. Exp. Bot.* 37: 1103-1113.
- Minchin, F.R.; J.F. Witty y L. Skot.** 1988. Limitations and benefits of oxygen diffusion control in legume nodules. En: *Physiological limitations and the genetic improvement of symbiotic nitrogen fixation*. O'Hara, S. Manian y J.J. Drevon (Eds.). pp. 77-85. Kluwer Academic Publishers. Dordrech.
- Minchin, F.R.; M. Becana y J.I. Sprent.** 1989. Short-term inhibition of legume N<sub>2</sub> fixation by nitrate. 2. Nitrate effects on nodule oxygen diffusion. *Planta* 180: 46-52.

- Minguez, I. y T. Ruiz Argüeso.** 1980. Relative energy efficiency of nitrogen fixation by nodules of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) produced by different strains of *Rhizobium*. *Current Microbiol.* 4: 169-171.
- Monza, J.; M.J. Delgado y E.J. Bedmar.** 1989. Actividad nitrato reductasa en hoja, tallo, raíz y nódulo de *Lotus corniculatus* en simbiosis con *Rhizobium loti*. *Turrialba* 39: 170-175
- Moreno, S.; E.J. Patriarca; M. Chiurazzi; R. Meza; R. Defez; A. Lambert; A. Riccio; M. Iaccarino y G. Espin.** 1992. Phenotype of a *Rhizobium leguminosarum ntrC* mutant. *Res. Microbiol.* 143: 161-171.
- Morpeth, F.F. y D.H. Boxer.** 1985. Kinetic analysis of respiratory nitrate reductase from *Escherichia coli* K-12. *Biochemistry* 24: 40-46.
- Munns, D.N.** 1968. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. III. Effects of nitrate on roots hairs and infection. *Plant Soil* 29: 33-38.
- Neal, J.L.; G.C. Allen; R.D. Morse y D.D. Wolf.** 1983a. Anaerobic nitrate dependent chemolithotrophic grown by *Rhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol.* 29: 316-320.
- Neal, J.L.; G.C. Allen; R.D. Morse y D.D. Wolf.** 1983b. Nitrate, nitrite, nitrous oxide and oxygen-dependent hydrogen uptake by *Rhizobium*. *FEMS Microbiol. Letts.* 17: 335-338.
- Nicholas, D.J.D. y A. Nason.** 1957. Determination of nitrate and nitrite. En: *Methods in enzymology*. S.P. Colowick y N.O. Kaplan (Eds.). Vol. 3: 981-984. Academic Press. New York.
- Nixon, B.T.; C.W. Ronson y F.M. Ausubel.** 1986. Two-components regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly-conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7850-7854.

- Nohno, T.; S. Noji; S. Taniguchi y T. Saito.** 1989. The *narX* and *narL* genes encoding the nitrate-sensing regulators of *Escherichia coli* are homologous to a family of prokaryotic two-component regulatory genes. *Nucleic Acids Res.* 17: 2947-2957.
- Noji, S. y S. Taniguchi.** 1987. Molecular oxygen controls nitrate transport of *Escherichia coli* nitrate-respiring cells. *J. Biol. Chem.* 262: 9441-9443.
- Noji, S.; T. Nohno; T. Saito y S. Taniguchi.** 1989. The *narK* gene product participates in nitrate transport induced in *Escherichia coli* nitrate-respiring cells. *FEBS Lett.* 252: 139-143.
- O'Brian, M.R. y R.J. Maier.** 1989. Molecular aspects of the energetics of nitrogen fixation in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Biochim. Biohys. Acta* 974: 229-246.
- O'Brian, M.R.; P.M. Kirshbom y R.J. Maier.** 1987. Tn5-induced cytochrome mutants of *Bradyrhizobium japonicum*: effect of the mutations on cells grown symbiotically and in culture. *J. Bacteriol.* 169: 1089-1094.
- O'Hara, G.W.; R.M. Daniel y K.W. Steele.** 1983. Effect of oxygen on the synthesis, activity and breakdown on the *Rhizobium* denitrification system. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2405-2412.
- O'Hara, G.W. y R.M. Daniel.** 1985. Rhizobial denitrification: a review. *Soil Biol. Biochem.* 17: 1-9.
- Oghoghorie, C.G.O. y J.S. Pate.** 1971. The nitrate stress syndrome of the nodulated field pea (*Pisum arvense* L.). En: *Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats. Plant Soil (special volume)*. T.A. Lie y E.G. Mulder (Eds.). pp. 185-202. Martinus Nijhoff. The Hague.

- Olsson, J.E.; P. Nakao; B.B. Bohlool y P.M. Gresshoff.** 1989. Lack of systemic suppression of nodulation in split root system of supernodulating soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) mutants. *Plant Physiol.* 90: 1347-1352.
- Omata, T.; M. Ohmori; N. Arai y T. Ogawa.** 1989. Genetically engineered mutant of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 defective in nitrate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6612-6616.
- Omata, T. y T. Ogawa.** 1986. Biosynthesis of a 42-kDa polypeptide in the cytoplasmic membrane of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* strain R2 during adaptation to low CO<sub>2</sub> concentration. *Plant Physiol.* 80: 525-530.
- Omata, T.; M. Ohmori, N. Arai y T. Ogawa.** 1990. Targeted mutagenesis of the 45-kDa protein inactivates nitrate transport in *Synechococcus* PCC 7942. En: *Inorganic nitrogen in plants and microorganisms. Uptake and metabolism.* W.R. Ullrich, C. Rigano, A. Fuggi y P.J. Aparicio (Eds.). pp. 86-92. Springer-Verlag. Berlin.
- Pagan, J.D.; W.R. Scowcroft; W.F. Dudman y A.H. Gibson.** 1977. Nitrogen fixation in nitrate reductase deficient mutants of cultured rhizobia. *J. Bacteriol.* 129: 718-723.
- Park, S.J. y B.R. Buttery.** 1988. Nodulation mutants of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) induced by ethyl-methane sulphonate. *Can. J. Plant Sci.* 68: 199-203.
- Paul, E.A. y F.E. Clark.** 1989. Transformation of nitrogen between the organic and inorganic phase and to nitrate. En: *Soil microbiology and biochemistry.* E.A. Paul y F.E. Clark (Eds.). pp. 131-146. Academic Press. San Diego.
- Pawlowski, K.; P. Ratet; J. Schell y F.J. de Bruijn.** 1987. Cloning and characterization of *nifA* and *ntnC* genes of the stem nodulating bacterium ORS571, the nitrogen fixing symbiont of *Sesbania rostrata*: regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes in the free living versus symbiotic state. *Mol. Gen. Genet.* 206: 207-219.

**Pawlowski, K.; U. Klosse y F.J. de Bruijn.** 1991. Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. *Mol. Gen. Genet.* 231: 124-138.

**Payne, W.J.** 1981. Denitrification. John Wiley and Sons. New York.

**Phelps, A.S. y P.M. Wilson.** 1941. Occurrence of hydrogenase in nitrogen fixing organisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 47: 473-476.

**Phillips, D.A.** 1971. Abscisic acid inhibition of root nodule initiation in *Pisum sativum*. *Planta* 100: 181-186.

**Pichinoty, F. y M. Piéchaud.** 1968. Recherche des nitrateréductases bactériennes A et B: méthodes. *Annal. Inst. Pasteur (Paris)* 114: 77-98.

**Pichinoty, F. y L. D'Ornano.** 1961. Inhibition by oxygen of biosynthesis and activity of nitrate reductase in *Aerobacter aerogenes*. *Nature* 191: 879-881.

**Pierce, M. y W.D. Bauer.** 1983. A rapid regulatory response governing nodulation in soybean. *Plant Physiol.* 73: 286-290.

**Postgate, J.R.** 1987. Nitrogen fixation. 2<sup>o</sup> ed. Studies in biology, n<sup>o</sup> 92. London: Edward Arnold.

**Puig, J.; E. Azoulay; F. Pichinoty y J. Gendre.** 1969. Genetic mapping of the *chlC* gene of the nitrate reductase A system in *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35: 659-662.

**Quastel, J.H.; M. Stepheson y M.D. Whetham.** 1925. Some reactions of bacteria in relation to anaerobic growth. *Biochem. J.* 19: 304-317.

- Rajagopalan, T.** 1938. Studies of groundnut nodule organism. IV. Physiology of the organism: intermediary metabolism. *Indian J. Agric. Sci.* 8: 379-402.
- Rajagopalan, K.V. y J.L. Johnson.** 1992. The pterin molybdenum cofactors. *J. Biol. Chem.* 267: 10199-10202.
- Reddy, A.T. y M.L. Lodha.** 1986. Nitrate-ammonification in groundnut *Rhizobium* strain 6050 grown microaerobically. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 181: 209-217.
- Reddy, A.T. y M.L. Lodha.** 1988. The expression of nitrate and nitrite reductases in free-living groundnut *Rhizobium* strain 6050: Effect of combined nitrogen sources. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 183: 389-395.
- Richards, J.E. y R.J. Soper.** 1978. Effect of N fertilizer on yield, protein content and symbiotic N fixation in faba beans. *Agron. J.* 71: 807-811.
- Riester, J.W.; W.G. Zumft y P.M.H. Kroneck.** 1989. Nitrous oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*. Redox properties and spectroscopic characterization of different form of the multicopper enzyme. *Eur. J. Biochem.* 178:751-762.
- Rigaud, J. y A. Puppo.** 1977. Effect of nitrate upon leghemoglobin and interaction with nitrogen fixation. *Biochim. Biophys. Acta* 497: 702-706.
- Roberts, G.P. y W.J. Brill.** 1981. Genetics and regulation of nitrogen fixation. *Ann. Rev. Microbiol.* 35: 207-235.
- Robertson, L.A. y J.G. Kuenen.** 1984. Aerobic denitrification-a controversy revived. *Arch. Microbiol.* 139: 351-354.

- Robson, R.L.; R.R. Eady; T.H. Richardson; R.W. Miller; M. Hawkins y J.R. Postgate.** 1986. The alternative nitrogenase of *Azotobacter chroococcum* is a vanadium enzyme. *Nature* 322: 388-390.
- Ronson, C.W.; B.T. Nixon y F.M. Ausubel.** 1987. Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. *Cell* 49: 579-581.
- Sambrook, J.; E.F. Fritsch y T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scott, R.H.; G.T. Sperl y J.A. DeMoss.** 1979. In vitro incorporation of molybdate into the molybdoproteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 137: 719-726.
- Scott, R.A.; W.G. Zumft; C.L. Coyle y D.M. Dooley.** 1989. *Pseudomonas stutzeri* N<sub>2</sub>O reductase contains Cu<sub>A</sub>-type sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4082-4086.
- Schubert, K.R. y H.J. Evans.** 1976. Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 1207-1211.
- Schuller, K.A.; D.A. Day; A.H. Gibson y P.M. Gresshoff.** 1986. Enzymes of ammonia assimilation and ureide biosynthesis in soybean nodules: effect of nitrate. *Plant Physiol.* 80: 646-650.
- Sharrocks, A.D.; J. Green y J.R. Guest.** 1990. In vivo and in vitro mutants of FNR, the anaerobic transcriptional regulator of *E. coli*. *FEBS Lett.* 270: 119-122.
- Shatters, R.G.; J.E. Sommerville y M.L. Kahn.** 1989. Regulation of glutamine synthetase II activity in *Rhizobium meliloti* 104A14. *J. Bacteriol.* 171: 5087-5094.

- Shaw, D.J.; D.W. Rice y J.R. Guest.** 1983. Homology between CAP and FNR, a regulator of anaerobic respiration in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 166: 241-247.
- Sheehy, J.E.; F.R. Minchin y J.F. Witty.** 1985. Control of nitrogen fixation in a legume nodule: an analysis of the role of oxygen diffusion in relation to nodule structure. Ann. Bot. 55: 549-562.
- Sheikholeslam, S.N.; K.A. Fishbeck y D.A. Phillips.** 1980. Effect of irradiance on partitioning of photosynthate to pea root nodules. Bot. Gaz. 141: 48-52.
- Sherwood, J.E.; G.L. Truchet y F.B. Dazzo.** 1984. Effect of nitrate supply on the in-vivo synthesis and distribution of trifoliin A, a *Rhizobium trifolii*-binding lectin, in *Trifolium repens* seedlings. Planta 162: 540-545.
- Showe, M.K. y J.A. DeMoss.** 1968. Localization and regulation of synthesis of nitrate reductase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 95: 1305-1313.
- Sivak, M.N.; C. Lara; J.M. Romero; R. Rodríguez y M.G. Guerrero.** 1989. Relationship between a 47 kDa cytoplasmic membrane polypeptide and nitrate transport in *Anacystis nidulans*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 158: 257-262.
- Small, J.G.C. y O.A. Leonard.** 1969. Translocation of <sup>14</sup>C-labelled photosynthate in nodulated legumes as influenced by nitrate nitrogen. Am. J. Bot. 56: 187-194.
- Smith, K.J. y W. Huyser.** 1987. World distribution and significance of soybean. En: Soybean: improvement, production and use. 2ª edición. J.R. Wilcox (Ed.). pp. 1-22. Am. Soc. Agron. Madison, WI.
- Smith, G.B. y M.S. Smith.** 1986. Symbiotic and free-living denitrification by *Bradyrhizobium japonicum*. Soil Sci. Soc. Am. J. 50: 349-354.

- Snell, F.D. y C.T. Snell.** 1949. Colorimetric methods of analysis. D. van Nostrand Company. pp. 802-807. New York.
- Snyder, S.W. y T.C. Hollocher.** 1987. Purification and some characteristics of nitrous oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. J. Biol. Chem. 262: 6515-6525.
- Sodergren, E.J. y J.A. DeMoss.** 1988. *narI* region of the *Escherichia coli* nitrate reductase (*nar*) operon contains two genes. J. Bacteriol. 170: 1721-1729.
- Solomonson, L.P. y M.J. Barber.** 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41: 225-253.
- Southern, E.M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.
- Spiro, S. y J. R. Guest.** 1988. Inactivation of the FNR protein of *Escherichia coli* by targeted mutagenesis in the N-terminal region. Mol. Microbiol. 2: 701-707.
- Spiro, S. y J.R. Guest.** 1990. FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Rev. 75: 399-428.
- Sprent, J.I.** 1987. The ecology of the nitrogen cycle. Cambridge University Press. Cambridge.
- Stam, H.; A.H. Stouthamer y H.W. van Verseveld.** 1987. Hydrogen metabolism and energy costs of nitrogen fixation. FEMS Microbiol. Rev. 46: 73-92.
- Stevenson, F.J.** 1986. The internal cycle of nitrogen in soil. En: Cycles of soil. F.J. Stevenson (Ed.). pp. 155-215. J. Wiley and sons. New York.

- Stewart, V.** 1988. Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in enterobacteria. *Microbiol. Rev.* 52: 190-232.
- Stewart, V. y C.H. MacGregor.** 1982. Nitrate reductase in *Escherichia coli* K-12: involvement of *chlC*, *chlE* and *chlG* loci. *J. Bacteriol.* 151: 788-799.
- Stewart, V. y J. Parales, Jr.** 1988. Identification and expression of genes *narL* and *narX* of the *nar* (nitrate reductase) locus of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 170: 1589-1597.
- Stewart, V.** 1982. Requirement of Fnr and NarL functions for nitrate reductase expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 151: 1320-1325.
- Stewart, V.; J. Parales Jr. y S.M. Merkel.** 1989. Structure of genes *narL* and *narX* of the *nar* (nitrate reductase) locus in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 171: 2229-2234.
- Stewart, V. y B.L. Berg.** 1988. Influence of *nar* (nitrate reductase) genes on nitrate inhibition of formate-hydrogen lyase and fumarate reductase gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 170: 4437-4444.
- Stickland, L.H.** 1931. The reduction of nitrates by *Bact. coli*. *Biochem. J.* 25: 1543-1554.
- Stouthamer, A.H.** 1976. Biochemistry and genetic of nitrate reductase in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 14: 315-375.
- Streeter, J.G.** 1988. Inhibition of legume nodule formation and N<sub>2</sub> fixation by nitrate. *CRC Critical Rev. Plant Sci.* 7: 1-23.
- Streeter, J.G.** 1985. Nitrate inhibition of legume nodule growth and activity. I. Long term studies with a continuous supply of nitrate. *Plant Physiol.* 77: 321-324.

**Streeter, J.G. y P.J. DeVine.** 1983. Evaluation of nitrate reductase activity in *Rhizobium japonicum*. Appl. Environ. Microbiol. 46: 521-524.

**Streeter, J.G.** 1982. Synthesis and accumulation of nitrite in soybean nodules supplied with nitrate. Plant Physiol. 69: 1429-1434.

**Syrett, P.J.** 1988. Uptake and utilization of nitrogen compounds. En: Biochemistry of the algae and cyanobacteria. L.J. Rogers y J.R. Gallon (Eds.). pp. 23-39. Clarendon Press. Oxford.

**Szeto, W.W.; B.T. Nixon; C.W. Ronson y F.M. Ausubel.** 1987. Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti ntrC* gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. J. Bacteriol. 169: 1423-1432.

**Thibodeau, P.S. y E.G. Jaworski.** 1975. Patterns of nitrogen utilization in the soybean. Planta 127: 133-147.

**Thöny, B.; H.M. Fisher; D. Anthamatten; T. Bruderer y H. Hennecke.** 1987. The symbiotic nitrogen fixation regulatory operon (*fixRnifA*) of *Bradyrhizobium japonicum* is expressed aerobically and is subject to a novel, *nifA*-independent type of activation. Nucleic Acids Res. 15: 8479-8499.

**Thöny, B.; D. Anthamatten y H. Hennecke.** 1989. Dual control of the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic nitrogen fixation regulatory operon *fixRnifA*: analysis of *cis*- and *trans*-acting elements. J. Bacteriol. 171: 4162-4169.

**Thorneley, R.N.F.** 1990. Kinetics and mechanism of ATP hydrolysis, electron transfer and proton released by *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase. En: Nitrogen fixation: achievements and objectives. P.M. Gresshoff, L.E. Roth, G. Stacey y W.E. Newton (Eds.). pp. 103. Chapman and Hall. New York.

- Totten, P.A.; J.C. Lara y S. Lory.** 1990. The *rpoN* gene product of *Pseudomonas aeruginosa* is required for expression of diverse genes, including the flagellin gene. *J. Bacteriol.* 172: 389-396.
- Towbin, H.; T. Staehelin y J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biochemistry* 76: 4350-4354.
- Trageser, M. y G. Uden.** 1989. Role of cysteine residues and metal ions in the regulatory functioning of FNR, the transcriptional regulator of anaerobic respiration in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* 3: 593-599.
- Trinchant, J.C. y J. Rigaud.** 1984. Nitrogen fixation in French-bean in the presence of nitrate: effect on bacteroid respiration and comparison with nitrite. *J. Plant Physiol.* 116: 209-217.
- Udvardi, M.K.; D.L. Lister y D.A. Day.** 1992. Isolation and characterization of a *nrnC* mutant of *Bradyrhizobium (Parasponia)* sp. ANU289. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1019-1025.
- Uden, G. y M. Trageser.** 1991. Oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*: Control of anaerobic respiration by the FNR protein. *Ant. van Leeuw.* 59: 65-76.
- Uden, G. y A. Duchene.** 1987. On the role of cyclic AMP and the FNR protein in *E. coli* growing anaerobically. *Arch. Microbiol.* 147: 195-200.
- Vairinhos, F.; W. Wallace y D.J.D. Nicholas.** 1989. Simultaneous assimilation and denitrification of nitrate by *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Gen. Microbiol.* 135: 189-193.
- van Berkum, P. y H.H. Keyser.** 1985. Anaerobic growth and denitrification among different serogroups of soybean rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 772-777.

**van't Riet, J. y R.J. Planta.** 1975. Purification, structure and properties of the respiratory nitrate reductase of *Klebsiella aerogenes*. *Biochim. Biophys. Acta.* 379: 81-94.

**Vega-Palas, M.A.; F. Madueño; A. Herrero y E. Flores.** 1990. Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942. *J. Bacteriol.* 172: 643-647.

**Vessey, J.K.; K.B. Walsh y D.B. Layzell.** 1988b. Can a limitation in phloem supply to nodules account for the inhibitory effect of nitrate on nitrogenase activity in soybean? *Physiol. Plant.* 74: 137-146.

**Vessey, J.K.; K.B. Walsh y D.B. Layzell.** 1988a. Oxygen limitation of N<sub>2</sub> fixation in stem-girdled and nitrate-treated soybean. *Physiol. Plant.* 73: 113-121.

**Vessey, J.K. y J. Waterer.** 1992. In search of the mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in legume nodules: recent developments. *Physiol. Plant.* 84: 171-176.

**Viebrock, A. y W.G. Zumft.** 1988. Molecular cloning, heterologous expression, and primary structure of the structural gene for the copper enzyme nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *J. Bacteriol.* 170: 4658-4668.

**Vincent, J.M.** 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. International biological programme handbook 15. Blackwell. Oxford.

**Walsh, K.B. y B.J. Carroll.** 1992. A reappraisal of nitrate inhibition of nitrogenase in A317, a nitrate reductase-deficient mutant of pea (*Pisum sativum*). *Physiol. Plant.* 84: 283-291.

**Wang, C.S. y R.L. Smith.** 1975. Lowry determination of protein in the presence of Triton X-100. *Anal. Biochem.* 63: 414-417.

- Warnecke, U.; R.A. Siddiqui; A. Hengsberger; S. Kosta; K. Etzold y B. Friedrich.** 1991. *Alcaligenes eutrophus* H16 has two respiratory nitrate reductases. Resumen P66. BIOforum 14: 47.
- Werner, D.** 1992. Physiology of nitrogen-fixing legume nodules: compartments and functions. En: Biological nitrogen fixation. G. Stacey, R.H. Burris y H.J. Evans (Eds.). pp. 399-431. Chapman and Hall. New York.
- Wilson, J.K.** 1917. Physiological studies of *Bacillus radicicola* on soybean (*Soja max* Piper) and factors influencing nodule production. Cornell Univ. Agric. Expn. Stn. Bull. 386: 369-372.
- Williams, P.M. y M. Sicardi de Mallorca.** 1984. Effect of gibberellins and the growth retardant CCC on the nodulation of soya. Plant Soil 77: 53-56.
- Williams, L.E. y D.A. Phillips.** 1983. Increased soybean productivity with a *Rhizobium japonicum* mutant. Crop. Sci. 23: 246-250.
- Wittenberg, J.B.** 1980. Utilization of leghemoglobin-bound oxygen by *Rhizobium* bacteroids. En: Nitrogen fixation. W.E. Newton (Ed.). Vol. 3: 53-67. University Park Press. Baltimore.
- Witty, J.F.; F.R. Minchin; L. Skot y J.E. Sheehy.** 1986. Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodule. Plant Mol. Cell Biol. 3: 275-314.
- Witty, J.F.; L. Skot y N.P. Revsbech.** 1987. Direct evidence for changes in the resistance of legume root nodules to O<sub>2</sub> diffusion. J. Exp. Bot. 38: 1129-1140.
- Wong, P.P.** 1980. Nitrate and carbohydrate effects on nodulation and nitrogen fixation (acetylene reduction) activity of lentil (*Lens esculenta* Moench.). Plant Physiol. 66: 78-82.

**Wood, P.M.** 1986. Nitrification as a bacterial energy source. En: Nitrification. Publicación especial de la sociedad para microbiología general, vol 20. J.I. Prosser (Ed.). pp. 39-62. IRL Press. Oxford.

**Zengbe, M.; P. Tillard; J.C. Cleyet-Maret y L. Salsac.** 1984. Influence de la souche de *Rhizobium* et de l'azote minéral sur la synthèse de uréides chez la soja. *Physiol. Veg.* 22: 285-289.

**Zumft, W.G.; A. Viebrock-Sambale y C. Braun.** 1990. Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. Genes for copper-processing and properties of the deduced products, including a new member of the family of ATP/GTP-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* 192: 591-599.

**Zumft, W.G.** 1992. The denitrifying prokaryotes. En: The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification, applications, 2<sup>a</sup> ed. A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder y K.H. Schleifer (Eds.). pp. 554-582. Springer-Verlag. New York.

**Zumft, W.G.; A. Viebrock y H. Körner.** 1988b. Biochemical and physiological aspects of denitrification. En: The nitrogen and sulphur cycles. J.A. Cole y S.J. Ferguson (Eds.). pp. 245-279. Cambridge University Press. Cambridge.

**Zumft, W.G.; K. Döhler; H. Körner; S. Löchelt; A. Viebrock y K. Frunzke.** 1988a. Defects in cytochrome *cd<sub>1</sub>*-dependent nitrite respiration of transposon Tn5-induced mutants from *Pseudomonas stutzeri*. *Arch. Microbiol.* 149: 492-498.