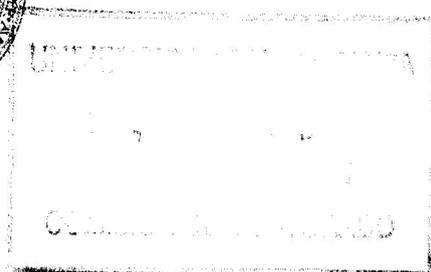


T. Prov.
22/23

T
15
140

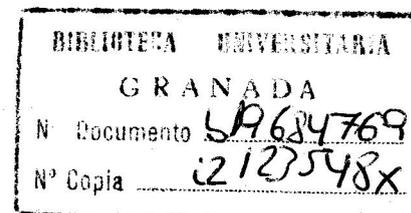
UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS



Desnitrificación en *Bradyrhizobium japonicum*:
Identificación y Caracterización de los genes *nir*, *nor* y *nos*

Leonardo Velasco Arjona



TESÍS DOCTORAL

1998

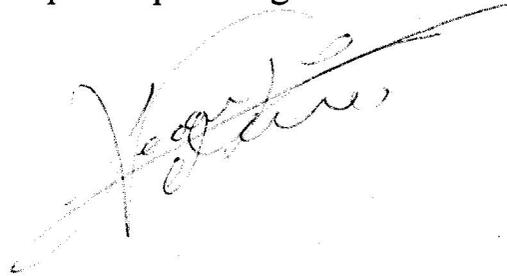
UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

DESNITRIFICACIÓN EN *Bradyrhizobium japonicum*:
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES *nir*, *nor* Y *nos*

Memoria que presenta el Licenciado en Ciencias Biológicas

D. Leonardo Velasco Arjona,
para aspirar al grado de Doctor



Fdo. Leonardo Velasco Arjona

VºBº

El Director



Fdo. Eulogio José Bedmar Gómez

Doctor en Ciencias Biológicas

Investigador Científico del CSIC

Esta Tesis ha sido realizada en el Departamento de
Microbiología del suelo y Sistemas Simbióticos de la
Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C.), Granada,
durante los años 1995-1998

A Carmen

A mis padres

A mis hermanos

Agradecimientos

La elaboración de una Tesis Doctoral requiere un largo período de tiempo y la colaboración de muchas personas. A todos ellos les dedico mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Eulogio J. Bedmar su dedicación y dirección a lo largo de estos cuatro años tanto desde el punto de vista humano como profesional.

A los Dres. Juan Sanjuan y José Olivares por su apropiados consejos cuando aparecían "callejones sin salida".

Al Dr. Francisco Ligerio por su amable tutoría de esta Tesis.

A la Dra. Carmen Lluch por estar siempre dispuesta a aclarar todas las dudas burocráticas o no que surgen siempre en estas labores.

Al Dr. Rob van Spanning por su amable acogida en el BioCentrum de la Vrije Universiteit, Amsterdam. Especialmente a Willem Reijnders, por todo.

A los compañeros del Departamento de Microbiología de la EEZ por los buenos momentos compartidos. En primer lugar a los de mi grupo, María José, Socorro, María Jesús, Chang-ai y las más recientes del *club*, Mari Ángeles y María Luisa. También deseo agradecer su comprensión y ayuda a los otros miembros del Departamento, Soco Muñoz, Julio, Jose Antonio Herrera, Jose Acevedo, Javier, Mariam, Pieter, Estefanía, María José, Fernando, Paco, Karim, Inma, Pepe García, Nuria *and last but not least* a las *Micorrhizal powers* Coral y María José.

A los demás miembros de la Estación Experimental del Zaidín que de una manera u otra tienen su también pequeña parte en esto, Ester, Owen, Mariam, Jaber, Mari Huertas, Lázaro, Eduardo, Roland, Andrés Belver y Pepe Palma.

A todos los que se encuentran ahora lejos pero que siempre recordaré, Jose Ignacio, Natalia, Marisa, Tara, Galdino, Eduardo, Mari Ángeles, Israel...

A Ángel por su ayuda inestimable con la RT-PCR y los inmejorables momentos que hemos pasado gracias a un invento egipcio. A Encarna.

A Carmen por ser tan comprensiva y no sólo eso. A mis hermanos Javier y Nuria. A mis padres.

Indice

ÍNDICE.....	i
ABREVIATURAS.....	vi
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Introducción	
1.1.1. El ciclo del nitrógeno en procariotas.....	3
1.1.2. Desnitrificación en la familia <i>Rhizobiaceae</i>	5
1.1.3. Energética de la desnitrificación en la familia <i>Rhizobiaceae</i>	6
1.1.4. Productos e intermediarios de la desnitrificación.....	7
1.2. Nitrito reductasa (NiR)	
1.2.1. Distribución de las nitrito reductasas	9
1.2.2. Características estructurales de las nitrito reductasas tipo Cu	11
1.2.3. Regulación de las nitrito reductasas tipo Cu	12
1.3. Óxido nítrico reductasa (NOR)	
1.3.1. Introducción	13
1.3.2. Características estructurales de las óxido nítrico reductasas	13
1.3.3. Regulación de las óxido nítrico reductasas	14
1.4. Óxido nitroso reductasa (N ₂ OR)	
1.4.1. Introducción	16
1.4.2. Características estructurales de las óxido nitroso reductasas	17
1.4.3. Regulación de las óxido nitroso reductasas.....	18
1.5. Coproporfirinógeno III oxidasa	
1.5.1. Introducción	20
1.5.2. Biosíntesis de los hemos	21
1.5.3. Coproporfirinógeno III oxidasa	22
1.6. Regulación de los genes implicados en la respiración anaeróbica del nitrato	
1.6.1. Introducción	24
1.6.2. Respuesta compartimentalizada al oxígeno y óxidos de nitrógeno	25
1.6.3. Regulación por factores tipo Fnr/Crp	25
1.6.3.1. Características de Fnr de <i>E. coli</i>	25
1.6.3.2. Regulación por factores tipo Fnr/Crp en <i>Rhizobiaceae</i>	28
1.6.4. Regulación dual por factores tipo Fnr/Crp y NarL	29
1.6.5. Regulación redox de Fnr/Crp	30
1.6.6. Regulación por factores σ^{54}	30
1.7. Consideraciones ecológicas y agronómicas de la desnitrificación en Rizobios.	
Efectos del nitrato en la fijación de nitrógeno	
1.7.1. Supervivencia en suelo.....	31
1.7.2. Pérdidas de nitrógeno en suelos	32
1.7.3. Óxidos de nitrógeno y la fijación de nitrógeno	32
1.8. Objetivos del presente trabajo	34

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Técnicas Microbiológicas y Bioquímicas	39
2.1.1. Cepas bacterianas y plásmidos	39
2.1.2. Medios de cultivo	41
2.1.3. Conservación de cepas bacterianas	41
2.1.4. Antibióticos	42
2.1.5. Cultivo de células de <i>B. japonicum</i>	43
2.1.6. Incubación de células para inducción de actividad actividad nitrito reductasa, nitrito reductasa, β -galactosidasa y medidas de óxido nitroso	43
2.1.7. Obtención de las fracciones soluble (citósol) y particulada (membranas) de <i>B. japonicum</i>	45
2.2. Técnicas Analíticas	
2.2.1. Determinación de actividad nitrito reductasa	45
2.2.2. Determinación de actividad nitrito reductasa	46
2.2.3. Determinación de nitrito	47
2.2.4. Determinación de óxido nitroso	47
2.2.5. Determinación de actividad β -galactosidasa	48
2.2.6. Determinación de proteína	
2.2.6.1. Método de Lowry	49
2.2.6.2. Método de Bradford	49
2.2.7. Detección de citocromos tipo <i>c</i> en membranas de <i>B. japonicum</i>	
2.2.7.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	50
2.2.7.2. Transfrecia a membranas de nitrocelulosa	51
2.2.7.3. Detección de citocromos tipo <i>c</i>	51
2.3. Técnicas de Biología Molecular	
2.3.1. Obtención de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i> (minipreps)	
2.3.1.1. Método de lisis alcalina	52
2.3.1.2. Método de lisis con STET	53
2.3.2. Obtención de plásmido de <i>B. japonicum</i>	54
2.3.3. Obtención de ADN total	55
2.3.4. Determinación de la concentración de ADN y ARN	56
2.3.5. Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción	56
2.3.6. Identificación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa	
2.3.6.1. Electroforesis de ADN	57
2.3.6.2. Revelado de geles y fotografía	57
2.3.6.3. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción	57
2.3.7. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	
2.3.7.1. Extracción de ADN de agarosa mediante SpinBind®	58
2.3.7.2. Extracción de ADN de agarosa mediante Quiaex II®	59
2.3.8. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación	

2.3.8.1. Ligación a vectores de clonación	60
2.3.8.2. Generación de extremos romos de extremo 5' protuberantes	60
2.3.8.3. Eliminación de extremos 3' de fragmentos de restricción	61
2.3.9. Preparación y transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	
2.3.9.1. Obtención de competentes con CaCl ₂	61
2.3.9.2. Transformación de las células competentes	62
2.3.9.3. Transformación de <i>E. coli</i> mediante electroporación	63
2.3.10. Experimentos de hibridación ADN-ADN	
2.3.10.1. Transferencia de ADN a filtros de nylon o <i>Southern</i>	64
2.3.10.2. Transferencia de ADN en vacío	65
2.3.10.3. Marcaje de sondas no radiactivas	66
2.3.10.4. Hibridación ADN-ADN con sondas no radiactivas	66
2.3.11. Construcción de clones de secuenciación	68
2.3.12. Extracción de ARN total de células de <i>B. japonicum</i>	70
2.3.13. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR	71
2.3.14. Purificación de ADN para secuenciación	
2.3.14.1. Qiaprep Spin Plasmid	72
2.3.14.2. Wizard Minipreps	73
2.3.15. Secuenciación automática de ADN de doble cadena	74
2.3.16. Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas	75
2.3.17. Mutagénesis dirigida de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110	
2.3.17.1. Mutagénesis de <i>nirK</i>	76
2.3.17.2. Mutagénesis de <i>hemN</i>	76
2.3.17.3. Mutagénesis de <i>nosZ</i> y <i>nosR</i>	76
2.3.17.5. Mutagénesis de <i>norB</i>	77
2.4. Inoculación de plantas de soja (<i>Glycine max</i> L. var Williams) con <i>B. japonicum</i>	
2.4.1. Esterilización de semillas y germinación	77
2.4.2. Soluciones nutritivas para el cultivo de las plantas	77
2.4.3. Cultivo de las plantas	78
2.4.4. Aislamiento de bacteroides.....	79
2.4.5. Determinación de nitrito en el citosol del nódulo	79
2.4.6. Determinación de actividad β -galactosidasa en extractos de nódulos	79
2.4.7. Análisis de los parámetros fisiológicos de plantas de soja inoculadas con cepas de <i>B. japonicum</i> en presencia y ausencia de nitrato en el medio de enraizamiento	80

3. RESULTADOS. NITRITO REDUCTASA

3.1. Identificación del gen <i>nirK</i> de <i>B. japonicum</i>	83
3.2. Caracterización del gen <i>nirK</i> de <i>B. japonicum</i>	84
3.3. Análisis de la región promotora del gen <i>nirK</i>	86
3.4. Obtención de una cepa mutante en el gen <i>nirK</i> (<i>B. japonicum</i> GRK308)	86

3.5. Características fenotípicas de <i>B. japonicum</i> GRK308	88
3.6. Regulación de la expresión del gen <i>nirK</i> de <i>B. japonicum</i>	
3.6.1. Construcción de una fusión transcripcional <i>nirK-lacZ</i>	90
3.6.2. Análisis de la expresión de la fusión <i>nirK-lacZ</i> en células en vida libre	91
3.6.3. Análisis de la expresión de la fusión <i>nirK-lacZ</i> en nódulos	92
3.7. Inoculación de plantas de soja con <i>B. japonicum</i> GRK308	93
4. RESULTADOS. COPROPORFIRINÓGENO III OXIDASA	
4.1. Identificación del gen <i>hemN</i> de <i>B. japonicum</i>	101
4.2. Caracterización del gen <i>hemN</i> de <i>B. japonicum</i>	101
4.3. Análisis de la región promotora del gen <i>hemN</i>	103
4.4. Obtención de una cepa mutante en el gen <i>hemN</i> (<i>B. japonicum</i> GRN307)	103
4.5. Regulación de la expresión de <i>hemN</i>	104
4.6. Detección de citocromos tipo <i>c</i> en <i>B. japonicum</i> USDA110 y GRN307	105
4.7. Inoculación de plantas de soja con <i>B. japonicum</i> GRN307	106
5. RESULTADOS. ÓXIDO NITROSO REDUCTASA	
5.1. Identificación de los genes <i>nosRZDFYLX</i> de <i>B. japonicum</i>	113
5.2. Caracterización de los genes <i>nosRZDFYLX</i>	
5.2.1. Características de <i>nosR</i>	115
5.2.2. Características de <i>nosZ</i> (N ₂ O reductasa)	117
5.2.3. Características de <i>nosD</i>	118
5.2.4. Características de <i>nosF</i>	118
5.2.5. Características de <i>nosY</i>	119
5.2.6. Características de <i>nosL</i>	120
5.2.7. Características de <i>nosX</i>	120
5.3. Obtención de cepas de <i>B. japonicum</i> mutantes en el gen <i>nosZ</i>	120
5.4. Obtención de cepas de <i>B. japonicum</i> mutantes en el gen <i>nosR</i>	122
5.5. Características fenotípicas de <i>B. japonicum</i> GRZ3035 y GRR1042	123
5.6. Análisis de la transcripción de los genes <i>nosRZDFYLX</i>	124
5.7. Regulación de la expresión del gen <i>nosZ</i>	
5.7.1. Construcción de una fusión transcripcional <i>nosZ-lacZ</i>	127
5.7.2. Análisis de la expresión de la fusión <i>nosZ-lacZ</i> en células en vida libre	128
5.7.3. Análisis de la expresión de la fusión <i>nosZ-lacZ</i> en nódulos	129
5.8. Inoculación de plantas de soja con <i>B. japonicum</i> GRZ3035	130
6. RESULTADOS. ÓXIDO NÍTRICO REDUCTASA	
6.1. Identificación de los genes <i>norCBQD</i> de <i>B. japonicum</i>	143
6.2. Caracterización de los genes <i>norCBQD</i> de <i>B. japonicum</i>	
6.2.1. Características de <i>norC</i>	144
6.2.2. Características de <i>norB</i>	145

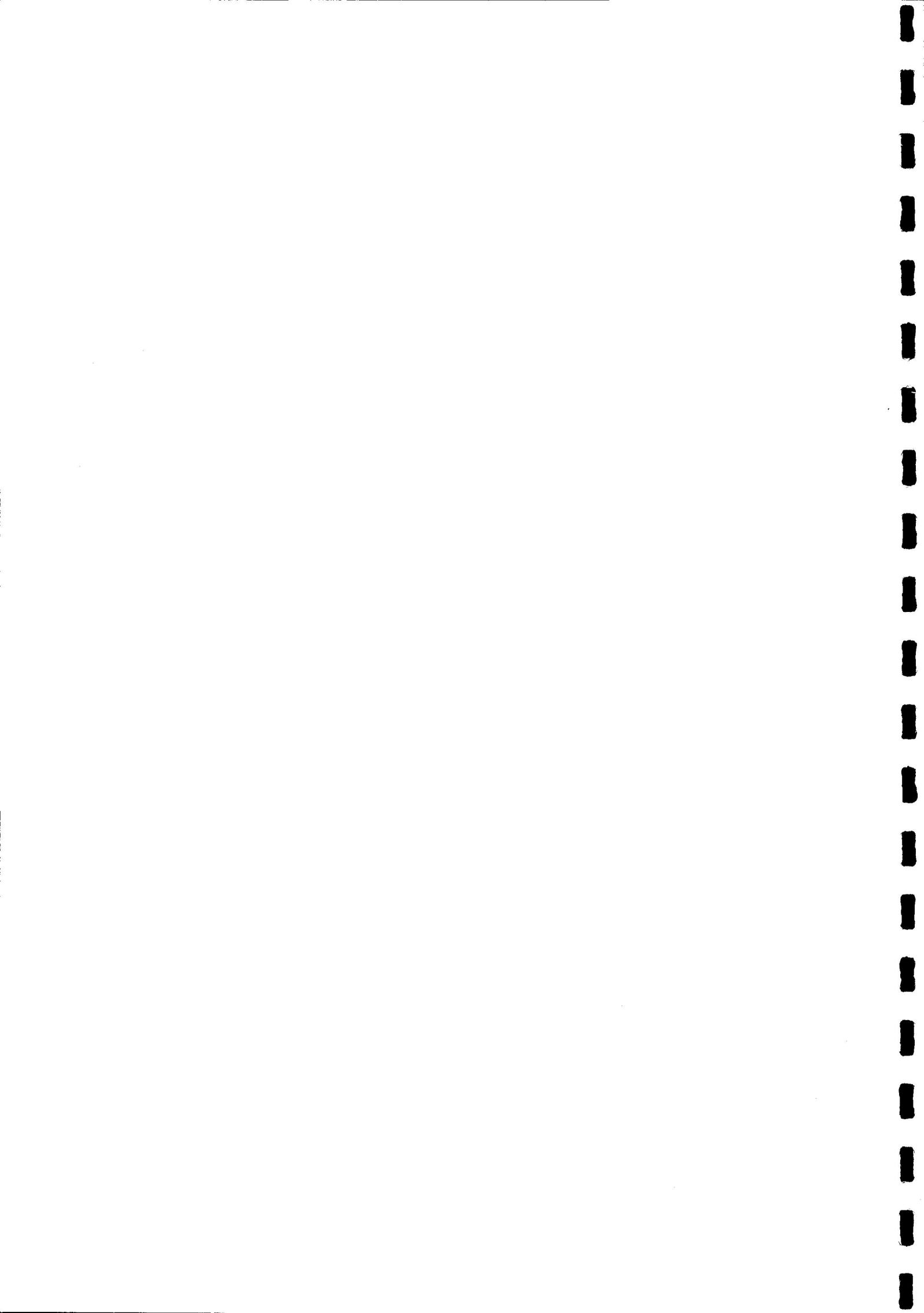
6.2.3. Características de <i>norQ</i> y <i>norD</i>	147
6.3. Análisis de la región promotora del gen <i>norC</i>	148
6.4. Obtención de una cepa mutante en el gen <i>norB</i> (<i>B. japonicum</i> GRB711)	148
7. DISCUSIÓN GENERAL	
7.1. Características de la nitrito reductasa respiratoria de <i>B. japonicum</i>	159
7.2. Características de la coproporfirinógeno III oxidasa independiente de oxígeno de <i>B. japonicum</i>	163
7.3. Características de la óxido nítrico reductasa de <i>B. japonicum</i>	165
7.4. Características de la óxido nitroso reductasa de <i>B. japonicum</i>	168
7.5. Regulación de los genes de <i>B. japonicum</i> implicados en la desnitrificación	172
7.6. Desnitrificación y la fijación de nitrógeno en simbiosis	174
7.7. Estudios futuros	176
8. CONCLUSIONES	179
9. BIBLIOGRAFÍA	183

Abreviaturas Empleadas

aa Aminoácido	ORF (<i>Open reading frame</i>) Marco de lectura abierto
ADN Ácido desoxirribonucleico	pb Par de bases
Amp Ampicilina	PCR Reacción en cadena de la ADN polimerasa
ARN Ácido ribonucleico	PEG Polietilén glicol
BSA Albúmina de suero bovino	PMSF Fluoruro de ácido fenil sulfónico
Cm Cloranfenicol	PSY Medio definido <i>B. japonicum</i>
DEPC Dietilpirocarbonato	RT-PCR Reacción de la Reverso transcriptasa/ADN polimerasa
DNAasa ADN ribonucleasa	RNAasa ARN ribonucleasa
dNTP Desoxirribonucleótido	SDS Dodecil sulfato sódico
DO Densidad óptica	Sm Estreptomicina
EDTA Ácido dietilpropilén triacético	Sm/Spc Estreptomicina/Espectinomicina
Fnr (<i>Anaerobic fumarate and nitrate reduction</i>) Factor de regulación en ausencia de oxígeno	Spc Espectinomicina
IPTG 1-Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido	Tc Tetraciclina
kb Kilobase (1000 pb)	TE Tris-EDTA pH 8
Km Kanamicina	UV Ultravioleta
LB Medio completo para <i>Escherichia coli</i>	YEM Medio de crecimiento completo <i>B japonicum</i>
MTAB Mezcla de alquilmetil-bromuro de amonio	YEMN YEM suplementado de nitrato 10 mM
MOPS Ácido morfolino propanosulfónico	X-gal 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
NAR Nitrato reductasa	
NBT Azul de nitrotetrazolio	
NiR Nitrito reductasa	
NNDA Ácido N-naftil-etilén-diamino	
NOR Óxido nítrico reductasa	
N₂OR Óxido nitroso reductasa	
ONPG 2-Nitrofenil- β -D-galactopiranosido	

1

Introducción



1.1. INTRODUCCIÓN

1.1.1. El ciclo del nitrógeno en procariotas

De los elementos químicos que entran a formar parte de la composición de los seres vivos, el nitrógeno es el más importante desde el punto de vista económico, ecológico y biológico. Ya sea por que es el elemento más limitante para el crecimiento de las plantas de interés agronómico o por la existencia de compuestos nitrogenados que tienen una incidencia crucial en la contaminación de acuíferos y del medio en general, el ciclo del nitrógeno se sitúa como especialmente crítico en el conjunto de la Biosfera. Por otro lado, debido a la enorme cantidad de nitrógeno atmosférico que es fijado anualmente -aproximadamente 95 millones de toneladas-, es obvio que debe haber una enorme reserva anaeróbica en la Biosfera para devolver esta cantidad de nitrógeno a la atmósfera cada año. Es probable, sin embargo, que el uso abusivo de fertilizantes está originando más nitrógeno fijado que el que la Biosfera puede devolver a través de la desnitrificación, en cuyo caso es muy probable que ocurra un aumento gradual de nitratos, nitritos y amonio en el medio.

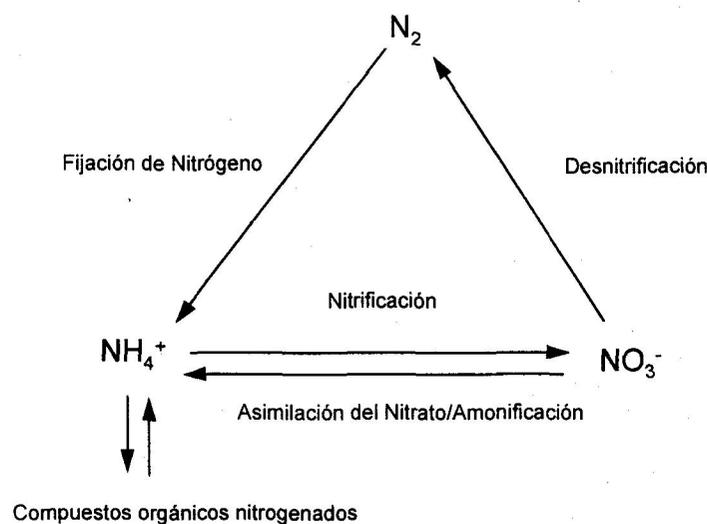


Figura 1.1. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno en los procariotas (adaptado de Zumft, 1997).

El nitrógeno entra a formar parte de la biosfera cuando es fijado por microorganismos, o bien procedente de la factura humana por síntesis química (síntesis de Haber-Bosh). Es retirado este nitrógeno de la biosfera por el mecanismo inverso, la

Desnitrificación, que es la reducción de nitrato a dinitrógeno molecular. La desnitrificación es una de las principales fuentes de pérdida de nitrógeno del suelo, aunque hay otras formas de que este desaparezca del mismo, volatilización, reacciones no enzimáticas del ácido nitroso con sales de amonio o aminoácidos y descomposición química de nitritos bajo condiciones ácidas para originar óxidos de nitrógeno.

La desnitrificación ocurre en los microorganismos como una forma alternativa de respiración que ocurre cuando la tensión de oxígeno es baja, empleando el nitrato y sus óxidos como aceptores de electrones en una cadena de transporte electrónico. La reducción de los óxidos de nitrógeno está acoplada a la conservación de energía y permite a la célula crecer en condiciones de microaerobiosis. Es posible sin embargo encontrar desnitrificación en condiciones aerobias en determinados microorganismos como *Thiobacillus/Paracoccus* que es un anaerobio facultativo y también recientemente se han encontrado genes de la desnitrificación en nitrificantes.

La denitrificación es un proceso que desde el punto de vista biológico está restringida a bacterias, aunque recientemente se han podido determinar en hongos genes implicados en este proceso como una nitrito reductasa tipo Cu y un óxido nítrico reductasa. La desnitrificación está muy extendida entre las diversas familias de bacterias, no siendo particular de ningún género en concreto, muchas clases de bacterias facultativas anaerobias pueden realizar este proceso, entre ellas gram negativas como *Achromobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Gluconobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Paracoccus* spp., *Thiobacillus* spp.; gram positivos como *Moraxella* spp., *Bacillus* spp., y algunos miembros de la familia *Rhizobiaceae*. Todas son bacterias que se encuentran normalmente en el suelo. Por el contrario el proceso de Nitrificación, la conversión del amonio en nitrito o nitrato es un proceso restringido a géneros bacterianos dentro de la familia Nitrobacteriaceae. La nitrificación ocurre fundamentalmente en organismos quimiotróficos, mientras que la desnitrificación en los heterotróficos. Sin embargo existen excepciones a esta regla: *Paracoccus denitrificans*, un heterótrofo característico, es capaz de nitrificar en condiciones aeróbicas y al mismo tiempo desnitrificar, teniendo esta bacteria las mismas enzimas de la nitrificación que un nitrificador típico como p.e. *Nitrosomonas europaea* (Stouthamer et al., 1997). Por el contrario se ha comprobado la producción de óxido nitroso en nitrificantes, encontrándose una nitrito reductasa tipo

cobre (ver más abajo) en *N. europaea*, aunque de características distintas a las halladas en las bacterias heterótrofas (DiSpirito et al., 1985). En resumen podemos completar la Tabla 1.1.

NITRIFICACIÓN	DESNITRIFICACIÓN
Aerobios obligados	Anaerobios facultativos
Quimioautotrófico	Heterotrófico
Requiere CO ₂ como fuente de carbono	Requieren carbono orgánico
Obtienen energía de reacciones inorgánicas	Emplean el carbono orgánico como fuente de energía
Inhibidos por exceso de carbono	Requieren carbono orgánico
Grupo taxonómicamente bien definido	Grupo formado por miembros de muy diversos géneros
Reversible	No reversible

Tabla 1.1. Comparación entre la Nitrificación y la Desnitrificación.

Las bacterias que forman los nódulos radicales, es decir, los miembros de la familia *Rhizobiaceae*, hacen una contribución fundamental al *pool* de Nitrógeno en el suelo mediante lo que se conoce como Fijación Simbiótica del Nitrógeno. Por esta razón la mayor parte de la investigación en rizobios ha girado en torno a la comprensión del fenómeno de la fijación biológica del nitrógeno, así como de la relación simbiótica bacteria-planta y las implicaciones agronómicas de estos procesos.

1.1.2. Desnitrificación en la familia *Rhizobiaceae*

La reducción del nitrato por rizobios ha sido descrita desde la década de los 40 (Rajopalan, 1938), pero sólo recientemente se ha demostrado como muchas cepas de la familia tienen algún grado de capacidad desnitrificante y capacidad de eliminar nitrógeno fijado del suelo. Evans (1954), demostró la presencia de un sistema activo de reducción de nitrato en nódulos de soja, encontrándose esta misma capacidad tanto en células en vida libre como en bacteroides de *Bradyrhizobium* (Cheniae y Evans, 1960; Lowe y Evans, 1964).

Posteriormente fue posible encontrar actividad nitrato reductasa en *B. japonicum* cultivado aeróbica y anaeróbicamente (Daniel y Gray, 1976). Más tarde Daniel y

colaboradores (1980, 1982) demostraron que empleando especies de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* el producto final de la desnitrificación es el óxido nitroso, en otros casos la del nitrato sólo es hasta nitrito y, finalmente, otros completan la desnitrificación hasta dinitrógeno molecular. A partir de múltiples aislados de soja, de crecimiento lento, adscritos por tanto al género *Bradyrhizobium*, van Berkum y Keyser (1985) comprobaron como la mayor parte de las bacterias y bacteroides aislados eran capaces de crecer microaeróbicamente con nitrato y que el dinitrógeno era el principal producto final de la desnitrificación, aunque en otras cepas podía ser óxido nitroso e incluso nitrito.

1.1.3. Energética de la desnitrificación en la familia *Rhizobiaceae*

Como se ha referido más arriba la desnitrificación es un proceso de obtención alternativa de energía en condiciones de ausencia de oxígeno en el cual el nitrato funciona como aceptor de electrones. Este proceso está claramente demostrado en desnitrificantes como *Pseudomonas*, *Paracoccus*, etc, pero también se ha demostrado que existe producción de ATP y translocación de protones acoplados a la desnitrificación en algunas bacterias de la familia *Rhizobiaceae* (O'Hara, 1985). La obtención de ATP acoplada a la desnitrificación se ha demostrado en *B. japonicum* tanto en cultivo en vida libre como en bacteroides (Bhandari et al., 1984) y también en la capacidad de reducción de nitrato por la cepa *Rhizobium* 6050 del cacahuete, *Arachis hypogea* (Reddy y Lodha, 1986). Más recientemente se ha descrito también la producción de ATP acoplado a la reducción de nitrato en *Azorhizobium caulinodans* asociada a NADH y succinato (Raju y Lodha, 1997). La obtención de energía parece estar en estas bacterias en la etapa de reducción de nitrato a nitrito, mientras que no existe en la reducción de nitrito ni en la del óxido nitroso (O'Hara, 1985). Posiblemente exista también producción de ATP asociada a la reducción del óxido nítrico tal como se ha demostrado en *Paracoccus*, *Pseudomonas*, etc.

Sin embargo no todos los rizobios tienen esta capacidad, todas las cepas de *S. meliloti* estudiadas hasta la fecha, aunque pueden reducir nitrato a óxido nitroso, son incapaces de emplear el nitrato como aceptor de electrones para generar ATP en baja

tensión de oxígeno y crecer en estas condiciones (García-Plazaola et al., 1993). Tampoco otros rizobios como *R. "hedysari"* pueden crecer microaeróbicamente con nitrato (Tofanin et al., 1996).

Bradyrhizobium japonicum es capaz de crecer anaeróbicamente con nitrato como única fuente de nitrógeno y de energía. Los estudios de Vairinhos y colaboradores (1989) mostraron como las células crecidas microaeróbicamente de *B. japonicum* CB 1809 con $^{15}\text{NO}_3^-$ formaban simultáneamente $^{15}\text{NH}_3^+$ y $^{15}\text{N}_2$, y por tanto, pudiendo incorporar el amonio así formado y emplear el nitrato como fuente de energía.

Por otro lado también se ha propuesto a la desnitrificación como un sistema de obtención de energía en el nódulo, de manera que fuese una fuente del ATP necesario para la reducción del dinitrógeno a amonio por la nitrogenasa. Sin embargo, aunque esto pudiera ocurrir se ha estimado que energéticamente este proceso sería apenas relevante en relación al ATP que se obtendría por la respiración aeróbica en el nódulo (O'Hara y Daniel, 1985).

Por último en este apartado, destacar que se ha descrito la óxido nitroso reductasa de *S. meliloti* (Holloway et al., 1996) y la nitrito reductasa de *R. "hedysari"* HCNT1 (Tofanin et al., 1996), dos miembros de la familia *Rhizobiaceae* que aunque posean estos genes y posiblemente algún otro relacionado con la reducción disimilatoria del nitrato, son incapaces de crecer anaeróbicamente con nitrato como única fuente de energía.

1.1.4. Productos e intermediarios de la desnitrificación

La reducción del nitrato a dinitrógeno lleva consigo la formación de intermediarios que, en orden, son nitrito, óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O). Las enzimas que catalizan estas reacciones son en orden de actuación: nitrato reductasa (NAR), nitrito reductasa (NiR), óxido nítrico reductasa (NOR) y óxido nitroso reductasa (N_2OR). Se considera la desnitrificación como la reducción completa del nitrato a dinitrógeno. Sin embargo se han descrito muchas bacterias que no llevan a cabo una desnitrificación completa, quedándose en algún paso intermedio. El ejemplo más extendido son las que carecen de óxido nitroso reductasa.

La reducción del nitrato a nitrito tiene lugar en diversos microorganismos no necesariamente desnitrificantes. Uno de los organismos donde más se ha estudiado la reducción del nitrato a nitrito, *E. coli*, es incapaz de desnitrificar, entendiéndose la desnitrificación como la reducción hasta dinitrógeno del nitrato. La enzima nitrato reductasa ha sido muy estudiada en *E. coli* y *P. denitrificans*, donde se han descrito dos tipos de nitrato reductasas respiratorias, una integral de membrana y otra periplásmica, codificadas por los genes *nar* y *nap*, respectivamente (Ferguson, 1994). Sin embargo, en *E. coli* no tiene lugar la reducción del nitrito a óxido nítrico, sino que el nitrito es asimilado como amonio. La nitrato reductasa de *E. coli* que reduce nitrato a nitrito para rutas asimilatorias es diferente a las nitrato reductasas disimilatorias, estando además codificadas por genes diferentes (*nas*) (Stewart, 1994). En los organismos desnitrificantes, por el contrario, tienen lugar las dos reacciones, por un lado la asimilación de nitrito como amonio para síntesis, y por otro la reducción del mismo a óxido nítrico con objeto de obtener energía.

El nitrito es una molécula reactiva. Su acumulación resulta tóxica para la célula. Los mutantes en nitrato reductasas respiratorias no pueden crecer en microaerobiosis con nitrato. El nitrito también puede formar complejos con la leghemoglobina, formando nitrosil-leghemoglobina, y con la nitrogenasa.

La reducción del nitrito a óxido nítrico es catalizada por las nitrito reductasas. El óxido nítrico (NO), al que debería llamarse más correctamente monóxido de nitrógeno, es una molécula muy reactiva por tener un electrón desapareado (NO \cdot). Es soluble en lípidos, por lo que atraviesa fácilmente las membranas. Forma en presencia de oxígeno especies moleculares muy reactivas como el peroxinitrito. La molécula de NO es susceptible de unirse a átomos de Fe, Cu de los centros activos de las enzimas, por ejemplo de las oxidasas terminales, la óxido nítrico reductasa, centros Fe-S de enzimas como los de la nitrogenasa, etc, además de provocar daños en las moléculas de ADN. Los mutantes en los genes responsables de la síntesis de la óxido nítrico reductasa son letales en anaerobiosis con nitrato.

El óxido nítrico, al que debería denominarse monóxido de nitrógeno, es el producto de la reducción del óxido nítrico. Esta molécula, poco soluble en agua, ha sido considerada a nivel ecológico como corresponsable junto al NO, el CO $_2$ y el CH $_4$ del

efecto invernadero, tiene asimismo importancia en la química atmosférica y en la estabilidad de la capa de ozono. El óxido nitroso es un inhibidor asimismo de la nitrogenasa.

1.2. NITRITO REDUCTASA

1.2.1. Distribución de las nitrito reductasas

Las nitrito reductasas respiratorias existen en una amplia variedad de bacterias. Estas enzimas catalizan o la reducción de seis electrones del nitrito, produciendo amonio, o bien la reducción de un electrón obteniéndose óxido nítrico (NO), hablándose en este caso de reducción disimilatoria.

Bacteria	Referencia
Tipo cd₁	
<i>Alcaligenes eutrophus</i> H16	Rees et al., 1997
<i>Paracoccus denitrificans</i>	de Boer et al., 1994
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Silvestrini et al., 1989
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ZoBell	Jüngst et al., 1991
<i>Thiosphera pantotropha</i>	Fülöp et al., 1995
Tipo Cu	
<i>Achromobacter cycloclastes</i>	Fenderson et al., 1991
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Nishiyama et al., 1993
<i>Alcaligenes xyloxidans</i>	Suzuki et al., 1998
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110	Este trabajo
<i>Rhizobium "hedysari"</i> HCTN1	Toffanin et al., 1996
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.3	Tosques et al., 1997
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	Glockner et al., 1993

Tabla 1.2. Diferentes tipo de nitrito reductasas respiratorias.

Existen dos tipos de nitrito reductasas respiratorias, mutuamente excluyentes en la misma célula, en la naturaleza: nitrito reductasas con tetrahemo cd₁ en el centro activo

(tipo cd_1) y nitrito reductasas con cobre en el centro activo (tipo Cu). Ambos tipos de enzimas no tienen entre sí ninguna relación estructural ni evolutiva. La explicación de porque esta diferenciación y de cual es la distribución real en las cepas del suelo no está aclarada aún, con las consideraciones ecológicas que esto a su vez conlleva. Se considera generalmente a las nitrito reductasas tipo cd_1 como las nitrito reductasas de los "verdaderos desnitrificantes" y las de tipo cobre como las de bacterias que pueden desnitrificar o no, entendiéndose esto como la capacidad de crecer microaeróbicamente con nitrato como única fuente de energía. Los genes de las nitrito reductasas tipo cd_1 forman parte de operones en los que se encuentran genes implicados en el procesamiento de los grupos hemo que formarán el centro activo del enzima, por ejemplo el operón *nirSTBMCFDLGH* de *P. stutzeri* (Jüngst et al., 1991), *nirSECF* de *P. denitrificans* (de Boer et al., 1994), *nirSMC* de *P. aeruginosa* (Silvestrini et al., 1989), etc. Por el contrario, las nitrito reductasas tipo cobre (Cu-NiR) se encuentran aisladas en el genoma sin formar parte de ningún operón (Zumft y Körner, 1997; Zumft, 1997).

Acerca de cuál podía ser el tipo de nitrito reductasa presente en *B. japonicum* sólo existían datos indirectos. A través de estudios inmunológicos, empleando anticuerpos policlonales específicos para un tipo u otro de nitrito reductasa parecía que la nitrito reductasa de *B. japonicum* no era del tipo cd_1 , al dar negativo el ensayo con el anticuerpo policlonal anti- cd_1 , sin embargo, al igual que ocurría con otras cepas, no daba tampoco positivo con el anticuerpo policlonal específico para las de tipo cobre. La determinación alternativa que también se realizó consistió en comprobar si la adición de un tipo u otro de anticuerpo inhibía o no la actividad nitrito reductasa, midiendo la producción de gases NO y N_2O . En caso de que el ensayo no diera un resultado positivo para ninguno de los dos anticuerpos, se determinó entonces a grupo podría corresponder mediante experimentos indirectos en los que se empleaba DCC (ácido 2,4-dicloroacético), que secuestra cobre, esperando así inhibir la nitrito reductasa tipo Cu. Este método indirecto parecía indicar que la nitrito reductasa de *B. japonicum* se veía inhibida por DCC, con lo cual era posible que se tratara de una nitrito reductasa de tipo cobre (Coyne et al., 1989).

1.2.2. Características estructurales de las nitrito reductasas tipo Cu

Las nitrito reductasas tipo Cu son enzimas de localización periplásmica y no están asociadas a membrana. Son aparentemente homotriméricas y, aunque la purificación en algún caso parece indicar que se trate de homodímeros esto ha de deberse al método empleado para ello. Existen en cada monómero dos centros de unión a cobre, llamados tipo 1 y tipo 2. El cobre se halla en estado reducido en la molécula: Cu(II). Existen diferencias aparentes en los espectros de absorción de las proteínas purificadas, que son verdes o azules por este motivo, en los tamaños moleculares, composición de las holoenzimas y actividades catalíticas, a pesar de tener una secuencia de aminoácidos sumamente conservadas. La cristalografía de rayos X ha demostrado que las Cu-NiR son homotrímeros. Se han realizado los estudios cristalográficos en las Cu-NiR de *Achromobacter cycloclastes* (Godden et al., 1991), *Alcaligenes faecalis* (Kukimoto et al., 1994) y recientemente en *Alcaligenes xyloxidans* (Dodd et al., 1997). También los aminoácidos implicados en la coordinación con el Cu del centro activo están conservados y la posición relativa es la misma en la secuencia. El número de átomos de cobre por holoproteína cabría esperarse que fuera de 6, teniendo en cuenta que existen dos sitios de cobre por monómero (tipo 1 y tipo 2), sin embargo los análisis demuestran un número inferior de átomos de cobre por proteína, en torno a 5'3-5'5. Se ha postulado que esto pudiera deberse a la sustitución por zinc, Zn(II), del cobre en algunas de las moléculas (Abraham et al., 1993). Las diferencias en los espectros de absorción se deben a pequeñas diferencias estructurales en las distancias relativas entre los aminoácidos ligandos del Cu y éste.

Cada monómero del trímero consta de dos dominios como se deduce de su estructura cristalográfica (Godden et al., 1991). En el dominio I se localizan los aminoácidos responsables de formar el centro activo de la molécula con los centros Cu tipo 1; lo forman dos Histidinas, un Cisteína y una Metionina; el dominio II contiene los aminoácidos constituyentes del centro tipo 2 y lo forman tres Histidinas.

Los estudios cristalográficos demuestran cuál es el proceso de reacciones que tienen lugar en el centro activo de la enzima. El modelo propuesto implica el desplazamiento por el nitrito de una molécula de agua unida al Cu tipo 1 -no se conoce

si en estado de Cu(I) ó de Cu(II)-; el Cu del sitio 2 sería el que realizara la reducción del nitrito covalentemente unido al Cu: $\text{Cu}^+-\text{NO}_2^-$ a través de un intermediario nitrosil Cu^+-NO^+ , liberando finalmente NO (Zumft, 1997).

Los donadores de electrones que se han propuesto para las Cu-NiR son diversos. En el caso de *P. aureofaciens* y *A. xyloxidans* son azurinas (Zumft et al., 1987; Dodd et al., 1995); para *A. faecalis* y *A. cycloclastes* son pseudoazurinas (Kakutani et al., 1981; Liu et al., 1986). Por último en el caso de *R. sphaeroides* es el citocromo *c*₂ el donador de electrones a la nitrito reductasa (Sawada et al., 1978).

1.2.3. Regulación de las nitrito reductasas tipo Cu

La regulación de los genes implicados en la desnitrificación está sometida a una respuesta sistémica a oxígeno y óxidos de nitrógeno (Zumft, 1997). También existe una respuesta a iones metálicos (ver Apartado 1.6.5). Las síntesis de las nitrito reductasas tipo *cd*₁ está influida por el contenido en Cu en el medio. Como veremos más adelante la regulación por oxígeno es controlada por la presencia de sitios tipo FNR en los promotores sometidos a este tipo de regulación. La síntesis del gen *nirS* de *Pseudomonas aeruginosa*, que codifica para la nitrito reductasa tipo *cd*₁ de este organismo, está sometida a este tipo de regulación pues este gen posee sitios FNR en su región promotora y las fusiones con β-galactosidasa demuestran la respuesta al oxígeno (Arai et al., 1991a). También este gen está regulado por la ausencia o presencia de nitrito en el medio (Arai et al., 1991b).

En el caso de las Cu-NiR se ha estudiado la regulación del gen *nirK* de *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3 demostrándose por un lado la presencia en el promotor de una caja tipo Fnr y la regulación del gen por oxígeno como muestran la fusión con *lacZ*, y por otro la relación entre la síntesis de la proteína NirK y la presencia o ausencia de óxido nítrico. La expresión del gen es mínima en el mutante *nirK*⁻ debido a que no hay síntesis de NO por la nitrito reductasa en este mutante. Como cabía esperar el nitrato es un fuerte inductor de la síntesis de este gen (Tosques et al., 1997). Es significativo resaltar que en el caso de la Cu-NiR de *Rhizobium "hedysari"* la síntesis de la enzima no es influida por la presencia de nitrito, aunque sí por la concentración de

oxígeno (Toffanin et al., 1996).

1.3. ÓXIDO NÍTRICO REDUCTASA

1.3.1. Introducción

El óxido nítrico tal como se ha referido más arriba es un compuesto muy reactivo, por encima de cierta concentración (> 1 mM) resulta letal para las células. Sin embargo es posible crecer células en microaerobiosis con NO como fuente de energía, siempre que se mantengan unas concentraciones suficientemente bajas del mismo. Esto se ha demostrado en desnitrificantes como *P. denitrificans*, *A. xyloxidans* subsp. *denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans*, etc. El crecimiento en NO como aceptor electrónico se debe a que existe un acoplamiento a la translocación de protones y síntesis de ATP a la reducción del NO a N_2O .

La reducción del NO a N_2O es catalizada por las NO reductasas (NOR), enzima presente en muy distintas especies de desnitrificadores. Este paso es el último que se consideró en el proceso de desnitrificación y fue aceptado que el NO era el intermediario entre el nitrito y el óxido nitroso sólo recientemente por las comunidad científica. La enzima encargada del proceso ha sido la última en ser caracterizada de la ruta enzimática de la desnitrificación (Zumft, 1997).

1.3.2. Características estructurales de las óxido nítrico reductasas

La óxido nítrico reductasa es un proteína unida a membrana, que se expresa sólo en condiciones de limitación de oxígeno y contiene grupos hemo; concretamente es un complejo de citocromos *bc*. Ha sido descrita esta actividad en diversos micrororganismos entre ellos *P. stutzeri*, *P. denitrificans*, *R. sphaeroides*, etc. Fue purificada en primer lugar a partir de membranas celulares de *P. stutzeri* (Zumft et al., 1987). Son enzimas compuestas por dos tipos de subunidades de 17 y 53 kDa que tienen carácter hidrofóbico. A la subunidad pequeña se le denomina NorC y a la grande NorB. El análisis espectroscópico demuestra la presencia de grupos hemo tipo C y B. El hemo B

está unido de forma no covalente a la proteína NorB, mientras que la unión del hemo C a NorC es covalente. La proteína funcional es un dímero NorCB o un trímero NorC₂B.

El análisis de la secuencia de NorC muestra un motivo C-X-X-C-H para unión al hemo C. La proteína NorB tiene, de acuerdo también con el análisis de la secuencia de aminoácidos, 12 segmentos hidrofóbicos. Estos segmentos han de corresponder a regiones transmembrana. Es significativo el hallazgo de homología en la secuencia primaria de aminoácidos entre NorB y la subunidad I de las oxidasas tipo hemo-cobre que son oxidorreductasas terminales (García-Horsman et al., 1994; van der Oost et al., 1994). Los ligandos de unión a cobre en la oxidasa coinciden con los de NorB (van der Oost et al., 1994; Saraste y Castresana, 1994). De hecho se ha planteado la posible relación filogenética entre las dos proteínas (Zumft y Körner, 1997). En el caso de esta enzima el metal prostético es hierro y está unido a los hemos C (NorC) y B (NorB), hierro hemínico y también, posiblemente, directamente a un residuo de glutamato de la proteína, hierro no hemínico (Kastrau et al., 1994). Por último, cabe mencionar la existencia de homología en la secuencia primaria entre las proteínas NorB y FixN de *B. japonicum*, que es la subunidad I de una citocromo *c* oxidasa de alta afinidad por oxígeno necesaria en la fijación de nitrógeno por los bacteroides que se codifica dentro del operón *fixNOPQ* (Preisig et al., 1993).

Los donadores de electrones propuestos para la NOR en los fotodesnitrificantes (*Rhodobacter*) son posiblemente el complejo de citocromos *bc₁* y el citocromo *c₂* (Bartnikas et al., 1997). En *P. denitrificans* se ha propuesto la pseudoazurina como donador de electrones (Moir et al., 1994).

1.3.3. Regulación de las óxido nítrico reductasas

Los genes *norCB* forman parte en el caso de *P. aeruginosa* y *Ps. stutzeri* de un operón de genes que incluyen los genes los genes *norCBD* (Arai et al., 1995; Braun y Zumft, 1992), en el caso de *R. sphaeroides* de los genes *norCBQD* (Bartnikas et al., 1997) y en *P. denitrificans* de *norCBQDEF* (de Boer et al., 1996). Sin embargo en *A. eutrophus* sólo está presente un gen *norB* de características algo diferentes (Cramm et al., 1997) (Figura 1.2).

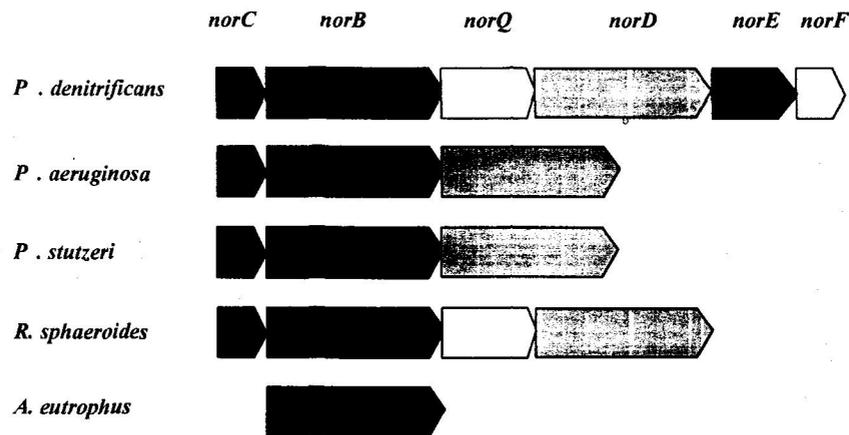


Figura 1.2. Comparación de la organización de los operones *nor* en distintas bacterias.

Como hemos referido más arriba los genes *norCB* codifican para la proteína estructural de la óxido nítrico reductasa. *norQ* codifica para una proteína que tiene un motivo de unión a ATP y que tiene una alta homología en su secuencia primaria con *nirQ* de *P. stutzeri* y *P. aeruginosa*, y además con CbbQ de *Pseudomonas hydrogenothermophila*. El gen *norE* codifica para una proteína con cinco posibles α -hélices transmembrana y con similaridad a CoxIII, que es la tercera subunidad de las citocromo *c* oxidasas.

Los mutantes en los genes *norC*, *norB*, *norD*, *norQ* (o *nirQ*) son incapaces de crecer microaeróbicamente con nitrato (Arai et al., 1995; Braun y Zumft, 1992; Bartnikas et al., 1997; de Boer et al., 1996; Cramm et al., 1997). En el caso de *P. denitrificans* se ha comprobado que los mutantes *norF* y *norE* son capaces de crecer microaeróbicamente pero tienen reducidas las actividades NOR y NiR, indicando algún tipo de papel en la regulación del proceso (de Boer et al., 1996).

Delante del sitio de inicio de transcripción del gen *norC* se encuentra en todas estas bacterias un sitio tipo Fnr/Crp bien conservado, indicando la posible regulación por oxígeno. Esto último ha sido comprobado mediante análisis de fusiones *norC-lacZ* en *R. sphaeroides* 2.4.3. en las que se comprueba que el gen es expresado con máximos niveles en anaerobiosis cuando el nitrato está presente, aunque no existen sitios en la región promotora que indiquen una posible regulación por nitrato (Bartnikas et al., 1997).

1.4. ÓXIDO NITROSO REDUCTASA

1.4.1. Introducción

La respiración del N_2O , también llamada reducción disimilatoria del óxido nitroso, es una de las tres reacciones que definen la desnitrificación. Sólo cuando está acoplada a la respiración del nitrato y del nitrito (incluyendo la reducción del óxido nítrico) se habla de desnitrificación en sentido estricto. Es el último paso en la reducción disimilatoria completa del nitrato. Esta reacción es catalizada por la óxido nitroso reductasa (N_2OR), enzima descrita en diversos organismos conteniendo siempre cobre y de localización periplásmica. (También el complejo nitrogenasa puede catalizar esta reacción, de ahí que el N_2O inhiba la reducción del nitrógeno molecular).

La respiración del N_2O es una etapa que a veces está ausente en ciertos organismos desnitrificadores, debido a la ausencia de los genes implicados en este proceso.

La N_2O reductasa fue purificada en primer lugar de *Pseudomonas stutzeri* ZoBell (Matsubara y Zumft, 1982), y el gen estructural, *nosZ*, fue el primer gen de la desnitrificación cuya secuencia se determinó (Viebrock y Zumft, 1988). Desde entonces se han identificado en diversos organismos la presencia de los genes necesarios para la reducción del N_2O . Se ha determinado que los genes que se tienen en común son los llamados *nosZDFY*, encontrándose recientemente en *S. meliloti* además, *nosL* y *nosX* (Chan et al., 1997). Se considera que *nosR* es un factor regulador de la síntesis de los demás, *nosZ* es el gen estructural de la N_2OR , *nosF* es un transportador de cobre, ATP dependiente, y *nosD*, *nosY* y, posiblemente *nosX* y *nosL* estarían implicados en el procesamiento del cobre hasta situarlo en el centro activo de *NosZ*. En el caso de *P. stutzeri* existen tres unidades de transcripción, una que corresponde a *nosR*, otra a *nosZ* y otra a *nosDFY*.

La localización de estos genes en la mayor parte de los casos es cromosómica, excepto en organismos como *Alcaligenes eutrophus* y *Sinohizobium meliloti* en los que se encuentran en los megaplásmidos pGH1 y pNOD respectivamente, lo que sugiere que estos genes se han adquirido por transferencia horizontal entre distintas especies

bacterianas (Zumft et al., 1992; Chan y Wheatcroft, 1993; Holloway et al., 1996). Existen géneros bacterianos fijadores de N_2 que incluyen además alguno o todos de los genes necesarios para la desnitrificación. El único caso hasta la fecha en el que se ha descrito la N_2OR en un organismo fijador de la familia *Rhizobiaceae* como es *S. meliloti*, que sin embargo, a diferencia de *B. japonicum*, es incapaz de crecer microaeróbicamente con nitrato, como hemos referido más arriba.

1.4.2. Características estructurales de las óxido nitroso reductasas

La N_2OR fue purificada en primer lugar como una proteína soluble y periplásmica tipo Cu de *P. stutzeri* (Zumft y Matsubara, 1982). Sin embargo en un primer momento no se pudo asignar ninguna función a la proteína aislada. La evidencia llegó cuando se comprobó que *P. stutzeri* requería Cu en el medio para crecer en N_2O . Cuando se hacían crecer las células en nitrato en ausencia de Cu ocurría una acumulación de N_2O . Se encontró además que sólo se podía aislar una proteína de unos 120 kd en bacterias cuyo producto final de la desnitrificación era N_2 , mientras que no se detectaba esta proteína en aquellas que únicamente producían N_2O . Finalmente la obtención de mutantes con Tn5 en *P. stutzeri* permitió demostrar el papel de esta proteína de 120 kd en la reducción del óxido nitroso (Zumft et al., 1985). Similares resultados se evidenciaron en *P. denitrificans/Thiosphaera pantotropha* (Hole et al., 1996). La N_2O reductasa se ha caracterizado bioquímicamente asimismo en *Flexibacter canadiensis* (Jones et al., 1992), *Pseudomonas aeruginosa* (SooHoo et al., 1991), *Alcaligenes xyloxidans* (Matsubara y Sano, 1985), *Wollinella succinogenes* (Teraguchi y Hollecher, 1989), *Achromobacter cycloclastes* (Hulse y Averill, 1990) y *Rhodobacter sphaeroides*, enzima que en este último caso contiene además de cobre, zinc (Michalski et al., 1986).

La purificación de la N_2OR en diferentes bacterias ha permitido demostrar que esta proteína es un dímero de unos 120 kd compuesto por subunidades idénticas de unos 66 kd. Cuando es aislada en ausencia de oxígeno contiene unos cuatro átomos de Cu por monómero. Su situación en la célula es periplásmica.

La proteína tiene un centro activo binuclear con los denominados centros tipo

Cu_A y Cu_Z. El centro tipo Cu_A (bimetálico) es semejante en estructura y en la secuencia primaria de aminoácidos al que tiene la subunidad II de las citocromo *c* oxidasas (Zumft y Körner, 1997). Este centro sería el responsable de aceptar los electrones donados por las pseudoazurinas. En el centro tipo Cu_Z, que es el catalítico, sería donde llegaría el sustrato (N₂O) que se acomplejaría con el metal dando lugar a la formación de N₂ en una reacción favorable energéticamente (Zumft, 1997).

Las proteínas con grupos prostéticos metálicos requieren, en general, de la intervención de otras proteínas que dirijan el ensamblaje del metal a la apoproteína. En el caso de la proteína NosZ esta función la realizan las proteínas NosD, NosF, NosY y, posiblemente NosL y NosX. Los genes que codifican a estas tres proteínas se sitúan inmediatamente debajo del gen *nosZ* que codifica para la óxido nitroso reductasa formando un operón. NosD es una proteína que se sitúa en el periplasma, como demuestra la posesión de un péptido señal en su secuencia; NosF es citosólica y posee un sitio de unión a ATP/GTP. NosY es una proteína altamente hidrofóbica y es situada en la membrana interna. El proceso de acoplamiento del cobre a NosZ sería mediado en primer lugar por NosA, una proteína cuyo gen, *nosA*, no está en el operón de la óxido nitroso reductasa y que se supone es un transportador de Cu situado en la membrana externa (Lee et al., 1991). A continuación una proteína aún desconocida realizaría el transporte de Cu al citosol. Por último NosF a través de NosY transportaría el Cu al periplasma y NosD realizaría el acoplamiento del Cu a NosZ (Zumft, 1997).

La transferencia de electrones a la N₂OR ha sido estudiada en *R. sphaeroides*, *R. capsulatus* y *P. denitrificans*. En los fotodesnitrificantes es el citocromo *c*₂ el donador de electrones (Michalski et al., 1986). En el caso de *P. denitrificans* se ha propuesto a la pseudoazurina como el posible donador (Moir et al., 1994).

1.4.3. Regulación de las óxido nitroso reductasas

Como hemos visto más arriba el gen que codifica para la N₂OR forma parte de un operón de genes que codifican para enzimas y factores relacionados con la regulación de la expresión de *nosZ* y para la incorporación del cobre al centro activo de la enzima. En los organismos en los que se ha estudiado la organización de estos genes en el

cromosoma ha podido comprobarse la estrecha correlación que existe en la distribución de los mismos (Figura 1.3). En el caso de *P. stutzeri* se ha estudiado la transcripción de los genes *nosR*, *nosZ* y *nosD*, encontrándose promotores en estos tres genes (Cuypers et al., 1995). En el caso de *nosR* y *nosD* parece haber un único sitio de inicio de transcripción, mientras que *nosZ* tiene seis posibles sitios de inicio de transcripción que se diferenciarían en las distintas condiciones de crecimiento de las células. *nosR* y *nosD* se transcribirían sólo anaeróbicamente, mientras que *nosZ* podría transcribirse aeróbicamente a partir de diferentes sitios de inicio de la transcripción. En *S. meliloti* se han determinado 4 grupos de complementación de los genes *nosRZDFYLX* mediante el análisis de mutantes Tn5. El primero correspondería a *norR*, el siguiente a *nosZ*, el tercero serían *nosDF(L)* y el cuarto sería *nosX*, transcribiéndose por tanto de forma independiente (Chan et al., 1997).

En la región promotora de *nosR* de *P. stutzeri* existe un posible sitio tipo FNR probablemente implicado en la respuesta a la anaerobiosis de este gen. En la región promotora de *nosZ*, sin embargo no se encuentra ningún sitio FNR, sino 4 sitios ½ FNR ó FNR incompletos (ver Discusión). Finalmente no aparecen sitios FNR en *nosD* de *P. stutzeri* ni de ninguno de los otros homólogos *nosD* descritos en los otros organismos.

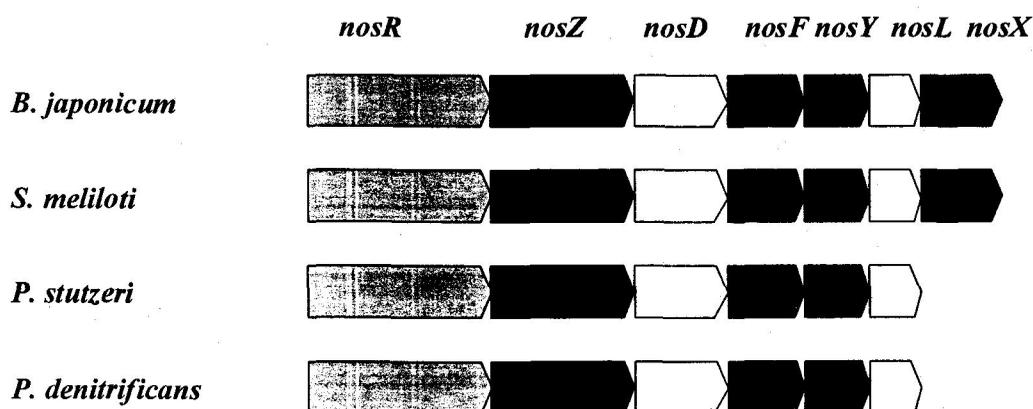


Figura 1.3. Organización genética de los genes *nos* en los organismos en los que se han descrito los demás genes *nos*, parte de *nosZ*. En el caso de *S. meliloti* y *P. denitrificans* no se ha descrito más que una pequeña parte de la secuencia de los respectivos genes *nosR*. El gen *nosX* está ausente en *Ps. stutzeri* y *Pa. denitrificans*, aunque en este último se ha depositado recientemente la secuencia de un nuevo ORF, *nirI*, que es homólogo a *nosX* de *S. meliloti*,

aunque su posición relativa está distante de los genes *nos*.

La posición relativa de los genes *nos* es diferente según se trate de un organismo u otro. En *P. stutzeri* se encuentran formando parte de un clúster de 30 kb en el que se encuentran además los genes *nor* y *nir* de esta bacteria (Braun y Zumft, 1992). En *P. denitrificans*, por el contrario los genes *nos* se encuentran alejados en el genoma de los genes *nor* y *nir* que sí se encuentran agrupados (Stouthamer et al., 1997). En *S. meliloti* se encuentran en el megaplásmido pNOD próximo a los genes *fixLJKNOQPGHIS* (Chan et al., 1997), pero no se conoce la posición de ningún otro gen relacionado con la desnitrificación.

1.5. COPROPORFIRINÓGENO III OXIDASA

1.5.1. Introducción

Los nódulos de las leguminosas son centros de síntesis muy elevada de grupos hemo, necesarios para biosíntesis de citocromos implicados en cadenas de transporte electrónico, la nitrogenasa y para la leghemoglobina. Sobre si la síntesis de los grupos hemo en el nódulo es realizada por parte de la planta o de la bacteria no hace mucho tiempo que estaba extendida la idea de que esta función era realizada por la bacteria. Sin embargo recientemente ha habido críticas a este punto. En primer lugar la hipótesis mantenía que la síntesis ALA por la planta tenía lugar mediante la reacción catalizada por la glutamil-tRNA sintasa (ver más abajo) y se pensaba que esta ruta de síntesis sólo era para la formación de clorofilas. Se descubrió más tarde que la síntesis de ALA por la planta en el nódulo era muy abundante y que esta tenía lugar en los plastidios (O'Brian, 1996).

Además el análisis de mutantes de especies de la familia *Rhizobiaceae* demostró que mutantes en el gen *hemA* de *Sinorhizobium meliloti* eran auxótrofos para ALA y los nódulos formados eran pequeños y no fijadores de nitrógeno. El análisis ultraestructural mostró como el nódulo formado por estos mutantes se quedaba en un estado inicial del desarrollo (Dikstein et al., 1991). Teniendo en cuenta que la leghemoglobina se forma

en estados posteriores de la evolución del nódulo, no se puede concluir que no se sintetiza leghemoglobina porque la bacteria no pueda sintetizar hemos, sino que simplemente no ha llegado el nódulo al estado de desarrollo en el que esta síntesis tiene lugar, sea cual sea la parte que la realice. Por tanto el papel jugado por la planta y la bacteria en la síntesis de hemos en el nódulo ha de dilucidarse todavía.

1.5.2. Biosíntesis de los Hemos

La biosíntesis de los tetrapirroles comienza con la síntesis del ácido δ -aminolevulínico (ALA), que puede ocurrir por dos vías diferentes: La primera ruta para la formación del ALA es la condensación de la glicina con succinil-coenzima A (CoA). Esta reacción requiere el coenzima piridoxal fosfato y la enzima ALA-sintasa. Esta reacción es la que se realiza en organismos eucarióticos que no contienen plastidios (p.e. animales, levaduras y hongos), además de las α -proteobacterias (como los géneros *Rhodobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Paracoccus*, etc.). La otra ruta de síntesis está restringida a plantas, algas y a la mayoría de las bacterias, como las entéricas *E. coli* y *S. typhimurium*. Esta ruta, más compleja, requiere glutamato y aminoacil-t-RNA y es catalizada por la glutamil-tRNA reductasa. La enzima ALA-sintasa está codificada por el gen *hemA*. En *B. japonicum* se ha demostrado que este gen está sometida a regulación por oxígeno mediante los factores FixLJ y en su secuencia se han encontrado sitios de reconocimiento por factores tipo FNR; la delección de esta secuencia en el promotor de *hemA* elimina la expresión del gen en condiciones de baja tensión de oxígeno (McClung et al., 1987; Page y Guerinot, 1995), al igual que ocurre en los genes homólogos de otras bacterias como *S. meliloti* (Leong et al., 1993.), *Rhodobacter sphaeroides* (Neidle y Kaplan, 1993), etc. Mutantes *hemA* en *S. meliloti* forman nódulos pequeños y no fijadores de nitrógeno. Sin embargo, el gen *hemA* no es requerido en la simbiosis de *B. japonicum* con soja dado que mutantes en este gen son fijadores de nitrógeno en simbiosis. La evidencia sugiere que el ALA puede ser también aportada por la soja en la simbiosis y es tomada por la bacteria a través de la membrana peribacteroidea (McGinnis y O'Brian, 1995).

La siguiente enzima de la ruta es la porfobilinógeno sintasa (PBG sintasa, ó ALA

deshidratasa) que cataliza la condensación de dos moléculas de ALA para formar porfobilinógeno (PBG). El gen que codifica esta enzima, *hemB*, es esencial para la formación de bacteroides simbióticos en *B. japonicum*. Es este paso, por tanto, el primero de la síntesis de los hemos que es necesario para la simbiosis. Este gen está sometido también a regulación por oxígeno mediante los factores FixLJ (Chauhan y O'Brian, 1997). Estas enzimas tienen requerimientos de metal, Mg^{2+} ó Zn^{2+} , dependiendo de la especie. En el caso de *B. japonicum* parecen ser necesarios los dos metales. La conversión del PBG a uroporfirinógeno III está catalizada por la hidroximetilbilano sintasa (codificada por el gen *hemC*) y la uroporfirinógeno III sintasa (codificada por *hemD*). Estos genes no han sido descritos en *B. japonicum*, aunque sí en otros organismos como *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*, etc (Beale, 1996). La conversión del uroporfirinógeno III a coproporfirinógeno III la cataliza la uroporfirinógeno III decarboxilasa, codificada por el gen *hemE*, descrita en varios organismos como *E. coli*, *R. sphaeroides* y en eucariotas como mamíferos y levaduras.

1.5.3. Coproporfirinógeno III oxidasa

La coproporfirinógeno III oxidasa cataliza la conversión por decarboxilación oxidativa del propionato en las posiciones 2 y 4 del coproporfirinógeno III para formar grupos vinilo, resultando el protoporfirinógeno IX. En los organismos obligados aerobios esta reacción requiere oxígeno, sin embargo los organismos facultativos anaerobios como *R. sphaeroides* pueden formar protoporfirinógeno IX a partir de coproporfirinógeno, ATP, piridín nucleótido oxidado y metionina. La implicación anaeróbica de S-adenosil-metionina esta indicada por la inhibición de la reacción cuando son crecidos con S-Adenosil-L-homocisteína. En *B. japonicum* se ha podido determinar una actividad coproporfirinógeno III oxidasa que funciona en condiciones anaeróbicas y que tiene los mismos requerimientos para su catálisis (Keithly y Nadler, 1993).

En *S. typhimurium* se han descrito dos coproporfirinógeno III oxidasas, codificadas respectivamente por los genes *hemF* y *hemN*, ambas pueden funcionar en aerobiosis y sus secuencias tienen poca o ninguna homología. Sin embargo mutantes en

hemN en esta bacteria acumulan coproporfirinógeno III y son auxotróficas para el protohemo sólo cuando son crecidas anaeróbicamente (Xu y Elliot, 1994). Se ha considerado por tanto que el *hemN* de *S. typhimurium* es la coproporfirinógeno III oxidasa que funciona en anaerobiosis, que es homóloga a *hemF* de *R. sphaeroides* y *hemF* de *E. coli* (Troup et al., 1995). Además, estos genes tienen homología con parte de *nifD*, que es la subunidad α de la Nitrogenasa en *Rhizobium phaseoli* y *R. leguminosarum*. En los casos de *P. denitrificans* (van Spanning et al., 1997) y *R. sphaeroides* (Zeilstra-Ryalls y Kaplan, 1995), se han encontrado los genes *hemN* junto a los operones de las citocromo oxidasa tipo *cbb₃*, posiblemente debido a que operaría su síntesis de forma coordinada.

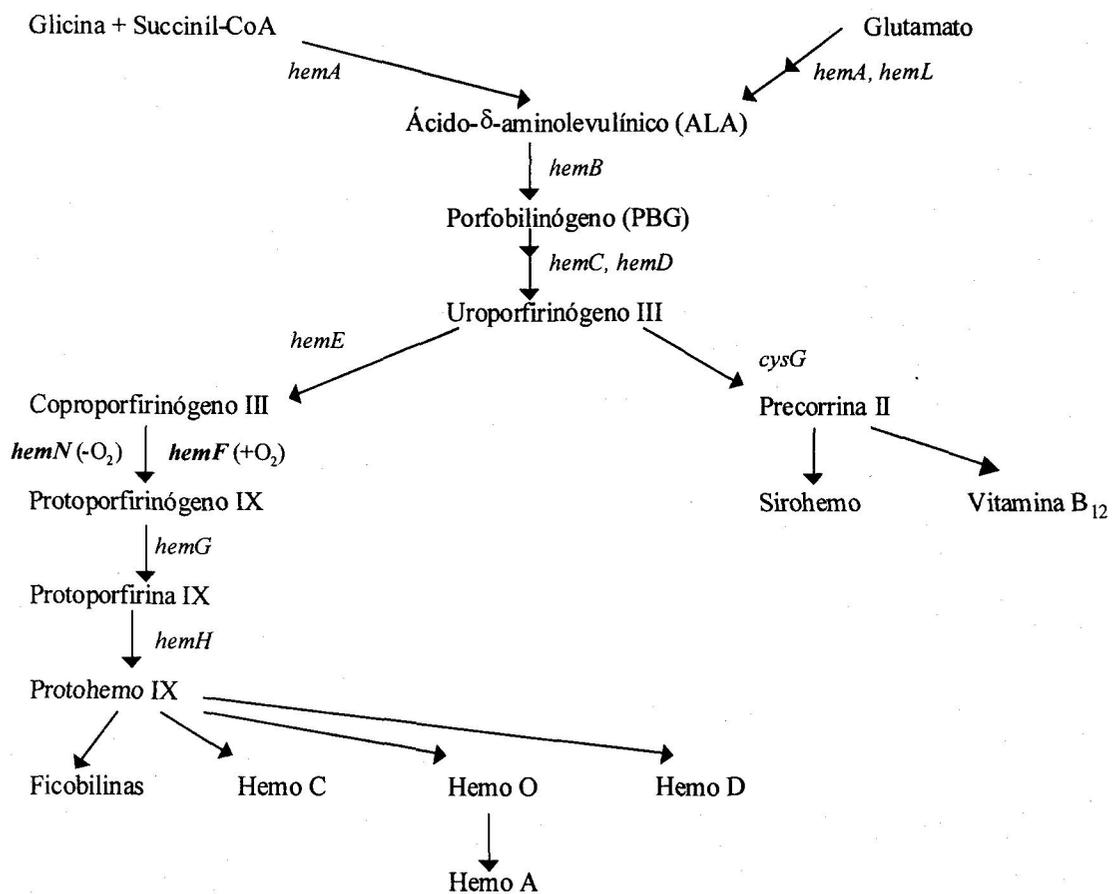


Figura 1.4. Esquema general de la síntesis de los Hemos (adaptado de Beale, 1996).

Por otro lado, recientemente se ha descrito un homólogo a *hemN* en *R. etli* (Valderrama et al., 1996) y en *Rhizobium* sp. NGR234. Sin embargo los posibles productos de estos genes son truncados - en torno a los 180 aminoácidos - a diferencia

de las de *E. coli*, *S. typhimurium*, *R. sphaeroides*, *P. denitrificans* y la que se describe en este trabajo de *B. japonicum* que tienen, aproximadamente, 450 aminoácidos. Probablemente se trate en el caso de *R. etli* y *R. sp.* NGR234 de proteínas no funcionales. Así, mutantes en el ORF251 de *R. etli*, no tienen ningún efecto aparente en la simbiosis, aunque se ha descrito que este gen se expresa en bacteroides (Valderrama et al., 1996).

La oxidación del protoporfirinógeno IX para formar protoporfirina IX es catalizada por la protoporfirinógeno oxidasa. Este paso es el último en el que en la síntesis de hemos y clorofilas es común. Está codificada por el gen *hemG*. En los organismos aerobios esta reacción requiere oxígeno. En los anaerobios facultativos como *R. sphaeroides* o *E. coli* la oxidación del protoporfirinógeno está acoplada a una cadena de transporte electrónico de reducción de nitrato o fumarato.

Por último para la formación del protohemo IX es necesaria la inserción del ión Fe^{2+} en la protoporfirina IX, reacción catalizada por la ferroquelatasa o protohemo ferroliasa que está codificada por el gen *hemH*. Este gen en *B. japonicum* es esencial para la formación de bacteroides fijadores (Frustaci y O'Brian, 1992; 1993). A diferencia del gen *hemB*, la expresión de *hemH* no parece ser inducida por la anaerobiosis, sino inhibida por oxígeno (Chauhan y O'Brian, 1997). Finalmente el protohemo es unido covalentemente a las apoproteínas para formar los diversos hemos, como son el hemo C, hemo D, hemo O, etc, que entrarán a formar parte de los diversos citocromos necesarios para las cadenas de transporte electrónico, oxidasas terminales, leghemoglobina, etc (Delgado et al., 1998).

1.6. REGULACIÓN DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA RESPIRACIÓN ANAERÓBICA DEL NITRATO

1.6.1. Introducción

Los sistemas desnitrificadores son inducidos por la existencia simultánea de una baja tensión de oxígeno y la presencia de óxidos de nitrógeno respirables por los

microorganismos. También se espera que la existencia de iones metálicos (Cu, Fe, Mo) afecte esta biosíntesis, principalmente debido a que se requiere nueva síntesis de sistemas respiratorios y cadenas de transporte electrónico alternativas a la respiración con oxígeno, ya sean citocromos u otras proteínas que requieren iones metálicos en sus centros activos.

1.6.2. Respuesta compartimentalizada al oxígeno y óxido de nitrógeno

Zumft (1997) postula que la desnitrificación puede verse como un conjunto de reacciones compartimentalizadas o módulos, funcionando de manera más o menos independiente. La principal razón que esgrime es la presencia o ausencia en los diversos microorganismos de uno u otro de estos módulos. La reducción del nitrato sería entonces independiente de las siguientes reacciones de desnitrificación. Por ejemplo en *E. coli* existe la nitrato reductasa respiratoria que es homóloga en función y secuencia a la descrita en los organismos desnitrificadores, y sin embargo, están ausentes todos los demás módulos para llevar a cabo la completa reducción del nitrato a dinitrógeno. La reducción del óxido nítrico sería también independiente, pues en ciertos organismos se encuentra ausente, de manera que el producto final de reducción del nitrato sería el óxido nítrico y no el dinitrógeno. Por último la reducción del nitrito y del óxido nítrico serían dos módulos con mayor grado de interdependencia. Esto sería debido fundamentalmente a la elevada toxicidad del NO. No obstante se puede hacer cierto reparo a este último módulo independiente, dado que se ha descrito una cepa de *R. sphaeroides* donde está ausente la nitrito reductasa y sin embargo existe una óxido nítrico reductasa (Tosques et al., 1997).

1.6.3. Regulación por factores tipo Fnr/Crp

1.6.3.1. Características de Fnr de *E. coli*

El llamado modulón Fnr de *E. coli* representa una familia de genes y operones cuya expresión es regulada en respuesta a anaerobiosis, por factores tipo Fnr. Fnr es el

regulador transcripcional anaeróbico. La evidencia de la existencia de este tipo de regulador general fue descrito primero en *E. coli* ante la existencia de una serie de mutantes pleiotrópicos incapaces de usar nitrato, fumarato o nitrito para el crecimiento en anaerobiosis. El término Fnr designa precisamente esto último, refiriéndose a defectos en la reducción anaeróbica del nitrato y fumarato (*anaerobic Fumarate and nitrate reduction*). Finalmente, el gen *fnr* fue clonado e identificado demostrándose que era un regulador transcripcional estructuralmente semejante al factor Cap (*Catabolite gene activator protein*), también conocido como Crp, *cyclic-AMP receptor protein* (Spiro y Guest, 1990).

Origen y Factor	Clase	Secuencia de la hélice de reconocimiento	Gen	Secuencia de reconocimiento	Referencia
<i>P. aeruginosa</i>					
ANR	FNR	SRNEIGNYLGLAVETVSRVFTRFQ	<i>arcD</i> <i>nosZ</i> <i>narG</i> <i>anr</i>	ctaTTGAcgtggATCAgc caacTGATtcccgcCgtc ? Ninguna	Zimmermann et al., 1992 Zumft et al., 1992 Ye et al., 1995 Zimmermann et al., 1991
DNR	FixK	AKQLVAGHLSIQPETFSRIMHRLG	<i>nirS</i> <i>nirQ</i> <i>norC</i> <i>dnr</i>	atcTTGATtccggTCAAg tgcTTGAccggaATCAAg atcTTGATtgccATCAAg agcTTGccgtgcgTCAAg	Arai et al., 1991 Arai et al., 1994 Arai et al., 1995 Arai et al., 1994
<i>P. stutzeri</i>					
FnrA	FNR	SRNEIGNYLGLAVETVSRVFTRFQ	<i>arcD</i> , <i>ccp</i> <i>fnrA</i>	? Ninguna	Cuypers y Zumft, 1993 Cuypers y Zumft, 1993
FnrD	FixK	AKQLVAGHLSIQPETFSRIIRLN	<i>nirS</i> <i>norC</i> <i>nosR</i> <i>nosZ(P3)</i> <i>fnrD</i>	ctcTTGATtgcggTCAAg ttcTTGATtgccATCAAg gcgaaGATggaaATCAAg cagTTGATccccgTgcAa actTTGAcgatcATCAAg	Jüngst et al., 1991 Zumft et al., 1994 Cuypers et al., 1995 Cuypers et al., 1995 Vollack et al. (no publicado)
<i>P. denitrificans</i>					
FnrP	FNR	TREAMADYLGLTLETVSRQMSALK	<i>ccoN</i> <i>narG</i> <i>fnrP</i>	agaTTGAcgcagATCAAA ? accTTGAcccaaATCAAA	van Spanning et al., 1995
NNR	FixK	NKRLIAGHLMQPELSRAFARLR	<i>nirS</i> <i>nirK</i> <i>norC</i> <i>nnr</i>	gccTTaAcaaaggTCAAA gctTTGAcctttgTtAAg cacTTGActttcATCAAT Ninguna	de Boer et al., 1994 de Boer et al., 1996 de Boer et al., 1996 van Spanning et al., 1997
<i>R. sphaeroides</i>					
FnrL	FNR	TREEMADYLGLTLETVSRQVSALK	<i>hemZ</i> <i>fnrL</i>	cgctTGATctgaATCAAA gctTTGATtcagATCAAg	Zeylstra-Ryalls y Kaplan, 1995
NnrR	FixK	TRQNISEMGTTLHTVSRLLSAWE	<i>nirK</i> <i>norC</i> <i>nnrR</i>	ttgTTGcgcgaaccgCAAA tctTTGtgatcccgcCAAc tcaTTGtgctgccgCAAA	Tosques et al., 1996 Bartnikas et al., 1997 Tosques et al., 1993
<i>B. japonicum</i>					
FixK ₁	FNR	SRQDIADYLGLTIETVSRTRFKLE	?	atcTTGATttcaATCAAT	Anthamatten et al., 1992
FixK ₂	FixK	CRRDIGDYLGTLTETVSRALSQLH	<i>fixN</i> <i>fixG</i> <i>fixK₁</i> <i>fixK₂</i>	cgTTGAgctggATCAAc gaaTTGATctgggTCAAc Ninguna	Fisher, 1994 Preisig et al., 1996 Anthamatten et al., 1992 Fisher, 1994
<i>E. coli</i>					
FNR	FNR	TRGDIGNYLGLTVETISRLLRFRQ αE αF	Consenso <i>fnr</i>	a--TTGAT--a-ATCAAT aaaTTGAcaaaATCAAT	Guest et al., 1996

Tabla 1.3. Secuencias de reconocimiento por factores tipo Fnr/Crp en diversos organismos desnitrificantes. La clase FNR comprende las subclases IA y IB de los factores tipo Fnr/Crp,

que poseen cisteínas en su extremo C-terminal. La clase FixK, corresponde a la subclase IC de estos factores (ver texto para detalles) (adaptado de Zumft, 1997).

El modelo del funcionamiento de Cap ha sido muy útil para dilucidar el comportamiento del modulón Fnr en *E. coli*. Así mientras que el modulón Cap regularía el metabolismo de la glucosa haciendo que este metabolito sea el preferido por el metabolismo cuando está presente, el modulón Fnr actuaría haciendo que el oxígeno fuera el aceptor final de la cadena de transporte electrónico cuando hay oxígeno disponible. Cuando no hubiera oxígeno otros compuestos serían los aceptores finales de electrones y el factor Fnr induciría tales sistemas (Guest et al., 1996).

Desde el punto de vista estructural, también el factor Cap ha sido muy útil por su comparación con Fnr. Cada monómero de la proteína Cap (que es un dímero) tiene en su estructura secundaria un motivo hélice-vuelta-hélice (α_E - α_F) que forman el dominio de unión a ADN, otro dominio de hélices β_{1-8} antiparalelas de unión a los nucleótidos y otro dominio de interacción con el otro monómero formado por una hélice α (Green et al., 1993). Sin embargo cuando se purifica Fnr resulta que es una proteína monomérica a diferencia de Cap, apareciendo como un dímero sólo cuando está unido a ADN. Tampoco se conservan los aminoácidos de la proteína CAP que interaccionan con el AMPc. Tampoco se conservan los aminoácidos de hélices β de CAP que interaccionan con la ARN polimerasa. Por último, cuando se purifica Fnr se encuentra hierro en su composición cosa que no ocurre con Cap (Green J y Guest JR, 1991).

La especificidad de la unión de los factores tipo Fnr/Crp a ADN viene dada por los aminoácidos que componen las hélices α_E - α_F . El motivo que reconocen los factores tipo Fnr/Crp es el palíndromo parcial --TTGAT--ATCAA--, siendo el motivo TTGA el que interacciona con los aminoácidos de cada monómero (Spiro et al., 1990). Este motivo se conoce también como *anaerobox*, o caja anaeróbica, debido a que los genes efectores de estos factores Fnr/Crp son activados en anaerobiosis.

Los tipos de factores tipo Fnr/Crp pertenecen a distintas clases dependiendo de la organización estructural de las proteínas. Existen dos dominios, el de unión a ADN, que incluye los aminoácidos que interaccionan con el ADN y el dominio sensorial. Los factores tipo Fnr/Crp se clasifican en dos clases. La clase I la componen, entre otros: Fnr

de *E. coli*, FnrA de *P. stutzeri*, FixK₁ y FixK₂ de *B. japonicum*. La clase II la componen las proteínas Crp de *E. coli* y *Haemophilus influenzae*, entre otras. A su vez dentro de la clase I se pueden distinguir tres subclases IA, IB y IC. Las proteínas pertenecientes a las subclases IA y IB tienen en el extremo N-terminal un dominio característico rico en cisteínas que es C-X(2)-C-X(5)-C, en la clase IA, a la que pertenece Fnr de *E. coli*; y C-X(2-3)-C-X(7)-C en la subclase IB. A ésta subclase pertenece FixK₁ de *B. japonicum*. Los miembros de la subclase IC carecen de este motivo de cisteínas. FixK₂ de *B. japonicum* y FixK de *S. meliloti* pertenecen a esta última. Las cisteínas de las proteínas pertenecientes a las subclase IA y IB son aparentemente quelantes del hierro (Fisher, 1994).

1.6.3.2. Regulación por factores tipo Fnr/Crp en *Rhizobiaceae*

En *S. meliloti* se descubrieron dos genes, *fixL* y *fixJ*, que eran necesarios para la activación transcripcional de los genes *fixNOQP* y *fixGHIS* que codifican para la citocromo *c* oxidasa *cbb3* y la nitrogenasa, respectivamente (David et al., 1988). Se pudo determinar también homólogos a estos genes en *B. japonicum* (Anthamatten y Hennecke, 1991), *Azorhizobium caulinodans* (Kaminski y Emerlich, 1991), etc. *fixLJ* codifican para las proteínas FixL y FixJ de 22 y 55 kd respectivamente. Los mutantes en estos genes en *S. meliloti*, *B. japonicum* y *A. caulinodans* forman nódulos no fijadores de nitrógeno. Además, los mutantes *fixLJ* en *B. japonicum* son incapaces de crecer en microaerobiosis con nitrato (Fisher 1994). Se considera que FixLJ forman un sistema de dos componentes en el que FixL, que es el sensor de oxígeno, que activaría a FixJ fosforilándolo (Kahn y Ditta, 1991). A su vez, FixJ fosforilado activaría por su unión a un motivo específico en la región promotora de diversos genes entre ellos *fixK2* de *B. japonicum* y *fixK* de *S. meliloti* y *A. caulinodans*, la transcripción de los mismos.

FixK₂ de *B. japonicum*, al igual que FixK de *S. meliloti* y *A. caulinodans*, serían los factores que, una vez activados por FixJ, actuarían sobre una serie de efectores, tales como los genes *fixNOQP*, *fixGHIS*, *nifHDK*, *rpoN*, etc (Fisher, 1994; Nellen-Anthamatten et al., 1998). La regulación por estos factores en *B. japonicum*, *S. meliloti* y *A. caulinodans* tiene algunas diferencias significativas. Entre ellas, por ejemplo, en *S.*

meliloti y *A. caulinodans* FixK activarían al gen *nifA* directamente mientras que en *B. japonicum* *nifA* no es activado de esta manera. Por otro lado, en *B. japonicum*, *rpoN* es activado directamente por FixK₂ (Nellen-Anthametten et al., 1998), mientras que en *S. meliloti* y *A. caulinodans* la transcripción de *rpoN* es independiente de FixK (Fisher, 1994) (ver Discusión, Figura 7.1).

La regulación mediada por factores tipo Fnr/Crp puede ser activadora o represora de la transcripción sobre el gen en el que actúa, dependiendo de la posición relativa de los sitios de unión a Fnr/Crp y de la presencia o ausencia de la caja -35. El número de sitios de unión a Fnr/Crp está entre uno y dos en las regiones 5' de los genes. Los genes regulados positivamente por Fnr/Crp tienen cajas -35 cuya secuencia se parece muy poco a la consenso, mientras que los reprimidos por Fnr/Crp tienen secuencias -35 muy parecidas a la consenso (Guest et al., 1996).

1.6.4. Regulación dual por factores tipo Fnr/Crp y NarL

La mayor parte de los genes implicados en la respiración anaeróbica están reguladas por factores tipo Fnr/Crp y el sistema de dos componentes NarXL. NarX actúa como el sensor de nitrato y NarL como el regulador de respuesta en *E. coli*. Existen en esta bacteria además un sistema alternativo que es el NarQP. Las proteínas fosforiladas NarL-P (NarP-P) tienen motivos de unión a ADN en secuencias específicas. En *E. coli* los genes de respiración del nitrato *narGHJI* y de la nitrito reductasa dependiente de NADH, *nirB*, dependen de NarL (Unden et al., 1994). En los promotores de diversos genes de respiración anaeróbica se encuentran simultáneamente sitios de unión a Fnr/Crp y a NarL. Recientemente se ha descrito que la activación de la expresión del gen *napF* (que codifica para la nitrato reductasa periplásmica de *E. coli*) es dependiente de Fnr y NarP, pero es antagonizada por NarL (Darwin et al., 1998). En el promotor de *norC*, *nosZ* y *nosR* de *P. stutzeri* parecen encontrarse cajas potenciales de reconocimiento or NarL, sin embargo si estos sitios son significativos o no tendrá que probarse con un análisis mutacional (Cuypers et al., 1995). Mutantes en NarL de *P. stutzeri* no están afectados en las actividades nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa (Zumft (1997), sin publicar). Por último no parece que este tipo

de regulación dual se deba una interacción física entre Fnr/Crp y NarL, pero sí que la presencia de ambos sitios de reconocimiento es básica para la máxima expresión del gen que regulan (Guest et al., 1996).

1.6.5. Regulación Redox de Fnr/Crp

Los modelos actuales de activación de los factores tipo Fnr/Crp consideran básico el papel del hierro en el proceso. No está claro si se debe a que en ausencia de oxígeno el hierro en la proteína cambia de estado redox de Fe(III) inactiva a Fe(II) activa o bien que el proceso se deba a que en presencia de oxígeno el hierro es liberado de la proteína inactivándola pasando además de Fe(III) a Fe(II) antes. El factor que donara los electrones al factor tipo Fnr/Crp no se conoce tampoco, aunque en *E. coli* hay evidencias de que pudiera ser la ubiquinona (Guest et al., 1996).

1.6.6. Regulación por factores σ^{54}

Los factores σ^{54} (codificados por el gen *rpoN*) fueron descritos por su implicación en las fijación de nitrógeno en *Rhizobiaceae* (Fisher, 1994). Pero desde entonces su relación con otros procesos también ha sido demostrada. En el caso de la desnitrificación en *B. japonicum* parece claro que no tiene ningún efecto la mutación en *rpoN* sobre este proceso (Fisher, 1994). Se ha comprobado recientemente que en el caso de *P. stutzeri* la mutación en *rpoN* no afecta a la expresión y actividad de la nitrato reductasa y óxido nitroso reductasa, aunque sin embargo parece estar afectada la cantidad de proteína de la nitrito reductasa y óxido nítrico reductasa aunque no la cantidad de ARN mensajero, en cuyo caso la regulación de estas actividades sería indirecta y tendría un carácter postraducciona (Härtig y Zumft, 1998)

1.7. CONSIDERACIONES ECOLÓGICAS Y AGRONÓMICAS DE LA DESNITRIFICACIÓN EN RIZOBIOS. EFECTOS DEL NITRATO EN LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO

1.7.1. Supervivencia en suelo

La presencia de rizobios en los suelos de todo el mundo es patente, independientemente de la existencia de las leguminosas con las que forman las simbiosis estas bacterias están ahí presentes. Las bacterias han de colonizar el suelo y persistir en él, en lo que ha dado en llamarse competencia saprofítica (Parker et al., 1977). Claramente en condiciones donde pueda ocurrir desnitrificación, por baja tensión de oxígeno (suelos inundados, etc), y exista nitrato en el medio, las bacterias capaces de sobrevivir en estas circunstancias tendrán una ventaja indudable. Por otro lado, la desnitrificación produce óxidos de nitrógeno, algunos muy tóxicos como el nitrito y el óxido nítrico, como hemos visto. Las bacterias incapaces de reducir estos compuestos por ausencia de las enzimas adecuadas pueden ser destruidas como consecuencia de la actividad desnitrificante de otras bacterias. Desde el punto de vista agrícola la persistencia en suelos de los rizobios es esencial para obtener poblaciones de rizobios efectivos para asegurar la nodulación. Alternativamente hay ocasiones en las que es interesante que las bacterias no sean persistentes, como por ejemplo cuando se cultiven alternativamente dos leguminosas a las que se hayan de inocular diferentes cepas y éstas compitan entre sí. En este caso es interesante conocer si la capacidad desnitrificadora aumentaría la supervivencia en suelos (Parker et al., 1977).

Las tasas de crecimiento rápidas se consideran como importantes para la competitividad. Sin embargo, los rizobios son bacterias de lento crecimiento, incluso en el laboratorio, las llamadas de rápido crecimiento tienen tasas de 4 h., mientras que las de crecimiento lento (*Bradyrhizobium* sp.) son en torno a las 12 h. En suelos hay que multiplicar por diez estas cifras. El principal factor limitante del crecimiento en suelo, donde los microorganismos parecen estar en un estado de latencia, es la disponibilidad de fuentes de energía. Los rizobios de crecimiento lento son mejores colonizadores de suelos infértiles que los de crecimiento rápido, posiblemente debido a factores como la

capacidad de desnitrificación, de hecho entre la mayoría de los rizobios de lento crecimiento se da la capacidad desnitrificadora, ausente en los de rápido crecimiento (O'Hara y Daniel, 1989).

1.7.2. Pérdidas de nitrógeno en suelos

Se considera generalmente que los rizobios no son numéricamente importantes en el volumen global de desnitrificación en suelos llevada a cabo por microorganismos. Sin embargo teniendo en cuenta la gran dispersión de estas bacterias por las prácticas agrícolas pudiera existir una tasa alta de pérdidas de nitrógeno en suelo debido a éstas. O'Hara y colaboradores (1984) determinaron la posibilidad de que la tasa de aporte de nitrógeno al suelo por rizobios (*Rhizobium lupini*) en suelos australianos fuera del mismo orden que la de eliminación del mismo, con las enormes implicaciones agrícolas y económicas que esto conllevaría.

1.7.3. Óxidos de nitrógeno en el suelo y la fijación de nitrógeno

La presencia de iones de nitrato y nitrito en el suelo inhibe la simbiosis rizobio-leguminosa desde los estados iniciales en el establecimiento de la misma. Podría por tanto, ser una ventaja selectiva para los rizobios la eliminación del nitrato y nitrito de la rizosfera a través de la desnitrificación. Aunque podríamos pensar que es mejor para la planta la utilización del nitrato para asimilarlo, a la larga esto no es beneficioso para el rizobio. La inhibición de la fijación de nitrógeno en nódulos de leguminosas por nitrato exógeno ha sido un fenómeno estudiado durante muchos años sin que haya podido encontrarse un consenso acerca de cuál pudiera ser el mecanismo causante de la inhibición (Arrese-Igor et al., 1997). Una de las causas propuestas es la toxicidad de los óxidos de nitrógeno derivados de la posible desnitrificación del nitrato en el nódulo procedente de la actividad de la nitrato reductasa y las otras reductasas (Becana et al., 1985).

Todos los intermediarios de la desnitrificación son potenciales inhibidores de la fijación de nitrógeno como hemos visto más arriba: El nitrito es un inhibidor

competitivo de la nitrogenasa y causa la autooxidación de la leghemoglobina a una forma inactiva en forma de nitrosil-leghemoglobina (Hunt y Layzell, 1993). El óxido nítrico es tóxico para las células y es un inhibidor de la nitrogenasa. El óxido nitroso es un inhibidor competitivo de la nitrogenasa, de la cual puede ser sustrato siendo reducido a N_2 ; de hecho se ha propuesto la desnitrificación como una fuente de N_2 para la nitrogenasa, aunque la cantidad de N_2 que este sistema pueda aportar para la nitrogenasa ha de ser ínfimo. También ha sido propuesto que el nitrato podría ser responsable de desapareamiento de transporte de ácidos dicarboxílicos a través de las membranas nodulares como consecuencia de una alteración del potencial de membrana, originando la disminución de la fijación de nitrógeno (Vassileva y Ignatov, 1996). Por otro lado se ha considerado la posibilidad de que el nitrato indujera una resistencia a la difusión de oxígeno al córtex del nódulo resultando en una menor disponibilidad del mismo para los bacteroides (Vessey et al., 1987).

Sin embargo, ha sido propuesto que el acceso del nitrato al nódulo podría ser bastante limitado (Pate y Atkins, 1983; Giannakis et al., 1988). Parece existir un consenso en establecer que si bien la actividad nitrato reductasa se induce en el nódulo en respuesta a la presencia de nitrato en el medio, no parece, sin embargo, que otro tanto ocurra con la actividad nitrito reductasa del bacteroide. No obstante, está demostrado que los bacteroides aislados tienen capacidad desnitrificante cuando se ensayan en condiciones de microaerobiosis con nitrato (Smith y Smith, 1986).

Los datos más recientes de Arrese-Igor y colaboradores (1998) indican que efectivamente el nitrato tiene acceso a los nódulos de soja infectados con *B. japonicum* en 48 horas. Sin embargo la entrada de nitrato no conlleva la acumulación ulterior de nitrito en el nódulo en condiciones fisiológicas. Cuando los nódulos son separados sí ocurre, por el contrario, una acumulación de nitrito. Posiblemente, concluyen estos investigadores, esto pueda estar relacionado con una alteración en la regulación por oxígeno de la actividad NiR. También agregan que la formación de nitrosil-leghemoglobina por la combinación de nitrito y leghemoglobina en estados iniciales de la formación del nódulo esté relacionada con el proceso de inhibición de la fijación de nitrógeno, y que a mismo tiempo la desaparición del nitrito se deba a la combinación del mismo con la leghemoglobina (Arrese-Igor et al., 1997; Arrese-Igor et al., 1998).

1.8. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

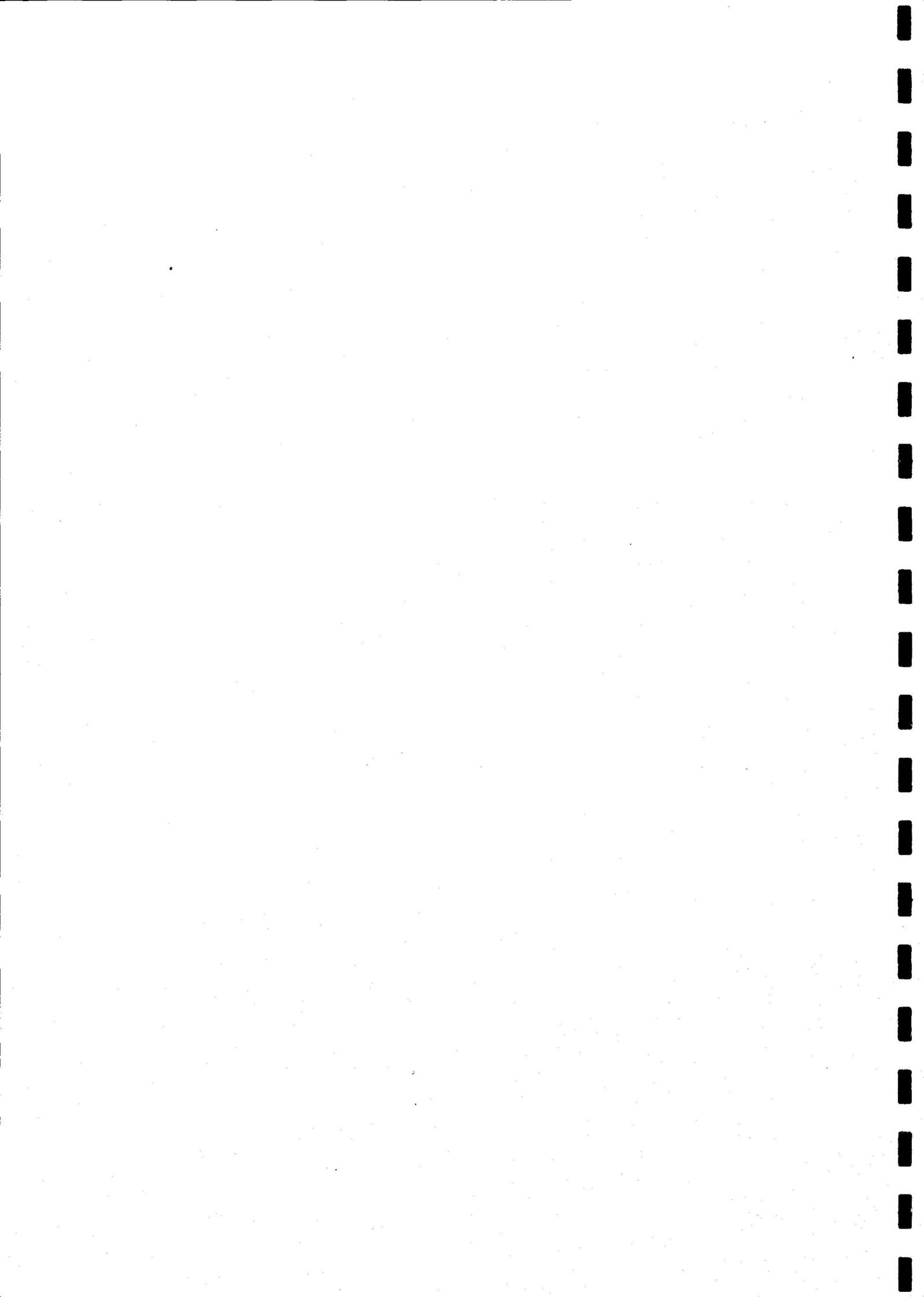
Las bacterias del género *Bradyrhizobium* al igual que los demás miembros de la familia *Rhizobiaceae* se caracterizan por su capacidad para infectar las células corticales de las raíces de las leguminosas, formando nódulos en los que diferenciándose a bacteroides sintetizan la enzima nitrogenasa, responsable de catalizar la reducción de dinitrógeno a amonio. Uno de los factores que más limitan la fijación biológica del nitrógeno es la inhibición por nitrato del proceso. No es conocido aún cuál es el mecanismo o mecanismos por los cuales ocurre esta inhibición, aunque existen diversas hipótesis.

En ausencia de la planta hospedadora, esto es, en vida libre, las especies del género *Bradyrhizobium*, a diferencia de los demás miembros de la familia *Rhizobiaceae*, son capaces de crecer anaeróbicamente con nitrato como única fuente de energía. El nitrato es empleado en estas condiciones como aceptor de electrones alternativo al oxígeno en la cadena respiratoria, acoplado este proceso a la síntesis de ATP. La respiración del nitrato resulta en la formación de nitrito, a partir del cual, se inicia el proceso de desnitrificación, que consiste en la formación de óxidos de nitrógeno y dinitrógeno molecular. La reducción anaeróbica de nitrato es llevada a cabo de manera secuencial por las enzimas nitrato reductasa (NAR), nitrito reductasa (NiR), óxido nítrico reductasa (NOR) y óxido nitroso reductasa (N₂OR). Se considera a *Bradyrhizobium japonicum*, por tanto, como una especie desnitrificante.

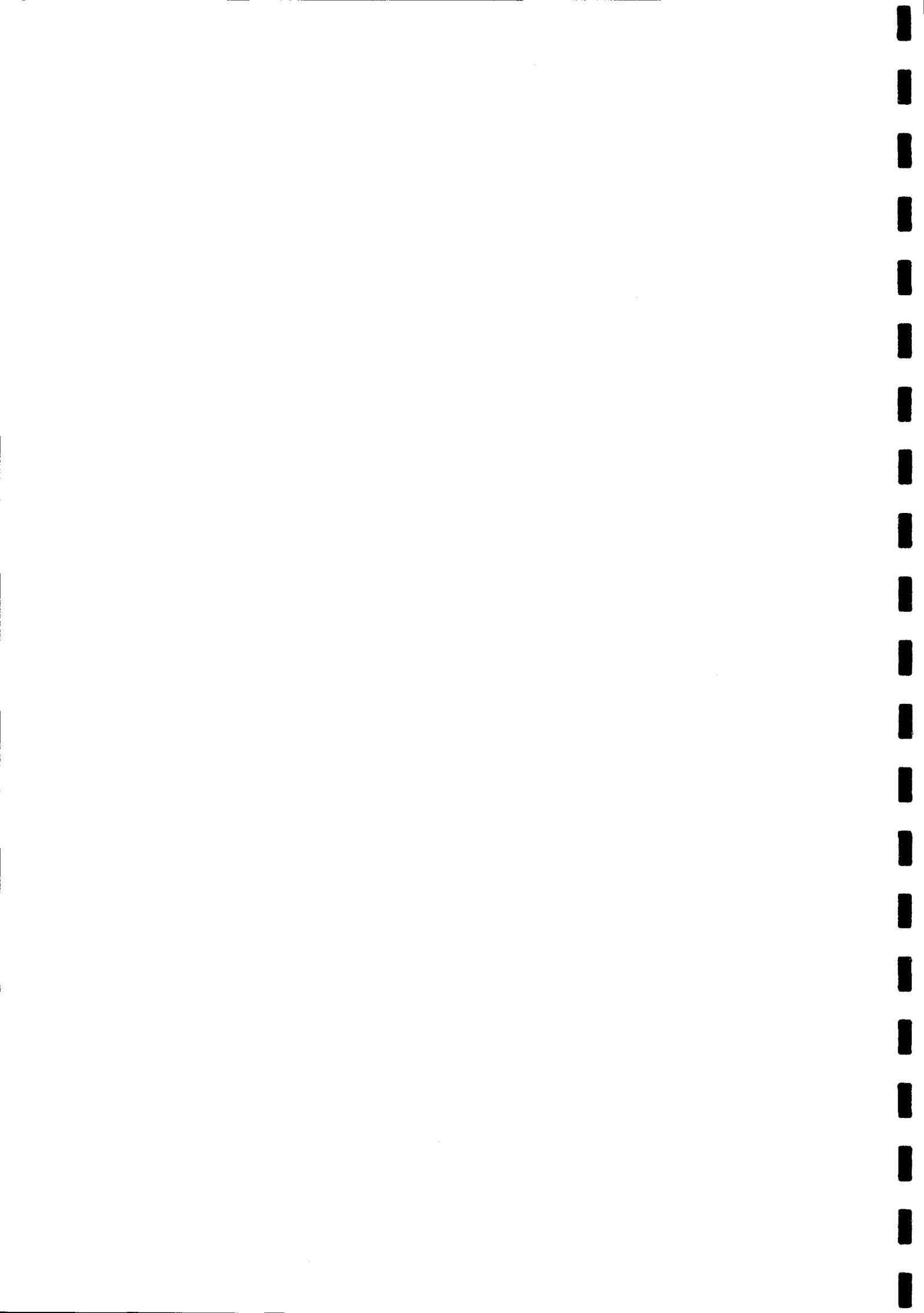
La fijación de nitrógeno y la desnitrificación son dos procesos antagónicos, ya que mientras el primero resulta en la formación de amonio, el segundo da lugar a la pérdida de nitrógeno combinado. No deja de ser paradójico que ambos procesos puedan ser llevados a cabo por el mismo microorganismo, como es el caso de *B. japonicum*, y en condiciones fisiológicas similares. Además, en la literatura existen datos preliminares que sugieren que ambos procesos podrían estar regulados a nivel genético por elementos de control comunes. Por otra parte, en bacteroides la desnitrificación puede proporcionar energía para permitir la reducción de nitrógeno atmosférico, además de contribuir a eliminar el nitrito y óxidos de nitrógeno producidos, todos ellos inhibidores potenciales de la fijación de nitrógeno. Teniendo esto en cuenta se plantearon los siguientes

objetivos encaminados a determinar las posibles relaciones existentes entre la fijación de nitrógeno y la desnitrificación en la simbiosis *B. japonicum-Glycine max*:

- 1.- Identificación y caracterización de los genes que codifican para la nitrito reductasa respiratoria, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa de *Bradyrhizobium japonicum*.
- 2.- Estudio de los mecanismos de regulación de estos genes en vida libre y en simbiosis.
- 3.- Mediante la utilización de mutantes de *B. japonicum* afectadas en estos genes y tras su inoculación en plantas de soja se ha estudiado la posible existencia de alteraciones en la fijación de nitrógeno en simbiosis *B. japonicum-Glycine max*.



Material y Métodos



2.1. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

2.1.1. Cepas bacterianas y plásmidos

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

Tabla 2.1. Cepas bacterianas.

Cepa	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>B. japonicum</i>		
USDA 110	Cepa parental; Cm ^r	Maier y Brill. (1978)
7403	USDA110, <i>fixL</i> :: Spc ^r , Km ^r	Anthamatten y Hennecke (1992)
7360	USDA110, <i>fixJ</i> :: Spc ^r , Km ^r	Anthamatten y Hennecke (1992)
9043	USDA110, <i>fixK2</i> :: Spc ^r , Sm ^r	Nellen-Anthamatten et al. (1998)
GRN307	USDA110, <i>hemN</i> :: Spc ^r , Sm ^r	Este trabajo
GRK308	USDA110, <i>nirK</i> :: Spc ^r , Sm ^r	Este trabajo
GRB711	USDA110, <i>norB</i> :: Km ^r	Este trabajo
GRZ3035	USDA110, <i>nosZ</i> :: Spc ^r , Sm ^r	Este trabajo
GRR1042	USDA110, <i>nosR</i> :: Spc ^r , Sm ^r	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
S17.1	<i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>recA</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , RP4Tc::Mu, Km::Tn7; Tp ^r ; Sm ^r	Simon et al. (1983)
DH5α	<i>supE44</i> , <i>ΔlacU169</i> , <i>f80</i> , <i>lacZAM</i> , <i>5hsdR171</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi1</i> , <i>relA1</i>	BRL
HB101	<i>supE44</i> , <i>hsdS20</i> , <i>recA13</i> , <i>ara 14</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl5mtI1</i>	Bolívar y Backman (1979)

Tabla 2.2. Plásmidos.

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pUC18	Vector de clonación y secuenciación; Amp ^r	Yanisch-Perron et al. (1985)
pBSKS(-)	Vector de clonación y secuenciación; Ap ^r , lacZ, ori fl	Stratagene [®]
pGEM7f(+)	Vector de clonación y secuenciación; Ap ^r , lacZ, ori fl	Promega [®]
pSUP202	Vector de clonación pBR325::mob; Tc ^r , Cm ^r , Ap ^r	Simon et al. (1983)
pSUP401	Vector de clonación pBR325::mob; Km ^r , Cm ^r , Ap ^r	Simon et al. (1983)
pHP45Ω	Plásmido portador del gen de resistencia a Spc/Sm; Sm ^r , Spc ^r , Ap ^r	Prentki y Kirsch (1984)
pUC4-KIXX-PSP	Plásmido portador del gen de resistencia a Km; Ap ^r , Km ^r	Kündig et al. (1993)
pMP220	Vector de clonación para la construcción de fusiones con β-galactosidasa; Tc ^r	Spaink et al. (1987)
pNIR201	Plásmido derivado de pUC19 que incluye parte del gen <i>nirK</i> de <i>A. faecalis</i> ; Ap ^r	Nishiyama et al. (1993)
pNIR9	Plásmido derivado de pBR325 que incluye parte del gen <i>nirS</i> de <i>P. stutzeri</i> ; Ap ^r	Jüngst et al. (1991)
pNS220	Plásmido derivado de pBR322 que incluye parte del gen <i>nosZ</i> de <i>P. stutzeri</i> ; Ap ^r	Viebrock y Zumft (1988)
pPNIR3E	Plásmido derivado de pGEM7 con los genes <i>norCB</i> de <i>P. denitrificans</i> ; Ap ^r	de Boer et al., 1996
pJNIR1	Cósmido derivado de pLAFR3 con los genes <i>nirK</i> y <i>hemN</i> de <i>B. japonicum</i> ; Tc ^r	Este trabajo
pJNIR61	Plásmido derivado de pBS con los genes <i>nirK</i> y <i>hemN</i> de <i>B. japonicum</i> . Ap ^r	Este trabajo
pJNIR61S	Plásmido derivado de pJNIR61 por digestión con <i>Sma</i> I. Contiene el gen <i>nirK</i> de <i>B. japonicum</i> ; Ap ^r	Este trabajo
pJNIR61H	Plásmido derivado de pJNIR61 por digestión con <i>Hind</i> III. Contiene el gen <i>hemN</i> de <i>B. japonicum</i> ; Ap ^r	Este trabajo
pJNOS1	Cósmido derivado de pLAFR3 con los genes <i>nosRZDFYLX</i> de <i>B. japonicum</i> ; Tc ^r	Este trabajo
pJNOS41	Plásmido derivado de pBS con los genes <i>nosZD</i> y parte de <i>nosF</i> de <i>B. japonicum</i>	Este trabajo
pCLH150	Plásmido derivado de pBS que incluye un fragmento <i>Hind</i> III de 12 kb con los genes <i>nosRZDFYLX</i> de <i>B. japonicum</i> ; Ap ^r	Este trabajo
pJNOR1	Cósmido derivado de pLAFR3 con los genes <i>norCB</i> de <i>B. japonicum</i> ; Tc ^r	Este trabajo

pJNOR41	Plásmido derivado de pBS con los genes <i>norBQD</i> de <i>B. japonicum</i> ;	Este trabajo
	Ap ^r	
pJNOR43	Plásmido derivado de pBS con el gen <i>norC</i> de <i>B. japonicum</i> ;	Este trabajo
	Ap ^r	
pSPNIR1	Plásmido derivado de pSUP202 para la mutagénesis en <i>nirK</i> ;	Este trabajo
	Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r , Ap ^r	
pSPHEM1	Plásmido derivado de pSUP202 para la mutagénesis en <i>hemN</i> ;	Este trabajo
	Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r , Ap ^r	
pSPNOSZ2.2	Plásmido derivado de pSUP202 para la mutagénesis en <i>nosZ</i> ;	Este trabajo
	Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r , Ap ^r	
pSPNOSR5.1	Plásmido derivado de pSUP401 para la mutagénesis en <i>nosR</i> ;	Este trabajo
	Sm ^r , Spc ^r , Km ^r , Ap ^r	
PSPNOR18.1	Plásmido derivado de pSUP202 para la mutagénesis en <i>norB</i> ;	Este trabajo
	Km ^r , Tc ^r , Ap ^r	
pNIRlacZ	Fusión transcripcional del promotor de <i>nirK</i> de <i>B. japonicum</i> al gen	Este trabajo
	<i>lacZ</i> del plásmido pMP220; Tc ^r	
pNOSlacZ	Fusión transcripcional del promotor de <i>nosZ</i> de <i>B. japonicum</i> al gen	Este trabajo
	<i>lacZ</i> del plásmido pMP220; Tc ^r	
pHEMlacZ	Fusión transcripcional del promotor de <i>hemN</i> de <i>B. japonicum</i> al	Este trabajo
	gen <i>lacZ</i> del plásmido pMP220; Tc ^r	

2.1.2. Medios de cultivo

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

Medio LB (Luria-Bertani, Miller, 1972): NaCl, 5 g; triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; agua (desionizada), 1 litro; Si se desea preparar medio sólido, hay que adicionar agar a una concentración de 15 g/litro. El medio se esterilizó en autoclave a 115 °C durante 30 minutos. El cultivo de células de *E. coli* se realizó a 37 °C.

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

Medio YEM (Vincent, 1970): Manitol, 5 g; NaCl, 0'1 g; extracto de levadura, 1 g; K₂HPO₄, 0'5 g; MgSO₄ · 7H₂O, 0'2 g; agua (desionizada), 1 litro. Si se desea preparar medio sólido, hay que adicionar agar a una concentración de 15 g/litro.

Medio YEMN: Se preparó adicionando 10 mM de KNO₃ al medio YEM.

Medio PSY (Regensburger y Hennecke, 1983): KH_2PO_4 , 0'3 g; Na_2HPO_4 , 0'3 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0'05 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0'10 g; extracto de levadura, 1 g; peptona, 3 g, H_3BO_3 , 0'01g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0'001 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0'0005 g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0'0001 g; FeCl_3 , 0'0001 g; biotina, 0'0002 g; agua desionizada, 1 litro. Si se desea preparar medio sólido, hay que adicionar agar a una concentración de 15 g/litro.

Medio PSY mínimo (PSYM): Como medio mínimo para *B. japonicum* se empleó medio PSY en el que el extracto de levadura y la peptona se sustituyeron por glutamato monosódico (1'7 g/l).

Todos los medios de cultivo para *B. japonicum* se prepararon ajustando el pH a 6'8-7'2, y se esterilizaron en autoclave a 115 °C durante 30 minutos. El cultivo de células de *B. japonicum* se realizó a 28 °C.

2.1.3. Conservación de cepas bacterianas

Para la conservación prolongada de las distintas cepas se han utilizado criotubos que contenían alícuotas de cultivos en fase logarítmica adicionados de glicerol estéril a una concentración final del 20%. Se mantuvieron almacenados a una temperatura de -80 °C.

2.1.4. Antibióticos

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se realizó a partir de soluciones concentradas de los mismos en agua desionizada, excepto en el caso de la tetraciclina y del cloranfenicol que se empleó una mezcla agua-etanol al 50%. La esterilización de los antibióticos se llevó a cabo mediante el empleo de unidades de filtración Minisart[®] NML (Sartorius), de 0'2 µm de tamaño de poro. La concentración final de los distintos antibióticos fue la que se describe en la Tabla 2.3.

Antibiótico	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>B. japonicum</i>	<i>E. coli</i>
Espectinomicina (Spc)	200	25
Sulfato de estreptomicina (Sm)	200	25
Tetraciclina (Tc)	100	10
Sulfato de kanamicina (Km)	180	20
Ampicilina (Ap)	–	200
Cloranfenicol (Cm)	20	50

Tabla 2.3. Antibióticos.

2.1.5. Cultivo de células de *B. japonicum*

Los cultivos de células de *B. japonicum* se llevaron a cabo, de forma rutinaria, a partir de precultivos de 2 ml de medio líquido YEM o PSY con los que se inocularon (dilución 1:50) matraces que contenían 25, 50 ó 100 ml de medio de cultivo líquido. Estos cultivos, a su vez, se emplearon para inocular (dilución 1:100) matraces de mayor capacidad. Las células se incubaron aeróbicamente en un agitador orbital (230 rpm) a 28 °C durante 4 días.

2.1.6. Incubación de *B. japonicum* en microaerobiosis: detección de actividad nitrato reductasa, nitrito reductasa y β -galactosidasa, óxido nítrico y citocromos tipo *c*.

Dado que la mayoría de las cepas mutantes de *B. japonicum* empleadas en este estudio son incapaces de crecer cuando se cultivan microaeróbicamente con nitrato, la inducción de actividad nitrato reductasa, nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y β -galactosidasa, así como la de citocromos tipo *c*, tanto en la cepa parental como en las cepas mutantes, se llevó a cabo de la manera que se indica a continuación:

1.- Las células de *B. japonicum* cultivadas aeróbicamente en medio YEM líquido durante 4 días se lavaron mediante centrifugación (8.000 rpm, 10 min, 4 °C) y, posteriormente, se resuspendieron (2'5 ml/l de cultivo original) en medio YEM.

2.- Las suspensiones celulares así obtenidas se utilizaron para inocular (2'5 ml/l) frascos provistos de tapón de rosca perforable que contenían medio YEMN.

3.- Las células se incubaron en condiciones microaeróbicas (1% de O₂). La microaerobiosis se realizó gaseando el medio de incubación con Ar hasta que la concentración de O₂ en el interior de los frascos fue del 1%. La concentración de O₂ se determinó haciendo pasar el flujo procedente del interior del frasco a través de un analizador de O₂ (Servomex 572B). Para evitar posibles contaminaciones durante el proceso de gaseado, se emplearon filtros Acro 50 (Gelman) de 0'2 µm de tamaño de poro.

4.- Detección de actividad:

4.1.- Para la determinación de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa, las células se incubaron durante 36 h en medio YEMN. Después de la incubación, las células se lavaron mediante centrifugación (8.000 rpm, 10 min, 4 °C) con buffer Tris-HCl 50 mM (pH 7'5) hasta eliminar el nitrito del medio, se resuspendieron en el mismo tampón (2'5 ml/l de medio de incubación) y, finalmente, se emplearon para los ensayos de actividad nitrato reductasa (apartado 2.9) y nitrito reductasa (apartado 2.10).

4.2.- Para la detección de óxido nitroso, las células se incubaron durante 60 h en medio YEMN. Durante este tiempo se tomaron alícuotas del espacio gaseoso de los frascos y se analizó su contenido en óxido nitroso mediante cromatografía gaseosa (ver apartado 2.2.4).

4.3.- Para la detección de actividad β-galactosidasa, se procuró llevar a cabo la inoculación de los medios YEM y YEMN de manera que la densidad óptica, determinada a 600 nm (DO₆₀₀), oscilara alrededor de 0'2. Después, las células se incubaron durante el tiempo necesario, normalmente 72 h, hasta conseguir que la DO₆₀₀ incrementara hasta 0'4-0'6. Finalmente, se tomaron alícuotas de los cultivos para determinar la actividad β-galactosidasa (ver apartado 2.2.5).

4.4.- Para la detección de citocromos tipo *c*, las células de *B. japonicum* se cultivaron aeróbicamente, durante 72 h, en matraces de 2 l que contenían 500 ml de medio YEM. Después de la incubación, las células se lavaron mediante centrifugación (8.000 rpm, 10 min, 4 °C) y se resuspendieron en el mismo medio. Mientras que la mitad de la suspensión celular se congeló a -20 °C para su análisis posterior, la otra mitad se empleó para inocular frascos de 1 l de capacidad que contenían 1 l de medio YEMN.

Los frascos se gasearon con Ar hasta la obtención de condiciones microaeróbicas (1% O₂) y las células se incubaron en agitación a 100 rpm durante 72 h. Pasado este tiempo, las células se lavaron dos veces con tampón de lavado y, finalmente, se resuspendieron en 3 ml del mismo tampón adicionado de 1 mM de PMSF, DNAasa (20 µg/ml) y RNAasa (20 µg/ml). Posteriormente, las células se rompieron por diferencia de presión (ver apartado 2.1.7) y, finalmente, las membranas se resuspendieron en 100-200 µl de tampón de lavado suplementado con PMSF, DNAasa y RNAasa.

- Tampón de lavado: 50 mM de PO₄Na/Na₂, pH 6'8, 1 mM MgCl₂, 0'1 mM CaCl₂ y 0'9% NaCl.

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

La obtención de citosol y membranas de *B. japonicum* se llevó a cabo mediante rotura de las células por diferencia de presión, siguiendo la metodología indicada por Fernández-López et al. (1992):

- 1.- Preenfriar la célula (émbolo y pistón) de una prensa de French (SLM, Aminco) en hielo.
- 2.- Romper las células aplicando una presión constante de 120 Mpa. Repetir el proceso 2-3 veces.
- 3.- Centrifugar el extracto celular resultante (10.000 rpm, 10 min, 4 °C) para sedimentar las células que no se hayan roto. Recoger el sobrenadante y recentrifugar a 250.000g (1 h, 4 °C)
- 4.- El sobrenadante resultante se consideró como la fracción soluble (citosol) y el sedimento como la fracción particulada o de membranas.

2.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS

2.2.1. Determinación de actividad nitrato reductasa

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

1.- Mezclar:

0'2 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7'5)

0'1 ml de KNO₃ 100 mM

0'1 ml de metil viológeno, 2 mM

0'1 ml de agua destilada

0'4 ml de suspensión o extracto celular (0'3-0'5 mg de proteína)

2.- Iniciar la reacción adicionando 0'1 ml de ditionito sódico 46 mM en Tris/HCl 500 mM (pH 7'5). Mezclar con suavidad e, inmediatamente, colocar los tubos a 30 °C.

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

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

2.2.2. Determinación de actividad nitrito reductasa

La determinación de actividad nitrito reductasa en células enteras (ensayos *in vivo*) se realizó determinando la desaparición de nitrito en el medio de reacción, de acuerdo al procedimiento descrito por Delgado et al. (1989). Para ello:

1.- Mezclar:

0'7 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7'5)

0'001 ml de KNO₂ 100 mM

0'1 ml de agua destilada

0.2 ml de células (0.3-0.5 mg de proteína)

2.- Iniciar la reacción adicionando a la mezcla 50 µl de ditionito sódico 144 mM disuelto en NaHCO₃ 300 mM. Mezclar suavemente de forma manual y colocar los tubos a 30 °C.

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

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

2.2.3. Determinación de nitrito

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

1.- A un volumen de muestra se adicionan volúmenes iguales de sulfanilamida (1) y de NNEDA (2). Agitar en vórtex e incubar a temperatura ambiente durante 20 min.

2.- Determinar la absorbancia a 540 nm de longitud de onda. La curva patrón de nitrito se preparó a partir de concentraciones conocidas de KNO₂ en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7.5).

- La sulfanilamida se preparó disolviendo 5 g de sulfanilamida en 100 ml de ácido clorhídrico concentrado (12 N). Diluir hasta 500 ml con agua destilada.

- El ácido N-naftil-etilén-diamino (NNEDA) se preparó disolviendo 100 mg de NNDA en 500 ml de agua destilada.

- Ambos reactivos deben preservarse de la luz, manteniéndolos en frascos color topacio o envueltos en papel de aluminio.

2.2.4. Determinación de óxido nitroso

La producción de óxido nitroso (N₂O) se determinó mediante cromatografía

gaseosa. Se tomaron muestras de 100 μ l del espacio gaseoso de los frascos que contenían los cultivos celulares y se inyectaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890, equipado con detector de conductividad térmica y una columna metálica (180 cm x 3'2 mm) empaquetada con Porapak Q de 80-100 mesh. La temperatura del horno, inyector y detector fue de 60 °C. Como gas portador se empleó helio a un flujo de 55 ml/min. Los picos de N₂O se indentificaron por comparación con el correspondiente patrón. Igualmente la concentración de N₂O en las muestras se calculó por referencia a la curva patrón que se construyó con volúmenes conocidos de N₂O.

2.2.5. Determinación de actividad β -galactosidasa

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

- 1.- Tomar alícuotas de 300 μ l de un cultivo ($DO_{600} = 0'5-0'7$) de células *B. japonicum*.
- 2.- Resuspender las células en 400 μ l de tampón Z.
- 3.- Adicionar 100 μ l de cloroformo y 50 μ l de SDS al 0'1 % en tampón Z. Agitar en vórtex durante 30 s e incubar 5-10 minutos a 30 °C.
- 4.- Adicionar 150 μ l de 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosido en tampón fosfato e incubar a 30 °C hasta que aparezca suficiente color amarillo. Adicionar 350 μ l de CO₃Na₂ 1 M (5).
- 5.- Centrifugar 5 minutos. Recoger el sobrenadante y determinar la absorbancia espectrofotométricamente a 420 nm.

- La actividad β -galactosidasa se expresa en unidades Miller (U), de acuerdo con la fórmula:
$$U = \frac{1000 \times DO_{420}}{t \text{ (min)} \times V \text{ (ml)} \times DO_{600}}$$
 donde DO₄₂₀ y DO₆₀₀ son los valores de densidad óptica determinados a 420 y 600 nm respectivamente; t= tiempo de incubación; V= volumen de cultivo.

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

$$U/\text{mg proteína} = \frac{1000 \times DO_{420}}{0'0045 \times t \text{ (min)} \times V \text{ (ml)} \times DO_{600}}$$
 donde 0'0045 es la absorbancia de 1 nmol de ONPG; DO₄₂₀ y DO₆₀₀ son los valores de densidad óptica determinados a 420 y 600 nm respectivamente; t= tiempo de incubación; V= volumen de cultivo.

- Tampón Z: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 mM), 1'068 g; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (40 mM), 0'551 g; KCl (10 mM), 0'074 g; MgSO_4 (1mM), 0'0246 g; β -mercaptoetanol (50 mM), 0'350 ml; agua destilada, 100 ml. Ajustar a pH = 7.
- ONPG: 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosido: 4 mg de ONPG/ml de tampón fosfato.
- Tampón fosfato: A: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0'1 mM), 1'245 g/70 ml; B: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0'1 mM), 0'689g/50 ml, 39 ml. Mezclar 61 ml de A y 39 ml de B.
- Carbonato sódico (CO_3Na_2 , 1 mM): 10'6 mg/ 100ml

2.2.6 Determinación de proteína

2.2.6.1. Método de Lowry (Lowry 1951)

Este método se empleó para determinar la concentración de proteína en células enteras:

- 1.- Sedimentar las células mediante microcentrifugación (14.000 rpm, 5 min).
- 2.- Resuspender las células en agua destilada. Tomar alícuotas de la muestra y adicionar 1 volumen igual de NaOH 1 N. Agitar en vórtex y hervir durante 20 minutos. Centrifugar 5 minutos. Tomar alícuotas de las muestras convenientemente diluídas y completar con agua destilada hasta un volumen final de 400 μl .
- 3.- Adicionar 400 μl de reactivo A. Mezclar con vórtex e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 4.- Adicionar 200 μl 0'2 N de reactivo de Folin-Cicolteau y agitar en vórtex. Mantener a temperatura ambiente durante 30 min.
- 5.- Registrar espectrofotométricamente los valores de absorbancia a 750 nm de longitud de onda obtenidos frente a un blanco que contenía 400 μl de agua bidestilada, 400 μl de reactivo A y 200 μl 0'2 N de reactivo de Folin-Cicolteau.

La concentración de proteína se calculó mediante interpolación respecto a una curva patrón que se preparó con albúmina bovina.

-
- Reactivo A: 3 partes de reactivo B, 1 parte de SDS 10 % y 1 parte de NaOH 1N.
 - Reactivo B: 20g de Na_2CO_3 en 260 ml de agua destilada; 0'4 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 20 ml de agua destilada y 0'2 g de tartrato sódico-potásico en 20 ml de agua destilada. Mezclar las tres

soluciones para obtener 300 ml de reactivo B.

2.2.6.2. Método de Bradford (Bradford 1976)

Este método se empleó para la determinación de la concentración de proteína en extractos libres de células:

- 1.- Tomar alícuotas de las muestras convenientemente diluidas y completar con agua destilada hasta un volumen final de 800 μ l.
- 2.- Adicionar 200 μ l de reactivo de Bradford (Biorad).
- 3.- Agitar en vórtex e incubar entre 2 y 60 min. La concentración de proteína se calcula después de registrar los valores de absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm frente a un blanco que contiene 800 μ l de agua y 200 μ l del reactivo de Bradford.

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

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

2.2.7.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se ha empleado el método descrito por Laemmli (1970). El gel de resolución se preparó a una concentración final del 15% de poliacrilamida. Para ello, se preparó un mezcla que contenía (por ml): 0.5 ml de acrilamida:bisacrilamida (29.2:0.8), 0.25 ml de tampón Tris-HCl (1.5 M, pH 8.8) con SDS al 0.4% (p/v), 20 μ l de 0.1 M de EDTA (pH 7.5) y 0.23 ml de agua destilada. El gel de empaquetado se preparó a una concentración final del 4.5% de poliacrilamida; la mezcla de acrilamida se obtuvo mezclando (por ml): 170 μ l de acrilamida:bisacrilamida (29.2:0.8), 0.5 ml de Tris-ClH (0.25 M, pH 6.8) adicionado de SDS al 0.4% (p/v), 20 μ l de 0.1 M de EDTA (pH 7.5) y 0.310 ml de agua destilada.. Los catalizadores TEMED (0.2%) y 10 μ l de persulfato amónico (preparado al 10% en agua). Como tampón de desarrollo se utilizó Tris-ClH (25 mM) suplementado con 192 mM de glicina y SDS al 0.1% (p/v). La electroforesis se llevó a

cabo en una cubeta Miniprotean II (Biorad) que emplea como moldes placas de vidrio de 7x10 cm y espaciadores de 0.75 mm. La intensidad de la corriente fue de 20 mA. Las muestras y los marcadores de tamaño molecular se prepararon mezclándolos con un 50% de de tampón de carga formado por Tris-ClH 124 mM (pH 7.0) adicionado de glicerol (20%), azul de bromofenol (20%) y SDS (4.6%, p/v).

2.2.7.2. Transferencia a membranas de nitrocelulosa

Después de la electroforesis (aproximadamente 3 h en las condiciones descritas), las proteínas se transfirieron a filtros de nitrocelulosa de la forma descrita por Bradley et al. (1988). Para ello, antes de su uso la membrana de nitrocelulosa se lavó durante 5 min en tampón de transferencia que contenía en el volumen final de 1 l: 30 g de Tris, 14.4 g de glicina y 200 ml de metanol. A continuación entre las dos esponjas de una cubeta de electroforesis Miniprotean II (Biorad) empapadas en tampón de transferencia se formó una unidad compuesta por un papel Whatman 3MM también empapado en tampón de transferencia, el gel de poliacrilamida, la membrana y, finalmente, otro papel Whatman. La unidad así preparada se colocó sobre la cubeta y la transferencia se llevó a cabo aplicando una intensidad de 10 mA durante 3 h. Después de la transferencia, la membrana se sumergió en tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 100 mM de tampón (pH 7.5) adicionado de NaCl 100 mM.

2.2.7.3. Detección de citocromos tipo c

La detección de proteínas que pudieran contener hemo C unido covalentemente se realizó mediante la técnica descrita por Vargas et al. (1993) basada en la detección de actividad peroxidasa intrínseca del hemo C. Para ello, la membrana se incubó durante 3 min en una mezcla que contenía los reactivos denominados 1 y 2, preparada de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el proveedor (ECL, Amersham). La emisión de luz se detectó poniendo en contacto la membrana con una película autorradiográfica (Hyperfilm β -max, Amersham) durante 10-30 min. El revelado de las películas se llevó a cabo utilizando revelador Neutol Liquid NE[®] (Agfa) y fijador N FIX 172[®] (Negra) a

las diluciones y tiempos recomendados por las casas comerciales.

2.3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

2.3.1 Obtención de ADN plasmídico de *E.coli* ("minipreps")

2.3.1.1. Método de la lisis alcalina (Sambrook et al. 1989)

- 1.- Inocular 1.5-3 ml de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes e incubar a 37 °C durante 12-15 h.
- 2.- Centrifugar las células en tubos de microfuga (14.000 rpm, 2 min). Tirar el sobrenadante. Eliminar los restos de sobrenadante mediante el empleo de micropuntas.
- 3.- Resuspender el sedimento en 250 µl de solución I.
- 4.- Adicionar inmediatamente 250 µl de solución II. Mezclar suavemente por inversión manual de los tubos. Dejar 5 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Adicionar 350 µl de solución III. Mezclar por inversión manual varias veces y centrifugar (14.000 rpm, 15 minutos).
- 6.- Recoger el sobrenadante y adicionar 1 volumen de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Agitar con vórtex y centrifugar (14.000 rpm, 3 minutos).
- 7.- Recoger en tubos nuevos la fase superior acuosa que contiene el ADN (se diferencia de la fase inferior por ser ésta de color amarilla debido a la 8-hidroxiquinoleína de la mezcla fenólica).
- 8.- Adicionar 1'5 volúmenes de etanol al 100% preenfriado a -20 °C. Dejar 15 minutos en hielo/agua. Centrifugar (14.000 rpm, 15 minutos).
- 9.- Eliminar el sobrenadante. Adicionar etanol al 70% y centrifugar (14.000 rpm, 2 minutos). Eliminar el sobrenadante.
- 10.- Secar el precipitado al vacío.
- 11.- Resuspender el precipitado en 40 µl de tampón o H₂O bidestilada.

- Solución I: Tris.HCl 50 mM; EDTA 10 mM; 100 µg/ml RNAasa A; pH 8.
- Solución II: NaOH 0'2 M; SDS 1%.
- Solución III: Acetato potásico 3 M; pH 5'5.
- Tampón TE8: Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH=8.
- RNAasa A: 100 µg/ml en NaCl 15 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 7'5. De forma previa a su utilización, la solución concentrada de RNAasa se calentó a 100 °C durante 15 min, se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente, se prepararon alícuotas y se almacenaron a -20 °C.
- Mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (vol/vol) (25:24:1): Se prepara a partir de fenol al 100% que contenía 8-hidroxiquinoleína al 0'1% en Tris-HCl 0'1 M (pH 8), al que se le adiciona cloroformo y alcohol isoamílico en la proporción indicada.

2.3.1.2. Método de la lisis con STET (Sambrook et al., 1989)

Este método se empleó cuando fue necesario analizar un gran número de clones de *E.coli*. Para ello:

- 1.- Inocular 3 ml de medio LB líquido suplementado con los antibióticos adecuados. Incubar en agitación (180 rpm) durante 12-14 horas a 37 °C.
- 2.- Centrifugar las células en tubos de microfuga (14.000 rpm, 2 min). Eliminar el sobrenadante.
- 3.- Adicionar 350 µl de STET y resuspender el precipitado con el vórtex. Adicionar 5 µl de lisozima (10 mg/ml).
- 4.- Colocar los tubos en agua hirviendo durante 40 s y centrifugar (14.000 rpm, 15 minutos). Eliminar el precipitado, que es viscoso, con un palillo higiénico.
- 5.- Adicionar 40 µl de AcK 3M pH 5'5 y dos volúmenes de isopropanol. Mantener los tubos a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 6.- Centrifugar (14.000 rpm, 15 minutos). Eliminar el sobrenadante. Adicionar etanol al 70% y centrifugar (14.000 rpm, 2 minutos).
- 7.- Eliminar el sobrenadante. Secar el precipitado al vacío.
- 8.- Resuspender el precipitado en 40 µl de tampón TE pH 8 o agua bidestilada.

STET: Sacarosa, 8%; Tritón X-100, 0'5%; EDTA, 50 mM pH8; Tris.HCl, 50 mM, pH 8.

2.3.2. Obtención de ADN plasmídico de *B. japonicum*

Para comprobar la presencia de los plásmidos que se introdujeron en *B. japonicum* mediante conjugación con *E. coli*, como fue el caso de los plásmidos pNIRlacZ, pNOSlacZ y pHEMlacZ en las cepas de *B. japonicum* USDA110, 7403, 7360, GRK308, GRN307, GRZ3035 y GRR1042, el aislamiento de ADN plasmídico de tales cepas se detalla a continuación:

- 1.- Inocular la cepa adecuada de *B. japonicum* en 5 ml de medio PSY o YEM suplementado con los antibióticos correspondientes. Incubar durante 4 días a 28 °C.
- 2.- Centrifugar (14.000 rpm, 3 minutos) en tubos de microfuga. Eliminar el sobrenadante y recoger el sedimento en 500 µl de NaCl 1M adicionado de Sarcosil al 1%. Lavar 2 veces con NaCl 1M.
- 3.- Resuspender el sedimento en 200 µl de solución MAXI.
- 4.- Adicionar 400 µl de solución de lisis (NaOH 0'2 M; SDS 1%). Mezclar por inversión manual de los tubos. Esperar 10-15 minutos hasta que se observe una lisis adecuada.
- 5.- Adicionar 200 µl de acetato sódico 3 M, pH 4'8. Mezclar por inversión, mantener en hielo 15 minutos.
- 6.- Centrifugar (14.000 rpm, 3 minutos). Recoger el sobrenadante en un tubo nuevo y adicionar etanol al 100% preenfriado a -20 °C.
- 7.- Mantener los tubos en hielo/agua 15 min. Centrifugar (14.000 rpm, 15 minutos).
- 8.- Adicionar etanol al 70% y centrifugar (14.000 rpm, 2 minutos). Eliminar el sobrenadante. Secar el precipitado al vacío.
- 9.- Resuspender el precipitado en 40 µl de tampón TE pH 8 o agua bidestilada.

Tras el aislamiento del ADN plasmídico, debido al bajo número de copias de los plásmidos en *B. japonicum*, es difícil, por regla general, detectarlo en geles de agarosa. Por ello, el ADN obtenido se empleó para transformar células competentes de *E. coli* DH5α, a partir de las cuales se obtuvo mayor cantidad de ADN plasmídico.

- Solución MAXI: Tris-HCl 25 mM, pH 8; glucosa, 50 mM; EDTA, 10 mM.

2.3.3. Obtención de ADN total

Para la obtención del ADN total se siguió la siguiente metodología:

- 1.- Cultivo de 5-10 ml en LB o YEM (para *E. coli* y *B. japonicum* respectivamente), hasta que se alcance la fase logarítmica (12 h para *E. coli* y 4 días para *B. japonicum*).
- 2.- Centrifugar (14.000 rpm, 1 min) en tubos eppendorf de 1'5 ml.
- 3.- Lavar con 250 µl de Sarcosyl 0'1% en TE pH 8.
- 4.- Resuspender en 345 µl de TE pH 8.
- 5.- Adicionar 5 µl de pronasa predigerida, e incubar a 37 °C durante 2 horas.
- 6.- Adicionar 50 µl de SDS 5% en TE pH 8. Mezclar por inversión suavemente e incubar durante 1 hora a 37 °C.
- 7.- Adicionar 120 µl de NaCl 5 M en TE pH8. Mezclar nuevamente por inversión e incubar en hielo durante 1 hora. Centrifugar (14.000 rpm, 3 min) y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 8.- Extraer con fenol equilibrado a pH 8. Para ello, adicionar 1 volumen de fenol y mezclar manualmente. Centrifugar (14.000 rpm, 3 min) y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo. Adicionar al sobrenadante 75 µl de acetato sódico 3 M pH 5'2.
- 9.- Extraer con la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico descrita en el apartado anterior. Centrifugar (14.000 rpm, 3 min) y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo. Repetir este paso dos veces más.
- 10.- Precipitar el sobrenadante con 2 volúmenes de isopropanol. Dejar a temperatura ambiente durante 10 min. Centrifugar (15.000 rpm, 10-15 min). Retirar el sobrenadante y lavar con etanol al 70%. Secar las muestras al vacío.
- 11.- Se puede resuspender entonces el ADN en TE pH 8 o en agua bidestilada, en cuyo caso conviene congelar inmediatamente.

- Pronasa: La pronasa se prepara en 50 µg/ml y se predigiere a 37 °C durante 2 horas. Se hacen entonces alícuotas que se congelan a -20 °C.

2.3.4. Determinación de la concentración de ADN y ARN

Se ha seguido el método espectrofotométrico descrito en Sambrook et al (1989). La absorbancia (A_{260} nm y A_{280} nm) de las soluciones de ADN en agua o en TE se determinaron utilizando como blanco agua o TE, respectivamente. La concentración se calcula respecto a los valores estándar de $DO_{260}=1$ para soluciones con 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de cadena doble. La relación DO_{260}/DO_{280} se usa como estimador de la pureza de la preparación, considerándose valores inferiores a 1'8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. Para muestras de ADN muy impuras o de baja concentración, se empleó el método de comparación de fluorescencia en gel de agarosa bajo luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida, también descrito por Sambrook et al. (1989).

2.3.5. Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción

La digestión total de ADN con enzimas de restricción se llevó a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima, siguiendo las indicaciones, en cuanto a temperatura y tampón, recomendadas por el proveedor (Boehringer, Mannheim, Alemania).

Las digestiones con más de una enzima de restricción se realizaron simultáneamente cuando las enzimas requerían el mismo tampón y temperatura. En caso contrario, se digirió primero con la enzima que requería el tampón de menor fuerza iónica, adicionando posteriormente el tampón y enzima para la segunda digestión. Cuando esto no fue posible, se llevó a cabo, primero, la digestión con una enzima, se precipitó el ADN con etanol y, posteriormente, se resuspendió en agua, llevándose a cabo entonces la digestión con la segunda enzima.

2.3.6. Identificación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en geles de agarosa

2.3.6.1 Electroforesis de ADN

La separación de fragmentos de restricción se ha llevado a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa preparada en TBE (Tris 50 mM; EDTA- Na_2 2'5 mM; BO_3H_2 50 mM; pH 8'2). El tampón de electroforesis también ha sido TBE. La concentración de agarosa ha sido del 0'7% ó del 1%, según el tamaño de los fragmentos a resolver. El voltaje usual de trabajo ha sido de 120 V en cubetas de electroforesis GNA 200 (Pharmacia) y de 80V en cubetas de electroforesis GNA 100 (Pharmacia). Como tampón de carga se ha utilizado una mezcla de sacarosa al 40% y azul de bromofenol al 0'25%, ambos preparados en agua bidestilada. El tampón de carga se emplea en proporción 1/5 con la muestra de ADN.

2.3.6.2. Revelado de geles y fotografía

Las muestras de ADN presentes en los geles de agarosa se visualizaron tras la inmersión de los geles en agua bidestilada que contenía 4-5 gotas de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml), durante 15-20 min. Posteriormente se observaron con luz UV (260 nm) en un transiluminador.

Las fotografías de los geles se han realizado con una cámara Polaroid MP-4 provista de filtro rojo y película Polaroid 665 y 667. Alternativamente, se ha utilizado una videocámara acoplada a un sistema de impresión de imágenes (Gelprinter vm509).

2.3.6.3. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción

La determinación del tamaño molecular de los fragmentos de restricción se ha efectuado teniendo en cuenta la relación logarítmica entre el tamaño molecular relativo (M_r) de moléculas marcadoras de ADN y la movilidad relativa (R_f) de las mismas en el gel de agarosa. Como marcadores de tamaño molecular se han utilizado los fragmentos

de restricción del ADN del fago λ resultantes de la digestión con endonucleasa *Hind*III (Marcador II) o *Eco*RI/*Hind*III (Marcador III).

2.3.7. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Para la purificación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa se han utilizado dos metodologías, SpinBind[®] (FMC Bioproducts-Europa, Dinamarca) y Quiaex-II[®] (Quiagen Inc., Chatsworth, California, USA).

2.3.7.1. Extracción de ADN de agarosa mediante SpinBind[®]

- 1.- Extraer la banda correspondiente del gel de agarosa y cortar cuanto agarosa sea posible, procurando que el volumen máximo de agarosa no supere los 100 μ l (aprox. 100 μ g).
- 2.- Adicionar 3 volúmenes de solución de unión (Reagent B[®]). Disolver la agarosa a temperatura ambiente agitando manualmente.
- 3.- Calentar el tampón de elución de ADN (TE, agua bidestilada) a 65 °C. Mantenerlo caliente hasta su uso.
- 4.- Colocar la unidad de SpinBind[®] en un tubo de microcentrífuga y cargar la muestra de ADN disuelta. Incubar 1 min a temperatura ambiente para que la solución moje uniformemente la membrana.
- 5.- Centrifugar (14.000 rpm, 10 s) en microfuga.
- 6.- Retirar el filtrado del tubo y cargar de nuevo la muestra en la unidad. Centrifugar de nuevo. Repetir el proceso una vez más (tres en total). Guardar el filtrado para posterior comprobación.
- 7.- Adicionar 400 μ l de tampón de lavado con NaI (Reagent C[®]) a la unidad de Spinbind[®]. Centrifugar (14.000 rpm, 10 s). Eliminar la solución de lavado del tubo de centrifuga.
- 8.- Adicionar 400 μ l del tampón de lavado de etanol, (Reagent D[®]) a la unidad.

Centrifugar (14.000 rpm, 10 s). Eliminar la solución de lavado.

9.- Repetir el paso 8 dos veces más para retirar el NaI residual.

10.- Centrifugar la unidad vacía a 14.000 rpm durante 30 s para eliminar todo el tampón de lavado.

11.- Transferir la unidad a un tubo eppendorf nuevo y adicionar 50 µl de tampón TE o agua bidestilada precalentada a 50 °C. Si se quiere concentrar el ADN, eluir en 25 µl. Centrifugar de nuevo (14.000 rpm, 30 s).

2.3.7.2. Extracción de ADN de agarosa mediante Quiaex II®

1.- Extraer la banda correspondiente del gel de agarosa y colocarla en un tubo de microcentrífuga. Pesar la muestra para determinar el volumen de agarosa.

2.- Adicionar 3 volúmenes de tampón QX1®, que contiene altas concentraciones de agentes caotrópicos. Disolver la agarosa a temperatura ambiente agitando manualmente.

3.- Después, agitar en vórtex. Adicionar 5 µl/µg de ADN de la resina Quiaex II® e incubar a 50 °C hasta conseguir la disolución de la agarosa (aprox. 10 min), agitando el tubo por inversión manual cada 2 min.

4.- Centrifugar (14.000 rpm, 30 s). Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado, que contiene el ADN adherido a la matriz, en 0'5 ml de tampón QX1®.

5.- Lavar el precipitado con 0'5 ml de tampón PE® que contiene etanol para eliminar los agentes caotrópicos. Secar a temperatura ambiente, evitando una desecación excesiva porque en caso contrario no se podrá eluir bien el ADN.

6.- Resuspender el precipitado en 20 µl de agua bidestilada o tampón TE calentando a 50 °C durante 10 min.

7.- Eliminar la resina mediante centrifugación (14.000 rpm, 30s). Recoger el sobrenadante con cuidado y pasarlo a un nuevo tubo eppendorf. Esta última operación se puede repetir una segunda vez para eluir el ADN restante.

