



UNIVERSIDAD  
DE GRANADA



UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO DE  
BIOLOGÍA FUNDAMENTAL Y DE SISTEMAS

## TESIS DOCTORAL

**Efecto del cobre sobre la emisión del óxido nitroso  
procedente de la desnitrificación en la simbiosis  
rizobio-leguminosa**

**Effect of copper on the nitrous oxide emission  
from denitrification by the rhizobium-legume  
symbiosis**

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos  
Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), Granada

**Pedro José Pacheco Márquez  
Granada, 2022**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Pedro José Pacheco Márquez  
ISBN: 978-84-1117-633-0  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/79159>





UNIVERSIDAD  
DE GRANADA



UNIVERSIDAD DE GRANADA

**PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOLOGÍA FUNDAMENTAL Y DE SISTEMAS**

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos  
Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), Granada

## **Efecto del cobre sobre la emisión del óxido nitroso procedente de la desnitrificación en la simbiosis rizobio-leguminosa**

### **Effect of copper on the nitrous oxide emission from denitrification by the rhizobium-legume symbiosis**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por el graduado en Biología  
Pedro José Pacheco Márquez para aspirar al Grado de Doctor

**Fdo. Pedro José Pacheco Márquez**

**VºBº Los Directores**

**Fdo.: María Jesús Delgado Igeño**  
Doctora en Biología  
Investigadora Científica del CSIC

**Fdo.: Germán Tortosa Muñoz**  
Doctor en Química  
E. Tec. Especializados de OPIs

**Granada, 2022**



This Doctoral Thesis has been carried out in the Nitrogen Metabolism Group from Department of Soil Microbiology and Symbiotic Systems from Estación Experimental del Zaidín (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC), Granada, Spain.

Part of the results obtained during this Doctoral Thesis have been published in the following scientific journals:

**Copper modulates nitrous oxide emissions from soybean root nodules.** Tortosa, G., Pacheco, P. J., Hidalgo-García, A., Granados, A., Delgado, A., Mesa, S., Bedmar, E. J., Delgado, M. J. (2020). *Environmental and Experimental Botany*, 180, 104262, <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104262>. (Impact Factor: 6.028 (JCR), Q1, Plant Science).

**Effect of copper on expression of functional genes and proteins associated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* denitrification.** Pacheco, P. J., Cabrera, J. J., Jiménez-Leiva, A., Bedmar, E. J., Mesa, S., Tortosa, G., Delgado, M. J. (2022). *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 3386, <https://doi.org/10.3390/ijms23063386>. (Impact Factor: 6.208 (JCR), Q1, Biochemistry).

***Ensifer meliloti* denitrification is involved in infection effectiveness and N<sub>2</sub>O emissions by alfalfa root nodules.** Pacheco, P. J., Bedmar, E. J., Mesa, S., Tortosa, G., Delgado, M. J. (2022).. *Plant and Soil* (under review), <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2033464/v1>.

The results obtained in this Doctoral Thesis have been presented in the following national and international meetings and congresses:

**Efecto del cobre (Cu) en la expresión de genes y proteínas funcionales asociados a la desnitrificación en *Bradyrhizobium diazoefficiens*.** Pacheco, P.J., Cabrera, J.J., Jiménez-Leiva, A., Mesa, S., Bedmar, E.J., Tortosa, G., Delgado, M.J. XV Reunión Nacional del Metabolismo del N. Córdoba, Spain. 2-4 February 2022. Oral communication.

**Copper involvement in *Bradyrhizobium diazoefficiens* denitrification.** Pacheco, P.J., Cabrera, J.J., Mesa, S., Bedmar, E.J., Tortosa, G., Delgado, M.J. 14th European Nitrogen Fixation Conference (on-line event). Aarhus, Denmark. From 22 September to 22 October 2021. Poster communication.

**Greenhouse gas emissions by legume root nodules.** Salas, A., Tortosa, G., Hidalgo-García, A., **Pacheco, P.J.**, Mesa, S., Bedmar, E.J., Richardson, D.J., Gates, A.J., Delgado, M.J. 21<sup>st</sup> International Congress on Nitrogen Fixation. Wuhan, China. 10-15 October 2019. Oral communication.

**Copper reduces nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emissions from soybean nodules.** Tortosa, G., **Pacheco, P.J.**, Mesa, S., Bedmar, E.J., Delgado, M.J. XVII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN)/VI Portuguese-Spanish Congress on Nitrogen Fixation. Madrid, Spain. 10-12 July 2019. Oral communication.

**Emission of the greenhouse gas nitrous oxide by alfalfa root nodules.** **Pacheco, P.J.**, Bedmar, E.J., Delgado, M.J., Tortosa, G. XVII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN)/VI Portuguese-Spanish Congress on Nitrogen Fixation. Madrid, Spain. 10-12 July 2019. Oral communication.

**La desnitrificación en *Ensifer meliloti* es clave para la mitigación de los niveles de N<sub>2</sub>O emitidos por nódulos de alfalfa.** **Pacheco, P.J.**, Bedmar, E.J., Delgado, M.J., Tortosa, G. II Congreso Nacional/IV Jornadas de Investigadores en Formación, Fomentando la Interdisciplinariedad (JIFFI). Granada, Spain. 26-28 June 2019. Oral communication.

***Ensifer meliloti* nitrous oxide reductase is a key for mitigation of N<sub>2</sub>O release from alfalfa root nodules.** **Pacheco, P.J.**, Bedmar, E.J., Delgado, M.J., Tortosa, G. 23<sup>rd</sup> European Nitrogen Cycle Meeting. Alicante, Spain. 19-21 September 2018. Poster communication.

The following activities of science communication were carried out during this Doctoral Thesis and fall within its scope:

**Plantas resfriadas, infectadas y estresadas. Año de la Salud Vegetal.** Matilde Barón Ayala, Emilio Benítez León, Pedro José Pacheco Márquez. Tripartite conference about plant health as part of the project called “Granada, ciudad para la Ciencia, ciencia para la ciudad”, developed by the Granada City Hall, the University of Granada and the Spanish National Research Council (CSIC). Granada, Spain. 29 January 2020.

**Leguminosas y gas de la risa: ¿cómo se relacionan?** Pedro José Pacheco Márquez. Video recorded and uploaded to YouTube as part of the event called “I Concurso de divulgación científica Yo Investigo, Yo Soy CSIC”. Madrid, Spain. November 2019. Link to the video: <https://youtu.be/dRMa8AWif0M>.





# Agradecimientos

Quiero dar las gracias:

Al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, por haberme otorgado un contrato del programa FPU y por la financiación que ha permitido la realización de esta Tesis Doctoral en la EEZ.

Por supuesto, a mis directores de tesis, la Dra. María Jesús Delgado Igeño y el Dr. Germán Tortosa Muñoz, por haberme servido de apoyo y guía durante toda esta etapa. Gracias al conocimiento, a la experiencia y a la comprensión de ambos, esta tesis ha sido posible.

También me gustaría agradecer al que ha sido hasta hace poco el jefe del Grupo del Metabolismo del Nitrógeno en Bacterias Rizosféricas, el Dr. Eulogio Bedmar Gómez, por su disponibilidad, su sabiduría y sus consejos. Que disfrutes de tu jubilación.

Asimismo, a la Dra. Socorro Mesa, por haberme permitido usar su laboratorio cuando me fue necesario, y también por sus ideas y acertadas opiniones.

A la Dra. María Jesús Torres Porras (Chudi), por su paciencia en los dos años de Máster y su compañerismo y profesionalidad durante mi estancia en Norwich. Y al Dr. Andrew Gates, por la supervisión de mi trabajo durante mi estancia en su laboratorio.

A todos mis compañeros de laboratorio, por su disposición a echarme una mano cuando lo necesitaba, y por los agradables ratos que hemos pasado en el laboratorio y fuera de él. Sois los mejores.

Y por último, pero no menos importante, a mis amigos José Antonio y Lionel, y a toda mi familia, por su apoyo incondicional.

Todos habéis sido parte fundamental en esta etapa de alguna u otra manera. Por todo lo que me habéis aportado:

**GRACIAS** y un enorme abrazo a todos



# Índice

<b>RESUMEN/SUMMARY .....</b>	<b>7</b>
Resumen.....	9
Summary .....	13
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>17</b>
I. Papel del N <sub>2</sub> O en el cambio climático.....	19
II. El N <sub>2</sub> O en la agricultura.....	22
2.1. La agricultura como principal sector de emisión antropogénica de N <sub>2</sub> O .....	22
2.2. Fuentes biológicas de N <sub>2</sub> O .....	24
2.3. Nitrificación.....	26
2.4. Desnitrificación .....	27
2.4.1. Nitrato reductasa.....	29
2.4.2. Nitrito reductasa.....	31
2.4.3. Óxido nítrico reductasa .....	33
2.4.4. Óxido nitroso reductasa.....	34
III. Las leguminosas y su simbiosis con rizobios .....	37
3.1. Las leguminosas y su importante papel frente al cambio climático.....	37
3.2. Cultivo de soja .....	39
3.3. Cultivo de alfalfa.....	40
3.4. Los rizobios .....	41
3.5. Nodulación.....	42
3.6. Fijación biológica de N <sub>2</sub> .....	45
IV. Desnitrificación en la simbiosis rizobio-leguminosa .....	46
4.1. <i>B. diazoefficiens</i> como modelo de estudio de la desnitrificación en rizobios.....	46
4.2. Desnitrificación en <i>E. meliloti</i> .....	50
4.3. Metabolismo de NO y N <sub>2</sub> O en nódulos de leguminosas .....	52
V. Relevancia del Cu en la simbiosis rizobio-leguminosa .....	56
5.1. Importancia del Cu para el desarrollo vegetal y de los nódulos.....	56
5.2. Regulación de la respuesta a Cu en bacterias.....	58
5.3. El Cu como factor regulador emergente en la desnitrificación.....	61
<b>OBJETIVOS/OBJECTIVES .....</b>	<b>63</b>
Objetivos .....	65
Objectives.....	66

<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>69</b>
I. Materiales.....	71
1.1. Cepas bacterianas y plásmidos .....	71
1.1.1. Cepas bacterianas.....	71
1.1.2. Plásmidos .....	72
1.2. Oligonucleótidos .....	72
1.3. Medios de cultivo .....	73
1.4. Antibióticos .....	76
II. Métodos microbiológicos .....	77
2.1. Conservación de cepas bacterianas .....	77
2.2. Cultivo de células.....	78
2.2.1. Siembra en placa de Petri .....	78
2.2.2. Cultivos en medio líquido.....	78
2.2.2.1. Precultivos aeróbicos .....	78
2.2.2.2. Cultivos aeróbicos .....	78
2.2.2.3. Cultivos microaeróbicos .....	79
2.2.2.4. Cultivos anaeróbicos .....	80
2.3. Obtención de membrana, periplasma y citosol de células de <i>B. diazoefficiens</i> .....	80
III. Métodos analíticos .....	82
3.1. Determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa .....	82
3.2. Determinación de proteína.....	84
3.3. Determinación de $\text{NO}_3^-$ y $\text{NO}_2^-$ .....	85
3.4. Determinación de $\text{N}_2\text{O}$ .....	86
3.5. Determinación de actividades enzimáticas .....	86
3.5.1. Actividades nitrato (NR, EC 1.7.99.4) y nitrito reductasa (NIR, EC 1.7.2.1) .....	86
3.5.2. Actividad óxido nítrico reductasa (NOR, EC 1.7.2.5).....	88
3.5.2.1. Preparación del sistema electrodo-membrana .....	88
3.5.2.2. Preparación de una solución saturada de NO .....	89
3.5.2.3. Calibración del sistema .....	89
3.5.2.4. Determinación del consumo de NO (actividad NOR) .....	90
3.5.3. Actividad óxido nitroso reductasa ( $\text{N}_2\text{OR}$ , EC 1.7.2.4) .....	90
3.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	91
3.7. Transferencia a membranas de nitrocelulosa.....	92
3.8. Detección de citocromos tipo <i>c</i> mediante <i>heme-staining</i> .....	93
3.9. Ensayos de inmunodetección ( <i>western-blot</i> ).....	94
3.10. Visualización de proteínas en geles de poliacrilamida con azul de Coomassie®.....	95

IV. Métodos de biología molecular .....	95
4.1. Obtención de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .....	95
4.2. Obtención del ADN total de <i>B. diazoefficiens</i> .....	96
4.3. Determinación de la concentración de ARN y ADN.....	97
4.4. Amplificación de ADN mediante PCR .....	97
4.5. Electroforesis de ADN o ARN en geles de agarosa .....	99
4.6. Purificación de fragmentos de ADN producto de PCR.....	99
4.7. Secuenciación del ADN .....	100
4.8. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción .....	100
4.9. Ligación de fragmentos de restricción a vectores de clonación.....	101
4.9.1. Desfosforilación de vectores de clonación .....	101
4.9.2. Ligación a vectores de clonación .....	101
4.10. Preparación y transformación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	102
4.10.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> con RbCl .....	102
4.10.2. Transformación de <i>E. coli</i> con el plásmido de interés .....	103
4.11. Transferencia de ADN a células de <i>B. diazoefficiens</i> o <i>E. meliloti</i> mediante conjugación .....	104
4.12. Aislamiento y purificación del ARN total de <i>B. diazoefficiens</i> .....	105
4.12.1. Extracción del ARN total de <i>B. diazoefficiens</i> .....	105
4.12.1.1. Protocolo manual .....	105
4.12.1.2. Protocolo comercial.....	106
4.12.2. Purificación del ARN total obtenido .....	107
4.13. Transcripción inversa o retrotranscripción .....	108
4.14. PCR cuantitativa a tiempo real.....	109
V. Ensayos con plantas .....	109
5.1. Esterilización y germinación de semillas.....	109
5.2. Solución nutritiva para el cultivo de las plantas.....	110
5.3. Cultivo de las plantas.....	110
5.4. Tratamientos de las plantas .....	114
5.4.1. Tratamientos de las plantas de soja .....	114
5.4.2. Tratamientos de las plantas de alfalfa .....	114
5.5. Cosecha de nódulos.....	117
5.6. Determinación de los parámetros fisiológicos de las plantas.....	117
5.6.1. Número de nódulos, peso fresco y seco de nódulos y peso fresco y seco de planta .....	117
5.6.2. Contenido en N total, de N procedente de la BNF y de Cu .....	118

5.6.2.1. Determinación del contenido en N total .....	118
5.6.2.2. Determinación de N procedente de la BNF .....	118
5.6.2.3. Determinación de Cu en las plantas y en la solución nutritiva .....	119
5.7. Determinaciones analíticas y enzimáticas en nódulos de soja y alfalfa .....	120
5.7.1. Contenido de leghemoglobina en los nódulos .....	120
5.7.2. Determinación de las emisiones de N <sub>2</sub> O en raíces noduladas y nódulos.....	121
5.7.3. Aislamiento de bacteroides procedentes de los nódulos .....	122
5.7.4. Siembra en placa de bacterias procedentes de los nódulos .....	123
5.7.5. Actividades MV <sup>+</sup> -NR y MV <sup>+</sup> -NIR en bacteroides .....	124
5.7.6. Actividad NOR en bacteroides.....	124
5.7.7. Actividad N <sub>2</sub> OR en bacteroides .....	125
VI. Análisis estadísticos y programas bioinformáticos .....	125
6.1. Análisis estadísticos.....	125
6.2. Programas bioinformáticos.....	126
<b>RESULTS .....</b>	<b>127</b>
<b>Chapter 1: Copper modulates nitrous oxide emissions from soybean root nodules .....</b>	<b>129</b>
1.1. Abstract .....	131
1.2. Copper effect on plant physiology and nodulation .....	131
1.3. Copper effect on SNF by using the <sup>15</sup> N isotope dilution methodology.....	133
1.4. Copper accumulation in soybean plant organs .....	134
1.5. Copper effect on nitrous oxide emissions .....	135
1.6. Copper effect on denitrifying enzymes activity in the bacteroids from soybean nodules .....	137
Chapter 1: supplementary material.....	139
<b>Chapter 2: <i>Ensifer meliloti</i> denitrification is involved in infection effectiveness and N<sub>2</sub>O emissions by alfalfa root nodules .....</b>	<b>141</b>
2.1. Abstract .....	143
2.2. Bacterial strains.....	143
2.3. Periplasmic nitrate reductase has a role in infectivity and competitiveness for nodulation in alfalfa.....	143
2.4. Periplasmic nitrate reductase is involved in N <sub>2</sub> O emissions by alfalfa root nodules .....	145
2.5. Copper modulates N <sub>2</sub> O emissions by alfalfa nodules and bacteroidal nitrous oxide reductase activity.....	148
Chapter 2: supplementary material.....	151
<b>Chapter 3: Effect of copper on expression of functional genes and proteins associated with <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> denitrification .....</b>	<b>153</b>
3.1. Abstract .....	155

3.2. Bacterial strains.....	155
3.3. Cu effect on <i>B. diazoefficiens</i> 110spc4 growth under different oxygen conditions .....	155
3.4. Disparate response of denitrification gene expression to Cu .....	157
3.5. Influence of Cu on expression and activity of denitrification enzymes .....	161
3.6. Investigating the possible role of NosR in <i>nos</i> gene expression and Nos activity .....	167
Chapter 3: supplementary material.....	169
<b>Chapter 3.1: Role of the Cu response regulator CsoR in denitrification .....</b>	<b>173</b>
3.1.1. Abstract.....	175
3.1.2. Construction of a <i>csoR</i> deletion mutant strain.....	175
3.1.3. Growth of the <i>csoR</i> deletion mutant strain .....	179
3.1.4. Expression of denitrification genes in the <i>csoR</i> mutant strain .....	180
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>183</b>
El cobre modula las emisiones de óxido nítrico procedentes de nódulos de soja.....	185
La desnitrificación de <i>E. meliloti</i> está implicada en la efectividad de la infección y en las emisiones de N <sub>2</sub> O por nódulos de alfalfa.....	189
Efecto del Cu sobre la expresión de genes y proteínas funcionales asociados a la desnitrificación de <i>B. diazoefficiens</i> .....	192
Papel de CsoR en la expresión de los genes de la desnitrificación .....	199
<b>CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....</b>	<b>203</b>
Conclusiones.....	205
Conclusions.....	206
<b>REFERENCES .....</b>	<b>207</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>237</b>
Anexo I: Listado de abreviaturas, acrónimos, siglas y símbolos .....	239
Anexo II: Listado de especies mencionadas y sus abreviaturas.....	246
Anexo III: Índice de figuras .....	249
Anexo IV: Índice de tablas .....	252





# **RESUMEN/ SUMMARY**



## Resumen

El óxido nitroso ( $N_2O$ ) es uno de los principales gases de efecto invernadero de origen biológico. Su potencial para causar efectos relacionados con el calentamiento global es 296 veces superior al del  $CO_2$  de acuerdo a su capacidad radiativa, y es responsable del 6% del calentamiento global actual. En general, en el siglo pasado, la concentración de  $N_2O$  en la atmósfera incrementó un 25%, aumentando actualmente cerca de un 0,25% anual tras haber permanecido estable durante, al menos, 800.000 años. Según el informe especial del IPCC en 2019, las actividades humanas englobadas en el acrónimo AFOLU (en español, agricultura, silvicultura y otros usos del suelo) representaron el 81% de las emisiones antropogénicas de  $N_2O$  en el período 2007-2016 y, dentro de estas actividades, la agricultura representó, aproximadamente, el 95% de dichas emisiones. La razón principal de esta enorme contribución de la agricultura a la concentración atmosférica de  $N_2O$  es la intensificación de las prácticas agrícolas de fertilización química, que han resultado en un desbalance antropogénico severo del ciclo biogeoquímico global del nitrógeno (N).

En los suelos agrícolas, una gran diversidad de rutas biológicas se encuentra implicada en las emisiones de  $N_2O$ . Entre ellas, la nitrificación y la desnitrificación microbianas constituyen las principales fuentes microbianas de  $N_2O$  a la atmósfera.

Actualmente, se conoce que la liberación de  $N_2O$  por los suelos agrícolas consiste en un balance entre el  $N_2O$  emitido y consumido por los microorganismos del suelo, y su ecología y diversidad son cada vez más relevantes en las estrategias de mitigación. De hecho, la rizosfera de las plantas y su microbioma asociado se consideran el foco central del ciclo del N y de las emisiones de  $N_2O$  derivadas de la desnitrificación. Las leguminosas constituyen uno de los principales cultivos empleados en alimentación animal, en la obtención de proteína vegetal, y también en la transición agroecológica de los sistemas agroalimentarios, puesto que, al incrementar la fertilidad del suelo, representan una alternativa ecológica al uso de fertilizantes nitrogenados. Las leguminosas pueden establecer asociaciones simbióticas con bacterias del suelo colectivamente denominadas rizobios a través de la formación de unas estructuras en sus raíces, llamadas nódulos, en cuyo interior, estas bacterias se convierten en bacteroides, que son capaces de llevar a cabo la fijación simbiótica del  $N_2$  (SNF), a través de la cual, el  $N_2$  atmosférico se convierte en amonio ( $NH_4^+$ ), fácilmente asimilable por la planta. Sin embargo, los bacteroides de algunas especies de rizobios pueden también realizar el proceso de desnitrificación, necesario para poder sobrevivir en las condiciones restrictivas de oxígeno que se pueden dar en el suelo

o en el interior de los nódulos. Durante este proceso, el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) se convierten en nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ) mediante la formación de los intermediarios gaseosos óxido nítrico (NO) y  $\text{N}_2\text{O}$ .

La soja (*Glycine max* L.) establece simbiosis con su endosimbionte natural *Bradyrhizobium diazoefficiens*, que contiene todas las enzimas implicadas en la ruta de la desnitrificación: una nitrato reductasa periplásmica (Nap), una nitrito reductasa que contiene Cu (NirK), una óxido nítrico reductasa dependiente de citocromo *c* (cNor) y una óxido nitroso reductasa (Nos), codificadas por los genes *nap*, *nirK*, *nor* y *nos*, respectivamente.

El Cu es un micronutriente esencial para las plantas y, en general, para todos los organismos vivos. Las plantas requieren Cu para su crecimiento y desarrollo normal, y cuando no se encuentra biodisponible, desarrollan síntomas específicos de deficiencia, la mayoría de los cuales afectan a las hojas jóvenes y a los órganos reproductores. Sin embargo, las propiedades redox que hacen al Cu esencial también contribuyen a su inherente toxicidad. El ciclo redox entre los dos cationes de Cu ( $\text{Cu}^+$  y  $\text{Cu}^{2+}$ ) puede catalizar la producción de radicales hidroxilo altamente tóxicos, con el consiguiente daño a las células a nivel de lípidos, membranas, ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas. Aunque el Cu normalmente se une a las proteínas, su capacidad para iniciar daño oxidativo posibilita que pueda interferir con importantes procesos celulares, como la fotosíntesis, la síntesis de pigmentos, la permeabilidad de la membrana plasmática, y otros procesos metabólicos, causando una fuerte inhibición del desarrollo vegetal. El Cu en exceso puede ser extremadamente tóxico, provocando síntomas como clorosis y necrosis, o inhibición del crecimiento de las raíces y el tallo. Por consiguiente, tanto la deficiencia como el exceso de Cu pueden provocar desórdenes en el crecimiento y desarrollo de la planta.

Además del oxígeno y el NO, el cobre se perfila como un nuevo factor ambiental implicado en el control de la desnitrificación. De hecho, el requerimiento de Cu por parte de las enzimas NirK y Nos sugiere la implicación de este elemento en el metabolismo del NO y del  $\text{N}_2\text{O}$ . Un estudio transcriptómico global llevado a cabo por Sullivan y colaboradores (2013) reveló que la deficiencia de Cu no sólo afecta a la maduración funcional de la enzima Nos, sino que, además, ejerce un notable impacto sobre la expresión génica de los genes responsables de su síntesis en *Paracoccus denitrificans*. En otro estudio, Black y colaboradores (2016) confirmaron que existe un umbral óptimo de concentración de Cu que permite maximizar el consumo de  $\text{N}_2\text{O}$  en *Pseudomonas stutzeri*. Además,

señalaron que la biodisponibilidad de Cu podía influir tanto en la síntesis como en la actividad de las enzimas Nir y Nos, así como en la tasa de crecimiento de *P. stutzeri*, lo que implicaba que podía ser posible usar la estequiometría para reducir las emisiones de N<sub>2</sub>O en suelos.

Dada la relevancia a nivel mundial del cultivo de soja, y que *B. diazoefficiens* se considera el rizobio modelo en el estudio de la desnitrificación, en esta tesis se ha llevado a cabo un estudio acerca de la implicación del Cu en la modulación de las emisiones de N<sub>2</sub>O por nódulos generados por *B. diazoefficiens* en su simbiosis con plantas de soja. Los resultados obtenidos indicaban que tanto la simbiosis como la fisiología de la planta podían verse afectadas por un exceso de Cu añadido, siendo 20 µM el umbral de Cu que la soja podía tolerar sin sufrir estrés por Cu. Respecto a las emisiones de N<sub>2</sub>O, la acumulación de Cu en los nódulos fue responsable de la reducción del N<sub>2</sub>O liberado por nódulos de soja, lo que se debía principalmente al efecto del Cu sobre las actividades de las enzimas de la desnitrificación, especialmente el descenso simultáneo de las actividades de las enzimas Nap y NirK y el aumento de la actividad de la enzima Nos. Finalmente, se propone que la actividad de Nap puede resultar una diana alternativa probablemente más efectiva que la modulación de la actividad de Nos en las estrategias de mitigación del N<sub>2</sub>O liberado por cultivos de soja inoculados con *B. diazoefficiens*.

A este respecto, Torres y colaboradores (2018) demostraron previamente que la Nap de *Ensifer meliloti* estaba implicada en la emisión de N<sub>2</sub>O por cultivos de vida libre, y que existía una limitación en la expresión de los genes *nap* en este microorganismo que lo incapacitaba para crecer a expensas de la desnitrificación en condiciones anóxicas (Torres *et al.*, 2014b), a pesar de contener todos los genes de la desnitrificación, al igual que *B. diazoefficiens*. La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es el cultivo forrajero más importante a nivel mundial y, en España, constituye el cultivo forrajero de mayor relevancia productiva y económica. Sin embargo, al comienzo de esta Tesis se desconocía si los nódulos producidos en la asociación simbiótica entre las plantas de alfalfa y *E. meliloti* eran capaces de producir N<sub>2</sub>O. En esta tesis, se demuestra por primera vez la capacidad de los nódulos de alfalfa de producir N<sub>2</sub>O en respuesta a nitrato y encharcamiento. Además, se evidencia el papel de Nap tanto en competitividad en nodulación como en las emisiones de N<sub>2</sub>O por plantas noduladas de alfalfa. Asimismo, se demuestra que un aumento en la disponibilidad de Cu ocasiona un descenso en la producción de N<sub>2</sub>O probablemente debido a la inducción de la actividad Nos de los bacteroides, por lo que la modulación de esta enzima

se propone como una estrategia a tener en cuenta para reducir los niveles de N<sub>2</sub>O liberados por los cultivos de alfalfa.

Aunque en el grupo de Metabolismo del Nitrógeno en Bacterias Rizosféricas (GMNBR, EEZ-CSIC) se ha avanzado considerablemente en el estudio del control de la desnitrificación en respuesta a condiciones limitantes de oxígeno y presencia de óxidos de nitrógeno (revisado por Salas *et al.*, 2021), al comienzo de esta tesis, se desconocía la influencia del Cu en el proceso de desnitrificación en rizobios. Por ello, se consideró interesante abordar este estudio en el rizobio modelo *B. diazoefficiens* en vida libre. Así, se planteó un estudio integrado en el que se investigó cómo afectaba el Cu a la expresión de los genes de la desnitrificación, así como a la expresión y actividad de las enzimas que codificaban. En síntesis, se demuestra en esta tesis, por primera vez, el papel del Cu en el control transcripcional y postranscripcional de la desnitrificación en *B. diazoefficiens*.

Adicionalmente, durante el desarrollo de dicho estudio, se identificó en el genoma de *B. diazoefficiens* un gen con elevada homología a un represor en respuesta a Cu de la familia CsoR. A continuación, se investigó la posible implicación de CsoR en la regulación de la desnitrificación en *B. diazoefficiens*. Para ello, se construyó una cepa mutante por delección en el gen *csoR* (denotada como  $\Delta csoR$ ), y se llevaron a cabo estudios de expresión génica. Los resultados sugieren que CsoR podría jugar un posible papel en el control mediado por Cu de la expresión de *nirK* y *nor*.

En resumen, el efecto del Cu sobre la emisión del gas de efecto invernadero N<sub>2</sub>O por los nódulos de plantas de soja y alfalfa, así como la implicación de la desnitrificación de sus respectivos endosimbiontes constituyen el foco central en esta Tesis. Además, también se incrementa el conocimiento relacionado con el control de la desnitrificación en el rizobio modelo *B. diazoefficiens*. Dicho conocimiento nos ha permitido proponer al Cu como otro factor esencial en el control de la desnitrificación tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. La participación del regulador CsoR en la respuesta a Cu en este control se propone como perspectiva futura de investigación. En conclusión, el conocimiento generado en esta Tesis es clave para diseñar estrategias que permitan reducir las emisiones de N<sub>2</sub>O de cultivos agrícolas y, más concretamente, de leguminosas.

## Summary

Nitrous oxide ( $\text{N}_2\text{O}$ ) is one of the main biogenic greenhouse gases with a global warming potential 296-fold greater than that of  $\text{CO}_2$  due to its radiative forcing and is responsible for the 6% of current global warming. Generally, over the last century, the atmospheric concentration of  $\text{N}_2\text{O}$  has increased by roughly 25% and it further increases currently by about 0.25% per year after having remained stable for at least 800,000 years. During the period 2007-2016, AFOLU (Agriculture, Forestry and Other Land Use) human activities represented 81% of the anthropogenic emissions of  $\text{N}_2\text{O}$ , and agriculture was responsible for the 95% of these emissions, according to the special IPCC report in 2019. The main reason for the great contribution of agriculture to the rising  $\text{N}_2\text{O}$  concentration is the drastic intensification of agricultural fertilization practices that has resulted in a severe anthropogenic imbalance of the global biogeochemical nitrogen (N) cycle.

Several biological pathways occurring in agricultural soils are involved in  $\text{N}_2\text{O}$  emissions. Among all of them, nitrification and denitrification are the main microbial  $\text{N}_2\text{O}$  sources.

Nowadays, it is known that  $\text{N}_2\text{O}$  release from agricultural soils is a balance between the  $\text{N}_2\text{O}$  emitted and the  $\text{N}_2\text{O}$  consumed by soil microorganisms, and their ecology and biodiversity are getting more relevance for mitigation strategies. Indeed, the rhizosphere of plants and their associated microbiome are considered one of the main hotspot for the N-cycle and  $\text{N}_2\text{O}$  emissions derived from denitrification. Legumes are one of the main worldwide crops used for providing animal feed, vegetable protein and, also for the agroecological transition to sustainable agrifood systems, where they can be an environmental-friendly alternative to N fertilizers by increasing soil fertility. Legumes can establish symbiotic associations with soil bacteria, collectively termed as rhizobia, through the formation of certain organs in their roots, called nodules. Once nodules are formed, rhizobia differentiate into bacteroids inside the nodules, acquiring the capacity of the symbiotic  $\text{N}_2$  fixation (SNF), where atmospheric  $\text{N}_2$  is converted into ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), which plants can assimilate easily. However, bacteroids from certain rhizobia species also perform another process called denitrification, which allow them to survive in the restrictive oxygen conditions found in the soil or inside the nodules. During this process, nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) or nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) is converted into molecular nitrogen ( $\text{N}_2$ ) through the formation of the gaseous intermediates nitric oxide (NO) and  $\text{N}_2\text{O}$ .



Soybean plants (*Glycine max* L.) establish symbiosis with its natural endosymbiont *Bradyrhizobium diazoefficiens*, which contains all the enzymes involved in the denitrification process: a periplasmic nitrate reductase (Nap), a Cu-containing nitrite reductase (NirK), a *c*-type cytochrome-dependent nitric oxide reductase (cNor) and a nitrous oxide reductase (Nos), encoded by *nap*, *nirK*, *nor* and *nos* genes, respectively.

Copper (Cu) is an essential micronutrient for plants as well as for all living organisms. Plants require Cu for normal growth and development, and when this ion is not available, plants develop specific deficiency symptoms, most of which affect young leaves and reproductive organs. Nevertheless, the redox properties that make Cu an essential element also contribute to its inherent toxicity. Redox cycling between the two Cu cations ( $\text{Cu}^+$  and  $\text{Cu}^{2+}$ ) can catalyze the production of highly toxic hydroxyl radicals, with subsequent damage to cells at the level of lipids, membranes, nucleic acids, proteins and other biomolecules. Although Cu usually binds to proteins, it has capacity to initiate oxidative damage and interfere with important cellular processes such as photosynthesis, pigment synthesis, plasma membrane permeability and other metabolic mechanisms, causing a strong inhibition of plant development. Cu in excess can become extremely toxic causing symptoms such as chlorosis and necrosis, and inhibition of root and shoot growth. Therefore, either Cu deficiency or excess can cause disorders in plant growth and development.

Apart from oxygen and NO, Cu is arising as a new environmental factor involved in the control of denitrification. In fact, Cu requirement by NirK and Nos enzymes suggest the participation of this element in the metabolism of NO and  $\text{N}_2\text{O}$ . A global transcriptomic study carried out by Sullivan and colleagues (2013) revealed that Cu deficiency does not only affect functional maturation of Nos, but it has also an important impact on gene expression in *Paracoccus denitrificans*. In another study, Black and colleagues (2016) confirmed that an optimal Cu concentration threshold exists for *Pseudomonas stutzeri*, allowing to maximize  $\text{N}_2\text{O}$  consumption. Moreover, they pointed out that Cu bioavailability can influence the expression and activity of Nir and Nos, as well as the growth rates of *P. stutzeri*, and implied that it may be possible to use stoichiometry to manage  $\text{N}_2\text{O}$  emissions from agricultural soils.

Taking into account the global importance of soybean cultures and that *B. diazoefficiens* is considered the model rhizobium in the study of denitrification, in the present thesis we have carried out a research about the involvement of Cu in the modulation of

N<sub>2</sub>O emissions by nodules formed during the symbiosis between *B. diazoefficiens* and soybean plants. The results obtained indicated that Cu excess could affect plant physiology and symbiosis. Furthermore, 20 µM was the Cu threshold that soybean plants could tolerate without suffering Cu stress. Concerning N<sub>2</sub>O emissions, Cu accumulation in nodules was responsible for the decrease of N<sub>2</sub>O release emitted by soybean nodules and this reduction was mainly due to the effect of Cu on denitrifying enzymes activities, especially the simultaneous decrease of Nap and NirK activities, and the increase of Nos activity. Finally, Nap can be proposed as an alternative target for the strategies of the mitigation of N<sub>2</sub>O emissions derived from soybean crops inoculated with *B. diazoefficiens*, probably more effective than Nos activity modulation.

In this regard, Torres and colleagues (2018) demonstrated previously that the Nap of *Ensifer meliloti* was involved in N<sub>2</sub>O emissions by free-living cultures. Additionally, a limitation in *nap* genes was responsible for the incapacity of this bacterium to grow anaerobically through denitrification (Torres *et al.*, 2014b), despite of containing all the denitrification genes, as it occurs in *B. diazoefficiens*. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is the most important forage legume worldwide, and represents the most extensive, productive and profitable forage crop in Spain. However, at the beginning of this Doctoral Thesis, the capacity of alfalfa nodules elicited by *E. meliloti* to produce N<sub>2</sub>O was still unknown. In the present thesis, it has been demonstrated for the first time the capacity of alfalfa nodules to produce N<sub>2</sub>O in response to nitrate and flooding. In addition, the involvement of *nap* genes expression in nodulation competitiveness as well as in N<sub>2</sub>O emissions has also been highlighted. Moreover, it has also been demonstrated that an increase in Cu availability triggers a decrease in N<sub>2</sub>O production probably due to an induction of bacteroidal Nos activity. Therefore, we propose the modulation of the bacteroidal Nos as an effective target for the mitigation strategies of N<sub>2</sub>O emissions derived from alfalfa crops.

Although the study in denitrification control in response to oxygen-limiting conditions and nitrogen-derived oxides has reached a great advance in the GMNBR (reviewed by Salas *et al.*, 2021), at the beginning of this Doctoral Thesis, the influence of Cu on denitrification by rhizobia was yet unknown. Consequently, we considered of interest to investigate this issue in the model rhizobium *B. diazoefficiens* under free-living conditions. Thus, an integrated study in which we analyzed the effect of Cu on denitrification genes expression, as well as on expression and activities of denitrification enzymes, was performed. In summary, in this thesis, it has been demonstrated for the first

time the role of Cu in the transcriptional and post-transcriptional control of *B. diazoefficiens* denitrification.

In addition, during the development of that integrative study, a search of the *B. diazoefficiens* genome revealed the presence of a putative gene encoding a Cu-responsive repressor from the CsoR family. Then, the possible involvement of CsoR in the regulation of denitrification in *B. diazoefficiens* was investigated. For this purpose, a mutant strain was constructed by deletion of the *csoR* gene. This strain, denoted as  $\Delta csoR$ , was used in gene expression studies. The results suggest that CsoR may play a possible role in the Cu-mediated control of *nirK* and *nor* expression.

In summary, Cu effect on the greenhouse gas N<sub>2</sub>O emissions by soybean and alfalfa nodules, as well as the involvement of denitrification of their respective endosymbionts, represent the central subject of this Thesis. Furthermore, the understanding about the control of denitrification in the model rhizobium *B. diazoefficiens* is also developed. This knowledge has allowed us to propose Cu as another essential factor in denitrification control at both transcriptional and post-transcriptional levels. The involvement of the CsoR regulator in this control is suggested as future research perspectives. To conclude, the knowledge provided by this Thesis is a key to design efficient strategies to reduce N<sub>2</sub>O emissions from crops and, more specifically, from legumes.

# INTRODUCCIÓN



## I. Papel del N<sub>2</sub>O en el cambio climático

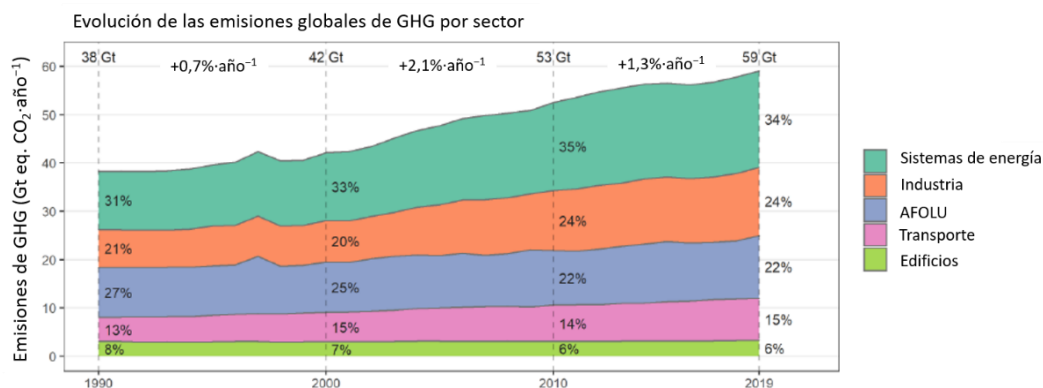
La radiación del Sol es la fuente de energía de la Tierra que dirige el clima global, abarcando un amplio espectro. Cerca de la mitad de la radiación solar se localiza en el espectro visible (*i.e.*, 400-700 nm, espectro electromagnético de onda corta), y la otra parte se encuentra repartida entre la zona alta de energía (radiación ultravioleta, UV) y la zona baja (radiación infrarroja, IR). (Le Treut *et al.*, 2007). Cerca del 31% de esta energía solar se refleja de vuelta al espacio por las nubes, los aerosoles, los gases atmosféricos, y la superficie de la Tierra. Esta fracción de la energía total se conoce como albedo y está influida por las condiciones de la superficie, como nieve, hielo, proporción de tierra y mar, tipo de vegetación, y otros factores de superficie. También se ve afectada por las condiciones atmosféricas, que incluyen la cubierta nubosa y la longitud de onda de la energía solar recibida (Pinty *et al.*, 2008). Por consiguiente, el albedo total es altamente variable de un lugar a otro. Según Sellers y colaboradores (1997), la energía restante ( $235 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ ) se absorbe por la superficie de la Tierra-tanto tierra como océano ( $168 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ )-y, en menor parte, por la atmósfera ( $67 \text{ W m}^{-2}$ ). La energía absorbida por la capa de vegetación conduce procesos como la evapotranspiración, la fotosíntesis, y la asimilación de carbono, mientras que el resto de la radiación, absorbida por el suelo subyacente controla la evaporación, la fusión de la nieve, y otros procesos relacionados con la temperatura (Sellers *et al.*, 1997).

Para mantener el balance energético en un clima estable, la Tierra debe radiar al espacio cerca de la misma cantidad de energía ( $235 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ ). Sin embargo, la Tierra se calienta y radia en torno al 114% de la radiación solar en forma de ondas largas, principalmente, radiación IR (*i.e.*, calor radiante). La atmósfera absorbe la mayor parte de esta radiación térmica, radiándola de vuelta a la Tierra, lo que causa un calentamiento mayor que si la radiación solar directa fuera la única fuente de energía. Como resultado, la temperatura global de la superficie de la Tierra es de 14 °C, 33 °C más alta de la esperada. Este proceso se conoce como efecto invernadero natural (Le Treut *et al.*, 2007).

Los gases de efecto invernadero (GHG, del inglés, *greenhouse gases*), también conocidos como gases traza, ocupan menos del 1% del volumen total del aire seco en la atmósfera, pero ejercen un papel importante en el balance energético de la Tierra, absorbiendo y emitiendo de vuelta radiación IR emitida por la superficie de la Tierra, previniendo que escape al espacio. Fundamentalmente, estos gases son vapor de agua (H<sub>2</sub>O), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) y ozono (O<sub>3</sub>).

Además de estos, existen otros GHGs, como los hidrofluorocarbonos (HFCs), los perfluorocarbonos (PFCs), los clorofluorocarbonos (CFCs), los hexafluoruros de azufre ( $\text{SF}_6$ ) o los trifluoruros de nitrógeno ( $\text{NF}_3$ ), generados por una amplia variedad de procesos industriales (Le Treut *et al.*, 2007).

Las concentraciones atmosféricas de GHGs han cambiado de forma natural a lo largo de la historia de la Tierra. Sin embargo, las actividades humanas en la era postindustrial han causado un aumento drástico en la emisión de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ , y  $\text{N}_2\text{O}$ , considerados como gases con alto potencial de calentamiento global y cuyo origen también puede ser biológico (Baede *et al.*, 2001). Concretamente, de acuerdo al informe de 2022 del Panel Internacional del Cambio Climático (IPCC, del inglés, *International Panel on Climate Change*) (<https://www.ipcc.ch/reports/ar6>), desglosando en % la contribución de los diferentes sectores económicos en 2019, el 34% de las emisiones de GHGs procedieron del sector de la energía, el 24% de la industria, el 22% de las actividades humanas englobadas en el acrónimo AFOLU (del inglés, *Agriculture, Forestry and Other Land Use*), el 15% del transporte, y el 6% de los edificios (Figura 1). De acuerdo también a dicho informe, diferentes actividades emiten distintas combinaciones de gases. Generalmente, la mayor fuente de  $\text{CO}_2$  es la quema de combustibles fósiles en sistemas de conversión de energía tales como calentadores de centrales eléctricas, motores de aviones y automóviles, y cocina y calefacción en hogares y negocios, lo que supone en total, aproximadamente, el 64% de las emisiones. Los combustibles fósiles representan asimismo una fuente principal de  $\text{CH}_4$ , el segundo gas de los mayores contribuidores al calentamiento global. Mientras que la mayoría de las emisiones de GHGs proceden de la quema de combustibles fósiles, en torno a 1/4 de ellas proceden de actividades relacionadas con el suelo, como la agricultura (principalmente,  $\text{CH}_4$  y  $\text{N}_2\text{O}$ ) y la deforestación (mayormente  $\text{CO}_2$ ), con emisiones adicionales provenientes de procesos industriales (sobre todo,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  y gases fluorados (HFCs, PFCs, etc.) y de los residuos y aguas residuales municipales ( $\text{CH}_4$  en su mayor parte) (IPCC, 2022). Todos estos compuestos constituyen los GHGs más potentes al presentar una gran capacidad para atrapar el calor, y algunos de ellos poseen tiempos de vida en la atmósfera extremadamente largos, por lo que, una vez emitidos, pueden permanecer en la atmósfera durante siglos, haciendo prácticamente irreversible su acumulación (Forster *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Evolución de las emisiones globales de GHG por sector a lo largo de las tres últimas décadas. Adaptada del IPCC de 2022 (*Mitigation of Climate Change. Summary for Policymakers*).

El N<sub>2</sub>O (conocido tradicionalmente como gas de la risa) es el gas nitrogenado de efecto invernadero dominante en la Tierra. Su potencial para causar efectos relacionados con el calentamiento global es 296 veces superior al del CO<sub>2</sub> de acuerdo a su capacidad radiativa, y es responsable del 6% del calentamiento global actual (Erisman *et al.*, 2011, 2015; IPCC, 2019). Su vida media en la atmósfera es de 120-150 años, lo que hace posible su transporte a la estratosfera, donde se convierte a óxido nítrico (NO) por fotólisis, el cual reacciona con el O<sub>3</sub>, generando dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), el cual reacciona, a su vez, con el agua, produciendo ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) que, al disolverse en el agua de lluvia, ocasiona la llamada lluvia ácida, que contamina los suelos, el agua y los sedimentos (Erisman *et al.*, 2015). Las emisiones globales de estos óxidos derivados del nitrógeno (NO<sub>x</sub>), NO y NO<sub>2</sub>, junto con el amoníaco (NH<sub>3</sub>), se han triplicado desde la era preindustrial. Dado que las reacciones químicas del NO y el NO<sub>2</sub> en la atmósfera son relativamente lentas, éstos pueden dispersarse y depositarse más ampliamente que el NH<sub>3</sub>, y, de esta manera, estos tres gases pueden llegar a tasas de acumulación que superan sobradamente los niveles naturales en amplias regiones del mundo. Estos gases, además, forman en la atmósfera O<sub>3</sub> troposférico y materia particulada (*i.e.*, nitrato y sulfato amónicos) al reaccionar con ácidos nítricos y sulfúricos. Todo ello ocasiona la eutrofización y acidificación de hábitats terrestres y acuáticos, como ríos, lagos, reservorios de agua dulce y zonas costeras, causando el deterioro de las condiciones medioambientales naturales, lo que impide la utilización de estos recursos por los humanos (Payne *et al.*, 2013). Además, los protones (H<sup>+</sup>) de la lluvia ácida pueden arrastrar algunos iones del suelo, como hierro (Fe), calcio (Ca), aluminio (Al), plomo (Pb), zinc (Zn), etc., y como consecuencia, pueden empobrecer el suelo en nutrientes esenciales para el crecimiento vegetal, aparte de causar pérdidas de biodiversidad,



cambios en las comunidades ecológicas y alteraciones en la cadena alimentaria (Erisman *et al.*, 2015). Todo ello hace del N<sub>2</sub>O un factor relevante no sólo en el clima global y en la química del O<sub>3</sub> atmosférico (Ussiri y Lal, 2013), sino también en la degradación medioambiental y de la salud humana (Erisman *et al.*, 2015), siendo necesario incrementar el conocimiento acerca de su evolución global en la atmósfera, así como de sus fuentes y sumideros, para controlar y mitigar su emisión.

## II. El N<sub>2</sub>O en la agricultura

### 2.1. La agricultura como principal sector de emisión antropogénica de N<sub>2</sub>O

El análisis de núcleos de hielo polar para determinar las concentraciones atmosféricas de N<sub>2</sub>O proporciona información acerca de sus emisiones anuales y ayuda a identificar el papel de las actividades humanas en el ciclo global del N y en la distribución global del N<sub>2</sub>O. Todas las fuentes conocidas de N<sub>2</sub>O se encuentran en la superficie de la Tierra. Las fuentes naturales de N<sub>2</sub>O son los procesos microbianos que se dan en los suelos terrestres y en los océanos. En la era preindustrial, la emisión y eliminación de N<sub>2</sub>O de la atmósfera se encontraban cerca del equilibrio, por lo que su concentración en la atmósfera permaneció prácticamente constante (Forster *et al.*, 2007). La industrialización a finales del siglo XIX causó cambios notables en la agricultura y la urbanización. El crecimiento económico aumentó la demanda de alimentos, induciendo la mecanización de la agricultura y un incremento en la producción de carne y leche. La transformación de la agricultura en Europa y América del Norte produjo una rápida intensificación en el uso de la fijación biológica de N y de abono animal, lo que aumentó las emisiones de N<sub>2</sub>O por los cultivos y los sistemas de explotación ganadera. Entre 1850 y 1950, la tasa anual de emisión de N<sub>2</sub>O a la atmósfera creció lentamente, pero se mantuvo de manera persistente en torno a las 0,1-0,2 partes por billón volumen (ppbv, nmol·mol<sup>-1</sup>), llegando rápidamente a 0,7 ppbv en los años 90 (MacFarling-Meure *et al.*, 2006). En general, en el siglo pasado, la concentración de N<sub>2</sub>O en la atmósfera incrementó un 25%, aumentando actualmente cerca de un 0,25% anual tras haber permanecido estable durante, al menos, 800.000 años (Rockström *et al.*, 2009).

Según el informe especial del IPCC de 2019, las actividades humanas englobadas en el acrónimo AFOLU representaron el 81% de las emisiones antropogénicas de N<sub>2</sub>O en el período 2007-2016 y, dentro de estas actividades, la agricultura representó, aproximadamente, el 95% de dichas emisiones. Generalmente, 2/3 de las emisiones antropogénicas globales de N<sub>2</sub>O proceden de la agricultura, siendo la principal

responsable de la tendencia ascendente de la concentración de  $N_2O$  en la atmósfera (IPCC, 2019). La razón principal de esta enorme contribución de la agricultura a la concentración atmosférica de  $N_2O$ , y del drástico incremento de este gas en la atmósfera mencionado anteriormente, es la intensificación de las prácticas agrícolas de fertilización, que han resultado en un desbalance antropogénico severo del ciclo biogeoquímico global del nitrógeno (N) (Steffen *et al.*, 2015; Kanter *et al.*, 2016). Todo esto fue posible después de la invención de la fijación de N artificial (*i.e.*, el proceso Haber-Bosch), en torno a 1913, que permitió la aplicación expansiva de fertilizantes de N sintéticos (Erisman *et al.*, 2008). Los últimos datos de la FAO (del inglés, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 2021) reflejan un aumento del 40% en el uso global de fertilizantes nitrogenados entre 2002 y 2020, lo que se correlaciona con el asociado incremento de las emisiones de  $N_2O$ . De hecho, la agricultura, junto con la ganadería, son las principales actividades humanas que contribuyen a las emisiones de  $N_2O$  de origen antropogénico, relegando la contribución de otras como la quema de combustibles fósiles o de biomasa, o el tratamiento de aguas residuales (Rockström *et al.*, 2009; Steffen *et al.*, 2015).

Debido a la clara evidencia que existe acerca del efecto perjudicial del  $N_2O$  atmosférico en el clima global, las estrategias de mitigación de las emisiones de  $N_2O$  que se pretenden aplicar a las prácticas agrícolas intensivas han de perseguir un incremento en la eficiencia agrícola al mismo tiempo que un descenso en los niveles actuales de producción de  $N_2O$ , en particular, en un contexto de crecimiento continuo de la población (Richardson *et al.*, 2009; Thomson *et al.*, 2012). En este contexto, las estrategias que pueden adoptarse incluyen:

i. Gestión tanto de la química como de la microbiología del suelo para asegurar que los procesos que liberan  $N_2O$ , como es el caso de la desnitrificación, se completen hasta la liberación de nitrógeno molecular ( $N_2$ ).

ii. Reducción de la dependencia de fertilizantes a través de cultivos mejorados por ingeniería genética para fijar  $N_2$  por ellos mismos o, alternativamente, a través de la aplicación de bacterias fijadoras de  $N_2$ .

iii. Promoción de la agricultura sostenible, *i.e.*, producir mayor biomasa en el mismo terreno, reduciendo de esta manera los impactos ambientales negativos de la agricultura extensiva.

iv. Incremento del conocimiento sobre los factores ambientales y reguladores que contribuyen a la generación y consumo biológicos de  $N_2O$ .

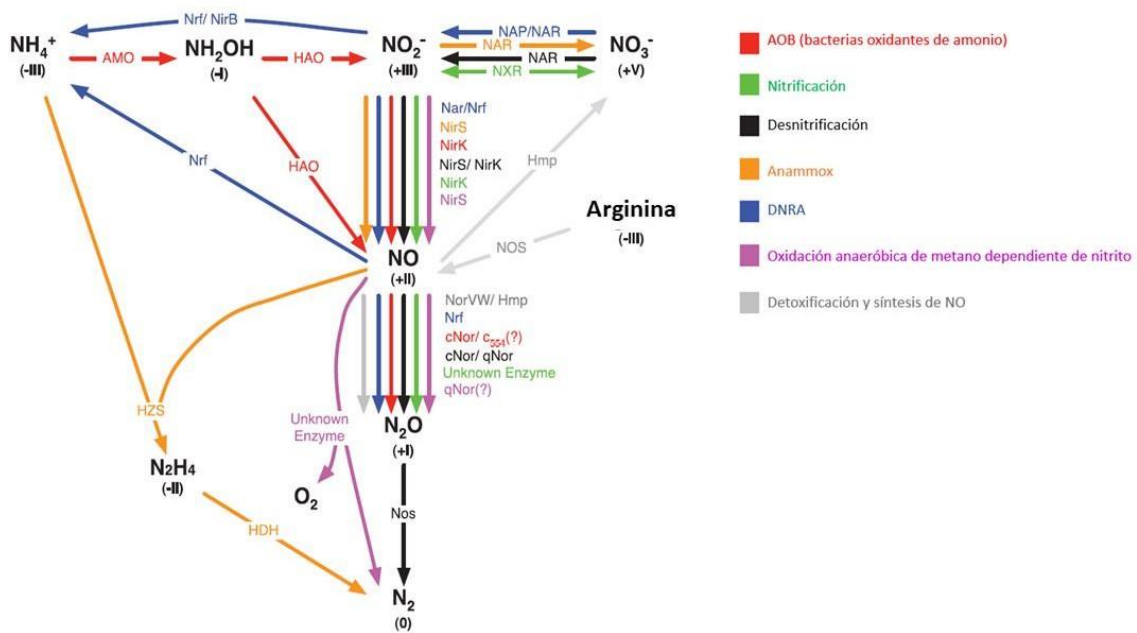
## **2.2. Fuentes biológicas de $N_2O$**

El  $N_2$  está presente en la atmósfera en un 78,08% (v/v), y posee uno de los enlaces químicos más estables, el triple enlace. Debido a la barrera de alta energía que presenta, su ruptura requiere de catalizadores efectivos o enzimas altamente eficientes. Sin embargo, todos los seres vivos requieren N para sintetizar aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, y otros cofactores adicionales. El N total combinado con la materia orgánica procede originalmente de la atmósfera, a donde regresa en forma de gas  $N_2$ . A través del ciclo del N, éste transita por todos sus estados redox accesibles, desde el más reducido, -3, en el  $NH_4^+$ , hasta el más oxidado, +5, en el anión  $NO_3^-$ . Además, a lo largo del ciclo, se generan especies de los estados de oxidación intermedios, como el nitrito ( $NO_2^-$ ) (+3), el NO (+2) o el  $N_2O$  (+1) (Thomson *et al.*, 2012) (Figura 2).

El  $N_2O$  se produce por numerosos procesos biológicos, aunque también existen procesos abióticos que generan  $N_2O$ . La siguiente lista engloba resumidamente los procesos que contribuyen a los flujos de  $N_2O$  en los suelos agrícolas (Butterbach-Bahl *et al.*, 2013):

- ✓ Descomposición química de la hidroxilamina ( $NH_2OH$ ) durante la nitrificación autótrofa y heterótrofa
- ✓ Quimio-desnitrificación del  $NO_2^-$  del suelo y descomposición abiótica del nitrato de amonio en presencia de luz, humedad y superficies reactivas
- ✓ Desnitrificación nitrificante por los microorganismos nitrificantes
- ✓ Acoplamiento de nitrificación y desnitrificación por distintos microorganismos (producción de  $NO_3^-$  por oxidantes del N, el cual es inmediatamente desnitrificado *in situ* por los desnitrificantes)
- ✓ Desnitrificación por organismos capaces de usar óxidos nitrogenados como aceptores alternativos de electrones en condiciones medioambientales de limitación de oxígeno ( $O_2$ )
- ✓ Desnitrificación conjunta de NO y compuestos orgánicos de N
- ✓ Amonificación de  $NO_3^-$  o reducción no asimilativa de  $NO_3^-$  a  $NH_4^+$  (DNRA, del inglés, *dissimilatory nitrate reduction to ammonium*)

La oxidación del amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) es un proceso aeróbico productor de energía en el que éste se oxida a  $\text{NO}_2^-$  a través del intermediario  $\text{NH}_2\text{OH}$  (Figura 2). Aunque la oxidación abiótica de la  $\text{NH}_2\text{OH}$  produce también  $\text{N}_2\text{O}$  (Heil *et al.*, 2016), se ha demostrado que la oxidación del  $\text{NH}_4^+$  acoplada a la reducción enzimática del  $\text{NO}_2^-$  y del  $\text{NO}$  (*i.e.*, desnitrificación nitrificante) es la principal ruta que emite  $\text{N}_2\text{O}$  durante la oxidación del  $\text{NH}_4^+$  (Kool *et al.*, 2011). Estudios recientes indican que las arqueas oxidantes de  $\text{NH}_4^+$  generan  $\text{N}_2\text{O}$  a través de una reacción espontánea entre  $\text{NH}_2\text{OH}$  y  $\text{NO}$  aunque, probablemente, produzcan menos  $\text{N}_2\text{O}$  en comparación con las bacterias oxidantes de  $\text{NH}_4^+$  (Kozłowski *et al.*, 2016; Hink *et al.*, 2017). Durante la amonificación respiratoria o DNRA, los aniones  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  se reducen a  $\text{NH}_4^+$ , con la formación concomitante de pequeñas cantidades de  $\text{N}_2\text{O}$  (Streminska *et al.*, 2012) (Figura 2). Cuando la célula detoxifica  $\text{NO}$ , también se produce  $\text{N}_2\text{O}$  (Spiro, 2012). Algunas bacterias que llevan a cabo la DNRA, también pueden unir la conservación de la energía a la reducción de  $\text{N}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2$  (Simon y Klotz, 2013). La contribución de la DNRA a los flujos totales de  $\text{N}_2\text{O}$  es incierta, aunque la mayoría de las evidencias sugieren que se trate de una contribución marginal en comparación con la desnitrificación y la oxidación del  $\text{NH}_4^+$  (Kool *et al.*, 2011; Rütting *et al.*, 2011). El  $\text{NO}_2^-$  también reacciona químicamente con el ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), originando  $\text{NO}$ , que consecutivamente reacciona con el  $\text{Fe}^{2+}$ , formando  $\text{N}_2\text{O}$ , y este proceso de quimio-desnitrificación puede contribuir de manera relevante a la generación de  $\text{N}_2\text{O}$  en ambientes donde habitan microorganismos activos reductores de ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Por último, parece ser que las bacterias oxidantes de  $\text{CH}_4$ , las oxidantes de  $\text{NO}_2^-$  y las anaeróbicas oxidantes de  $\text{NH}_4^+$  y de  $\text{CH}_4$  también producen  $\text{N}_2\text{O}$  (Stein y Klotz, 2011; Schreiber *et al.*, 2012; Butterbach-Bahl *et al.*, 2013), pero su contribución aún no está clara. No obstante, la mayor parte del  $\text{N}_2\text{O}$  emitido a la atmósfera (más del 65%) se atribuye a la desnitrificación y a la oxidación del  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_2^-$ , que constituye la primera etapa de la nitrificación (Thomson *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2016).



**Figura 2.** Rutas biológicas relacionadas con los flujos de NO y N<sub>2</sub>O del ciclo del N. Adaptada de Schreiber *et al.* (2012).

### 2.3. Nitrificación

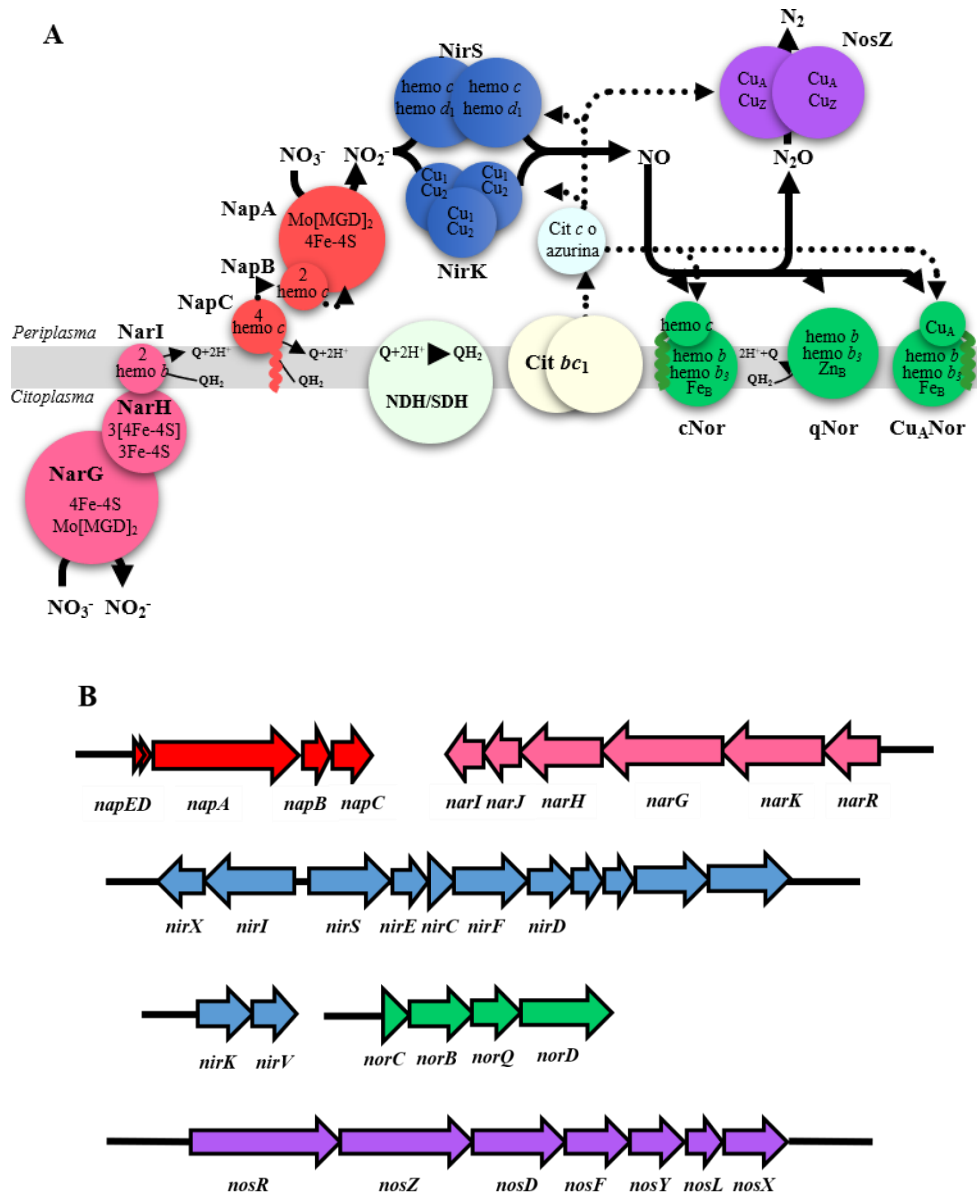
El  $\text{NH}_4^+$  puede oxidarse a  $\text{NO}_3^-$  a través de un proceso llamado nitrificación, que genera  $\text{NH}_2\text{OH}$  y  $\text{NO}_2^-$  como intermediarios. Este proceso está conformado por dos etapas: oxidación de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_2^-$  y, subsecuentemente, la oxidación de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$  (Figura 2). Los aniones  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  generados por este proceso pueden entonces reducirse por DNRA o desnitrificación. Durante esta etapa, se puede liberar  $\text{N}_2\text{O}$  como subproducto (Thomson *et al.*, 2012). En la ruta de la desnitrificación, NO y N<sub>2</sub>O son intermediarios obligados, mientras que, en la nitrificación, son subproductos, y se ha sugerido que operan en condiciones subóptimas para la oxidación posterior a  $\text{NO}_3^-$  (Baggs, 2008). Ambos procesos tienen lugar en las mismas microzonas del suelo, pero incluso haciendo uso de las tecnologías modernas, como marcaje isotópico, microelectrodos o análisis molecular, es complicado elucidar al detalle las rutas biológicas responsables de la producción de NO y N<sub>2</sub>O en diferentes condiciones (Schreiber *et al.*, 2012). Generalmente, las emisiones de NO se asocian a condiciones nitrificantes, y las de N<sub>2</sub>O, a condiciones desnitrificantes (Fowler *et al.*, 2015). La nitrificación tiene lugar en todos los suelos y sistemas acuosos, e implica a una amplia gama de microorganismos. En los suelos, la oxidación del  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_2^-$  ocurre principalmente gracias a la actividad de bacterias oxidantes del  $\text{NH}_4^+$  (AOB, del inglés, *ammonium-oxidizing bacteria*), principalmente pertenecientes al género *Nitrosomonas*, y

de arqueas oxidantes del  $\text{NH}_4^+$  (AOA, del inglés, *ammonium-oxidizing archaea*), mientras que la siguiente etapa, la conversión de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$ , la lleva a cabo mayormente el género *Nitrobacter*. No obstante, algunos organismos heterótrofos pueden llevar a cabo la nitrificación en los suelos, pero a unas tasas mucho más bajas que las bacterias autótrofas de los dos géneros mencionados; las bacterias heterótrofas pueden contribuir a la nitrificación en condiciones medioambientales adversas, como las que se dan en suelos ácidos (Sahrawat, 2008; Tzanakakis *et al.*, 2022). Recientemente, se ha identificado una nueva especie oxidante de  $\text{NH}_4^+$  (denominada "comammox") dentro del género *Nitrospira* capaz de oxidar el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Daims *et al.*, 2015). Esta nueva especie también desempeña un papel activo en la nitrificación en suelos agrícolas (Li *et al.*, 2019).

#### **2.4. Desnitrificación**

La desnitrificación es un proceso microbiano heterótrofo en el que el  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NO}_2^-$  se reducen gradualmente a  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2$ , generando  $\text{NO}$  como intermediario (Zumft, 1997). Este proceso, llevado a cabo por bacterias, arqueas y hongos (Takaya, 2002; Treusch *et al.*, 2005; Prendergast-Miller *et al.*, 2011), emplea compuestos nitrogenados oxidados, como el  $\text{NO}_3^-$  o el  $\text{NO}_2^-$ , como aceptores alternativos de electrones en ausencia de  $\text{O}_2$  y ocurre en suelos, sedimentos o cuerpos de agua si las condiciones medioambientales resultan desfavorables para la degradación aeróbica de la materia orgánica (Butterbach-Bahl *et al.*, 2013). La desnitrificación incluye a menudo la reducción de  $\text{N}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2$ , pero no siempre los microorganismos desnitrificantes completan el proceso, lo que resulta en la liberación de  $\text{N}_2\text{O}$  como producto final- ya sea por carecer de la capacidad genética que permita la reducción del  $\text{N}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2$  o porque los factores ambientales suprimen la reacción (Philippot *et al.*, 2011; Graf *et al.*, 2014). Un ejemplo de la primera circunstancia son los hongos que desnitrifican (Shoun *et al.*, 2012; Maeda *et al.*, 2015; Higgins *et al.*, 2016). Para que la desnitrificación tenga lugar, al menos, tres condiciones deben cumplirse: (a) limitación de  $\text{O}_2$ , (b) disponibilidad de óxidos de N, y (c) disponibilidad de sustratos de C orgánico fácilmente degradables. En las aguas residuales, la desnitrificación constituye el principal proceso que elimina el  $\text{NO}_3^-$ , pero es la principal vía de pérdida del N aportado con la fertilización en suelos agrícolas (Fowler *et al.*, 2015).

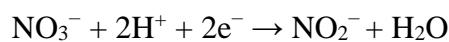
Aunque muchas especies bacterianas tienen el potencial de adaptar sus rutas respiratorias, tanto la posesión de los genes codificantes de enzimas activas de la desnitrificación como las condiciones medioambientales, determinan ampliamente si un organismo desnitrificante actuará como fuente o sumidero de  $N_2O$  cuando se encuentre en condiciones limitantes de oxígeno (Thomson *et al.*, 2012). La desnitrificación está distribuida extensamente en el dominio Bacteria y parece que domina en el filo Proteobacteria (Shapleigh, 2006). La mayoría de los estudios sobre desnitrificación se han enfocado en bacterias Gram negativas que ocupan nichos terrestres, usando como organismos modelo la  $\alpha$ -proteobacteria *P. denitrificans* y las  $\gamma$ -proteobacterias *P. stutzeri* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las reacciones de la desnitrificación están catalizadas por la nitrato reductasa periplásmica (Nap) o de membrana (Nar), la nitrito reductasa que contiene cobre (Cu) (NirK) o citocromo *cd*<sub>1</sub> (NirS), la óxido nítrico reductasa dependiente de citocromo *c* (cNor), del *pool* de quinonas (qNor) o que contiene Cu (Cu<sub>A</sub>Nor), y la óxido nitroso reductasa (Nos), codificadas por los genes *nap/nar*, *nirK/nirS*, *nor* y *nos*, respectivamente (revisado por van Spanning *et al.* (2005), (2007), Kraft *et al.* (2011), Richardson (2011), Bueno *et al.* (2012), Torres *et al.* (2016), Salas *et al.* (2020) y Yang *et al.* (2020)) (Figura 3).



**Figura 3.** (A) Esquema general de la ruta y (B) de los genes de la desnitrificación. La figura A es una adaptación de Salas *et al.* (2021). Q, quinona; QH<sub>2</sub>, hidroquinona; cit, citocromo. En la figura B, se muestran operones representativos de cada enzima de la ruta de la desnitrificación. Los operones *nap*, *nor* y *nos*, así como los genes *nirKV*, se corresponden con la organización que éstos presentan en *B. diazoefficiens* USDA110 (revisado por Salas *et al.*, 2021). Los operones *nar* y *nirS* se representan como aparecen en *P. denitrificans* PD1222 según Olaya-Abril *et al.* (2018). Se representa sólo el operón codificante de la cNor por ser el tipo mejor estudiado de enzima Nor.

### 2.4.1. Nitrato reductasa

El proceso de la desnitrificación comienza con la reducción de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:



Esta reacción está catalizada por dos tipos de nitrato reductasas: respiratoria o de membrana (Nar) y periplásmica (Nap) (Figura 3A).



Las Nar son enzimas heterotriméricas ancladas a la membrana y que contienen molibdeno (Mo) en su centro activo formando el cofactor Mo[MGD]<sub>2</sub> (del inglés, *bis molybdopterin guanine dinucleotide*), y Fe en la forma de grupos hierro-azufre (Fe-S) y de grupos hemo como cofactores redox adicionales (González *et al.*, 2006; Tavares *et al.*, 2006; Dobbek, 2011). La subunidad catalítica  $\alpha$  NarG y la subunidad  $\beta$  de transferencia de electrones NarH se localizan en el citoplasma y están asociadas a la subunidad integral de membrana quinol oxidasa NarI, que contiene un citocromo con dos grupos hemo *b* (Figura 3A). La reducción de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> por Nar es un proceso que conserva la energía (*i.e.*, se encuentra acoplada a la translocación de H<sup>+</sup> al periplasma para generar la fuerza H<sup>+</sup>-motriz necesaria para la síntesis de ATP) (Richardson y Sawers, 2002; Jormakka *et al.*, 2003). Las proteínas Nar están codificadas por el operón *narGHJI*; mientras que *narGHI* codifica las subunidades estructurales para quinol/nitrato oxido reductasa, *narJ* codifica una chaperona citoplasmática necesaria para la maduración de la holoenzima funcional de Nar. Estudios recientes han demostrado en *P. denitrificans* que NarJ sirve no sólo como chaperona de Nar, sino también para la nitrato reductasa asimiladora (NasC) (Pinchbeck *et al.*, 2019). En *P. denitrificans*, los genes *narGHJI* se localizan en el cluster *narK1-K2GHJI*. El gen *narK1-K2* codifica un transportador transmembrana fusionado que pertenece a la superfamilia de proteínas transportadoras MFS (del inglés, *major facilitator superfamily*). El dominio similar a NarK1 (o NarK1-like) funciona principalmente como transportador de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, mientras que el dominio similar a NarK2 (o NarK2-like) está más especializado en el transporte de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Goddard *et al.*, 2017).

La enzima Nap se encuentra codificada por el operón *napEDABC* (Figura 3B). Dependiendo de la especie, Nap se emplea en la respiración anaeróbica de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como parte de la DNRA o de la desnitrificación, o como sumidero de e<sup>-</sup> durante el crecimiento aeróbico (foto)organoheterótrofo a partir de fuentes reducidas de C con el fin de asegurar la homeostasis redox y así disipar el exceso de poder reductor. Este es el caso de *P. denitrificans* que, además de Nar, sintetiza Nap. En esta bacteria, Nar reduce el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como primera etapa de la desnitrificación anaeróbica. Sin embargo, Nap no es electrogénica y sirve para disipar el exceso de equivalentes reductores originados durante el crecimiento aeróbico (Richardson, 2011; Simon y Klotz, 2013). El sistema Nap se encuentra en muchas bacterias Gram negativas diferentes. Las enzimas Nap mejor estudiadas se han aislado de *Paracoccus pantotrophus*, *Escherichia coli*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Desulfovibrio desulfuricans*. El gen *napA* codifica la subunidad catalítica,

NapA, la cual contiene un cofactor Mo[MGD]<sub>2</sub> y un cluster [4Fe-4S], de manera similar a NarG. En la mayoría de los casos conocidos, NapA constituye un complejo con NapB (codificada por *napB*), que contiene dos grupos hemo *c*. Generalmente, la Nap madura se transporta al periplasma a través del sistema Tat (del inglés, *twin-arginine transporter*), lo que requiere la actuación de una chaperona citoplasmática codificada por el gen *napD* (Grahl *et al.*, 2012). En la mayor parte de los sistemas Nap, la transferencia de e<sup>-</sup> del quinol al complejo NapAB necesita de una proteína codificada por *napC* y que contiene 4 grupos hemo *c*. Sin embargo, en *E. coli* se ha identificado un segundo sistema oxidante de quinol, NapGH (codificado por los genes *napGH*), en el cual NapH es una quinol-deshidrogenasa unida a membrana, y NapG es una proteína periplásmica adaptadora de transferencia de electrones. No obstante, aún se desconocen la estructura y la función detalladas de este complejo NapGH, ya que no se ha purificado todavía. Adicionalmente, *E. coli* también contiene un gen *napF*, que codifica una proteína citoplasmática con complejos Fe-S que podría intervenir en la modificación post-traducciona de NapA antes de exportar la proteína ya plegada al periplasma (Nilavongse *et al.*, 2006).

#### 2.4.2. Nitrito reductasa

La siguiente reacción de la desnitrificación consiste en la reducción de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NO:



Esta reacción está catalizada por la enzima nitrito reductasa, de la cual existen dos tipos: nitrito reductasas que contienen citocromo *cd*<sub>1</sub> (NirS) y nitrito reductasas que contienen Cu (NirK) (Figura 3A).

Las Nir de tipo *cd*<sub>1</sub> se encuentran codificadas generalmente por un operón que contiene, al menos, 10 genes: *nirSECFDLGHJN*. De entre todos ellos, *nirS* codifica la subunidad catalítica. Los genes *nirC* y *nirM* (este último presente en *P. aeruginosa* y *P. stutzeri*) codifican un citocromo *c* soluble pequeño, que se requiere en la transferencia de e<sup>-</sup>. Las Nir de tipo *cd*<sub>1</sub> son homodímeros que contienen un citocromo *c* y un citocromo *d*<sub>1</sub> en cada subunidad (revisado por Rinaldo *et al.* (2017) y Yang *et al.* (2020)) (Figura 3A). Los e<sup>-</sup> necesarios para reducir el NO<sub>2</sub><sup>-</sup> proceden de donadores de e<sup>-</sup> macromoleculares del periplasma, como el citocromo *c*<sub>551</sub> en el caso de *P. aeruginosa* (Cutruzzolà *et al.*, 2002), o pseudoazurina y el citocromo *c*<sub>550</sub> en el caso de *P. pantotrophus* (Pearson *et al.*, 2003). Estos e<sup>-</sup> se transportan al hemo *c*, el cual los

transfiere internamente al hemo  $d_1$ , donde ocurre la catálisis (Rinaldo *et al.*, 2008). Los genes *nirDLGH* codifican un complejo responsable de la biosíntesis del grupo hemo  $d_1$ , el cual pertenece al grupo tetrapirrol modificado, siendo único este cofactor de las Nir  $cd_1$  (Allen *et al.*, 2005), y es responsable de la reactividad peculiar de estas enzimas a ligandos capaces de interactuar con grupos Fe-hemo, como aniones, NO o monóxido de carbono (CO) (Rinaldo *et al.*, 2011). Los genes *nirE* y *nirJ* codifican proteínas implicadas en la maduración del hemo  $d_1$  en el citoplasma (Nicke *et al.*, 2013). Asimismo, las proteínas periplásmicas NirN y NirF (codificadas por los genes *nirN* y *nirF*) intervienen en la inserción del hemo  $d_1$  dentro de NirS (Bali *et al.*, 2010; Adamczack *et al.*, 2014).

La Nir dependiente de Cu está codificada por el gen *nirK* y cataliza la reducción de  $\text{NO}_2^-$  a NO mediante la transferencia de un  $e^-$  a través de un intermediario redox, que suelen ser proteínas pequeñas de transferencia de  $e^-$ , como cupredoxinas (proteínas de Cu azul) o un citocromo *c*, que transfieren un  $e^-$  a través de la cadena transportadora de electrones de la respiración (*e.g.*, citocromo *bc\_1*) (revisado por Nojiri *et al.*, 2017) (Figura 3A). Esta enzima homotrimérica contiene dos sitios de unión a Cu en cada monómero. Los dos sitios de Cu se clasifican en tipo 1 (T1Cu) y tipo 2 (T2Cu), y se distinguen por sus propiedades espectroscópicas, estructurales y funcionales. T1Cu se une a dos residuos de histidina (His), uno de cisteína (Cys) y otro de metionina (Met) y transfiere un  $e^-$  del intermediario redox a T2Cu, exhibiendo un intenso color “azul” o “verde” característico del estado oxidado ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Por otro lado, T2Cu se coordina con tres residuos de His y sirve como sitio de unión y reducción del  $\text{NO}_2^-$ . Ambos sitios se encuentran conectados por un segmento -His-Cys- conservado, donde el residuo de Cys pertenece a T1Cu, y el de His, a T2Cu. La transferencia electrónica controlada entre T1Cu y T2Cu es necesariamente rápida y ocurre a través de este canal (Rinaldo *et al.*, 2017). Algunas veces, al lado del gen *nirK* aparece el gen *nirV*, que codifica la proteína NirV, relacionada con desulfurasas y que puede ser necesaria para la correcta inserción del Cu en el centro catalítico de la enzima (van Spanning, 2011) (Figura 3B). La mayoría de los desnitrificantes codifican NirK o NirS. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que *Bradyrhizobium nitroreducens* sp. nov. (Jang *et al.*, 2018) y *Bradyrhizobium oligotrophicum* (Sánchez y Minamisawa, 2018) contienen genes para ambas nitrito reductasas.

### 2.4.3. Óxido nítrico reductasa

En la siguiente etapa de la desnitrificación, el NO se reduce a N<sub>2</sub>O:



Esta reacción está catalizada por las óxido nítrico reductasas, de las que existen tres tipos: dependiente de citocromo *c* (cNor), de quinol (qNor) o que contiene Cu (Cu<sub>A</sub>Nor) (Figura 3A). Todas ellas pertenecen a la superfamilia de las oxidasas que contienen hemo y Cu (HCO, del inglés, *haem-Cu oxidases*).

La cNor fue la primera que se aisló y es la que más se ha estudiado, y sólo se encuentra en bacterias desnitrificantes. La enzima cNor está compuesta por dos subunidades: NorB y NorC. La subunidad NorC está orientada hacia la zona periplásmica de la membrana plasmática y presenta un hemo *c* en su estructura, el cual está coordinado con residuos de His y Met y funciona como aceptor de e<sup>-</sup> procedentes de otros citocromos *c* (citocromos *c*<sub>551</sub> o *c*<sub>552</sub>) o de azurinas de Cu azul (azurina o pseudoazurina) (las propiedades estructurales de cNor han sido ampliamente revisadas por Daskalakis *et al.*, 2015; Mahinthichaichan *et al.*, 2018; Tosha y Shiro, 2017). NorB es la subunidad grande y contiene el centro catalítico, que está conformado por un sitio activo hemo *b*<sub>3</sub>::Fe<sub>B</sub>, que recibe los e<sup>-</sup> de otro grupo hemo *b* unido a la misma proteína; esta subunidad recibe e<sup>-</sup> de NorC. Las cNors mejor caracterizadas proceden de *P. denitrificans* (codificada por el operón *norCBQDEF*), *P. stutzeri* y *P. aeruginosa* (codificada en ambas por el operón *norCBQ*). La estructura del complejo NorBC de *P. aeruginosa* (Hino *et al.*, 2010) presenta 12 hélices  $\alpha$  transmembrana en NorB, mientras que NorC se encuentra anclada a la membrana por un único segmento transmembrana. NorQ y NorD están implicados en la inserción del cofactor (Fe<sub>B</sub>) en NorB (Kahle *et al.*, 2018). NorE and NorF no son esenciales para la actividad de Nor, pero son importantes en condiciones en las que la actividad Nir endógena genera una exposición prolongada al NO (Bergaust *et al.*, 2014). Los estudios cristalográficos de la cNor de *P. aeruginosa* demostraron que NorB no tiene ningún canal de protones transmembrana, a diferencia de las HCO que translocan protones, por lo que esta enzima no actúa como una bomba de protones y, por lo tanto, no participa directamente en la conservación de la energía (Hino *et al.*, 2010; Shiro *et al.* 2012).

A diferencia de la cNor, la qNor está conformada por una sola subunidad (NorB) y es reactiva en presencia de ubiquinol (UQH<sub>2</sub>) y/o menaquinol (MQH<sub>2</sub>) (Figura 3A). NorB de qNor contiene una extensión N-terminal que está ausente en NorB de las cNors y que muestra cierta similitud con NorC, aunque carece de motivo de unión a hemo *c*. Su centro activo es similar al que presenta la NorB de las cNor, ya que contiene un grupo hemo *b* y un átomo de Fe<sub>B</sub> que no forma parte de ningún grupo hemo. Este tipo de Nor se ha encontrado en bacterias Gram negativas del suelo como *Ralstonia eutropha*, en arqueas como *Pyrobaculum aerophilum*, en cianobacterias como *Synechocystis* sp., o en patógenos como *Neisseria ghonorrae* o *Neisseria meningitidis* (revisado por Tosha y Shiro, 2017).

Un subgrupo inusual de qNor, la qCu<sub>A</sub>Nor o simplemente, como se denota actualmente, Cu<sub>A</sub>Nor, está ejemplificada en *Bacillus azotoformans*, y contiene una subunidad grande NorB formando un complejo con una subunidad pequeña que contiene un sitio Cu<sub>A</sub> (encontrado típicamente en las HCO reductoras de O<sub>2</sub>), lo que hace a esta enzima competente para recibir e<sup>-</sup> del citocromo *c*<sub>551</sub> unido a membrana y del *pool* de MQH<sub>2</sub> (de Vries *et al.*, 2007). Sin embargo, esta enzima de *Bacillus* carece de actividad oxidante de MQH<sub>2</sub>, y este es el motivo por el que su anotación cambió de qCu<sub>A</sub>Nor a Cu<sub>A</sub>Nor (Al-Attar y de Vries, 2015).

#### 2.4.4. Óxido nitroso reductasa

La última etapa de la desnitrificación cursa con la reducción del N<sub>2</sub>O a N<sub>2</sub> a través de la siguiente reacción:



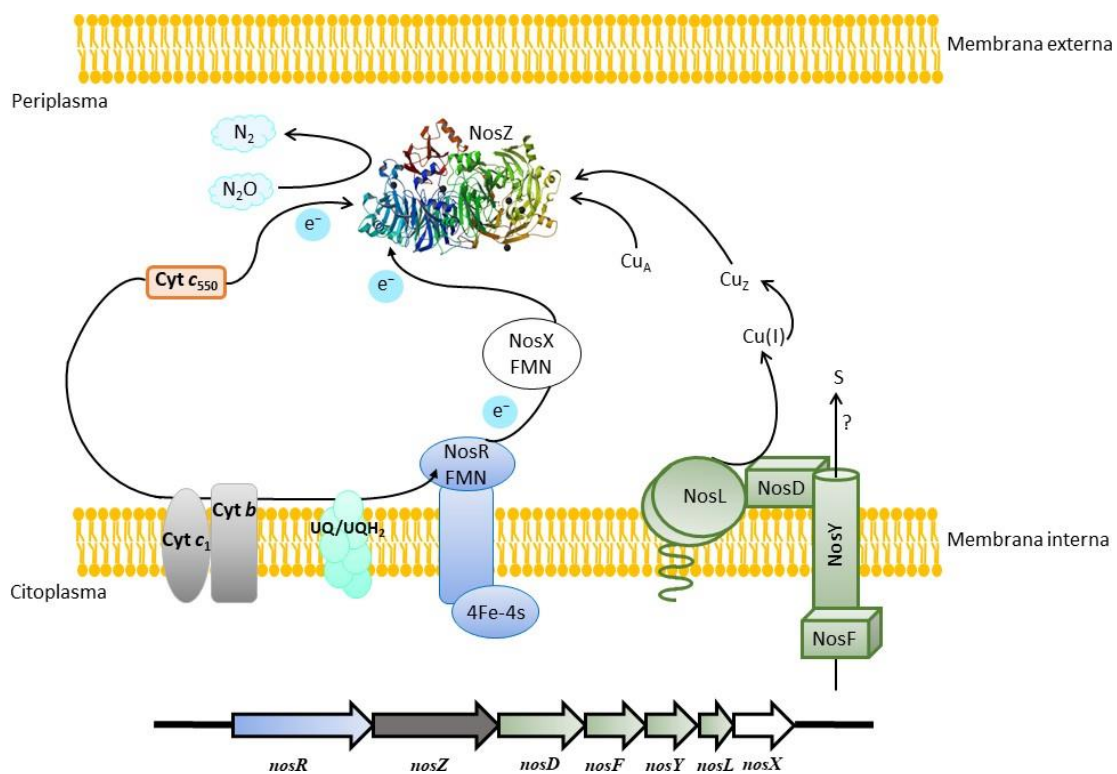
La relevancia de esta reacción radica en que es la única enzima capaz de reducir el N<sub>2</sub>O lo que previene la liberación a la atmósfera de este gas que, como se ha explicado anteriormente, actúa como un potente GHG (apartado 1). La reducción de N<sub>2</sub>O a N<sub>2</sub> está catalizada por la óxido nitroso reductasa (Nos), codificada por el operón *nosRZDFYLX*; la Figura 4 muestra un modelo de su estructura fundamental. El gen *nosZ* codifica la subunidad catalítica de esta enzima, NosZ, la cual contiene dos centros multi-Cu: el centro catalítico tetranuclear Cu<sub>Z</sub>, y el centro binuclear Cu<sub>A</sub>, que le transfiere los e<sup>-</sup> (revisado por Pauleta *et al.* (2017), Pauleta *et al.* (2019) y Hein y Simon (2019)). El centro Cu<sub>Z</sub> contiene el puente tetrasulfuro del tetranúcleo de Cu ligado a 7 residuos de His, del que se sugiere que podría ser el sitio de unión y reducción del N<sub>2</sub>O, mientras que el centro Cu<sub>A</sub> contiene

dos residuos de Cys, uno de Met, y el esqueleto carbonilo de un residuo de triptófano. Esta enzima resulta ser un homodímero, en el que cada monómero presenta un centro Cu<sub>A</sub> y un centro Cu<sub>Z</sub>. El dominio N-terminal contiene un pliegue  $\beta$ -*propeller* de 7 láminas, con el centro Cu<sub>Z</sub> insertado en medio, mientras que el extremo C-terminal posee un pliegue cupredoxina compuesto de 9 láminas  $\beta$  que se coordinan con el centro Cu<sub>A</sub> (Brown *et al.*, 2000). Para su expresión, maduración y mantenimiento se requieren varias proteínas auxiliares. De hecho, el mínimo requerido para la reducción de N<sub>2</sub>O lo constituyen, aparte de NosZ, las proteínas NosD, F, Y, L y R.

NosD, NosF y NosY codifican un transportador de tipo ABC (NosFY) y una proteína de interacción periplásmica NosD que se cree que es necesaria para suministrar una especie de azufre para el ensamblaje del centro Cu<sub>Z</sub>. De hecho, se ha demostrado recientemente que NosFY y NosD son esenciales para la formación del sitio [4Cu-2S] de Cu<sub>Z</sub> pero no para el sitio de transferencia de electrones Cu<sub>A</sub> (Zhang *et al.*, 2019). Estudios genéticos y bioquímicos recientes en *P. denitrificans* han demostrado que NosL es una proteína de unión a Cu (I) que también es necesaria para el ensamblaje eficiente del sitio Cu<sub>Z</sub> (Bennett *et al.*, 2019). Muy recientemente, gracias a la cristalización del complejo NosDFY y de NosL de *P. denitrificans*, así como del macrocomplejo transitorio que constituyen estas dos macromoléculas y el que originan NosDFY con NosZ, se ha definido el proceso por el cual NosDFYL transfiere Cu(I) a NosZ (Müller *et al.*, 2022).

En  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -proteobacterias, además de NosZDFYL, se expresan dos flavoproteínas de unión a flavín mononucleótido (FMN), NosR y NosX. NosR, codificada por *nosR*, es una flavoproteína transmembrana que contiene centros Fe-S (Wunsch y Zumft, 2005). Este cofactor de flavina se une covalentemente al dominio periplásmico a través del residuo de Thr<sub>163</sub>, mientras que el dominio citoplasmático contiene poliferredoxina, que podría unir dos centros [4Fe-4S], y ambas estructuras podrían mediar en la transcripción del gen *nosZ* a través de su interacción con reguladores transcripcionales (Wunsch y Zumft, 2005). También se ha propuesto que NosR juega un papel en la reducción de N<sub>2</sub>O in vivo contribuyendo al mantenimiento del estado reducido del centro de Cu<sub>Z</sub> (Wunsch y Zumft, 2005). NosX es una flavoproteína periplásmica perteneciente a la familia ApbE (que es una familia de proteínas implicadas en la biosíntesis de complejos Fe-S) (Boyd *et al.*, 2011). Recientemente, Bennett y colaboradores (2020) demostraron que NosX es esencial para la reducción de N<sub>2</sub>O en la  $\alpha$ -proteobacteria *P. denitrificans*, y que su función no está asociada con el ensamblaje de

los centros de Cu en la Nos. En cambio, es probable que esté implicada de manera indirecta en mantener la actividad catalítica de NosZ a través de la flavinilación de NosR. Por último, otras proteínas, como NosC, NosG o NosH, al igual que ocurre con NosX, se encuentran distribuidas siguiendo patrones taxonómicos y no son ubicuas (Zumft y Kroneck, 2007). En cuanto a su transporte, el sistema Tat es responsable de transportar la apoproteína NosZ al periplasma, donde se completa su maduración (Wunsch *et al.*, 2003; Zumft y Kroneck, 2007), y también es exportada la proteína NosX por este sistema. NosR y NosY, sin embargo, son proteínas integrales de membrana que presentan péptidos señal específicos del sistema de secreción (Sec). Por consiguiente, está claro que tanto el sistema Tat como Sec (ambos revisados en Kudva *et al.*, 2013) deben cooperar para ensamblar un sistema Nos funcional (Zumft y Kroneck, 2007). No obstante, a pesar de que NosZ es diana del sistema Tat, comprende una excepción al concepto de que la adquisición del cofactor ocurre antes de la translocación, ya que  $Cu_A$  y  $Cu_Z$  se ensamblan en el periplasma (Zumft, 2005).



**Figura 4.** Modelo general de las proteínas implicadas en la reducción del  $N_2O$  a  $N_2$ , así como para la biogénesis de NosZ. UQ, ubiquinona; UQH<sub>2</sub>, ubihidroquinona; cyt, citocromo; FMN, flavín mononucleótido. Adaptada de Torres *et al.* (2016).

### III. Las leguminosas y su simbiosis con rizobios

#### **3.1. Las leguminosas y su importante papel frente al cambio climático**

Con cerca de 770 géneros y más de 19500 especies, la familia Leguminosae es la tercera familia de angiospermas más grande según el número de especies, por detrás de Asteraceae y Orchidaceae, y ocupa el segundo lugar en importancia económica por detrás de Poaceae (gramíneas). Las leguminosas tienen una distribución cosmopolita y representan elementos ecológicos importantes en prácticamente todo el mundo. Se han domesticado junto con las gramíneas en diferentes áreas del mundo desde los inicios de la agricultura, y han sido claves en su desarrollo. Además, constituyen cultivos alimentarios importantes al proporcionar las legumbres, que son ricas en proteínas y micronutrientes. Las leguminosas también se emplean como forraje y abono verde y, de ellas, se pueden extraer madera, taninos, aceites y resinas de gran valor económico (revisado por Foyer *et al.*, 2019).

La mayoría de las especies de leguminosas pueden fijar  $N_2$  atmosférico mediante el proceso conocido como fijación biológica de  $N_2$  (BNF, del inglés, *biological N<sub>2</sub> fixation*) tras asociarse con bacterias simbióticas que reciben el nombre general de rizobios, lo que les otorga una ventaja para crecer en condiciones de bajo aporte de N si otros factores ambientales son favorables (revisado por Vasconcelos *et al.*, 2020 ). Este proceso puede ser un aporte importante de N no sólo a la propia planta, sino también a los ecosistemas naturales y agrícolas y, por este motivo, juega un papel positivo en la rotación de cultivos, además de contribuir a reducir las emisiones de GHGs, sobre todo de  $CO_2$  y  $N_2O$  (revisado por Vasconcelos *et al.*, 2020). Los cultivos de leguminosas también son capaces de aportar materia orgánica de alta calidad y facilitar la circulación de nutrientes en el suelo, así como promover la retención de agua, minimizando de este modo la entrada de combustibles fósiles en la cadena de producción agrícola (revisado por Vasconcelos *et al.*, 2020). Más de la mitad de todo el N incorporado en los sistemas terrestres es resultado de la BNF. A través de este proceso, el  $N_2$  inerte se transforma para ser asimilable por los organismos, manteniendo así el equilibrio de los ecosistemas. Por ello, los estudios de la simbiosis planta-bacteria en leguminosas se consideran actualmente de gran relevancia, destacando su importante papel ecológico y su protagonismo en la recuperación de ecosistemas, ya que también se emplean en la restauración de suelos degradados, debido a la tolerancia de ciertas especies a



determinados factores de estrés, como salinidad, aridez, sequía, suelos ácidos y alcalinos, calor extremo y fuertes vientos (revisado por Huaranga-Joaquín *et al.*, 2022).

Los hábitos alimenticios de los 7,7 billones de habitantes que poblamos el planeta amenazan a todos los dominios de la vida, siendo el cambio climático una expresión extremadamente preocupante de este hecho (Macdiarmid y Whybrow, 2019). La producción de ganado emite GHGs y otros contaminantes a niveles considerablemente elevados, además de agravar la escasez de agua y la erosión del suelo (Godfray *et al.*, 2018). Si los patrones actuales de producción y consumo persisten, se espera que, para 2050, las emisiones de GHG incrementen en un 50-80% y que las tierras destinadas a cultivo se expandan en un 13-66% (Clark *et al.*, 2019), lo que ocasionaría que la biodiversidad se viera aún más seriamente amenazada (Tilman *et al.*, 2017). Esto se traduciría, globalmente, en un aumento de un 15% en el uso del agua, y de un 50 y 100% en el empleo de fertilizantes nitrogenados y fosforados, respectivamente (Clark *et al.*, 2019). De acuerdo a la literatura, la producción de alimentos vegetales registra el menor impacto medioambiental, ya que, por ejemplo, las emisiones de GHGs son 25-150 veces inferiores a las que generan los rumiantes criados para la producción de carne. En base a estos datos, se ha sugerido que debe haber un cambio hacia una dieta donde los vegetales adquieran mayor protagonismo, proporcionando, de esta manera, fuentes de proteína más respetuosas con el medio ambiente (Willett *et al.*, 2019). La reducción de las emisiones del gas CH<sub>4</sub> a la atmósfera por los rumiantes se presenta como una alternativa plausible. Las leguminosas han llamado la atención del público recientemente, pasando a ser consideradas como nutrientes alternativos en alimentación e incluso herramientas en la protección del clima, poniendo en relieve su papel clave en el desarrollo de sistemas sostenibles de producción de alimentos (Calles *et al.*, 2019b; Jiménez-López *et al.*, 2020). Por ello, se propone que el consumo y la producción de leguminosas sea piedra angular en seguridad alimentaria y protección medioambiental, a la luz del eminente cambio climático (Willett *et al.*, 2019). Con el objeto de reforzar esta idea, la ONU declaró el 2016 como el Año Internacional de las Legumbres (Calles *et al.*, 2019a). En el mismo año, el eslogan para celebrar el Día Mundial de la Alimentación fue “El clima está cambiando. La agricultura y la alimentación también deben hacerlo” (FAO, 2016). Desde entonces, las leguminosas se encuentran en el foco de las estrategias de mitigación del cambio climático global (Willett *et al.*, 2019).

### **3.2. Cultivo de soja**

La soja [*Glycine max* (L.) Merr.] es única entre las leguminosas por un contenido en proteínas del 40% y de un 21% de aceites e isoflavonas. Según datos actualizados del USDA (del inglés, *United States Department of Agriculture*), el 60% de la producción total de oleaginosas en el mundo está representada por los cultivos de soja, los cuales, a junio de 2022, alcanzaron la cifra de 395 millones de toneladas (web de USDA). Anualmente, los cultivos de soja son capaces de fijar 16,4 toneladas de N anualmente, lo que supone el 77% del N total fijado por leguminosas (Herridge *et al.*, 2008). La soja despierta un interés económico e industrial por su aceite, su uso como alimento, su aporte en proteína, o su utilidad en la extracción de fármacos para revestimientos protectores o en la producción de biodiésel. Entre los principales productores de soja, se encuentran Brasil (38%), EEUU (32%) y Argentina (13%) a la cabeza, seguidos de China (4%), India y Paraguay (ambos con un 3%) (web de USDA). En la UE, aunque su superficie ha aumentado en los últimos años, su presencia aún es reducida, con 933000 hectáreas (ha). Más del 40% de la producción europea se localiza en Italia, seguida de Francia y Rumanía (web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, MAPA). En España, la superficie cultivada de soja es menos extensa que la de otras oleaginosas, como girasol o colza, y entre 2015 y 2019, la superficie media de este cultivo fue de 1400 ha (web del MAPA; anexo oleaginosas 2021). No obstante, su producción mundial subió de 17 a 230 millones de toneladas métricas en los últimos 50 años, y se espera que crezca rápidamente en un futuro debido a un marcado aumento en la demanda tanto de la planta para su consumo como de su aceite (Uchida y Akiyama, 2013). Este cultivo también ha atraído la atención de los agricultores como cultivo medioambientalmente sostenible que requiere pequeñas dosis de fertilizantes a base de N, o no requiere dicha fertilización en absoluto (Crews y Peoples, 2004). La soja es la primera especie de leguminosa cuyo genoma se ha secuenciado completamente (Schmutz *et al.*, 2010). La secuencia de este genoma abre la puerta a las mejoras de cultivos para una producción sostenible de alimento humano, animal y de energía, y para lograr un balance entre agricultura y medio ambiente.

### **3.3. Cultivo de alfalfa**

La alfalfa pertenece a la familia de las leguminosas y está representada por el género *Medicago*, del cual existen 30 especies en España, de las cuales, por su importancia para la formación de la alfalfa cultivada, destacan *Medicago sativa* L. y *Medicago falcata* L., ambas descritas por Castroviejo (2000). Además de sus usos tradicionales como alimento animal, el cultivo de alfalfa presenta un gran potencial para la producción de bioenergía, y diferentes estudios han considerado a esta planta (especialmente los tallos) como cultivo sostenible para la producción de bioetanol de segunda generación. Estas plantas también poseen propiedades terapéuticas, las cuales se han empleado en veterinaria y medicina. La especie *Medicago truncatula* juega un papel prominente en la investigación fundamental de la biología de las leguminosas y de la fijación simbiótica de N<sub>2</sub> (SNF, del inglés, *symbiotic N<sub>2</sub> fixation*) debido a características favorables, que incluyen diploidía, genoma pequeño (unos 500 millones de pares de bases (Mpb)), facilidad para su transformación, ciclo de vida corto y una elevada diversidad natural (Cook, 1999). El genoma de esta leguminosa modelo se secuenció en la primera década del siglo XXI (Young *et al.*, 2011).

De entre las dos especies más cultivadas de alfalfa, *M. sativa* L. es uno de los cultivos forrajeros más valiosos en zonas de clima templado. Por ello, la historia de la alfalfa es la historia del cultivo forrajero más importante del mundo (Delgado y Lloveras, 2020). Es difícil conocer con exactitud la superficie cultivada de alfalfa en el mundo, ya que no consta con este nombre ni en las estadísticas de la FAO (Faostat) ni en las de la UE (Eurostat). Sin embargo, al parecer, se cultivan 30 millones de ha (después de la soja, con 110 millones de ha), siendo EEUU (6 millones de ha), China (4,7 millones de ha), Canadá (3,7 millones de ha), Argentina (3,2 millones de ha), Australia y Rusia (unos 3,5 millones de ha cada uno) los principales productores (revisado por Delgado y Lloveras, 2020). España también es un importante productor de alfalfa, con una superficie cultivada de 266000 ha, y constituye el cultivo forrajero de mayor importancia superficial, productiva y económica en el país (datos de la web del MAPA).

La alfalfa no necesita fertilización nitrogenada para su crecimiento, ya que satisface sus requerimientos en N gracias a la SNF. De hecho, puede alcanzar las máximas producciones siempre que no haya deficiencias en el suelo de otros minerales importantes, como el fósforo (P), el potasio (K), el boro (B), el Ca, el S o el Mo. La alfalfa, por su elevada capacidad productiva de forraje, llega a fijar hasta unos 463 kg de N<sub>2</sub> atmosférico

por ha y año, que utiliza, en su mayor parte, para la producción de su propia proteína, la cual se extrae en el campo como parte del forraje. El N restante se incorpora al cultivo siguiente a través del rastrojo que queda (raíces, coronas y restos de cosecha). Desde que los agricultores descubrieron estas propiedades, aunque fuera intuitivamente, han empleado las leguminosas como la alfalfa en las rotaciones de cultivo para aprovechar este enriquecimiento del suelo y mejorar los rendimientos de la siguiente cosecha, lo que se conoce coloquialmente como “abono verde” (revisado por Lloveras *et al.*, 2020). La SNF permite a la alfalfa que entre el 88,3 y 90,8% de su contenido en N proceda de la atmósfera. La simbiosis más común la realiza con el género *Ensifer* (anteriormente, *Sinorhizobium*), destacando las especies *Ensifer meliloti* y *Ensifer garamanticus* (Valdez-Núñez y Cuadros-Infante, 2022).

### **3.4. Los rizobios**

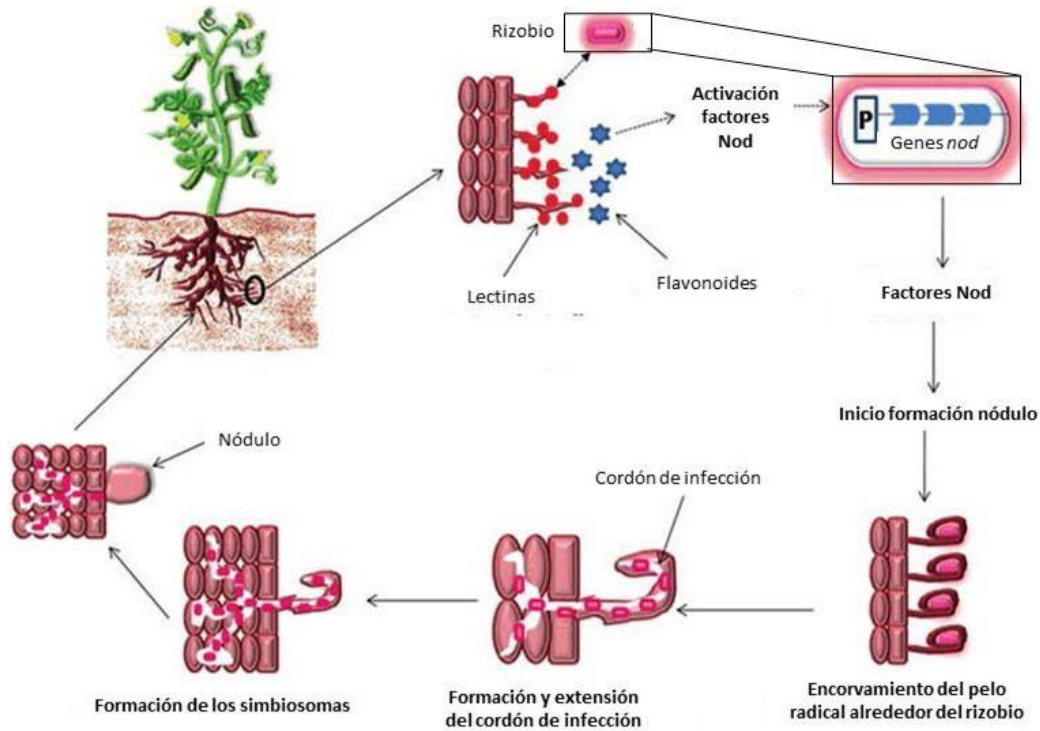
Los rizobios son bacterias Gram negativas bien conocidas por su habilidad para establecer simbiosis fijadoras de N<sub>2</sub> con su leguminosa huésped, como ya se ha comentado previamente. Hasta 2001, se creía que los rizobios pertenecían únicamente a las  $\alpha$ -proteobacterias, y se incluyeron en los géneros *Rhizobium*, *Ensifer* (anteriormente *Sinorhizobium*), *Allorhizobium*, *Pararhizobium*, *Neorhizobium* y *Shinella* dentro de la familia Rhizobiaceae, perteneciente a su vez al orden Rhizobiales. A lo largo de los siguientes años, se ha demostrado la existencia de otras familias bacterianas que no contienen especies pertenecientes a la familia Rhizobiaceae, pero que pueden nodular leguminosas. Entre estas familias se encuentran Phyllobacteriaceae (géneros *Mesorhizobium*, *Aminobacter* y *Phyllobacterium*), Brucellaceae (género *Ochrobactrum*), Methylobacteriaceae (géneros *Methylobacterium* y *Microvirga*), Bradyrhizobiaceae (género *Bradyrhizobium*), Hyphomicrobiaceae (género *Devosia*), y Xanthobacteriaceae (género *Azorhizobium*), todas incluidas en la clase  $\alpha$ -Proteobacteria del filo Bacteria (de Lajudie *et al.*, 2019). En 2001, se sugirió que la nodulación de leguminosas no estaba restringida sólo a  $\alpha$ -proteobacterias. De hecho, Moulin y colaboradores (2001) describieron dos cepas de *Burkholderia* aisladas de nódulos de *Aspalathus carnosa* y *Machaerium lunatum*, y Chen y colaboradores (2001) aislaron bacterias del género *Cupriavidus* (anteriormente, *Ralstonia*) de nódulos de *Mimosa*, demostrando de esta forma que la capacidad para nodular también estaba presente en la clase  $\beta$ -proteobacteria. A este respecto, el grupo de investigación donde he realizado mi Tesis Doctoral aisló por primera vez la especie *Burkholderia phymatum* de nódulos procedentes de plantas de

*Phaseolus vulgaris* que crecían en Marruecos (Talbi *et al.*, 2010) cuando, hasta el momento, sólo se había documentado este género en nódulos de leguminosas del género *Mimosa* y otras leguminosas de clima tropical. En sentido amplio, a pesar de la diversidad de clases, órdenes, familias, géneros y especies, todas las bacterias capaces de establecer simbiosis fijadoras de N<sub>2</sub> mediante la generación de nódulos en leguminosas reciben el nombre genérico de rizobios.

### **3.5. Nodulación**

Las leguminosas constituyen las fuentes principales de aporte de N a los diversos ecosistemas. Sin embargo, esta contribución de N no la puede llevar a cabo la planta sola, sino que necesita de la asociación con los rizobios del suelo. Esta asociación resulta en la producción en sus raíces y en el tallo de algunas leguminosas de unas estructuras especializadas denominadas nódulos (revisado por Mahmud *et al.*, 2020).

El proceso de nodulación requiere un intercambio coordinado de señales entre el microsimbionte (el rizobio) y el macrosimbionte (la planta) (Figura 5). En primer lugar, las plantas liberan señales químicas, como flavonoides, que son captados por rizobios compatibles en la rizosfera, lo que conduce a la producción por parte de éstos de proteínas llamadas factores de nodulación (o factores Nod), que inducen a su vez diversas cascadas génicas, como las de nucleoporinas, canales catiónicos, picos de Ca<sup>2+</sup>, expresión de genes de nodulación temprana, y señalización por citoquininas, que conducen a múltiples divisiones de las células corticales y pericíclicas y, concomitantemente, a la infección bacteriana. Los rizobios quedan atrapados por los pelos radicales, los cuales se encorvan después de haber detectado los factores Nod, lo que inicia la formación del cordón de infección tubular, el cual facilita la penetración de las bacterias en el pelo radical y en las células corticales adyacentes. Las divisiones de las células corticales y del periciclo ocurren simultáneamente, dando lugar al primordio nodular. Las bacterias se dividen, facilitando su desplazamiento a través del cordón de infección y se liberan eventualmente en las células del primordio nodular inducido. Posteriormente, el nódulo madura y se origina el simbiosoma en el citoplasma de las células corticales (revisado por Poole *et al.* (2018), Mahmud *et al.* (2020) y Yang *et al.* (2022)). La Figura 5 muestra un esquema representativo del proceso completo de nodulación.

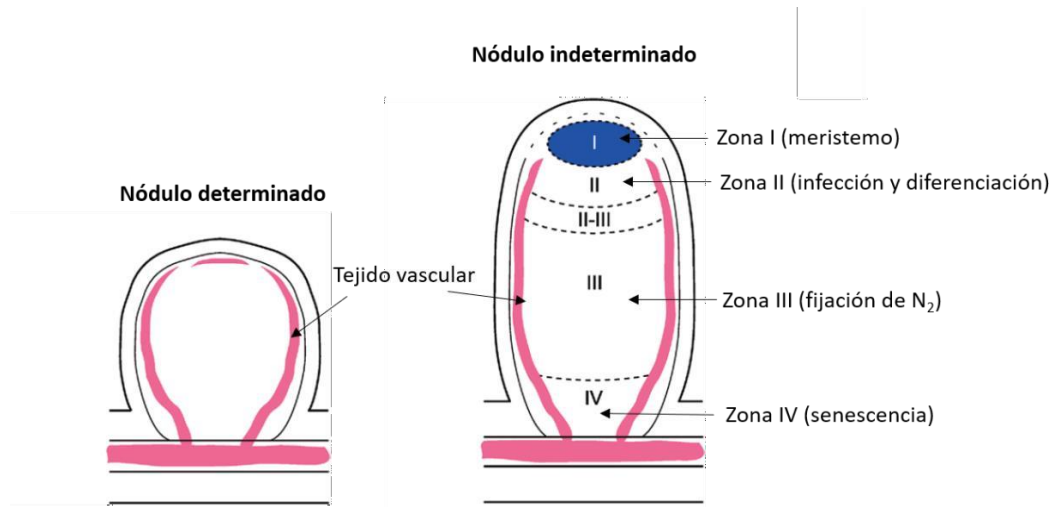


**Figura 5.** Principales etapas del proceso de nodulación. Adaptada de Singh *et al.* (2019).

Dependiendo de dónde se inician las divisiones del meristemo, de si éste permanece activo durante toda la vida del nódulo, y de las sustancias transportadas, se pueden distinguir principalmente dos tipos de nódulos: indeterminados o determinados (revisado por Kohlen *et al.*, 2018) (Figura 6):

- ✓ Nódulos determinados: el meristemo normalmente se inicia en el córtex externo por debajo de la epidermis. La diferenciación de las células ocurre de manera sincronizada y, al cabo de cierto tiempo, éstas mueren, por lo que estos nódulos viven unas pocas semanas. La actividad meristemática del nódulo finaliza temprano en la vida del mismo. Cuando entran en senescencia, se forman nódulos en las partes más jóvenes de la raíz. Tienen forma esférica y transportan amidas. La soja presenta este tipo de nódulos.
- ✓ Nódulos indeterminados: las primeras divisiones meristemáticas ocurren en el interior del córtex seguidas por divisiones de la endodermis y el periciclo, generando nuevos tejidos que son infectados por los rizobios. Se distinguen 4 zonas principalmente: I, el meristemo, II, donde los rizobios se diferencian a bacteroides en el interior de la célula vegetal, III, donde los bacteroides llevan a cabo la SNF, y IV, donde ocurre la senescencia. Su actividad meristemática es

prolongada, y la senescencia no ocurre tan rápido como en los nódulos determinados. Son alargados, pueden estar ramificados o no, y transportan ureidos. La alfalfa desarrolla este tipo de nódulos.



**Figura 6.** Representación de un nódulo determinado (izquierda) e indeterminado (derecha). El color rosa indica tejido vascular, mientras que el azul, señala el tejido meristemático. Los nódulos determinados carecen de la diferenciación por zonas como en el caso de los indeterminados, y su senescencia comienza en el centro del nódulo. Adaptada de Kohlen *et al.* (2018).

La habilidad de los rizobios para formar nódulos en presencia de otras cepas determina su competitividad en la nodulación (Onishchuk *et al.*, 2017). La competencia entre los rizobios comprende importantes implicaciones en la agricultura, ya que pueden existir grandes diferencias entre cepas en cuanto a la eficiencia de la SNF (Irisarri *et al.*, 2019). Los inoculantes comerciales preparados con rizobios élite deben ser sumamente efectivos en proporcionar N<sub>2</sub> fijado a la planta y, al mismo tiempo, ser altamente competitivos en la ocupación nodular frente a los rizobios nativos, los cuales pueden mostrar mayor competencia, pero ser menos eficientes en la SNF (Checcucci *et al.*, 2017; Onishchuk *et al.*, 2017).

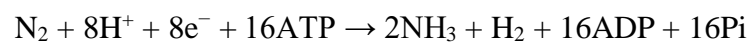
Las interacciones planta-microbio en la agricultura forman parte de una ecuación multifactorial que incluye (i) el genotipo de la planta, (ii) el medio ambiente, y (iii) los microbiomas de la planta y el suelo. Todos estos factores deben tomarse en cuenta a la hora de evaluar el éxito de microorganismos beneficiosos (Busby *et al.*, 2017; Onishchuk *et al.*, 2017; diCenzo *et al.*, 2019). La nodulación y, por extensión, la competencia entre rizobios, se ve afectada por el tipo de suelo y sus propiedades físico-químicas (*i.e.*, temperatura, pH, humedad), la disponibilidad de nutrientes y la habilidad de los microorganismos para usarlos, la población de rizobios nativos y el microbioma

remanente del suelo, el historial previo de inoculación, y/o el método de inoculación seleccionado. El grado de adaptación de las cepas de rizobios a las condiciones locales del suelo influirá fuertemente en la competencia entre cepas (revisado por Mendoza-Suárez *et al.*, 2021).

La competencia en nodulación es una característica adaptativa clave de los rizobios que cobra una gran importancia en la aplicación práctica de los inoculantes. Sin embargo, la base genética de este proceso aún no se conoce completamente. Se sabe que la competitividad, de manera similar a la SNF, está controlada por genes específicos que se expresan a lo largo del desarrollo del nódulo (Ampe *et al.*, 2003; Barnett *et al.*, 2004). Para ser competitiva y efectiva en la SNF, una cepa élite debe poseer componentes que la capaciten para (i) colonizar exitosamente la rizosfera y beneficiarse de los nutrientes disponibles de una manera efectiva, (ii) impedir el crecimiento de otras bacterias, (iii) establecer una simbiosis eficiente, y (iv) promover el crecimiento vegetal. Manipular la expresión de estos rasgos, bien genéticamente, bien a través de las condiciones de cultivo, puede mejorar la habilidad de las cepas de rizobios inoculadas para competir frente a las poblaciones microbianas endógenas del suelo (revisado por Mendoza-Suárez *et al.*, 2021).

### **3.6. Fijación biológica de N<sub>2</sub>**

La BNF (o SNF si tiene lugar en el interior de los nódulos) es un proceso dinámico y de alta demanda de energía (Rosenblueth *et al.*, 2018), y consiste en la reducción de N<sub>2</sub> atmosférico a NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, haciendo asimilable el N<sub>2</sub> inerte por la planta, como se ha comentado anteriormente, a través de la siguiente reacción:



Los microorganismos que pueden llevar a cabo este proceso se conocen como diazotrofos. Una pequeña fracción del ecosistema rizosférico de la planta está compuesta por diazotrofos de vida libre. Para la consecución de la BNF, es necesaria la actividad de la enzima nitrogenasa, la cual es sensible a la presencia de O<sub>2</sub>. Las propiedades bioquímicas, estructurales y espectroscópicas de la nitrogenasa han sido recientemente revisadas por Einsle y Rees (2020). Dado que los rizobios son microorganismos aerobios obligados, requieren la cooperación de la planta para desarrollar mecanismos que contribuyan a crear un entorno microaeróbico adecuado para la SNF. En el interior de los nódulos, las bacterias se rodean por una membrana de la célula vegetal, originando un



complejo llamado simbiosoma, donde experimentan un ambiente microaeróbico y se diferencian en bacteroides, las formas especializadas que sintetizan la nitrogenasa (revisado por Udvardi y Poole (2013) y Mahmud *et al.* (2020)). Estas condiciones microaeróbicas en el interior del nódulo se consiguen por tres estrategias (revisado por Rutten y Poole, 2019): (i) una barrera de difusión del O<sub>2</sub> en las capas celulares externas de los nódulos, que limita la entrada de O<sub>2</sub> al simbiosoma, (ii) la síntesis de la leghemoglobina (Lb) por parte de la planta que une el O<sub>2</sub> con una alta afinidad y lo transporta rápidamente a los bacteroides del simbiosoma y las mitocondrias de las células infectadas, y (iii) unas tasas respiratorias más altas por los bacteroides y las mitocondrias vegetales, que consumen el O<sub>2</sub> tan rápido como entra en el nódulo. En este sentido, los bacteroides pueden consumir el O<sub>2</sub> a una elevada tasa respiratoria gracias a que sintetizan una citocromo oxidasa de tipo *cbb*<sub>3</sub>, la cual presenta alta afinidad por O<sub>2</sub>, lo que le permite a la enzima usarlo como aceptor de e<sup>-</sup> cuando se encuentra en muy bajas concentraciones. Con todo ello, se consiguen concentraciones estables de O<sub>2</sub> libre del orden de nM en las zonas infectadas de los nódulos, que son cuatro órdenes de magnitud inferiores a las que alcanza el O<sub>2</sub> disuelto en equilibrio con el agua (revisado por Delgado *et al.* (1998) y Udvardi y Poole (2013)).

## IV. Desnitrificación en la simbiosis rizobio-leguminosa

Aunque la desnitrificación (apartado 2.4) entre los rizobios es rara, la mayoría de las especies de interés agronómico contienen genes de la desnitrificación en sus genomas. Por ejemplo, *Rhizobium galegae* (anteriormente, *Pseudomonas* sp. G-179) sintetiza las enzimas Nap, NirK y Nor; *Rhizobium sllae* (anteriormente, *Rhizobium hedysari*) sólo expresa NirK; *Rhizobium etli* CFN42 presenta los determinantes genéticos para la síntesis de NirK y cNor; y *B. diazoefficiens* y *E. meliloti* contienen todos los genes de la desnitrificación (revisado por Torres *et al.* (2016) y Salas *et al.* (2021)).

### **4.1. *B. diazoefficiens* como modelo de estudio de la desnitrificación en rizobios**

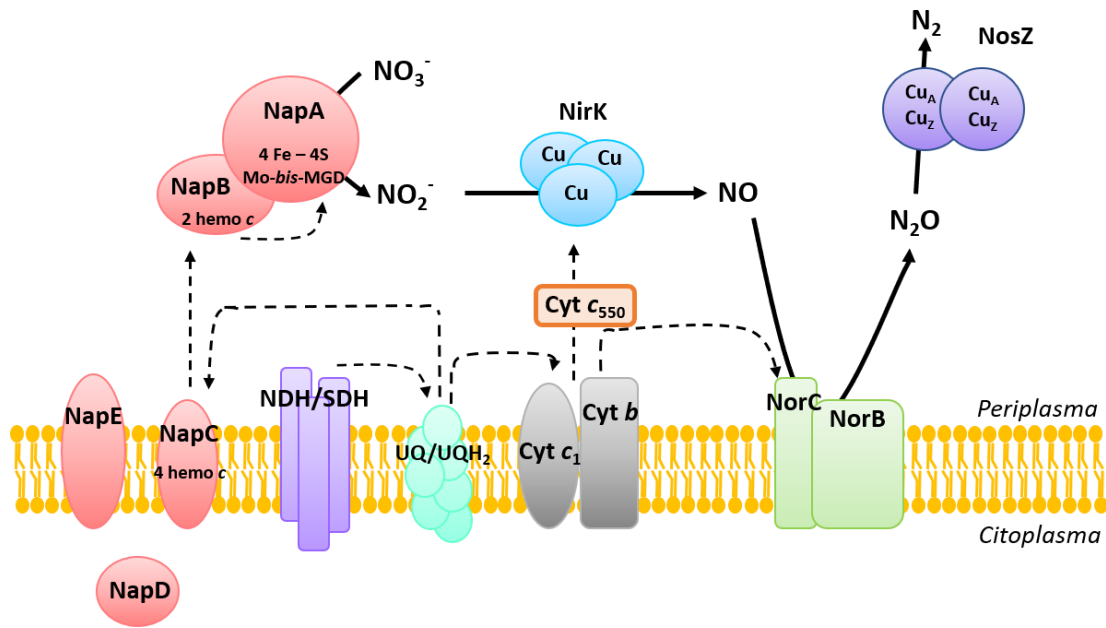
La cepa USDA110 de *B. diazoefficiens* (la cual, anteriormente, se conocía como *Bradyrhizobium japonicum*) (Delamuta *et al.*, 2013) se aisló originalmente de nódulos de soja en Florida en 1957 y, desde entonces, se ha usado ampliamente para el propósito de estudios de genética molecular, fisiología y ecología. Además, la cepa USDA110 se considera rizobio modelo en el estudio de la desnitrificación en bacterias asociadas a leguminosas tanto en vida libre como en simbiosis. En la mayoría de estudios de

genómica funcional, se emplea una cepa de *B. diazoefficiens* derivada de la USDA110, la cual se denomina 110*spc4*, que es resistente espontánea a Spc (Regensburger y Hennecke, 1983), y de la cual se ha publicado recientemente su genoma (Fernández *et al.*, 2019). Es interesante mencionar que dicha cepa presenta una delección de 202 kb y otras diferencias en comparación con su cepa de origen, pero que no afectan ni a su capacidad desnitrificante ni a su simbiosis con soja (Fernández *et al.*, 2019). Es por este motivo por el que ambas cepas de *B. diazoefficiens* se emplean simultáneamente en investigación.

*B. diazoefficiens* es la única capaz de crecer en condiciones anóxicas con  $\text{NO}_3^-$  a través de la ruta de la desnitrificación y donde se ha investigado este proceso extensamente tanto en vida libre como en simbiosis (revisado por Bedmar *et al.* (2005), (2013), Delgado *et al.* (2007), Torres *et al.* (2016) y Salas *et al.* (2021)). Esta bacteria ocupa dos nichos: el suelo en vida libre, y la planta en simbiosis con soja (*G. max*), siratro (*Macroptilium atropurpureum*), judía mungo (*Vigna radiata*) y otras especies de *Vigna*.

En *B. diazoefficiens*, la desnitrificación depende de los genes *napEDABC* (Delgado *et al.*, 2003), *nirK* (Velasco *et al.*, 2001), *norCBQD* (Mesa *et al.*, 2002), y *nosRZDFYLX* (Velasco *et al.*, 2004), que codifican las enzimas Nap, NirK, cNor y Nos de la desnitrificación, respectivamente (Figura 7). En vida libre, una cepa mutante en *napA* reveló su incapacidad para crecer anaeróbicamente con  $\text{NO}_3^-$  como aceptor final de  $e^-$  y de expresar la actividad nitrato reductasa periplásmica (Delgado *et al.*, 2003). La secuenciación del genoma de *B. diazoefficiens* (Kaneko *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2019) confirmó la ausencia de genes *nar*, responsables de la síntesis de Nar (apartado 2.4.1), por lo que Nap constituye la única enzima que lleva a cabo la reducción respiratoria del  $\text{NO}_3^-$  y es la que inicia la desnitrificación en *B. diazoefficiens* (Delgado *et al.*, 2003). Una cepa deficiente en *nirK*, carente de actividad nitrito reductasa respiratoria, es incapaz de crecer en anoxia con  $\text{NO}_3^-$ , y acumula  $\text{NO}_2^-$  en el medio (Velasco *et al.*, 2001). Las cepas mutantes *norC* y *norB* de *B. diazoefficiens* no pueden crecer en condiciones desnitrificantes, acumulando NO (Mesa *et al.*, 2002). Finalmente, las cepas mutantes en los genes *nosR* y *nosZ* crecen en condiciones desnitrificantes, pero acumulan  $\text{N}_2\text{O}$ , en lugar de  $\text{N}_2$ , como producto final de la desnitrificación (Velasco *et al.*, 2004). Además, citocromos accesorios como *c<sub>550</sub>*, codificado por *cycA*, son necesarios para el transporte de  $e^-$  durante la desnitrificación, siendo esencial para la cesión de  $e^-$  a NirK (Bueno *et al.*, 2008). Recientemente se ha descubierto que este citocromo también está implicado en la actividad Nos, aunque se presume que, en su ausencia, una ruta

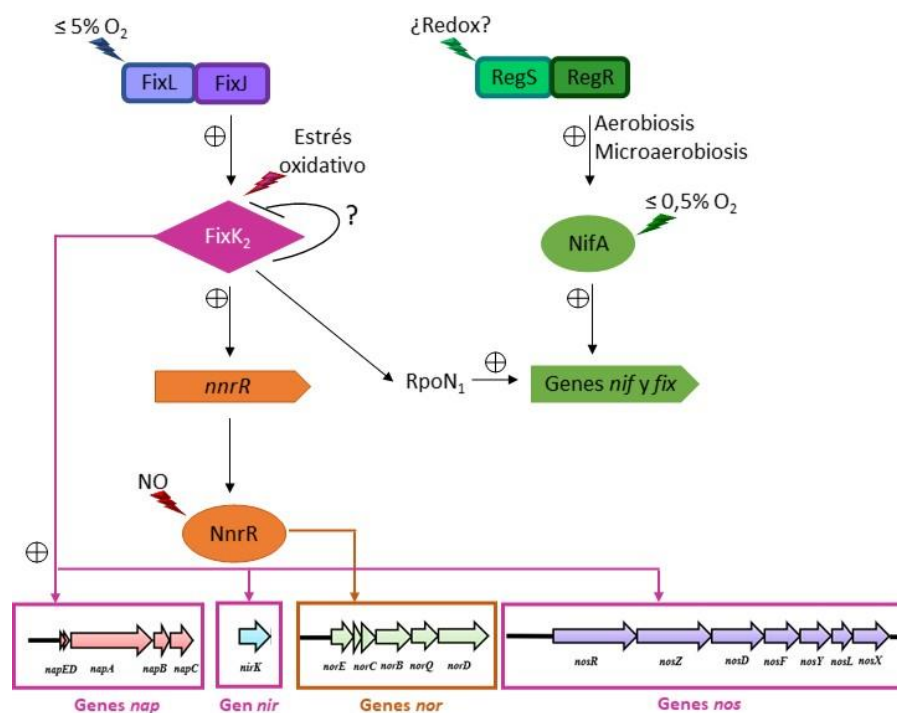
alternativa de  $e^-$  supliría su función (Jiménez-Leiva *et al.*, 2019). No obstante, ninguna proteína de tipo azurina o pseudoazurina se ha anotado en el genoma de *B. diazoefficiens*.



**Figura 7.** Representación esquemática de la ruta de la desnitrificación en *B. diazoefficiens*. UQ, ubiquinona; UQH<sub>2</sub>, ubihidroquinona; NDH, NADH deshidrogenasa; SDH, succinato deshidrogenasa; cyt, citocromo. Las flechas discontinuas indican el flujo de electrones. Adaptada de Torres *et al.* (2016) y de la tesis de Andrea Jiménez-Leiva (2019).

Al igual que ocurre con otros desnitrificantes, la expresión de los genes de la desnitrificación en *B. diazoefficiens* requiere tanto limitación de O<sub>2</sub> como presencia de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> o de otro NO<sub>x</sub> (Bedmar *et al.*, 2005). Esta bacteria detecta la señal de bajo O<sub>2</sub> a través de dos cascadas reguladoras de respuesta a O<sub>2</sub> interconectadas: FixLJ-FixK<sub>2</sub>-NnrR, y RegSR-NifA (revisado por Torres *et al.* (2011), Bueno *et al.* (2012), Torres *et al.* (2016) y Salas *et al.* (2021)) (Figura 8). Una disminución moderada en la concentración de O<sub>2</sub> en la fase gaseosa ( $\leq 5\%$ ) es suficiente para activar la expresión de las dianas dependientes de FixLJ-FixK<sub>2</sub> (Sciotti *et al.*, 2003). La proteína hemo quinasa sensora FixL capta la señal de bajo O<sub>2</sub> y se autofosforila, transfiriendo el grupo fosfato al regulador de respuesta FixJ, que activa entonces la transcripción del gen *fixK<sub>2</sub>*. Este gen codifica FixK<sub>2</sub>, el cual es un regulador transcripcional de la familia de reguladores transcripcionales bacterianos Crp/FNR (del inglés, *cAMP receptor protein/fumarate and nitrate reductase regulatory protein*), que engloba reguladores implicados en la coordinación de la transición del metabolismo aeróbico al anaeróbico en bacterias anaerobias facultativas en condiciones limitantes de O<sub>2</sub>. A continuación, FixK<sub>2</sub> induce la expresión de los genes *nap*, *nirK* y *nor* y *nos*, y genes reguladores tales como *rpoN<sub>1</sub>*, *fixK<sub>1</sub>* y *nnrR* (Mesa *et al.*, 2003; Mesa *et*

al., 2008). El producto de este último gen, NnrR (del inglés, *nitrite and nitric oxide reductase regulator*) también se requiere para la máxima expresión de los genes de la desnitrificación (Mesa *et al.*, 2003; Bueno *et al.*, 2017; Torres *et al.*, 2017). Recientemente, se ha documentado una regulación diferente de la expresión de los genes de la desnitrificación en respuesta a microoxia, a NO<sub>x</sub>, y a las proteínas reguladoras FixK<sub>2</sub> y NnrR en *B. diazoefficiens*. En esta cascada reguladora, la expresión de los genes *napEDABC*, *nirK* y *nosRZDFYLX* requiere de condiciones microóxicas y depende directamente de FixK<sub>2</sub> (Bueno *et al.*, 2017; Torres *et al.*, 2017). En cambio, el NO es la señal clave en la expresión de *norCBQD*, siendo NnrR el regulador que interacciona directamente con el operón *norCBQD* (Bueno *et al.*, 2017). El mecanismo por el cual NnrR detecta NO como molécula señal aún se desconoce. Sin embargo, recientemente, se han revelado los determinantes moleculares discriminatorios que permiten a FixK<sub>2</sub> el reconocimiento y la activación selectiva de sus dianas (Cabrera *et al.*, 2021).



**Figura 8.** Red de regulación de los genes de la desnitrificación de *B. diazoefficiens* en respuesta a bajo O<sub>2</sub> y óxido nítrico (NO). Los signos positivos indican regulación positiva. Las flechas perpendiculares indican regulación negativa. Adaptada de Fernández *et al.* (2016) y la tesis de Andrea Jiménez-Leiva (2019).

La segunda cascada reguladora en *B. diazoefficiens* en respuesta a O<sub>2</sub>, RegSR-NifA, responde a concentraciones más bajas de O<sub>2</sub> ( $\leq 0.5\%$ ) (Figura 8). En esta cascada, el regulador de respuesta RegR del sistema regulador de dos componentes RegSR induce la expresión del operón *fixR-nifA* (revisado por Torres *et al.*, 2016) independientemente de las condiciones de oxígeno. Cuando la concentración de oxígeno es muy baja ( $\leq 0.5\%$ ),

la proteína NifA induce su propia síntesis junto con RpoN (o el factor  $\sigma^{54}$  de la ARN polimerasa). En *B. diazoefficiens*, RpoN está codificada por los genes *rpoN<sub>1</sub>* y *rpoN<sub>2</sub>*, y el primero de ellos está bajo el control de FixK<sub>2</sub>, por lo que este gen representa el enlace entre ambas cascadas reguladoras. Las dianas de NifA incluyen a los genes *nif* y *fix*, que están implicados en la fijación de N<sub>2</sub> directa o indirectamente (Nienaber *et al.*, 2000; Hauser *et al.*, 2007). Asimismo, se ha demostrado que NifA es necesaria para la máxima expresión de los genes *nap*, *nirK* y *nor* (Bueno *et al.*, 2010), aunque todavía se está investigando si estos genes son diana directa o indirecta de NifA. Aparte de NifA, se ha demostrado también la implicación de RegR en el control de la desnitrificación en *B. diazoefficiens* (Torres *et al.*, 2014a), concretamente en la expresión de los genes estructurales *nor* y *nos*, así como de genes codificantes de proteínas de transporte de e<sup>-</sup>, como *cycA* o *cy2*, entre otros. También se ha demostrado la capacidad de RegR de interactuar con los promotores de *norC* y *nosR* (Torres *et al.*, 2014a). Estudios de expresión con la fusión *norC-lacZ* y análisis de detección de hemo *c* han demostrado que se requieren NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y anoxia para la inducción de los genes *nor* dependiente de RegR, y que este control es independiente de la proteína sensora RegS (Torres *et al.*, 2014a).

Por tanto, se sugiere la existencia de una red reguladora compleja del proceso de la desnitrificación en *B. diazoefficiens* y, por extensión, de las emisiones de N<sub>2</sub>O por nódulos de soja. No obstante, aunque se ha avanzado en la regulación de los genes *nap*, *nir* y *nor*, implicados en la producción de N<sub>2</sub>O y de los genes *nos*, implicados en la reducción de N<sub>2</sub>O, aún queda mucho por investigar en relación a los mecanismos moleculares implicados en el control de los genes de la desnitrificación por las cascadas FixLJ-FixK<sub>2</sub>-NnrR, y RegSR-NifA.

### **4.2. Desnitrificación en *E. meliloti***

*E. meliloti* es una bacteria aeróbica del suelo que establece asociaciones simbióticas fijadoras de N<sub>2</sub> con plantas de los géneros *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*. La cepa 1021 de *E. meliloti* es un rizobio modelo que se ha empleado extensamente para entender mejor la interacción entre *E. meliloti* y *M. truncatula*, que ha sido y sigue siendo el objeto de una amplia investigación bioquímica, molecular y genética (Jones *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2011). Una inspección del genoma de la cepa silvestre 1021 de *E. meliloti* reveló la existencia de tres replicones con características estructurales y funcionales diferentes: un cromosoma circular de 3,65 Mpb, y dos megaplásmidos: pSymA, de 1,35 Mpb, y pSymB, de 1,68 Mpb (Galibert *et al.*, 2001). El plásmido pSymA

contiene una fracción amplia de genes específicamente implicados en la simbiosis y genes probablemente implicados en el metabolismo del C, transporte, respuesta a factores de estrés y respuesta de resistencia, lo que otorga a *E. meliloti* una ventaja en su nicho ecológico (Barnett *et al.*, 2001). Además, en pSymA se localiza un segmento particularmente rico en genes codificantes de proteínas relacionadas con el metabolismo del N, incluyendo todos los genes de la desnitrificación, *napEFDABC*, *nirK*, *norECBQD* y *nosRZDFYLX*. Análisis transcriptómicos demostraron que estos genes se inducen en *E. meliloti* en respuesta a microoxia y en condiciones simbióticas (Becker *et al.*, 2004).

De forma parecida a como se describe para *B. diazoefficiens*, en condiciones microóxicas de vida libre, la expresión de los genes de la desnitrificación se encuentra coordinada por el sistema regulador de dos componentes FixLJ a través del regulador transcripcional FixK. En este sistema, la proteína fosforilada FixJ activa la transcripción de los genes reguladores *fixK* y *nifA*, que inducen la expresión de los genes *fix* (implicados en la respiración) y *nif* (implicados en la SNF), respectivamente (Becker *et al.*, 2004; Bobik *et al.*, 2006). En *E. meliloti*, FixLJ responde tanto a condiciones microóxicas como a NO. Sin embargo, el O<sub>2</sub> es la única molécula capaz de suprimir la actividad quinasa de FixL (Gilles-González *et al.*, 2008). La proteína reguladora NnrR también participa en la respuesta a NO. En presencia de NO, NnrR regula la expresión de *nirK* y *norC*, así como de otros genes necesarios para la desnitrificación tales como *azul* y *nnrS* (Meilhoc *et al.*, 2010). Sin embargo, FixK y NnrR pertenecen a dos cascadas reguladoras diferentes, al contrario que en *B. diazoefficiens*, donde ambos reguladores forman parte de la misma cascada (Cabrera *et al.*, 2011).

Sin embargo, a pesar de poseer y expresar los genes de la desnitrificación, se considera a *E. meliloti* un desnitrificante parcial por su incapacidad para crecer en condiciones anaeróbicas con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> como aceptor final de e<sup>-</sup>, es decir, en condiciones desnitrificantes. Sin embargo, los genes estructurales *napA*, *nirK*, *norC* y *nosZ* son funcionales, ya que están involucrados en la síntesis de las enzimas de la desnitrificación en condiciones microaeróbicas (Torres *et al.*, 2014b). Estos autores demostraron en dicho trabajo que la expresión del gen *napA* era significativamente más baja respecto a la del resto de genes de la desnitrificación en condiciones anóxicas. Recientemente, Torres y colaboradores (2018) revelaron que esta limitación en la inducción de los genes *nap* era la responsable de que *E. meliloti* fuera incapaz de respirar NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en un ambiente anóxico. De hecho, estos autores demostraron que la sobreexpresión

de los genes *napEFDABC* permitía a *E. meliloti* crecer en condiciones anóxicas con nitrato como sustrato respiratorio. Además, la cepa sobreexpresante de *nap* producía unos niveles de N<sub>2</sub>O significativamente mayores comparados con los de la cepa silvestre 1021 (Torres *et al.*, 2018).

Por otro lado, empleando un sistema de incubación robotizado, Bueno y colaboradores (2015) confirmaron la incapacidad de *E. meliloti* de crecer anaeróbicamente a expensas de la respiración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Sin embargo, estos estudios demostraron la habilidad de *E. meliloti* 1021 de crecer a través de la respiración anaeróbica de N<sub>2</sub>O a N<sub>2</sub>. La actividad Nos en dicha cepa no dependía de la presencia de NO u otros NO<sub>x</sub>, por lo que su expresión podía ser inducida tan solo por un descenso en el nivel de O<sub>2</sub>. Cuando se incubó a pH 6, la capacidad de *E. meliloti* de reducir N<sub>2</sub>O disminuyó drásticamente, lo que corroboraba observaciones previas en bacterias del suelo y en cultivos puros de *P. denitrificans*, en los cuales la expresión de una Nos funcional se ve negativamente afectada a pH ácido (Bergaust *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014). Además, la presencia en el medio de cultivo de sustratos de C altamente reducidos, como el butirato, también provocó un descenso en la actividad de la enzima Nos (Bueno *et al.*, 2015). Dicho estudio demuestra que la cepa 1021, que, en condiciones anóxicas, no puede generar N<sub>2</sub>O a partir de la respiración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pero puede reducir el N<sub>2</sub>O emitido por otros organismos, presenta el potencial de actuar como sumidero de N<sub>2</sub>O. Estos resultados también podrían extrapolarse a cepas de *E. meliloti* fijadoras de N<sub>2</sub> competitivas y eficientes con el objeto de desarrollar estrategias que contribuyan a reducir las emisiones de N<sub>2</sub>O por cultivos de alfalfa. Por consiguiente, la emisión de N<sub>2</sub>O procedente de los suelos podría descender si las plantas de alfalfa se inocularan con cepas sobreexpresantes de Nos.

### **4.3. Metabolismo de NO y N<sub>2</sub>O en nódulos de leguminosas**

La primera evidencia de que la desnitrificación llevada a cabo por los rizobios en vida libre también podría tener lugar en los nódulos, fue la expresión *in situ* de los genes de la desnitrificación de *B. diazoefficiens* en nódulos de soja (Mesa *et al.*, 2004). Dichos resultados sugerían que el bajo nivel de O<sub>2</sub> existente en los nódulos era el principal factor dominante en la expresión de estos genes en nódulos de soja. De hecho, el encharcamiento, que provoca un descenso en la concentración de O<sub>2</sub> en el interior de los nódulos, incrementaba significativamente tanto la expresión como la actividad de las

enzimas de la desnitrificación en nódulos de soja, incluyendo un marcado aumento en la actividad de Nap (Meakin *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2010).

La inoculación de plantas de soja con las cepas mutantes en los genes de la desnitrificación mencionadas en el apartado 4.1 no afectaba a la SNF cuando el crecimiento de la planta dependía exclusivamente de dicho proceso (Mesa *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando se añadió  $\text{KNO}_3$  al medio, las enzimas NirK y NorCB de la desnitrificación jugaban un papel en la formación del nódulo, pero no en su función (Mesa *et al.*, 2004). En respuesta a las condiciones de encharcamiento, la inoculación con la cepa mutante *nirK* tuvo una ligera ventaja para la SNF frente a la inoculación con la cepa silvestre o la mutante *norC*, lo que sugería que el NO generado por la NirK en nódulos de soja en respuesta a encharcamiento ocasionaba un efecto negativo sobre la actividad de la enzima nitrogenasa (Sánchez *et al.*, 2011), posiblemente al reducir la expresión de los genes *nifH* y *nifD* responsables de su síntesis (Sánchez *et al.*, 2010). Asimismo, se ha demostrado además que el NO también contribuye a la formación de complejos nitrosil-leghemoglobina (LbNO) (Sánchez *et al.*, 2010). En cuanto a su eliminación, la enzima Nor constituye la principal proteína implicada en la reducción del NO. Adicionalmente, en los bacteroides se activan mecanismos de detoxificación de NO y, recientemente, se ha propuesto que los nódulos inducidos por una cepa mutante en una hemoglobina de dominio único (denominada Bjgb) expresaron mayor actividad de Nor y, en consecuencia, acumularon menos NO que los nódulos WT, contribuyendo a la protección de la nitrogenasa frente al NO (Salas *et al.*, 2020) (Figura 9).

Por otra parte, en trabajos previos, se demostró la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  por nódulos de soja (Mesa *et al.*, 2004; Sameshima-Saito *et al.*, 2006; Inaba *et al.*, 2012). Posteriormente, se demostró que el  $\text{NO}_3^-$  y la anoxia provocada por encharcamiento son factores ambientales que inducen la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  por dichos nódulos (Tortosa *et al.*, 2015). La enzima Nor es la principal candidata para la síntesis de este gas, ya que esta enzima reduce el NO a  $\text{N}_2\text{O}$ . Adicionalmente, se ha demostrado que la enzima Nos de *B. diazoefficiens* es esencial para rebajar las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  en nódulos de soja (Tortosa *et al.*, 2015). En base a ello, Itakura y colaboradores (2013) comprobaron que la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  por suelos cultivados con soja podía disminuir mediante la inoculación de las plantas con cepas de *B. diazoefficiens* sobrepresantes de *nosZ*, por lo que la inoculación con estas cepas podría emplearse como estrategia para mitigar las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  procedentes de las crecientes extensiones de los campos de soja.



Así, se ha propuesto que la desnitrificación de los bacteroides de *B. diazoefficiens* constituye el principal proceso responsable de la producción de NO y N<sub>2</sub>O en nódulos de soja, ya que los niveles de estos gases descendieron significativamente en los nódulos generados por la cepa mutante en *napA*, donde la desnitrificación se encuentra bloqueada (Sánchez *et al.*, 2010; Tortosa *et al.*, 2015). No obstante, estos autores detectaron niveles basales de ambos gases en los nódulos originados por esta cepa mutante. De manera similar a como ocurre en vida libre, podría ser posible que la nitrato reductasa asimilatoria (NasC) actúe como fuente adicional de NO en nódulos de soja (Figura 9), aunque aún no se ha demostrado la expresión ni el papel fisiológico de la asimilación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por *B. diazoefficiens* en nódulos (Salas *et al.*, 2021).

Durante la simbiosis *M. truncatula*-*E. meliloti*, el NO desempeña un papel positivo durante las etapas tempranas de infección (del Giudice *et al.*, 2011). De forma similar a como ocurre en nódulos de soja, los genes *napA* y *nirK* de *E. meliloti* parecen estar involucrados en la formación de NO en nódulos de *M. truncatula*, al menos, en la etapa madura. Ambos genes se expresan en la zona de fijación de los nódulos de esta planta, pero no juegan un papel crucial en la simbiosis (Horchani *et al.*, 2011). Aunque se considera que la desnitrificación efectuada por *E. meliloti* constituye la principal ruta enzimática precursora de NO, estudios recientes han sugerido que la asimilación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, en la que actúan las enzimas nitrato reductasa (NarB) y nitrito reductasa (NirBD), participa de manera indirecta en la síntesis de NO en concierto con la desnitrificación (Ruiz *et al.*, 2019).

En los nódulos de *M. truncatula*, los sistemas de detoxificación de NO también resultan esenciales para mantener una baja concentración estable de NO intracelular que permita una simbiosis eficiente. La principal enzima implicada en el consumo de NO en estos nódulos es la cNor de *E. meliloti* (Blanquet *et al.*, 2015), aunque también se ha sugerido la participación combinada de la flavohemoglobina Hmp de *E. meliloti* y las proteínas NnrS<sub>1</sub> y NnrS<sub>2</sub> en la reducción del NO en nódulos de *M. truncatula* (Blanquet *et al.*, 2015) (Figura 9). El gen *nnrS* se ubica normalmente cerca de los genes que codifican al regulador transcripcional NnrR, y codifica una proteína transmembrana que contiene hemo y Cu. No obstante, la función reguladora de NnrS se desconoce por el momento (Bartnikas *et al.*, 2002). Respecto al metabolismo de N<sub>2</sub>O, es necesario mencionar que a diferencia de soja, los estudios relacionados con la emisión de N<sub>2</sub>O por nódulos de alfalfa son inexistentes.

Recientemente, se ha avanzado en los estudios relacionados con el metabolismo del NO y el N<sub>2</sub>O en la simbiosis que se establece entre *R. etli* y las plantas de judía (*P. vulgaris*). El genoma de la cepa silvestre de *R. etli* CFN42 contiene un cromosoma y seis plásmidos de gran tamaño (pCFN42), los cuales se nombran de a hasta f (pCFN42a-pCFN42f), y cuyos tamaños se encuentran en el rango de 184,4-642,45 kb (González *et al.*, 2006). El plásmido pCFN42d se corresponde con el plásmido simbiótico (pSym) e incluye genes implicados en los procesos de nodulación y SNF. El plásmido pCFN42f contiene un clúster genético conformado por los genes de la desnitrificación *nirK* y *norEFQBQD*, además de otros genes relacionados (Girard *et al.*, 2000; González *et al.*, 2006). Esta bacteria carece de genes *nap*, *nir* y *nos*, y es incapaz de respirar NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. La presencia de regiones codificantes de NirK y Nor en *R. etli* sugiere una ruta de detoxificación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO que prevendría la acumulación de NO dentro de células crecidas en vida libre. Mediante ensayos *in vivo*, se ha demostrado que NirK es necesaria para la reducción de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NO y que la enzima Nor resulta esencial para detoxificar NO en vida libre (Bueno *et al.*, 2005; Gómez-Hernández *et al.* 2011). En cuanto a los nódulos de judía, se observó un incremento en los niveles de complejos LbNO en los nódulos generados por una mutante *norC* de *R. etli* y descendían en los producidos por una mutante *nirK*, en comparación con los nódulos de la cepa silvestre (Gómez-Hernández *et al.*, 2011). Es interesante mencionar que la presencia de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en la solución nutritiva de las plantas de judía redujo la actividad nitrogenasa específica en nódulos de la cepa silvestre y de la mutante *norC*. Sin embargo, esta inhibición de la actividad nitrogenasa por NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no se detectó en nódulos de la mutante *nirK*, probablemente debido a los bajos niveles del citotóxico NO producidos en estos nódulos (Gómez-Hernández *et al.*, 2011). Como se ha mencionado previamente, *R. etli* carece de los genes que codifican Nap o Nar. En los nódulos de judía, el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> añadido a la solución nutritiva puede reducirse a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> por la actividad nitrato reductasa de la planta, que constituye la fuente enzimática más importante de NO a partir de la reducción de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Chamizo-Ampudia *et al.*, 2017) (Figura 9). En los bacteroides, la nitrato reductasa citosólica de *R. etli*, denominada NarB, puede ser candidata a reducir el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, actuando como fuente productora de NO dependiente de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en nódulos de judía. La contribución de la NarB de *R. etli* a la producción de NO en nódulos de *P. vulgaris* se encuentra actualmente en investigación. En cuanto a la producción de N<sub>2</sub>O, dado que *R. etli* carece de los genes *nos*, los cuales codifican la enzima Nos, la contribución de los nódulos de judía a las emisiones de N<sub>2</sub>O puede ser relevante. Recientemente, se ha demostrado que los genes *nirK* y *nor* se



nivel celular, el Cu juega un papel esencial en procesos tales como el metabolismo de la pared celular, la señalización por factores de transcripción, la fosforilación oxidativa, la movilización del Fe y la biogénesis del cofactor de Mo (revisado por Yruela, 2009).

Por tanto, las plantas requieren Cu para su crecimiento y desarrollo normal, y cuando no se encuentra biodisponible, desarrollan síntomas específicos de deficiencia, la mayoría de los cuales afectan a las hojas jóvenes y a los órganos reproductivos. Sin embargo, las propiedades redox que hacen al Cu esencial también contribuyen a su inherente toxicidad. El ciclo redox entre los dos cationes de Cu puede catalizar la producción de radicales hidroxilo altamente tóxicos, con el consiguiente daño a las células a nivel de lípidos, membranas, ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas. Aunque el Cu normalmente se une a las proteínas, su capacidad para iniciar daño oxidativo posibilita que pueda interferir con importantes procesos celulares, como la fotosíntesis, la síntesis de pigmentos, la permeabilidad de la membrana plasmática, y otros procesos metabólicos, causando subsiguientemente una fuerte inhibición del desarrollo vegetal. El Cu en exceso puede ser extremadamente tóxico, provocando síntomas como clorosis y necrosis, o inhibición del crecimiento de las raíces y el tallo. A nivel celular, el exceso de Cu puede inactivar y distorsionar la estructura proteica como resultado de su inevitable unión a proteínas. La toxicidad puede originarse por: (i) unión a los grupos tiol de las proteínas, inhibiendo, por tanto, la actividad enzimática o la función de la proteína, (ii) inducción de deficiencia de otros iones esenciales, (iii) alteración de procesos de transporte celular, y (iv) daño oxidativo. Tanto la deficiencia como el exceso de Cu pueden provocar desórdenes en el crecimiento y desarrollo de la planta (revisado por Yruela, 2009).

La concentración crítica de Cu libre en el medio nutritivo (por debajo de la cual ocurre deficiencia de Cu) oscila entre  $10^{-14}$  y  $10^{-16}$  M. Las plantas habitualmente encuentran un aporte variable de Cu en el suelo dado que, típicamente, las concentraciones de Cu en el suelo se encuentran en el rango de  $10^{-6}$ - $10^{-9}$  M, pero pueden requerir aún solubilizar y reducir el metal. En la rizosfera, las actividades de las raíces y los microbios pueden influir en la movilidad química de los iones metálicos y, por consiguiente, en la captación por las plantas como consecuencia de alteraciones en el pH del suelo o del C orgánico disuelto (revisado por Yruela, 2009).

La mayoría de las leguminosas presentan otros sumideros de metales aparte de sus tejidos vegetativos: los nódulos, en cuyo interior, los bacteroides llevan a cabo la SNF gracias a la enzima nitrogenasa, que es muy sensible al O<sub>2</sub> (apartado 3.6). Para regular los niveles de O<sub>2</sub>, los bacteroides sintetizan la citocromo oxidasa de tipo *cbb<sub>3</sub>* (apartado 3.6), que contiene cofactores de Fe y Cu. Otras metaloenzimas también son críticas para la SNF, como las que detoxifican los radicales libres que se generan en el nódulo (Becana *et al.*, 2010). Además, las enzimas de la desnitrificación de los rizobios y los bacteroides son complejas metaloenzimas que requieren varios cofactores redox activos, como Fe, Mo y/o Cu, para sus respectivas actividades (apartado 2.4). En definitiva, la variedad de metaloproteínas y las altas concentraciones de Cu que requieren hacen de los nódulos uno de los principales sumideros de metales en las leguminosas. De hecho, la disponibilidad de metal limita la formación y el desarrollo de los nódulos. Para evitar esto, las plantas noduladas inducen una respuesta de deficiencia de metal para asegurar un aporte adecuado de metales al nódulo. Esta respuesta indica asimismo que todos los metales deben ser proporcionados por la planta huésped, en lugar de utilizar algún tipo de reservorio de metal del rizobio (revisado por González-Guerrero *et al.*, 2016).

### **5.2. Regulación de la respuesta a Cu en bacterias**

La habilidad del Cu para transitar entre dos estados de oxidación (Cu<sup>+</sup> y Cu<sup>2+</sup>), hace a este metal ideal como cofactor de enzimas redox que utilizan O<sub>2</sub> como sustrato. La mayoría de las especies, desde bacterias a humanos, sintetizan una gran variedad de cuproenzimas, entre ellas, amino-oxidasas, citocromo *c* oxidasas, lacasas, metano monooxigenasas, oxidasas multicobre, nitrito oxidasas, plastocianinas, superóxido dismutasas y tirosinasas, que juegan papeles importantes en procesos celulares como transducción de energía, movilización del Fe y respuesta a estrés oxidativo (Grass *et al.*, 2011). En exceso, el Cu es altamente tóxico para las células vivas, e interacciona con los grupos tiol libres de las proteínas, desestabiliza los cofactores Fe-S, compite con otros metales por los sitios de unión, y promueve la formación de especies reactivas del O<sub>2</sub>. Por consiguiente, las bacterias necesitan controlar estrechamente la homeostasis del Cu para mantener su metabolismo y viabilidad (apartado 5.1). En base a la detallada revisión de Rademacher y Masepohl (2012), se distinguen 9 clases de reguladores transcripcionales de respuesta a Cu representadas por los miembros fundadores de *E. coli* (clases 1-3; CueR, CusRS, ComR), otras proteobacterias (clases 4 y 5; CopL, CorE), cianobacterias (clase 6; BxmR) y bacterias Gram positivas (clases 7-9; CopY, CsoR, YcnK). La mayoría

de los reguladores sensores de Cu descritos pertenecen a las clases 1 (CueR), 2 (CusRS), 7 (CopY) y 8 (CsoR).

CueR (clase 1) pertenece a la familia de activadores transcripcionales MerR (Brown *et al.*, 2003), los cuales exhiben una estructura en tres dominios: un dominio N-terminal de unión a ADN (que contiene un motivo hélice-giro-hélice [HTH]), un dominio central de dimerización, y un dominio C-terminal de unión a efector. Muchos miembros de la familia MerR responden a iones metálicos, como  $Hg^{2+}$  (MerR),  $Zn^{2+}$  (ZntR),  $Pb^{2+}$  (PbrR) y  $Cu^+$  (CueR). Los activadores de tipo CueR se encuentran ampliamente distribuidos entre las proteobacterias (Liu *et al.*, 2007) y, aparte de *E. coli*, se han identificado en  $\gamma$ -proteobacterias como *P. aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* y *Salmonella enterica*, y en  $\alpha$ -proteobacterias como *Agrobacterium tumefaciens* y *R. sphaeroides* (revisado por Rademacher y Masepohl, 2012).

El sistema CusRS (clase 2) es un sistema de dos componentes. Tras la unión del efector, la quinasa sensora se autofosforila en un residuo conservado de His y, después, transfiere ese grupo fosfato a un residuo de aspartato del regulador de respuesta. A continuación, el regulador fosforilado activa la transcripción de sus genes diana. *E. coli* posee 30 quinasas sensoras y 34 reguladores de respuesta, la mayoría de los cuales son sistemas reguladores de dos componentes, incluyendo al sistema de respuesta a Cu CusRS (Yamamoto *et al.*, 2005). Estos sistemas CusRS también se han caracterizado en proteobacterias como *P. fluorescens*, *P. putida*, *Pseudomonas syringae* y *Helicobacter pylori*, la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803, y la bacteria Gram positiva *Corynebacterium glutamicum* (revisado por Rademacher y Masepohl, 2012).

El miembro fundador de la clase 7 es CopY de *Enterococcus hirae*. Esta clase está conformada por represores de respuesta a Cu pertenecientes a la superfamilia de reguladores HTH (Solioz *et al.*, 2010). Estos reguladores de tipo CopY se encuentran ampliamente distribuidos entre las bacterias Gram positivas, pero están ausentes aparentemente en las bacterias Gram negativas (Liu *et al.*, 2007). La implicación de este tipo de represores en la homeostasis del Cu no sólo se ha demostrado en esta especie, sino también en *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pneumoniae* (revisado por Rademacher y Masepohl, 2012).

La clase 8 la constituye el represor CsoR de *Mycobacterium tuberculosis* (Liu *et al.*, 2007) y, posteriormente, también se han encontrado este tipo de represores en las bacterias Gram positivas *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Streptomyces lividans*. Se han predicho reguladores de tipo CsoR para muchas proteobacterias, además de cianobacterias y deinococos (Liu *et al.*, 2007). Hasta la fecha, no existen evidencias que apoyen una regulación de genes en respuesta a Cu por CsoR ni en proteobacterias ni en cianobacterias. Sin embargo, se ha demostrado que CsoR controla la homeostasis del Cu en *Thermus thermophilus*, que pertenece al filo *Deinococcus-Thermus*, que se encuentra relacionado con especies de proteobacterias y Gram positivas (Sakamoto *et al.*, 2010). Aparentemente, los homólogos de CsoR son los principales reguladores de respuesta a Cu de un solo componente en los procariotas que carecen de CueR (Liu *et al.*, 2007).

Las estructuras cristalinas se han resuelto para la proteína CsoR de *M. tuberculosis* (Liu *et al.*, 2007), *S. lividans* (Dwarakanath *et al.*, 2012) y *T. thermophilus* (Sakamoto *et al.*, 2010). CsoR constituye homodímeros en *M. tuberculosis*, mientras que en *S. lividans* y *T. thermophilus*, origina tetrámeros. Las estructuras de los tres reguladores son muy similares. Ninguno contiene motivos de unión a ADN conocidos, pero se ha sugerido que esta función la desempeñan grupos antiparalelos de 4 hélices. Los tres reguladores unen 2 iones  $\text{Cu}^+$  por dímero, y cada ion está coordinado por un residuo del primer monómero y dos residuos del segundo monómero. La coordinación de los átomos de  $\text{Cu}^+$  se lleva a cabo por motivos C-H-C en *M. tuberculosis* (Cys<sup>36</sup>-His<sup>61</sup>-Cys<sup>65</sup>) y *S. lividans* (Cys<sup>75</sup>-His<sup>100</sup>-Cys<sup>104</sup>), mientras que, en *T. thermophilus*, se coordina por un motivo C-H-H (Cys<sup>41</sup>-His<sup>70</sup>-His<sup>66</sup>).

La bacteria Gram positiva patógena de humanos *M. tuberculosis* contiene el operón *csoR-rv0968-ctpV*, que codifica al represor CsoR, a una proteína hipotética conservada (DUF1490), y a una ATPasa de Cu denotada como CtpV (Liu *et al.*, 2007). La transcripción de este operón se induce por Cu, lo que es consistente con la función predicha para CtpV en la excreción del exceso de Cu en condiciones de vida libre. Adicionalmente, durante la infección de pulmones de ratón, se induce la expresión de *ctpV*, lo que sugiere que CtpV está implicada, además, en virulencia (Ward *et al.*, 2010).

A concentraciones bajas de Cu en el ambiente externo, CsoR libre de Cu reprime la transcripción del operón *csoR-rv0968-ctpV* mediante su unión a una secuencia palindrómica (GTAGCCCACCCC-N<sub>4</sub>-GGGGTGGGATAC), solapando con la región -35/-10. Cuando CsoR se une a Cu<sup>+</sup>, esta proteína se separa del ADN, lo que conduce a la activación del operón (Liu *et al.*, 2007).

Este represor, CsoR, también se ha encontrado recientemente en rizobios, aunque se han publicado pocos estudios al respecto hasta la fecha. Concretamente, Liang y colaboradores (2016) investigaron los mecanismos de resistencia a Cu en *Bradyrhizobium liaoningense*, y caracterizaron funcionalmente un divergón *csoR-cueA*, codificante del represor CsoR y de una fosfato-ATPasa transportadora de metales pesados, llamada CueA. Estos autores determinaron que este divergón era crucial en la homeostasis del Cu, y que también estaba involucrado en la resistencia frente a Zn y cadmio (Cd), por lo que se trataría de un componente versátil de resistencia a metales. En otro trabajo, Lu y colaboradores (2017) observaron una inducción de la respuesta específica a estrés por metales cuando se expuso a Cu (600 µM) una cepa de *E. meliloti* aislada de *Medicago lupulina*, y entre los genes que se regularon positivamente, se encontraba un regulador transcripcional de tipo CsoR.

### **5.3. El Cu como factor regulador emergente de la desnitrificación**

Además del oxígeno y el NO, el cobre se perfila como un nuevo factor ambiental implicado en el control de la desnitrificación. De hecho, el requerimiento de Cu por parte de la nitrito reductasa (NirK) y de la óxido nitroso reductasa (NosZ) sugiere la implicación de este elemento en el metabolismo del NO y del N<sub>2</sub>O. En este contexto, en cultivos bacterianos de *P. denitrificans* que carecían de Cu, se observó una acumulación de los niveles de N<sub>2</sub>O (Felgate *et al.*, 2012). Durante muchos años, se ha considerado que el Cu es un factor importante en la actividad de NosZ, pero análisis transcriptómicos recientes han demostrado que, además, está implicado en la regulación del operón *nos* a nivel de expresión génica. Un estudio transcriptómico global llevado a cabo por Sullivan y colaboradores (2013) reveló que la deficiencia de Cu no sólo afecta a la maduración funcional de la enzima Nos, sino que, además, ejerce un notable impacto sobre la expresión génica en *P. denitrificans*, puesto que se encontró una regulación negativa del gen *nosZ* en condiciones limitantes de Cu. Adicionalmente, encontraron que los niveles de transcrito de *nosZ* en cepas mutantes *nosC* y *nosR* de *P. denitrificans* eran significativamente más elevados respecto a la cepa silvestre y similares tanto en Cu



limitante como en condiciones de disponibilidad de Cu y, lo que llevó a estos autores a proponer que la represión de *nosZ* que se observaba en Cu limitante desaparecía en estas cepas mutantes en respuesta a la disponibilidad de Cu. Por tanto, estos resultados sugieren que NosC y NosR intervienen en la regulación de *nosZ* en respuesta a Cu, aunque aún no se ha identificado el mecanismo responsable de este control. En cultivos puros de la  $\gamma$ -proteobacteria *P. stutzeri*, una adecuada concentración de Cu biodisponible (150  $\mu$ M) resultó en los niveles de transcripción más elevados de los genes *nirS*, *norB* y *nosZ* (Black *et al.*, 2016). Estos mismos autores confirmaron que existe un umbral óptimo de concentración de Cu que permite maximizar el consumo de N<sub>2</sub>O en *P. stutzeri*. Además, señalaron que un elevado nivel de Cu podía inhibir la reducción de N<sub>2</sub>O a N<sub>2</sub>, y que la biodisponibilidad de Cu podía influir tanto en la síntesis como en la actividad de las enzimas Nir y Nos, así como en la tasa de crecimiento de *P. stutzeri*, lo que implicaba que podía ser posible usar la estequiometría para reducir las emisiones de N<sub>2</sub>O en suelos agrícolas. Esta idea ya fue propuesta por Richardson y colaboradores (2009) como posible estrategia para mitigar las emisiones de N<sub>2</sub>O, la cual requiere un aporte adecuado de micronutrientes esenciales para las reacciones redox, particularmente Fe, Mo y Cu. Actualmente, se requiere ampliar el conocimiento acerca del papel del Cu en el proceso de la desnitrificación en general, y llevado a cabo por los rizobios en simbiosis con las leguminosas en particular.

# **OBJETIVOS/ OBJECTIVES**



## Objetivos

La agricultura constituye una importante fuente del potente gas de efecto invernadero óxido nitroso ( $N_2O$ ) debido a la aplicación en ocasiones abundante y no sincronizada de fertilizantes nitrogenados a los cultivos. La fijación biológica de  $N_2$ , llevada a cabo por la simbiosis rizobio-leguminosa, puede ser una estrategia efectiva para mitigar las emisiones de  $N_2O$ . Sin embargo, determinados factores ambientales pueden afectar a las emisiones de  $N_2O$  derivadas de los cultivos de leguminosas. Estudios realizados en el Grupo de Metabolismo del Nitrógeno en Bacterias Rizosféricas (GMNBR, EEZ-CSIC) han demostrado que la presencia de nitrato resulta esencial para las emisiones de  $N_2O$  y, además, que la aplicación de nitrato junto con encharcamiento inducen notablemente estas emisiones en nódulos de soja (Tortosa *et al.*, 2015). Asimismo, estos autores han demostrado la importancia de la desnitrificación de *B. diazoefficiens* en la liberación de  $N_2O$  por nódulos de soja. Sin embargo, al inicio de esta Tesis Doctoral, se desconocía de qué manera el Cu podía modular las emisiones de  $N_2O$  generadas por estos nódulos.

Por otro lado, en el GMNBR también se investiga la simbiosis que la alfalfa establece con la especie de rizobio *E. meliloti*. Esta simbiosis es relevante desde el punto de vista agronómico, ya que la alfalfa es el cultivo forrajero más importante del mundo, y el de mayor importancia superficial, productiva y económica a nivel nacional. Se conoce que *E. meliloti* contiene todos los genes de la desnitrificación, pero es incapaz de crecer en condiciones desnitrificantes debido a una limitación en la expresión de los genes *nap* (Torres *et al.*, 2014b). En este contexto, nuestro grupo ha demostrado que la sobreexpresión de *nap* restaura la capacidad de dicho microorganismo de crecer en condiciones anóxicas a través de la desnitrificación y, además, conlleva un drástico aumento de las emisiones de  $N_2O$  en cultivos de vida libre (Torres *et al.*, 2018). En un trabajo previo, Lecomte y colaboradores (2018) sugirieron que la desnitrificación podía mejorar la capacidad competitiva bacteriana en la rizosfera. Cuando comenzó esta Tesis Doctoral, se desconocía si la expresión de *nap* podía afectar a la habilidad competitiva en nodulación de *E. meliloti*. Tampoco existían publicaciones que demostraran la emisión de  $N_2O$  por nódulos de alfalfa, así como los factores medioambientales implicados en dicha emisión, como nitrato, encharcamiento o disponibilidad de Cu.

Aunque en el GMNBR se ha avanzado considerablemente en el estudio del control de la desnitrificación en respuesta a condiciones limitantes de oxígeno y presencia de óxidos de nitrógeno (revisado por Salas *et al.*, 2021), al comienzo de esta tesis, se desconocía la influencia del Cu en el proceso de desnitrificación en rizobios. Por ello, se consideró interesante abordar este estudio en el rizobio modelo *B. diazoefficiens* en vida libre, ya que esta bacteria presenta dos enzimas desnitrificantes que contienen Cu como cofactor, la nitrito reductasa NirK, y la óxido nitroso reductasa, Nos. Además, se habían publicado estudios en los que se sugería la posible implicación del Cu en la regulación de la expresión de los genes de la desnitrificación en microorganismos desnitrificantes de vida libre como *P. denitrificans* (Sullivan *et al.*, 2013) o *P. stutzeri* (Black *et al.*, 2016). Adicionalmente, durante el desarrollo de dicho estudio, se identificó en el genoma de *B. diazoefficiens* un gen putativo codificante de un represor en respuesta a Cu de la familia CsoR, lo cual era algo novedoso en el momento de la tesis, ya que no se conocía la posible implicación de CsoR en la desnitrificación de *B. diazoefficiens*.

En resumen, teniendo en cuenta los antecedentes presentados, se establecieron los siguientes objetivos para el desarrollo de esta Tesis Doctoral (Figura 1):

1- Investigar el efecto del Cu sobre las emisiones de N<sub>2</sub>O producidas por nódulos de soja (Capítulo 1).

2- Estudiar la capacidad de los nódulos de las raíces de alfalfa de producir N<sub>2</sub>O en respuesta a nitrato, limitación de O<sub>2</sub> y disponibilidad de Cu, así como la influencia de la desnitrificación de *E. meliloti* en dichas emisiones (Capítulo 2).

3- Analizar el papel del Cu en la regulación de la desnitrificación de cultivos en vida libre de *B. diazoefficiens*. Investigar la implicación del represor CsoR de respuesta a Cu (Capítulo 3).

## Objectives

Agriculture is a major source of the potent greenhouse gas nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) due to the sometimes over and non-synchronized application of nitrogen fertilisers on crop soils. Biological N<sub>2</sub> fixation carried out by rhizobium-legume symbiosis may be an effective strategy to mitigate N<sub>2</sub>O emissions. However, certain environmental factors can affect N<sub>2</sub>O emissions derived from legume crops. Studies performed by the Nitrogen Metabolism Group in Rhizospheric Bacteria (GMNBR, EEZ-CSIC) have shown that the

presence of nitrate is essential for N<sub>2</sub>O emissions and, additionally, that the application of nitrate together with flooding conditions strongly induce these emissions by soybean nodules (Tortosa *et al.*, 2015). Moreover, these authors have also demonstrated the importance of *B. diazoefficiens* denitrification in N<sub>2</sub>O release by soybean nodules. However, at the start of this Doctoral Thesis, the way in which Cu could modulate N<sub>2</sub>O emissions by these nodules was yet unknown.

Separately, the symbiosis established between alfalfa and the rhizobium species *E. meliloti* is also investigated in the GMNBR. This symbiosis is relevant from an agronomic point of view because alfalfa is the most important forage legume crop in the world, and is considered the most extensive, productive and profitable forage crop in Spain. It is well known that *E. meliloti* contains all the denitrification genes, but is unable to grow under denitrifying conditions because of a limitation in *nap* genes expression (Torres *et al.*, 2014b). In this context, our group has shown that *nap* overexpression restores the capacity of *E. meliloti* to grow anoxically through denitrification and also contributes to increase drastically N<sub>2</sub>O emissions by free-living cultures (Torres *et al.*, 2018). In a previous work, Lecomte and colleagues (2018) suggested that denitrification may improve competitiveness of soil bacteria in the rhizosphere. At the start of this Doctoral Thesis, it was unknown if *nap* expression could affect the *E. meliloti* competitive ability in nodulation. Evidences about the capacity of alfalfa nodules to release N<sub>2</sub>O, as well as the environmental factors involved in these emissions, such as nitrate, flooding or Cu availability, were also scarce.

Although the study in denitrification control in response to oxygen-limiting conditions and nitrogen-derived oxides has reached a great advance in the GMNBR (reviewed by Salas *et al.*, 2021), at the beginning of this Doctoral Thesis, the influence of Cu on denitrification by rhizobia was yet unknown. Thus, how Cu could affect *B. diazoefficiens* denitrification under free-living lifestyle was considered as an interesting issue to investigate since this bacterium harbours two Cu-containing enzymes, the nitrite reductase NirK, and the nitrous oxide reductase, Nos, both of which use Cu as cofactor. Furthermore, various studies have suggested the possible involvement of this micronutrient in the regulation of denitrification genes expression in free-living denitrifying microorganisms such as *P. denitrificans* (Sullivan *et al.*, 2013) or *P. stutzeri* (Black *et al.*, 2016). In addition, during the development of this work, the presence of a putative gene encoding a Cu-responsive repressor from the CsoR family was unveiled,

and this was reported as a new finding, since there was no published information about the possible involvement of CsoR in *B. diazoefficiens* denitrification.

In summary, taking in consideration the background presented here, the following objectives were established in order to accomplish this Doctoral Thesis (Figure 1):

1- To investigate Cu effect in N<sub>2</sub>O emissions produced by soybean nodules (Chapter 1).

2- To study the capacity of alfalfa nodules to produce N<sub>2</sub>O in response to nitrate, oxygen limitation or Cu availability, as well as the influence of *E. meliloti* denitrification in such emissions (Chapter 2).

3- To analyse the role of Cu in denitrification performed by *B. diazoefficiens* free-living cultures. To investigate the involvement of the Cu-responsive repressor called CsoR (Chapter 3).

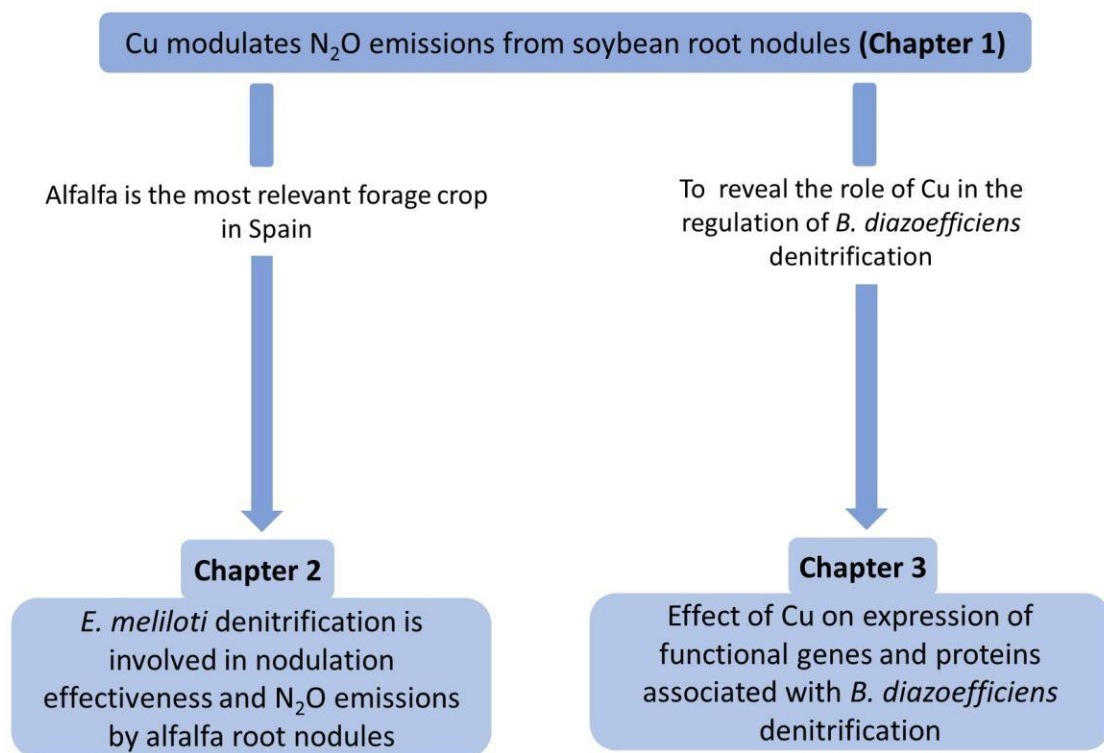


Figure 1. Thesis organization.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**





## I. Materiales

### 1.1. Cepas bacterianas y plásmidos

#### 1.1.1. Cepas bacterianas

Las cepas empleadas en esta tesis, junto con sus características más relevantes, se recogen en la siguiente tabla (Tabla 1):

**Tabla 1.** Cepas bacterianas.

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>E. coli</i>		
<b>DH5<math>\alpha</math></b>	<i>supE44</i> , $\Delta$ <i>lacU169</i> , ( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15), <i>5hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Bethesda Research Laboratories Inc., Gaithersburg, Maryland
<b>S17.1</b>	Sm <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> Tp <sup>r</sup> ; <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>recA</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , RP4Tc::Mu, Km::Tn7	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>E. meliloti</i>		
<b>2011</b>	Sm <sup>r</sup> ; cepa silvestre (WT)	Casse <i>et al.</i> , 1979
<b>1021</b>	Sm <sup>r</sup> ; otra cepa WT estrechamente relacionada con 2011	Meade <i>et al.</i> , 1982
<b>4002</b>	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> ; cepa sobrexpresante de <i>nap</i> (WT 1021 que contiene pDS4002)	Torres <i>et al.</i> , 2018
<b>4004</b>	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> ; WT 1021 que contiene pDS4004 (plásmido vacío derivado de pDS4002)	Torres <i>et al.</i> , 2018
<b>4002-GUS3</b>	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> ; 4002 que contiene pGUS3	Este trabajo
<b>4004-GUS3</b>	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> ; WT 4004 que contiene pGUS3	Este trabajo
<b>2011mTn5STM.3.02.F08</b>	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> ; <i>napA</i> ::mini-Tn5	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
<b>2011mTn5STM.5.07.B03</b>	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> ; <i>nosZ</i> ::mini-Tn5	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
<i>B. diazoefficiens</i>		
<b>USDA110</b>	Cm <sup>r</sup> ; WT	USA Dept. of Agriculture (USDA), Beltsville, Maryland
<b>110spc4</b>	Cm <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> ; cepa WT resistente a Spc y derivada de USDA110	Regensburger y Hennecke, 1983
<b>GRPA1</b>	Cm <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> ; <i>napA</i> :: $\Omega$	Delgado <i>et al.</i> , 2003
<b>GRK308</b>	Cm <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> ; <i>nirK</i> :: $\Omega$	Velasco <i>et al.</i> , 2001
<b>GRC131</b>	Cm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> ; <i>norC</i> :: <i>aphII</i> -PSP	Mesa <i>et al.</i> , 2002
<b>GRZ3035</b>	Cm <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> ; <i>nosZ</i> :: $\Omega$	Velasco <i>et al.</i> , 2004
<b><math>\Delta</math>nosR</b>	Cm <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> ; mutante por delección sin marcador de la cepa WT 110spc4	Bueno, E., colección del grupo
<b>BG0602</b>	Cm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> ; USDA110::P <i>napE-lacZ</i>	Robles <i>et al.</i> , 2006
<b>RJ2498</b>	Cm <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> ; 110spc4::P <i>nirK-lacZ</i>	Mesa <i>et al.</i> , 2003
<b>RJ2499</b>	Cm <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> ; 110spc4::P <i>norC-lacZ</i>	Mesa <i>et al.</i> , 2003
<b>BG0301</b>	Cm <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> ; 110spc4::P <i>nosR-lacZ</i>	Torres <i>et al.</i> , 2017
<b><math>\Delta</math>nosR-(pBG0301)</b>	Cm <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> ; $\Delta$ <i>nosR</i> ::P <i>nosR-lacZ</i>	Bueno, E., colección del grupo

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>B. diazoefficiens</i> (continuación)		
4030	Cm <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> ; mutante en <i>csr0701</i> (bsr0701) por delección sin marcador de la cepa WT 110 <i>spc4</i>	Este trabajo
4030-BG0602	Cm <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> ; 4030:: <i>PnapE-lacZ</i>	Este trabajo
4030-RJ2498	Cm <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> ; 4030:: <i>PnirK-lacZ</i>	Este trabajo
4030-RJ2499	Cm <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> ; 4030:: <i>PnorC-lacZ</i>	Este trabajo
4030-BG0301	Cm <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> ; 4030:: <i>PnosR-lacZ</i>	Este trabajo
4030-BG0302	Cm <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> ; 4030:: <i>PnosZ-lacZ</i>	Este trabajo

### 1.1.2. Plásmidos

En la siguiente tabla (Tabla 2), se recogen los plásmidos empleados durante el desarrollo de esta tesis:

Tabla 2. Plásmidos.

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pBBR1MCS-2	Km <sup>r</sup> ; <i>lacZ mob</i> <sup>+</sup> , vector de clonación	Kovach <i>et al.</i> , 1994
pK18 <i>mobSacB</i>	Km <sup>r</sup> ; vector suicida	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pBI101	Derivado de pBIN19 provisto de un casete sin promotor del gen codificante de la $\beta$ -glucuronidasa	Clontech, Heidelberg, Alemania
pDS4002	Km <sup>r</sup> ; fragmento de 4709 pb correspondiente al operón <i>napEFDABC</i> de <i>E. meliloti</i> clonado en pBBR1MCS-2	Torres <i>et al.</i> , 2018
pDS4004	Km <sup>r</sup> ; pBBR1MCS-2 vacío derivado de pDS4002	Torres <i>et al.</i> , 2018
pGUS3	Km <sup>r</sup> ; fusión traduccional entre <i>PnfeD</i> (coordinados 2993-3345) y <i>gusA</i> en pBI101	García-Rodríguez y Toro, 2000
pDB4030	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> ; pK18 <i>mobSacB</i> con delección del gen <i>csr0701</i> de <i>B. diazoefficiens</i> (bsr0701)	Este trabajo

## 1.2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados durante el desarrollo de esta tesis se recogen en la siguiente tabla (Tabla 3):

Tabla 3. Oligonucleótidos.

Oligonucleótido	Secuencia de ADN (5'→3')	Referencia
qRT-PCR		
bsr7036 ( <i>napE</i> )_for_4	GCCTTCCTGTTCTGAC	Torres <i>et al.</i> , 2014a
bsr7036 ( <i>napE</i> )_rev_4	CCGGCAAACATCTGGTAGA	Torres <i>et al.</i> , 2014a

Oligonucleótido	Secuencia de ADN (5'→3')	Referencia
qRT-PCR (continuación)		
<i>nirK_for_6</i>	AGCCTTCACCGACACCGAAGAG	Torres, M. J., colección del grupo
<i>nirK_rev_6</i>	GAGCGCATTCTTGCCGGTAAGC	Torres, M. J., colección del grupo
<i>norC_3_for</i>	GCAGATGCCGCAGTTCAAC	Torres <i>et al.</i> , 2014a
<i>norC_3_rev</i>	TGATCGTGCTCACCCATTG	Torres <i>et al.</i> , 2014a
<i>nosR_qRT-PCR_F</i>	ATGATCCAGGTGCGGCTGAAG	Torres <i>et al.</i> , 2017
<i>nosR_qRT-PCR_R</i>	CCGGCTGTGATGATTGTGTTTCG	Torres <i>et al.</i> , 2017
<b>16S_qRT_for</b>	GCAGGCTTAACACATGCAAGTC	Torres <i>et al.</i> , 2017
<b>16S_qRT_rev</b>	AGGTACGTTCCCACGCGTTACTC	Torres <i>et al.</i> , 2017
Construcción de la cepa 4030 de <i>B. diazoefficiens</i>		
<i>csoR_Up_For_XbaI</i>	ACATCTAGATCATGTGCGCGAGTTCGGGATTGG	Este trabajo
<i>csoR_Up_Rev_BamHI</i>	AAAGGATCCCTTGATGTCCTTGCGCATGCCGTC	Este trabajo
<i>csoR_Down_For_BamHI</i>	AAAGGATCCTGATCGGACGGGCGGAAAGGTAG	Este trabajo
<i>csoR_Down_Rev_EcoRI</i>	AAAGAATTCTGCACTGGGCCGACAAGCAGAAG	Este trabajo
<b>pSRKC1_F</b>	ATGCTTCCGGCTCGTATG	Cabrera, J. J., colección del grupo
<b>pK18_4</b>	CTGCGCAACTGTTGGGAAGG	Cabrera, J. J., colección del grupo
<i>csoR_IN_For</i>	CTGAAGGACCACGTGCCCATG	Este trabajo
<b>Kan5</b>	ACAGGATGAGGATCGTTTCG	Colección del grupo
<b>Kan6</b>	AATATCACGGGTAGCCAACG	Colección del grupo

### **1.3. Medios de cultivo**

En la Tabla 4, se detallan los medios de cultivo empleados durante el desarrollo de esta tesis:

**Tabla 4.** Medios de cultivo.

Medio de cultivo	Composición	Utilidad	Referencia
<i>E. coli</i>			
<b>LB (Luria-Bertani)</b>	NaCl, 5 g; triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; agua destilada, 1 L; pH 7	Medio para el cultivo rutinario de <i>E. coli</i>	Miller, 1972
<i>E. meliloti</i>			
<b>TY (Tryptone-Yeast extract)</b>	Triptona, 5 g; extracto de levadura, 3 g; CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 0,5 g; agua destilada, 1 L; pH 7	Medio para el cultivo rutinario de <i>E. meliloti</i>	Beringer, 1974
<b>MM (Minimal Medium)</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,3 g; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,3 g; MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0,15 g; NaCl, 0,05 g; L-glutamato monosódico, 1,1 g; manitol, 10 g; CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 0,05 g; FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 0,006 g; agua destilada, 1 L; pH 7	Medio mínimo para <i>E. meliloti</i>	Robertsen <i>et al.</i> , 1981
<b>MMN</b>	Igual que MM, pero suplementado con 10 mM KNO <sub>3</sub>	Medio mínimo para el cultivo de <i>E. meliloti</i> en microaerobiosis	Robertsen <i>et al.</i> , 1981
<i>B. diazoefficiens</i>			
<b>PSY (Peptone-Salt-Yeast extract)</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,3 g; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,3 g; CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 0,005 g; MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0,1 g; extracto de levadura, 1 g; peptona, 3 g; solución 100x de elementos traza, 10 mL <sup>(1)</sup> ; L-arabinosa, 1 g <sup>(2)</sup> ; agua destilada, 1 L; pH 7	Medio para el cultivo rutinario de <i>B. diazoefficiens</i>	Mesa <i>et al.</i> , 2008
<b>BVM (Buffered Vincent Minimal medium)</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2 g; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 g; NH <sub>4</sub> Cl, 0,84 g; MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0,25 g; CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 0,068 g; FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 0,01 g; MOPS, 2,09 g; L-arabinosa, 3 g <sup>(3)</sup> ; solución 1000x de elementos traza, 1 mL <sup>(4)</sup> ; agua destilada, 1 L; pH 6,8 <sup>(5)</sup>	Medio mínimo para el cultivo de <i>B. diazoefficiens</i>	Vincent, 1970
<b>BVMN<sup>(6)</sup></b>	Igual que BVM, pero suplementado con 10 mM KNO <sub>3</sub>	Medio mínimo para el cultivo de <i>B. diazoefficiens</i> en microaerobiosis y diferentes condiciones de Cu	Vincent, 1970

<sup>(1)</sup> La composición de la solución 100x de elementos traza empleada para PSY se especifica a continuación:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	1 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O... ..	0,1 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O... ..	0,05 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O... ..	0,05 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O... ..	0,01 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O.....	0,1 g
Agua destilada .....	1 L

<sup>(2)</sup> Para el medio PSY, tanto líquido como sólido, se añadió 1 g de L-arabinosa para que la concentración final fuera del 0,1%. Para ello, previamente, se preparó una solución de L-arabinosa al 10% (5 g en 50 mL de agua destilada), la cual se filtró usando filtros Minisart® NML (Sartorius, Gotinga, Alemania) de 0,2 µm de diámetro del poro. A continuación, tras autoclavar el medio de cultivo, se añadieron 10 mL de la solución al 10% a 1 L de medio.

<sup>(3)</sup> Para los medios BVM y BVMN, se añadieron 3 g de L-arabinosa para que la concentración final fuera de 20 mM. Para ello, se preparó una solución 1 M de L-arabinosa (15,013 g en 100 mL de agua destilada), la cual se filtró como se especifica en <sup>(2)</sup>. A continuación, tras autoclavar el medio de cultivo, se añadieron 20 mL de la solución 1 M a 1 L de medio.

<sup>(4)</sup> La composición de la solución 1000x de elementos traza empleada para BVM y BVMN se especifica a continuación:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0,145 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O... ..	0,108 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O... ..	0,005 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O... ..	0,004 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O... ..	0,125 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O... ..	0,125 g
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O... ..	0,07 g
NTA (nitrilotriacetato).....	7 g
Agua destilada .....	1 L

<sup>(5)</sup> Los medios BVM y BVMN se ajustaron a un pH de 6,8 añadiendo gotas de una solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  2 M.

<sup>(6)</sup> El medio BVMN se empleó para el crecimiento microaeróbico (y anaeróbico) en distintas condiciones de Cu. Las condiciones de Cu utilizadas en este trabajo fueron Cu limitante (denotado como Cu-L), Cu estándar (denotado como Cu-S) y alto Cu (denotado como Cu-H):

Para preparar el medio BVMN con Cu-L, la receta seguida fue la que se especifica en la Tabla 4, pero eliminando el  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  de la solución 1000x de elementos traza y, además, añadiendo 10 mL de una solución 100 mM de sal sódica de L-ascorbato como agente reductor de Cu(II), y 10 mL de una solución 1 mM de sal disódica bihidratada de BCS (del inglés, *bathocuproinedisulfonic acid*) como agente quelante de Cu(I). Previamente, fue necesario tratar todo el material de vidrio que se iba a emplear en la preparación y conservación de este medio de cultivo con  $\text{HCl}$  0,1 M durante toda la noche.

El medio BVMN con Cu-S se preparó tal y como se detalla en la Tabla 4. La concentración de Cu de este medio es de 0,02  $\mu\text{M}$ .

El medio BVMN con Cu-H se preparó como se especifica en la Tabla 4, con la salvedad de que, en este caso, se añadió una concentración de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  de 13  $\mu\text{M}$  (0,003 g en 1 L de BVMN). Para ello, se preparó una solución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  de 5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  (la cual se filtró previamente a su uso), añadiendo al medio de cultivo un volumen de 650  $\mu\text{L}$  de dicha solución concentrada.

Para preparar los medios sólidos, se añadió agar bacteriológico a una concentración de 15  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  tras haber medido el pH y antes de esterilizar.

La esterilización de todos los medios de cultivo empleados se llevó a cabo en un autoclave a 121 °C durante 20 min. Posteriormente, se añadían la L-arabinosa y/o los antibióticos correspondientes en el caso de que fuera necesario.

### **1.4. Antibióticos**

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se realiza a partir de soluciones concentradas de los mismos en agua destilada, habiéndolas filtrado previamente utilizando el mismo tipo de filtros usado para las soluciones de L-arabinosa. La concentración final de los diferentes antibióticos se indica en la Tabla 5:

Tabla 5. Antibióticos.

Nombre		Cultivos de <i>B. diazoefficiens</i> ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )		Cultivos de <i>E. meliloti</i> (líquidos y sólidos) ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Cultivos de <i>E. coli</i> (líquidos y sólidos) ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
		Líquido	Sólido		
<b>Espectinomicona</b> (CAS: 1695-77-8)	<b>Spc</b>	100	200	-	25
<b>Estreptomicina</b> (CAS: 57-92-1)	<b>Sm</b>	100	200	200	25
<b>Tetraciclina*</b> (CAS: 60-54-8)	<b>Tc</b>	25	50	-	10
<b>Kanamicina*</b> (CAS: 25389-94-0)	<b>Km</b>	100	200	200	25
<b>Ampicilina</b> (CAS: 69-53-4)	<b>Ap</b>	-	-	-	200
<b>Cloranfenicol**</b> (CAS: 56-75-7)	<b>Cm</b>	20	20	-	50

\* La solución concentrada de Tc se preparó en metanol:agua (1:1) o metanol absoluto dependiendo de la concentración de la misma (1 o 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente). El antibiótico kanamicina, en realidad, se encuentra en la forma de sulfato de kanamicina.

\*\* Para la solución concentrada de cloranfenicol, se utilizó etanol.

## II. Métodos microbiológicos

### 2.1. Conservación de cepas bacterianas

La conservación de las diferentes cepas se realizó según la metodología establecida en nuestro grupo de investigación:

1. Para la preparación de los cultivos, inocular 5 mL de LB, 20 mL de TY o 20 mL de PSY con una sola colonia aislada procedente de placa fresca de *E. coli* (< 7 días), *E. meliloti* (< 10 días) o *B. diazoefficiens* (< 14 días), respectivamente, añadiendo asimismo los antibióticos correspondientes.
2. Incubar a 37 °C durante 16 h para *E. coli* o a 30 °C durante 3-4 días para *E. meliloti* o 4-5 días para *B. diazoefficiens*.
3. Centrifugar a 7000 rpm durante 8 min a 4 °C.



4. Lavar los sedimentos ( o *pellets*) una vez con medio sin antibiótico.
5. Añadir glicerol estéril a criotubos vacíos para alcanzar una concentración final del 50% una vez se transfieran las células.
6. Resuspender los *pellets* en 2,25 mL del medio correspondiente sin antibiótico.
7. Alicuotar cada cepa en tres criotubos, de los cuales, uno se destinó para su conservación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y los otros dos, para la colección a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  del grupo.

Para el transporte y envío de cepas bacterianas a otros laboratorios, se inoculan criotubos con medio de cultivo sólido LB para *E. coli* o PSY para *B. diazoefficiens* en pico de flauta, suplementado con los antibióticos adecuados.

### **2.2. Cultivo de células**

#### *2.2.1. Siembra en placa de Petri*

Las diferentes cepas de *E. coli*, *B. diazoefficiens* o *E. meliloti* a emplear se siembran en placa a partir de los criotubos conservados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  o a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tras preparar las placas con el medio y los antibióticos adecuados, se sumerge el asa de siembra en el criotubo correspondiente y la gota atrapada se siembra formando tres estrías. Finalmente, estas placas se incuban a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5-7 días.

#### *2.2.2. Cultivos en medio líquido*

##### 2.2.2.1. Precultivos aeróbicos

Tras el crecimiento de las estrías en las placas, se preparan cultivos líquidos en medio rico a modo de precultivos. Para ello, tubos de 17 mL con 5 mL de LB o matraces de 100 mL con 25-30 mL de TY o PSY suplementado con los antibióticos correspondientes se inoculan con una colonia aislada de la placa pertinente. A continuación, se incuban a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche para *E. coli* o a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3-4 días para *E. meliloti* o 4-5 días para *B. diazoefficiens* en un agitador orbital a 170 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ; del inglés, *optical density at 600 nm*) de 1.

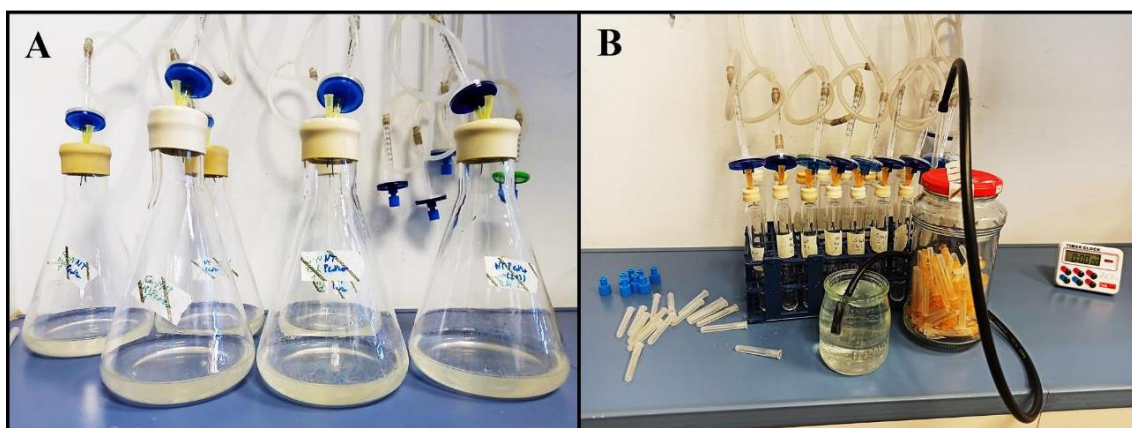
##### 2.2.2.2. Cultivos aeróbicos

Los cultivos aeróbicos, en esta tesis, tan solo se prepararon para *B. diazoefficiens* y en tubos de ensayo de 17 mL. Estos cultivos se inician a partir de los precultivos líquidos. En primer lugar, los precultivos se centrifugan a 7000 rpm durante 8 min, primero, para sedimentar las células y, después, para lavar las células 2 veces con medio

mínimo BVM(N) sin antibiótico, resuspendiendo finalmente el *pellet* obtenido en 5 mL de medio. A continuación, a partir de la resuspensión obtenida, tubos de 17 mL con 3 mL de medio BVM(N) se inoculan con la cepa correspondiente de *B. diazoefficiens* a una OD<sub>600</sub> de 0,05. Estos tubos, finalmente, se incuban durante 7 días a 30 °C, monitorizando diariamente la densidad óptica de los cultivos para construir curvas de crecimiento.

### 2.2.2.3. Cultivos microaeróbicos

Los cultivos microaeróbicos de *E. meliloti* en MMN o de *B. diazoefficiens* en BVM(N) se inician a partir de los precultivos líquidos, al igual que los aeróbicos. Tubos de 17 mL con 3 mL de medio, o matraces de 100, 250 o 500 mL con 25, 50 o 100 mL de medio, respectivamente, se inoculan con la cepa correspondiente a una OD<sub>600</sub> de 0,05 a partir de la resuspensión obtenida de los precultivos tras las centrifugaciones mencionadas en el subapartado anterior. A continuación, se coloca un tapón de goma perforable a cada tubo o a cada matraz, fijándolo con cinta Parafilm® a la boca del vial correspondiente, y se gasean con una mezcla de 2% (v/v) O<sub>2</sub> y 98% (v/v) N<sub>2</sub> durante 5 min para tubos de 17 mL y matraces de 100 mL, 10 min para matraces de 250 mL, o 15 min para matraces de 500 mL, conservando en todos los casos la proporción 1:5 entre fase líquida y fase gaseosa (Figura 1). Durante el gaseo, se utilizan filtros Minisart® NML(Sartorius) de 0,2 µm de diámetro del poro para evitar la entrada de contaminación externa a través del flujo de gas. Los tubos sólo se inocularon con *B. diazoefficiens* y se incubaron durante 7 días para llevar a cabo curvas de crecimiento y/u otras determinaciones a lo largo del período de incubación, como consumo de nitrato o acumulación de nitrito en el medio de cultivo o emisión de N<sub>2</sub>O mediante cromatografía de gases. Los matraces inoculados con *B. diazoefficiens* se incuban a 30 °C durante 2 días para extracción de ARN, o durante 3 días para aislamiento de las fracciones celulares o para ensayos de actividades enzimáticas. Los matraces inoculados con *E. meliloti*, los cuales fueron únicamente de 100 mL con 25 mL de MMN, se incubaron a 30 °C durante 5 días hasta una OD<sub>600</sub> aproximada de 0,2 para usarlos posteriormente en ensayos de cinética de nodulación o de competitividad.



**Figura 1.** Gaseo de cultivos microaeróbicos en diferentes viales empleados en esta tesis. (A) Gaseo de matraces de 500 mL. (B) Gaseo de tubos de 17 mL.

#### 2.2.2.4. Cultivos anaeróbicos

Los cultivos anaeróbicos tan solo se prepararon para *B. diazoefficiens* y en tubos de ensayo de 17 mL. Estos cultivos se inician a partir de los precultivos líquidos, al igual que los aeróbicos y microaeróbicos. Tubos de 17 mL llenos hasta poco menos del borde con medio BVM(N) se inoculan con la cepa correspondiente a una  $OD_{600}$  de 0,05 a partir de la resuspensión obtenida de los precultivos tras las centrifugaciones mencionadas previamente. Dichos tubos se incuban a 30 °C durante 7 días, monitorizando diariamente la densidad óptica de los cultivos para construir curvas de crecimiento.

### **2.3. Obtención de membrana, periplasma y citosol de células de *B. diazoefficiens***

Para este protocolo, se necesita preparar previamente las siguientes soluciones:

- ✓ Tampón de lavado: Tris-HCl 40 mM; KCl 150 mM; pH 7; 4 °C
- ✓ Tampón SET: Tris HCl 100 mM (pH 8); EDTA 3 mM; sacarosa 500 mM; EDTA: *ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate* (CAS: 6381-92-6)
- ✓ Tampón de fraccionamiento: tampón de lavado provisto de AEBSF 1 mM; ADNasa I 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; AEBSF: *4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride* (CAS: 30827-99-7)

Los cultivos celulares de *B. diazoefficiens* se centrifugaron a 7000 rpm durante 8 min a 4 °C y se lavaron 2 veces con tampón de lavado.

Para la obtención de proteínas periplásmicas, se siguió un protocolo descrito previamente (Delgado *et al.*, 2003; Felgate *et al.*, 2012), que tomaron como referencia el protocolo establecido por McEwan y colaboradores (1984). El protocolo es el siguiente:

1. Resuspender el *pellet* resultante en 10 mL de tampón SET y añadir 1 mg·mL<sup>-1</sup> de lisozima.
2. Incubar las células durante 2 h a 30 °C.
3. Centrifugar las células a 9000 rpm durante 10 min para separar la fracción periplásmica de los esferoplastos.
4. Transferir el sobrenadante, que contiene las proteínas periplásmicas, a tubos Amicon® Ultra de 3 kDa de límite de peso molecular (*molecular weight cut-off*, MWCO), y centrifugar seguidamente a 7000 rpm durante 20 min a 20 °C.
5. Completar hasta un volumen de 4 mL con tampón SET.
6. Transferir ese volumen a tubos Amicon Ultra de 10 kDa de MWCO y centrifugar a 7000 rpm durante 20 min a 4 °C para aislar especialmente NirK (37 kDa) y NosZ (67 kDa).
7. Transferir el volumen resultante a un tubo de microcentrífuga, completando con tampón SET hasta 250 µL, y concentrando las proteínas lo máximo posible de esta manera. Conservar las alícuotas así obtenidas a -20 °C hasta su uso.

Para la obtención de las fracciones citosólica y de membrana, los *pellets* de esferoplastos se resuspendieron en 2 mL de tampón de fraccionamiento. A continuación, las células se rompieron por diferencia de presión mediante el uso de una prensa de French (SLM Aminco, Maryland, EEUU), según la metodología indicada por Fernández-López y colaboradores (1994):

1. Antes de proceder a la ruptura celular, mantener en frío la célula de la prensa de French en una cámara frigorífica.
2. Ensamblar la célula el día de su uso, la cual consta de pistón, émbolo, tapa, llave y grifo.
3. Transferir la suspensión celular a la célula de la prensa.
4. Lisar las bacterias aplicando una presión constante de 120 MPa y dejando salir la suspensión lentamente a través del grifo. Repetir este proceso 3 veces.
5. Centrifugar el homogenado resultante a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C para sedimentar las células que no se hayan lisado.
6. Centrifugar el sobrenadante libre de esas células a 70000 rpm en una ultracentrífuga Optima Max (Beckman Coulter Inc., Brea, California, EEUU) durante 1 h a 4 °C para separar las membranas del citosol. El sobrenadante

resultante se considera la fracción citosólica, y el sedimento translúcido, la fracción particulada o de membrana.

7. Sustraer el sobrenadante y transferirlo a tubos de microcentrífuga.
8. Resuspender el sedimento de membrana en 70  $\mu$ L de tampón de lavado con ayuda de una varilla de vidrio y transferirlo a un tubo de microcentrífuga.
9. Guardar las muestras de citosol y de membrana así preparadas a  $-20$  °C hasta su uso.

### III. Métodos analíticos

#### **3.1. Determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa**

Para este protocolo, se necesita preparar previamente las siguientes soluciones:

- ✓ Tampón Z:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  60 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  40 mM; KCl 10 mM;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mM; SDS 0,01%;  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mM (estos dos últimos se pueden añadir el día de su uso);  $\text{H}_2\text{O}$  destilada
- ✓ Solución de ONPG: 2-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido (CAS: 369-07-3), 4  $\text{mg} \cdot (\text{mL de tampón fosfato})^{-1}$
- ✓ Tampón fosfato: preparar, por un lado, solución A:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,1 M, 1,245 g en 70 mL  $\text{H}_2\text{O}$  y, por otro lado, solución B:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,1 M, 0,689 g en 50 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ; mezclar 61 mL de A y 39 mL de B
- ✓ Solución de carbonato sódico:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

La actividad  $\beta$ -galactosidasa se determinó siguiendo el método descrito por Cabrera y colaboradores (2016) que, a su vez, se basa en el método descrito por Sambrook y Russell (2001). El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. Medir la  $\text{OD}_{600}$  de los diferentes cultivos.
2. Tomar una alícuota de 1 mL de cada cultivo, y transferirla a un tubo Falcon<sup>TM</sup> vacío de 15 mL.
3. En la campana de extracción, añadir 1,5 mL de tampón Z y 70  $\mu$ L de cloroformo a cada tubo.
4. Una vez cerrados los tubos, agitar en vórtex durante 15 s, de tal manera que la solución debe volverse turbia y blanquecina.
5. Dejar reposar durante 5-10 min a temperatura ambiente siendo tiempo suficiente para que el cloroformo precipite en el fondo del tubo.

6. Tomar 3 alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  cada una de cada tubo de centrifuga Falcon<sup>TM</sup>, transfiriéndolas a tubos de microcentrífuga nuevos, teniendo cuidado de no arrastrar restos de cloroformo.
7. Preparar la solución de ONPG en tampón fosfato, cubriéndola con papel de aluminio para que no incida la luz directamente sobre ella.
8. Añadir 100  $\mu\text{L}$  a cada tubo, iniciando el cronometraje de la reacción inmediatamente después de añadir el reactivo al primer tubo.
9. Incubar a 30 °C durante 5-20 min, dependiendo de la fusión transcripcional analizada. En todos los casos, el tiempo de incubación depende de la aparición de color amarillo.
10. Detener la reacción a los 5-20 min de incubación añadiendo 200  $\mu\text{L}$  de solución de carbonato sódico una vez que el color amarillo se vuelva evidente a simple vista sin que se oscurezca demasiado para no subestimar la actividad enzimática.
11. Centrifugar todos los tubos a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C.
12. Sustraer 200  $\mu\text{L}$  de cada tubo y transferirlos a pocillos individuales de una placa ELISA, midiendo la densidad óptica a 420 nm ( $\text{OD}_{420}$ ) y 550 nm ( $\text{OD}_{550}$ ) en un lector de placas ELISA utilizando los filtros correspondientes.

Para los cálculos de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en Unidades Miller (MU, del inglés, *Miller Units*), se emplea la siguiente fórmula matemática:

$$MU = \frac{1000 \cdot (\text{OD}_{420} - \text{OD}_{550})}{\text{Volumen celular}(\text{mL}) \cdot \text{tiempo de reacción}(\text{min}) \cdot \text{OD}_{600} \text{ final del cultivo}}, \text{ donde:}$$

- $\text{OD}_{420}$  es la densidad óptica de la muestra a 420 nm, que se tiene en cuenta para cuantificar la intensidad del color amarillo.
- $\text{OD}_{550}$  es la densidad óptica de la muestra a 550 nm, que sirve para determinar la existencia de restos celulares que podrían haber sido arrastrados durante el proceso.
- Volumen celular se refiere al volumen de células presente en cada alícuota de 500  $\mu\text{L}$ , y debe expresarse en mL.
- Tiempo de reacción se refiere al tiempo de reacción de todos los tubos, el cual finaliza cuando se añade el carbonato sódico a cada tubo de reacción individualmente; el tiempo de reacción debe ser el mismo para todos los tubos. Se expresa en min.

- OD<sub>600</sub> final del cultivo se refiere al valor de OD<sub>600</sub> medido previamente en el espectrofotómetro antes de sustraer 1 mL de cada cultivo.

Las MU también se pueden expresar por mg de proteína, en cuyo caso, la fórmula matemática es similar a la anterior:

$$MU = \frac{1000 \cdot (OD_{420} - OD_{550})}{0,0045 \cdot Volumen\ celular(mL) \cdot tiempo\ de\ reacción(min) \cdot [proteína](mg/mL)}, \text{ donde } 0,0045 \text{ se}$$

corresponde con la absorbancia de 1 nmol de ONPG.

### **3.2. Determinación de proteína**

Para este protocolo, se necesita preparar previamente las siguientes soluciones:

- ✓ Solución de lisis: NaOH 1 M en H<sub>2</sub>O destilada
- ✓ Solución Bradford: reactivo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, California, EEUU), mezcla 1:5 en H<sub>2</sub>O destilada
- ✓ Solución patrón de BSA: albúmina de suero bovino (BSA, del inglés, *bovine serum albumin*), 100 µg·mL<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O; dicha solución se prepara en fresco a partir de otra también en fresco de 2 mg·mL<sup>-1</sup>

La determinación de proteína en extractos celulares o en bacteroides aislados de nódulos se llevó a cabo mediante el método colorimétrico descrito por Bradford (1976).

El protocolo empleado es el siguiente:

1. Añadir solución de lisis a las alícuotas pertinentes.
2. Incubar durante 20 min en Termoblock a 100 °C o en agua hirviendo.
3. Centrifugar a 12000 rpm durante 5 min.
4. Durante los pasos 2 y 3, preparar una curva estándar construida con concentraciones crecientes de BSA a partir de la solución patrón. La recta patrón se compone de las siguientes concentraciones (µg·mL<sup>-1</sup>): 0, 4, 8, 12, 16, 20.
5. Añadir a cada pocillo alícuotas de muestra convenientemente diluidas y, después, 160 µL de solución Bradford.
6. Medir la OD<sub>595</sub> de cada muestra en placa ELISA.
7. Extrapolar los valores de concentración a partir de los datos de OD<sub>595</sub> de las muestras utilizando la recta patrón preparada en el paso 4.

### **3.3. Determinación de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitrito ( $\text{NO}_2^-$ )**

Para este protocolo, se necesita preparar previamente las siguientes soluciones:

- ✓ Solución de sulfanilamida: sulfanilamida, 10 g en 200 mL de HCl concentrado (12 N); enrasar hasta 1 L con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada; cubrir con papel de aluminio para protegerla de la luz y conservar a 4 °C
- ✓ Solución de NNEDA: *N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride* (CAS: 1465-25-4), 200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (0,77 mM); cubrir con papel de aluminio para protegerla de la luz y conservar a 4 °C
- ✓ Solución patrón de  $\text{NaNO}_2$  100  $\mu\text{M}$ :  $\text{NaNO}_2$  100 mM en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada; a partir de ésta, se prepara otra de 100  $\mu\text{M}$

Estas determinaciones se llevaron a cabo mediante ensayos colorimétricos descritos originalmente por Hageman y Hucklesby (1971), los cuales se basan en la reacción de diazotación que tiene lugar entre el  $\text{NO}_2^-$  y los reactivos sulfanilamida y NNEDA.

Para la determinación de  $\text{NO}_2^-$  en el sobrenadante, se sigue el protocolo especificado a continuación:

- ✓ Añadir a las muestras un volumen de sulfanilamida, seguido de un volumen de NNEDA.
- ✓ Incubar a temperatura ambiente durante 20 min en oscuridad, apareciendo un color rosáceo o violáceo en función de la concentración de  $\text{NO}_2^-$  presente.
- ✓ Transferir 300 mL de cada muestra a pocillos individuales de una placa ELISA.
- ✓ Medir la  $\text{OD}_{550}$  en el lector de placas ELISA.
- ✓ Extrapolar los valores de concentración de  $\text{NO}_2^-$  a partir de los datos de  $\text{OD}_{550}$  de las muestras utilizando una curva estándar construida con concentraciones crecientes de  $\text{NaNO}_2$  a partir de la solución patrón 100 mM. Dicha recta patrón se compone de las siguientes concentraciones (mM): 0, 20, 40, 60, 80 y 100.

La determinación de  $\text{NO}_3^-$  en el sobrenadante se realizó mediante el empleo de un kit para medir nitrato y nitrito (número de catálogo #23479-1KT-F, Merck, Darmstadt, Alemania), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y basado también en esta reacción de diazotación.



### **3.4. Determinación de óxido nitroso (N<sub>2</sub>O)**

La determinación de N<sub>2</sub>O se llevó a cabo en cultivos microaeróbicos de *B. diazoefficiens* a lo largo de 7 días o en nódulos aislados en viales SUPELCO® cerrados herméticamente (este último caso se explica más adelante). La producción de N<sub>2</sub>O se efectuó mediante cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo Hewlett Packard HP-4890D equipado con un detector de captura de electrones (Hewlett-Packard, San José, California, EEUU). El protocolo seguido fue el que se detalla en Torres y colaboradores (2014b). La columna estaba empaquetada con malla Porapak Q 80/100. Se empleó N<sub>2</sub> como gas portador circulando a una tasa de flujo de 23 mL·min<sup>-1</sup>. Las temperaturas del inyector, la columna y el detector fueron de 125, 60 y 375 °C, respectivamente. Tras establecer todos estos parámetros, el protocolo se divide en los siguientes pasos:

1. Tomar muestras gaseosas del espacio de cabeza de los cultivos después de 1, 2, 3, 6 y 7 días de incubación e inyectarlas manualmente en el cromatógrafo usando jeringas herméticas BD Microlance™ 3.
2. Los picos correspondientes al N<sub>2</sub>O se integran usando el software de GC ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU), y los valores obtenidos se emplean para calcular la concentración de N<sub>2</sub>O en cada muestra mediante extrapolación usando una curva patrón elaborada con un estándar de N<sub>2</sub>O al 2% (v/v) (Air Liquid, París, Francia) e incluyendo los siguientes volúmenes de gas: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mL.
3. Determinar la concentración total de N<sub>2</sub>O teniendo en cuenta el N<sub>2</sub>O del espacio de cabeza y el disuelto en la fase líquida, aplicando el coeficiente de solubilidad de Bunsen para este último caso, el cual resulta ser del 47,2% a 30 °C.

### **3.5. Determinación de actividades enzimáticas**

#### *3.5.1. Actividades nitrato (NR, EC 1.7.99.4) y nitrito reductasa (NIR, EC 1.7.2.1)*

Para este protocolo, se necesita preparar previamente las siguientes soluciones:

- ✓ Mezcla NR: Tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,5); KNO<sub>3</sub> 20 mM; metil viológeno (MV<sup>+</sup>) 0,4 mM; completar con H<sub>2</sub>O destilada
- ✓ Mezcla NIR: Tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,5); NaNO<sub>2</sub> 0,2 mM; MV<sup>+</sup> 0,4 mM; completar con H<sub>2</sub>O destilada
- ✓ Solución de ditionito sódico: Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 46 mM en Tris-HCl 50 mM (pH 7,5); preparar en fresco y mantener en hielo en todo momento

- ✓ Solución de sulfanilamida
- ✓ Solución de NNEDA
- ✓ Solución patrón de  $\text{NaNO}_2$  100  $\mu\text{M}$

La determinación de la actividad NR dependiente de  $\text{MV}^+$  ( $\text{MV}^+$ -NR) se realizó tanto en células de *B. diazoefficiens* cultivadas microaeróbicamente en vida libre como en bacteroides aislados de nódulos de soja y alfalfa (la técnica en bacteroides se describirá más adelante). La determinación de actividad NIR dependiente de  $\text{MV}^+$  ( $\text{MV}^+$ -NIR) se llevó a cabo en cultivos microaeróbicos de vida libre de *B. diazoefficiens* o en bacteroides aislados de nódulos de soja y alfalfa (la técnica en bacteroides se describe más adelante). Para ambas técnicas, se tomó como referencia el protocolo descrito por Delgado y colaboradores (2003); en ambos casos, el procedimiento es similar y se fundamenta en la reacción de diazotación mencionada en el apartado 3.3:

1. Sedimentar las células por centrifugación a 7000 rpm durante 8 min a 4 °C.
2. Lavar el *pellet* 4-5 veces con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) con el fin de eliminar todo el posible  $\text{NO}_2^-$  acumulado en el medio de cultivo.
3. Resuspender el *pellet* final en 0,5-1 mL del mismo tampón.
4. Para la actividad  $\text{MV}^+$ -NR, dispensar 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción NR en tubos de microcentrífuga, de tal manera que cada uno contenga 200  $\mu\text{M}$  del donador de electrones  $\text{MV}^+$  y 10 mM de  $\text{KNO}_3$ . Para la actividad  $\text{MV}^+$ -NIR, dispensar 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción NIR, de tal manera que cada uno contenga 100  $\mu\text{M}$   $\text{NaNO}_2$  y 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{MV}^+$ .
5. Adicionar 0,1-0,2 mg de proteína procedentes de la suspensión celular, completando con tampón Tris-HCl 50 mM hasta alcanzar un volumen de 450  $\mu\text{L}$  en cada tubo de reacción y en cada tubo control.
6. Preparar en fresco la solución de ditionito sódico, y conservar en hielo en todo momento.
7. Añadir 50  $\mu\text{L}$  de esta solución de ditionito a cada tubo de reacción, apareciendo rápidamente un color azul indicativo de la reducción del  $\text{MV}^+$  por el ditionito.
8. Incubar 10-20 min a 30 °C.
9. Detener la reacción mediante agitación breve en vórtex hasta que el color azul desaparezca completamente en las muestras.
10. Añadir el ditionito a los tubos control de la reacción, y agitar inmediatamente después para impedir la reducción del  $\text{MV}^+$  y, al mismo tiempo, oxidar el  $\text{MV}^+$

que pueda haberse reducido entre el breve período de tiempo transcurrido entre la adición del ditionito a los tubos control y la agitación en vórtex.

Las actividades MV<sup>+</sup>-NR y MV<sup>+</sup>-NIR se expresan en nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> producido (para NR) o consumido (para NIR)·(mg de proteína·min)<sup>-1</sup>.

### 3.5.2. Actividad óxido nítrico reductasa (NOR, EC 1.7.2.5)

La actividad NOR se determinó en cultivos microaeróbicos de *B. diazoefficiens* en vida libre o en bacteroides aislados de nódulos de soja (la técnica en bacteroides se describe más adelante) mediante amperometría (Serpe y Zhang, 2006) en ambos casos, usando un electrodo de NO con sensor ISO-NOP de 2 mm APOLLO 4000® (World Precision Instruments Inc. (WPI), Friedberg, Alemania) montado con una membrana selectiva para NO.

#### 3.5.2.1. Preparación del sistema electrodo-membrana

La membrana selectiva para el NO se suministra montada en una funda impermeable frente a cualquier líquido, e incluso a gases disueltos, excepto el NO. Para su montaje (o cambio de la membrana), se realizan los siguientes pasos:

1. Con el electrodo conectado, retirar la funda protectora de la membrana, desenroscándola del electrodo.
2. Sumergir en agua destilada, al menos durante 15 min. Durante este paso, la señal debe subir, saliendo de escala.
3. Introducir 100 µL de electrolito especial para el electrodo de NO (suministrado también por WPI) en el interior de la funda de la membrana, utilizando para ello el aplicador provisto junto al electrodo con cuidado de no formar burbujas.
4. Acoplar la rosca de metacrilato de la funda con cuidado de no dañar la membrana.
5. Secar el electrodo con papel. En ese momento, la señal debe volver a valores bajos.
6. Introducir el electrodo en la funda y enroscar hasta que éste presione con suavidad la membrana.
7. Montar el electrodo con la funda en la cámara de anaerobiosis, para lo que se inserta la rosca de metacrilato sobre la funda de la membrana y, a continuación, se inserta una arandela de goma.
8. Enroscar la rosca de metacrilato en la cámara de anaerobiosis hasta asegurar la estanqueidad del sistema.

9. Añadir agua destilada hasta que el sistema electrodo-funda-membrana quede sumergido, y esperar hasta que la señal se estabilice.
10. Verificar la integridad de la membrana sustituyendo el agua por una solución de HCl 1 M. Si la membrana estuviera dañada, la señal subiría hasta salir de escala, pero si estuviera íntegra, sin daño alguno, la señal no se alteraría respecto a la mostrada durante la inmersión en agua.

### 3.5.2.2. Preparación de una solución saturada de NO

Para este protocolo, se necesita preparar previamente las siguientes soluciones:

- ✓ Solución ácida de FeSO<sub>4</sub>: FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,21 M; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5 M; en H<sub>2</sub>O destilada
- ✓ Solución de KOH: KOH 10% (p/v) en H<sub>2</sub>O destilada
- ✓ Agua ácida: H<sub>2</sub>O destilada acidificada con HCl a pH 3

Para la obtención de una solución acuosa saturada de NO (1,91 mM), se siguieron los pasos descritos por Bricio y colaboradores (2014):

1. Transferir 2 mL de solución de KOH a un vial Vacutainer® de 5 mL, y 2 mL de agua ácida a otro vial Vacutainer.
2. Pesar 250 mg de NaNO<sub>2</sub> en un tubo de rosca de 17 mL cerrado con tapón de goma perforable, y extraer todo el aire hasta el vacío con una jeringa de 20 mL.
3. Añadir 3 mL de solución ácida de FeSO<sub>4</sub>. Inmediatamente, el NaNO<sub>2</sub> reacciona con el FeSO<sub>4</sub> y el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, apareciendo un color negro intenso en la mezcla y liberando NO.
4. Transferir 10 mL con una jeringa al vial que contiene KOH y voltear varias veces.
5. Sustraer unos 7 mL de ese mismo vial, y transferirlos al vial con agua ácida, volteando varias veces para que el gas NO se mezcle bien.

### 3.5.2.3. Calibración del sistema

Para este protocolo, se necesita preparar previamente las siguientes soluciones:

- ✓ Tampón fosfato 25 mM: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM; en H<sub>2</sub>O destilada; pH 7,4
- ✓ Solución de succinato sódico 1 M en H<sub>2</sub>O destilada
- ✓ Solución de glucosa 320 mM
- ✓ Mezcla de enzimas glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* 40 U·mL<sup>-1</sup> y catalasa de hígado bovino 250 U·mL<sup>-1</sup>

Para la calibración, se siguen los siguientes pasos:

1. Añadir a la cámara del electrodo (de unos 2,2 mL de capacidad) 1,8 mL de tampón fosfato 25 mM, 90  $\mu$ L de succinato sódico 1 M, 100  $\mu$ L de glucosa 320 mM, y 100  $\mu$ L de la mezcla de enzimas, y dejar actuar a todos estos compuestos durante 5 min para crear condiciones anóxicas.
2. Cuando se observe una línea base estable, inyectar alícuotas crecientes desde 10  $\mu$ L de la solución saturada de NO descrita en el subapartado anterior, generando una curva de calibración que se empleará para los cálculos posteriores.

### 3.5.2.4. Determinación del consumo de NO (actividad NOR)

Tras calibrar el electrodo, se procedió a medir el consumo de NO de células de *B. diazoefficiens* cultivadas en microaerobiosis en vida libre o en bacteroides de soja (la técnica en bacteroides se describe más adelante). El protocolo seguido para medir el consumo de NO se basa en el establecido por Cabrera y colaboradores (2016):

1. Centrifugar y lavar las células tal y como se detalla en el apartado 3.5.1.
2. Resuspender el *pellet* final en 1,5 mL de tampón Tris-HCl 50 mM.
3. Añadir 100  $\mu$ L de suspensión celular a la cámara, que debe contener previamente el tampón fosfato 25 mM y todos los reactivos empleados en la calibración.
4. Una vez que se alcancen condiciones anóxicas, indicadas por la aparición de una línea base estable, inyectar 50  $\mu$ L de la solución saturada de NO para que dé comienzo la reacción.
5. Detener cada medida cuando la señal caiga a 0, que significa que todo el NO presente ha sido consumido por las células.

La actividad NOR se expresa en  $\text{mmol NO consumido} \cdot (\text{mg de proteína} \cdot \text{h})^{-1}$ .

### 3.5.3. *Actividad óxido nitroso reductasa (N<sub>2</sub>OR, EC 1.7.2.4)*

La actividad N<sub>2</sub>OR se determinó en células de *B. diazoefficiens* cultivadas microaeróbicamente en vida libre o en bacteroides aislados de nódulos de soja y alfalfa (la técnica en bacteroides se describe más adelante). Previamente, las células se centrifugan y lavan como se detalla en el apartado 3.5.1., resuspendiendo el *pellet* obtenido en 1,5 mL de tampón Tris-HCl 50 mM. Las tasas de consumo de N<sub>2</sub>O se miden esencialmente como se describe en Jiménez-Leiva y colaboradores (2019):

1. Añadir 6,3 mL de tampón Tris-HCl 50 mM y 700  $\mu$ L de succinato sódico 600 mM como donador de electrones a tubos de 17 mL autoclavados.
2. Cerrar los tubos con tapón de goma perforable.
3. Inyectar en todos los tubos una mezcla de 2% (v/v) O<sub>2</sub> y 98% (v/v) N<sub>2</sub>, seguida de 500  $\mu$ L de N<sub>2</sub>O al 2% (v/v) en 98% (v/v) N<sub>2</sub>.
4. Incubar a 30 °C en un agitador orbital a 170 rpm durante 30 min para asegurar el equilibrio entre las fases líquida y gaseosa.
5. Inyectar manualmente a través del tapón perforable en cada tubo un volumen de suspensión celular correspondiente a 0,3-0,4 mg de proteína.
6. Tomar muestras gaseosas de 1 mL del espacio de cabeza de cada tubo para el tiempo 0.
7. Incubar los tubos inoculados durante 4 h a 30 °C.
8. Tomar nuevas muestras gaseosas de 1 mL.
9. Las medidas de N<sub>2</sub>O y los cálculos de la concentración total de este gas se realizan como se describe en el apartado 3.4.

La actividad N<sub>2</sub>OR se expresa en nmol N<sub>2</sub>O consumido  $\cdot$  (mg de proteína  $\cdot$  h)<sup>-1</sup>.

### **3.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Para este protocolo, se necesita preparar previamente las siguientes soluciones:

- ✓ Gel de empaquetado (*stacking gel*) al 4%: H<sub>2</sub>O destilada 0,91 mL; Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), 0,375 mL; acrilamida 30% (37,5:1), 0,2 mL; SDS 10% (p/v); APS 10% (preparado en fresco), 30  $\mu$ L; TEMED 6,6 M, 1,25  $\mu$ L; APS: persulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) (CAS: 7727-54-0); TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina (CAS: 110-18-9)
- ✓ Gel de resolución (*resolving gel*) al 14%: H<sub>2</sub>O destilada 1,31 mL; Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), 1,25 mL; acrilamida 30% (37,5:1), 2,34 mL; SDS 10% (p/v); APS 10% (preparado en fresco), 31,25  $\mu$ L; TEMED 6,6 M, 2,5  $\mu$ L
- ✓ Tampón de desarrollo (*running buffer*): glicina 14,41 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>; Tris base 3,03 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>; SDS 1g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>

La técnica SDS-PAGE (del inglés, *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*) se realiza empleando un sistema Mini-PROTEAN® Tetra Handcast (Bio-Rad), con geles de 1 mm de grosor con una concentración de poliacrilamida del 14% para el gel de resolución

y del 4% para el gel de empaquetado. La preparación de los geles se lleva a cabo con los cristales previamente ensamblados. El protocolo es el siguiente:

1. Inmediatamente antes de usar la solución de resolución, añadirle el TEMED para que comience la fase de polimerización con el APS.
2. Añadir 4,5 mL de dicha solución entre los cristales.
3. Para conseguir un perfil nivelado del gel, añadir 1 mL de isopropanol sobre la solución de resolución entre los cristales hasta completar la longitud del cristal.
4. Pasados 30-45 min, eliminar el isopropanol, lavando con abundante agua destilada para eliminar posibles restos.
5. Añadir la solución de empaquetado sobre el gel de resolución hasta completar la longitud del cristal, habiendo añadido el TEMED inmediatamente antes de su uso, como se explicó para el gel de resolución.
6. Colocar el peine para crear los pocillos, con cuidado de que no se formen burbujas.
7. Una vez sintetizados los geles, montar el sistema dentro de la cubeta de electroforesis, de tal manera que quede un vaso estanco entre los dos geles montados en el casete.
8. Rellenar el vaso estanco con tampón de desarrollo hasta cubrir completamente ambos geles por igual.
9. Añadir unos 7  $\mu$ L de tampón de carga a un solo pocillo y activar la electroforesis, dejando funcionar el sistema a 180 V durante 40-60 min hasta que el frente de azul de bromofenol llegue al final del gel, lo que se llama “precourir el gel”.
10. Añadir el tampón de carga adecuado (detallados más adelante) a las muestras, y cargarlas en los pocillos correspondientes, destinando un pocillo para la carga de 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular (entre 10 y 250 kDa) PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU).
11. Llevar a cabo la electroforesis a 180 V durante 1 h o hasta que las bandas del marcador estén bien separadas.

### **3.7. Transferencia a membranas de nitrocelulosa**

Una vez finalizado el proceso SDS-PAGE, se realiza la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa de 0,2  $\mu$ m de grosor tanto para la detección de citocromos *c* como para los ensayos de inmunodetección. La transferencia de proteínas a la membrana se efectúa mediante el sistema Trans-Blot Turbo

(Bio-Rad), para lo que se emplea un paquete comercializado por Bio-Rad que contiene tanto las membranas de nitrocelulosa como los correspondientes papeles de filtro humedecidos. El protocolo se puede resumir en los siguientes pasos:

1. Colocar el gel de poliacrilamida en contacto con la membrana de nitrocelulosa, creando un sándwich con el papel de filtro del paquete, quedando la membrana en el interior pegada al gel, tomando la precaución de que todas las capas queden sin burbujas.
2. Colocar el sándwich en el casete del sistema, enfriando previamente la tapa del casete a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante unos 30 min para evitar el sobrecalentamiento del sistema y, con ello, la desnaturalización de las proteínas.
3. Cerrar el casete a presión accionando un mecanismo hermético.
4. Establecer el protocolo adecuado de transferencia semiseca: protocolo preestablecido llamado *MixedMW*; 3 min y 15 V para la detección de citocromos *c*, o 6 min y 15 V para la inmunodetección con anticuerpos.
5. Lavar las membranas con las proteínas transferidas usando el tampón adecuado, dependiendo de su uso posterior.

### **3.8. Detección de citocromos tipo *c* mediante *heme-staining***

Para este protocolo, se necesita preparar previamente la siguiente solución:

- ✓ Tampón de carga de proteínas: Tris-HCl 350 mM (pH 6,8); SDS 350 mM; DTT 20 mM; glicerol 30% (v/v); azul de bromofenol 0,02% (p/v); DTT: 1,4-ditiotreitol (CAS: 3483-12-3)

La detección de proteínas que contienen grupos hemo de tipo *c* se llevó a cabo mediante la técnica de detección de actividad peroxidasa (o *heme-staining*), intrínseca a estos citocromos (Vargas *et al.*, 1993; Delgado *et al.*, 2003). Para ello, la membrana se incubó durante 2 min con sendos volúmenes de 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y luminol, proporcionados ambos reactivos con el kit Amersham<sup>TM</sup> ECL Select<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EEUU). Las señales quimioluminiscentes se revelan con un sistema ChemiDoc XRS<sup>+</sup> (Bio-Rad), y las imágenes se analizan operando con los programas Quantity One® e Image Lab<sup>TM</sup> (siendo ambos de Bio-Rad).



### **3.9. Ensayos de inmunodetección (*western-blot*)**

Para este protocolo, se necesita preparar previamente las siguientes soluciones:

- ✓ Tampón de carga de proteínas: Tris-HCl 280 mM (pH 6,8); SDS 350 mM; DTT 480 mM; glicerol 20% (v/v); azul de bromofenol 0,02% (p/v)
- ✓ TBS: NaCl 150 mM en Tris-HCl 50 mM (pH 7,5)
- ✓ TTBS: TWEEN® 20, 0,1% (v/v) en TBS
- ✓ Tampón de bloqueo (*blocking buffer*): leche en polvo descremada (para análisis) 7,5% (p/v) en TTBS

Después de transferir las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, se lleva a cabo la inmunodetección mediante el siguiente protocolo (basado en la metodología descrita previamente por Delgado *et al.* (2003), Felgate *et al.* (2012), Torres *et al.* (2017) y Jiménez-Leiva *et al.* (2019)):

1. Lavar la membrana en 25 mL de tampón TBS durante 20 min en agitación a temperatura ambiente.
2. Reemplazar el TBS por tampón de bloqueo y dejar incubando la membrana durante toda la noche a 6 °C.
3. Al día siguiente, descartar el tampón de bloqueo y lavar 3 veces la membrana con tampón TTBS; 15 min cada lavado.
4. Incubar la membrana durante 1 h con el anticuerpo primario a temperatura ambiente. En el caso de NapA, se emplean anticuerpos purificados anti-NapA de *P. pantotrophus* a una tasa de dilución 1:750. En el caso de NirK, se usan anticuerpos homólogos primarios anti-NirK de *B. diazoefficiens* obtenidos de conejo (ABclonal Biotechnology Co., Wuhan, China) a una tasa de dilución 1:1000. En el caso de NosZ, se utilizan anticuerpos heterólogos primarios anti-NosZ de *P. denitrificans* obtenidos de oveja a una tasa de dilución 1:1000.
5. Lavar las membranas 3 veces con tampón TTBS, siendo cada lavado de 15 min a temperatura ambiente.
6. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario durante 1 h también a temperatura ambiente. En el caso de NapA y NirK, se emplean anticuerpos secundarios anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*, HRP) (Sigma-Aldrich) a una tasa de dilución 1:3500. En el caso de

NosZ, se usan anticuerpos secundarios anti-oveja obtenidos de burro conjugados con HRP (Sigma-Aldrich) a una tasa de dilución 1:3500.

7. Lavar 4 veces con tampón TTBS la membrana durante 15 min cada lavado.
8. Revelar la membrana siguiendo la metodología descrita para la detección de citocromos de tipo *c* (apartado 3.8).

### **3.10. Visualización de proteínas en geles de poliacrilamida con azul de Coomassie®**

Para este protocolo, se necesita preparar previamente las siguientes soluciones:

- ✓ Solución de azul Coomassie: Coomassie® Brilliant Blue R250 1 g; metanol 400 mL; ácido acético 100 mL; H<sub>2</sub>O destilada 500 mL
- ✓ Solución de desteñido: metanol 250 mL; ácido acético 100 mL; H<sub>2</sub>O destilada 650 mL

Para la visualización de proteínas, se lleva a cabo una SDS-PAGE en otro gel paralela a la del gel destinado a la transferencia a la membrana de nitrocelulosa. En este segundo gel, se cargan idénticos volúmenes de la misma muestra que se había cargado en el primer gel, es decir, se replica el primer gel en el segundo gel. Tras la SDS-PAGE, este segundo gel se tiñe con solución de azul Coomassie® durante 12 min a temperatura ambiente. Posteriormente, el gel se lava con solución de desteñido durante 2 h.

## **IV. Métodos de biología molecular**

### **4.1. Obtención de ADN plasmídico de *E. coli***

El ADN plasmídico de *E. coli* se puede obtener empleando la técnica de miniprep TENS o un kit comercial.

La técnica de miniprep TENS se usa durante un cribado rápido de candidatos en el proceso de clonación de fragmentos de ADN en plásmidos.

Para el protocolo de miniprep TENS, se necesita preparar previamente las siguientes soluciones:

- ✓ Tampón TE: Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8
- ✓ Solución TENS: NaOH 0,1 M; SDS 0,5% (p/v); ARNasa A en TE 1 µL
- ✓ Solución de neutralizado: acetato sódico 3 M; equilibrado con ácido acético glacial a pH 5,2
- ✓ Solución de ARNasa A: 2 mg·mL<sup>-1</sup> ARNasa A en Tris-HCl 10 mM (pH 7,4); NaCl 0,1 M; glicerol 20% (v/v); hervir durante 10 min para eliminar ADNasas

El protocolo es el siguiente:

1. Tras una incubación de 16 h de los cultivos de 5 mL de *E. coli* correspondientes, centrifugar en tubos de microcentrífuga a 13000 rpm durante 5 min.
2. Descartar el sobrenadante, dejando unos 50 µL remanentes, resuspendiendo las células en dicho volumen.
3. Añadir 300 µL de solución TENS y 150 µL de solución de neutralizado.
4. Agitar la mezcla en vórtex durante unos 5 s.
5. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 min.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, llenándolo con etanol absoluto (100%), mezclando por inversión unas 10 veces.
7. Centrifugar a 13000 rpm y descartar el sobrenadante.
8. Lavar el *pellet* obtenido con 200 µL de etanol al 70%,.
9. Descartar el etanol y secar el sedimento durante 10 min al vacío.
10. Resuspender en 20-50 µL de agua ultrapura.

Cuando las muestras se destinan a secuenciación, es necesaria una mayor pureza de las mismas, También es necesario cuando se emplean para pasos subsecuentes de clonación o, en algunos casos, cuando el método TENS no permite purezas o concentraciones de ADN suficientes para el cribado de candidatos. Para estas situaciones, se empleó el kit comercial QIAprep® Spin Miniprep (QIAGEN, Venlo, Países Bajos), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

### **4.2. Obtención del ADN total de *B. diazoefficiens***

Para el cribado por el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés, *polymerase chain reaction*) de los diferentes candidatos, tanto de *E. coli* como de *B. diazoefficiens*, se elaboran preparaciones de ADN total mediante lisis celular por calor. Para ello, en tubos de microcentrífuga, se resuspende una pequeña cantidad de células procedentes de una placa fresca en 200 µL de agua ultrapura, incubando a 100 °C en Termoblock o en agua hirviendo durante 10 min. Las muestras así preparadas se guardan a -20 °C, aunque, en general, pueden conservarse durante una semana a 4 °C. En el caso de utilizarlas inmediatamente después de prepararlas, deben enfriarse en hielo. Normalmente, para las reacciones de PCR, se emplea un volumen de lisado celular equivalente al 10% del volumen total de reacción.

En caso de requerir mayor pureza en las preparaciones de ADN total, ya sea por efecto de inhibición de la reacción de PCR al utilizar lisados por calor, o porque los productos de PCR se deben emplear para secuenciación o clonación, se emplea el método comercial de REAL Pure Spin Plantas y Hongos (Real, Valencia, España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **4.3. Determinación de la concentración de ARN y ADN**

La concentración de ADN o ARN en soluciones acuosas se determina mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 nm. Para ello, se emplea el equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific), que realiza un barrido del espectro ultravioleta de 220 a 350 nm. Tras limpiar el pedestal, y establecer un blanco con agua ultrapura, se selecciona el tipo de ácido nucleico (ADN o ARN de cadena doble o simple), y se colocan 2  $\mu\text{L}$  de la muestra correspondiente en el pedestal. Una vez realizada la medida, el sistema ofrece el espectro de absorbancia de la muestra, la concentración de ARN o ADN de la misma en  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , los datos de absorbancia a 260 y 280 nm, y los ratios 260/280 y 260/230. El primer ratio, 260/280, debe estar cercano a 1,8 en muestras de ADN, y a 2 en muestras de ARN. Si resulta ser más bajo, entonces indica la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben a 280 nm. El segundo ratio, 260/230, es una medida secundaria de la pureza de la muestra, y sus valores son a menudo más altos respecto a los del ratio anterior, situándose comúnmente entre 2 y 2,2, tanto para ADN como para ARN. Valores inferiores indican la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm, como carbohidratos, EDTA o fenol.

Los datos obtenidos mediante este sistema pueden ser validados en una electroforesis en gel de agarosa, comparando la intensidad de banda con la del marcador, de concentraciones conocidas (GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder; Thermo Fisher Scientific), ya sea *de visu* o con el programa Image Lab<sup>TM</sup>.

### **4.4. Amplificación de ADN mediante PCR**

Esta técnica se emplea con múltiples fines, como obtención de fragmentos de ADN para su clonación en vectores, comprobación de la correcta construcción de plásmidos, comprobación y diferenciación de cepas recombinantes, experimentos de qRT-PCR, y comprobación de contaminación de las muestras por ADN o ARN.

Dependiendo de la finalidad de la PCR, se emplean dos ADN polimerasas diferentes:

- I. DreamTaq (número de catálogo #EP0702, Thermo Fisher Scientific) se emplea en PCR rutinaria, como comprobación de candidatos, verificación de la especificidad de oligonucleótidos, o la verificación de ausencia de ARN en muestras de ADN.
- II. Phusion (número de catálogo #F530L Thermo Fisher Scientific) se utiliza en PCR donde se requiere una mayor fidelidad en la secuencia de ADN a amplificar, como en los casos donde los fragmentos de ADN amplificados se deben clonar posteriormente en vectores.

En la Tabla 6, se detallan las mezclas de PCR para las diferentes ADN polimerasas empleadas:

**Tabla 6.** Mezclas de PCR por reacción en función de la ADN polimerasa utilizada.

Componente	Para DreamTaq	Para Phusion
Tampón específico (10x)	2,5 µL	5 µL
dNTP 10 mM	2 µL	0,5 µL
Oligonucleótido A	1,5 µL	2 µL
Oligonucleótido B	1,5 µL	2 µL
ADN polimerasa	0,2 µL	0,125 µL
ADN molde	400 ng - 800 ng	20 ng
DMSO (opcional)	3 µL	-
H <sub>2</sub> O ultrapura	Hasta 25 µL	Hasta 25 µL

Las reacciones se llevan a cabo en un termociclador GeneAmp 2400 (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EEUU) con tapa calefactable. El programa de amplificación se diseña según las especificaciones de la ADN polimerasa empleada y el tamaño del fragmento a amplificar, según se detalla a continuación (Tabla 7):

**Tabla 7.** Programa de PCR diseñado en función de la ADN polimerasa utilizada.

Etapa		Ciclos	Para DreamTaq	Para Phusion
Desnaturalización inicial		1	95 °C / 5 min	98 °C / 30 s
Amplificación	Desnaturalización	30	94 °C / 30 s	98 °C / 10 s
	Annealing		57 °C / 30 s	60 °C / 30 s
	Extensión		72 °C / ≥ 1 min <sup>(1)</sup>	72 °C / 30 s por kb
Extensión final		1	72 °C / 10 min	72 °C / 10 min
Conservación (HOLD)		-	4 °C / ∞	4 °C / ∞

<sup>(1)</sup> Según las instrucciones del fabricante, la duración recomendada de la etapa de extensión es de 1 min para fragmentos de hasta 2 kb. A partir de 2 kb, el tiempo de extensión debe ser prolongado por 1 min por kb.

#### **4.5. Electroforesis de ADN o ARN en geles de agarosa**

Para este protocolo, se necesita preparar previamente las siguientes soluciones:

- ✓ Tampón de carga 6x para ADN o ARN: sacarosa 40% (*p/v*); azul de bromofenol 0,25% (*p/v*); H<sub>2</sub>O ultrapura, 10 mL; se divide en alícuotas de 1 mL
- ✓ Tampón TBE 0,5x (para ADN): Tris-HCl 45 mM; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 45 mM; EDTA 1 mM; pH 8
- ✓ Tampón TAE 1x (para ARN): Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM; pH 8

Para separar y visualizar fragmentos de ADN (o ARN), procedentes de PCR, miniprep o digestión, se efectúa una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (o al 1% para fragmentos por debajo de 500 pb) en tampón TBE 0,5x para ADN o en tampón TAE 1x para ARN, que se emplean también como tampón de desarrollo. El sistema empleado para esta técnica es Mini-Sub Cell GT Cell (Bio-Rad). Para cargar las muestras en los pocillos del gel, éstas se mezclan con tampón de carga 6x. Un pocillo se destina para la carga del marcador de ADN (GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder; Thermo Fisher Scientific). Para electroforesis de rutina, se emplean 95 V durante 70 min, tiempo en el cual el frente de azul de bromofenol alcanza  $\frac{3}{4}$  partes del gel, en la mayoría de los casos.

Para la visualización de las muestras, al tampón de carga se le añade GelRed® (Biotium, Fremont, California, EEUU), el cual es un agente fluorescente fotosensible, extremadamente estable y seguro para el medio ambiente diseñado para reemplazar al bromuro de etidio (EtBr), altamente tóxico, en la tinción de ácidos nucleicos en geles de agarosa o poliacrilamida. GelRed® presenta los mismos espectros de excitación y emisión que el EtBr, situándose el pico de excitación de ambos en 301 nm (región ultravioleta) y el de emisión, en 603 nm (región visible del naranja). Para el revelado de los geles, se emplea un sistema GelDoc XR (Bio-Rad), y las imágenes se analizan operando con los programas Quantity One® e Image Lab™ (siendo ambos de Bio-Rad).

#### **4.6. Purificación de fragmentos de ADN producto de PCR**

Para ello, se utiliza un kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN), siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante.

#### **4.7. Secuenciación del ADN**

Para secuenciar el ADN clonado en vectores de clonación o productos de PCR, se emplea el método Sanger. La técnica se lleva a cabo en el Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (IPBLN). Según las indicaciones del servicio de secuenciación del IPBLN: 400-800 ng de ADN plasmídico o 10-80 ng de producto de PCR se disuelven en agua ultrapura, añadiendo posteriormente 6,4 pmol de un solo oligonucleótido, desde el cual se iniciará la reacción. El volumen final de reacción es de 12  $\mu$ L. Los resultados enviados desde el servicio se analizan con el programa Clone Manager (Sci-Ed, Westminster, Colorado, EEUU).

#### **4.8. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción**

La digestión del ADN de las muestras pertinentes se lleva a cabo mediante endonucleasas de restricción. Este proceso es necesario para comparar el perfil obtenido tras la electroforesis en gel de agarosa con el patrón teórico resultante *in silico* con el programa Clone Manager (Sci-Ed), y se emplea tanto para la clonación en vectores como para la verificación de las construcciones conseguidas. Las endonucleasas empleadas son FastDigest (Thermo Fisher Scientific), que se usan siguiendo las especificaciones del fabricante. Las digestiones se llevan a cabo en tubos de microcentrífuga, a los que se les añaden, como máximo, 1  $\mu$ g de ADN plasmídico o 0,2  $\mu$ g de producto de PCR, 2  $\mu$ L de tampón de reacción 10x específico de la enzima en cuestión (suministrado por el proveedor junto con la enzima), y 1  $\mu$ L de la endonucleasa de restricción de interés, completando con agua ultrapura hasta 20  $\mu$ L para ADN plasmídico o hasta 30  $\mu$ L para producto de PCR. En el caso de realizar digestiones con varias enzimas, se ajusta el volumen de cada una para que no superen en conjunto el 10% del volumen de reacción. A continuación, se mezcla por pipeteo y se les da un breve pulso a todos los tubos. Después, se incuban a 37 °C en Termoblock durante el tiempo especificado para cada enzima (Tabla 8), incrementando el tiempo de incubación en caso necesario (previa comprobación de las digestiones mediante electroforesis en gel de agarosa). La inactivación de las enzimas no se requiere para comprobaciones rutinarias de plásmidos recombinantes, pero es conveniente cuando se pretende emplear los fragmentos digeridos en posteriores etapas de un proceso de clonación. En el caso de las enzimas empleadas en esta tesis, todas ellas se inactivan mediante choque térmico a una temperatura elevada. El tiempo y la temperatura de incubación dependen de la endonucleasa a inactivar, aunque, en general, se incuba durante 20 min a 65 °C u 80 °C en Termoblock, en función de la

enzima. La siguiente tabla (Tabla 8) recoge todas las endonucleasas utilizadas, así como sus características más relevantes, indicadas por el fabricante:

**Tabla 8.** Endonucleasas de restricción empleadas en esta tesis.

Nombre	Diana (5'→3') <sup>(1)</sup>	Tiempo de reacción (min)		Inactivación (min / °C)
		≤ 1 µg de plásmido	≤ 0,2 µg de producto de PCR	
<b>BamHI</b>	<u>G</u> GATCC	5	5	5 / 80
<b>EcoRI</b>	<u>G</u> AATTC	15	20	5 / 80
<b>PstI</b>	CTGC <u>A</u> G	5	30	-
<b>XbaI</b>	<u>T</u> CTAGA	5	5	20 / 65

<sup>(1)</sup> En la secuencia diana (5'→3'), la base subrayada representa el sitio de corte de la endonucleasa de restricción en cuestión.

## **4.9. Ligación de fragmentos de restricción a vectores de clonación**

### *4.9.1. Desfosforilación de vectores de clonación*

Esta reacción se lleva a cabo con el fin de evitar la posible religación del vector digerido, o la ligación entre dos moléculas del mismo. Para ello, se emplea la enzima fosfatasa alcalina de camarón (*Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP), 1 U·µL<sup>-1</sup>, Thermo Fisher Scientific), aplicando el protocolo recomendado por el proveedor.

### *4.9.2. Ligación a vectores de clonación*

Desfosforilado o no el vector, el siguiente paso consiste en ligar el fragmento de ADN de interés al vector de clonación adecuado. Para ello, se lleva a cabo una reacción de ligación preparada según un protocolo modificado basado en uno previo descrito por Sambrook y Russell (2001), y que se detalla a continuación:

1. En un tubo de microcentrífuga, añadir, en primer lugar, un cierto volumen “X” de inserto y un cierto volumen “Y” de vector digerido (previamente desfosforilado o no), de tal manera que la suma “X+Y” sea de, al menos, 100 ng, y teniendo en cuenta una relación de 1 mol de vector por 3 mol de inserto (1:3).
2. Añadir 1 µL de ligasa T4 (5 U·µL<sup>-1</sup>, Roche, Basilea, Suiza) y 1 µL de tampón de la ligasa (suministrado por el proveedor junto a la enzima), completando con agua ultrapura hasta 10 µL de volumen final.
3. Mezclar suavemente por pipeteo y dar un breve pulso.



4. Incubar las reacciones a 4 °C durante toda la noche (o un fin de semana), aunque también se pueden dejar a temperatura ambiente durante 1 h.

#### **4.10. Preparación y transformación de células competentes de *E. coli***

##### *4.10.1. Preparación de células competentes de *E. coli* con RbCl*

Para este protocolo, se necesita preparar previamente las siguientes soluciones:

- ✓ Tampón TFB1: acetato potásico 30 mM; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 50 mM; RbCl 100 mM; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10 mM; glicerol 15% (v/v); pH 5,8
- ✓ Tampón TFB2: MOPS 10 mM; RbCl 10 mM; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 75 mM; glicerol 15% (v/v); pH 6,8; cubrir con papel de aluminio para protegerlo de la luz y conservar a 4 °C; MOPS: 3-(*N*-morpholino)propane sulfonic acid (CAS: 1132-61-2)

Las células competentes de *E. coli* se generan mediante la técnica descrita por Hanahan (1983), la cual se detalla a continuación:

1. Inocular un precultivo de 5 mL de células de *E. coli* DH5α o S17.1 (ambas cepas descritas en Tabla 1) en un matraz de 500 mL al que previamente se le ha introducido un volumen de LB de 100 mL precalentado a 37 °C, incubando este matraz a 37 °C en un agitador orbital a 170 rpm hasta que el cultivo alcance una OD<sub>600</sub> de 0,4-0,6 (fase logarítmica).
2. Detener el crecimiento manteniéndolo en hielo durante 15 min. Es necesario mencionar que la OD<sub>600</sub> es esencial para obtener realmente células competentes, ya que una OD<sub>600</sub> por encima de 0,6 hace disminuir sustancialmente la capacidad de estas células de adquirir la competencia.
3. Centrifugar el cultivo en tubos Falcon™ estériles de 50 mL a 7000 rpm durante 10 min a 4 °C, y descartar el sobrenadante.
4. Resuspender suavemente el *pellet* obtenido en 30 mL de tampón TFB1 (enfriado previamente a 4 °C).
5. Incubar en hielo durante 15 min.
6. Centrifugar como en el paso 3, descartando el sobrenadante posteriormente.
7. Resuspender el *pellet* en 4 mL de tampón TFB2 (enfriado previamente a 4 °C).
8. Dispensar el volumen total en tubos de microcentrífuga (enfriados previamente a 4 °C) en alícuotas de 100 µL, guardando finalmente las alícuotas a -80 °C hasta su uso.

Las células competentes de *E. coli* son muy delicadas. Los pasos en frío son necesarios para evitar la lisis celular y, además, se debe pipetear con suavidad, prescindiendo de agitación por vórtex.

#### 4.10.2. Transformación de *E. coli* con el plásmido de interés

La transformación de células competentes de *E. coli* con el plásmido en cuestión se realiza siguiendo un protocolo establecido por Rodríguez y Tait (1983), que consiste básicamente en los siguientes pasos:

1. Descongelar en hielo durante 10-15 min las alícuotas de células competentes a utilizar.
2. Añadir 50 o 100 ng de plásmido recombinante o 25 ng de plásmido puro.
3. Mezclar suavemente e incubar en hielo durante 30 min.
4. Someter a las células a un choque térmico de 42 °C durante 90 s (aunque el tiempo puede reducirse a 45 s), e incubar en hielo durante 5 min.
5. Añadir medio LB sin antibióticos hasta 500 µL.
6. Incubar a 37 °C durante 1 h 30 min en agitación a 170 rpm.
7. Durante la incubación, preparar las placas de Petri necesarias con medio LB sólido y los antibióticos correspondientes, añadiendo a cada placa, además, 40 µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranosido (X-Gal, CAS: 7240-90-6) y 4 µL de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, CAS: 367-93-1), en el caso de que se pueda realizar una selección por color mediante un ensayo blanco/azul por α-complementación.
8. Sembrar en césped las placas con las células transformadas. Concretamente, sembrar 2 placas por cada transformación. Una de ellas se siembra con 50 µL de la resuspensión y, para la otra placa, el volumen restante de resuspensión (450 µL) se centrifuga a máxima velocidad durante 5 min, y el *pellet* resultante se resuspende en 100 µL de LB, sembrando en la placa el volumen completo de la resuspensión concentrada.
9. Incubar las placas a 37 °C durante toda la noche.

#### **4.11. Transferencia de ADN a células de *B. diazoefficiens* o *E. meliloti* mediante conjugación**

La transferencia de plásmidos a *B. diazoefficiens* o a *E. meliloti* se efectúa a través de conjugaciones biparentales con la cepa de *E. coli* S17.1 que contiene el plásmido o construcción de interés, y se realiza siguiendo una metodología bien establecida en nuestro grupo de investigación, la cual se detalla a continuación:

1. Cultivar en matraz la cepa receptora de *E. meliloti* o *B. diazoefficiens* con 20 o 50 mL de TY o PSY, respectivamente, con los antibióticos correspondientes hasta alcanzar la fase exponencial tardía de crecimiento (3 o 4 días para *E. meliloti*; 4 o 5 días para *B. diazoefficiens*).
2. El día anterior a la conjugación, preparar cultivos de *E. coli* S17.1, cepa donadora, en 3 mL de LB suplementado con los antibióticos adecuados, e incubar a 37 °C en agitación a 170 rpm durante toda la noche.
3. Al día siguiente, refrescar esos cultivos de *E. coli* S17.1 inoculando 150 µL de los mismos en tubos nuevos a los que previamente se les ha añadido 3 mL de LB con sus antibióticos correspondientes.
4. Incubar a 37 °C en agitación a 170 rpm hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0,4-0,6 (fase logarítmica), que normalmente se consigue al cabo de unas 3 h.
5. Cuando los cultivos de las cepas donadora y receptora presenten una OD<sub>600</sub> adecuada, centrifugar 1 mL (*E. meliloti*) o 5 mL (*B. diazoefficiens*) de cepa receptora a 13000 rpm durante 5 min, descartando el sobrenadante después.
6. Sobre el *pellet* obtenido, añadir 1 mL de cepa donadora (*E. coli* S17.1), centrifugando en las mismas condiciones descritas en el paso 5, y descartando el sobrenadante posteriormente.
7. Lavar el *pellet* resultante 2 veces en 1 mL de TY o PSY, según corresponda, centrifugando como en el paso 5, y descartar el sobrenadante.
8. Resuspender los sedimentos celulares en 100 µL de TY o PSY.
9. Sembrar el volumen completo en forma de gota en placas individuales solidificadas previamente y elaboradas con TY o PSY sin adición de antibióticos.
10. Dejar secar las gotas e incubar a 30 °C durante 48 h.
11. Preparar 2 placas por gota de conjugación con el medio sólido adecuado, MM para *E. meliloti* o PSY para *B. diazoefficiens*, esta vez añadiendo antibióticos. Las placas para *B. diazoefficiens* contienen el antibiótico cloranfenicol, ya que éste

permite seleccionar a esta especie, impidiendo el crecimiento de *E. coli*. Las placas de *E. meliloti* se preparan en medio MM, en el cual no crece *E. coli*, por lo que la selección de *E. meliloti* se lleva a cabo por el medio de cultivo, no por el antibiótico, ya que, en este caso, tanto la cepa receptora como la donadora resisten a Sm.

12. La siembra se efectúa dependiendo de si la cepa receptora es *B. diazoefficiens* o *E. meliloti*. En el caso de *B. diazoefficiens*, resuspender las gotas individualmente en 1 mL de medio sin antibióticos, y sembrar en césped 30  $\mu\text{L}$  en una placa y 200  $\mu\text{L}$  en la otra placa. En el caso de *E. meliloti*, resuspender las gotas en 1 mL de medio MM sin antibióticos, y realizar diluciones seriadas de las gotas de conjugación también en medio MM sin antibióticos, entre  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ , sembrando 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ , ya que, en estas dos diluciones, las colonias crecen lo suficientemente separadas como para seleccionarlas y aislarlas individualmente.
13. Incubar todas las placas a 30 °C hasta observar colonias bien crecidas (normalmente, entre 8 y 10 días, aunque las colonias de *E. meliloti* pueden tardar unos días más en aparecer, dado que crecen en medio mínimo y, además, proceden de diluciones).

Es necesario mencionar que las placas para *E. meliloti* también contienen X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónico (CAS: 18656-96-7)) a una concentración final de 40  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para poder seleccionar colonias azules, es decir, transformadas con el plásmido pGUS3 (Tabla 2).

#### **4.12. Aislamiento y purificación del ARN total de *B. diazoefficiens***

##### *4.12.1. Extracción del ARN total de *B. diazoefficiens**

###### 4.12.1.1. Protocolo manual

Para este protocolo, se necesita preparar previamente las siguientes soluciones:

- ✓ Solución STOP o de parada: Fenol 10% (v/v) en etanol; pH 8
- ✓ Agua tratada con DEPC: H<sub>2</sub>O ultrapura; DEPC 0,1% (p/v); se deja en agitación durante 24 h y se autoclava posteriormente; DEPC: dietilpirocarbonato (CAS: 1609-47-8)
- ✓ Solución D: isotiocianato de guanidina 4 M; citrato sódico 25 mM; sarcosil 0,5% (p/v); H<sub>2</sub>O tratada con DEPC 50 mL; pH 7; autoclavar

- ✓ Solución de lisis: mezcla 10:1:10 solución D, acetato sódico 2 M (pH 4) y fenol saturado en H<sub>2</sub>O tratada con DEPC o en Tris-HCl; pH 8
- ✓ Tampón TE libre de ARNasas: Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8; se prepara en H<sub>2</sub>O tratada con DEPC y se conserva a 4 °C
- ✓ Solución de ADNasa: inhibidor de ARNasas 20 U; DTT 0,1 M; MgCl<sub>2</sub> 1 M; ADNasa (libre de ARNasa) 10 U; H<sub>2</sub>O tratada con DEPC 25 µL

El protocolo seguido se muestra a continuación:

1. Para detener la actividad celular de los cultivos, mezclar 35 mL de cultivo con 5 mL de solución STOP.
2. Centrifugar a 7000 rpm durante 10 min a 4 °C.
3. Descartar el sobrenadante. En caso de que sea necesario, el *pellet* se puede congelar en N<sub>2</sub> líquido y guardar a -80 °C hasta su uso.
4. Resuspender el sedimento en 1,4 mL de solución de lisis.
5. Incubar a 60 °C durante 10 min, agitando periódicamente.
6. Adicionar 280 µL de cloroformo y agitar en vórtex durante unos segundos.
7. Centrifugar a 9000 rpm durante 10 min a 4 °C, y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
8. Añadir 660 µL de isopropanol frío e incubar a -20 °C durante 15 min.
9. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 min.
10. Descartar el sobrenadante y lavar el *pellet* con etanol al 70%.
11. Resuspender este sedimento en agua tratada con DEPC.
12. Cuantificar la concentración de ARN en las muestras con NanoDrop, verificar su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa, y guardar a -20 °C hasta su uso.

#### 4.12.1.2. Protocolo comercial

El método comercial para extracción del ARN total se llevó a cabo en los laboratorios del Dr. Gates, en la *School of Biological Sciences*, en la UEA, ubicada en Norwich (Reino Unido). Al no haber medios ni un cuarto aparte para extraer el ARN con el método convencional, se pensó que merecía la pena intentar aislar ARN de cultivos microaeróbicos de *B. diazoefficiens* empleando el kit comercial SV Total RNA Isolation System (número de catálogo #Z3100, Promega, Madison, Wisconsin, EEUU), el cual se

emplea en dicho laboratorio para extraer ARN de cultivos de *P. denitrificans*. Para ello, se siguieron las instrucciones del fabricante.

#### 4.12.2. Purificación del ARN total obtenido

Los siguientes pasos se pueden realizar el mismo día de la extracción o al día siguiente. El protocolo seguido varía dependiendo de si el ARN se aisló usando el método convencional o el comercial.

Si el ARN se extrajo por el método convencional, se siguió este protocolo:

1. Añadir 60 ng de ARN a un tubo de microcentrífuga, conteniendo previamente 25  $\mu\text{L}$  de solución de ADNasa, e incubar a 37 °C durante 1 h.
2. Comprobar la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa, y tomar 1  $\mu\text{L}$  de la muestra de ARN para realizar una PCR de verificación de la ausencia total de ADN, en la cual, no debe detectarse amplificación alguna.
3. Añadir 1 volumen de mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Ambion, Austin, Texas, EEUU) a las muestras de ARN.
4. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 min a 4 °C.
5. Recoger cuidadosamente la fracción superior acuosa.
6. Precipitar el ARN adicionando acetato sódico 3 M (pH 4,8) hasta el 10% de concentración final y 2 volúmenes de etanol absoluto.
7. Mantener las muestras toda la noche a  $-80$  °C.
8. Al día siguiente, centrifugar a 13000 rpm durante 15 min.
9. Descartar el sobrenadante, y lavar el sedimento con etanol al 70% centrifugando en las mismas condiciones descritas.
10. Resuspender el sedimento de ARN obtenido en agua tratada con DEPC.

Si el ARN se extrajo por el método comercial, las muestras de ARN se trataron con el kit TURBO DNA-free<sup>TM</sup> (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este tratamiento se efectuó para eliminar toda traza de ADN genómico contaminante.

Finalmente, independientemente de emplear el método convencional o comercial, se cuantificó la concentración de ARN en las muestras con NanoDrop, se comprobó la ausencia de ADN en las muestras mediante PCR con 1  $\mu\text{L}$  de cada muestra, se verificó

su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa, y se guardaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **4.13. Transcripción inversa o retrotranscripción**

Para la obtención de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN extraído, el protocolo varía ligeramente dependiendo de si el ARN se aisló usando el método convencional o el comercial.

Si el ARN se extrajo por el método convencional, se siguió este protocolo:

1. Añadir  $1\text{ }\mu\text{g}$  de ARN total a un tubo de microcentrífuga libre de ARNasas, junto a  $2\text{ }\mu\text{L}$  del oligonucleótido específico ( $2\text{ pmol}$ ) o aleatorio ( $75\text{ }\mu\text{g}$ ), y  $2,5\text{ }\mu\text{L}$  de dNTPs a  $10\text{ mM}$ , completando con agua ultrapura libre de ARNasas (Sigma-Aldrich) hasta  $20\text{ }\mu\text{L}$ .
2. Incubar a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $5\text{ min}$ , y pasar inmediatamente a hielo.
3. Añadir  $3\text{ }\mu\text{L}$  de solución de DTT  $100\text{ mM}$ ,  $1\text{ }\mu\text{L}$  de RNaseOUT<sup>TM</sup> ( $40\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ; Invitrogen), y  $6\text{ }\mu\text{L}$  de tampón de reacción  $5\times$  (compuesto por Tris-HCl  $250\text{ mM}$  (pH 8,3), KCl  $250\text{ mM}$ ,  $\text{MgCl}_2$   $20\text{ mM}$  y DTT  $50\text{ mM}$ ).
4. Incubar a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  (en el caso de usar oligonucleótidos específicos) o a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  (en el caso de oligonucleótidos aleatorios) durante  $2\text{ min}$ .
5. Añadir  $1,5\text{ }\mu\text{L}$  de retrotranscriptasa y realizar el ciclo de incubación:  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $10\text{ min}$ ,  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $50\text{ min}$ , y  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $15\text{ min}$ .
6. Eliminar el ARN de la muestra por lisis alcalina añadiendo  $10\text{ }\mu\text{L}$  de NaOH  $1\text{ M}$  e incubar a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $30\text{ min}$ .
7. Neutralizar el pH añadiendo  $10\text{ }\mu\text{L}$  de HCl  $1\text{ M}$ .
8. Purificar el ADNc obtenido con el kit comercial especificado en el apartado 4.6.
9. Añadir alícuotas de solución de neutralizado, hasta que el indicador del pH del tampón PB vire a amarillo.

En caso de emplear oligonucleótidos aleatorios, se cuantifica la concentración de ADN mediante NanoDrop. Sin embargo, la concentración de ADN obtenida usando oligonucleótidos específicos era demasiado baja como para cuantificarla con esta metodología.

En el caso del ARN obtenido mediante el método comercial, la retrotranscripción se llevó a cabo también con otro método comercial, el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (número de catálogo #K1622, Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **4.14. PCR cuantitativa a tiempo real**

La técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) permite amplificar el ADNc obtenido (apartado 4.13) y, simultáneamente, cuantificar de manera relativa a un gen de referencia el producto de la amplificación. Esta técnica se llevó a cabo en el sistema iQ<sup>TM</sup>5 Optical System (Bio-Rad), utilizando una placa ELISA de 96 pocillos para las reacciones. El gen de referencia en estos experimentos fue el codificante del ARN ribosómico, ARNr (o rRNA, en inglés) 16S.

Para estos ensayos, se añadió cada pocillo el par de oligonucleótidos correspondiente al gen que se deseaba amplificar a una concentración final de 0,2  $\mu$ M (4,5  $\mu$ L), y 9,5  $\mu$ L del fluoróforo iQ<sup>TM</sup> SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). A continuación, en cada pocillo se adicionaron 5  $\mu$ L del ADNc correspondiente. Para cada tratamiento, además, se incluyeron 3 concentraciones diferentes de ADNc, 10 veces menor a la anterior, tanto de las muestras como del gen de referencia; en este caso, 300, 30 y 3 ng de ADNc de cada gen de interés y del gen codificante del ARNr 16S, lo que se consiguió realizando diluciones seriadas.

Para cuantificar la expresión relativa de los genes de interés respecto al de referencia, se tiene en cuenta la eficiencia de cada pareja de oligonucleótidos, aplicando la metodología de Pfaffl (2001). Los niveles de expresión de los genes de estudio se normalizan respecto a la expresión del gen de referencia, que siempre debe ser constitutivo; en este caso, el codificante del ARNr 16S (Torres *et al.*, 2017).

## **V. Ensayos con plantas**

### **5.1. Esterilización y germinación de semillas**

Las semillas de soja (*G. max* (L.) Merr., cultivar Williams) se esterilizan en etanol al 96% (v/v) durante 5 min, pasándolas después a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (v/v) durante 15 min, lavándolas finalmente con abundante agua destilada estéril varias veces. Después, se añaden 25 mL de agar estéril al 1% (p/v) a placas de Petri estériles y, tras su solidificación, se colocan 10 semillas por placa, cubriéndolas con papel de aluminio y dejándolas germinar posteriormente a 28 °C durante 3 días.



Las semillas de alfalfa (*M. sativa* L., cultivar Victoria) se esterilizan sumergiendo las semillas en  $\text{HgCl}_2$  al 2,5% (p/v) durante 9 min. A continuación, se lavan 5-6 veces con agua destilada estéril en abundancia y se dejan en imbibición durante 2 h en agitación, renovando el agua tras la primera hora de incubación. Seguidamente, se introduce un disco de papel de filtro en placas de Petri estériles individuales, y cada disco se humedece con 3 mL de agua destilada estéril. Transcurridas las 2 h de imbibición, las semillas se colocan bien separadas en las placas de Petri estériles. Por último, las placas se disponen de manera inclinada unas sobre las otras en una bandeja, la cual se cubre con plástico negro, dejando a las semillas germinar en oscuridad a 30 °C durante 48 h.

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

Para el cultivo de plantas tanto de soja como de alfalfa, se empleó una solución mineral derivada de la que inicialmente fue descrita por Rigaud y Puppo (1975), y cuya composición es la siguiente (definida para 1 L de agua destilada):

- ✓ Macroelementos:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 68 mg;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 44 mg;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 123 mg;  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 174 mg;  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 150 mg; Sequestrene® 138 G100 (6,2 mg de Fe quelado), 25 mg.
- ✓ Microelementos:  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2,85 mg;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,55 mg;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 3,07 mg;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,11 mg.

Tras su preparación, se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 30 min.

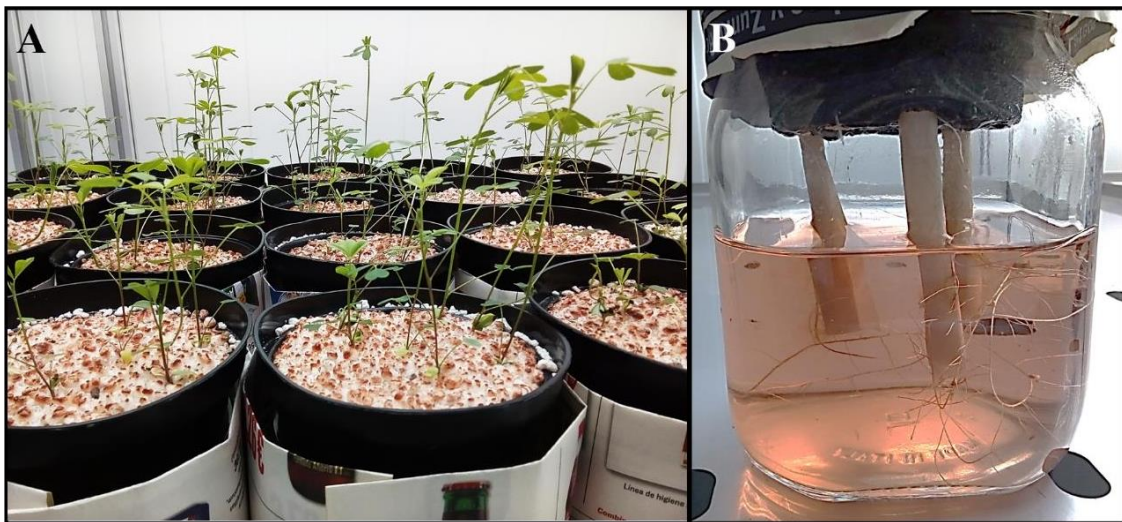
Para los experimentos realizados con plantas de soja, la solución se suplementó con 4 mM de  $\text{KNO}_3$  y diferentes concentraciones de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : 0, 5, 10, 20, 40, 60 o 100  $\mu\text{M}$ .

Para los experimentos llevados a cabo con plantas de alfalfa, la solución se suplementó con diferentes concentraciones de  $\text{KNO}_3$ , a saber, 0, 1, 2, 3 o 4 mM, y diferentes concentraciones de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : 0, 0,8 o 20  $\mu\text{M}$ .

### **5.3. Cultivo de las plantas**

Las semillas de soja o alfalfa se plantan en macetas con el sistema de Leonard (Leonard, 1943). Este sistema está formado por dos componentes: una base de vidrio en la parte inferior, y una maceta de plástico en la parte superior, con una capacidad de 250 mL para semillas de soja o de 350 mL para semillas de alfalfa. Las bases de vidrio se esterilizan a 121 °C durante 40 min, añadiendo a cada una en el momento de la siembra

200 o 600 mL de solución nutritiva (según la capacidad de la base) para macetas de soja o alfalfa, respectivamente. Las macetas se rellenan con perlita estéril y, previamente, en el caso de las macetas para semillas de alfalfa, a cada una se le colocan 3 tiras de papel de filtro, las cuales, al ajustar la maceta a la base, entran en contacto con la solución nutritiva, permitiendo a ésta ascender hasta las semillas por capilaridad (Figura 2). En cada maceta, se siembran 1 semilla de soja u 8 de alfalfa, las cuales se inoculan en el momento de la siembra con 1 mL de suspensión ( $10^8$  células) de la cepa bacteriana en cuestión de *B. diazoefficiens* o de *E. meliloti*, respectivamente. Seguidamente, las semillas se cubren con una fina capa de perlita para protegerlas de la contaminación ambiental, y también para reflejar la luz, evitando de este modo un sobrecalentamiento de las semillas que pudiera afectar a su desarrollo.



**Figura 2.** Sistema de maceta Leonard utilizado en esta tesis. (A) Vista frontal de la parte superior del sistema de maceta Leonard con plantas de alfalfa en crecimiento (en este caso, llevaban 26 días). (B) Vista de la parte inferior del sistema, donde se observan las tiras de papel y las raíces en contacto con la solución nutritiva al cabo de 30 días de crecimiento.

Las macetas en sistema de Leonard se trasladan a una cámara del Servicio de Invernadero y Cámaras de Cultivo de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC) con las siguientes condiciones ambientales controladas: ciclo día/noche de 16/8 h, temperatura de día/noche de 26/22 °C, y densidad de flujo fotónico fotosintético de  $180 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Las plantas se cosecharon a los 35 días en el caso de la soja, o a los 50 días en el caso de la alfalfa.

En el caso de las semillas de alfalfa, también se sembraron en tubos de vidrio para los ensayos de cinética de nodulación y competitividad (Figura 3):



**Figura 3.** Sistema de cultivo de los experimentos de cinética de nodulación y competitividad; fotografías procedentes de un mismo experimento. (A) Tubos con plantas de alfalfa en crecimiento cubiertos y taponados con algodón. (B) Vista frontal de tubos descubiertos. Se pueden observar las plantas de alfalfa en su interior tras 30 días de crecimiento. (C, D) Nódulos de alfalfa observados a través de los tubos transparentes al cabo de 30 días de cultivo.

El protocolo seguido se puede resumir en estos pasos:

1. Introducir a cada tubo una tira de papel de filtro y taparlos con algodón.
2. Autoclavarlos a 121 °C durante 20 min.
3. Añadir 10 mL de agua destilada estéril.
4. Plantar una semilla germinada en cada tubo.
5. Cubrir lateralmente cada tubo con un cartucho de papel de periódico para que la luz no incida directamente sobre las semillas.
6. Mantenerlos inclinados en oscuridad durante 24 h.
7. Trasladarlos a la cámara de condiciones controladas.
8. Dejar las plántulas crecer durante 4 o 5 días.
9. Durante el crecimiento de las plántulas en la cámara, preparar y autoclavar botes de 100 mL provistos de 90 mL de solución nutritiva.
10. El día de la inoculación, añadir las células a los botes a una densidad de  $10^8$  células·mL<sup>-1</sup> (para cinética de nodulación) o  $10^5$  células·mL<sup>-1</sup> (para competitividad) a partir de los cultivos microaeróbicos en matraz (Figura 4A) tras sedimentar y lavar las células y, en el caso de requerir condiciones anóxicas, cerrarlos herméticamente con un tapón de goma perforable (ajustado a la boca del

tubo con Parafilm®), inyectando a continuación gas N<sub>2</sub> mediante agujas con la longitud suficiente para contactar con la fase líquida (Figura 4B).

11. Reemplazar en cada tubo los 10 mL de agua por 10 mL de solución nutritiva inoculada con la suspensión celular correspondiente.

Para las condiciones anóxicas, los 10 mL se toman a través de las mismas agujas usadas para inyectar el gas N<sub>2</sub> tras esterilizarlas (Figura 4C). En el caso de las condiciones óxicas, los botes no se cierran herméticamente y los 10 mL se toman directamente con una jeringa. Finalmente, los tubos inoculados se trasladan de nuevo a la cámara de condiciones controladas, dejando las plántulas crecer durante 30 días, y contando los nódulos periódicamente.



**Figura 4.** Preparación de ensayos con plantas de alfalfa en tubos y en los que se requieren condiciones inicialmente anóxicas. (A) Cultivo microaeróbico de la cepa 1021-GUS3 para la inoculación de plantas de alfalfa en tubos de vidrio en el caso de un ensayo de competitividad. (B) Gaseo de los botes con N<sub>2</sub> inoculados previamente con la cepa correspondiente o con la mezcla 1:1. Las agujas de inyección de N<sub>2</sub> contactan con la solución nutritiva durante el gaseo. (C) Sistema usado para conservar las condiciones anóxicas durante la inoculación de las células en los tubos.

En el caso de los ensayos de competitividad, para comprobar que las mezclas de cepas en solución nutritiva estuvieran en proporción 1:1, se calcularon las unidades formadoras de colonias (CFU, del inglés, *colony-forming units*) por mL (CFU·mL<sup>-1</sup>), para lo que se tomaron 200 μL de cada mezcla antes de la inoculación en los tubos, sembrando 100 μL en placa (10<sup>0</sup>), mientras que los otros 100 μL se emplearon en diluciones seriadas de cada mezcla (10<sup>-1</sup>-10<sup>-5</sup>) en medio mínimo (medio MM, Tabla 4) sin antibióticos, y de cada dilución se sembraron 100 μL en césped en placas preparadas igual que las destinadas a la dilución 10<sup>0</sup>, es decir, con MM suplementado con Km, y X-Gluc sólo en el caso de las cepas que contenían pGUS3 (1021-GUS3 o 4004-GUS3). Las colonias podían contarse en placa después de 5 días a 30 °C, aproximadamente, pudiendo calcular de esa manera las CFU·mL<sup>-1</sup>, que debían estar en torno a 10<sup>5</sup>.

## **5.4. Tratamientos de las plantas**

### *5.4.1. Tratamientos de las plantas de soja*

Para inducir la producción de  $N_2O$  por los nódulos, todas las plantas se trataron con 4 mM de  $KNO_3$  y, a los 28 días de cultivo, se sometieron a encharcamiento durante 7 días, para lo cual, las plantas se sacaron de la maceta y se transfirieron a la base de vidrio, la cual se llenó seguidamente con solución nutritiva hasta su máxima capacidad, de manera que las raíces y los nódulos quedaron cubiertos por la solución, según se describe en Sánchez y colaboradores (2010) y en Tortosa y colaboradores (2015). Asimismo, se añadieron diferentes concentraciones de Cu a la solución nutritiva durante el crecimiento de acuerdo a Sánchez-Pardo y Zornoza (2014). Las plantas se regaban 2 veces a la semana con 200 mL de solución nutritiva nueva hasta la aplicación de encharcamiento.

Para la determinación del contenido de N de la planta procedente de la fijación biológica de  $N_2$  (BNF), las plantas se trataron con 4 mM de  $KNO_3$  marcado con  $^{15}N$  (Potassium nitrate- $^{15}N$ , 5 atom%  $^{15}N$ , Campro Scientific GmbH, Berlín, Alemania), el cual se añadió previamente a la solución nutritiva en el momento de su preparación.

Tras 35 días de cultivo, se cosecharon las plantas de soja, lavando sus raíces con abundante agua para eliminar la perlita, y secándolas con papel de filtro posteriormente. A continuación, se cosecharon los nódulos para las determinaciones pertinentes, y se llevó a cabo un análisis fisiológico de las plantas de soja.

### *5.4.2. Tratamientos de las plantas de alfalfa*

Tal y como se muestra en la Figura 5A, para estudiar la influencia del nitrato en las emisiones de  $N_2O$  por nódulos de alfalfa, las plantas se trataron con 0, 1 o 3 mM de  $KNO_3$  durante 50 días, o sin nitrato 43 días y con 10 mM de  $KNO_3$  la semana antes de la cosecha. Para medir la emisión de  $N_2O$  por los nódulos de alfalfa, cada set de macetas por tratamiento se dividió a la mitad, sometiendo a una mitad a encharcamiento durante la última semana antes de la cosecha tal y como se describe en el apartado 5.4.1, pero no a la otra.

De acuerdo a la Figura 5B, una vez establecidas las mejores condiciones para medir las emisiones de  $N_2O$  en nódulos procedentes de plantas crecidas en macetas Leonard, se analizó la implicación de Nap en estas emisiones de  $N_2O$ . Para ello, las plantas crecieron durante 43 días sin nitrato y, durante la última semana anterior a la cosecha, se sometieron a encharcamiento junto con 10 mM de  $KNO_3$ .

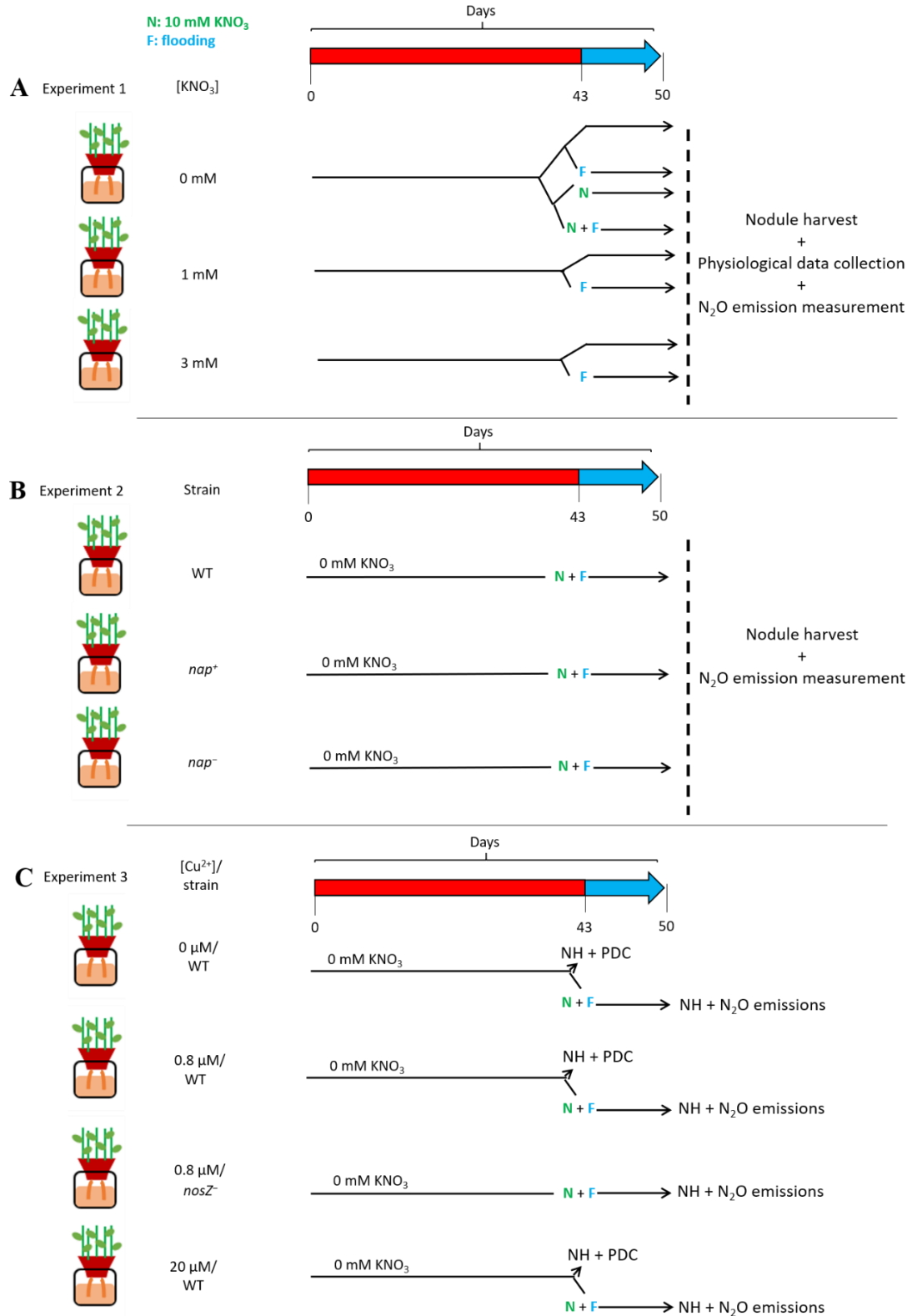
Tal y como se muestra en la Figura 5C, en los experimentos realizados para el estudio del efecto del Cu sobre la desnitrificación, las plantas crecieron sin nitrato, y en tres condiciones de Cu (sin Cu añadido, con 0,8 o con 20  $\mu M$  de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), sustituyendo esa solución nutritiva por otra suplementada con 10 mM de  $KNO_3$  durante la última semana antes de la cosecha, y, al mismo tiempo, sometiendo a encharcamiento una mitad de las macetas de cada tratamiento, pero no la otra.

Tras 50 días de cultivo, se cosecharon las plantas de alfalfa, lavando sus raíces con abundante agua para eliminar la perlita, y secándolas con papel de filtro posteriormente. A continuación, se cosecharon los nódulos para las determinaciones pertinentes, y se llevó a cabo un análisis fisiológico de las plantas de alfalfa.

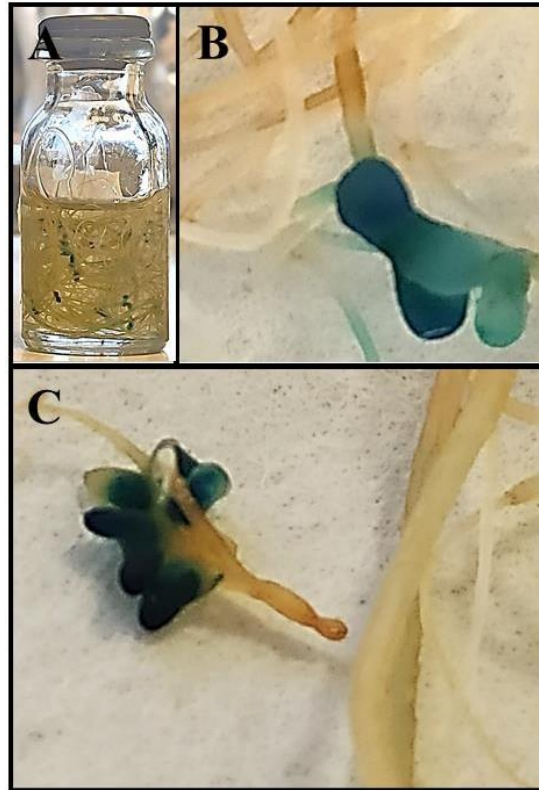
Para la cinética de nodulación en diferentes concentraciones de nitrato, la solución nutritiva se suplementó con 0, 1, 2, 3 o 4 mM de  $KNO_3$ .

Para los ensayos de competitividad, la solución se suplementó con 3 mM de  $KNO_3$  como único tratamiento con nitrato. El protocolo para este ensayo se puede resumir en los siguientes pasos, de acuerdo a Nogales y colaboradores (2006):

1. En el último día de crecimiento de las plantas, sustraerlas de los tubos de vidrio, y separar las raíces de la parte aérea.
2. Introducir todas las raíces noduladas de un mismo tratamiento en un vial de 10 mL, el cual debe contener 9 mL de tampón de incubación de nódulos ( $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O/NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  50 mM (pH 7); SDS 1% (*p/v*); X-Gluc, 21 mg en 40 mL de tampón 50 mM X-Gluc) (Figura 6A).
3. Para proteger el X-Gluc de la incidencia directa de la luz, cubrir cada vial con papel de aluminio.
4. Incubar todos los viales durante 16 h a 37 °C.
5. Sacar las raíces noduladas de los viales y contar los nódulos blancos y azules que hayan aparecido en cada tratamiento (Figura 6B, C).



**Figura 5.** Esquema metodológico de los experimentos con plantas de alfalfa. WT, cepa silvestre 1021; *nap*<sup>+</sup>, cepa sobrexpresante de los genes *nap*; *nap*<sup>-</sup>, cepa mutante en los genes *nap*; *nosZ*<sup>-</sup>, cepa mutante en el gen *nosZ*; NH, cosecha de nódulos (del inglés, *nodule harvest*); PDC, recogida de datos fisiológicos de las plantas (del inglés, *plant data collection*).



**Figura 6.** Revelado de nódulos en los ensayos de competitividad. (A) Raíces sumergidas en una solución que contiene X-Gluc tras incubarlas toda la noche en oscuridad. Se pueden observar nódulos teñidos de azul. Nódulos de la cepa 1021-GUS3 (B) o de la cepa 4004-GUS3 (C) teñidos con X-Gluc. Los nódulos de la imagen B proceden de las raíces del vial de la imagen A.

### **5.5. Cosecha de nódulos**

Para la producción de  $N_2O$  por nódulos de soja y alfalfa, éstos se separaron de las raíces de las plantas e, inmediatamente, se prepararon las diferentes muestras en viales para dichos análisis, los cuales se efectuaron el mismo día que se cosecharon los nódulos. Para el resto de determinaciones, los nódulos se cosecharon, se prepararon alícuotas de los mismos en tubos Falcon<sup>TM</sup> de 15 mL e, inmediatamente, se congelaron sumergiendo los tubos en  $N_2$  líquido. Por último, se trasladaron a un arcón a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , donde se conservaron hasta su uso.

### **5.6. Determinación de los parámetros fisiológicos de las plantas**

#### *5.6.1. Número de nódulos, peso fresco y seco de nódulos y peso fresco y seco de planta*

El día de la cosecha, se cuantificó el número de nódulos (NN) por planta, y se determinó el peso fresco de nódulos (NFW), de parte aérea (SFW) y/o de planta (PFW) en plantas de soja o alfalfa, así como la longitud de la raíz (RL) de plantas individuales de soja. En cuanto a soja, el peso seco de nódulos (NDW), de parte aérea (SDW), de raíz (RDW) o de planta (PDW) se obtuvieron tras secar a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 días los nódulos, la



parte aérea, la raíz o la planta de soja individual correspondiente, pesando posteriormente. En el caso de la alfalfa, como la unidad experimental no fue la planta sino la maceta, SDW o PDW se obtuvieron tras secar a 70 °C durante 3 días las partes aéreas o las plantas de la maceta correspondiente, pesando posteriormente; no se midió ni el peso fresco ni seco de raíces ni la longitud de las raíces ni por maceta ni por planta al ser complicado separar individualmente las plantas y obtener medidas confiables por maceta y por planta de dicho parámetro con el sistema de cultivo empleado.

### 5.6.2. Contenido en N total, de N procedente de la BNF y de Cu

#### 5.6.2.1. Determinación del contenido en N total

El análisis del N total (TN) en soja y alfalfa lo llevó a cabo el Servicio de Análisis de Nitrógeno y Carbono de la EEZ-CSIC. Para ello, la parte aérea sin raíces de plantas individuales (en el caso de soja) o de una misma maceta (en el caso de alfalfa) se pesó y se molió con un molinillo IKA A11 (Rose Scientific, Alberta, Canadá) hasta conseguir partículas inferiores a 0,5 mm de diámetro, tras lo cual, las muestras se enviaron al Servicio de Análisis de Nitrógeno y Carbono (EEZ-CSIC), donde se pesaron entre 80 y 90 mg, y se cuantificó su contenido en N total mediante un analizador elemental LECO TruSpec® CN (LECO, St Joseph, Michigan, EEUU). Básicamente, la muestra se sometía a combustión completa a 950 °C en presencia de O<sub>2</sub>. Posteriormente, todos los óxidos de N generados se convirtieron a N<sub>2</sub>, detectándose mediante un detector de conductividad térmica. Los valores de N total se expresaron en mg de N·(g de muestra seca)<sup>-1</sup>.

#### 5.6.2.2. Determinación de N procedente de la BNF

En cuanto al contenido en N procedente de la BNF en plantas de soja, para diferenciar entre el N adquirido por la BNF o por la asimilación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, el porcentaje de N derivado del N<sub>2</sub> atmosférico (Ndfa, del inglés, *N derived from atmosphere*) en plantas cultivadas con 4 mM de KNO<sub>3</sub> marcado con <sup>15</sup>N, se calculó mediante la técnica de dilución del isótopo <sup>15</sup>N (Sánchez *et al.*, 2011). El enriquecimiento en <sup>15</sup>N ( $\delta^{15}\text{N}$ ) y el % de átomos de <sup>15</sup>N ( $\delta^{15}\text{N}\cdot 100$ ) se midieron en la parte aérea de plantas de soja. El parámetro %Ndfa se calculó aplicando la siguiente fórmula matemática:

$$\% \text{Ndfa} = 100 \cdot [1 - (A/B)], \text{ donde:}$$

A = % <sup>15</sup>N en exceso en plantas inoculadas

B = % <sup>15</sup>N en exceso en plantas sin inocular

El %  $^{15}\text{N}$  en exceso tanto en plantas inoculadas como sin inocular se define como % de átomos  $^{15}\text{N}$  en tratamiento marcado – % de átomos  $^{15}\text{N}$  en tratamiento sin marcar.

Para calcular el % de átomos  $^{15}\text{N}$  en exceso, un conjunto de plantas se mantuvo en condiciones de BNF para obtener el % de átomos  $^{15}\text{N}$  del tratamiento no marcado.

El contenido de  $\text{N}_2$  fijado (FN) se calculó como  $\text{FN} = (\% \text{Ndfa} \cdot \text{TN})/100$ .

Todos estos análisis, en su conjunto, se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biogeoquímica de Isótopos Estables del Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (IACT).

La proporción de N procedente de la BNF también se analizó en muestras gaseosas de  $\text{N}_2\text{O}$  emitido por los nódulos de soja. Antes de la cosecha, las raíces noduladas se sometieron a encharcamiento, y se tomaron muestras gaseosas del espacio de cabeza, transfiriéndolas a viales de cristal de 12 mL con vacío (Labco, París, Francia). Las determinaciones de  $\text{N}_2\text{O}$  marcado con  $^{15}\text{N}$  en cada muestra se realizaron en la Instalación de Isótopos Estables de la Universidad de California (UC-Davis), siguiendo sus recomendaciones (Stevens *et al.*, 1993), analizando diferentes isotopólogos del  $\text{N}_2\text{O}$  para obtener la fracción isotópica:  $^{44}\text{N}_2\text{O}$  ( $^{14}\text{N}$ - $^{14}\text{N}$ ),  $^{45}\text{N}_2\text{O}$  ( $^{14}\text{N}$ - $^{15}\text{N}$ ) y  $^{46}\text{N}_2\text{O}$  ( $^{15}\text{N}$ - $^{15}\text{N}$ ). Finalmente, el % de  $\text{N}_2\text{O}$  marcado con  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N} \cdot 100$ ) se calculó de acuerdo a Hart y Myrold (1996).

#### 5.6.2.3. Determinación de Cu en las plantas y en la solución nutritiva

La concentración de Cu se analizó en muestras previamente secas y molidas de semillas, parte aérea, raíces y nódulos de soja de plantas individuales, así como en muestras previamente secas y molidas de parte aérea y raíces de macetas de alfalfa, y de nódulos y semillas de alfalfa íntegros previamente secos. Para ello, dichas muestras se enviaron al Servicio Técnico de Instrumentación de la EEZ-CSIC, donde se analizaron utilizando la técnica llamada espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, del inglés, *inductively coupled plasma-optical emission spectrometry*) gracias a la disponibilidad de un equipo PlasmaQuant® PQ 9000 (Analytik Jena, Jena, Alemania). Antes de llevar a cabo las medidas, las muestras se mineralizaron mediante digestión por microondas en presencia de una mezcla ácida en proporción 1:1 (v/v) de HCl y HF. Los datos se expresaron en  $\text{mg de Cu} \cdot (\text{kg de muestra seca})^{-1}$ .

Asimismo, también se midió periódicamente el contenido en Cu en la solución nutritiva, situándose por debajo del límite de detección en el tratamiento sin Cu añadido (0  $\mu\text{M}$ ).

### **5.7. Determinaciones analíticas y enzimáticas en nódulos de soja y alfalfa**

Las determinaciones enzimáticas y analíticas que se describen a continuación se realizaron en nódulos procedentes de 10 plantas individuales por tratamiento en el caso de la soja, y de 5 macetas por tratamiento con 8 plantas cada una en el caso de la alfalfa.

#### *5.7.1. Contenido de leghemoglobina en los nódulos*

Para este protocolo, se necesita preparar previamente las siguientes soluciones:

- ✓ Tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  50 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  50 mM;  $\text{H}_2\text{O}$  destilada 100 mL; pH 7,4
- ✓ Tampón de extracción de Lb:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  50 mM (pH 7,4), 100 mL;  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  0,02% (*p/v*);  $\text{NaHCO}_3$  0,1% (*p/v*); cubrir con papel de aluminio para protegerlo de la luz y conservar a 4 °C
- ✓ Solución saturada de ácido oxálico:  $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 6,6 g en 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada; preparar en fresco
- ✓ Solución patrón de hemoglobina humana: hemoglobina humana 0,3  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

El método de determinación por fluorimetría del contenido de Lb en nódulos se basó en un protocolo descrito por LaRue y Child (1979). El protocolo es el siguiente:

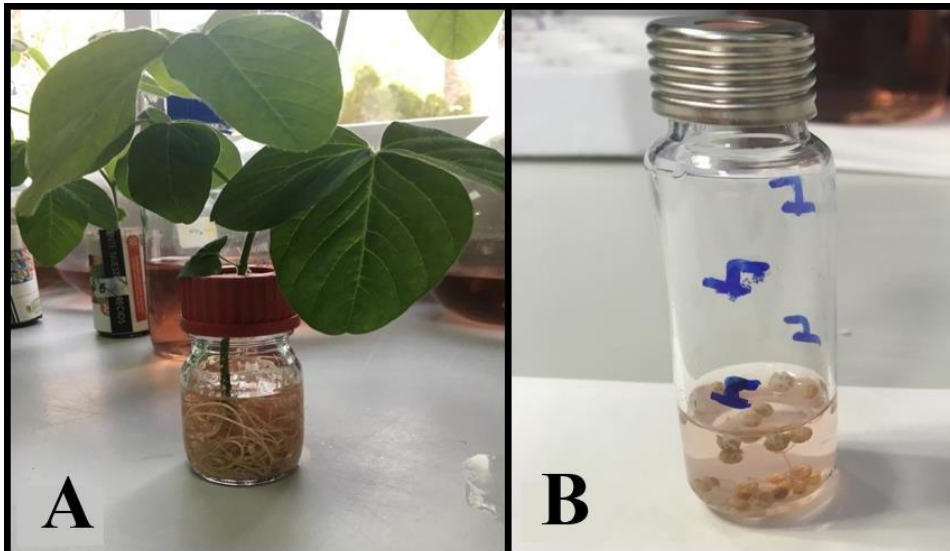
1. Pesar 0,5-1 g de nódulos de soja o 0,125-0,13 g de nódulos de alfalfa.
2. Homogeneizar en un mortero en hielo que contiene 6 mL de tampón de extracción de Lb y 0,1 g de PVPP (polivinilpolipirrolidona, CAS: 9003-39-8).
3. Centrifugar el extracto a 7000 rpm en una centrífuga Sorvall® RC 6 Plus (Thermo Fisher Scientific) durante 20 min a 4 °C.
4. Transferir 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de nódulos de soja o 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de nódulos de alfalfa a tubos de cristal que contienen 3,15 mL de solución saturada de ácido oxálico.
5. Autoclavar a 120 °C durante 30 min.
6. Enfriar las muestras a temperatura ambiente.
7. Medir en un espectrofluorímetro Shimadzu (Shimadzu Scientific Instruments, Kioto, Japón), estableciendo  $\lambda = 405 \text{ nm}$  y  $\lambda = 600 \text{ nm}$  como longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente, comparando con muestras no autoclavadas como control.

Las concentraciones de Lb se expresan como  $\text{mg Lb} \cdot (\text{g NFW})^{-1}$ , y se obtienen después de extrapolar los datos a partir de una curva estándar elaborada con los siguientes volúmenes de una solución patrón de hemoglobina humana: 0, 60, 120, 180, 240 y 300  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

### 5.7.2. Determinación de las emisiones de $\text{N}_2\text{O}$ en raíces noduladas y nódulos

Las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  se midieron en raíces noduladas y nódulos aislados para soja, y sólo en nódulos aislados para alfalfa y, en todos los casos, se realizó mediante cromatografía de gases de acuerdo a Tortosa y colaboradores (2015).

Para la determinación de las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  en raíces noduladas de soja, se eliminó la perlita adherida a ellas en primer lugar. Posteriormente, cada planta se transfirió a un bote PYREX® de 100 mL que contenía 70 mL de la solución nutritiva correspondiente a cada tratamiento, que fue volumen suficiente para mantener las condiciones de encharcamiento de las raíces. A continuación, cada bote se cerró con un tapón provisto de una goma transparente perforable que se ajustó al tallo de la planta (Figura 7A), y se tomaron muestras gaseosas del espacio de cabeza a las 2, 5 y 8 h de incubación a 30 °C para medir las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  usando un cromatógrafo de gases. La inyección de las muestras y los cálculos pertinentes se llevaron a cabo tal y como se detalla en el apartado 3.4.



**Figura 7.** Sistemas cerrados usados para las determinaciones de  $\text{N}_2\text{O}$  en (A) raíces noduladas y (B) nódulos aislados de plantas de soja.

Para la determinación de las emisiones de  $N_2O$  en nódulos aislados de soja, 0,2-0,3 g de nódulos frescos cosechados instantáneamente se transfirieron a viales SUPELCO® de 20 mL, los cuales contenían 5 mL de la solución nutritiva correspondiente a cada tratamiento (Figura 7B). Tras preparar los viales, se tomó 1 mL de muestra gaseosa del espacio de cabeza de cada uno a las 0, 3 y 6 h de incubación a 30 °C. La inyección de las muestras y los cálculos pertinentes se llevaron a cabo tal y como se detalla en el apartado 3.4.

Para la determinación de las emisiones de  $N_2O$  en nódulos aislados de alfalfa, 0,2-0,3 g de nódulos frescos (que básicamente fue la cantidad obtenida por maceta de alfalfa) cosechados instantáneamente se transfirieron a viales SUPELCO® de 10 mL, los cuales contenían 100  $\mu$ L (para los tratamientos sin encharcamiento) o 1 mL (para los tratamientos con encharcamiento) de la solución nutritiva correspondiente a cada tratamiento. Tras preparar los viales, se tomaron 0,5 mL de muestra gaseosa del espacio de cabeza de cada uno a las 3 y 6 h de incubación a 30 °C. La inyección de las muestras y los cálculos pertinentes se llevaron a cabo tal y como se detalla en el apartado 3.4.

Las emisiones de  $N_2O$  se expresaron como  $nmol N_2O \cdot (planta \cdot h)^{-1}$  en el caso de raíces noduladas de plantas de soja, o como  $nmol N_2O \cdot (g NFW \cdot h)^{-1}$  en el caso de nódulos aislados tanto de soja como de alfalfa.

### 5.7.3. Aislamiento de bacteroides procedentes de los nódulos

Para este protocolo, se necesita preparar previamente la siguiente solución:

- ✓ Tampón de extracción de bacteroides: tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5); manitol 250 mM (añadir en el momento de uso)

El aislamiento de bacteroides de nódulos de soja o alfalfa se llevó a cabo según el protocolo de Mesa y colaboradores (2004), el cual se basó en el descrito por Arrese-Igor y colaboradores (1998). Básicamente, el protocolo seguido se resume en los siguientes pasos:

1. Homogeneizar 0,5-1 g de nódulos de soja o 0,15-0,25 g de nódulos de alfalfa en un mortero en hielo que contiene 7,5 mL de tampón de extracción de bacteroides.
2. Filtrar el homogenado a través de gasas estériles.
3. Centrifugar a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C para eliminar las células enteras y los restos de nódulos.

4. Transferir el sobrenadante a tubos nuevos.
5. Centrifugar a 7000 rpm durante 10 min a 4 °C para sedimentar los bacteroides.
6. Lavar los *pellets* celulares 2 veces con tampón de lavado Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) y resuspender en 5 mL o 0,5-1 mL del mismo tampón en el caso de bacteroides de nódulos de soja o alfalfa, respectivamente.

La suspensión celular resultante se utilizó para las determinaciones bioquímicas.

#### 5.7.4. Siembra en placa de bacterias procedentes de los nódulos

La verificación del fenotipo de resistencia a Km de la cepa 4004 (WT) o 4002 (*nap*<sup>+</sup>), o del color azul para las cepas WT-GUS3 o *nap*<sup>+</sup>-GUS3, que contenían pGUS3, se llevó a cabo mediante siembra en placa de bacterias procedentes de nódulos congelados a -80 °C o de los nódulos frescos originados en plantas de alfalfa crecidas en tubos de vidrio. Para ello, se siguió el protocolo detallado a continuación:

1. Transferir unos 100 mg de nódulos congelados a tubos de microcentrífuga estériles de 2 mL, los cuales previamente se deben tarar.
2. Añadir 1 mL de etanol absoluto, enjuagando durante 1 min.
3. Eliminar el etanol utilizando una micropipeta.
4. Enjuagar los nódulos 5 veces con 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril cada lavado.
5. Eliminar el H<sub>2</sub>O con una micropipeta.
6. Añadir 100 µL de medio TY sin antibiótico y machacar los nódulos con una varilla de vidrio.
7. Añadir 900 µL más de TY líquido y agitar en vórtex.
8. Tras un breve pulso, a partir de esa mezcla (10<sup>0</sup>), llevar a cabo diluciones seriadas (de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>) también en medio TY sin antibiótico.
9. Sembrar en césped 100 µL de las diluciones 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup> en placas con medio sólido TY sin antibióticos por un lado, y suplementado con Km por otro lado. Las placas destinadas a sembrar cepas con pGUS3 contienen X-Gluc.
10. Incubar las placas durante 5 días a 30 °C.
11. Una vez se consigan colonias visibles e individualizadas en todas las placas, seleccionar 100 de ellas de las placas sin antibiótico y otras 100 de las placas con Km, y sembrarlas simultáneamente en estría en placas sólo con Sm, por un lado, y sólo con Km, por otro lado.
12. Incubar las placas durante 5 días.

13. Determinar la proporción de colonias resistentes a Km y, por consiguiente, portadoras del plásmido pDS4002. Las estrías de las cepas WT o *nap*<sup>+</sup> provistas de pGUS3 muestran color azul.

#### 5.7.5. Actividades *MV*<sup>+</sup>-NR y *MV*<sup>+</sup>-NIR en bacteroides

Para analizar las actividades *MV*<sup>+</sup>-NR o *MV*<sup>+</sup>-NIR en bacteroides de nódulos de soja o alfalfa, se procedió como se detalla en el apartado 3.5.1. La única diferencia radica en la cantidad de proteína introducida en cada tubo, ya que, una vez preparadas las suspensiones de bacteroides, se añadieron 200  $\mu$ L de suspensión de bacteroides de nódulos de soja, que contenían 0,5-1 mg de proteína total, o 17  $\mu$ L de suspensión de bacteroides de nódulos de alfalfa, que contenían 20-30  $\mu$ g de proteína total.

#### 5.7.6. Actividad NOR en bacteroides

El análisis de la actividad NOR se efectuó sólo en bacteroides de soja, y el procedimiento a seguir fue el descrito en el apartado 3.5.2, con ligeras diferencias. En este caso, para la calibración, primero, se añadieron a la cámara del electrodo (de unos 2,2 mL de capacidad) 760  $\mu$ L de tampón fosfato 25 mM, 90  $\mu$ L de una solución de succinato sódico 1 M, 100  $\mu$ L de glucosa 320 mM, y 100  $\mu$ L de una mezcla de enzimas que contenía 40  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  de glucosa oxidasa de *A. niger* y 250  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  de catalasa de hígado bovino, dejando actuar a todos estos compuestos durante 5 min para crear condiciones anóxicas. Cuando se observó una línea base estable, se inyectaron alícuotas crecientes de la solución saturada de NO desde 10  $\mu$ L, generando una curva de calibración que se emplearía para los cálculos posteriores. A continuación, se añadieron 900  $\mu$ L de la suspensión de bacteroide a la cámara. Una vez que se alcanzaron condiciones anóxicas, indicadas por la aparición de una línea base estable, se inyectaron 50  $\mu$ L de la solución saturada de NO para que diera comienzo la reacción. Cada medida se detuvo cuando la señal cayó a 0, lo que significaba que todo el NO presente había sido consumido por las células. Finalmente, la actividad NOR se expresó en  $\text{mmol NO consumido}\cdot(\text{mg de proteína}\cdot\text{min})^{-1}$ .

### 5.7.7. Actividad N<sub>2</sub>OR en bacteroides

La actividad N<sub>2</sub>OR se analizó tanto en bacteroides de soja como de alfalfa. El procedimiento a seguir fue el que se detalla en el apartado 3.5.3, con ciertas diferencias, recogidas anteriormente en Tortosa y colaboradores (2015) en el caso de bacteroides de soja, y estableciendo nuevas modificaciones en el caso de bacteroides de alfalfa. Una vez preparadas las suspensiones correspondientes de bacteroides, se transfirió 1 mL de extracto de bacteroides de soja o 103 µL de extracto de bacteroides de alfalfa a viales SUPELCO® de 10 mL, a los que previamente se les había añadido 60 mM de succinato sódico. Inmediatamente después, se cerraron con tapones herméticos provistos de membrana perforable y, seguidamente, se les inyectó consecutivamente gas N<sub>2</sub> al 98% y N<sub>2</sub>O a una concentración final de 0,1% (v/v), tras lo cual, se incubaron a 30 °C durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se tomaron alícuotas de 0,5 mL del espacio de cabeza de cada vial, realizando las inyecciones de las muestras y los cálculos como se especifica en el apartado 3.4.

## VI. Análisis estadísticos y programas bioinformáticos

### 6.1. Análisis estadísticos

Para analizar los datos estadísticamente, se empleó el programa IBM SPSS Statistics 27 (con licencia proporcionada por el CSIC) o el software abierto GNU-PSPP (v1.0.1) (<https://www.gnu.org/software/pspp/>), así como la versión en español de LibreOffice Calc (v6.0.7.3) (<https://es.libreoffice.org/descubre/calc/>). Para todos los datos, se calculó la media, la desviación estándar y el error estándar de la media y, a continuación, se aplicó un test estadístico Kolmogorov-Smirnov para determinar si la muestra en cuestión se ajustaba a una distribución normal. En caso afirmativo, se empleó un test paramétrico t de Student para comparar entre 2 muestras, o ANOVA para comparar entre más de 2 muestras, y en este caso, seguidamente se aplicó un test *post-hoc* de Tukey para las comparaciones por pares de tratamientos. En caso negativo, se empleó un test no paramétrico U de Mann-Whitney para comparar entre 2 muestras, o Kruskal-Wallis para comparar entre más de 2 muestras, y en este caso, seguidamente se aplicó un test *post-hoc* U de Mann-Whitney para las comparaciones por pares de tratamientos. En general, para los datos en vida libre, se aplicaron tests paramétricos, mientras que, para los datos obtenidos en simbiosis, se aplicaron tests no paramétricos. El *p*-valor considerado para todos los tests estadísticos aplicados fue  $p \leq 0.05$ .



## **6.2. Programas bioinformáticos**

Las herramientas bioinformáticas empleadas en el desarrollo de esta tesis se presentan en la Tabla 9 (todas ellas mencionados a lo largo de toda la sección de Materiales y Métodos):

**Tabla 9.** Programas bioinformáticos empleados durante el desarrollo de esta tesis.

<b>Programa</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>
<b>Clone Manager</b>	Programa para la simulación de procesos de clonación, restricciones, representación gráfica de plásmidos y diseño de oligonucleótidos	Sci-Ed Software
<b>Quantity-One®</b>	Programa para la obtención, análisis y cuantificación de imágenes de geles de poliacrilamida o agarosa obtenidas por equipos de Bio-Rad	Bio-Rad
<b>Image Lab™</b>	Programa para el análisis de imágenes de geles de poliacrilamida o agarosa	Bio-Rad
<b>iQ™5 Optical System Software</b>	Programa para la adquisición y análisis de los datos de qRT-PCR	Bio-Rad

Webs oficiales de los programas mencionados:

Clone Manager: [https://www.scied.com/pr\\_cmpro.htm](https://www.scied.com/pr_cmpro.htm)

Quantity One®: <https://www.bio-rad.com/es-es/product/quantity-one-1-d-analysis-software?ID=1de9eb3a-1eb5-4edb-82d2-68b91bf360fb>

Image Lab™: <https://www.bio-rad.com/es-es/product/image-lab-software?ID=KRE6P5E8Z>

iQ™5 Optical System Software: <https://www.bio-rad.com/es-es/sku/1709753-iq5-optical-system-software?ID=1709753>

# RESULTS



# Chapter 1

## **Copper modulates nitrous oxide emissions from soybean root nodules**

Tortosa, G., **Pacheco, P. J.**, Hidalgo-García, A., Granados, A., Delgado, A., Mesa, S., Bedmar, E. J., Delgado, M. J.

Modified version from the article published with the following reference:

Tortosa, G., Pacheco, P. J., Hidalgo-García, A., Granados, A., Delgado, A., Mesa, S., Bedmar, E. J., Delgado, M. J. (2020). Copper modulates nitrous oxide emissions from soybean root nodules. *Environmental and Experimental Botany*, 180, 104262, <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104262>.



## **1.1. Abstract**

Agriculture is an important source of the greenhouse gas N<sub>2</sub>O due to the over- or non-synchronised application of nitrogen to crops. SNF by legume-rhizobia symbiosis can be an effective strategy for N<sub>2</sub>O mitigation, but several environmental factors such as copper (Cu) availability might affect N<sub>2</sub>O emissions derived from legume crops. The aim of this research was to study how Cu can modulate N<sub>2</sub>O emissions by soybean root nodules. Soybean plants inoculated with *B. diazoefficiens* USDA110 were grown in the presence of 4 mM KNO<sub>3</sub> and a battery of Cu<sup>2+</sup> concentrations added during growth (0, 5, 10, 20, 40, 60 or 100 μM). N<sub>2</sub>O emissions were measured by gas chromatography in both nodulated roots and detached nodules after root flooding. Furthermore, <sup>15</sup>N isotope dilution was assayed for SNF and N<sub>2</sub>O determinations. Results showed that an excess of added Cu during growth significantly affected plant physiology, nodulation and SNF of the soybean-*B. diazoefficiens* symbiosis, being 20 μM the threshold that soybean plants can tolerate without suffering Cu stress. Meanwhile, Cu addition reduced statistically N<sub>2</sub>O emissions by soybean nodules. This reduction was correlated with Cu accumulation in nodules, which affected the denitrifying enzymes activities. Cu excess produced a simultaneous decrease of NR and NIR activities, but an increase of N<sub>2</sub>OR activity. Finally, the modulation of bacteroidal Nap is proposed as an effective target for the strategies for mitigation of N<sub>2</sub>O emissions derived from soybean crops, probably more effective than Nos.

## **1.2. Copper effect on plant physiology and nodulation**

The Cu concentration added to plants during the growth period was ranged between 0–100 μM Cu<sup>2+</sup>. The highest concentration (100 μM) produced a significant reduction of plant biomass and nodulation capacity, and caused clear chlorotic and necrotic symptoms in the leaves (Figure S1.1).

For that reason, Table 1.1 only shows the effect of the addition of 0, 5, 10, 20, 40 or 60 μM Cu<sup>2+</sup> on several plant physiological parameters. As shown in Table 1.1, the addition of 5 or 10 μM Cu<sup>2+</sup> slightly promoted shoot biomass production (SDW) compared to those plants that grew without added Cu. On the contrary, addition of higher concentrations (≥ 20 μM) triggered a decrease of SDW, being 60 μM the concentration that had the strongest negative effect on shoot plant development. Similarly, Cu addition statistically decreased RDW, being also 60 μM Cu<sup>2+</sup> the concentration that induced a severe decrease compared to those plants that grew under non-Cu treatment. Another

physiological symptom that was affected by Cu addition was RL. In fact, as higher the Cu concentration added to the plants was, the shorter RL was observed (Table 1.1).

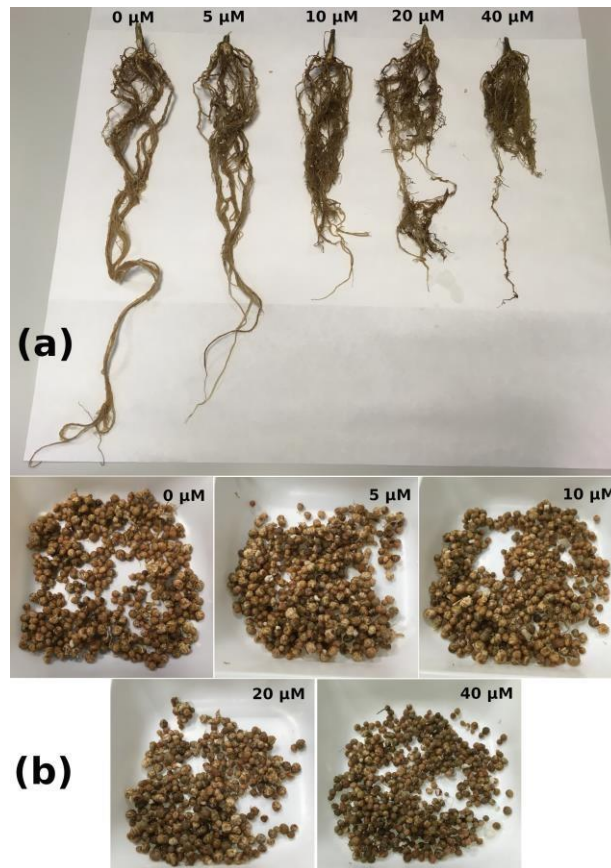
**Table 1.1.** Effect of Cu addition on shoot dry weight (SDW), root dry weight (RDW), SDW/RDW ratio, root length (RL), nodule number (NN), nodule dry weight (NDW), dry weight per nodule (NDW/NN) and leghemoglobin content of the nodules (Lb) of soybean plants inoculated with *B. diazoefficiens* USDA 110.

Cu <sup>2+</sup> ( $\mu\text{M}$ )	SDW (g·plant <sup>-1</sup> )	RDW (g·plant <sup>-1</sup> )	SDW/ RDW	RL (cm·plant <sup>-1</sup> )	NN· plant <sup>-1</sup>	NDW (g·plant <sup>-1</sup> )	NDW/NN (mg·nodule <sup>-1</sup> )	Lb
0	2.37c	1.04a	2.9e	41a	56b	0.76c	2.64a	9.53a
5	2.73a	0.99a	3.4d	33b	57b	0.86b	2.77a	9.73a
10	2.78a	0.77b	3.7c	22c	79a	1.02a	2.58a	9.86a
20	2.62b	0.72b	3.7c	20d	80a	0.93ab	2.30b	7.79b
40	2.49b	0.60c	4.2b	15e	69ab	0.74c	2.30b	4.86c
60	1.87d	0.41d	4.8a	13f	48c	0.49d	2.12c	4.35c

Lb is expressed in mg·(g NFW)<sup>-1</sup>. NFW, nodule fresh weight. Same lower-case letter in each column means not statistical difference according to U Mann-Whitney (or Wilcoxon-Mann-Whitney) test at  $p \leq 0.05$ .

Plants grown without Cu addition suffered a significant longitudinal development of the primary roots compared to those plants subjected to the different Cu treatments (Figure 1.1a). As shown in Table 1.1, RL decreased from  $41 \pm 8$  cm in plants grown in the absence of added Cu to  $13 \pm 1$  cm in plants cultivated in the presence of  $60 \mu\text{M}$  Cu<sup>2+</sup>. Concerning nodulation, the effect of Cu addition on NN or NDW showed a similar behaviour than SDW (Table 1.1). Addition of 5, 10 or  $20 \mu\text{M}$  Cu<sup>2+</sup> to the plant growth medium slightly improved NN or NDW compared to those plants that were growing without Cu added. In fact, an increase in NN and NDW of about 43% or 22%, respectively, was observed in plants treated with  $20 \mu\text{M}$  Cu<sup>2+</sup> with respect to non-treated plants. However, addition of 40 or  $60 \mu\text{M}$  Cu<sup>2+</sup> during growth decreased NN and NDW. This negative effect was more significant when  $60 \mu\text{M}$  was added to the mineral solution, where the plants showed a decrease of about 14% and 35% in NN and NDW, respectively, in comparison to plants grown without Cu addition (Table 1.1). When the ratio between NDW and NN (NDW/NN) per plant was calculated as an indicative parameter of the individual dry weight per nodule, a decrease was observed in plants grown with 20, 40 or  $60 \mu\text{M}$  Cu<sup>2+</sup> compared to non-treated plants (Table 1.1). This observation indicated that Cu<sup>2+</sup> addition from 20 to  $60 \mu\text{M}$  produced smaller nodules, as it is also shown in Figure 1.1b. Finally, an estimation of nodule functionality was assessed by measuring the nodular Lb concentration. As shown in Table 1.1, a significant reduction of Lb was observed in nodules from plants grown in the presence of 20, 40 or  $60 \mu\text{M}$  Cu<sup>2+</sup>. In fact, a decrease of about 50% (from  $9.53 \pm 0.39$  to  $4.35 \pm 0.12$  mg·(g NFW)<sup>-1</sup>) was produced

after the addition of  $60 \mu\text{M Cu}^{2+}$  to the plant growth medium compared to non-treated plants.



**Figure 1.1.** Roots (a) and nodules (b) from soybean plants subjected to different Cu concentrations during growth (0, 5, 10, 20 and  $40 \mu\text{M}$ ).

### **1.3. Copper effect on SNF by using the $^{15}\text{N}$ isotope dilution methodology**

The addition of  $20 \mu\text{M Cu}^{2+}$  slightly increased shoot biomass (SDW, Table 1.1) and also TN of the shoots, which was statistically higher compared to non-Cu addition, with  $24.85 \pm 1.12$  and  $19.21 \pm 1.57 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectively (Table 1.2). Further, the  $^{15}\text{N}$  enrichment in the soybean shoots showed that the addition of  $20 \mu\text{M Cu}^{2+}$  during the growth period statistically increased ( $p < 0.05$ ) the percentage of atom  $^{15}\text{N}$  excess ( $2.226 \pm 0.041$ ) compared to plants grown without Cu supplementation ( $2.023 \pm 0.023$ ), which meant a higher  $^{15}\text{N}$ -labelled  $\text{NO}_3^-$  assimilation of plants at  $20 \mu\text{M Cu}^{2+}$  treatment. This result revealed that the proportion of Ndfa was 9% higher in plants grown without Cu addition than in those provided with  $20 \mu\text{M Cu}^{2+}$  ( $53.79 \pm 0.49$  and  $49.14 \pm 0.81$  of %Ndfa for plants grown without or with  $20 \mu\text{M Cu}^{2+}$  addition, respectively).



**Table 1.2.** Total nitrogen content (TN), atom  $^{15}\text{N}$  excess and proportion of nitrogen derived from the atmosphere (Ndfa) in shoots from soybean plants inoculated with *B. diazoefficiens* USDA 110 and grown with 4 mM  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  and 0 or 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ .

$\text{Cu}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	TN ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Atom $^{15}\text{N}$ excess (%)	Ndfa (%)
0	19.21b	2.023b	53.79a
20	24.85a	2.226a	49.14b

Same lower-case letter in each column means not statistical difference according to U Mann-Whitney test at  $p \leq 0.05$ .

#### **1.4. Copper accumulation in soybean plant organs**

Cu was linearly accumulated in shoots, roots and nodules in relation with the Cu concentration added to the mineral solution during soybean growth (Table 1.3). Cu was preferentially accumulated in roots, ranging from  $244 \pm 23$  to  $1,386 \pm 249$  mg of Cu per kg of dry weight in roots from plants grown in the presence from 5 to 60  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ . Nodules also accumulated significant amounts of Cu, which were correlated with the concentration of  $\text{Cu}^{2+}$  added to the plants during growth. Shoots were the plant tissue that showed the least Cu accumulation, with Cu concentrations ranging from  $13.4 \pm 0.2$  to  $52.8 \pm 1.5$   $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  of shoots from plants treated with 5 or 60  $\mu\text{M}$ , respectively. Finally, Cu concentration in soybean seeds was  $19 \pm 1$   $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (or  $5.44 \pm 0.66$   $\mu\text{g}$  per seed), which represented close to 85% of the total Cu accumulated in shoots, roots and nodules of plants grown without Cu addition.

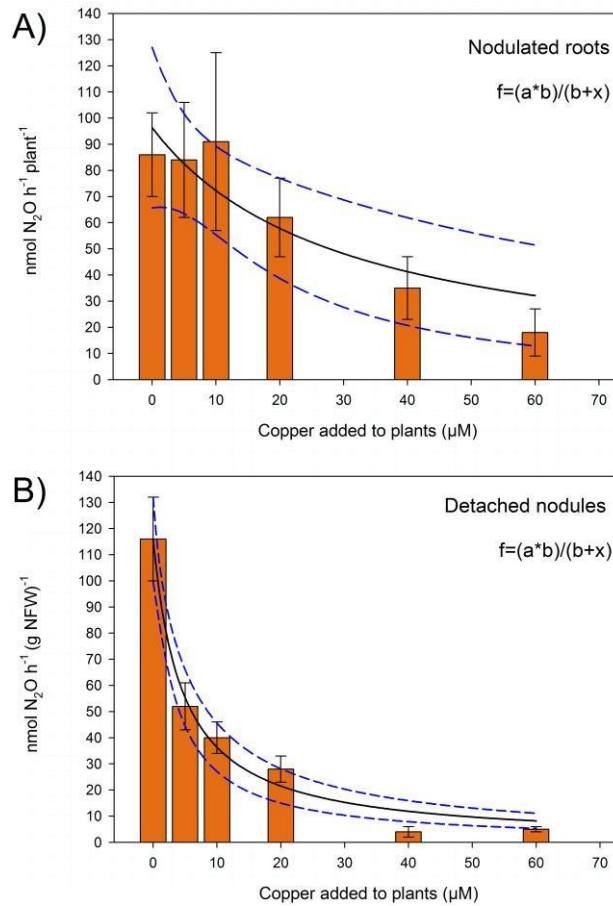
**Table 1.3.** Copper accumulation in shoots, roots and nodules of soybean plants inoculated with *B. diazoefficiens* USDA 110 and grown in the presence of different  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations.

$\text{Cu}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{Cu}^{2+}$ accumulation ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )		
	Shoots	Roots	Nodules
0	0d	6f	3e
5	13.4c	244e	152d
10	13.4c	283d	196c
20	22.0bc	438c	303b
40	35.7b	787b	373b
60	52.8a	1386a	686a

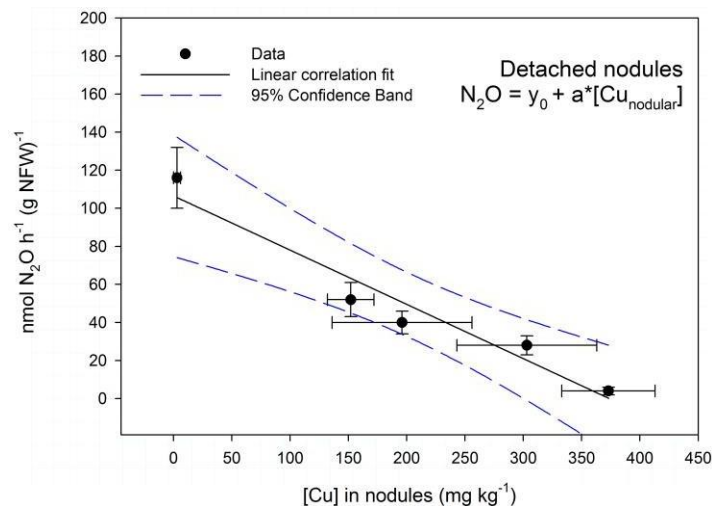
Same lower-case letter in each column means not statistical difference according to U Mann-Whitney test at  $p \leq 0.05$ .

### **1.5. Copper effect on nitrous oxide emissions**

As shown in Figure 1.2A, N<sub>2</sub>O production by nodulated roots decreased proportionally to the increased Cu concentration added to the plants during growth. The highest N<sub>2</sub>O flux was observed in nodulated roots from non-treated plants or plants receiving 5 or 10 μM of Cu<sup>2+</sup> concentrations. However, a significant decrease of N<sub>2</sub>O production was observed in root nodules from plants grown with Cu<sup>2+</sup> concentrations ranging from 20 to 60 μM. The strongest reduction of N<sub>2</sub>O emission was observed in 60 μM Cu<sup>2+</sup>-treated plants, where about a 5-fold decrease was observed compared to non-treated plants ( $18 \pm 9$  versus  $86 \pm 16$  nmol N<sub>2</sub>O·(plant·h)<sup>-1</sup>, respectively). The reduction of N<sub>2</sub>O flux produced by plant Cu<sup>2+</sup> treatment was statistically fitted to a hyperbolic decay regression [N<sub>2</sub>O emission rate = (a·b)/(b+[Cu<sup>2+</sup>)]], showing a significant regression coefficient (R<sup>2</sup> = 0.8430) (Table S1.1). N<sub>2</sub>O production by detached nodules showed a similar tendency to that observed in nodulated roots (Figure 1.2B). N<sub>2</sub>O release also statistically decreased with the Cu concentration added to the plant mineral solution (R<sup>2</sup> = 0.9839) (Table S1.1), being the hyperbolic decay relevant within the interval of 0-20 μM Cu<sup>2+</sup> added. Indeed, the emission rate by nodules from plants grown without Cu<sup>2+</sup> addition was  $116 \pm 16$  nmol N<sub>2</sub>O·(g NFW·h)<sup>-1</sup>, and it dropped close to 4-fold ( $28 \pm 5$  nmol N<sub>2</sub>O·(g NFW·h)<sup>-1</sup>) in detached nodules from plants treated with 20 μM Cu<sup>2+</sup>. Moreover, N<sub>2</sub>O flux registered in detached nodules from plants subjected to higher Cu concentrations (40 and 60 μM) were meaningless ( $4 \pm 2$  and  $5 \pm 1$  nmol N<sub>2</sub>O·(g NFW·h)<sup>-1</sup>, respectively). When N<sub>2</sub>O emission rate and Cu concentration of detached nodules were plotted (Figure 1.3), a regression was observed, which statistically fitted to a linear decay equation (N<sub>2</sub>O emission rate =  $y_0 + a \cdot [\text{Cu}^{2+}_{\text{nodular}}]$ ) (R<sup>2</sup> = 0.9401; Table S1.1). This graph confirmed that N<sub>2</sub>O fluxes reduction was directly related to the Cu accumulation in soybean nodules.



**Figure 1.2.** N<sub>2</sub>O emissions by nodulated roots (A) and detached nodules (B) from soybean plants inoculated with *B. diazoefficiens* USDA 110 and watered with different Cu concentrations during growth. The black line represents hyperbolic decay regression, and the blue line, the 95% confidence band.



**Figure 1.3.** Linear regression of N<sub>2</sub>O emission rate and Cu accumulation of detached nodules from soybean plants inoculated with *B. diazoefficiens* USDA 110 and watered with different Cu concentrations during growth. The black line represents hyperbolic decay regression, and the blue line, the 95% confidence band.

Finally, the proportion of  $^{15}\text{N-N}_2\text{O}$  derived from the 4 mM  $^{15}\text{NO}_3^-$  applied to the plants during growth was estimated by using the  $^{15}\text{N}$  isotope dilution approach (Table 1.4). According to the relative abundance of the three isotopologues of  $\text{N}_2\text{O}$  ( $m/z$ : 44, 45 and 46) analysed, a statistical enrichment ( $p < 0.05$ ) in the  $^{15}\text{N}$  proportion of  $\text{N}_2\text{O}$  emitted by nodulated roots of plants grown with  $^{15}\text{NO}_3^-$  was found, independently of the Cu concentration added. Specifically, the concentration of the two isotopologues of  $\text{N}_2\text{O}$  including  $^{15}\text{N}$  ( $^{45}\text{N}_2\text{O}$  and  $^{46}\text{N}_2\text{O}$ ) increased significantly with  $^{15}\text{N}$  enrichment, being their concentration 14-fold and 2-fold higher respectively, compared to non-enriched treatments. Moreover, the relative proportion of  $^{15}\text{N-N}_2\text{O}$  atom in the  $^{15}\text{N}$  enriched treatments ranged between 5.65–5.75, close to 15-fold higher than those obtained in the non-enriched  $\text{NO}_3^-$  treatments (Table 1.4). These results confirmed that the  $\text{N}_2\text{O}$  emitted by soybean nodules derived mainly from the  $\text{NO}_3^-$  of the mineral solution.

**Table 1.4.**  $^{15}\text{N-N}_2\text{O}$  emissions by nodulated roots from soybean plants inoculated with *B. diazoefficiens* USDA 110 and grown with 4 mM  $\text{KNO}_3$  ( $^{15}\text{N}$  enriched or not) and 0 or 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ .

Nitrate (4 mM)	$\text{Cu}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	$^{44}\text{N}_2\text{O}$ ( $^{14}\text{N}\text{-}^{14}\text{N}$ ) [% total $\text{N}_2\text{O}$ · (h·plant) $^{-1}$ ]	$^{45}\text{N}_2\text{O}$ ( $^{14}\text{N}\text{-}^{15}\text{N}$ ) [% total $\text{N}_2\text{O}$ · (h·plant) $^{-1}$ ]	$^{46}\text{N}_2\text{O}$ ( $^{15}\text{N}\text{-}^{15}\text{N}$ ) [% total $\text{N}_2\text{O}$ · (h·plant) $^{-1}$ ]	Atom $^{15}\text{N-N}_2\text{O}$ (%)
non-enriched	0	99.01a	0.78c	0.21c	0.373c
non-enriched	20	98.98a	0.78c	0.24c	0.372c
$^{15}\text{N}$ enriched	0	88.63c	10.84a	0.53a	5.653b
$^{15}\text{N}$ enriched	20	88.81b	10.68b	0.51b	5.747a

Same lower-case letter in each column means not statistical difference according to U Mann-Whitney test at  $p \leq 0.05$ .

### **1.6. Copper effect on denitrifying enzymes activity in the bacteroids from soybean nodules**

NR activity was not affected by  $\text{Cu}^{2+}$  addition within the interval of 0-20  $\mu\text{M}$ , with values ranging between 32.4–42.2  $\text{nmol NO}_2^- \text{ produced} \cdot (\text{mg protein} \cdot \text{min})^{-1}$ , respectively (Table 1.5). However, treatments with higher Cu concentrations ( $> 20 \mu\text{M}$ ) significantly decreased NR activity compared to bacteroids from non-treated plants, being this reduction about 3-fold and 25-fold lower when 40 or 60  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  was added to the plant nutrient solution, respectively. With respect to NIR activity, a decrease that was parallel with the increase in the Cu concentration added to the plants during growth was observed. This reduction was especially relevant in bacteroids from plants treated with 40 or 60  $\mu\text{M}$ , which showed 5-fold reduction of NIR activity compared to that of bacteroids from non-treated plants. NOR activity was weakly affected by Cu addition to the plants, showing a slight increment of about 1.3-fold in bacteroids from 60  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ -treated plants compared to non-treated plants. Conversely,  $\text{N}_2\text{OR}$  activity was significantly increased in response

to plant Cu treatment. Particularly, in plants grown in the presence of 40 or 60  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{N}_2\text{OR}$  activity increased about 4-fold compared to that of bacteroids from plants that were not treated with Cu.

**Table 1.5.** Methyl viologen-dependent nitrate ( $\text{MV}^+$ -NR) and nitrite ( $\text{MV}^+$ -NIR), nitric oxide (NOR) and nitrous oxide ( $\text{N}_2\text{OR}$ ) reductase activities of bacteroids from nodules of soybean plants inoculated with *B. diazoefficiens* USDA 110 and subjected to different Cu treatments during growth.

$\text{Cu}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	NR [nmol $\text{NO}_2^-$ pro- duced $\cdot$ (min $\cdot$ mg pro- tein) $^{-1}$ ]	NIR [nmol $\text{NO}_2^-$ con- sumed $\cdot$ (min $\cdot$ mg pro- tein) $^{-1}$ ]	NOR [nmol NO con- sumed $\cdot$ (min $\cdot$ mg protein) $^{-1}$ ]	$\text{N}_2\text{OR}$ [nmol $\text{N}_2\text{O}$ con- sumed $\cdot$ (h $\cdot$ mg pro- tein) $^{-1}$ ]
<b>0</b>	32.4a	8.6a	1.8c	1.1c
<b>5</b>	43.0a	7.0a	2.1b	1.2c
<b>10</b>	42.2a	4.8b	2.0b	1.3c
<b>20</b>	33.6b	4.8b	2.1b	3.2b
<b>40</b>	11.9c	1.7c	2.3a	4.2a
<b>60</b>	1.3d	1.8c	2.4a	4.0a

Same lower-case letter in each column means not statistical difference according to U Mann-Whitney test at  $p \leq 0.05$ .

## Chapter 1: supplementary material

**Table S1.1.** Parameters of the regression models fitted to experimental data of N<sub>2</sub>O emission rates from nodulated roots and detached nodules from plants grown with different Cu concentrations.

<b>Nodulated roots.</b>			
<b>Hyperbola decay kinetic model: N<sub>2</sub>O emission rate = (a·b)/(b+[Cu<sup>2+</sup>])</b>			
R: 0.9181	R <sup>2</sup> : 0.8430	Adj R <sup>2</sup> : 0.8037	Standard Error of Estimate: 13.3852
	Coefficient	Standard Error	P
a (nmol N <sub>2</sub> O h <sup>-1</sup> plant <sup>-1</sup> )	96.3473	11.0660	0.0010
b (μM <sup>-1</sup> Cu <sup>2+</sup> )	30.0192	12.7157	0.0776
<b>Detached nodules.</b>			
<b>Hyperbola decay kinetic model: N<sub>2</sub>O emission rate = (a·b)/(b+[Cu<sup>2+</sup>])</b>			
R: 0.9919	R <sup>2</sup> : 0.9839	Adj R <sup>2</sup> : 0.9798	Standard Error of Estimate: 5.8822
	Coefficient	Standard Error	P
a [(nmol N <sub>2</sub> O h <sup>-1</sup> (g NFW <sup>-1</sup> )]	115.7278	5.8429	<0.0001
b (μM <sup>-1</sup> Cu <sup>2+</sup> )	4.5780	0.7137	0.0030
<b>Detached nodules.</b>			
<b>Linear regression model: N<sub>2</sub>O emission rate = y<sub>0</sub> + a·[Cu<sup>2+</sup><sub>nodular</sub>]</b>			
R: 0.9696	R <sup>2</sup> : 0.9401	Adj R <sup>2</sup> : 0.9202	Standard Error of Estimate: 11.8547
	Coefficient	Standard Error	P
y <sub>0</sub> [nmol N <sub>2</sub> O h <sup>-1</sup> (g NFW <sup>-1</sup> )]	106.5250	10.0417	0.0018
a [nmol N <sub>2</sub> O h <sup>-1</sup> (g NFW <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> mg kg <sup>-1</sup> Cu <sup>2+</sup> <sub>nodular</sub> ]	-0.2849	0.0415	0.0063



**Figure S1.1.** Chlorotic and necrotic symptoms in the leaves of soybean plants grown with 100 μM Cu<sup>2+</sup>.



# Chapter 2

## ***Ensifer meliloti* denitrification is involved in infection effectiveness and N<sub>2</sub>O emissions by alfalfa root nodules**

**Pacheco, P. J.,** Bedmar, E. J., Mesa, S., Tortosa, G., Delgado, M. J.

Modified version from the article submitted to Plant and Soil journal; preprint published online with the following reference:

Pacheco, P. J., Bedmar, E. J., Mesa, S., Tortosa, G., Delgado, M. J. (2022). *Ensifer meliloti* denitrification is involved in infection effectiveness and N<sub>2</sub>O emissions by alfalfa root nodules. *Plant and Soil* (under review), <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2033464/v1>.





## **2.1. Abstract**

$N_2O$  is a potent greenhouse gas that contributes to global warming. Its atmospheric concentration has remarkably increased over the last century, being the intensification of nitrogen fertilisation the main cause of this important rise. One of the main strategies to mitigate  $N_2O$  emissions from agriculture soils consists of using legumes, which reduce the dependence on synthetic nitrogen fertilisers, improving health and fertility of crop soils at the same time. These plants are able to establish symbiosis with rhizobia through the formation of nodules in their roots, where biological  $N_2$  fixation takes place. Alfalfa is one of the most valuable forage legume crops and is symbiotically associated with *E. meliloti*. Although this bacterium contains all the denitrification genes, is unable to grow under anoxic conditions with nitrate as respiratory substrate because of a limitation in *nap* genes expression. In this context, it has been demonstrated that *nap* overexpression restores the capacity of *E. meliloti* free-living cultures to grow anaerobically through denitrification and also induces  $N_2O$  production. In the present work, the involvement of *E. meliloti nap* genes expression in competitiveness for nodulation in alfalfa plants under low oxygen conditions has been assessed by the first time. We have also demonstrated the capacity of alfalfa nodules to produce  $N_2O$  in response to environmental factors such as nitrate and flooding, which reduces oxygen availability. On the contrary, Cu addition to the plant growth medium triggered a reduction of  $N_2O$  production by the nodules probably due to the induction of  $N_2O$  reductase activity of the bacteroids. We propose the modulation of bacteroidal  $N_2O$  reductase activity as an effective target for the mitigation strategies of  $N_2O$  emissions derived from alfalfa crops.

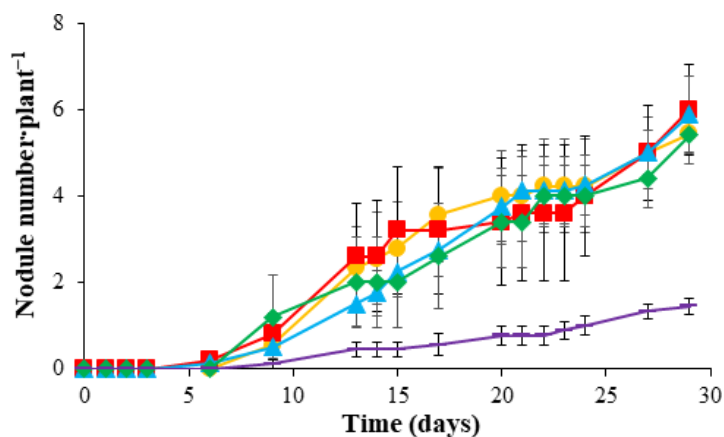
## **2.2. Bacterial strains**

*E. meliloti* strains and plasmids used in this study and their description are listed in Table 1 from Material and Methods.

## **2.3. Periplasmic nitrate reductase has a role in infectivity and competitiveness for nodulation in alfalfa**

As a preliminary experiment, we investigated the effect of nitrate on nodulation capacity of *E. meliloti* by sowing alfalfa seeds in glass tubes and inoculating with *E. meliloti* 4004 or 1021. Plants were grown during 28 days without nitrate or with different nitrate concentrations, ranging from 1 mM to 4 mM (Figure 2.1). In these experiments,

nodulation was significantly diminished by 4 mM nitrate, while no differences were observed for the rest of nitrate concentrations (Figure 2.1). Similar results were obtained with the WT strain 1021 (data not shown).

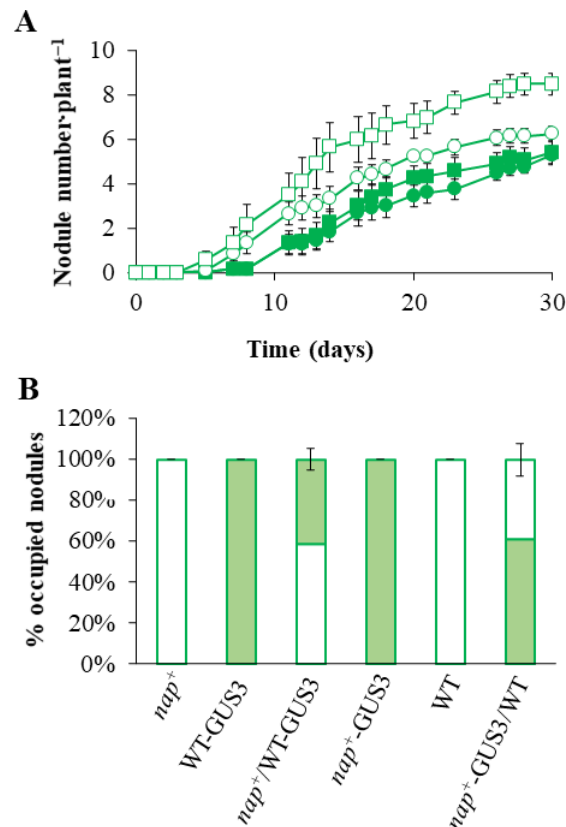


**Figure 2.1.** Nodulation kinetics of alfalfa plants inoculated with strain 4004 of *E. meliloti* grown without nitrate (0 mM, ●) or with 1 mM (■), 2 mM (▲), 3 mM (◆) or 4 mM (▼) KNO<sub>3</sub> during 30 days. Data represent means with standard error bars separated using a Tukey HSD test at  $p \leq 0.05$ . Data shown are representative from two independent experiments.

Next, we were interested in elucidating whether nodulation capacity of *E. meliloti* was influenced by *nap* expression. To achieve this goal, seeds were sown in glass tubes with nutrient solution supplemented with 3 mM KNO<sub>3</sub>, and were inoculated with the *nap*<sup>+</sup> strain or the strain 4004 (WT). Before inoculation, nutrient solution was subjected or not to anoxic conditions (see Material and Methods). As shown in Figure 2.2A, similar nodulation capacity between the WT or *nap*<sup>+</sup> strains inoculated under oxic conditions was observed, counting 6 nodules per plant, approximately, after 30 days of plant growth regardless of the strain ( $p > 0.05$ ). However, the *nap*<sup>+</sup> strain showed a significantly major efficiency for nodulation than the WT under anoxic conditions, counting 8 and 6 nodules per plant, respectively, at the end of the experiment ( $p < 0.05$ ) (Figure 2.2A). These results indicated that *nap* overexpression might promote nodulation when roots are developed in an anoxic environment.

The next step was to analyse the competitiveness of the *nap*<sup>+</sup> strain for nodulation. We performed experiments with alfalfa plants grown in glass tubes with 3 mM nitrate and inoculated with a mixture (1:1 ratio) of the WT 4004-GUS3 and the *nap*<sup>+</sup> strain (4002), or the WT 4004 and the *nap*<sup>+</sup>-GUS3 strain. Plants inoculated only with the WT or the *nap*<sup>+</sup> strain (harbouring pGUS3 or not) were used as control of the experiments. Additionally, stability of pGUS3 and pDS4002 was checked in plates as described in Material and Methods (subsection 5.7.4). As shown in Figure 2.2B, the *nap*<sup>+</sup> strain

produced 59% of the total number of nodules, while the WT 4004-GUS3 generated the remaining 41%. Moreover, the *nap*<sup>+</sup>-GUS3 strain produced 61% of the total number of nodules, while the WT 4004 elicited the remaining 39%. Therefore, these results confirm the previous results on nodulation kinetics (Figure 2.2A) and suggest that *E. meliloti nap* overexpression improves competitiveness for nodulation of alfalfa plants.

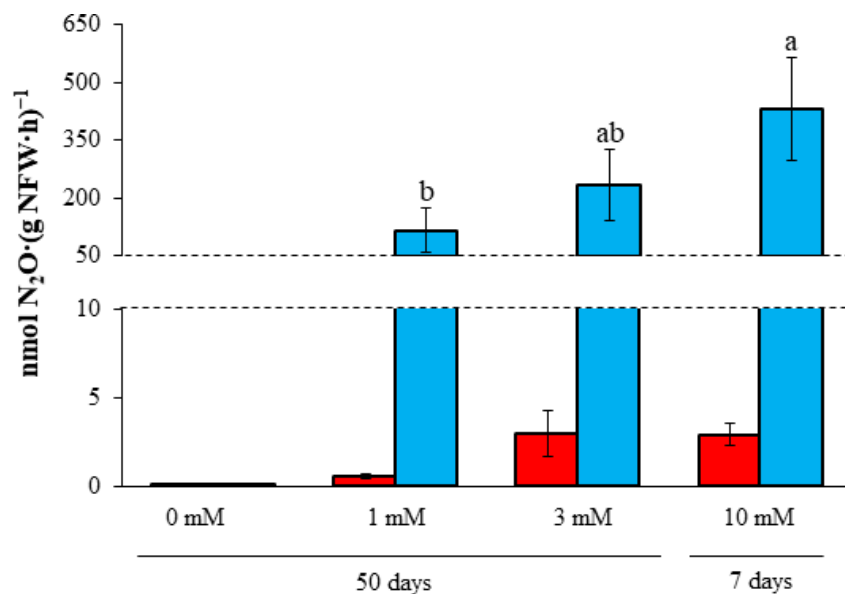


**Figure 2.2.** Nodulation capacity of a *nap*-overexpressing *E. meliloti* strain (*nap*<sup>+</sup>). **(A)** Nodulation kinetics of alfalfa plants inoculated with the strain 4004 (wild-type, WT, circles) or the *nap*<sup>+</sup> strain 4002 (squares) and grown in glass tubes during 30 days with nutrient solution supplemented with 3 mM KNO<sub>3</sub>. Half of the tubes containing NS were sparged with N<sub>2</sub> gas during 10 min before inoculation (anoxic conditions, white symbols) and the other half were not fluxed with N<sub>2</sub> (oxic conditions, black symbols). **(B)** Nodule competition assays. Data represent the percentage of nodules occupied by the *nap*<sup>+</sup> or the WT 4004-pGUS3 strains, inoculated separately as control of the experiments or after co-inoculation (ratio 1:1) under anoxic conditions. In **A** and **B**, data represent means with standard error bars from three independent experiments assayed by using ten plant replicates.

#### **2.4. Periplasmic nitrate reductase is involved in N<sub>2</sub>O emissions by alfalfa root nodules**

To investigate the capacity of alfalfa root nodules to produce N<sub>2</sub>O, seeds were inoculated with *E. meliloti* 1021 or 4004 and N<sub>2</sub>O emissions were measured after growing the plants in pots containing nutrient solution with different nitrate concentrations (Figure 5A from Material and Methods). As shown in Figure 2.3, N<sub>2</sub>O emissions were not

detected in nodules from plants grown without nitrate independently of the application of flooding conditions or not. A weak induction of  $N_2O$  production was observed in non-flooded nodules in the presence of 1 mM nitrate in the growth medium. The addition of 3 mM to the nutrient solution or the treatment of the plants with 10 mM nitrate 7 days before harvesting slightly induced  $N_2O$  release from non-flooded nodules compared to 1 mM treatment (Figure 2.3). Interestingly, flooding triggered a significant increase in  $N_2O$  emissions by nodules from plants subjected to 1 mM, 3 mM or 7-day 10 mM nitrate, respectively, compared to non-flooded nodules (Figure 2.3). It is worth mentioning that no differences in  $N_2O$  emission levels under flooding conditions were found between 1 and 3 mM nitrate for 50 days ( $p > 0.05$ ), and between 3 mM and the application of a nitrate shock of 10 mM 7 days before harvesting ( $p > 0.05$ ). However,  $N_2O$  levels from flooded nodules of 7-day treated plants with 10 mM nitrate were significantly higher compared to those from flooded plants grown in the presence of 1 mM ( $p < 0.05$ ; Figure 2.3). Similar results were obtained with the WT strain 4004 (data not shown).



**Figure 2.3.**  $N_2O$  emissions from detached nodules elicited by *E. meliloti* 1021. Alfalfa plants were grown without nitrate (0 mM), with 1 or 3 mM  $KNO_3$  during 50 days, or treated with 10 mM  $KNO_3$  7 days before harvesting. Flooding conditions were applied a week before harvesting (blue bars) or not (red bars). Data represent means with standard error bars from at least five biological replicates. Lower-case letters indicate comparisons between plants subjected to flooding and nitrate treatments (1 or 3 mM  $KNO_3$  for 50 days or 10 mM  $KNO_3$  for 7 days). Same lower-case letters are not statistically significant according to U Mann-Whitney test at  $p \leq 0.05$ . NFW, nodule fresh weight.

As shown in Table 2.1, NFW per plant significantly decreased when plants were grown with 1 or 3 mM  $KNO_3$  for 50 days in comparison to those plants treated with 10 mM  $KNO_3$  during 7 days before harvesting. However, NN per plant was not affected by any nitrate treatment. It is also important to mention that the application of 1 or 3 mM

nitrate during 50 days as well as 10 mM nitrate treatment for 7 days caused a major impact on leghemoglobin content in nodules obtaining a decrease of 1.9, 1.7 and 1.5-fold respectively, compared to that observed in nodules from plants grown without nitrate. With respect to PDW per plant, the treatment of 3 mM nitrate during 50 days increased PDW significantly compared to plants grown without nitrate or with 1 mM nitrate or treated with 10 mM nitrate, where no differences were observed. These results indicate that the increase in PDW of plants grown with 3 mM is possibly due to the nitrogen uptake by plant roots rather than the SNF, since nodule growth and physiology were severely affected under these conditions compared to those grown without nitrate (Table 2.1).

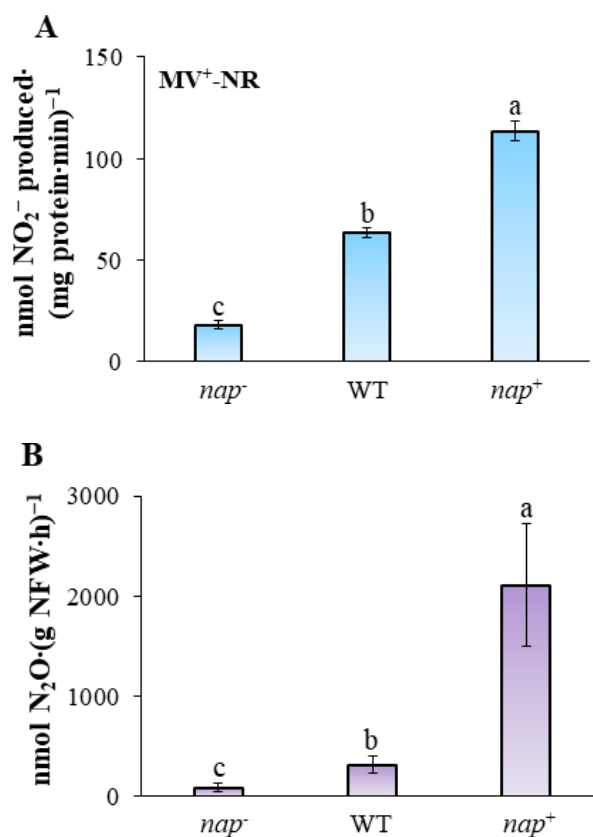
**Table 2.1.** Effect of nitrate on nodule number (NN), nodule fresh weight (NFW), plant dry weight (PDW) and leghemoglobin content in nodules (Lb) from alfalfa plants inoculated with *E. meliloti* 1021. Plants were grown without nitrate (0 mM), with 1 mM or 3 mM KNO<sub>3</sub> during 50 days, or applying 10 mM KNO<sub>3</sub> 7 days before harvesting. All the plants were subjected to flooding conditions for 7 days before harvesting.

	Nitrate treatment (mM)			
	50 days			7 days before harvesting
	0	1	3	10
NN·plant <sup>-1</sup>	17a	15a	17a	15a
NFW (mg·plant <sup>-1</sup> )	41.31a	21.10b	17.58b	35.25a
PDW (mg·plant <sup>-1</sup> )	346.04b	323.48b	456.16a	362.50b
Lb (mg·(g NFW) <sup>-1</sup> )	10.9a	5.65c	6.4c	7.38b

Values in a row followed by the same lower-case letter are not statistically different according to U Mann-Whitney test at  $p \leq 0.05$ .

To investigate the involvement of Nap in N<sub>2</sub>O emissions, alfalfa plants were grown in pots and, a week before harvesting, they were subjected to 10 mM KNO<sub>3</sub> and flooding conditions, since these were the conditions where the highest N<sub>2</sub>O emission levels were found and nodule biomass was not affected (Figure 2.3, Table 2.1). Plants were inoculated with the WT strain 1021 or 4004, the *nap*<sup>+</sup>, or the *nap*<sup>-</sup> strain (Figure 5B from Material and Methods). As shown in Figure 2.4A, MV<sup>+</sup>-NR activity from bacteroids of the WT 1021 was 2.4-fold higher compared to that from *nap*<sup>-</sup> bacteroids. Inoculation of the plants with the *nap*<sup>+</sup> strain induced MV<sup>+</sup>-NR activity of the bacteroids about 1.8-fold compared to those from plants inoculated with the WT strain. When N<sub>2</sub>O emissions from the nodules were analysed, N<sub>2</sub>O levels decreased 3.5-fold in the nodules produced by the *nap* mutant compared to the WT nodules. Interestingly, inoculation of the plants with the *nap*<sup>+</sup> strain resulted in a large increase of N<sub>2</sub>O emissions (about 6.7-fold) by these nodules compared to those from plants inoculated with the WT strain (Figure 2.4B). Collectively, these results indicate that *E. meliloti* Nap is clearly involved in N<sub>2</sub>O

emissions from alfalfa nodules. Similar results were obtained with the WT 4004 (data not shown).



**Figure 2.4.** (A) MV<sup>+</sup>-NR activity from bacteroids isolated from nodules elicited by *E. meliloti* 1021 (WT), the *napA::Ω* mutant (*nap*<sup>-</sup>) or the *nap*<sup>+</sup> strain after inoculation of alfalfa plants subjected to flooding and 10 mM KNO<sub>3</sub>, both applied 7 days before harvesting. Data are means with standard deviation from at least two independent extractions assayed in triplicate. (B) N<sub>2</sub>O emissions from nodules isolated from the same plants. Data are means with standard deviation from at least three biological replicates. Same lower-case letters are not statistically significant according to U Mann-Whitney test at  $p \leq 0.05$ . NFW, nodule fresh weight.

## **2.5. Copper modulates N<sub>2</sub>O emissions by alfalfa nodules and bacteroidal nitrous oxide reductase activity**

In order to investigate the effect of Cu on the alfalfa-*E. meliloti* symbiotic interaction, plants were grown during 43 days in pots containing nutrient solution without nitrate and without Cu<sup>2+</sup> addition (0 μM) or supplemented with 0.8 μM or 20 μM Cu<sup>2+</sup> (Figure 5C from Material and Methods). Figure S2.1 shows the experimental setting for these experiments.

As shown in Table 2.2, NFW, SDW, PDW and N content significantly decreased in plants grown without Cu<sup>2+</sup> added compared to those grown in the presence of Cu<sup>2+</sup>. No differences in those parameters were found between plants grown with 0.8 or 20 μM Cu<sup>2+</sup>. Moreover, plants grown without Cu<sup>2+</sup> added displayed a pale green tone in their leaves,

while they were dark green in the other treatments, as observed in Figure S2.1. These results indicate a negative effect of Cu limitation on alfalfa-*E. meliloti* SNF. Leghemoglobin values support this idea, since nodules from plants grown without Cu<sup>2+</sup> contained 1.8-fold less leghemoglobin than those from plants grown with 0.8 μM Cu<sup>2+</sup> (Table 2.2). As observed in Table 2.2, Cu concentration was higher in roots and nodules comparing to shoots, especially in plants grown with 20 μM Cu<sup>2+</sup>, where we found 5.5-fold and 7.6-fold more Cu in nodules and roots, respectively, compared to shoots. According to these results, Cu may be primarily accumulated in the roots, and only a minimal proportion would be transferred to shoot and leaves.

**Table 2.2.** Effect of Cu<sup>2+</sup> on nodule fresh weight (NFW), shoot dry weight (SDW), plant dry weight (PDW), leghemoglobin content in nodules (Lb), nitrogen concentration ([N]) and Cu<sup>2+</sup> concentration ([Cu<sup>2+</sup>]) in shoots, roots and nodules from alfalfa plants inoculated with *E. meliloti* 1021. Plants were grown for 43 days without nitrate supplied and with Cu<sup>2+</sup> added to nutrient solution (0.8 or 20 μM) or not (0 μM). Cu content in seeds was also determined ( $17 \pm 0.5 \text{ mg} \cdot (\text{kg of dry seeds})^{-1}$ , or  $28 \pm 0.8 \text{ ng per seed}$ ).

	Cu <sup>2+</sup> added (μM)		
	0	0.8	20
<b>NFW (mg·plant<sup>-1</sup>)</b>	23.56b	41.75a	35.66a
<b>SDW (mg·plant<sup>-1</sup>)</b>	79.11b	141.98a	140.35a
<b>PDW (mg·plant<sup>-1</sup>)</b>	136.12b	235.50a	258.99a
<b>Lb (mg·g NFW<sup>-1</sup>)</b>	6.31c	11.45a	8.33b
<b>[N] (mg·g<sup>-1</sup>)</b>	20.90b	35.67a	37.05a
<b>[Cu<sup>2+</sup>] (shoot) (mg·kg<sup>-1</sup>)</b>	n.d.	6.14b	23.14a
<b>[Cu<sup>2+</sup>] (root) (mg·kg<sup>-1</sup>)</b>	n.d.	10.79b	176.25a
<b>[Cu<sup>2+</sup>] (nodule) (mg·kg<sup>-1</sup>)</b>	2.10c	13.23b	127.57a

Values in a row followed by the same lower-case letter are not statistically different according to U Mann-Whitney test at  $p \leq 0.05$ . n.d., not detected.

In order to elucidate the contribution of Nos to N<sub>2</sub>O emissions from alfalfa nodules, bacteroids were isolated from nodules elicited by the WT 1021 or 2011 or a *nosZ* mutant. These nodules were collected from plants grown for 50 days and subjected to 10 mM nitrate and flooding during 7 days before harvesting (Figure 5C from Material and Methods). Bacteroids from the *nosZ* mutant showed 5.9-fold less N<sub>2</sub>OR activity than bacteroids from the WT 1021 ( $p < 0.05$ ). On the contrary, N<sub>2</sub>O emission rates by *nosZ*<sup>-</sup> nodules were 5.3-fold higher compared to those nodules from plants inoculated with the WT strain ( $p < 0.05$ ) (Table 2.3). These results demonstrate the involvement of Nos in N<sub>2</sub>O reduction in alfalfa nodules. Finally, another set of alfalfa pots was inoculated with the WT 1021 or 2011 strain and grown without Cu added (0 μM), or in the presence of 0.8 μM or 20 μM Cu. Seven days before harvesting (*i. e.*, after 43 days), plants were



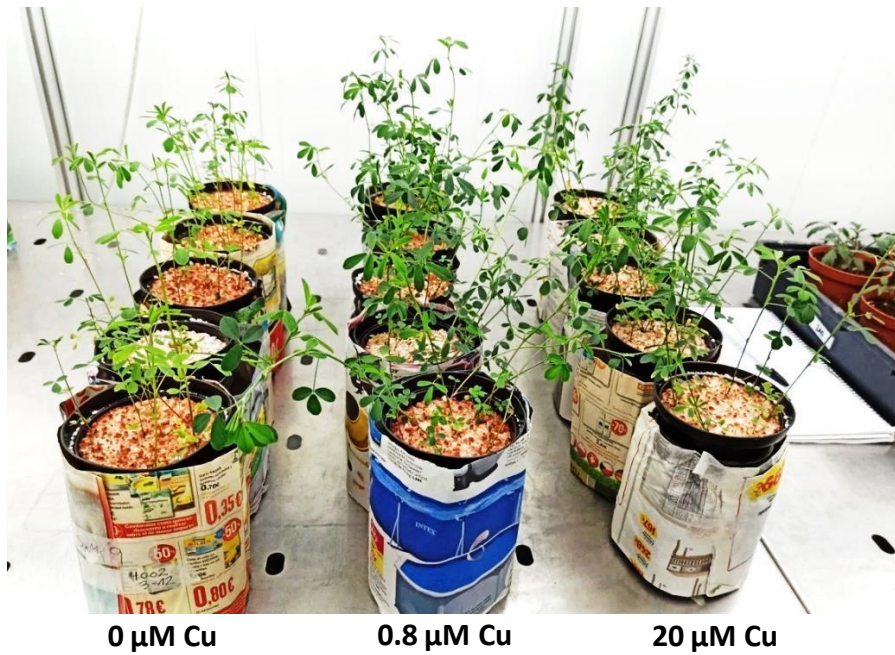
treated with 10 mM KNO<sub>3</sub> and subjected to flooding in order to induce N<sub>2</sub>O emissions (Figure 5C from Material and Methods). As shown in Table 2.3, Cu accumulation in nodules was correlated with the Cu concentration added to the nutrient solution. Moreover, while MV<sup>+</sup>-NR activity from the bacteroids was not significantly influenced by Cu availability, MV<sup>+</sup>-NIR activity was significantly reduced in bacteroids from 0 or 20 μM Cu treatments comparing with 0.8 μM Cu. N<sub>2</sub>OR activity increased in parallel with the Cu concentration provided. Conversely, N<sub>2</sub>O emission rate decreased with Cu concentration. These results suggest that environmental Cu concentration plays an essential role in modulating NIR and N<sub>2</sub>OR activity and consequently in the decrease of N<sub>2</sub>O emissions by alfalfa nodules. In the above mentioned experiments, similar results shown by the WT 1021 were obtained with the WT 2011 (data not shown).

**Table 2.3.** Effect of Cu<sup>2+</sup> on nodules elicited by *E. meliloti* 1021. Plants inoculated with *E. meliloti* 1021 were grown in pots with 0, 0.8 or 20 μM Cu<sup>2+</sup> added to the nutrient solution during 50 days, while plants inoculated with the *nosZ* mutant strain only were grown with 0.8 μM Cu<sup>2+</sup> for the same time period. This entire set of plants was subjected to 10 mM KNO<sub>3</sub> and flooding for 7 days before harvesting. MV<sup>+</sup>-NR, MV<sup>+</sup>-NIR and N<sub>2</sub>OR activities were analysed from bacteroids isolated from nodules, while N<sub>2</sub>O emissions were analysed from detached nodules.

Cu <sup>2+</sup> added to NS (μM)	Strains	MV <sup>+</sup> -NR [nmol NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> produced·(mg protein·min) <sup>-1</sup> ]	MV <sup>+</sup> -NIR [nmol NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> consumed·(mg protein·min) <sup>-1</sup> ]	N <sub>2</sub> OR [nmol N <sub>2</sub> O consumed·(mg protein·h) <sup>-1</sup> ]	N <sub>2</sub> O emissions [nmol N <sub>2</sub> O produced·(g NFW·h) <sup>-1</sup> ]	Cu <sup>2+</sup> content in nodules (mg·kg <sup>-1</sup> )
0	WT	32.70a	21.53b	12.52c	694.84a	5.28c
0.8	WT	36.98a	52.76a	44.63Ab	236.17Bb	41.04b
	<i>nosZ</i> <sup>-</sup>	n.d.	n.d.	7.61B	1254.75A	n.d.
20	WT	40.45a	28.93b	147.72a	69.13c	673.55a

Values in a column followed by the same lower-case letter (comparison between Cu treatments) or upper-case letter (comparison between WT and *nosZ*<sup>-</sup>) are not statistically different according to U Mann-Whitney test at  $p \leq 0.05$ . n.d., not determined; NS, nutrient solution; NFW, nodule fresh weight.

## Chapter 2: supplementary material



**Figure S2.1.** Experimental set of alfalfa plants grown under different Cu conditions without nitrate for 43 days. Note the lighter green color of leaves from the plants grown without Cu added (0 μM) comparing to the rest of treatments.



# Chapter 3

## **Effect of copper on expression of functional genes and proteins associated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* denitrification**

**Pacheco, P. J.**, Cabrera, J. J., Jiménez-Leiva, A., Bedmar, E. J., Mesa, S., Tortosa, G., Delgado, M. J.

Modified version from the article published with the following reference:

Pacheco, P. J., Cabrera, J. J., Jiménez-Leiva, A., Bedmar, E. J., Mesa, S., Tortosa, G., Delgado, M. J. (2022). Effect of copper on expression of functional genes and proteins associated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* denitrification. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 3386, <https://doi.org/10.3390/ijms23063386>.



### **3.1. Abstract**

N<sub>2</sub>O is a powerful greenhouse gas that contributes to climate change. Denitrification is one of the largest sources of N<sub>2</sub>O in soils. The soybean endosymbiont *B. diazoefficiens* is a model for rhizobial denitrification studies since, in addition to fixing N<sub>2</sub>, it has the ability to grow anaerobically under free-living conditions by reducing nitrate from the medium through the complete denitrification pathway. This bacterium contains a periplasmic nitrate reductase (Nap), a copper (Cu)-containing nitrite reductase (NirK), a *c*-type nitric oxide reductase (cNor), and a Cu-dependent nitrous oxide reductase (Nos) encoded by the *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* and *nosRZDFYLX* genes, respectively. In this work, an integrated study of the role of Cu in *B. diazoefficiens* denitrification has been performed. A notable reduction in *nirK*, *nor*, and *nos* genes expression observed under Cu limitation was correlated with a significant decrease in NirK, NorC and NosZ protein levels and activities. Meanwhile, *nap* expression was not affected by Cu, but a remarkable depletion in Nap activity was found, presumably due to an inhibitory effect of nitrite accumulated under Cu-limiting conditions. Interestingly, a post-transcriptional regulation by increasing Nap and NirK activities, as well as NorC and NosZ protein levels, was observed in response to high Cu. Our results demonstrate, for the first time, the role of Cu in transcriptional and post-transcriptional control of *B. diazoefficiens* denitrification. Thus, this study will contribute by proposing useful strategies for reducing N<sub>2</sub>O emissions from agricultural soils.

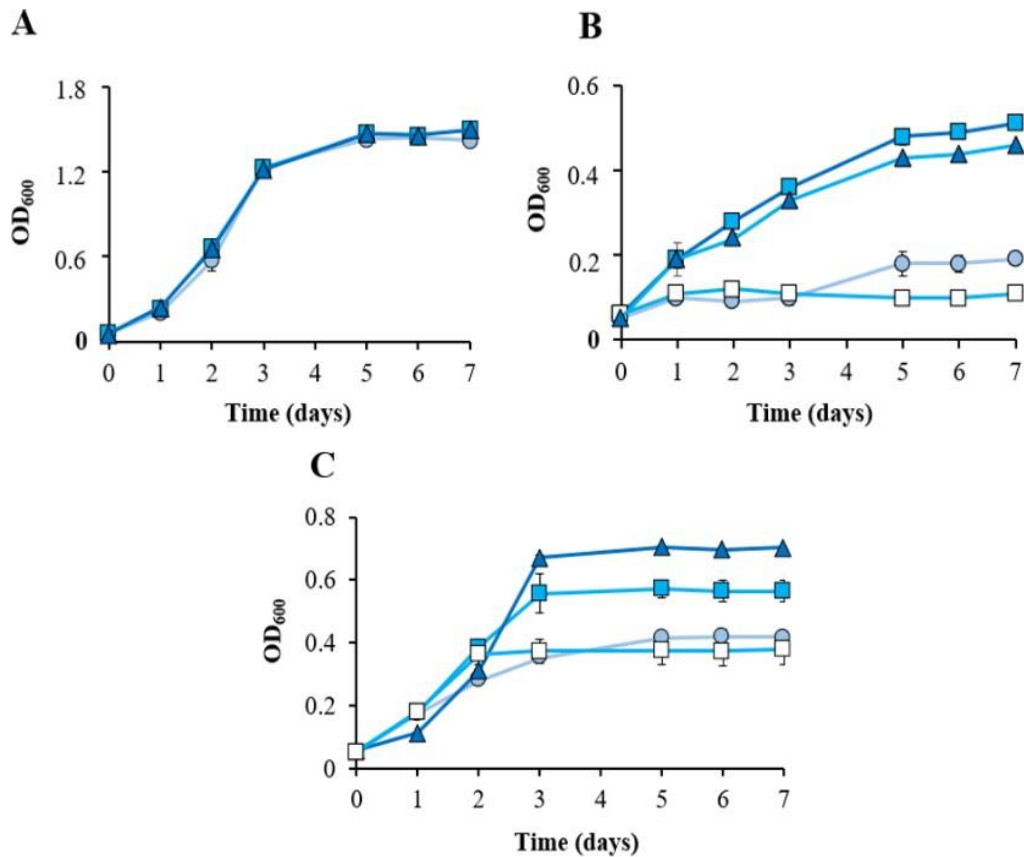
### **3.2. Bacterial strains**

*B. diazoefficiens* strains used in this study and their description are listed in Table 1 from Material and Methods. Primers sequences in this work are listed in Table 3 from Material and Methods.

### **3.3. Cu effect on *B. diazoefficiens* 110*spc4* growth under different oxygen conditions**

*B. diazoefficiens* 110*spc4* was grown under oxic, anoxic and microoxic (2% initial O<sub>2</sub> concentration) conditions in Buffered Vincent's medium (Serventi *et al.*, 2012) supplemented with nitrate (BVMN) and different Cu concentrations: Cu limitation, *i.e.*, chelated (Cu-L), standard Cu (Cu-S, 0.02 μM) or high Cu (Cu-H, 13 μM) (Figure 3.1). Under oxic conditions, cultures reached an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of around 1.5 after 7 days of incubation, regardless of the Cu treatment (Figure 3.1A). These results suggest that Cu was not a limiting factor for *B. diazoefficiens* growth by oxygen respiration (Figure 3.1A).

When *B. diazoefficiens* 110*spc4* cells were cultured in BVMN medium under anoxic conditions (Figure 3.1B), Cu-L cultures reached a turbidity (OD<sub>600</sub>) of about 0.2 after 7 days of incubation, while Cu-S and Cu-H cultures reached an OD<sub>600</sub> of about 0.5, indicating that growth was severely affected in the Cu-L medium compared with Cu-S or Cu-H media (Figure 3.1B). This result indicates that Cu was essential for nitrate-dependent anaerobic growth of *B. diazoefficiens*. In fact, the growth profile displayed in BVMN Cu-L cultures with NO<sub>3</sub><sup>-</sup> was similar to that observed in Cu-S cultures incubated without NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (BVM medium) (Figure 3.1B), indicating that Cu and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> were both indispensable for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> respiration under anoxic conditions. Finally, *B. diazoefficiens* 110*spc4* cells were incubated under microoxic conditions in Cu-L, Cu-S and Cu-H BVMN media. As shown in Figure 3.1C, microaerobic growth under Cu-L conditions decreased compared to that reached under Cu-S conditions (about 0.4 and 0.6 OD<sub>600</sub>, respectively, after 7 days of incubation). In contrast, cells grown in the Cu-H medium showed a significant increase in growth rates compared to those cultured in the Cu-S medium (about 0.7 and 0.6 OD<sub>600</sub>, respectively, after 7 days of incubation). Interestingly, when cells were grown microaerobically in the Cu-S medium, but in the absence of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, they displayed similar growth rates to those cultured in Cu-L conditions with NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as the respiratory substrate (Figure 3.1C). These results suggest that NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and Cu were necessary for *B. diazoefficiens* to grow from NO<sub>3</sub><sup>-</sup> respiration under microoxic conditions, as it was observed under anoxic conditions (Figure 3.1B).



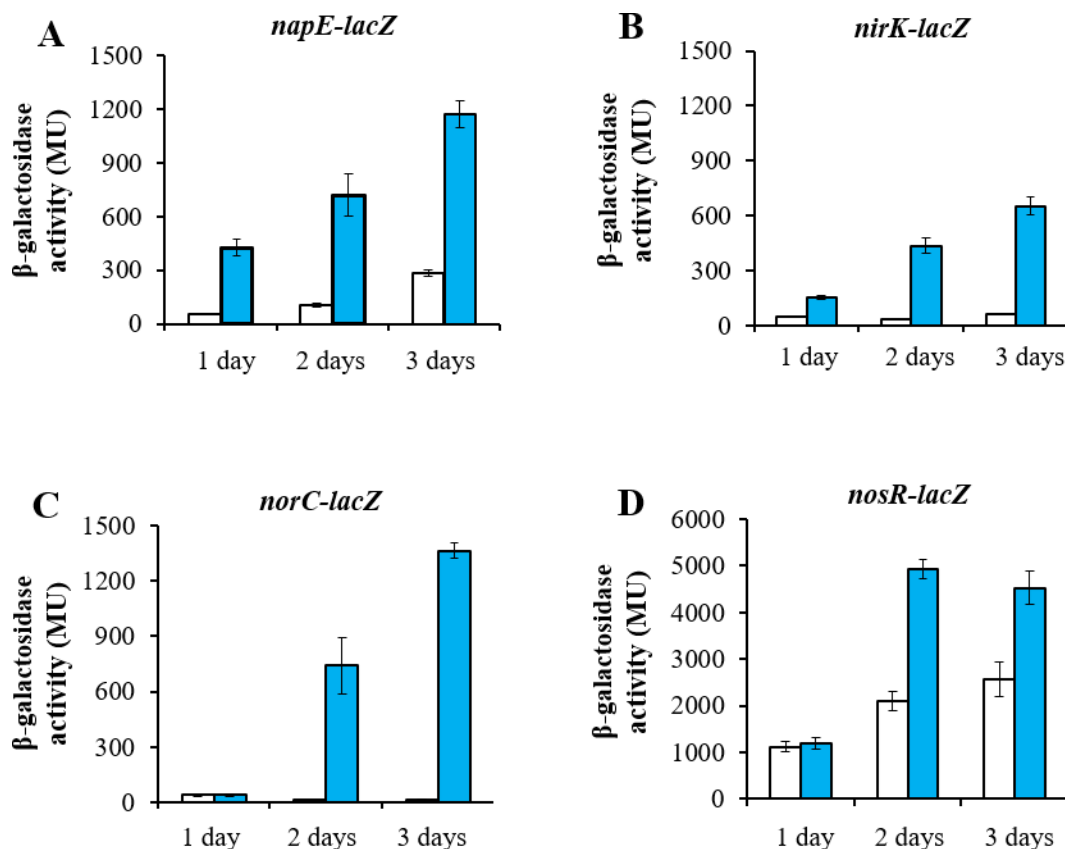
**Figure 3.1.** Growth of *B. diazoefficiens* 110spc4 in Cu limitation (Cu-L) (○), standard Cu (Cu-S) (■) and high Cu (Cu-H) (▲) BVMN media under oxic (A), anoxic (B) and microoxic (C) conditions. In (B,C), growth in the Cu-S BVM medium was also included (□). Data represent means with standard error bars from at least two independent cultures assayed in triplicate, and where not visible, these were smaller than the symbols.

### **3.4. Disparate response of denitrification gene expression to Cu**

A preliminary experiment was performed in order to select the incubation period in which denitrification gene induction in response to oxygen depletion in a BVMN medium reached maximal levels. To achieve this goal,  $\beta$ -galactosidase activity from a *napE-lacZ*, *nirK-lacZ*, *norC-lacZ* and *nosR-lacZ* transcriptional fusions was analysed in *B. diazoefficiens* parental cells grown in Cu-S BVMN medium under oxic and microoxic conditions for 1, 2 and 3 days of incubation. As shown in Figure 3.2, all the fusions showed a gradual increase in  $\beta$ -galactosidase activity from 1 to 3 days of growth. In general, microaerobic expression of all the denitrification genes was notably higher than that observed under aerobiosis. These results confirmed previous studies (Bedmar *et al.*, 2005; Bueno *et al.*, 2017), where oxygen-limiting conditions together with  $\text{NO}_3^-$  strongly induced denitrification gene expression in *B. diazoefficiens*. In contrast to the remarkably low levels of aerobic expression of *nap*, *nirK* and *nor* genes, the *nosR-lacZ* fusion showed significantly higher levels of  $\beta$ -galactosidase activity after 1, 2 and 3-day incubation



periods under oxic conditions. Similar levels of *nosR-lacZ* expression were observed under aerobic and microaerobic respiration after 1 day of incubation. However, a significant induction of  $\beta$ -galactosidase activity was observed from the *nosR-lacZ* fusion in cells incubated for 2 or 3 days under microoxic conditions compared to that from aerobically grown cells (Figure 3.2).

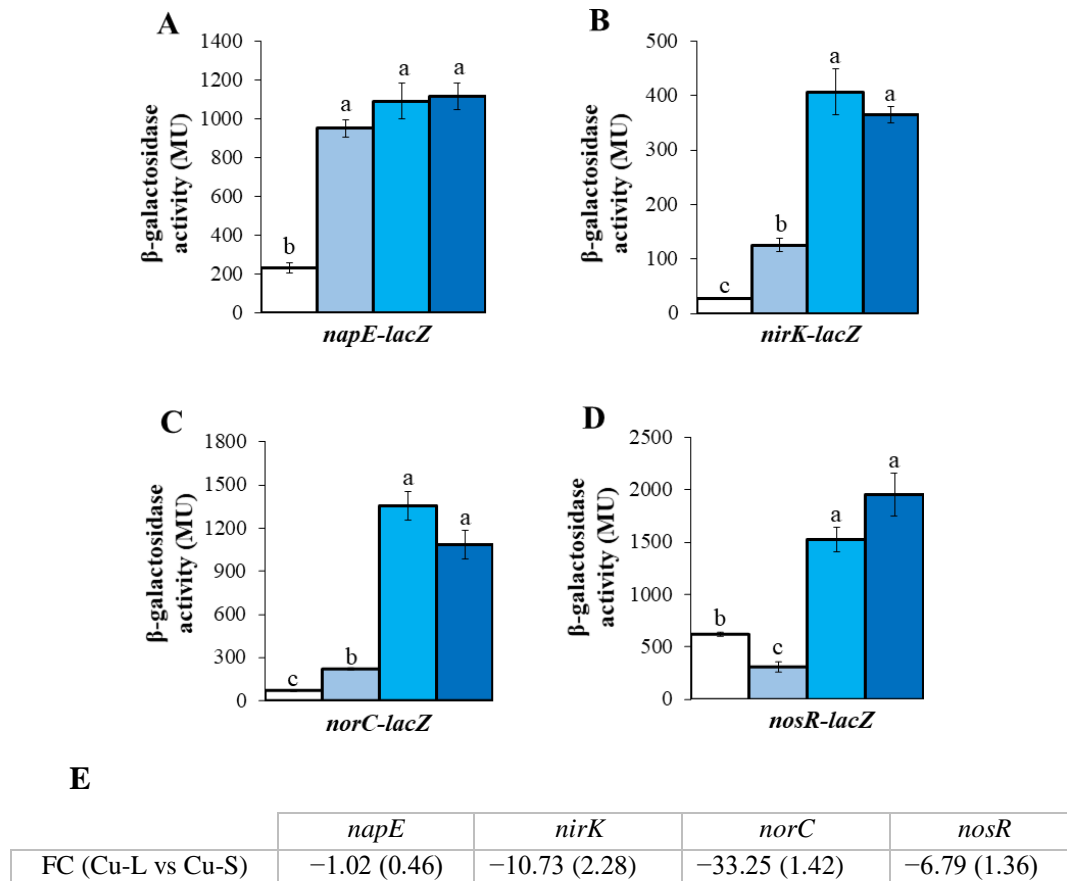


**Figure 3.2.**  $\beta$ -galactosidase activity from *napE-lacZ* (A), *nirK-lacZ* (B), *norC-lacZ* (C) and *nosR-lacZ* (D) transcriptional fusions chromosomally integrated in *B. diazoefficiens* 110*spc4* grown under aerobic (white bars) or microaerobic conditions (blue bars) in Cu-S BVMN medium for 1, 2 and 3 days. Data expressed as Miller Units (MU) are means with standard error bars from at least three independent cultures assayed in triplicate.

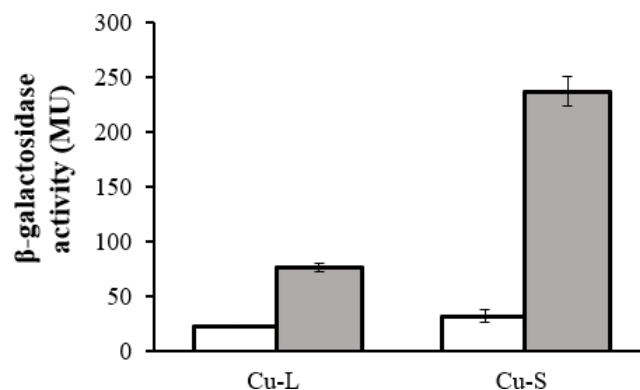
Taking these results into consideration, we decided to perform a study into the Cu effect on denitrification gene expression, by incubating cells for 3 days under different Cu concentrations. For this purpose, we analysed  $\beta$ -galactosidase activity from the *napE-lacZ*, *nirK-lacZ*, *norC-lacZ* and *nosR-lacZ* transcriptional fusions in *B. diazoefficiens* 110*spc4* cells grown for 3 days in Cu-L, Cu-S and Cu-H BVMN media under microoxic conditions (Figure 3.3). Cultures grown aerobically were included as a control in the experiments. As shown in Figure 3.3A, *napE-lacZ* microaerobic expression was not significantly affected by Cu concentration in the medium, demonstrating similar  $\beta$ -galactosidase activity values under Cu-L, Cu-S or Cu-H conditions. These results

indicate that Cu is not involved in the transcriptional control of *napEDABC* genes. In contrast, Cu limitation drastically lowered  $\beta$ -galactosidase activity from the *nirK-lacZ*, *norC-lacZ* and *nosR-lacZ* fusions (about 3-, 6- and 4-fold, respectively) compared with the values obtained in the Cu-S medium (Figure 3.3B-D). These results suggest that Cu availability is essential for *nirK*, *norCBQD* and *nosRZDFYLX* maximal expression. Since the catalytic subunit of cNor, NorB, does not contain Cu as cofactor, the drastic reduction in *norCBQD* expression under Cu-L conditions, instead of being directly controlled by Cu, might be due to the lack of nitric oxide (NO), the product of NirK, which is required to induce the expression of *norCBQD* genes (Bueno *et al.*, 2017; Jiménez-Leiva *et al.*, 2019). In order to test this hypothesis, we performed a  $\beta$ -galactosidase activity assay with *B. diazoefficiens* cells containing the *norC-lacZ* fusion incubated under Cu-L and Cu-S BVM media (*i.e.*, without  $\text{NO}_3^-$ ) in the presence of NO that was added to the cells 5 h before the assay. As shown in Figure 3.4, the addition of NO to the Cu-L BVM medium resulted in a very weak induction of about 3-fold of *norC-lacZ* expression, in contrast to the notable increase of about 9.5-fold in the NO-amended Cu-S BVM medium. Thus, the decreased expression of *norCBQD* genes under Cu limitation was not due to the lack of NO provoked by the reduction in *nirK* expression under Cu-L conditions, but rather to a direct unknown effect of Cu limitation on *norC-lacZ* expression. Regarding the effect of high Cu on denitrification gene expression, the growth of the cells in the Cu-H BVMN medium did not change the expression of any of the transcriptional fusions significantly compared to that observed in cells grown in the Cu-S BVMN medium (Figure 3.3A-D).

The negative effect of Cu limitation on *nirK*, *nor* and *nos* transcriptional expression was also confirmed by qRT-PCR analyses. When cells were cultured microaerobically in the Cu-L BVMN medium, expression of *nirK*, *norC* and *nosR* genes was reduced to 10.73, 33.25 and 6.79, respectively, compared to that observed in cells cultured in the Cu-S medium (Figure 3.3E). In contrast, Cu limitation did not affect *napE* expression compared with Cu-S conditions, similar to the results obtained when we analysed the *napE-lacZ* transcriptional fusion (Figure 3.3A,E). Taken together, these results confirm the negative effect of Cu limitation on *nirK*, *nor* and *nos* but not on *nap* genes expression.



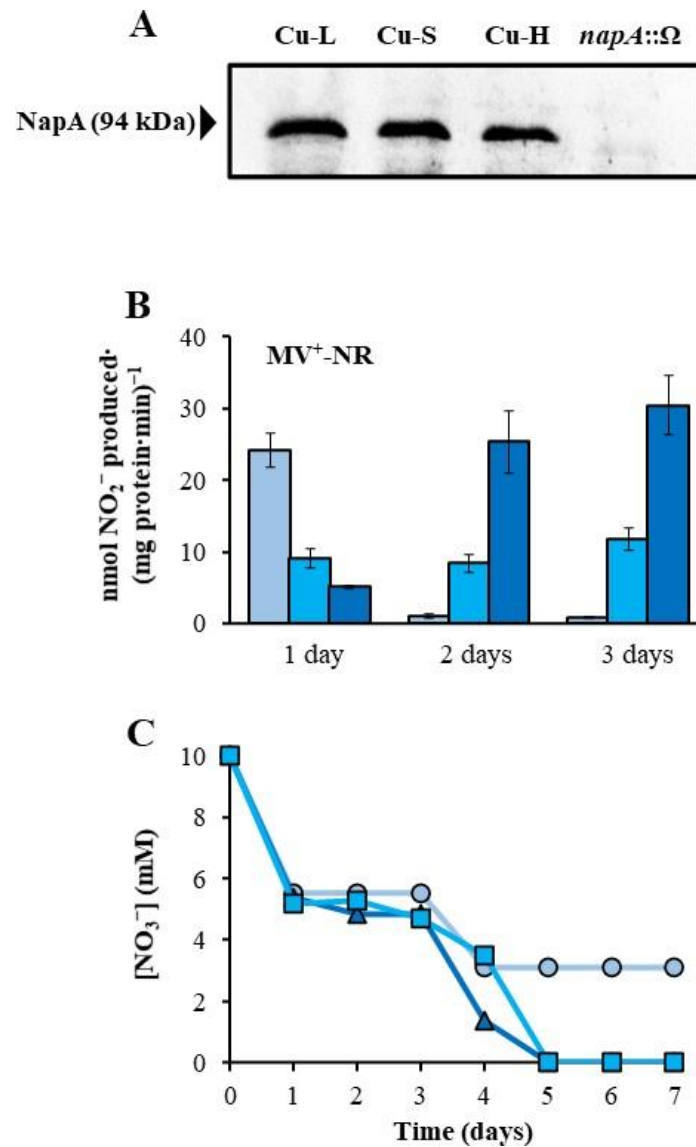
**Figure 3.3.** Transcriptional expression of denitrification genes monitored as  $\beta$ -galactosidase activity from *napE-lacZ* (A), *nirK-lacZ* (B), *norC-lacZ* (C) and *nosR-lacZ* (D) fusions chromosomally integrated in *B. diazoefficiens* 110*spc4* grown aerobically in Cu-S (white bars) and microaerobically in Cu-L (light blue bars), Cu-S (blue bars) and Cu-H (dark blue bars) BVMN media for 3 days. Data expressed as MU are means with standard deviation bars from at least three independent cultures assayed in triplicate. A *post-hoc* Tukey HSD test at  $p \leq 0.05$  was applied in (A–D); same lower-case letters in each figure indicate that values are not statistically different. (E) Expression changes of *napE*, *nirK*, *norC* and *nosR* genes in *B. diazoefficiens* 110*spc4* grown microaerobically in Cu-L compared with Cu-S measured by qRT-PCR. Data expressed as Fold Change (FC) are means with standard deviation in parentheses from at least three independent cultures assayed in triplicate.



**Figure 3.4.**  $\beta$ -galactosidase activity from the *norC-lacZ* transcriptional fusion chromosomally integrated in *B. diazoefficiens* 110*spc4* grown under microaerobic conditions in Cu-L or Cu-S BVM medium (*i.e.*, without nitrate). Tubes were incubated during 24 h at an initial OD600 of 0.2, and 5 h before the assay, NO was added (grey bars) or not (white bars). Data expressed as MU represent means with standard error bars from at least three independent cultures assayed in triplicate.

### **3.5. Influence of Cu on expression and activity of denitrification enzymes**

In order to investigate the effects of Cu on Nap expression, immunoblot analyses using antibodies raised against purified *P. pantotrophus* NapA (Richardson *et al.*, 1998) were performed in the soluble fraction of *B. diazoefficiens* grown under microoxic conditions in Cu-L, Cu-S and Cu-H BVMN media. A band of about 94 kDa, that was undetectable in a *napA* mutant, was present in the WT cells (Figure 3.5A). Expression of NapA was not affected by Cu since similar protein levels were observed in WT cells grown under the different Cu conditions assayed (Figure 3.5A). Full scans of the entire gel from a representative experiment are shown in Figure S3.1A,B. Next, MV<sup>+</sup>-NR activity was analysed in *B. diazoefficiens* parental cells incubated for 1, 2 and 3 days under microoxic conditions in Cu-L, Cu-S or Cu-H BVMN media. As shown in Figure 3.5B, MV<sup>+</sup>-NR activity in Cu-L conditions was higher than that detected in Cu-S or Cu-H media after 1 day of incubation. However, MV<sup>+</sup>-NR activity was much lower than that detected in Cu-S or Cu-H media after 2 and 3 days of incubation. Low levels of MV<sup>+</sup>-NR activity observed after 2 and 3 days of incubation in Cu-L conditions were in concordance with nitrate consumption rates, where only 7 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> was taken from the medium, while all the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> present (10 mM) was consumed by the cells grown under Cu-S and Cu-H conditions after 5 days of incubation (Figure 3.5C). It is also important to note that the highest values of MV<sup>+</sup>-NR activity were obtained in Cu-H medium either after 2 or 3 days of incubation (Figure 3.5B). In fact, while 8.7 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> was consumed by cells grown under Cu-H conditions, only 6.6 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> was taken by Cu-S grown cells after 4 days of incubation (Figure 3.5C).

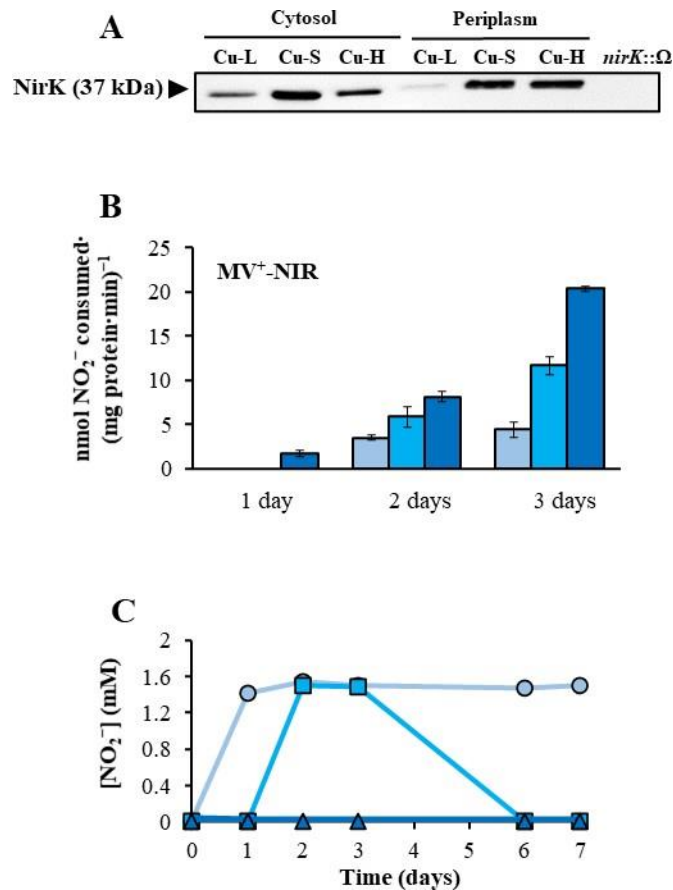


**Figure 3.5.** Nitrate reductase protein levels and activity. **(A)** Western-blotted SDS-PAGE gels of soluble fraction (20  $\mu$ g) proteins probed with anti-NapA antibodies from *P. pantotrophus*. Soluble fraction from a *napA::Ω* mutant strain was used as negative control in the experiments. Apparent mass of NapA (94 kDa) is shown at the left margin. Soluble fraction was isolated from 3-day incubation cultures. **(B)** MV<sup>+</sup>-NR activity in Cu-L (light blue bars), Cu-S (blue bars) and Cu-H (dark blue bars) conditions. Data are means with standard error bars from at least two independent cultures assayed in triplicate. **(C)** Extracellular nitrate concentration in the Cu-L (□), Cu-S (○) and Cu-H (△) growth media. Data are means with standard error bars from at least two independent cultures assayed in triplicate, and where not visible, these were smaller than the symbols. Cells were grown under microoxic conditions in BVMN medium with different Cu concentrations.

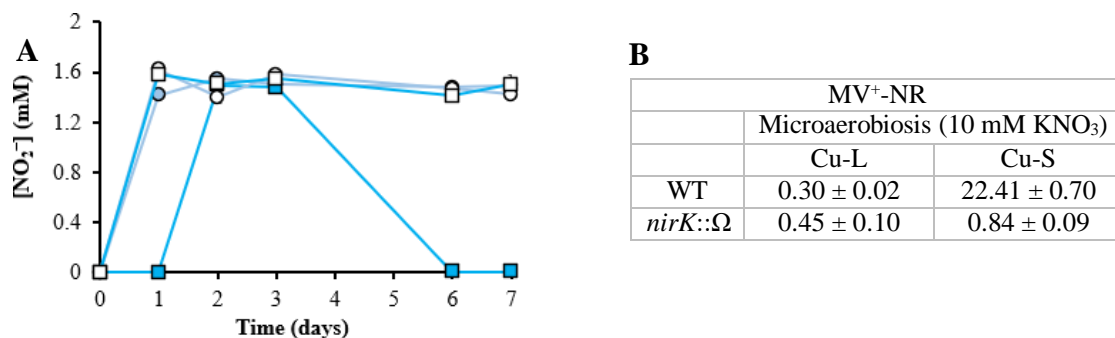
Figure 3.6A displays NirK western blot analyses in cytosolic and periplasmic fractions. The band corresponding to NirK (37 kDa), that was absent in a *nirK* mutant, was fainter in the cytosol (2.3-fold) and very weakly detectable in the periplasm (4.5-fold lower expression) from cells grown under Cu-L conditions compared to that detected in cells grown in the Cu-S medium (Figure 3.6A). In contrast, while the levels of NirK in the cytosol of Cu-H cells were 1.8-fold lower than those detected in Cu-S cells, a similar

pattern of expression was observed in the periplasm of the Cu-H and Cu-S grown cells (Figure 3.6A). Full scans of the entire gel from a representative experiment are shown in Figure S3.2A,D. With respect to NirK activity, MV<sup>+</sup>-NIR activity levels were significantly lower in the Cu-L than in the Cu-S medium, mainly after 3 days of incubation (Figure 3.6B). This observation was consistent with the accumulation of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in the Cu-L medium (1.5 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) that was not further consumed through the entire 7- day incubation period (Figure 3.6C). In contrast, Cu-S grown cells consumed the NO<sub>2</sub><sup>-</sup> accumulated (1.5 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) from the third day of incubation, decreasing its concentration in the growth medium to zero after 6 days (Figure 3.6C). As observed in Figure 3.6C, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> was accumulated in the Cu-L medium from the first day, indicating a possible inhibitory effect on Nap activity, observed after 2 and 3 days of incubation (Figure 3.5B). To confirm this hypothesis, we analysed NO<sub>2</sub><sup>-</sup> accumulation and MV<sup>+</sup>-NR activity in cells of a *nirK* mutant that, as has been reported previously, also accumulates NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in the growth medium (Velasco *et al.*, 2001; Bueno *et al.*, 2008). For this purpose, WT and *nirK* mutant cells were cultured for 3 days in Cu-L or Cu-S media. As expected, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> accumulated in the WT Cu-L medium, as well as in the *nirK* Cu-L and Cu-S media (Figure 3.7A). Moreover, very low MV<sup>+</sup>-NR activity values were observed in WT under Cu-L and in the *nirK* mutant both under Cu-L and Cu-S conditions, compared to those found in WT grown in the Cu-S medium (Figure 3.7B).

As shown in Figure 3.6B, MV<sup>+</sup>-NIR activity was notably higher in cells grown for 3 days under Cu-H conditions compared to that observed under Cu-S conditions. In fact, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> was not detected in the Cu-H medium throughout the entire incubation period (Figure 3.6C). This observation may be a consequence of the high NIR activity observed under Cu-H conditions (Figure 3.6B).

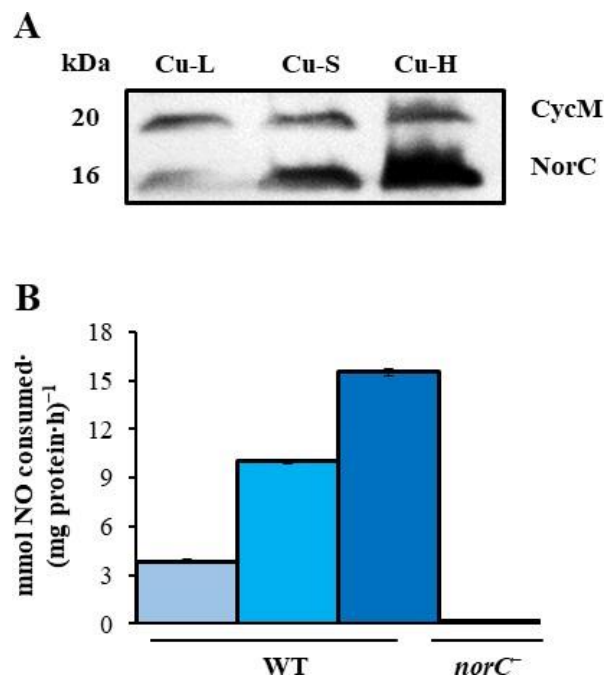


**Figure 3.6.** Nitrite reductase protein levels and activity. (A) Western-blotted SDS-PAGE gels of periplasmic (21 µg) and cytosolic (12 µg) proteins probed with anti-NirK antibodies from *B. diazoefficiens* 110spc4. Soluble fraction from a *nirK::Ω* mutant strain was used as negative control in the experiments. Apparent mass of NirK (37 kDa) is shown in the left margin. Periplasmic and cytosolic fractions were isolated from 3-day incubation cultures. (B) MV<sup>+</sup>-NIR activity under Cu-L (light blue bars), Cu-S (blue bars) and Cu-H (dark blue bars) conditions. Data are means with standard error bars from at least two independent cultures assayed in triplicate. (C) Extracellular NO<sub>2</sub><sup>-</sup> concentration in the Cu-L (○), Cu-S (◻) and Cu-H (▲) growth media. Error bars represent standard error between triplicates, and where not visible, these were smaller than the symbols.



**Figure 3.7.** (A) Extracellular nitrite concentration in the growth medium of *B. diazoefficiens* 110spc4 (WT, coloured symbols) and the *nirK::Ω* mutant strain (open symbols) cultured under Cu-L (○) or Cu-S (◻) conditions. Error bars represent standard error between triplicates, and where not visible, these were smaller than the symbols. (B) MV<sup>+</sup>-NR activity of WT and *nirK::Ω* mutant strains cultured in Cu-L or Cu-S. MV<sup>+</sup>-NR activity given as nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> produced · (mg protein · min)<sup>-1</sup> was determined after 3 days of incubation. Data are means with standard error in parentheses from at least two independent cultures assayed in triplicate. Cells were grown microaerobically in BVMN medium with different Cu concentrations.

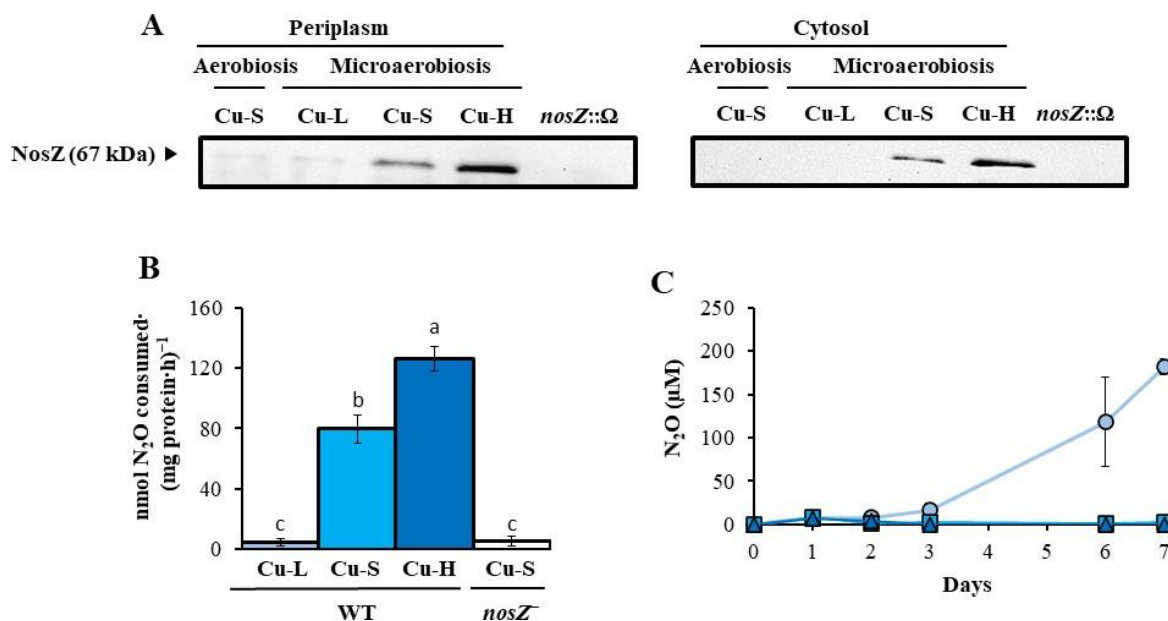
Next, we analysed the expression of NorC by heme-staining of the membrane proteins (Figure 3.8A). The NorC subunit of the NOR enzyme, identified previously by Mesa and colleagues (2002), is about 16 kDa. As observed in Figure 3.8A, about 3.3-fold lower levels of NorC were detected in cells grown under Cu-L conditions compared to those grown in Cu-S. Moreover, an approximate 2.3-fold increase in NorC expression was detected in Cu-H compared with Cu-S conditions (Figure 3.8A). Full scans of the entire gel from a representative experiment are shown in Figure S3.3A,B. Similarly, NOR activity was notably lower in cells incubated in the Cu-L medium than in those grown under Cu-S conditions (Figure 3.8B). A significant induction of NOR activity was also observed under Cu-H conditions compared to that from Cu-S grown cells (Figure 3.8B). A *norC* mutant, which lacked NOR activity, cultured in the Cu-S medium was used as negative control in the experiments (Figure 3.8B).



**Figure 3.8.** Nitric oxide reductase protein levels and activity. **(A)** Heme-stained proteins (30 µg) of membranes prepared from *B. diazoefficiens* 110spc4. CycM and NorC cytochromes identified previously are specified in the right margin. Apparent masses of the proteins (kDa) are shown at the left margin. **(B)** NOR activity of *B. diazoefficiens* 110spc4 (WT). The *norC::aphII-PSP* (*norC*<sup>-</sup>) mutant strain cultured in Cu-S medium was used as negative control in the experiments. Data represent means with standard error bars from at least two independent cultures assayed in triplicate. Cells were grown microaerobically in Cu-L (light blue bar), Cu-S (blue bar) or Cu-H (dark blue bar) BVMN medium for 3 days.



Finally, we analysed NosZ expression in periplasmic and cytosolic fractions by western blot using an antibody against purified *P. denitrificans* NosZ (Felgate *et al.*, 2012). As shown in Figure 3.9A, two bands were observed in periplasm (left) and cytosol (right) of WT cells grown microaerobically in the Cu-S medium. The 67 kDa band corresponds to NosZ and the 50 kDa band corresponds to the C-terminal truncated NosZ protein, as previously reported for NosZ from *B. diazoefficiens* (Jiménez-Leiva *et al.*, 2019) and from *P. denitrificans* (Felgate *et al.*, 2012). As expected, the 67 kDa band was absent in the *nosZ* mutant which confirmed that such a band corresponds to NosZ. However, a band of about 50 kDa was present in the cytosol and periplasm of the *nosZ* insertion mutant, where the C-terminal domain was deleted, producing a shorter polypeptide. NosZ was very faintly expressed under oxic Cu-S conditions, as well as under microoxic Cu-L conditions, in both cellular fractions (Figure 3.9A). However, NosZ was detected in cells grown under Cu-S and Cu-H conditions, and its concentration increased in the periplasmic (about 2.2-fold) and cytosolic (about 2.3-fold) fractions from cells incubated in the Cu-H medium compared to those grown in the Cu-S medium. Interestingly, the 67 kDa band observed in the periplasm of Cu-H grown cells was 1.9-fold more intense than that of 50 kDa (Figure 3.9A). In contrast, in the periplasm of Cu-S grown cells, the level of the mature NosZ of 67 kDa was 1.6-fold lower than that of the truncated protein (50 kDa). These results suggest a clear effect of Cu on the maturation of the protein in the periplasm. Full scans of the entire gels from a representative experiment are shown in Figure S3.2B,C,E,F. Next, N<sub>2</sub>OR activity was measured in cells grown under microoxic Cu-L, Cu-S and Cu-H conditions. The *nosZ* mutant cultured in Cu-S medium was also included as negative control in the experiments. As shown in Figure 3.9B, N<sub>2</sub>OR activity in the Cu-L medium was diminished to levels similar to those of the *nosZ* mutant. A strong induction of N<sub>2</sub>OR activity was observed in cells grown under Cu-S conditions compared to that from cells under Cu-L conditions. When cells were incubated in the Cu-H medium, an increase in N<sub>2</sub>OR activity of 1.6-fold was observed compared with that from Cu-S grown cells (Figure 3.9B). Figure 3.9C shows N<sub>2</sub>O accumulation in the headspace of the medium through 7 days of incubation. Under Cu-L conditions, N<sub>2</sub>O was accumulated from the third day of incubation, increasing its concentration from  $16.61 \pm 7.36 \mu\text{M}$  (day 3) to  $118.12 \pm 51.65 \mu\text{M}$  (day 7). However, N<sub>2</sub>O was not detected in the headspace of Cu-S or Cu-H cultures throughout the entire incubation period (Figure 3.9C).

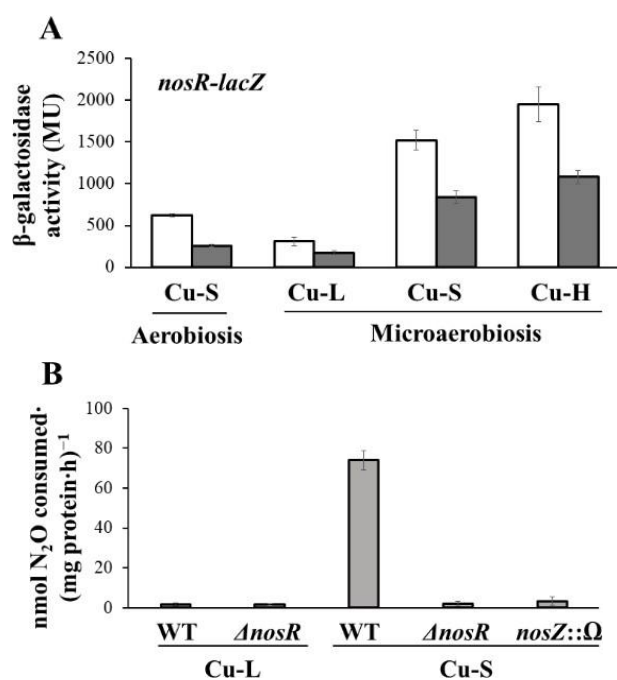


**Figure 3.9.** Nitrous oxide reductase protein levels and activity. **(A)** Western-blotting SDS-PAGE gels of periplasmic (left, 21  $\mu$ g) and cytosolic (right, 14  $\mu$ g) proteins probed with anti-NosZ antibodies from *P. denitrificans*. Apparent masses of NosZ (67 kDa) and truncated NosZ (50 kDa) are shown at the left margin. Periplasmic and cytosolic fractions were isolated from 3-day incubation cultures. **(B)**  $\text{N}_2\text{O}$  consumption capacity of cells grown for 3 days under Cu-L (light blue bar), Cu-S (blue bar) and Cu-H (dark blue bar) conditions. Data represent means with standard error bars from at least two independent cultures assayed in triplicate. Soluble proteins **(A)** and cells **(B)** from a *nosZ::Ω* mutant cultured microaerobically in Cu-S medium were used as negative control in these experiments. In **(B)**, a *post-hoc* Tukey HSD test at  $p \leq 0.05$  was applied; same lower-case letters indicate that values are not statistically different. **(C)**  $\text{N}_2\text{O}$  accumulation in the headspace of Cu-L (○), Cu-S (◼) and Cu-H (◻) growth medium. Data are means with standard error bars from at least two independent cultures assayed in triplicate, and where not visible, these were smaller than the symbols. Cells were grown aerobically or microaerobically in BVMN medium with different Cu concentrations.

### **3.6. Investigating the possible role of NosR in *nos* gene expression and Nos activity**

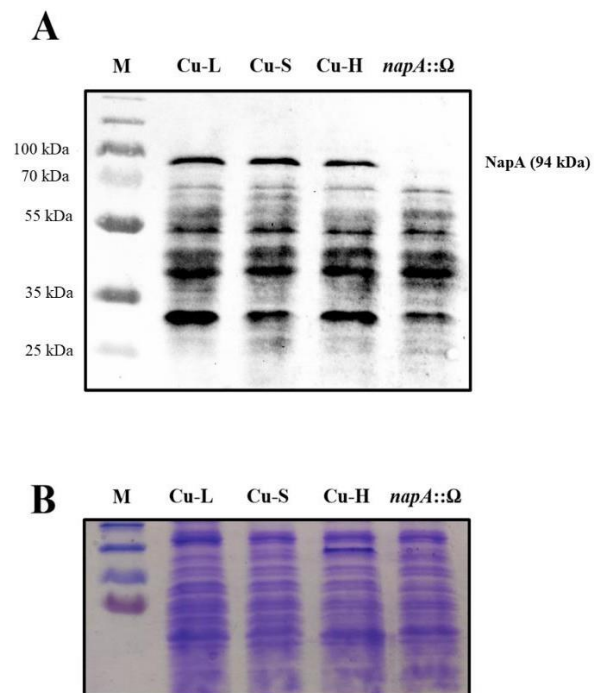
In order to investigate the role of NosR in the expression of the *nos* operon, *B. diazoefficiens* WT and a *nosR* deletion mutant, both containing a fusion between *lacZ* gene and the promoter of the first gene of the *nos* operon, *i.e.*, a *nosR-lacZ* fusion, were grown under microoxic conditions in Cu-L, Cu-S or Cu-H BVMN for 3 days. Expression values obtained under Cu-S aerobic growth were also included as control. As shown in Figure 3.10A,  $\beta$ -galactosidase activity of the *nosR-lacZ* fusion was slightly lower in the *nosR* mutant compared with the WT when cells were grown either under oxic (2.4-fold) or under microoxic conditions independently of the Cu concentration present in the medium (1.8-fold in Cu-L, Cu-S or Cu-H conditions). These results indicate that the lower expression of *nosR-lacZ* in the *nosR* mutant is independent of the growth conditions and could be due to an intrinsic defect of *nos* expression in this mutant. We then investigated  $\text{N}_2\text{OR}$  activity in the *nosR* mutant compared to the WT, both cultivated microaerobically in Cu-L or Cu-S BVMN media. A *nosZ* mutant strain cultured in the Cu-S medium was

employed as negative control in these experiments. As observed in Figure 3.10B, N<sub>2</sub>OR activity was very weak in both the WT and the *nosR* mutant when cells were incubated in the Cu-L medium. A significant induction of N<sub>2</sub>OR was observed in the WT grown under Cu-S conditions. However, under these conditions, N<sub>2</sub>OR activity was drastically diminished in the *nosR* mutant compared with the WT ( $2.03 \pm 1.10$  versus  $74.10 \pm 4.89$  nmol N<sub>2</sub>O consumed·(mg protein·h)<sup>-1</sup>, respectively). These results indicate that NosR is essential for the optimal function of Nos.

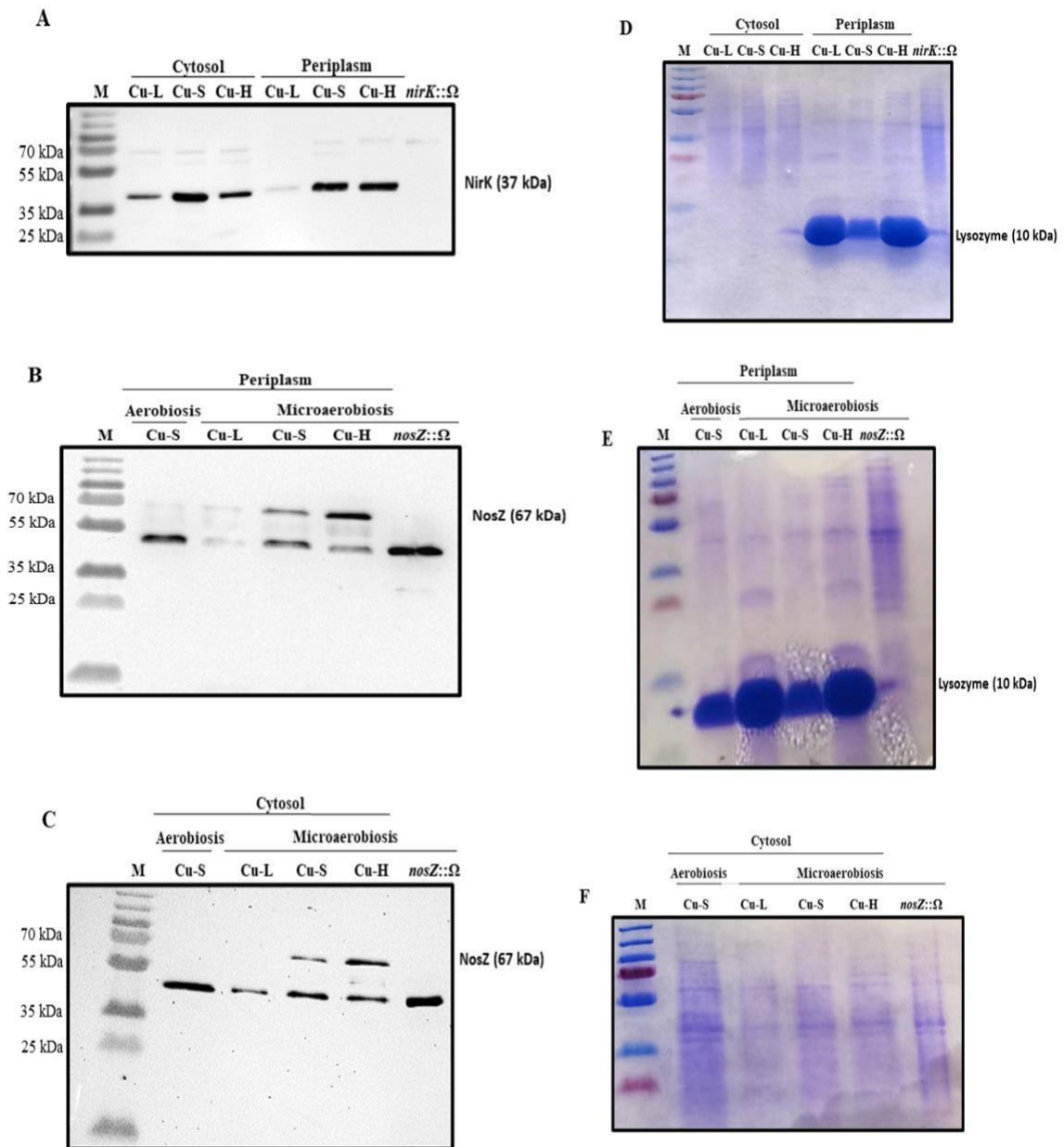


**Figure 3.10.** (A) β-galactosidase activity from the *nosR-lacZ* transcriptional fusion chromosomally integrated in *B. diazoefficiens* 110*spc4* (white bars) and *nosR* mutant (dark grey bars) backgrounds grown aerobically in Cu-S or microaerobically in Cu-L, Cu-S and Cu-H BVMN media for 3 days. Data expressed as Miller Units (MU) are means with standard error bars from at least three independent cultures assayed in triplicate. (B) N<sub>2</sub>OR activity of *B. diazoefficiens* 110*spc4* (WT) and the *nosR* mutant (*ΔnosR*) strains incubated in Cu-L and Cu-S BVMN media under microoxic conditions. The *nosZ::Ω* mutant strain cultured in the Cu-S medium was used as negative control in these experiments. N<sub>2</sub>O was measured in the headspace of the cultures after 3 days of incubation. Data represent means with standard error bars from at least two independent cultures assayed in triplicate.

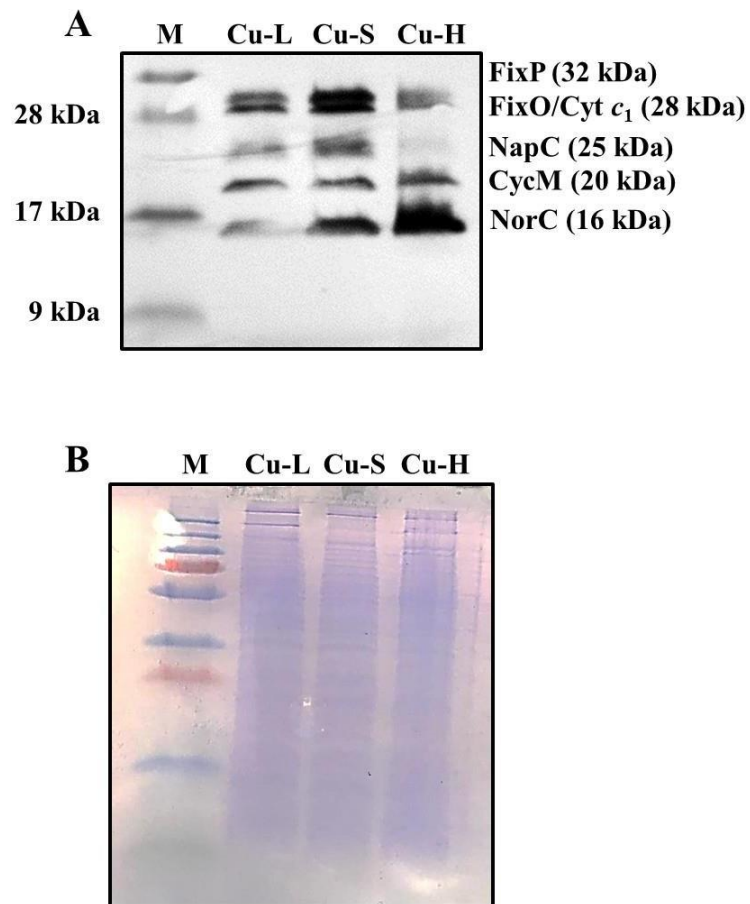
## Chapter 3: supplementary material



**Figure S3.1.** (A) Full scans of the entire gel of the western blot experiments shown in Figure 3.5A. Apparent masses of the marker proteins (kDa) are shown at the left margin. (B) Coomassie® blue-stained SDS-PAGE gel made to visualize protein levels loaded in each lane for NapA western blot experiments. M, protein marker ladder.



**Figure S3.2.** (A,B,C) Full scans of the entire gels of the western blot experiments shown in Figure 3.6A (A) and 3.9A (B,C). Apparent masses of the marker proteins (kDa) are shown at the left margin. (D,E,F) Coomassie® blue-stained SDS-PAGE gels made to visualize protein levels loaded in each lane for NirK (D) and periplasmic (E) or cytosolic (F) NosZ western blot experiments. M, protein marker ladder.



**Figure S3.3.** (A) Full scan of the entire gel of the heme-staining experiment shown in Figure 3.8A. Heme-stained *c*-type cytochromes are specified at the right margin. Apparent masses of the marker proteins (kDa) are shown at the left margin. (B) Coomassie® blue-stained SDS-PAGE gel made to visualize protein levels loaded in each lane for these experiments. M, protein marker ladder.



## *Chapter 3.1*

### *Role of the Cu response regulator CsoR in denitrification*





### 3.1.1. Abstract

To investigate the possible involvement of the repressor in response to Cu called CsoR in the regulation of denitrification in *B. diazoefficiens*, a mutant strain was constructed by deletion of the *csor* gene. This strain was denoted as  $\Delta csor$ , and was used in growth experiments and gene expression analyses performed by qRT-PCR and  $\beta$ -galactosidase activity of transcriptional fusions of the denitrification genes to the reporter gene *lacZ*. The results obtained suggest that CsoR is not involved in bacterial growth, but may play a possible role in the Cu-mediated control of *nirK*, *nor* and *nos* expression.

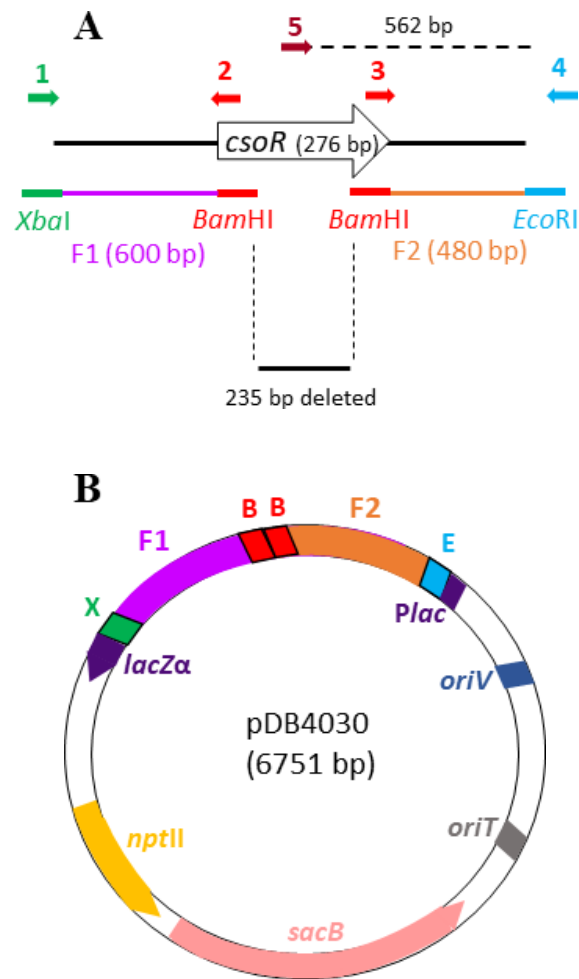
### 3.1.2. Construction of a *csor* deletion mutant strain

As mentioned previously, a search of the *B. diazoefficiens* genome in KEGG database revealed the presence of a putative gene encoding a Cu-responsive repressor from the CsoR family whose annotation is bsr0701 (*csor* gene).

To investigate the possible involvement of the predicted CsoR protein in the regulation of *nirK*, *nor* and *nos* genes expression under Cu limitation, a deletion mutant strain in bsr0701 was constructed first. The primers used throughout the entire process are listed in Table 3 from Material and Methods.

A deletion in this gene of 235 nucleotides was carried out by amplifying two fragments (Figure 3.1.1A):

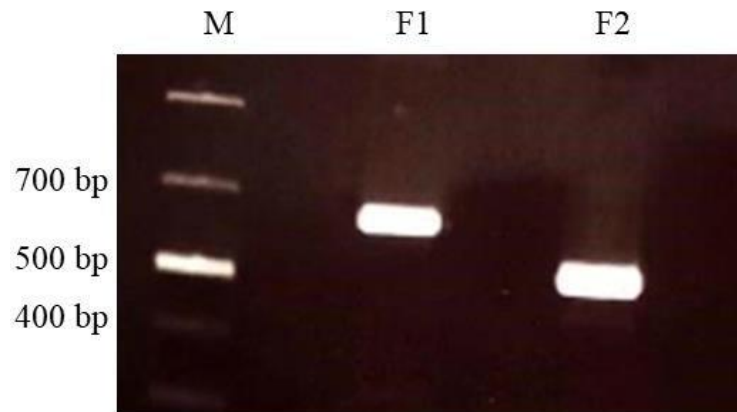
- A fragment corresponding to the upstream region (5') of the *csor* gene and the initial portion of this gene. This fragment contained 600 nucleotides and was denoted as F1. Both *csor*\_Up\_For\_ *Xba*I and *csor*\_Up\_Rev\_ *Bam*HI were the primers used.
- A fragment corresponding to the downstream region (3') of the *csor* gene and the end portion of this gene. This fragment contained 480 nucleotides and was denoted as F2. Both *csor*\_Down\_For\_ *Bam*HI and *csor*\_Down\_Rev\_ *Eco*RI were the primers used.



**Figure 3.1.1.** (A) Deletion of the *csOR* gene. Two fragments were amplified by PCR: F1 (600 bp) and F2 (480 bp). F1 contained the upstream region (5') of the *csOR* gene and the initial portion of this gene. F2 corresponded to the downstream region (3') of the *csOR* gene and the end portion of this gene. For F1 amplification, primers 1 and 2 were used. For F2 amplification, primers 3 and 4 were utilised. Each primer contained a specific enzyme restriction site, thus F1 was flanked by *XbaI* and *BamHI* restriction sites, whereas F2 was flanked by *BamHI* and *EcoRI* restriction sites. The internal primer 5 was used to check the lack of the 235 bp deleted from the 276 total bp of the *csOR* gene; this primer amplified a fragment of about 562 bp, including the downstream region outside the gene also amplified in F2. The primers used are denoted with numbers: 1, *csOR*\_Up\_For\_ *XbaI*; 2, *csOR*\_Up\_Rev\_ *BamHI*; 3, *csOR*\_Down\_For\_ *BamHI*; 4, *csOR*\_Down\_Rev\_ *EcoRI*; 5, internal primer, *csOR*\_IN\_For. (B) Schematic representation of the pDB4030 plasmid (6751 bp), derived from pK18*mobsacB* (5660 bp). The construct [F1+F2] was inserted using the multiple cloning site (MCS), located into the *lacZα* gene, and was placed between the *lac* promoter (*Plac*) and the rest of the *lacZα* gene, with *XbaI* and *EcoRI* sites from the MCS flanking the entire construct; *nptII*, neomycin phosphotransferase gene (*i. e.*, kanamycin resistance gene); *sacB*, levansucrase gene (*i. e.*, sucrose sensitivity gene); X, *XbaI* restriction site; B, *BamHI* restriction site; E, *EcoRI* restriction site; bp, base pairs.

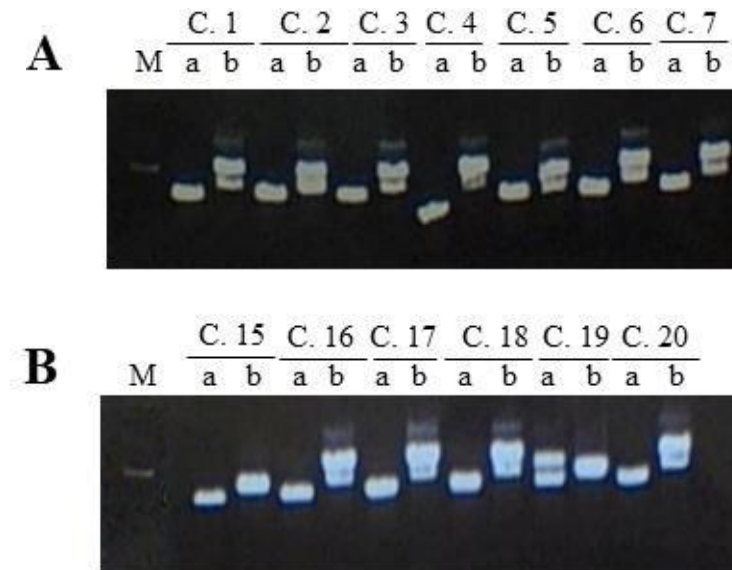
F1 and F2 were amplified by PCR using Phusion® polymerase (Figure 3.1.2). The fragments obtained were purified and then both F1 and F2 were cloned into pK18*mobsacB*. After that, competent *E. coli* DH5α cells were transformed with the resulting plasmid. The colonies containing the construction were white and Km resistant. They were selected by a blue/white assay adding IPTG and X-Gal to the solid growth

medium. Once the clone was chosen, the plasmid was isolated and sent for sequencing. F1 and F2 insertion in the cloning vector was also checked by PCR using the pair of primers pSRKC1\_F/pK18\_4, producing a fragment of 1308 bp.



**Figure 3.1.2.** Agarose gel electrophoresis of F1 and F2 fragments amplified by PCR with Phusion® polymerase. M, DNA marker; bp, base pairs.

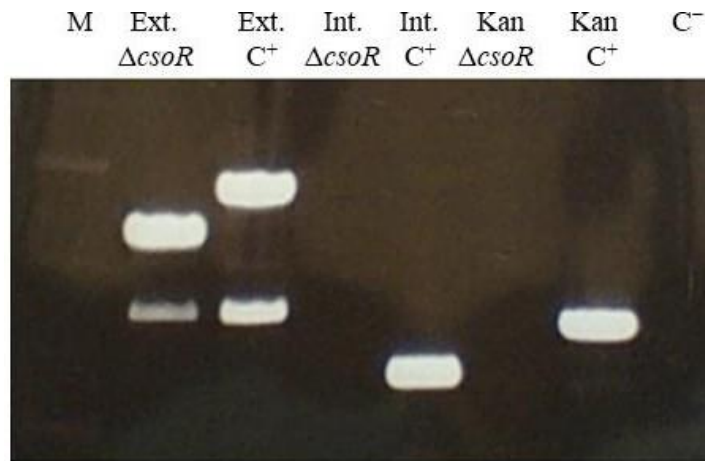
After checking the construction was correct, the new plasmid was called pDB4030 (Figure 3.1.1B). Next, a conjugative transfer was performed between *E. coli* S17.1 containing pDB4030 and *B. diazoefficiens* 110spc4. The construction was inserted in the *B. diazoefficiens* 110spc4 chromosome by a double recombination event. As shown in Figure 3.1.3, the first step was to obtain simple recombinants, which were checked by PCR using the primer pairs *csor*\_Up\_For\_XbaI/pSRKC1\_F (denoted as “a”) and *csor*\_Down\_Rev\_EcoRI/pK18\_4 (denoted as “b”). In the 5’ recombinants, two bands were always amplified when the primer pair “b” was used due to the additional amplification of the plasmid contamination from the conjugation mix, since the primer pK18\_4 is internal to the construction. In the 3’ recombinants, these two amplification bands were observed when the primer pair “a” was used, but not with the pair of primers “b”. Moreover, the primer pair Kan5/Kan6 was utilised in order to identify the simple recombinants obtained. A band of 705 bp should be shown by these candidates after PCR amplification. Two clones were selected for the following step: a 5’ recombinant (clone 1) and a 3’ recombinant (clone 19) (Figure 3.1.3).



**Figure 3.1.3.** Checking of 5' and 3' simple recombinants. **(A)** Agarose gel electrophoresis of candidates from 1 to 7. **(B)** Agarose gel electrophoresis of candidates from 15 to 20. Letters “a” and “b” mean the primer pair used: the primer pair “a” is formed by the primers *csor*\_Up\_For\_*Xba*I and pSRKC1\_F; the primer pair “b” is formed by the primers *csor*\_Down\_Rev\_*Eco*RI and pK18\_4 (which is internal to the construction). In **(A)**, all the candidates shown are 5' recombinants, displaying a double band with the primer pair “b”. In **(B)**, the candidate 19 is the only 3' recombinant, displaying this double band with the primer pair “a”; the rest are 5' recombinants. M, DNA marker; C., candidate.

In the next step, the double recombination was induced by sowing the two candidates in PSY plates supplemented with 10% sucrose. The candidates obtained were Km sensitive and checked by PCR using the external primer pair *csor*\_Up\_For\_*Xba*I/*csor*\_Down\_Rev\_*Eco*RI and the internal primer pair *csor*\_IN\_For/*csor*\_Down\_Rev\_*Eco*RI. The clone used in the following experiments was *Bd4030\_19\_11*, which was finally checked by PCR using the following primers (Figure 3.1.4):

- ✓ External: *csor*\_Up\_For\_*Xba*I/*csor*\_Down\_Rev\_*Eco*RI; a band of 1068 bp (corresponding to the construct [F1+F2]) should be shown in the  $\Delta$ *csor* strain, while a band of 1297 bp should appear in the WT strain.
- ✓ Internal: *csor*\_IN\_For/*csor*\_Down\_Rev\_*Eco*RI; no band should be observed in the  $\Delta$ *csor* strain, whereas a band of 562 bp should be displayed in the WT strain.
- ✓ Km resistance gene: Kan5/Kan6; no band should be observed in the double recombinant  $\Delta$ *csor* strain; however, in the positive control (a simple recombinant isolated in the previous cloning steps and checked by PCR), a band of 705 bp should be obtained.

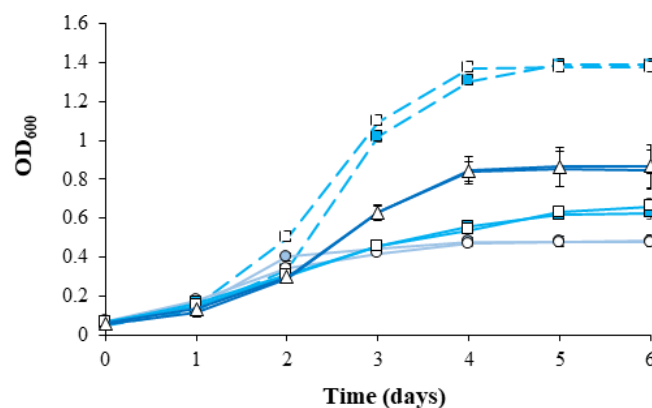


**Figure 3.1.4.** Checking of the clone 19 ( $\Delta csoR$  strain), 3' recombinant, by using both the primer pairs external ("Ext.") and internal ("Int.") to the construction, and the primer pair of the Km resistance gene ("Kan"), and by comparing with the positive control. M, DNA marker;  $C^+$ , positive control;  $C^-$ , negative control with ultrapure water. The positive control was the WT strain for the external and internal primers, and a simple recombinant of  $\Delta csoR$  for the primers amplifying the Km resistance gene.

### 3.1.3. Growth of the *csoR* deletion mutant strain

Growth of the *csoR* mutant strain *Bd4030\_19\_11* and the WT strain was monitored during incubation for 6 days under microoxic (2%  $O_2$ ) conditions in Cu-L, Cu-S or Cu-H BVMN. Aerobic growth of each strain was used as control of the experiment; in that case, cells were grown only in Cu-S BVMN.

As shown in Figure 3.1.5, differences in growth were not observed in the *csoR* mutant strain compared to the WT. Microaerobic growth was affected by Cu limitation either in the WT (as shown in Figure 3.1) or *csoR* mutant. However, the *csoR* gene deletion did not affect the growth capacity. Therefore, this result indicated that the deletion of *csoR* did not cause any apparent distinct phenotype in growth.



**Figure 3.1.5.** Growth of *B. diazoefficiens* 110spc4 (color symbols) and the  $\Delta csoR$  strain (open symbols) under Cu limitation (Cu-L) (○), standard Cu (Cu-S) (□), or high Cu (Cu-H) (△) BVMN media under oxic (dash line) or microoxic conditions (solid line). Data are means with standard error bars from at least two independent cultures assayed in triplicate, and where not visible, these were smaller than the symbols.

### 3.1.4. Expression of denitrification genes in the *csoR* mutant strain

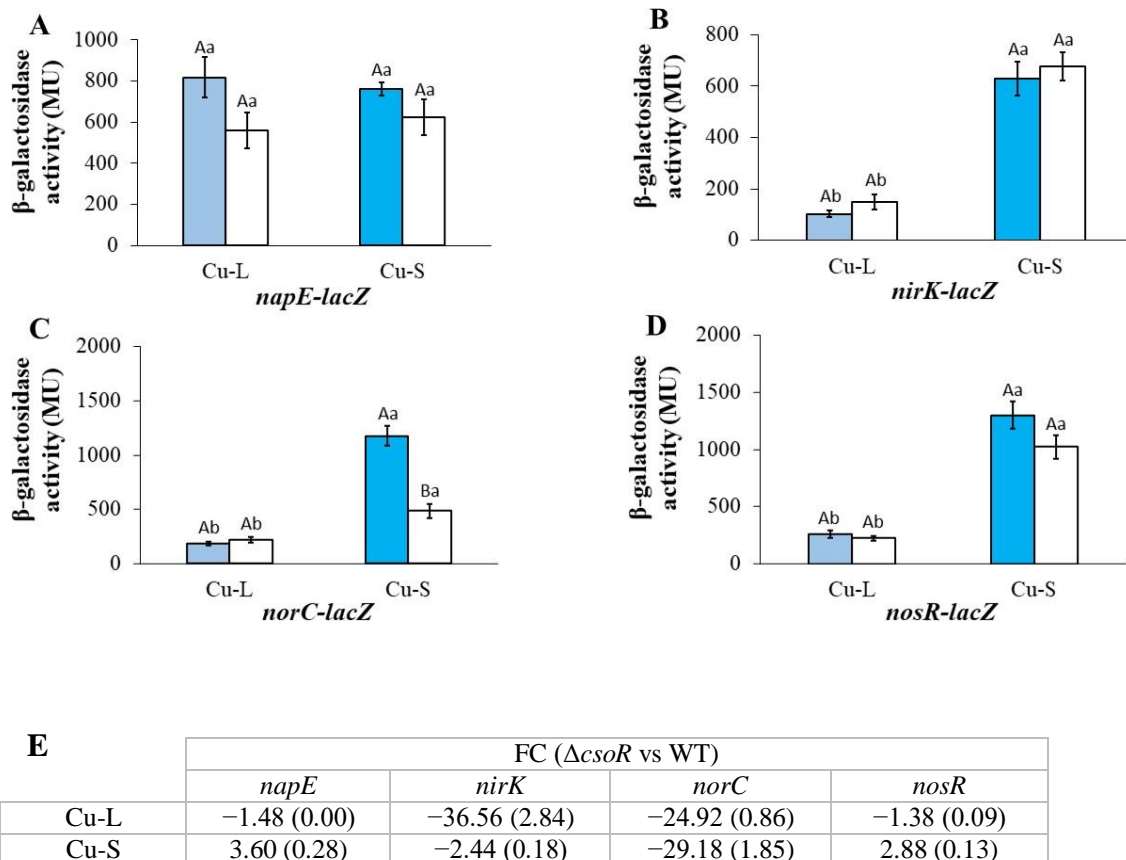
Given the low expression levels obtained in Cu-L for *nirK*, *nor* and *nos* genes (Figure 3.3B,C,D,E) compared to Cu-S, we were interested in elucidating whether the Cu-responsive repressor CsoR could be involved in the down-regulation of those genes in response to Cu limitation. To achieve this goal, expression of the denitrification genes in the *csoR* deletion mutant strain was determined by two different experimental approaches:  $\beta$ -galactosidase activity assays firstly and qRT-PCR secondly (Figure 3.1.6).

For  $\beta$ -galactosidase activity assays,  $\Delta$ *csoR* strains containing the *napE-lacZ*, *nirK-lacZ*, *norC-lacZ* and *nosR-lacZ* transcriptional fusions were constructed (Table 1 from Material and Methods). For these experiments, cells were grown microaerobically in Cu-L or Cu-S BVMN media, and  $\beta$ -galactosidase activity was measured for each fusion after the third day of incubation. The results obtained by this technique were confirmed by qRT-PCR. Primers used in the qRT-PCR assays are listed in Table 3 from Material and Methods. For these experiments, cells were grown under microaerobic conditions in Cu-L or Cu-S BVMN.

Concerning the *napE-lacZ* fusion, both WT and  $\Delta$ *csoR* showed similar  $\beta$ -galactosidase activity values independently of the Cu condition assayed ( $p > 0.05$  between strains either in Cu-L or Cu-S) (Figure 3.1.6A). In order to confirm these results, *napE* expression changes between strains were measured by qRT-PCR in Cu-L and Cu-S (Figure 3.1.6E). The FC obtained indicated that *napE* expression changes between strains were not significant independently of the Cu condition assayed. This result was coherent with those obtained by  $\beta$ -galactosidase activity, indicating that *nap* genes expression was not apparently affected by *csoR* deletion. Therefore, CsoR may be not involved in *nap* genes expression in response to Cu.

Regarding *nirK-lacZ* fusion, expression levels were notably reduced in Cu-L compared with Cu-S in both WT and  $\Delta$ *csoR* (Figure 3.1.6B). In Cu-L, significant differences in *nirK-lacZ* expression were not observed between strains ( $p > 0.05$ ) (Figure 3.1.6B). Nevertheless, qRT-PCR expression levels were approximately 37-fold lower in  $\Delta$ *csoR* compared to WT under Cu limitation (Figure 3.1.6E). Therefore, a discrepancy between the expression results obtained by  $\beta$ -galactosidase activity and qRT-PCR was found in Cu-L for *nirK*. Thus,  $\beta$ -galactosidase activity approach appears not to be a sufficiently exhaustive or precise method to detect the differences in expression reported

between strains by qRT-PCR under Cu-L. In other words, it might be difficult to measure even lower  $\beta$ -galactosidase activity levels in  $\Delta csoR$  due to the poor *nirK* expression levels calculated for WT (see Figure 3.3B). Under Cu-S medium, *nirK-lacZ* expression between strains was not significantly different ( $p > 0.05$ ) (Figure 3.1.6B), and this result was confirmed by qRT-PCR, since *nirK* expression analyses did not show a relevant expression change in Cu-S between strains (Figure 3.1.6E). Collectively, these results suggested that, since *csoR* deletion triggered a significant lower *nirK* expression compared to WT levels, CsoR may be involved in *nirK* down-regulation, but not as a repressor under Cu limitation. These data suggest an indirect effect of CsoR on *nirK* expression in response to Cu-limitation.



**Figure 3.1.6.** Transcriptional expression of denitrification genes monitored as  $\beta$ -galactosidase activity from *napE-lacZ* (A), *nirK-lacZ* (B), *norC-lacZ* (C) and *nosR-lacZ* (D) fusions chromosomally integrated in *B. diazoefficiens* 110*spc4* (color bars) and the  $\Delta csoR$  strain (white bars) grown microaerobically in Cu-L or Cu-S BVMN media for 3 days. Data expressed as MU are means with standard error bars from at least three independent cultures assayed in triplicate. In (A–D), same lower- or upper-case letters in each figure indicate that values are not statistically different according to a *post-hoc* Tukey HSD test at  $p \leq 0.05$ ; lower-case letters indicate comparisons between Cu conditions, while upper-case letters mean comparisons between strains. (E) Relative expression changes in Cu-L or Cu-S BVMN media of *napE*, *nirK*, *norC* and *nosR* genes measured by qRT-PCR in the *B. diazoefficiens*  $\Delta csoR$  mutant strain compared to WT 110*spc4*. Data expressed as Fold Change (FC) are means with standard error in parentheses from at least three independent cultures assayed in triplicate.



When we analysed the *norC-lacZ* fusion, no significant differences in expression levels between strains under Cu-L medium ( $p > 0.05$ ) were observed (Figure 3.1.6C). However, by qRT-PCR, *norC* expression levels were approximately 25-fold lower in Cu-L medium in  $\Delta csoR$  compared to WT (Figure 3.1.6E). A possible explanation for this discrepancy could be that *norC-lacZ* expression levels obtained in WT diminished substantially in Cu-L conditions and, subsequently, may be not sufficient to detect differences in expression with  $\Delta csoR$  by  $\beta$ -galactosidase activity. In Cu-S, we observed lower levels of *norC-lacZ* expression in the *csoR* mutant compared to those observed in the WT strain were observed ( $p < 0.05$ ). Similarly, *norC* expression levels obtained by qRT-PCR (Figure 3.1.6C,E) were approximately 29-fold lower in  $\Delta csoR$  compared to the WT. Taken together, all these results suggested that CsoR rather to function as a repressor of *norC* expression, it might be involved in the regulation of *norC* expression by an indirect mechanism under Cu limitation. Additionally, the significant decrease in *norC* expression observed in Cu-S in  $\Delta csoR$  comparing to WT indicated that CsoR might be relevant to induce maximal *norC* expression levels in response to standard levels of Cu (0.02  $\mu$ M) in the growth medium.

Regarding *nosR-lacZ* fusion, we did not observe significant differences in expression levels between strains under Cu-L ( $p > 0,05$ ) or Cu-S ( $p > 0.05$ ) medium (Figure 3.1.6D). These results were corroborated by qRT-PCR, since the relative expression changes found between  $\Delta csoR$  and WT were not relevant independently of the Cu condition assayed (Figure 3.1.6E). These results collectively suggested that CsoR is not involved in the regulation of *nos* genes expression in response to Cu.

In conclusion, the data obtained by both  $\beta$ -galactosidase activity and qRT-PCR assays suggest globally that CsoR may exert an indirect control on *nirK* and *norC* expression under Cu limitation. Moreover, CsoR appears to be necessary to induce maximal *nor* genes expression in the presence of low Cu levels (0.02  $\mu$ M).

# DISCUSIÓN



## El cobre modula las emisiones de óxido nitroso procedentes de nódulos de soja

El Cu es considerado un micronutriente esencial para el correcto crecimiento y desarrollo vegetal debido a su implicación en una gran variedad de procesos bioquímicos y fisiológicos tales como la fotosíntesis, las cadenas transportadoras de electrones de la respiración, la síntesis de ATP, la protección frente a estrés oxidativo o la percepción de las células vegetales, entre otros (Nagajyoti *et al.*, 2010). Sin embargo, el exceso de Cu en los suelos agrícolas puede provocar efectos negativos sobre la fisiología de las plantas reduciendo las actividades enzimáticas de las células, generando un desequilibrio en las concentraciones de iones y metales esenciales, afectando a los procesos de transporte celular e induciendo la oxidación de la membrana lipídica (Fernandes y Henriques, 1991; Saglam *et al.*, 2016; Yruela, 2009). En este sentido, los resultados obtenidos en este capítulo de la Tesis han demostrado el efecto negativo del Cu sobre la fisiología de la simbiosis *B. diazoefficiens*-soja dado que las plantas que crecieron en concentraciones de Cu  $> 20 \mu\text{M Cu}^{2+}$  se vieron negativamente afectadas, ya que experimentaron un descenso en todos los parámetros de desarrollo vegetal analizados. De forma similar, Sánchez-Pardo y Zornoza (2014) observaron una reducción estadísticamente significativa en el crecimiento de la parte aérea y las raíces de lupino blanco y plantas de soja que crecieron en presencia de 48, 96 y 192  $\mu\text{M Cu}^{2+}$ . Además, en otro trabajo se observó que el crecimiento vegetal en exceso de Cu se veía afectado por cambios en la estructura de la raíz, produciendo una inhibición del crecimiento de las raíces primarias, y un incremento en la densidad de raíces laterales (Nikolaevna *et al.*, 2016), lo que confirma los resultados obtenidos en este trabajo.

El estrés por Cu parece ser un factor negativo para la simbiosis rizobio-leguminosa y la SNF al reducir la actividad nitrogenasa y la viabilidad de los nódulos (Fernandes y Henriques, 1991). Los resultados obtenidos en esta tesis han demostrado que el estrés por Cu ( $\geq 20 \mu\text{M}$ ) también afectó a la simbiosis *B. diazoefficiens*-soja, puesto que descendieron los parámetros NN y NDW, así como el crecimiento del nódulo y su funcionamiento (determinado mediante el contenido de Lb, parámetro que se correlaciona directamente con la capacidad fijadora de nitrógeno de los nódulos). Seliga (1998) obtuvo resultados similares para la simbiosis con judía, lupino amarillo y soja. De hecho, Sánchez-Pardo y colaboradores (2012) encontraron una reducción del 50% en NN, NDW y en el TN derivado de la SNF en plantas de soja que crecieron con 192  $\mu\text{M Cu}^{2+}$ , y también

observaron anomalías en la estructura del nódulo, las cuales resultaron ser producto de la acumulación de Cu.

En nuestros estudios, las plantas de soja crecieron con 4 mM KNO<sub>3</sub> y se sometieron a encharcamiento durante 7 días antes de la cosecha, condiciones que habían sido consideradas en trabajos previos como las necesarias para inducir la desnitrificación y las emisiones de N<sub>2</sub>O en nódulos de soja (Tortosa *et al.*, 2015; Salas *et al.*, 2020). Por ello, para confirmar el efecto negativo causado por la adición de Cu ( $\geq 20 \mu\text{M}$ ) sobre la fijación de N<sub>2</sub>, se calculó la proporción de N derivado de la SNF en la parte aérea de plantas de soja que crecieron en presencia de K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> aplicando el método de la dilución del isótopo <sup>15</sup>N. Los resultados obtenidos confirmaron el efecto negativo del Cu (20  $\mu\text{M}$  Cu<sup>2+</sup>) en la SNF en comparación con las plantas que no habían sido tratadas con Cu.

De acuerdo a Nikolaevna y colaboradores (2016), la concentración natural de Cu en los tejidos vegetales debe situarse entre 5 y 20 mg·kg<sup>-1</sup> (peso seco), dependiendo de la especie vegetal, la etapa de desarrollo, el contenido en Cu del suelo y otras propiedades del suelo (*e.g.*, pH). Una concentración de Cu superior a 20 mg·kg<sup>-1</sup> resulta ser tóxica para el crecimiento vegetal y el desarrollo (Droppa *et al.*, 1987; Fernandes y Henriques, 1991; Yruela, 2009; Nikolaevna *et al.*, 2016; Saglam *et al.*, 2016). Nuestros resultados muestran que los tratamientos con una concentración de 20  $\mu\text{M}$  Cu<sup>2+</sup> o superior añadida durante el crecimiento vegetal producía una acumulación de Cu en parte aérea por encima de 20 mg·kg<sup>-1</sup>. Estos datos confirmaron que el tratamiento con 20  $\mu\text{M}$  Cu<sup>2+</sup> representaba la máxima concentración de Cu que las plantas de soja podían tolerar sin sufrir estrés. A día de hoy, no existe consenso acerca de cuál debe ser el nivel de Cu que un suelo debe contener para ser clasificado como suelo contaminado, pero algunos autores sugieren que debe encontrarse en torno a 100 mg·kg<sup>-1</sup>, dependiendo de las características del suelo, tales como el pH (Bernal *et al.*, 2007; Kabata-Pendias, 2011). Desafortunadamente, el nivel de Cu en los suelos actualmente está aumentando como consecuencia de actividades humanas, entre ellas, la agricultura (Ballabio *et al.*, 2018). A modo de ejemplo. Las concentraciones más elevadas de Cu en suelos europeos se encuentran en los viñedos (49,3 mg·kg<sup>-1</sup>), olivos (33,5 mg·kg<sup>-1</sup>) y frutales (27,3 mg·kg<sup>-1</sup>), y éstas derivan principalmente del uso reiterado de fungicidas provistos de Cu y de la adición de materia orgánica (*e.g.*, residuos fecales de pjaras de cerdos) (Ballabio *et al.*, 2018; Panagos *et al.*, 2018). Las plantas asimilan Cu principalmente a través de las raíces, donde puede unirse a grupos amino y carboxilo. Dichas interacciones pueden reducir su transporte desde las raíces a

la parte aérea (Nikolaevna *et al.*, 2016). Este comportamiento se ha confirmado en esta tesis, ya que se observó una baja translocación del Cu de las raíces al tallo, resultando en una acumulación de Cu de 20-30 veces superior en raíces y 10 veces superior en nódulos respecto a la concentración obtenida en la parte aérea.

Como se ha mencionado anteriormente, la biodisponibilidad de Cu puede influir en una gran diversidad de procesos biológicos, como la fotosíntesis, la respiración mitocondrial y el crecimiento vegetal (Yruela, 2009). Adicionalmente, el Cu también puede afectar a las emisiones de N<sub>2</sub>O procedentes de los suelos agrícolas y derivadas de la desnitrificación y la nitrificación microbianas (Richardson *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2018). En este contexto, Shen y colaboradores (2020) observaron que diferentes concentraciones de Cu (0, 0,0013, 0,13, 1,3, 13 y 130 mM CuSO<sub>4</sub>) aplicadas a suelos Andosol (generalmente negros y compuestos por material de origen volcánico) y Fluvisol (generalmente suelos desarrollados sobre depósitos aluviales) mostraban una reducción moderada en las emisiones de N<sub>2</sub>O, analizadas en condiciones tanto de microcosmo como de campo. De acuerdo a nuestros resultados, la concentración de Cu añadida a la solución nutritiva se relacionó directamente con el descenso en las emisiones de N<sub>2</sub>O producidas por raíces noduladas y nódulos aislados. Por consiguiente, además del NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y el encharcamiento de las raíces (Tortosa *et al.*, 2015), el Cu representa otro factor importante a tener en cuenta en el control de la emisión de N<sub>2</sub>O en la simbiosis *B. diazoefficiens*-soja.

En esta tesis, se ha demostrado que la adición de Cu provoca una acumulación significativa de Cu en nódulos, la cual se ajustaba a una correlación lineal con la bajada en las emisiones de N<sub>2</sub>O por nódulos de soja. Es posible que la acumulación de este metal repercuta directamente en la actividad de las enzimas implicadas en la desnitrificación del endosimbionte. En apoyo a esta hipótesis, recientemente se ha demostrado que el Cu inhibe significativamente la desnitrificación en suelos y las emisiones de N<sub>2</sub>O derivadas de dicho proceso (Li *et al.*, 2018). Como se ha mencionado previamente, tanto Nos como NirK son enzimas dependientes de Cu. Sin embargo, en esta tesis se demostró que su respuesta a Cu era diferente. Mientras que la actividad NIR de los bacteroides se inhibió al añadir Cu a la solución nutritiva, la actividad N<sub>2</sub>OR incrementó proporcionalmente con el aporte de Cu. Este efecto positivo del Cu sobre la actividad N<sub>2</sub>OR también se ha observado en *P. stutzeri*, que requiere concentraciones de Cu en el rango de 50 a 100 μM para alcanzar los niveles máximos de reducción de N<sub>2</sub>O a N<sub>2</sub> (Black *et al.*, 2016). Los resultados de nuestro trabajo sugieren que la actividad NIR es significativamente sensible

al Cu. Se sabe que el exceso de Cu afecta específicamente a los citocromos *c* periplásmicos y de membrana mediante un bloqueo de la biogénesis de los citocromos de tipo *c* (Durand *et al.*, 2015). En *B. diazoefficiens*, el citocromo *c*<sub>550</sub> (CycA), localizado en el periplasma, es absolutamente necesario para la transferencia de electrones a NirK, ya que, en una cepa mutante en el gen *cycA*, se obtuvo una fuerte inhibición de la actividad NIR (Bueno *et al.*, 2008). La sensibilidad de NirK a Cu puede ser debida a un efecto negativo del Cu sobre la biogénesis de CycA. De manera similar a NIR, altas concentraciones de Cu (40 y 60  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ ) añadidas a la solución nutritiva también contribuyeron a un descenso en la actividad NR de los bacteroides. La enzima Nap no contiene Cu como cofactor, pero su actividad puede ser dependiente de otras proteínas que sí necesiten Cu para su funcionamiento, lo que sugeriría un efecto indirecto y negativo del Cu sobre la actividad NR. Como ya se mencionó en el subapartado 2.4.1 de la Introducción, la enzima Nap posee un cluster [4Fe-4S] y dos hemoproteínas que contienen citocromos *c*. Además de bloquear la síntesis de citocromos *c*, el exceso de Cu intracelular específicamente afecta a las proteínas con clusters Fe-S, ya que bloquea la biosíntesis de este grupo en células de *E. coli* cultivadas en condiciones anaeróbicas (Tan *et al.*, 2017). Este efecto negativo sobre la síntesis de los citocromos *c* y los clusters Fe-S puede explicar la inhibición por Cu de la actividad NR. Alternativamente, de acuerdo a la serie de Irving-Williams ( $\text{Zn}^{2+} < \text{Cu}^+ < \text{Cu}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+}$ ), que describe las preferencias de unión de iones metálicos a ligandos orgánicos, el Cu y el Fe pueden competir por el centro activo de ciertas metaloenzimas (Yruela, 2009), afectando consecuentemente a su actividad. Este podría ser el caso de Nap, que contiene Fe. En contraposición a las actividades NR, NIR y  $\text{N}_2\text{OR}$  de los bacteroides, que se encontraban moduladas por Cu, la actividad NOR no se vio afectada significativamente por este metal.

En resumen, estos resultados sugieren que la reducción del  $\text{N}_2\text{O}$  emitido por los nódulos de soja en respuesta a Cu se podría explicar por un descenso simultáneo de las actividades NR y NIR, y un incremento en la actividad  $\text{N}_2\text{OR}$ . En conjunto, estos resultados permiten proponer a Nap y NirK, aparte de Nos, como dianas efectivas en las estrategias dirigidas a mitigar las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  derivadas de los cultivos de soja. En este contexto, se ha demostrado recientemente que los rizobios de alfalfa que emiten bajos niveles de  $\text{N}_2\text{O}$  presentaban mutaciones espontáneas en el gen *napC*, lo que sugiere que la reducción de  $\text{NO}_3^-$  puede ser la etapa limitante en el proceso de la desnitrificación en rizobios, lo que tendría un impacto en la disminución de las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  (Brambilla

*et al.*, 2020). Asimismo, es interesante considerar que, mientras que las nitrato reductasas (Nap o Nar) son ubicuas, Nos no lo es, ya que dicha enzima no está presente en la mayoría de los desnitrificantes (Philippot *et al.*, 2011; Hallin *et al.*, 2018). A pesar de ello, se requiere continuar investigando en este aspecto para confirmar esta hipótesis.

### **La desnitrificación de *E. meliloti* está implicada en la efectividad de la infección y en las emisiones de N<sub>2</sub>O por nódulos de alfalfa**

Como se ha mencionado en la introducción, *E. meliloti* es incapaz de crecer en condiciones anaeróbicas y en presencia de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como único aceptor de electrones. Este defecto se debe a que los niveles de expresión de los genes *nap* son notablemente más bajos respecto a los del resto de genes de la desnitrificación (Torres *et al.*, 2014b). Debido a ello, una cepa sobrepresante de *nap* (*nap*<sup>+</sup>) recuperó la habilidad de crecer en condiciones anaeróbicas (Torres *et al.*, 2018). Demostrada la capacidad de una cepa *nap*<sup>+</sup> de sobrevivir en anoxia a expensas de la respiración del NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, consideramos interesante explorar cómo afecta esta característica a la colonización de las raíces por esta bacteria, ya que esta cuestión aún no se había abordado en el caso de endosimbiontes de leguminosas. Los resultados obtenidos demostraron que la sobreexpresión de Nap promueve la interacción simbiótica entre *E. meliloti* y alfalfa, puesto que las plantas inoculadas con la cepa *nap*<sup>+</sup> aumentaron su capacidad de nodulación en relación con las inoculadas con la cepa WT en condiciones de bajo O<sub>2</sub>. En esta línea, Lecomte y colaboradores (2021) sugirieron que los genes *nap* podrían desempeñar un papel importante en la eficiencia de *Agrobacterium fabrum* de colonizar su planta hospedadora. En concordancia con nuestros resultados, estudios previos demostraron que las cepas mutantes de *B. diazoefficiens* en *nirK* y *norC*, las cuales no crecen en condiciones desnitrificantes en vida libre, mostraban una capacidad de nodulación reducida en plantas de soja crecidas con nitrato (Mesa *et al.*, 2004).

Como se ha comentado anteriormente, la presencia de 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> junto con encharcamiento inducen las emisiones de N<sub>2</sub>O en nódulos aislados de soja, siendo la desnitrificación el principal proceso implicado (Tortosa *et al.*, 2015). Dado que *E. meliloti* no puede crecer ni producir N<sub>2</sub>O en condiciones anóxicas en vida libre, nos pareció interesante investigar la capacidad de *E. meliloti* de emitir N<sub>2</sub>O en simbiosis con alfalfa, así como estudiar la contribución de la desnitrificación del bacteroide. Para lograr este objetivo, se cultivaron plantas de alfalfa en presencia de KNO<sub>3</sub>. A diferencia de la soja,



que es muy tolerante al  $\text{NO}_3^-$ , una concentración de 4 mM  $\text{NO}_3^-$  resulta excesiva para las plantas de alfalfa, ya que el número de nódulos generados por *E. meliloti* disminuyó drásticamente en estas condiciones de  $\text{NO}_3^-$ . Además, aunque ni 1 ni 3 mM  $\text{NO}_3^-$  afectaron al número de nódulos, estos niveles de  $\text{NO}_3^-$  redujeron la biomasa nodular. Por ello, en este trabajo se ha seleccionado el tratamiento de 10 mM  $\text{KNO}_3$  durante 7 días para investigar el efecto del  $\text{NO}_3^-$  sobre las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$ , puesto que dicho tratamiento no afectó al desarrollo del nódulo. Estas condiciones de  $\text{NO}_3^-$  aplicadas junto con encharcamiento indujeron drásticamente las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$ , al igual que se había observado previamente en plantas de soja (Tortosa *et al.*, 2015). En lo concerniente a la implicación de Nap en la producción de  $\text{N}_2\text{O}$  por los nódulos, los resultados obtenidos claramente muestran una correlación entre la actividad NR y los niveles de  $\text{N}_2\text{O}$  tanto para la cepa *nap*<sup>-</sup> como para la cepa *nap*<sup>+</sup>, indicando que Nap ejerce un papel relevante en las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  por nódulos de alfalfa en respuesta a nitrato y encharcamiento. En este contexto, Brambilla y colaboradores (2020) aislaron nuevas cepas de *E. meliloti* que producían niveles más bajos de emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  que la cepa modelo 1021 o la cepa comercial B399, y observaron que todos los aislados contenían mutaciones espontáneas en el gen *napC*, que codifica NapC, una proteína de tipo citocromo *c* esencial para la actividad Nap. El trabajo desarrollado en este capítulo complementa estudios anteriores en los que se demostró la implicación de la reducción de  $\text{NO}_3^-$  en el bacteroide en la síntesis de NO en nódulos de *M. truncatula* (Horchani *et al.*, 2011).

Al igual que se había investigado en soja (Capítulo 1), en esta tesis también se abordó el estudio del efecto del Cu en la SNF así como en la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  por la simbiosis *E. meliloti*-alfalfa. Los resultados obtenidos demostraron el efecto negativo de la limitación de Cu sobre la SNF, con la consecuente incapacidad de los nódulos de satisfacer las demandas de N exigidas por las plantas de alfalfa. De hecho, las plantas no tratadas con Cu mostraban un pálido tono verde en tallo y hojas, indicando que la limitación de Cu puede afectar a la síntesis de clorofila, causando una drástica disminución en la biomasa vegetal y clorosis en las hojas. De manera similar, en un estudio reciente, Printz y colaboradores (2016) observaron clorosis foliar y una densidad foliar más baja en plantas de alfalfa crecidas con 3 y 30 nM de Cu. Por tanto, la presente tesis pone en relieve que un aporte adecuado de Cu resulta esencial para una apropiada SNF. Al igual que se había observado en plantas de soja, los tallos de plantas de alfalfa crecidas con 0.8 o 20  $\mu\text{M}$  Cu mostraron una concentración de Cu significativamente más

baja que las raíces y los nódulos. De forma similar a lo observado en soja (Tortosa *et al.*, 2020), el tratamiento con 20  $\mu\text{M}$  Cu no afectó significativamente a la SNF en plantas de alfalfa.

Por último, se analizaron las actividades NR, NIR y  $\text{N}_2\text{OR}$  en bacteroides aislados de nódulos de alfalfa en respuesta a Cu. Como Nap estaba implicada en las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  por nódulos de alfalfa, como se ha discutido anteriormente, se consideró interesante explorar la influencia del Cu sobre la actividad de esta enzima y la siguiente enzima de la desnitrificación, NirK. No obstante, los resultados obtenidos indicaban que la actividad NR no se veía significativamente afectada por el Cu en el rango utilizado. De manera similar, en estudios previos se demostró que 20  $\mu\text{M}$  Cu no afectaba a la actividad NR de los bacteroides de *B. diazoefficiens* (Tortosa *et al.*, 2020). El notable descenso en la actividad  $\text{MV}^+\text{-NIR}$  que se observó en los bacteroides del tratamiento 0  $\mu\text{M}$  Cu respecto a los de 0,8  $\mu\text{M}$  Cu pone en relieve que NirK es una enzima dependiente de Cu. Además, la actividad  $\text{MV}^+\text{-NIR}$  también se redujo significativamente en presencia de 20  $\mu\text{M}$  Cu. En línea con estos resultados, Tortosa y colaboradores (2020) encontraron una bajada significativa de esta actividad en los bacteroides de soja sometidos a concentraciones de 10, 20, 40 y 60  $\mu\text{M}$  Cu. Por tanto, una concentración de 20  $\mu\text{M}$  Cu afecta a la función de NirK tanto en bacteroides aislados de nódulos de soja como de nódulos alfalfa. En *B. diazoefficiens*, NirK requiere un citocromo  $c_{550}$  (CycA) como donador de electrones esencial para su actividad (Bueno *et al.*, 2008). En este contexto, se ha documentado que un exceso de Cu puede bloquear la biogénesis de citocromo *c* (Durand *et al.*, 2015). Así, la sensibilidad de NirK a altos niveles de Cu en nódulos de soja o alfalfa podría ser debida a un efecto negativo sobre la biogénesis del citocromo periplásmico  $c_{550}$  (CycA). En la presente tesis, asimismo, se demuestra la contribución de Nos a la reducción de  $\text{N}_2\text{O}$  en nódulos de alfalfa, puesto que la actividad  $\text{N}_2\text{OR}$  fue significativamente superior en los bacteroides de la cepa WT respecto a los de la cepa mutante en el gen *nosZ*. Tortosa y colaboradores (2015) obtuvieron resultados similares para los nódulos de soja, poniendo de manifiesto el papel de Nos como la única enzima capaz de reducir el  $\text{N}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2$ , lo que la convierte consecuentemente en una enzima clave en las estrategias de mitigación de las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  por cultivos agrícolas. En este contexto, se ha propuesto que la concentración de Cu en suelos agrícolas podría afectar de manera importante a las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  procedentes de los procesos microbianos, especialmente desnitrificación y nitrificación (Li *et al.*, 2018). Tortosa y colaboradores (2020)

demonstraron que el descenso en las emisiones de N<sub>2</sub>O era concomitante con el incremento en la concentración de Cu añadida a la solución nutritiva, y concluyeron que el Cu era un factor relevante implicado en la reducción de los niveles de N<sub>2</sub>O producidos por nódulos de soja. Siguiendo esta línea, en esta tesis se demostró que la biodisponibilidad de Cu indujo significativamente la actividad N<sub>2</sub>OR y, por extensión, contribuyó a disminuir las emisiones de N<sub>2</sub>O procedentes de nódulos originados por *E. meliloti* en plantas de alfalfa.

En conjunto, los resultados mostrados en este capítulo sugieren una ventaja controvertida de la sobreexpresión de *nap*, ya que mejora la capacidad de nodulación en condiciones limitantes de O<sub>2</sub>, al mismo tiempo que contribuye a las emisiones de N<sub>2</sub>O. A este respecto, proponemos que la selección de inoculantes con una adecuada expresión de *Nap* y una elevada actividad N<sub>2</sub>OR puede ser una estrategia a tener en cuenta para lograr una interacción simbiótica efectiva entre *E. meliloti* y las plantas de alfalfa, así como para reducir los niveles de N<sub>2</sub>O liberados por los cultivos de leguminosas. En este contexto, se ha demostrado recientemente que las emisiones de N<sub>2</sub>O procedentes de cultivos de soja se pueden disminuir a escala de campo mediante la inoculación con una mezcla de cepas nativas de *B. diazoefficiens* aisladas de los campos agrícolas que muestren una alta actividad N<sub>2</sub>OR (Akiyama *et al.*, 2016).

En conclusión, en este capítulo se demuestra por primera vez la capacidad de los nódulos de alfalfa de emitir N<sub>2</sub>O en respuesta a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, encharcamiento y limitación de Cu. Adicionalmente, se aporta evidencia experimental de la implicación de la *Nap* de *E. meliloti* en la competición por la nodulación y en la infectividad de la infección, así como en las emisiones de N<sub>2</sub>O por nódulos de alfalfa. Finalmente, también se demuestra la capacidad del Cu de modular las actividades NIR y N<sub>2</sub>OR de los bacteroides y, consecuentemente, la liberación de N<sub>2</sub>O por nódulos de alfalfa.

### **Efecto del Cu sobre la expresión de genes y proteínas funcionales asociados a la desnitrificación de *B. diazoefficiens***

El principal objetivo del trabajo desarrollado en este capítulo ha sido contribuir a ampliar el conocimiento acerca del papel del Cu en la desnitrificación de *B. diazoefficiens*, especie modelo en el estudio de la desnitrificación en rizobios. Para ello, se ha llevado a cabo un estudio integrado de la expresión de los genes *nap*, *nirK*, *nor* y *nos*, abarcando desde la transcripción génica hasta la síntesis de las proteínas *NapA*, *NirK*, *NorC* y *NosZ*

y sus correspondientes actividades enzimáticas, todas ellas implicadas en la desnitrificación. En primer lugar, analizamos la capacidad de *B. diazoefficiens* 110*spc4* de crecer en diferentes condiciones de Cu: limitación de Cu (Cu-L), estándar de Cu (Cu-S), o alto Cu (Cu-H). El crecimiento aeróbico no se vio afectado por Cu limitante, lo que indicaba que las oxidasas terminales independientes de Cu podían estar funcionando en esas condiciones. De hecho, al igual que otras bacterias aerobias facultativas, *B. diazoefficiens* puede adaptar su metabolismo a diferentes condiciones de O<sub>2</sub> a través de la expresión de múltiples oxidasas terminales con distinta afinidad por el O<sub>2</sub> (Delgado *et al.*, 1998). En *B. diazoefficiens* se han identificado concretamente ocho oxidasas terminales, de las cuales, dos de ellas son oxidasas de tipo *bd* independientes de Cu, mientras que las seis restantes son oxidasas de tipo hemo-Cu, que requieren Cu como cofactor (Bühler *et al.*, 2010). Es posible que las oxidasas de tipo *bd* sean responsables del crecimiento aeróbico en limitación de Cu. De acuerdo a Jünemann (1997), la expresión de citocromos de tipo *bd* incrementaba concomitantemente con la bajada de O<sub>2</sub> en *E. coli*; sin embargo, en *Azotobacter vinelandii* se obtuvieron mayores niveles de expresión de estos citocromos al aumentar la concentración de O<sub>2</sub>. En la bacteria Gram positiva patógena de humanos *M. tuberculosis*, las oxidasas *bd* independientes de Cu se indujeron en hipoxia, reduciéndose consecuentemente la necesidad de Cu, lo que resulta beneficioso para la bacteria, ya que la toxicidad del Cu incrementa en condiciones hipóxicas (Marcus *et al.*, 2016). Por consiguiente, una adaptación en condiciones óxicas limitantes de Cu a través de la síntesis de oxidasas independientes de Cu en *B. diazoefficiens* es una hipótesis plausible que permitiría explicar el fenotipo observado.

Al contrario de lo que ocurre en condiciones óxicas, la limitación de Cu afectaba negativamente el crecimiento anaeróbico y microaeróbico dependiente de nitrato. No obstante, otros desnitrificantes, tales como *P. denitrificans* o *Achromobacter xylosoxidans*, no mostraron diferencias significativas en el crecimiento entre los medios Cu-L y Cu-H en anaerobiosis con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como sustrato respiratorio (Felgate *et al.*, 2012). La presencia de la enzima independiente de Cu NirS en *P. denitrificans* permitiría explicar las diferencias de crecimiento observadas en Cu-L entre esta bacteria y *B. diazoefficiens*. No obstante, *A. xylosoxidans*, que, al igual que *B. diazoefficiens*, posee una NirK que contiene Cu, también fue capaz de crecer anaeróbicamente en medio limitante en Cu (Felgate *et al.*, 2012). Esta diferencia de crecimiento con *B. diazoefficiens* se podría explicar por las diferentes condiciones de cultivo empleadas en esta tesis respecto a las de dicho estudio,

donde tanto *A. xylosoxidans* como *P. denitrificans* crecieron en cultivo continuo en quimiostato. Otra razón posible para estas diferencias podría ser que *A. xylosoxidans* y *P. denitrificans* son microorganismos de crecimiento rápido (Felgate *et al.*, 2012), mientras que *B. diazoefficiens* es una bacteria de crecimiento lento. La baja tasa de crecimiento de *B. diazoefficiens* podría contribuir al efecto negativo causado por la limitación de Cu sobre la expresión y la activación del mecanismo completo de la desnitrificación, y podría explicar los defectos en el crecimiento observados en Cu-L respecto a Cu-S y Cu-H. El hecho de que, al contrario que en este trabajo, Sullivan y colaboradores (2013) no observaran ninguna diferencia en el crecimiento en Cu-L y Cu-H de cultivos discontinuos (o tipo *batch*) de *P. denitrificans*, se podría explicar por el hecho de que el proceso de la desnitrificación en *P. denitrificans* comienza con una nitrato reductasa de membrana (Nar), mientras que, en *B. diazoefficiens*, lo inicia una Nap. En *P. stutzeri*, otro microorganismo de crecimiento rápido, se encontraron evidencias que apoyan esta idea, puesto que, en esta bacteria, la desnitrificación también comienza con la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  por una Nar (Black *et al.*, 2016). En dicho estudio, no se obtuvieron diferencias significativas en cultivos anaeróbicos de *P. stutzeri* incubados a lo largo de un período de 7 días en un rango de concentración de Cu de 0 a 1 mM Cu. Por tanto, nuestro trabajo sugiere que la limitación de Cu podría afectar a los microorganismos de crecimiento lento provistos de Nap como primera enzima de la desnitrificación y que además contienen una NirK dependiente de Cu.

Mediante el empleo de fusiones transcripcionales al gen reportero *lacZ*, se demostró la dependencia de Cu en la inducción de los genes *nirK*, *nor* y *nos* de la desnitrificación en condiciones microóxicas. Estas observaciones se confirmaron a través del análisis de expresión mediante qRT-PCR de los genes *napA*, *nirK*, *norC* y *nosR*. De manera similar a nuestras observaciones, una concentración adecuada de Cu (0,15 mM) indujo los mayores niveles de transcripción de los genes *nirS*, *norB* y *nosZ* de la desnitrificación en *P. stutzeri* al comparar con concentraciones más bajas de Cu (Black *et al.*, 2016). Asimismo, en células de *P. denitrificans* crecidas en Cu limitante, se observaron niveles bajos de expresión de *nosZ* (Sullivan *et al.*, 2013). Es interesante mencionar que, aparte de los genes *nirK* y *nos*, codificantes de las enzimas dependientes de Cu NirK y Nos, la inducción de la expresión de los genes *nor*, que codifican la enzima carente de Cu Nor, también requiere Cu. En la presente tesis, se demuestra que este control no se encuentra mediado por los bajos niveles de expresión de *nirK*, que posiblemente sean la causa del descenso

en la producción de NO, la molécula señal necesaria para inducir la expresión de los genes *nor* (Bueno *et al.*, 2017). Así, se propone un efecto negativo de la limitación de Cu a nivel de la transcripción de los genes *nor*.

La ausencia de respuesta a Cu de los genes *nap* se corroboró analizando los niveles de proteína NapA, los cuales, al igual que ocurría con los niveles de expresión génica, no se vieron afectados por la concentración de Cu presente en el medio de cultivo. Por el contrario, se observó un claro efecto del Cu sobre la actividad NR. Este efecto fue variable a lo largo del período de incubación. Mientras que, tras 1 día de incubación, la actividad NR fue más alta en Cu-L respecto a Cu-S, esta se vio notablemente inhibida después de 2 o 3 días de incubación. Como se ha comentado en el capítulo anterior, la afinidad por metales pesados generalmente sigue un orden universal de preferencia, que es la serie Irving-Williams para los metales divalentes:  $Zn^{2+} < Cu^+ > Cu^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} > Fe^{2+} > Mn^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+}$  (Fraústo da Silva y Williams, 2001). Normalmente, cada ion metálico puede reemplazar a otro que se encuentre por debajo de él. Así, el ion cúprico ( $Cu^{2+}$ ) es altamente competitivo y se espera que sustituya a cofactores metálicos de diferentes metaloproteínas, especialmente de aquellas que contengan ligandos de S y N. NapA presenta en su estructura un cofactor Mo[MGD]<sub>2</sub> y un centro [4Fe-4S] (Delgado *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2016). Por consiguiente, sería posible una competición por los sitios activos de NapA entre Cu y Fe y/o Mo (Fraústo da Silva y Williams, 2001). En Cu limitante, la baja concentración de ion  $Cu^{2+}$  no sería suficiente para competir con  $Fe^{2+}$  o  $Mo^{2+}$ , resultando en una mayor actividad NR. La inhibición de la actividad NR observada tras 2 y 3 días de incubación en Cu-L puede ser debida a los elevados niveles de  $NO_2^-$  presentes en el medio de cultivo durante el primer día de crecimiento. Esta acumulación de  $NO_2^-$  permitiría explicar el defecto observado en el crecimiento en Cu-L de forma similar a como ocurre en una mutante *nirK*, que también acumula altos niveles de  $NO_2^-$  en el medio de cultivo (Velasco *et al.*, 2001; Bueno *et al.*, 2008). Al contrario de lo que se observa en Cu-L, la actividad NR se indujo en Cu-H después de 2 o 3 días de incubación. Resulta interesante mencionar que la actividad NR en Cu-L, Cu-S y Cu-H se correlacionaba con las tasas de consumo de  $NO_3^-$ . En conjunto, estos resultados sugieren un control post- traduccional de la Nap de *B. diazoefficiens* mediado por Cu.

En lo concerniente a NirK, y de manera similar a como ocurre con la expresión del gen *nirK*, los niveles de proteína disminuyeron en Cu-L respecto a Cu-S. Sin embargo, este efecto fue más pronunciado en la fracción periplásmica que en la citosólica. Por el

contrario, en las células crecidas en Cu-H, NirK se expresó más en el periplasma que en el citoplasma. La secuencia de la NirK de *B. diazoefficiens* contiene a su vez la secuencia <sup>3</sup>TRRAALI<sup>9</sup> en la región N-terminal (Velasco *et al.*, 2001), que se acerca en su mayor parte al motivo de argininas gemelas (o *twin-arginine motif*) (S/T)RRXFLK identificado en un gran número de metaloproteínas periplásmicas que contienen cofactores complejos y se exportan a través del sistema Tat, que es independiente del sistema Sec (Maillard *et al.*, 2007; Sargent, 2007). De hecho, el transporte de NirK unida a Cu a través del Sistema Tat se ha demostrado en algunas arqueas halófilas, como *Haloferax mediterranei* (Esclapez *et al.*, 2013). Nuestros resultados sugieren que, además de influir en la expresión de *nirK*, el Cu también podría ejercer algún efecto sobre el transporte de NirK al periplasma. Los bajos niveles de NirK en respuesta a Cu limitante explican la baja actividad NIR, así como los elevados niveles de acumulación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. No obstante, aunque Cu-H no aumentó el contenido en NirK en el periplasma en comparación con Cu-S, se obtuvo una mayor actividad de NirK en estas células, lo que permitiría explicar la ausencia de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en el medio Cu-H. Estos resultados sugieren un control post-traducciona l de alto Cu sobre la actividad catalítica de NirK. En este contexto, recientemente se ha documentado que el pH causa cambios estructurales en la NirK de la cepa USDA110 de *B. diazoefficiens*, lo que resulta en una actividad catalítica dependiente del pH (Cristaldi *et al.*, 2020).

El efecto negativo de la limitación de Cu sobre la expresión de los genes *nor* provocó bajos niveles de proteína NorC, y también de actividad Nor. A pesar de que no se observó una mayor inducción de la expresión de los genes *nor* en Cu-H respecto a Cu-S, se obtuvo un incremento significativo en los niveles de proteína NorC, así como de actividad Nor, en el medio Cu-H. Estos resultados sugieren una regulación post-transcripcional de la síntesis de NorC en Cu-H. Dado que Cu-H aumenta significativamente la actividad NirK y, consecuentemente, la formación de NO, sería posible que las células necesitaran producir niveles más altos de cNor para protegerse de la toxicidad causada por el NO en estas condiciones.

En cuanto a Nos, existe un control transcripcional de la expresión de los genes *nos* en Cu-L. Por el contrario, Cu-H no influyó significativamente en la expresión de los genes *nos* respecto a Cu-S, pero sí en los niveles de NosZ y en la actividad N<sub>2</sub>OR, poniendo de manifiesto la relevancia del Cu para una correcta maduración y un adecuado funcionamiento de NosZ. Los niveles de NosZ madura fueron mayores frente a los de la NosZ truncada en el periplasma de las células crecidas en Cu-H, lo que sugiere que la

regulación post-transcripcional de Nos en Cu-H probablemente afecte la maduración de dicha proteína en el periplasma. En este contexto, se conoce que, a pesar de ser transportada por el sistema Tat, la maduración de NosZ se completa en el periplasma, donde los centros Cu<sub>A</sub> y Cu<sub>Z</sub> se ensamblan en la apoproteína de NosZ (revisado por Torres *et al.*, 2016). Nuestros resultados son consistentes con observaciones previas en otros microorganismos (Matsubara *et al.*, 1982; Granger y Ward, 2003; Felgate *et al.*, 2012), donde el Cu modula la actividad N<sub>2</sub>OR. En esta tesis, la baja actividad N<sub>2</sub>OR detectada en Cu-L provocó una notable acumulación de N<sub>2</sub>O en la atmósfera gaseosa de los cultivos. De manera similar, en cultivos discontinuos de *P. denitrificans* en Cu-L con NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Sullivan y colaboradores (2013) observaron una acumulación transitoria de N<sub>2</sub>O que no se observó en cultivos en Cu-H, lo que sugería que la capacidad catalítica de las otras reacciones de la desnitrificación excedía la tasa de funcionamiento de la enzima Nos provista de Cu.

En conjunto, los resultados discutidos hasta el momento permiten concluir que la activación de Nap, NirK, Nor y Nos en Cu-H (13 μM Cu) podrían explicar el mayor crecimiento detectado en Cu-H comparando con Cu-S (0,02 μM Cu). Mientras que la limitación de Cu inhibe claramente la desnitrificación en *B. diazoefficiens*, una concentración de 13 μM Cu induce un aumento destacable en el crecimiento y en la actividad de todas las enzimas de la desnitrificación.

La enzima Nos, codificada por el operon *nosRZDFYLX* en *B. diazoefficiens*, cataliza la reducción biológica de N<sub>2</sub>O a N<sub>2</sub>, que representa la última etapa de la desnitrificación (Velasco *et al.*, 2004). En general, NosZ constituye la subunidad catalítica, y está codificada por el gen *nosZ*. NosZ es una proteína homodimérica del periplasma que contiene dos centros de Cu en cada monómero: Cu<sub>A</sub> y Cu<sub>Z</sub> (Wüst *et al.*, 2012). NosR es una proteína integral de membrana que actúa como donador de electrones para la reducción de N<sub>2</sub>O (Wunsch y Zumft, 2005). Esta proteína posee un dominio periplásmico de unión a FMN y un dominio C-terminal similar a ferredoxina con dos clusters [4Fe-4S] localizados en el citoplasma (Zumft y Kroneck, 2007). Se ha sugerido que NosR y un miembro de la familia de proteínas ApbE, NosX, están implicados en la reducción de N<sub>2</sub>O *in vivo*, manteniendo la actividad catalítica de NosZ. En esta línea, se propuso la existencia de un sistema donador de electrones a través de NosR, en el que NosX funcionaría como una quinol oxidoreductasa, que actuaría en paralelo con la ruta formada por el citocromo *bc*<sub>1</sub>, el citocromo *c*<sub>550</sub> y la pseudoazurina (Wunsch *et al.*, 2005; Wunsch y Zumft, 2005). Recientemente, Zhang y colaboradores (2017) han demostrado que la proteína periplásmica



ApbE de *P. stutzeri*, la cual une FAD, cataliza la transferencia de grupos flavinil al dominio de unión a FMN de NosR. Esta evidencia sugiere que ApbE (o NosX en otros microorganismos, tales como *P. denitrificans* o *B. diazoefficiens*) sustenta la actividad catalítica de NosZ a través de NosR. En la presente tesis, se demuestra que NosR es necesaria para la actividad Nos en *B. diazoefficiens*, lo que confirma resultados previos obtenidos por nuestro grupo (Velasco *et al.*, 2004). No obstante, se requiere más investigación en este aspecto para elucidar la participación de NosX en la actividad de la enzima Nos de *B. diazoefficiens*. Aparte de actuar como donador de electrones a NosZ, también se ha propuesto que NosR podría desempeñar una función reguladora, dado que Honisch y Zumft (2003) desvelaron que la transcripción de los genes *nosZ* y *nosD* en *P. stutzeri* necesitaba de NosR. Wunsch y Zumft (2005) sugirieron un control indirecto de NosR sobre sus genes diana y, además, que sólo el dominio periplásmico provisto de flavina era necesario para la expresión de *nosZ*. Adicionalmente, Sullivan y colaboradores (2013) analizaron la transcripción de *nosZ* en la cepa parental de *P. denitrificans* y en una cepa mutante en el gen *nosR* en condiciones anóxicas y limitación de Cu con nitrato, y descubrieron que los niveles de transcrito en la cepa mutante en *nosR* eran notablemente superiores a los de la cepa WT, lo que indicaba que NosR ejercía un papel en la represión de la expresión de *nosZ* en respuesta a Cu limitante en *P. denitrificans*. En cambio, los resultados obtenidos en esta Tesis indican que NosR no está implicada en la expresión del operon *nosRZDFYLX* en *B. diazoefficiens* en respuesta a microoxia y/o Cu. Sin embargo, en contra de nuestros resultados, Velasco y colaboradores (2004) observaron niveles muy bajos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en células de una mutante *nosR* que contenía una fusión *nosZ-lacZ* incubadas microaeróbicamente en medio completo (YEM), lo que llevó a estos autores a sugerir que NosR podría actuar como regulador positivo del gen *nosZ*, tal y como propuso Zumft (1997). Torres y colaboradores (2017) demostraron que la transcripción de los genes *nosRZDFYLX* depende principalmente de un promotor presente en la región 5' de *nosR*. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que exista otro promotor interno en la región 5' de *nosZ* que responda a Cu. Un análisis de la expresión de *nosZ* en un fondo mutante *nosR* en limitación y presencia de Cu ayudaría a aclarar esta discrepancia.

Considerados en conjunto, los resultados presentados en este capítulo sugieren que el Cu no sólo afecta a la actividad enzimática de Nap, NirK, Nor y Nos, sino que además actúa como factor indispensable en la regulación de la expresión de los genes de la desnitrificación, y asimismo podría mediar en el transporte de la enzima NirK y en la maduración de la enzima NosZ, ambas dependientes de Cu. Por tanto, el Cu podría estar implicado en una red reguladora de la desnitrificación, en la cual no funcionaría tan solo como mero cofactor enzimático de las enzimas provistas de Cu, sino también de importante señal reguladora de este proceso.

### **Papel de CsoR en la expresión de los genes de la desnitrificación**

Los resultados obtenidos en el capítulo 3 de esta tesis indican claramente que la inducción de los genes *nirK*, *nor* y *nos* en condiciones de bajo O<sub>2</sub> y presencia de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se redujo significativamente en Cu limitante, lo que sugiere que este control podría estar modulado por un represor específico. En este contexto, CsoR y CopY se consideran represores transcripcionales sensores de Cu en bacterias, tales como *M. tuberculosis* (Liu *et al.*, 2007), *E. coli* y *E. hirae* (revisado por Rademacher y Masepohl, 2012). No obstante, recientemente se ha descubierto un divergón *csoR-cueA* codificante de un represor de tipo CsoR y de una ATPasa de tipo P transportadora de metales pesados (CueA) en la bacteria Gram negativa *B. liaoningense* CCNWSX0360 (Liang *et al.*, 2016). Estos autores atribuyeron un papel crucial a este sistema en la homeostasis del Cu, así como en la resistencia frente a Zn y Cd. Una búsqueda en el genoma de *B. diazoefficiens* en la base de datos KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) (Kanehisa y Goto, 2000; Kanehisa, 2019; Kanehisa *et al.*, 2021) reveló la presencia de un gen putativo codificante de un represor de la familia CsoR cuya anotación es bsr0701. No obstante, se requiere una investigación más exhaustiva en este aspecto para determinar si, aparte de la probable implicación de esta proteína CsoR predicha en la tolerancia a metales, se le puede atribuir un papel putativo en los bajos niveles de transcripción de los genes *nirK*, *nor* y *nos* en células de *B. diazoefficiens* crecidas en condiciones limitantes de Cu.

Para explorar esta hipótesis, se construyó una cepa mutante de *B. diazoefficiens* en este gen tal y como se detalla en los resultados de este subcapítulo. Básicamente, esta cepa se construyó por delección sin marcador del gen *csoR* (Figura 3.1.1).

La curva de crecimiento de esta cepa mutante no fue distinta a la de la cepa WT 110*spc4* independientemente de la condición de Cu analizada en microaerobiosis (Figura 3.1.5). Por consiguiente, CsoR aparentemente no está implicada en el crecimiento de la cepa silvestre en condiciones microóxicas.

En cuanto a la posible implicación de CsoR en la expresión de los genes de la desnitrificación, los resultados obtenidos sugieren que CsoR no actuaría como represor de los genes *nirK* y *nor* dado que los niveles de expresión de estos genes en la cepa mutante *csoR* son aún más bajos a los observados en la cepa WT en condiciones de bajo Cu. Alternativamente, CsoR podría mediar la expresión de los genes *nirK* y *nor* de manera indirecta en condiciones limitantes de Cu. Tal y como se ha comentado en Introducción, en *M. tuberculosis* se ha demostrado que, cuando el Cu no se encuentra biodisponible, CsoR se mantiene unida al promotor de su gen codificante, reprimiendo la transcripción de los genes del operón *csoR* (Liu *et al.*, 2007). Al incrementar la concentración externa de Cu, éste se une a CsoR, que se disocia del promotor, permitiendo la transcripción de los genes de dicho operón (Liu *et al.*, 2007). En una cepa mutante  $\Delta$ *csoR* es probable que, al no encontrarse reprimida la expresión de *cueA*, la proteína CueA exporte Cu al exterior de la célula, haciendo aún más limitante la concentración de este microelemento en el interior celular. A la vista de los resultados de expresión obtenidos (Figura 3.1.6), se sugiere que la ausencia de CsoR refuerza aún más la inhibición de la expresión de estos genes en condiciones limitantes de Cu. En conclusión, CsoR actuaría de forma indirecta probablemente al contribuir a la disminución de los niveles de Cu en el interior de la célula. Por el momento, se desconoce cuál pudiera ser el regulador que actuaría directamente sobre los genes de la desnitrificación de *B. diazoefficiens* en condiciones limitantes de Cu.

Siguiendo esta línea, en una mutante *csoR* que se había empleado para infectar ratones, Marcus y colaboradores (2016) observaron que se inducían genes de respuesta específicos a factores de estrés del huésped, como los niveles de Cu (*ctpV*), NO e hipoxia (regulón *dosR*, del inglés, *dormancy survival regulator*). Estos autores sugieren la implicación de *cso* en la dormancia al observar la inducción de *csoR* durante toda la respuesta a hipoxia. Una respuesta a Cu incrementada en condiciones de hipoxia puede ser fisiológicamente importante no sólo porque el Cu es más tóxico en estas condiciones, sino porque, además, la hipoxia estimula la captación de Cu por los macrófagos. Al mismo tiempo, la necesidad de Cu por *M. tuberculosis* en condiciones de hipoxia

disminuye, al inducirse las oxidasas de tipo *bd*, las cuales son independientes de Cu, lo que reduce la necesidad de la citocromo *c* oxidasa, que es dependiente de Cu (Neyrolles *et al.*, 2015). El NO y niveles tóxicos de Cu representan factores de estrés que *M. tuberculosis* tiene que enfrentar en el interior del fagosoma de los macrófagos, especialmente de aquellos que se han activado. Para la inducción del regulón *dosR* en una mutante *csor*, se proponen dos hipótesis. La primera sugiere que la interrupción del transporte de  $e^-$  o de la citocromo *c* oxidasa induce dicha expresión (Voskuil *et al.*, 2003; Honaker *et al.*, 2010). Como la citocromo *c* oxidasa es una metaloenzima que contiene Cu, la inducción de *csor*, que conlleva a un transporte del exceso de Cu fuera del citosol, podría impactar negativamente en su función. El bloqueo de la respiración, entonces, podría contribuir a la activación de este regulón. Una segunda posibilidad podría ser que el NO indujera directamente el regulón DosR en la cepa mutante. El Cu podría estar presente en bajos niveles en el citoplasma, y CtpV exportaría Cu sólo a través de la membrana celular. Aún no se sabe si los niveles de expresión de los genes implicados en la expulsión de Cu a través de la pared de la micobacteria se ven afectados, por lo que sería posible que el Cu pudiera acumularse y causar daño en el espacio periplásmico de la mutante *knockout* en *csor*; el  $Cu^+$  puede generar NO a través de su interacción con S-nitrosotioles (Dicks y Williams, 1996), por lo que, eventualmente, el Cu acumulado daría lugar a altos niveles de NO que, subsiguientemente, podrían inducir el regulón DosR.

En este contexto, es posible que en células de *B. diazoefficiens* 110*spc4* crecidas en microaerobiosis y en presencia de Cu, se exprese CueA, que se activaría para exportar el exceso de Cu al periplasma. No obstante, en la cepa mutante  $\Delta csor$ , CueA exportaría más Cu del necesario, dando lugar a una desregulación de la respuesta a Cu. De acuerdo a los resultados de expresión en *B. diazoefficiens*, la delección de *csor* conllevó una reducción en los niveles de expresión de *nor* en Cu-S (Figura 3.1.6C,E). Dado que en limitación de Cu, tanto la expresión de los genes *nor* como la síntesis y actividad de la enzima Nor se ven comprometidas (Figuras 3.3C,E, 3.8), es probable que, al bajar notablemente el nivel interno de Cu en la cepa mutante cuando se encuentra en Cu-S, no se alcancen niveles adecuados ni de expresión de los genes *nor* (Figura 3.1.6C,E) ni de actividad de la enzima Nor, y se acumule NO en el periplasma en la cepa  $\Delta csor$ . Consecuentemente, esta acumulación de NO podría desencadenar la activación de un mecanismo inhibitor de naturaleza similar a *dosR*, el cual podría, a su vez, estar implicado en la bajada de expresión de los genes *nor*, y quizás también de *nirK* y *nos*. Sin embargo,

son necesarios experimentos adicionales para comprobar el efecto de la mutación en *csoR* no sólo en la expresión, sino también en los niveles de proteína NorC y de actividad de la enzima Nor en condiciones estándar de Cu (0,02  $\mu$ M).

Como conclusión, a la vista de los resultados presentados, se propone que CsoR no actúa como factor de transcripción de los genes *nirK*, *nor* y *nos* de la desnitrificación, pero influye en la expresión de *nirK* y *nor* de manera indirecta en respuesta a los niveles citosólicos de Cu. Por consiguiente, no se puede descartar la implicación de factores de transcripción que detecten los niveles intracelulares de Cu y que estén asimismo implicados en el control directo de la expresión de los genes de la desnitrificación. En definitiva, este capítulo esboza, en general, una posible conexión entre la regulación de la respuesta a Cu y la desnitrificación, por lo que cabe la posibilidad de que ambos procesos formen parte de una red de regulación más amplia en la que el Cu jugaría un papel central.

# **CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS**



## Conclusiones

1. La adición de Cu reduce las emisiones de N<sub>2</sub>O por los nódulos de soja. Este descenso se debe principalmente al efecto del Cu sobre las actividades enzimáticas de la desnitrificación de los bacteroides, especialmente a la disminución de la actividad nitrato y nitrito reductasa y al aumento de la actividad óxido nitroso reductasa.
2. Los nódulos de plantas de alfalfa emiten N<sub>2</sub>O en respuesta a nitrato y encharcamiento.
3. La enzima nitrato reductasa periplásmica de *E. meliloti* está implicada en la competitividad por la nodulación, además de contribuir a las emisiones de N<sub>2</sub>O por nódulos de alfalfa.
4. La disponibilidad de Cu induce significativamente la actividad óxido nitroso reductasa de los bacteroides y, por extensión, reduce las emisiones de N<sub>2</sub>O procedentes de nódulos de alfalfa.
5. La limitación de Cu inhibe el crecimiento anaeróbico y microaeróbico de *B. diazoefficiens* dependiente de nitrato.
6. Mientras que la limitación de Cu reduce notablemente los niveles de expresión de los genes *nirK*, *nor* y *nos*, la expresión de *nap* no se encuentra afectada por Cu.
7. Las enzimas de la desnitrificación de *B. diazoefficiens* están sometidas a una regulación postranscripcional mediante el aumento de las actividades Nap y NirK, así como de los niveles de las proteínas NorC y NosZ, en respuesta a un nivel de Cu por encima de la concentración estándar, concretamente, 13 μM en este caso.
8. La proteína NosR es esencial para el correcto funcionamiento de la óxido nitroso reductasa de *B. diazoefficiens*, pero no está implicada en la expresión de los genes responsables de su síntesis.
9. El regulador CsoR está implicado en la inhibición de la expresión de los genes *nirK* y *nor* en respuesta a condiciones limitantes de Cu.
10. El Cu, además de funcionar como cofactor de las enzimas NirK y Nos, es un factor importante en la compleja red de regulación de la desnitrificación de *B. diazoefficiens*.



## Conclusions

1. Cu addition reduces N<sub>2</sub>O emissions by soybean nodules. This decrease occurs mainly due to the effect of Cu on bacteroidal denitrification enzymatic activities, especially the simultaneous decrease in nitrate and nitrite reductase activities and the increase in nitrous oxide reductase activity.
2. Alfalfa nodules emit N<sub>2</sub>O in response to nitrate and flooding.
3. *E. meliloti* periplasmic nitrate reductase is involved in the competitiveness for nodulation, and also contributes to N<sub>2</sub>O emissions by alfalfa nodules.
4. Cu availability significantly induces bacteroidal nitrous oxide reductase activity and, by extension, decreases N<sub>2</sub>O emissions by alfalfa nodules.
5. *B. diazoefficiens* nitrate-dependent anaerobic and microaerobic growth are both severely affected by Cu limitation.
6. A notable reduction in *nirK*, *nor* and *nos* expression levels is triggered by Cu limitation. Meanwhile, *nap* expression is not affected by Cu.
7. *B. diazoefficiens* denitrification enzymes are subjected to a post-transcriptional regulation by increasing Nap and NirK activities, as well as NorC and NosZ protein levels, in response to a Cu level above the standard concentration, specifically, 13 μM in this case.
8. NosR is essential for the proper function of *B. diazoefficiens* Nos, but is not involved in *nos* genes expression.
9. CsoR is involved in the regulation of *nirK* and *nor* genes expression in response to Cu-limiting conditions.
10. Besides its role as an essential cofactor for NirK and NorC, Cu is an important factor involved in the intricate *B. diazoefficiens* denitrification regulatory network.

# REFERENCES



- Adamczack, J., Hoffmann, M., Papke, U., Haufschildt, K., Nicke, T., Bröring, M., Sezer, M., Weimar, R., Kuhlmann, U., Hildebrandt, P., Layer, G. (2014). NirN Protein from *Pseudomonas aeruginosa* is a Novel Electron-bifurcating Dehydrogenase Catalyzing the Last Step of Heme  $d_1$  Biosynthesis. *J Biol Chem* 289, 30753-30762, <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.603886>.
- Akiyama, H., Hoshino, Y.T., Itakura, M., Shimomura, Y., Wang, Y., Yamamoto, A., Tago, K., Nakajima, Y., Minamisawa, K., Hayatsu, M. (2016). Mitigation of soil  $N_2O$  emission by inoculation with a mixed culture of indigenous *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *Sci Rep* 6, 32869, <https://doi.org/10.1038/srep32869>.
- Al-Attar, S., de Vries, S. (2015). An electrogenic nitric oxide reductase. *FEBS Lett* 589, 2050–2057, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.06.033>.
- Allen, J.W.A., Barker, P.D., Daltrop, O., Stevens, J.M., Tomlinson, E.J., Sinha, N., Sambongi, Y., Ferguson, S.J. (2005). Why isn't "standard" heme good enough for  $c$ -type and  $d_1$ -type cytochromes? *Dalton Trans* issue 21, 3410-3418, <https://doi.org/10.1039/b508139b>.
- Ampe, F., Kiss, E., Sabourdy, F., Batut, J. (2003). Transcriptome analysis of *Sinorhizobium meliloti* during symbiosis. *Genome Biol* 4, R15, <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-2-r15>.
- Arrese-Igor, C., Gordon, A.J., Minchin, F.R., Ford, D.R. (1998). Nitrate entry and nitrite formation in the infected region of soybean nodules. *J Exp Bot* 318, 41-48, <https://doi.org/10.1093/jxb/49.318.41>.
- Baede, A.P.M., Ahlonsou, E., Ding, Y., Schimel, D. (2001) The climate system: an overview. In: *Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Noguer, M., van der Linden, P.J., Dai, X., Maskell, K., Johnson, C.A., eds.), Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, USA, pp. 21–84.
- Baggs, E.M. (2008). A review of stable isotope techniques for  $N_2O$  source partitioning in soils: recent progress, remaining challenges and future considerations. *Rapid Commun Mass Sp* 22, 1664–1672, <https://doi.org/10.1002/rcm.3456>.
- Bali, S., Warren, M.J., Ferguson, S.J. (2010). NirF is a periplasmic protein that binds  $d_1$  heme as part of its essential role in  $d_1$  heme biogenesis. *FEBS J* 277, 4944-4955, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07899.x>.
- Ballabio, C., Panagos, P., Lugato, E., Huang, J., Orgiazzi, A., Jones, A., Fernández-Ugalde, O., Borrelli, P., Montanarella, L. (2018). Copper distribution in European topsoils: an assessment based on LUCAS soil survey. *Sci Total Environ* 636, 282-298. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.268>.
- Barnett, M.J., Fisher, R.F., Jones, T., Komp, C., Abola, A.P., Barloy-Hubler, F., et al. (2001). Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *PNAS* 98, 9883-9888, <https://doi.org/10.1073/pnas.161294798>.

## References

- Barnett, M.J., Toman, C.J., Fisher, R.F., Long, S.R. (2004). A dual-genome Symbiosis Chip for coordinate study of signal exchange and development in a prokaryote-host interaction. *PNAS* 101(47), 16636-16641, <https://doi.org/10.1073/pnas.0407269101>.
- Bartnikas, T.B., Wang, Y., Bobo, T., Veselov, A., Scholes, C.P., Shapleigh, J.P. (2002). Characterization of a member of the NnrR regulon in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3 encoding a haem-copper protein. *Microbiol* 148(3), 825-833, <https://doi.org/10.1099/00221287-148-3-825>.
- Becana, M., Matamoros, M.A., Udvardi, M.K., Dalton, D.A. (2010). Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. *New Phytol* 188, 960-976, <https://doi.org/doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03512.x>.
- Becker, A., Berges, H., Krol, E., Bruand, C., Ruberg, S., Capela, D., *et al.* (2004). Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact* 17, 292-303, <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.3.292>.
- Bedmar, E.J., Bueno, E., Correa, D., Torres, M.J., Delgado, M.J., Mesa, S. (2013). Ecology of denitrification in soils and plant-associated bacteria. In: *Beneficial plant-microbial interactions: Ecology and applications* (Rodelas, B., González-López, J., eds.), CRC Press, Florida, USA, pp. 164-182, <https://doi.org/10.1201/b15251>.
- Bedmar, E.J., Robles, E.F., Delgado, M.J. (2005). The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem Soc Trans* 33, 141-144, <https://doi.org/10.1042/BST0330141>.
- Bennett, S.P., Soriano-Laguna, M.J., Bradley, J.M., Svistunenko, D.A., Richardson, D.J., Gates, A.J., Le Brun, N.E. (2019). NosL is a dedicated copper chaperone for assembly of the Cu<sub>2</sub> center of nitrous oxide reductase. *Chem Sci* 10, 4985-4993, <https://doi.org/10.1039/C9SC01053J>.
- Bennett, S.P., Torres, M.J., Soriano-Laguna, M.J., Richardson, D.J., Gates, A.J., Le Brun, N.E. (2020). *nosX* is essential for whole-cell N<sub>2</sub>O reduction in *Paracoccus denitrificans* but not for assembly of copper centres of nitrous oxide reductase. *Microbiol* 166, 909-917, <https://doi.org/10.1099/mic.0.000955>.
- Bergaust, L.L., Hartsock, A., Liu, B., Bakken, L.R., Shapleigh, J.P. (2014). Role of *norEF* in denitrification, elucidated by physiological experiments with *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 196(12), 2190-2200, <https://doi.org/10.1128/JB.00003-14>.
- Bergaust, L.L., Mao, Y., Bakken, L.R., Frostegård, Å. (2010). Denitrification response patterns during the transition to anoxic respiration and posttranscriptional effects of suboptimal pH on nitrogen oxide reductase in *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol* 76, 6387-6396, <https://doi.org/10.1128/AEM.00608-10>.
- Beringer, J.E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 84(1), 188-198, <https://doi.org/10.1099/00221287-84-1-188>.

- Bernal, M.P., Clemente, R., Walker, D.J. (2007). The role of organic amendments in the bioremediation of heavy metal-polluted soils. In: *Environmental Research at the Leading Edge* (Gore, R.W., ed.), Nova Science Publishers Inc., New York, USA, pp. 1-57.
- Black, A., Hsu, P.L., Hamonts, K.E., Clough, T.J., Condon, L.M. (2016). Influence of copper on expression of *nirS*, *norB* and *nosZ* and the transcription and activity of NIR, NOR and N<sub>2</sub>OR in the denitrifying soil bacteria *Pseudomonas stutzeri*. *Microb Biotechnol* 9, 381–388, <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12352>.
- Blanquet, P., Silva, L., Catrice, O., Bruand, C., Carvalho, H., Meilhoc, E. (2015). *Sinorhizobium meliloti* controls nitric oxide-mediated post-translational modification of a *Medicago truncatula* nodule protein. *Mol Plant Microbe Interact* 28(12), 1353-1363, <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-15-0118-R>.
- Bobik, C., Meilhoc, E., Batut, J. (2006). FixJ: A major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 188, 4890-4902, <https://doi.org/10.1128/JB.00251-06>.
- Boyd, J.M., Endrizzi, J.A., Hamilton, T.L., Christopherson, M.R., Mulder, D.W. *et al.* (2011). FAD binding by ApbE protein from *Salmonella enterica*: a new class of FAD-binding proteins. *J Bacteriol* 193, 887–895, <https://doi.org/10.1128/JB.00730-10>.
- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72, 248-254, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Brambilla, S., Soto, G., Odorizzi, A., Arolfo, V., McCormick, W., Primo, E., Giordano, W., Jozefkowicz, C., Ayub, N. (2020). Spontaneous mutations in the nitrate reductase gene *napC* drive the emergence of eco-friendly low-N<sub>2</sub>O-emitting alfalfa rhizobia in regions with different climates. *Microb Ecol*, 79, 1044-1053, <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01473-w>.
- Bricio, C., Alvarez, L., San Martin, M., Schurig-Briccio, L.A., Gennis, R.B., Berenguer, J. (2014). A third subunit in ancestral cytochrome *c*-dependent nitric oxide reductases. *Appl Environ Microbiol* 80, 4871-4878, <https://doi.org/10.1128/AEM.00790-14>.
- Brown, N.L., Stoyanov, J.V., Kidd, S.P., Hobbman, J.L. (2003). The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev* 27, 145-163, [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00051-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00051-2).
- Brown, K., Tegoni, M., Prudêncio, M., Pereira, A.S., Besson, S., Moura, J.J., Moura, I., Cambillau, C. (2000). A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase. *Nat Struct Biol* 7, 191-195, <https://doi.org/10.1038/73288>.
- Bueno, E., Bedmar, E.J., Richardson, D.J., Delgado, M.J. (2008). Role of *Bradyrhizobium japonicum* cytochrome *c*<sub>550</sub> in nitrite and nitrate respiration. *FEMS Microbiol Lett* 279, 188-194, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01034.x>.

## References

- Bueno, E., Gómez-Hernández, N., Girard, L., Bedmar, E.J., Delgado, M.J. (2005). Function of the *Rhizobium etli* CFN42 *nirK* gene in nitrite metabolism. *Biochem Soc Trans* 33(1), 162-163, <https://doi.org/10.1042/BST0330162>.
- Bueno, E., Mania, D., Frostegård, Å., Bedmar, E.J., Bakken, L.R., Delgado, M.J. (2015). Anoxic growth of *Ensifer meliloti* 1021 by N<sub>2</sub>O-reduction, a potential mitigation strategy. *Front Microbiol* 6, 537, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00537>.
- Bueno, E., Mesa, S., Bedmar, E.J., Richardson, D.J., Delgado, M.J. (2012). Bacterial adaptation of respiration from oxic to microoxic and anoxic conditions: Redox control. *Antioxid Redox Signal* 16, 819–852, <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4051>.
- Bueno, E., Mesa, S., Sánchez, C., Bedmar, E.J., Delgado, M.J. (2010). NifA is required for maximal expression of denitrification genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Environ Microbiol* 12, 393-400, <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02076.x>.
- Bueno, E., Robles, E.F., Torres, M.J., Krell, T., Bedmar, E.J., Delgado, M.J., Mesa, S. (2017). Disparate response to microoxia and nitrogen oxides of the *Bradyrhizobium japonicum* *napEDABC*, *nirK* and *norCBQD* denitrification genes. *Nitric Oxide* 68, 137-149, <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.02.002>.
- Bühler, D., Rossmann, R., Landolt, S., Balsiger, S., Fischer, H.-M., Hennecke, H. (2010). Disparate pathways for the biogenesis of cytochrome oxidases in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Biol Chem* 285, 15704-15713, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.085217>.
- Busby, P.E., Soman, C., Wagner, M.R., Friesen, M.L., Kremer, J., Bennett, A., *et al.* (2017). Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture. *PLoS Biol* 15(3), e2001793, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001793>.
- Butterbach-Bahl, K., Baggs, E.M., Dannenmann, M., Kiese, R., Zechmeister-Boltenstern, S. (2013). Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368, 20130122, <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0122>.
- Cabrera, J.J., Jiménez-Leiva, A., Tomás-Gallardo, L., Parejo, S., Casado, S., Torres, M.J., Bedmar, E.J., Delgado, M.J., Mesa, S. (2021). Dissection of FixK<sub>2</sub> protein-DNA interaction unveils new insights into *Bradyrhizobium diazoefficiens* lifestyles control. *Environ Microbiol* 23(10), 6194-6209, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15661>.
- Cabrera, J.J., Salas, A., Torres, M.J., Bedmar, E.J., Richardson, D.J., Gates, A.J., Delgado, M.J. (2016). An integrated biochemical system for nitrate assimilation and nitric oxide detoxification in *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem J* 473, 297-309, <https://doi.org/10.1042/BJ20150880>.
- Cabrera, J.J., Sánchez, C., Gates, A.J., Bedmar, E.J., Mesa, S., Richardson, D.J., Delgado, M.J. (2011). The nitric oxide response in plant-associated endosymbiotic bacteria. *Biochem Soc Trans* 39(6), 1880-1885, <https://doi.org/10.1042/BST20110732>.

- Calles, T., del Castillo, R., Baratelli, M., Xipsiti, M., Navarro, D.K. (2019a). The international year of pulses: final report Rome. Available from <http://www.wipo.int/amc/en/mediation/rules>.
- Calles, T., Xipsiti, M., del Castillo, R. (2019b). Legacy of the international year of pulses. *Environ Earth Sci* 78, 124, <https://doi.org/10.1007/s12665-019-8106-6>.
- Casse, F., Boucher, C., Julliot, J.S., Michel, M., Dénarié, J. (1979). Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J Gen Microbiol* 113, 229-242, <https://doi.org/10.1099/00221287-113-2-229>.
- Castroviejo, S. (2000). Leguminosae. In: *Flora Ibérica, Vol. VII (II)* (Talavera, S., Aedo, C., Castroviejo, S., Herrero, A., Romero, C., Salgueiro, F.C., Velayos, M. eds.), Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid, Spain, pp. 741-775.
- Chamizo-Ampudia, A., Sanz-Luque, E., Llamas, A., Galván, A., Fernández, E. (2017). Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis. *Trends Plant Sci* 22, 163-174, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.001>.
- Checucci, A., DiCenzo, G.C., Bazzicalupo, M., Mengoni, A. (2017). Trade, diplomacy, and warfare: the Quest for elite rhizobia inoculant strains. *Front Microbiol* 8, 2207, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02207>.
- Chen, W.M., Laevens, S., Lee, T.M., Coenye, T., de Vos, P., Mergeay, M., Vandamme, P. (2001). *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1729-1735, <https://doi.org/10.1099/00207713-51-5-1729>.
- Clark, M., Science, N.R., Paul, S., States, U. (2019). Changing dietary patterns as drivers of changing environmental impacts. In: *Encyclopedia of food security and sustainability*, vol 1. (Ferranti, P., Berry, E.M., Anderson, J.R., eds.), Elsevier, pp. 172–177, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21992-6>.
- Cook, D.R. (1999). *Medicago truncatula*—A model in the making! *Curr Opin Plant Biol* 2, 301-304, [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)80053-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)80053-3).
- Crews, T.E., Peoples, M.B. (2004). Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. *Agric Ecosyst Environ* 102, 279-297, <https://doi.org/10.1016/j.agee.2003.09.018>.
- Cristaldi, J.C., Ferroni, F., Duré, A.B., Ramírez, C.S., Dalosto, S.D., Rizzi, A.C., González, P.J., Rivas, M.G., Brondino, C.D. (2020). Heterologous production and functional characterization of *Bradyrhizobium japonicum* copper-containing nitrite reductase and its physiological redox partner cytochrome *c*<sub>550</sub>. *Metallomics* 12, 2084-2097, <https://doi.org/10.1039/d0mt00177e>.
- Cutruzzolà, F., Arese, M., Ranghino, G., van Pouderoyen, G., Canters, G., Brunori, M. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome *c*<sub>551</sub>: probing the role of the hydrophobic patch in electron transfer. *J Inorg Biochem* 88, 353-361, [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(01\)00390-7](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(01)00390-7).



- Daims, H., Lebedeva, E.V., Pjevac, P., *et al.* (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* 528, 504-523, <https://doi.org/10.1038/nature16461>.
- Daskalakis, V., Ohta, T., Kitagawa, T., Varotsis, C. (2015). Structure and properties of the catalytic site of nitric oxide reductase at ambient temperature. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1847, 1240-1244, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.06.014>.
- de Lajudie, P.M., Andrews, M., Ardley, J., *et al.* (2019). Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 69, 1852-1863, <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003426>.
- Delamuta, J.R., Ribeiro, R.A., Ormeño-Orrillo, E., Melo, I.S., Martínez-Romero, E., Hungría, M. (2013). Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 3342-3351, <https://doi.org/10.1099/ijms.0.049130-0>.
- Delgado, M.J., Bedmar, E.J., Downie, J.A. (1998). Genes involved in the formation and assembly of rhizobial cytochromes and their role in symbiotic nitrogen fixation. *Adv Microb Physiol* 40, 191-231, [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60132-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60132-0).
- Delgado, M.J., Bonnard, N., Tresierra-Ayala, A., Bedmar, E.J., Müller, P. (2003). The *Bradyrhizobium japonicum napEDABC* genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. *Microbiol* 149, 3395-3403, <https://doi.org/10.1099/mic.0.26620-0>.
- Delgado, M.J., Casella, S., Bedmar, E.J. (2007). Denitrification in rhizobia-legume symbiosis. In: *Biology of the nitrogen cycle* (Bothe, H., Ferguson, S.J., Newton, W.E., eds.), Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, pp. 83-91, <https://doi.org/10.1016/B978-044452857-5.50007-2>.
- Delgado, I., Lloveras, J. (2020) Historia y distribución de la alfalfa. In: *La alfalfa: agronomía y utilización* (Lloveras, J., Delgado, I., Chocarro C., eds.), Edicions de la Universitat de Lleida, Lleida, Spain, pp. 21-36, ISBN: 978-84-9144-246-2.
- del Giudice, J., Cam, Y., Damiani, I., Fung-Chat, F., Meilhoc, E., Bruand, C., Brouquisse, R., Puppo, A., Boscari, A. (2011). Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytol* 191, 405-417, <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03693.x>.
- de Vries, S., Suharti, S., Pouvreau, L.A.M. (2007). Nitric oxide reductase: Structural variations and catalytic mechanism. In: *Biology of the nitrogen cycle* (Bothe, H., Ferguson, S.J., Newton, W.E., eds.), Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, pp. 57-66, <https://doi.org/10.1016/B978-044452857-5.50005-9>.
- diCenzo, G.C., Zamani, M., Checcucci, A., Fondi, M., Griffiths, J.S., Finan, T.M., *et al.* (2019). Multidisciplinary approaches for studying rhizobium-legume symbioses. *Can J Microbiol* 65, 1-33, <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0377>.

- Dicks, A.P., Williams, D.L. (1996). Generation of nitric oxide from S-nitrosothiols using protein-bound  $\text{Cu}^{2+}$  sources. *Chem Biol* 3, 655-659, [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(96\)90133-7](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(96)90133-7).
- Dobbek, H. (2011). Structural aspects of mononuclear Mo/W-enzymes. *Coord Chem Rev* 255, 1104-1116, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.017>.
- Droppa, M., Masojidek, J., Rózsa, Z., Wolak, A., Horváth, L., Farkas, T., Horváth, G. (1987). Characteristics of Cu deficiency-induced inhibition of photosynthetic electron transport in spinach chloroplasts. *BBA-Bioenerg* 891(1), 75-84, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(87\)90085-5](https://doi.org/10.1016/0005-2728(87)90085-5).
- Durand, A., Azzouzi, A., Bourbon, M.L., Steunou, A.S., Liotenberg, S., Maeshima, A., Astier, C., Argentini, M., Saito, S., Ouchane, S. (2015). c-Type Cytochrome Assembly is a Key Target of Copper Toxicity within the Bacterial Periplasm. *mBio* 6(5), e01007-15, <https://doi.org/10.1128/mBio.01007-15>.
- Dwarakanath, S., Chaplin, A.K., Hough, M.A., Rigali, S., Vijgenboom, E., Worrall, J.A.R. (2012). Response to copper stress in *Streptomyces lividans* extends beyond genes under direct control of a copper-sensitive operon repressor protein (CsoR). *J Biol Chem* 287(21), 17833-17847, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.352740>.
- Einsle, O, Rees, D.C. (2020). Structural enzymology of nitrogenase enzymes. *Chem Rev* 120, 4969-5004, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00067>.
- Erisman, J.W., Galloway, J.N., Dise, N.B., *et al.* (2015). Nitrogen: too much of a vital resource. *Science Brief*. WWF Netherlands, Zeist, The Netherlands, ISBN: 978-90-74595-22-3.
- Erisman, J.W., Galloway, J.N., Seitzinger, S., Bleeker, A., Butterbach-Bahl, K. (2011). Reactive nitrogen in the environment and its effect on climate change. *Curr Opin Environ Sustain* 3, 281-290, <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2011.08.012>.
- Erisman, J.W., Sutton, M.A., Galloway, J., Klimont, Z., Winiwarter, W. (2008). How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geosci* 1, 636-639, <https://doi.org/10.1038/ngeo325>.
- Esclapez, J., Zafrilla, J., Martínez-Espinosa, R.M., Bonete, M.J. (2013). Cu-NirK from *Haloferax mediterranei* as an example of metalloprotein maturation and exportation via Tat system. *Biochim Biophys Acta* 1834, 1003-1009, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.03.002>.
- FAO (Food and Agriculture Organization) (2016). The climate is changing. Food and agriculture must too. Available from <https://www.fao.org/3/I5758E/I5758E.pdf> (Last access: July 12, 2022).
- FAOSTAT (2021). Fertilizers by Nutrient. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RFN> (Last access: July 10, 2022).

## References

- Felgate, H., Giannopoulos, G., Sullivan, M.J., Gates, A.J., Clarke, T.A., Baggs, E., Rowley, G., Richardson, D.J. (2012). The impact of copper, nitrate and carbon status on the emission of nitrous oxide by two species of bacteria with biochemically distinct denitrification pathways. *Environ Microbiol* 14, 1788-1800, <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02789.x>.
- Fernandes, J.C., Henriques, F.S. (1991). Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *Bot Rev* 57, 246-273, <https://doi.org/10.1007/BF02858564>.
- Fernández, N., Cabrera, J.J., Salazar, S., Parejo, S., Rodríguez, M.C., Lindemann, A., *et al.* (2016). Molecular determinants of negative regulation of the *Bradyrhizobium diazoefficiens* transcription factor FixK<sub>2</sub>. In: *Biological nitrogen fixation and beneficial plant-microbe interactions* (González-Andrés, F., James, E., eds.), Springer International Publishing, Cham, Switzerland, pp. 57–72, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-32528-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-32528-6_6).
- Fernández, N., Cabrera, J.J., Varadarajan, A.R., Lutz, S., Ledermann, R., Rosckitzki, B., Eberl, L., Bedmar, E.J., Fischer, H.-M., Pessi, G., Ahrens, C.H., Mesa, S. (2019). An Integrated Systems Approach Unveils New Aspects of Microoxia-Mediated Regulation in *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *Front Microbiol* 10, 924, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00924>.
- Fernández-López, M., Olivares, J., Bedmar, E.J. (1994). Two differentially regulated nitrate reductases required for nitrate-dependent, microaerobic growth of *Bradyrhizobium japonicum*. *Arch Microbiol* 162, 310-315.
- Forster, P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Berntsen, T., Betts, R., Fahey, D.W., Haywood, J., Lean, J., Lowe, D.C., Myhre, G., Nganga, J., Prinn, R., Raga, G., Schulz, M., Dorland, R.V. (2007). Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., Miller, H.L., eds.), Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, USA, pp. 129-234.
- Fowler, D., Steadman, C.E., Stevenson, D., *et al.* (2015). Effects of global change during the 21st century on the nitrogen cycle. *Atmos Chem Phys* 15, 13849-13893, <https://doi.org/10.5194/acp-15-13849-2015>.
- Foyer, C.H., Nguyen, H., Lam, H.-M. (2019). Legumes – The art and science of environmentally sustainable agriculture. *Plant Cell Environ* 42, 1-5, <https://doi.org/10.1111/pce.13497>.
- Fraústo da Silva, J.J.R., Williams, R.J.P. (2001). *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*, 2<sup>nd</sup> ed., Oxford University Press Inc., New York, USA.
- Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., *et al.* (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293, 668-672, <https://doi.org/10.1126/science.1060966>.

- García-Rodríguez, F.M., Toro, N. (2000). *Sinorhizobium meliloti nfe* (nodulation formation efficiency) genes exhibit temporal and spatial expression patterns similar to those of genes involved in symbiotic nitrogen fixation. *Mol Plant Microbe Interact* 13(6), 583-591, <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.6.583>.
- Gilles-González, M.A., González, G., Sousa, E.H., Tuckerman, J. (2008). Oxygen-sensing histidine-protein kinases: Assays of ligand binding and turnover of response-regulator substrates. *Methods Enzymol* 437, 173-189, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)37010-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)37010-9).
- Girard, L., Brom, S., Dávalos, A., López, O., Soberón, M., Romero, D. (2000). Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL*-*fixK* cascade. *Mol Plant Microbe Interact* 13(12), 1283-1292, <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.12.1283>.
- Goddard, A.D., Bali, S., Mavridou, D.A., Luque-Almagro, V.M., Gates, A.J., Roldán, M.D., *et al.* (2017). The *Paracoccus denitrificans* NarK-like nitrate and nitrite transporters-probing nitrate uptake and nitrate/nitrite exchange mechanisms. *Mol Microbiol* 103, 117–133, <https://doi.org/10.1111/mmi.13546>.
- Godfray, H.C.J., Aveyard, P., Garnett, T., Hall, J.W., Key, T.J., Lorimer, J., *et al.* (2018). Meat consumption, health, and the environment. *Science* 361(6399): eaam5324, <https://doi.org/10.1126/science.aam5324>.
- Gómez-Hernández, N., Reyes-González, A., Sánchez, C., Mora, Y., Delgado, M.J., Girard, L. (2011). Regulation and symbiotic role of *nirK* and *norC* expression in *Rhizobium etli*. *Mol Plant Microbe Interact* 24, 233-245, <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-10-0173>.
- González, P.J., Correia, C., Moura, I., Brondino, C.D., Moura, J.J.G. (2006). Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *J Inorg Biochem* 100, 1015–1023, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.11.024>.
- González-Guerrero, M., Escudero, V., Sáez, A., Tejada-Jiménez, M. (2016). Transition metal transport in plants and associated endosymbionts: arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia. *Front Plant Sci* 7, 1088, <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01088>.
- Graf, D.R.H., Jones, C.M., Hallin, S. (2014). Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N<sub>2</sub>O emissions. *PLoS One* 9, e114118, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114118>.
- Grahl, S., Maillard, J., Spronk, C.A.E.M., Vuister, G.W., Sargent, F. (2012). Overlapping transport and chaperone-binding functions within a bacterial twin-arginine signal peptide. *Mol Microbiol* 83, 1254–1267, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08005.x>.
- Granger, J., Ward, B.B. (2003). Accumulation of nitrogen oxides in copper-limited cultures of denitrifying bacteria. *Limnol Oceanogr* 48, 313-318, <https://doi.org/10.4319/lo.2003.48.1.0313>.

## References

- Grass, G., Rensing, C. Solioz, M. (2011). Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl Environ Microbiol* 77(5), 1541-1547, <https://doi.org/10.1128/AEM.02766-10>.
- Hageman, R.H., Hucklesby, D.P. (1971). Nitrate reductase from higher plants. In: *Methods in Enzymology* (San Pietro, A., ed.), Academic Press, London, UK, vol. 23, pp. 491–503, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(71\)23121-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(71)23121-9).
- Hallin, S., Philippot, L., Löffler, F.E., Sanford, R.A., Jones, C.M. (2018). Genomics and ecology of novel N<sub>2</sub>O-reducing microorganisms. *Trends Microbiol* 26(1), 43-55, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.003>.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580, [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8).
- Hart, S.C., Myrold, D.D. (1996). 15N tracer studies of soil nitrogen transformations. In: *Mass Spectrometry of Soils* (Boutton, T.W., Yamasaki, A., eds.), Marcel-Dekker, New York, USA, pp. 225-245, ISBN: 0824796993 9780824796990.
- Hauser, F., Pessi, G., Friberg, M., Weber, C., Rusca, N., Lindemann, A., *et al.* (2007). Dissection of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA+ $\sigma^{54}$  regulon, and identification of a ferredoxin gene (*fdxN*) for symbiotic nitrogen fixation. *Mol Genet Genomics* 278, 255-271, <https://doi.org/10.1007/s00438-007-0246-9>.
- Heil, J., Vereecken, H., Brüggemann, N. (2016). A review of chemical reactions of nitrification intermediates and their role in nitrogen cycling and nitrogen trace gas formation in soil. *Eur J Soil Sci* 67, 23–39, <https://doi.org/10.1111/ejss.12306>.
- Hein, S., Simon, J. (2019). Bacterial nitrous oxide respiration: electron transport chains and copper transfer reactions. *Adv Microb Physiol* 75, 137-175, <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2019.07.001>.
- Herridge, D.F., Peoples, M.B., Boddey, R.M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil*, 311, 1-18, <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9668-3>.
- Hidalgo-García, A., Torres, M.J., Salas, A., Bedmar, E.J., Girard, L., Delgado, M.J. (2019). *Rhizobium etli* produces nitrous oxide by coupling the assimilatory and denitrification pathways. *Front Microbiol* 10, 980, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00980>.
- Higgins, S.A., Welsh, A., Orellana, L.H., Konstantinidis, K.T., Chee-Sanford, J.C., Sanford, R.A., Schadt, C.W., Löffler, F.E. (2016). Detection and diversity of fungal nitric oxide reductase genes (*p450nor*) in agricultural soils. *Appl Environ Microbiol* 82, 2919–2928, <https://doi.org/10.1128/AEM.00243-16>.
- Hink, L., Nicol, G.W., Prosser, J.I. (2017). Archaea produce lower yields of N<sub>2</sub>O than bacteria during aerobic ammonia oxidation in soil. *Environ Microbiol* 19(12), 4829-4837, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13282>.
- Hino, T., Matsumoto, Y., Nagano, S., Sugimoto, H., Fukumori, Y., Murata, T., *et al.* (2010). Structural basis of biological N<sub>2</sub>O generation by bacterial nitric oxide reductase. *Science* 330, 1666–1670, <https://doi.org/10.1126/science.1195591>.

- Honaker, R.W., Dhiman, R.K., Narayanasamy, P., Crick, D.C., Voskuil, M.I. (2010). DosS responds to a reduced electron transport system to induce the *Mycobacterium tuberculosis* DosR regulon. *J Bacteriol* 192, 6447-6455, <https://doi.org/10.1128/JB.00978-10>.
- Honisch, U., Zumft, W.G. (2003). Operon structure and regulation of the *nos* gene region of *Pseudomonas stutzeri*, encoding an ABC-Type ATPase for maturation of nitrous oxide reductase. *J Bacteriol* 185, 1895-1902, <https://doi.org/10.1128/JB.185.6.1895-1902.2003>.
- Horchani, F., Prevot, M., Boscari, A., Evangelisti, E., Meilhoc, E., Bruand, C., *et al.* (2011). Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules. *Plant Physiol* 155, 1023-1036, <https://doi.org/10.1104/pp.110.166140>.
- Huaranga-Joaquín, A., de Arenas, L.E., de Bustillos, E.M., Mayta, F.C. (2022). Importancia de las leguminosas en la agricultura sostenible. In: *Las leguminosas y su microbioma en la agricultura sostenible* (Valdez-Núñez, R.A., Silvera-Pablo, C., Bedmar, E.J., eds.), Universidad Nacional de Barranca, Lima, Perú, pp. 27-42, ISBN: 978-612-47636-3-2.
- Inaba, S., Ikenishi, F., Itakura, M., Kikuchi, M., Eda, S., Chiba, N., *et al.* (2012). N<sub>2</sub>O emission from degraded soybean nodules depends on denitrification by *Bradyrhizobium japonicum* and other microbes in the rhizosphere. *Microbes Environ* 27(4), 470-476, <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12100>.
- IPCC (2019). Summary for Policymakers. In: *Climate Change and Land: an IPCC Special Report on Climate Change, Desertification, Land Degradation, Sustainable Land Management, Food Security, and Greenhouse Gas Fluxes in Terrestrial Ecosystems* (Shukla, P.R., Skea, J., Calvo Buendia, E., Masson-Delmotte, V., Pörtner, H.-O., Roberts, D.C., Zhai, P., Slade, R., Connors, S., van Diemen, R., Ferrat, M., Haughey, E., Luz, S., Neogi, S., Pathak, M., Petzold, J., Portugal Pereira, J., Vyas, P., Huntley, E., Kissick, K., Belkacemi, M., Malley, J., eds.). In press.
- IPCC (2022). Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2022: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Shukla, P.R., Skea, J., Slade, R., Al Khourdajie, A., van Diemen, R., McCollum, D., Pathak, M., Some, S., Vyas, P., Fradera, R., Belkacemi, R., Hasija, A., Lisboa, G., Luz, S., Malley, J., eds.), Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, USA, <https://doi.org/10.1017/9781009157926.001>.
- Irisarri, P., Cardozo, G., Tartaglia, C., Reyno, R., Gutiérrez, P., Lattanzi, F.A., *et al.* (2019). Selection of competitive and efficient Rhizobia Strains for White Clover. *Front Microbiol* 10, 768, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00768>.
- Itakura, M., Uchida, Y., Akiyama, H., Hoshino, Y.T., Shimomura, Y., Morimoto, S., *et al.* (2013). Mitigation of nitrous oxide emissions from soils by *Bradyrhizobium japonicum* inoculation. *Nat Clim Chang* 3, 208-212, <https://doi.org/10.1038/nclimate1734>.

## References

- Jang, J., Ashida, N., Kai, A., Isobe, K., Nishizawa, T., Otsuka, S., Yokota, A., Senoo, K., Ishii, S. (2018). Presence of Cu-Type (NirK) and *cd*<sub>1</sub>-Type (NirS) Nitrite Reductase Genes in the Denitrifying Bacterium *Bradyrhizobium nitroreducens* sp. nov. *Microbes Environ* 33, 326-331, <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME18039>.
- Jiménez-Leiva, A. (2019). Caracterización molecular de las proteínas FixK<sub>2</sub> y NnrR que controlan la desnitrificación en *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Doctoral Thesis, Universidad de Granada, Granada, Spain, <http://hdl.handle.net/10481/59614>.
- Jiménez-Leiva, A., Cabrera, J.J., Bueno, E., Torres, M.J., Salazar, S., Bedmar, E.J., *et al.* (2019). Expanding the regulon of the *Bradyrhizobium diazoefficiens* NnrR transcription factor: New insights into the denitrification pathway. *Front Microbiol* 10, 1926, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01926>.
- Jiménez-López, J.C., Singh, K.B., Clemente, A., Nelson, M.N., Ochatt, S., Smith, P.M.C. (2020). Editorial: Legumes for Global Food Security. *Front Plant Sci* 11, 926, <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00926>.
- Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E., Walker, G.C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* 5(8), 619-633, <https://doi.org/10.1038/nrmicro1705>.
- Jormakka, M., Byrne, B., Iwata, S. (2003). Protonmotive force generation by a redox loop mechanism. *FEBS Lett* 545, 25-30, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00389-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00389-2).
- Jünemann, S. (1997). Cytochrome *bd* terminal oxidase. *BBA-Bioenerg* 1321, 107-127, [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00046-7).
- Kabata-Pendias, A. (2011). *Trace Elements in Soils and Plants*, 4<sup>th</sup> ed., CRC Press LLC, Florida, USA.
- Kahle, M., ter Beek, J., Hosler, J.P., Ädelroth, P. (2018). The insertion of the non-heme Fe<sub>B</sub> cofactor into nitric oxide reductase from *P. denitrificans* depends on NorQ and NorD accessory proteins. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1859, 1051-1058, <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2018.05.020>.
- Kanehisa, M. (2019). Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Sci* 28, 1947-1951, <https://doi.org/10.1002/pro.3715>.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Ishiguro-Watanabe, M., Tanabe, M. (2021). KEGG: integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Res* 49, D545-D551, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa970>.
- Kanehisa, M., Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* 28, 27-30, <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., *et al.* (2002). Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* 9, 189-197, <https://doi.org/10.1093/dnares/9.6.189>.

- Kanter, D.R., Zhang, X., Mauzerall, D.L., Malyshev, S., Shevliakova, E. (2016). The importance of climate change and nitrogen use efficiency for future nitrous oxide emissions from agriculture. *Environ Res Lett* 11, 094003, <https://doi.org/10.1088/1748-9326/11/9/094003>.
- Kohlen, W., Ng, J.L.P., Deinum, E.E., Mathesius, U. (2018). Auxin transport, metabolism, and signalling during nodule initiation: indeterminate and determinate nodules. *J Exp Bot* 69(2), 229-244, <https://doi.org/10.1093/jxb/erx308>.
- Kool, D.M., Dolfig, J., Wrage, N., Van Groenigen, J.W. (2011). Nitrifier denitrification as a distinct and significant source of nitrous oxide from soil. *Soil Biol Biochem* 43, 174–178, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.09.030>.
- Kovach, M.E., Phillips, R.W., Elzer, P.H., Roop 2<sup>nd</sup>, R.M., Peterson, K.M. (1994). pBRR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* 16(5), 800-802, PMID: 8068328.
- Kozlowski, J.A., Stieglmeier, M., Schleper, C., *et al.* (2016). Pathways and key intermediates required for obligate aerobic ammonia-dependent chemolitho-trophy in bacteria and Thaumarchaeota. *ISME J* 10, 1836–1845, <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.2>.
- Kraft, B., Strous, M., Tegetmeyer, H.E. (2011). Microbial nitrate respiration—Genes, enzymes and environmental distribution. *J Biotechnol* 155, 104–117, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.12.025>.
- Kudva, R., Denks, K., Kuhn, P., Vogt, A., Müller, M., Koch, H.-G. (2013). Protein translocation across the inner membrane of Gram-negative bacteria: the Sec and Tat dependent protein transport pathways. *Res Microbiol* 164, 505-534, <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.016>.
- LaRue, T.A., Child, J.J. (1979). Sensitive fluorometric assay for leghemoglobin. *Anal Biochem* 92(1), 11-15, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90618-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90618-3).
- Lecomte, S.M., Nesme, X., Franzino, T., Villard, C., Pivard, M., Vial, L., Doré, J., Hommais, F., Haichar, F.E.Z. (2021). *Agrobacterium fabrum* C58 involved nitrate reductase NapA and antisense RNA NorR to denitrify. *FEMS Microbiol Ecol* 97(1), fiae233, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae233>.
- Leonard, L.T. (1943). A simple assembly for use in the testing of cultures of Rhizobia. *J Bacteriol* 45, 523-527, <https://doi.org/10.1128/jb.45.6.523-527.1943>.
- Le Treut, H., Somerville, R., Cubasch, U., Ding, Y., Mauritzen, C., Mokssit, A., Peterson, T., Prather, M. (2007). Historical Overview of Climate Change. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., Miller, H.L., eds.), Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, USA, pp. 93–127.



## References

- Li, C.Y., Hu, H.W., Chen, Q.L., Chen, D.L., He, J.Z. (2019). Comammox *Nitrospira* play an active role in nitrification of agricultural soils amended with nitrogen fertilizers. *Soil Biol Biochem* 138, 107609, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107609>.
- Li, S., Yang, X., Buchner, D., Wang, H., Xu, H., Haderlein, S.B., Zhu, Y. (2018). Increased copper levels inhibit denitrification in urban soils. *Earth Environ Sci Trans R Soc Edinb* 109 (3-4), 421-427, <https://doi.org/10.1017/S1755691018000592>.
- Liang, J., Zhang, M., Lu, M., Li, Z., Shen, X., Chou, M., Wei, G. (2016). Functional characterization of a *csoR-cueA* divergon in *Bradyrhizobium liaoningense* CCNWSX0360, involved in copper, zinc and cadmium cotolerance. *Sci Rep* 6, 35155, <https://doi.org/10.1038/srep35155>.
- Liu, B., Frostegård, Å., Bakken, L.R. (2014). Impaired reduction of N<sub>2</sub>O to N<sub>2</sub> in acid soil is due to a post transcriptional interference with the expression of *nosZ*. *mBio* 5(3), e01383-14, <https://doi.org/10.1128/mBio.01383-14>.
- Liu, T., Ramesh, A., Ma, Z., Ward, S.K., Zhang, L., George, G.N., Talaat, A.M., Sacchettini, J.C., Giedroc, D.P. (2007). CsoR is a novel *Mycobacterium tuberculosis* copper-sensing transcriptional regulator. *Nat Chem Biol* 3, 60-68, <https://doi.org/10.1038/nchembio844>.
- Lloveras, J., Delgado, I., Chocarro, C. (2020). Fertilización. In: *La alfalfa: agronomía y utilización* (Lloveras, J., Delgado, I., Chocarro, C., eds.), Edicions de la Universitat de Lleida, Lleida, Spain, pp. 79-92, ISBN: 978-84-9144-246-2.
- Lu, M., Jiao, S., Gao, E., Song, X., Li, Z., Hao, X., Rensing, C., Wei, G. (2017). Transcriptome Response to Heavy Metals in *Sinorhizobium meliloti* CCNWSX0020 Reveals New Metal Resistance Determinants That Also Promote Bioremediation by *Medicago lupulina* in Metal-Contaminated Soil. *Appl Environ Microbiol* 83, e01244-17, <https://doi.org/10.1128/AEM.01244-17>.
- Macdiarmid, J.I., Whybrow, S. (2019). Nutrition from a climate change perspective. *Proc Nutr Soc* 78(3), 380–387, <https://doi.org/10.1017/S0029665118002896>.
- MacFarling-Meure, C., Etheridge, D., Trudinger, C., Steele, P., Langenfelds, R., van Ommen, T., Smith, A., Elkins, J. (2006). Law Dome CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O ice core records extended to 2000 years BP. *Geophys Res Lett* 33(14), L14810, <https://doi.org/10.1029/2006gl026152>.
- Maeda, K., Spor, A., Edel-Hermann, V., et al. (2015). N<sub>2</sub>O production, a widespread trait in fungi. *Sci Rep* 5, 9697, <https://doi.org/10.1038/srep09697>.
- Mahinthichaichan, P., Gennis, R.B., Tajkhorshid, E. (2018). Bacterial denitrifying nitric oxide reductases and aerobic respiratory terminal oxidases use similar delivery pathways for their molecular substrates. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1859, 712-724, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.06.002>.
- Mahmud, K., Makaju, S., Ibrahim, R., Missaoui, A. (2020). Current Progress in Nitrogen Fixing Plants and Microbiome Research. *Plants* 9, 97, <https://doi.org/10.3390/plants9010097>.

- Maillard, J., Spronk, C.A.E.M., Buchanan, G., Lyall, V., Richardson, D.J., Palmer, T., Vuister, G.W., Sargent, F. (2007). Structural diversity in twin-arginine signal peptide-binding proteins. *PNAS* 104, 15641-15646, <https://doi.org/10.1073/pnas.0703967104>.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) (2022). <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/leguminosas-y-oleaginosas/oleaginosas.aspx> (Last access: July 12, 2022); annex: [https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/anexooleaginosas2021\\_tcm30-563740.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/anexooleaginosas2021_tcm30-563740.pdf).
- Marcus, S.A., Sidiropulos, S.W., Steinberg, H., Talaat, A.M. (2016). CsoR Is Essential for Maintaining Copper Homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* 11, e0151816, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151816>.
- Matsubara, T., Frunzke, K., Zumft, W.G. (1982). Modulation by copper of the products of nitrite respiration in *Pseudomonas perfectomarinus*. *J Bacteriol* 149, 816-823, <https://doi.org/10.1128/jb.149.3.816-823.1982>.
- McEwan, A.G., Jackson, J.B., Ferguson, S.J. (1984). Rationalization of properties of nitrate reductases in *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch Microbiol* 137, 344-349, <https://doi.org/10.1007/BF00410732>.
- Meade, H.M., Long, S.R., Ruvkun, G.B., Brown, S.E., Ausubel, F.M. (1982). Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* 149(1), 114-122, <https://doi.org/10.1128/jb.149.1.114-122.1982>.
- Meakin, G.E., Bueno, E., Jepson, B., Bedmar, E.J., Richardson, D.J., Delgado, M.J. (2007). The contribution of bacteroidal nitrate and nitrite reduction to the formation of nitrosylhaemoglobin complexes in soybean root nodules. *Microbiol* 153, 411-419, <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/000059-0>.
- Meilhoc, E., Cam, Y., Skapski, A., Bruand, C. (2010). The response to nitric oxide of the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* 23, 748-759, <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-6-0748>.
- Mendoza-Suárez, M., Andersen, S.U., Poole, P.S., Sánchez-Cañizares, C. (2021). Competition, Nodule Occupancy, and Persistence of Inoculant Strains: Key Factors in the *Rhizobium*-Legume Symbioses. *Front Plant Sci* 12, 690567, <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.690567>.
- Mesa, S., Alché, J.D., Bedmar, E., Delgado, M.J. (2004). Expression of *nir*, *nor* and *nos* denitrification genes from *Bradyrhizobium japonicum* in soybean root nodules. *Physiol Plant* 120, 205-211, <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.0211.x>.
- Mesa, S., Bedmar, E.J., Chanfon, A., Hennecke, H., Fischer, H.M. (2003). *Bradyrhizobium japonicum* NnrR, a denitrification regulator, expands the FixLJ-FixK<sub>2</sub> regulatory cascade. *J Bacteriol* 185, 3978-3982, <https://doi.org/10.1128/JB.185.13.3978-3982.2003>.

## References

- Mesa, S., Hauser, F., Friberg, M., Malaguti, E., Fischer, H.-M., Hennecke, H. (2008). Comprehensive assessment of the regulons controlled by the FixLJ-FixK<sub>2</sub>-FixK<sub>1</sub> cascade in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 190, 6568-6579, <https://doi.org/10.1128/JB.00748-08>.
- Mesa, S., Velasco, L., Manzanera, M.E., Delgado, M.J., Bedmar, E.J. (2002). Characterization of the *norCBQD* genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiol* 148, 3553-3560, <https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3553>.
- Miller, J.H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. *Nature* 411, 948-950, <https://doi.org/10.1038/35082070>.
- Müller, C., Zhang, L., Zipfel, S., Topitsch, A., Lutz, M., Eckert, J., Prasser, B., Chami, M., Lü, W., Du, J., Einsle, O. (2022). Molecular interplay of an assembly machinery for nitrous oxide reductase. *Nature* 608, 626-631, <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05015-2>.
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett* 8, 199-216, <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>.
- Neyrolles, O., Wolschendorf, F., Mitra, A., Niederweis, M. (2015). *Mycobacteria*, metals, and the macrophage. *Immunol Rev* 264, 249-263, <https://doi.org/10.1111/imr.12265>.
- Nicke, T., Schnitzer, T., Münch, K., Adamczack, J., Haufschildt, K., Buchmeier, S., Kucklick, M., Felgenträger, U., Jänsch, L., Riedel, K., Layer, G. (2013). Maturation of the cytochrome *cd*<sub>1</sub> nitrite reductase NirS from *Pseudomonas aeruginosa* requires transient interactions between the three proteins NirS, NirN and NirF. *Biosci Rep* 33, e00048, <https://doi.org/10.1042/BSR20130043>.
- Nienaber, A., Huber, A., Gottfert, M., Hennecke, H., Fischer, H.-M. (2000). Three new NifA-regulated genes in the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic gene region discovered by competitive DNA-RNA hybridization. *J Bacteriol* 182, 1472-1480, <https://doi.org/10.1128/jb.182.6.1472-1480.2000>.
- Nikolaevna, G., Sergeevna, M., Fjodorovna, N., Anatoljevna, N. (2016). Resistance of plants to Cu stress: transgenesis. In: *Plant Metal Interaction. Emerging Remediation Techniques* (Ahmad, P., ed.), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 69-114, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00004-7>.
- Nilavongse, A., Brondijk, T.H.C., Overton, T.W., Richardson, D.J., Leach, E.R., Cole, J.A. (2006). The NapF protein of the *Escherichia coli* periplasmic nitrate reductase system: Demonstration of a cytoplasmic location and interaction with the catalytic subunit, NapA. *Microbiol* 152, 3227-3237, <https://doi.org/10.1099/mic.0.29157-0>.

- Nogales, J., Muñoz, S., Olivares, J., Sanjuán, J. (2006). *Sinorhizobium meliloti* genes involved in tolerance to the antimicrobial peptide protamine. *FEMS Microbiol Lett* 264(2),160-167, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00445.x>.
- Nojiri, M. (2017). Structure and function of copper nitrite reductase. In: *Metalloenzymes in denitrification: Applications and environmental impacts* (Moura, I., Moura, J.J., Pauleta, S.R., Maia, L.B., eds.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 91-113, <https://doi.org/10.1039/9781782623762-00091>.
- Olaya-Abril, A., Hidalgo-Carrillo, J., Luque-Almagro, V.M., Fuentes-Almagro, C., Urbano, F.J., Moreno-Vivián, C., Richardson, D.J., Roldán, M.D. (2018). Exploring the Denitrification Proteome of *Paracoccus denitrificans* PD1222. *Front Microbiol* 9, 1137, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01137>.
- Onishchuk, O.P., Vorobyov, N.I., Provorov, N.A. (2017). Nodulation competitiveness of nodule bacteria: genetic control and adaptive significance: review. *Appl Biochem Microbiol* 53, 131-139, <https://doi.org/10.1134/S0003683817020132>.
- Panagos, P., Ballabio, C., Lugato, E., Jones, A., Borrelli, P., Scarpa, S., Orgiazzi, A., Montanarella, L. (2018). Potential sources of anthropogenic copper inputs to European agricultural soils. *Sustainability* 10(7), 2380, <https://doi.org/10.3390/su10072380>.
- Pauleta, S.R., Carepo, M.S.P., Moura, I. (2019). Source and reduction of nitrous oxide. *Coord Chem Rev* 387, 436-449, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.02.005>.
- Pauleta, S.R., Carreira, C., Moura, I. (2017). Insights into nitrous oxide reductase. In: *Metalloenzymes in denitrification: Applications and environmental impacts* (Moura, I., Moura, J.J., Pauleta, S.R., Maia, L.B., eds.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 141-169, <https://doi.org/10.1039/9781782623762-00141>.
- Payne, R.J., Dise, N.B., Stevens, C.J., Gowing, D.J., BEGIN Partners (2013). Impact of nitrogen deposition at the species level. *PNAS* 113, 984-987, <https://doi.org/10.1073/pnas.1214299109>.
- Pearson, I.V., Page, M.D., van Spanning, R.J.M., Ferguson, S.J. (2003). A Mutant of *Paracoccus denitrificans* with Disrupted Genes Coding for Cytochrome *c*<sub>550</sub> and Pseudoazurin Establishes These Two Proteins as the In Vivo Electron Donors to Cytochrome *cd*<sub>1</sub> Nitrite Reductase. *J Bacteriol* 185, 6308, <https://doi.org/10.1128/JB.185.21.6308-6315.2003>.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, 2002-2007, <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- Philippot, L., Andert, J., Jones, C.M., Bru, D., Hallin, S. (2011). Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N<sub>2</sub>O emissions from soil. *Glob Change Biol* 17, 1497–1504, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02334.x>.

## References

- Pinchbeck, B.J., Soriano-Laguna, M.J., Sullivan, M.J., Luque-Almagro, V.M., Rowley, G., Ferguson, S.J., *et al.* (2019). A dual functional redox enzyme maturation protein for respiratory and assimilatory nitrate reductases in bacteria. *Mol Microbiol* 111, 1592–1603, <https://doi.org/10.1111/mmi.14239>.
- Pinty, B., Lavergne, T., Kaminski, T., Aussedat, O., Giering, R., Gobron, N., Taberner, M., Verstraete, M.M., Voßbeck, M., Widlowski, J.L. (2008). Partitioning the solar radiant fluxes in forest canopies in the presence of snow. *J Geophys Res* 113(D4), D04104, <https://doi.org/10.1029/2007JD009096>.
- Pobigaylo, N., Wetter, D., Szymczak, S., Schiller, U., Kurtz, S., Meyer, F., Nattkemper, T.W., Becker, A. (2006) Construction of a large signature-tagged mini-Tn5 transposon library and its application to mutagenesis of *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* 72(6), 4329-4337, <https://doi.org/10.1128/AEM.03072-05>.
- Poole, P., Ramachandran, V., Terpolilli, J. (2018). Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. *Nat Rev Microbiol* 16, 291-303, <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.171>.
- Prendergast-Miller, M.T., Baggs, E.M., Johnson, D. (2011). Nitrous oxide production by the ectomycorrhizal fungi *Paxillus involutus* and *Tylospora fibrillosa*. *FEMS Microbiol Lett* 316, 31–35, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02187.x>.
- Printz, B., Guerriero, G., Sergeant, K., Audinot, J.-N., Guignard, C., Renaut, J., Lutts, S., Hausman, J.-F. (2016). Combining -Omics to Unravel the Impact of Copper Nutrition on Alfalfa (*Medicago sativa*) Stem Metabolism. *Plant Cell Physiol* 57(2), 407-422, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw001>.
- Rademacher, C., Masepohl, B. (2012). Copper-responsive gene regulation in bacteria. *Microbiol* 158, 2451-2464, <https://doi.org/10.1099/mic.0.058487-0>.
- Regensburger, B., Hennecke, H. (1983). RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. *Arch Microbiol* 135, 103–109, <https://doi.org/10.1007/BF00408017>.
- Richardson, D.J. (2011). Redox complexes of the nitrogen cycle. In: *Nitrogen cycling in bacteria* (Moir, J.W.B., ed.), Caister Academic Press, Norkfolk, UK, pp. 23–39, <https://doi.org/10.21775/9781912530069>.
- Richardson, D., Felgate, H., Watmough, N., Thomson, A., Baggs, E. (2009). Mitigating release of the potent greenhouse gas N<sub>2</sub>O from the nitrogen cycle - could enzymic regulation hold the key? *Trends Biotechnol* 27, 388-397, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.03.009>.
- Richardson, D., Sawers, G. (2002). Structural biology. PMF though the redox loop. *Science* 295, 1842-1843, <https://doi.org/10.1126/science.1070366>.
- Richardson, D.J., Wehrfritz, J.-M., Keech, A., Crossman, L.C., Roldan, M.D., Sears, H.J., Butler, C.S., Reilly, A., Moir, J.W.B., Berks, B.C., *et al.* (1998). The diversity of redox proteins involved in bacterial heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Biochem Soc Trans* 26, 401-408, <https://doi.org/10.1042/bst0260401>.

- Rigaud, J., Puppo, A. (1975). Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J Gen Microbiol* 88, 223-228, <https://doi.org/10.1099/00221287-88-2-223>.
- Rinaldo, S., Arcovito, A., Giardina, G., Castiglione, N., Brunori, M., Cutruzzolà, F. (2008). New insights into the activity of *Pseudomonas aeruginosa* *cd*<sub>1</sub> nitrite reductase. *Biochem Soc Trans* 36, 1155-1159, <https://doi.org/10.1042/BST0361155>.
- Rinaldo, S., Giardina, G., Cutruzzolà, F. (2017). Nitrite reductase-cytochrome *cd*<sub>1</sub>. In: *Metalloenzymes in denitrification: Applications and environmental impacts* (Moura, I., Moura, J.J., Pauleta, S.R., Maia, L.B., eds.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 59-90, <https://doi.org/10.1039/9781782623762-00059>.
- Rinaldo, S., Sam, K.A., Castiglione, N., Stelitano, V., Arcovito, A., Brunori, M., Allen, J.W.A., Ferguson, S.J., Cutruzzolà, F. (2011). Observation of fast release of NO from ferrous *d*<sub>1</sub> haem allows formulation of a unified reaction mechanism for cytochrome *cd*<sub>1</sub> nitrite reductases. *Biochem J* 435, 217-225, <https://doi.org/10.1042/BJ20101615>.
- Robertsen, B.K., Aman, P., Darvill, A.G., McNeil, M., Albersheim, P. (1981). Host-Symbiont Interactions: V. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiol* 67(3), 389-400, <https://doi.org/10.1104/pp.67.3.389>.
- Robles, E.F., Sánchez, C., Bonnard, N., Delgado, M.J., Bedmar, E.J. (2006). The *Bradyrhizobium japonicum* *napEDABC* genes are controlled by the FixLJ-FixK<sub>2</sub>-NnrR regulatory cascade. *Biochem Soc Trans* 34, 108-110, <https://doi.org/10.1042/BST0340108>.
- Rockström, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, A., Chapin, F.S., 3rd, Lambin, E.F., *et al.* (2009). A safe operating space for humanity. *Nature* 461, 472-475, <https://doi.org/10.1038/461472a>.
- Rodríguez, R.L., Tait, R.C. (1983). *Recombinant DNA Techniques: An Introduction*, Addison-Wesley, Reading, Massachusetts, USA, [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(84\)90140-7](https://doi.org/10.1016/0307-4412(84)90140-7).
- Rosenblueth, M., Ormeño-Orrillo, E., López-López, A., Rogel, M.A., Reyes-Hernández, B.J., Martínez-Romero, J.C., Reddy, P.M., Martínez-Romero, E. (2018). Nitrogen Fixation in Cereals. *Front Microbiol* 9, 1794, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01794>.
- Ruiz, B., Le Scornet, A., Sauviac, L., Rémy, A., Bruand, C., Meilhoc, E. (2019). The nitrate assimilatory pathway in *Sinorhizobium meliloti*: Contribution to NO production. *Front Microbiol* 10, 1526, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01526>.
- Rutten, P.J., Poole, P.S. (2019). Oxygen regulatory mechanisms of nitrogen fixation in rhizobia. *Adv Microb Physiol* 75, 325-389, <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2019.08.001>.

## References

- Rütting, T., Boeckx, P., Müller, C., Klemetsson, L. (2011). Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle. *Biogeosciences* 8, 1779–1791, <https://doi.org/10.5194/bg-8-1779-2011>.
- Saglam, A., Yetissin, F., Demiralay, M., Terzi, R. (2016). Copper stress and responses in plants. In: *Plant Metal Interaction. Emerging Remediation Techniques* (Ahmad, P., ed.), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 21-40, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00002-3>.
- Sahrawat, K.L. (2008). Factors affecting nitrification in soils. *Commun Soil Sci Plant Anal* 39, 1436-1446, <https://doi.org/10.1080/00103620802004235>.
- Sakamoto, K., Agari, Y., Agari, K., Kuramitsu, S., Shinkai, A. (2010). Structural and functional characterization of the transcriptional repressor CsoR from *Thermus thermophilus* HB8. *Microbiol* 156, 1993-2005, <https://doi.org/10.1099/mic.0.037382-0>.
- Salas, A., Cabrera, J.J., Jiménez-Leiva, A., Mesa, S., Bedmar, E.J., Richardson, D.J., Gates, A.J., Delgado, M.J. (2021). Bacterial nitric oxide metabolism: recent insights in rhizobia. *Adv Microb Physiol* 78, 259-315, <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2021.05.001>.
- Salas, A., Tortosa, G., Hidalgo-García, A., Delgado, A., Bedmar, E.J., Richardson, D.J., Gates, A.J., Delgado, M.J., 2020. The hemoglobin Bjgb from *Bradyrhizobium diazoefficiens* controls NO homeostasis in soybean nodules to protect symbiotic nitrogen fixation. *Front Microbiol* 10, 2915, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02915>.
- Sambrook, J., Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sameshima-Saito, R., Chiba, K., Hirayama, J., Itakura, M., Mitsui, H., Eda, S., Minamisawa, K. (2006). Symbiotic *Bradyrhizobium japonicum* reduces N<sub>2</sub>O surrounding the soybean root system via nitrous oxide reductase. *Appl Environ Microbiol* 72, 2526-2532, <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2526-2532.2006>.
- Sánchez, C., Gates, A.J., Meakin, G.E., Uchiumi, T., Girard, L., Richardson, D.J., Bedmar, E.J., Delgado, M.J. (2010). Production of nitric oxide and nitrosylhemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. *Mol Plant Microbe Interact* 23(5), 702-711, <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-5-0702>.
- Sánchez, C., Minamisawa, K. (2018). Redundant roles of *Bradyrhizobium oligotrophicum* Cu-type (NirK) and *cd*<sub>1</sub>-type (NirS) nitrite reductase genes under denitrifying conditions. *FEMS Microbiol Lett* 365, fny015, <https://doi.org/10.1093/femsle/fny015>.
- Sánchez, C., Tortosa, G., Granados, A., Delgado, A., Bedmar, E.J., Delgado, M.J. (2011). Involvement of *Bradyrhizobium japonicum* denitrification in symbiotic nitrogen fixation by soybean plants subjected to flooding. *Soil Biol Biochem* 43, 212-217, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.09.020>.

- Sánchez-Pardo, B., Fernández-Pascual, M., Zornoza, P. (2012). Copper microlocalisation, ultrastructural alterations and antioxidant responses in the nodules of white lupin and soybean plants grown under conditions of copper excess. *Environ Exp Bot* 84, 52-60, <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.04.017>.
- Sánchez-Pardo, B., Zornoza, P. (2014). Mitigation of Cu stress by legume–*Rhizobium* symbiosis in white lupin and soybean plants. *Ecotox Environ Safe* 102, 1-5, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.016>.
- Sargent, F. (2007). The twin-arginine transport system: Moving folded proteins across membranes. *Biochem Soc Trans* 35, 835-847, <https://doi.org/10.1042/BST0350835>.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose-cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145(1), 69-73, [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90324-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90324-7).
- Schmutz, J., Cannon, S.B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., et al. (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463, 178-183, <https://doi.org/10.1038/nature08670>.
- Schreiber, F., Wunderlin, P., Udert, K.M., Wells, G.F. (2012). Nitric oxide and nitrous oxide turnover in natural and engineered microbial communities: Biological pathways, chemical reactions and novel technologies. *Front Microbiol* 3, 372, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00372>.
- Sciotti, M.A., Chanfon, A., Hennecke, H., Fischer, H. M. (2003). Disparate oxygen responsiveness of two regulatory cascades that control expression of symbiotic genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 185, 5639-5642, <https://doi.org/10.1128/JB.185.18.5639-5642.2003>.
- Seliga, H. (1998). Nitrogen fixation in several grain legume species with contrasting sensitivities to copper nutrition. *Acta Physiol Plant* 20, 263-267, <https://doi.org/10.1007/s11738-998-0057-6>.
- Sellers, P.J., Dickinson, R.E., Randall, D.A., Betts, A.K., Hall, F.G., Berry, J.A., Collatz, G.J., Denning, A.S., Mooney, H.A., Nobre, C.A., Sato, N., Field, C.B., Henderson-Sellers, A. (1997). Modelling the exchanges of energy, water, and carbon between continents and the atmosphere. *Science* 275(5299), 502–509, <https://doi.org/10.1126/science.275.5299.502>.
- Serpe, M., Zhang, X. (2006). The principles, development and application of microelectrodes for the in vivo determination of nitric oxide. *Electrochemical Methods for Neuroscience* (Michael, A.C., Borland, L.M., eds.), CRC Press, Pennsylvania, USA, pp. 465-487, PMID: 21204380.



## References

- Serventi, F., Youard, Z.A., Murset, V., Huwiler, S., Bühler, D., Richter, M., Luchsinger, R., Fischer, H.-M., Brogioli, R., Niederer, M., *et al.* (2012). Copper Starvation-inducible Protein for Cytochrome Oxidase Biogenesis in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Biol Chem* 287, 38812–38823, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.406173>.
- Shapleigh, J.P. (2006). The denitrifying prokaryotes. In: *The prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria* (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds.), Springer Science+Business Media, New York, USA, pp. 769-792, [https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7\\_23](https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7_23).
- Shen, W., Xue, H., Gao, N., Shiratori, Y., Kamuya, T., Fujiwara, T., Isobe, K., Senoo, K. (2020). Effects of copper on nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) reduction in denitrifiers and N<sub>2</sub>O emissions from agricultural soils. *Biol Fertil Soils* 56, 39-51, <https://doi.org/10.1007/s00374-019-01399-y>.
- Shiro, Y., Sugimoto, H., Tosha, T., Nagano, S., Hino, T. (2012). Structural basis for nitrous oxide generation by bacterial nitric oxide reductases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 1195–1203, <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0310>.
- Shoun, H., Fushinobu, S., Jiang, L., Kim, S.-W., Wakagi, T. (2012). Fungal denitrification and nitric oxide reductase cytochrome P450nor. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 1186–1194, <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0335>.
- Simon, J., Klotz, M.G. (2013). Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations. *Biochim Biophys Acta* 1827, 114–135, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.07.005>.
- Simon, R., Priefer, U., Pühler, A. (1983). Vector plasmids for in vivo and in vitro manipulation of gram-negative bacteria. In: *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction* (Pühler, A., ed.), Springer Science, Heidelberg, Germany, pp. 98-106.
- Singh, P., Rajput, R.S., Ram, R.M., Singh, H. B. (2019). A deeper insight into the symbiotic mechanism of *Rhizobium* spp. from the perspective of secondary metabolism. In: *Secondary metabolites of plant growth promoting rhizomicroorganisms* (Singh, H. B., Keswani, C., Reddy, M. S., Sansinenea, E., García-Estrada, C., eds.), Springer, Singapore, pp. 265-291, [doi: https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3\\_14](https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_14).
- Solioz, M., Abicht, H.K., Mermod, M., Mancini, S. (2010). Response of Gram-positive bacteria to copper stress. *J Biol Inorg Chem* 15, 3-14, <https://doi.org/10.1007/s00775-009-0588-3>.
- Spiro, S. (2012). Nitrous oxide production and consumption: regulation of gene expression by gas-sensitive transcription factors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 1213–1225, <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0309>.
- Steffen, W., Richardson, K., Rockström, J., Cornell, S.E., Fetzer, I., Bennett, E.M., *et al.* (2015). Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *Science* 347, 1259855, <https://doi.org/10.1126/science.1259855>.

- Stein, L.Y., Klotz, M.G. (2011). Nitrifying and denitrifying pathways of methanotrophic bacteria. *Biochem Soc Trans* 39, 1826–1831, <https://doi.org/10.1042/BST20110712>.
- Stevens, R.J., Laughlin, R.J., Atkins, G.J., Prosser, S.J. (1993). Automated determination of Nitrogen-15-labeled dinitrogen and nitrous oxide by mass spectrometry. *Soil Sci Soc Am J* 57, 981–988, <https://doi.org/10.2136/sssaj1993.03615995005700040017x>.
- Streminska, M.A., Felgate, H., Rowley, G., Richardson, D.J., Baggs, E.M. (2012). Nitrous oxide production in soil isolates of nitrate-ammonifying bacteria. *Environ Microbiol* 4, 66–71, <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00302.x>.
- Sullivan, M.J., Gates, A.J., Appia-Ayme, C., Rowley, G., Richardson, D.J. (2013). Copper control of bacterial nitrous oxide emission and its impact on vitamin B<sub>12</sub>-dependent metabolism. *PNAS* 110(49), 19926–19931, <https://doi.org/10.1073/pnas.1314529110>.
- Takaya, N. (2002). Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control in fungi. *J Biosci Bioeng* 94, 506–510, [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80187-6](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80187-6).
- Talbi, C., Delgado, M.J., Girard, L., Ramírez-Trujillo, A., Caballero-Mellado, J., Bedmar, E.J. (2010). *Burkholderia phymatum* strains capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils. *Appl Environ Microbiol* 76, 4587–4591, <https://doi.org/10.1128/AEM.02886-09>.
- Tan, G., Yang, J., Li, T., Zhao, J., Sun, S., Li, X., Lin, C., Li, J., Zhou, H., Lyu, J., Ding, H. (2017). Anaerobic Copper Toxicity and Iron-Sulfur Cluster Biogenesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 83, e00867-17, <https://doi.org/10.1128/AEM.00867-17>.
- Tavares, P., Pereira, A.S., Moura, J.J.G., Moura, I. (2006). Metalloenzymes of the denitrification pathway. *J Inorg Biochem* 100, 2087–2100, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.09.003>.
- Thomson, A.J., Giannopoulos, G., Pretty, J., Baggs, E.M., Richardson, D.J. (2012). Biological sources and sinks of nitrous oxide and strategies to mitigate emissions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 1157–1168, <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0415>.
- Tilman, D., Clark, M., Williams, D.R., Kimmel, K., Polasky, S., Packer, C. (2017). Future threats to biodiversity and pathways to their prevention. *Nature* 546(7656), 73–81, <https://doi.org/10.1038/nature22900>.
- Torres, M.J., Argandoña, M., Vargas, C., Bedmar, E.J., Fischer, H.-M., Mesa, S., Delgado, M.J. (2014a). The global response regulator RegR controls expression of denitrification genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS One* 9, e99011, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099011>.
- Torres, M.J., Ávila, S., Bedmar, E.J., Delgado, M.J. (2018). Overexpression of the periplasmic nitrate reductase supports anaerobic growth by *Ensifer meliloti*. *FEMS Microbiol Lett* 365, fny041, <https://doi.org/10.1093/femsle/fny041>.

## References

- Torres, M.J., Bueno, E., Jiménez-Leiva, A., Cabrera, J.J., Bedmar, E.J., Mesa, S., Delgado, M.J. (2017). FixK<sub>2</sub> is the main transcriptional activator of *Bradyrhizobium diazoefficiens* nosRZDYFLX genes in response to low oxygen. *Front Microbiol* 8, 1621, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01621>.
- Torres, M.J., Rubia, M.I., Bedmar, E.J., Delgado, M.J. (2011). Denitrification in *Sinorhizobium meliloti*. *Biochem Soc Trans* 39, 1886-1889, <https://doi.org/10.1042/BST20110733>.
- Torres, M.J., Rubia, M.I., de la Peña, T.C., Pueyo, J.J., Bedmar, E.J., Delgado, M.J. (2014b). Genetic basis for denitrification in *Ensifer meliloti*. *BMC Microbiol* 14, 142, <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-142>.
- Torres, M.J., Simon, J., Rowley, G., Bedmar, E.J., Richardson, D.J., Gates, A.J., Delgado, M.J. (2016). Nitrous oxide metabolism in nitrate-reducing bacteria: Physiology and regulatory mechanisms. *Adv Microb Physiol* 68, 353-432, <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2016.02.007>.
- Tortosa, G., Hidalgo, A., Salas, A., Bedmar, E.J., Mesa, S., Delgado, M.J. (2015). Nitrate and flooding induce N<sub>2</sub>O emissions from soybean nodules. *Symbiosis* 67, 125-133, <https://doi.org/10.1007/s13199-015-0341-3>.
- Tosha, T., Shiro, Y. (2017). Structure and function of nitric oxide reductases. In: *Metalloenzymes in denitrification: Applications and environmental impacts* (Moura, I., Moura, J.J., Pauleta, S.R., Maia, L.B., eds.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 114-140, <https://doi.org/10.1039/9781782623762-00114>.
- Treusch, A.H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S.C., Klenk, H.P., Schleper, C. (2005). Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol* 7, 1985–1995, <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00906.x>.
- Tzanakakis, V.A., Taylor, A.E., Bottomley, P.J. (2022). Different contributions of ammonia oxidizing archaea and bacteria to nitrification in soils amended with equivalent amounts of either ammonium-N or organic-N. *Appl Soil Ecol* 175, 104451, <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104451>.
- Uchida, Y., Akiyama, H. (2013). Mitigation of postharvest nitrous oxide emissions from soybean ecosystems: a review. *Soil Sci Plant Nutr* 59, 477-487. <https://doi.org/10.1080/00380768.2013.805433>.
- Udvardi, M., Poole, P.S. (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu Rev Plant Biol* 64, 781-805, <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120235>.
- USDA (United States Department of Agriculture) (2022). <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf> (Last access: July 12, 2022).

- Ussiri, D., Lal, R. (2013). The role of nitrous oxide on climate change. In: *Soil Emission of Nitrous Oxide and its Mitigation* (Ussiri, D., Lal, R., eds.), Springer Science+Business Media, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-28, <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5364-8>.
- Valdez-Núñez, R.A., Cuadros-Infante, E.C. (2022). Leguminosas forrajeras. In: *Las leguminosas y su microbioma en la agricultura sostenible* (Valdez-Núñez, R.A., Silvera-Pablo, C., Bedmar, E.J., eds.), Universidad Nacional de Barranca, Lima, Perú, pp. 87-96, ISBN: 978-612-47636-3-2.
- van Spanning, R.J. (2011). Structure, function, regulation and evolution of the nitrite and nitrous oxide reductase: Denitrification enzymes with a *b*-propeller fold. In: *Nitrogen cycling in bacteria* (Moir, J.W.B., ed.), Caister Academic Press, Norkfolk, UK, pp. 135-161, ISBN: 978-1-904455-86-8.
- van Spanning, R.J.M., Delgado, M.J., Richardson, D.J. (2005). The nitrogen cycle: Denitrification and its relationship to N<sub>2</sub> fixation. In: *Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment* (Werner, D., Newton, W.E., eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 277-342, [https://doi.org/10.1007/1-4020-3544-6\\_13](https://doi.org/10.1007/1-4020-3544-6_13).
- van Spanning, R.J.M., Richardson, D.J., Ferguson, S.J. (2007). Introduction to the biochemistry and molecular biology of denitrification. In: *Biology of the nitrogen cycle* (Bothe, H., Ferguson, S.J., Newton, W.E., eds.), Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, pp. 3–20, <https://doi.org/10.1016/B978-044452857-5.50002-3>.
- Vargas, C., McEwan, A.G., Downie, J.A. (1993). Detection of *c*-type cytochromes using enhanced chemiluminescence. *Anal Biochem* 209, 323-326, <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1127>.
- Vasconcelos, M.W., Grusak, M.A., Pinto, E., *et al.* (2020). The biology of legumes and their agronomic, economic and social impact. In: *The plant family Fabaceae* (Hasanuzzaman, M., Araújo, S., Gill, S.S., eds.), Springer, Singapore, pp. 3-25, [https://doi.org/10.1007/978-981-15-4752-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4752-2_1).
- Velasco, L., Mesa, S., Delgado, M.J., Bedmar, E.J. (2001). Characterization of the *nirK* gene encoding the respiratory, Cu-containing nitrite reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochim Biophys Acta* 1521, 130-134, [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(01\)00279-2](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(01)00279-2).
- Velasco, L., Mesa, S., Xu, C.A., Delgado, M.J., Bedmar, E.J. (2004). Molecular characterization of *nosRZDFYLX* genes coding for denitrifying nitrous oxide reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 85, 229–235, <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000020156.42470.db>.
- Vincent, J.M. (1970). *A Manual for Practical Study of Root Nodule Bacteria*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, <https://doi.org/10.1002/jobm.19720120524>.

- Voskuil, M.I., Schnappinger, D., Visconti, K.C., Harrell, M.I., Dolganov, G.M., Sherman, D.R., *et al.* (2003). Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J Exp Med* 198, 705-713, <https://doi.org/10.1084/jem.20030205>.
- Ward, S.K., Abomoelak, B., Hoye, E.A., Steinberg, H., Talaat, A.M. (2010). CtpV: a putative copper exporter required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 77(5), 1096-1110, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07273.x>.
- Willett, W., Rockström, J., Loken, B., Springmann, M., Lang, T., Vermeulen, S., *et al.* (2019). Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *Lancet* 393, 447–492, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31788-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31788-4).
- Wunsch, P., Herb, M., Wieland, H., Schiek, U.M., Zumft, W.G. (2003). Requirements for Cu<sub>A</sub> and Cu-S center assembly of nitrous oxide reductase deduced from complete periplasmic enzyme maturation in the non-denitrifier *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 185, 887–896, <https://doi.org/10.1128/JB.185.3.887-896.2003>.
- Wunsch, P., Körner, H., Neese, F., van Spanning, R.J.M., Kroneck, P.M.H., Zumft, W.G. (2005). NosX function connects to nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) reduction by affecting the Cu<sub>Z</sub> center of NosZ and its activity *in vivo*. *FEBS Lett* 579(21), 4605-4609, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.023>.
- Wunsch, P., Zumft, W.G. (2005). Functional domains of NosR, a novel transmembrane iron-sulfur flavoprotein necessary for nitrous oxide respiration. *J Bacteriol* 187, 1992–2001, <https://doi.org/10.1128/JB.187.6.1992-2001.2005>.
- Wüst, A., Schneider, L., Pomowski, A., Zumft, W.G., Kroneck, P.M.H., Einsle, O. (2012). Nature's way of handling a greenhouse gas: The copper-sulfur cluster of purple nitrous oxide reductase. *Biol Chem* 393, 1067-1077, <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0177>.
- Yamamoto, K., Hirao, K., Oshima, T., Aiba, H., Utsumi, R., Ishihama, A. (2005). Functional characterization *in vitro* of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 280(2), 1448-1456, <https://doi.org/10.1074/jbc.M410104200>.
- Yang, J., Feng, L., Pi, S., Cui, D., Ma, F., Zhao, H.-P., Li, A. (2020). A critical review of aerobic denitrification: insights into the intracellular electron transfer. *Sci Total Environ* 731, 139080, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139080>.
- Yang, J., Lan, L., Jin, Y., Yu, N., Wang, D., Wang, E. (2022). Mechanisms underlying legume-rhizobium symbioses. *J Integr Plant Biol* 64, 244-267, <https://doi.org/10.1111/jipb.13207>.

- Young, N.D., Debelle, F., Oldroyd, G.E., Geurts, R., Cannon, S.B., Udvardi, M.K., *et al.* (2011). The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* 480, 520–524, <https://doi.org/10.1038/nature10625>.
- Yruela, I., 2009. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Funct Plant Biol* 36(5), 409-430, <https://doi.org/10.1071/FP08288>.
- Zhang, L., Trncik, C., Andrade, S.L.A., Einsle, O. (2017). The flavinyl transferase ApbE of *Pseudomonas stutzeri* matures the NosR protein required for nitrous oxide reduction. *BBA-Bioenerg* 1858, 95-102, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.11.008>.
- Zhang, L., Wüst, A., Prasser, B., Müller, C., Einsle, O. (2019). Functional assembly of nitrous oxide reductase provides insights into copper site maturation. *PNAS* 116, 12822-12827, <https://doi.org/10.1073/pnas.1903819116>.
- Zumft, W.G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 533–616, <https://doi.org/10.1128/mmbr.61.4.533-616.1997>.
- Zumft, W.G. (2005). Biogenesis of the bacterial respiratory Cu<sub>A</sub>, Cu-S enzyme nitrous oxide reductase. *J Mol Microbiol Biotechnol* 10, 154–166, <https://doi.org/10.1159/000091562>.
- Zumft, W.G., Kroneck, P.M. (2007). Respiratory transformation of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) to dinitrogen by bacteria and archaea. *Adv Microb Physiol* 52, 107–227, [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(06\)52003-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(06)52003-X).



**ANEXOS**





## Anexo I

### Listado de abreviaturas, acrónimos, siglas y símbolos

<u>Abreviatura</u>	<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
A	Alanina / Adenina	<i>Alanine / Adenine</i>
ABC	Casete de unión a ATP	<i>ATP-binding cassette</i>
ADN / DNA	Ácido desoxirribonucleico	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ADNc / cDNA	ADN complementario	<i>Complementary DNA</i>
ADP	Adenosina trifosfato	<i>Adenosine triphosphate</i>
AFOLU	Agricultura, silvicultura y otros usos de la tierra	<i>Agriculture, forestry and other land use</i>
AMP	Adenosina monofosfato	<i>Adenosine monophosphate</i>
AMPC / cAMP	AMP cíclico	<i>Cyclic AMP</i>
AOA	Arqueas oxidantes de amonio	<i>Ammonium-oxidizing archaea</i>
AOB	Bacterias oxidantes de amonio	<i>Ammonium-oxidizing bacteria</i>
Ap	Ampicilina	<i>Ampicillin</i>
ARN / RNA	Ácido ribonucleico	<i>Ribonucleic acid</i>
ARNr / rRNA	ARN ribosómico	<i>Ribosomal RNA</i>
ATP	Adenosina trifosfato	<i>Adenosine triphosphate</i>
b	Base nitrogenada	<i>Nitrogenous base</i>
BNF	Fijación biológica de N <sub>2</sub>	<i>Biological N<sub>2</sub> fixation</i>
BSA	Albúmina de suero bovino	<i>Bovine serum albumin</i>
C	Citosina	<i>Cytosine</i>
CFC	Clorofluorocarbono	<i>Chlorofluorocarbon</i>
CFU	Unidad formadora de colonia	<i>Colony-forming unit</i>
cit / cyt	Citocromo	<i>Cytochrome</i>
Cm	Cloranfenicol	<i>Chloramphenicol</i>
cNor	Óxido nítrico reductasa dependiente de citocromo c	<i>c cytochrome-dependent nitric oxide reductase</i>
Crp/FNR	Proteína receptora de AMPc/proteína reguladora de fumarato y nitrato reductasas	<i>cAMP receptor protein/fumarate and nitrate reductase regulatory protein</i>
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas	<i>Spanish National Research Council</i>
C-terminal	Extremo carboxilo terminal	<i>Carboxyl-terminal end</i>
Cu <sub>A</sub> Nor	Óxido nítrico reductasa que contiene Cu	<i>Cu-containing nitric oxide reductase</i>
Cu-H	Medio con alto cobre	<i>High Cu medium</i>
Cu-L	Medio con cobre limitante	<i>Cu-limiting medium</i>
Cu-S	Medio con cobre estándar	<i>Cu-standard medium</i>
Cys	Cisteína	<i>Cysteine</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNRA	Reducción no asimilativa de nitrato a amonio	<i>Dissimilatory nitrate reduction to ammonium</i>
dNTP	Desoxirribonucleósido trifosfato	<i>Deoxyribonucleoside triphosphate</i>
e <sup>-</sup>	Electrón	<i>Electron</i>
EEUU / USA	Estados Unidos de América	<i>United States of America</i>
EEZ	Estación Experimental del Zaidín	<i>Zaidin Experimental Station</i>

<u>Abreviatura</u>	<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
ELISA	Inmunoanálisis enzimático de adsorción	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EtBr	Bromuro de etidio	<i>Ethidium bromide</i>
F	Fenilalanina	<i>Phenylalanine</i>
FAD	Flavín dinucleótido de adenina	<i>Flavin adenine dinucleotide</i>
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FC	Cambio relativo	<i>Fold-change</i>
[FeS]	Grupos hierro-azufre	<i>Iron-sulfur cluster</i>
FMN	Flavín mononucleótido	<i>Flavin mononucleotide</i>
FN	N fijado	<i>Fixed N</i>
G	Guanina	<i>Guanine</i>
GHG	Gas de efecto invernadero	<i>Greenhouse gas</i>
GMN	Grupo de Metabolismo del Nitrógeno	<i>Nitrogen Metabolism Group</i>
HCO	Oxidasas que contienen hemo y Cu	<i>Haem-Cu oxidases</i>
HFC	Hidrofluorocarbono	<i>Hydrofluorocarbon</i>
His	Histidina	<i>Histidine</i>
HRP	Peroxidasa de rábano	<i>Horseradish peroxidase</i>
HTH	Motivo hélice-giro-hélice	<i>Helix-turn-helix motif</i>
I	Isoleucina	<i>Isoleucine</i>
IACT	Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra	<i>Andalusian Earth Sciences Institute</i>
ICP-OES	Espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente	<i>Inductively coupled plasma-optical emission spectrometry</i>
IPBLN	Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra	<i>Institute of Parasitology and Biomedicine "López-Neyra"</i>
IPCC	Panel Internacional del Cambio Climático	<i>International Panel on Climate Change</i>
IR	Radiación infrarroja	<i>Infrared radiation</i>
K	Lisina	<i>Lysine</i>
Km	Sulfato de kanamicina	<i>Kanamycin sulfate</i>
L	Leucina	<i>Leucine</i>
Lb	Leghemoglobina	<i>Leghemoglobin</i>
LbNO	Complejo nitrosil-leghemoglobina	<i>Nitrosyl-leghemoglobin complex</i>
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación	<i>Ministry of Agriculture, Fisheries and Food</i>
MCS	Sitio de clonación múltiple	<i>Multiple cloning site</i>
Met	Metionina	<i>Methionine</i>
MFS	Superfamilia de proteínas facilitadoras principales	<i>Major facilitator superfamily</i>
Mo[MGD] <sub>2</sub>	Bis (dinucleótido de molibdopterina y guanina)	<i>Bis-molybdopterin guanine dinucleotide</i>
MQH <sub>2</sub>	Pool de menaquinol	<i>Menaquinol pool</i>
MU	Unidades Miller	<i>Miller units</i>
MV <sup>+</sup>	Metil viológeno	<i>Methyl viologen</i>
MV <sup>+</sup> -NR	NR dependiente de MV <sup>+</sup>	<i>MV<sup>+</sup>-dependent NR</i>
MV <sup>+</sup> -NIR	NIR dependiente de MV <sup>+</sup>	<i>MV<sup>+</sup>-dependent NIR</i>
MWCO	Límite de peso molecular	<i>Molecular weight cut-off</i>

<u>Abreviatura</u>	<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
N	Cualquier nucleótido (C, T, A o G)	<i>Any nucleotide (C, T, A or G)</i>
NAD/NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido/NAD reducido	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide/reduced NAD</i>
Nap	Nitrato reductasa periplásmica	<i>Periplasmic nitrate reductase</i>
Nar	Nitrato reductasa de membrana	<i>Respiratory nitrate reductase</i>
Nas	Nitrato reductasa asimiladora o asimilativa	<i>Assimilatory nitrate reductase</i>
Ndfa	N derivado del N <sub>2</sub> atmosférico	<i>N derived from atmosphere</i>
NDH	NADH deshidrogenasa	<i>NADH dehydrogenase</i>
NDW	Peso seco de nódulos	<i>Nodule dry weight</i>
NDW/NN	Peso unitario de nódulo	<i>Dry weight per nodule</i>
NFW	Peso fresco de nódulos	<i>Nodule fresh weight</i>
NIR	Actividad nitrito reductasa	<i>Nitrite reductase activity</i>
NirK	Nitrito reductasa que contiene Cu	<i>Cu-containing nitrite reductase</i>
NirS	Nitrito reductasa que contiene citocromo <i>cd</i> <sub>1</sub>	<i>cd<sub>1</sub> cytochrome-containing nitrite reductase</i>
NN	Número de nódulos	<i>Nodule number</i>
NnrR	Regulador de la nitrito reductasa y la óxido nítrico reductasa	<i>Nitrite and nitric oxide reductase regulator</i>
NOR	Actividad óxido nítrico reductasa	<i>Nitric oxide reductase activity</i>
N <sub>2</sub> OR	Actividad óxido nitroso reductasa	<i>Nitrous oxide reductase activity</i>
Nos	Óxido nitroso reductasa	<i>Nitrous oxide reductase</i>
NO <sub>x</sub>	Óxidos derivados del N	<i>N-derived oxides</i>
NR	Actividad nitrato reductasa	<i>Nitrate reductase activity</i>
N-terminal	Extremo amino terminal	<i>Amino-terminal end</i>
OD <sub>420</sub>	Densidad óptica a 420 nm	<i>Optical density at 420 nm</i>
OD <sub>550</sub>	Densidad óptica a 550 nm	<i>Optical density at 550 nm</i>
OD <sub>595</sub>	Densidad óptica a 595 nm	<i>Optical density at 595 nm</i>
OD <sub>600</sub>	Densidad óptica a 600 nm	<i>Optical density at 600 nm</i>
ONU	Organización de las Naciones Unidas	<i>United Nations Organization</i>
pb / bp	Pares de bases	<i>Base pairs</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDW	Peso seco de planta	<i>Plant dry weight</i>
PFC	Perfluorocarbono	<i>Perfluorocarbon</i>
PFW	Peso fresco de planta	<i>Plant fresh weight</i>
ppbv	Partes por billón volumen	<i>Parts per billion volume</i>
<i>p/v</i>	Peso/volumen	<i>Weight/volume</i>
Q	Quinona	<i>Quinone</i>
QH <sub>2</sub>	<i>Pool</i> de hidroquinol	<i>Hydroquinol pool</i>
qNor	Óxido nítrico reductasa dependiente del <i>pool</i> de quinonas	<i>Quinone-dependent nitric oxide reductase</i>
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real	<i>Quantitative real time PCR</i>
R	Arginina	<i>Arginine</i>
r	Resistencia o resistente a un antibiótico; superíndice	<i>Antibiotic resistance or antibiotic resistant; superscript</i>
RDW	Peso seco de raíz	<i>Root dry weight</i>
RL	Longitud de la raíz	<i>Root length</i>

<u>Abreviatura</u>	<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
rpm	Revoluciones por minuto	<i>Revolutions per minute</i>
S	Serina	<i>Serine</i>
SAP	Fosfatasa alcalina de camarón	<i>Shrimp alkaline phosphatase</i>
SDH	Succinato deshidrogenasa	<i>Succinate dehydrogenase</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida	<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SDW	Peso seco de parte aérea	<i>Shoot dry weight</i>
Sec	Sistema de secreción	<i>Secretion system</i>
SFW	Peso fresco de la parte aérea	<i>Shoot fresh weight</i>
Sm	Estreptomicina	<i>Streptomycin</i>
SNF	Fijación simbiótica de N <sub>2</sub>	<i>Symbiotic N<sub>2</sub> fixation</i>
Spc	Espectinomicina	<i>Spectinomycin</i>
T	Treonina / Timina	<i>Threonine / Thymine</i>
Tat	Sistema de translocación de argininas gemelas	<i>Twin-arginine transporter</i>
Tc	Tetraciclina	<i>Tetracycline</i>
TN	N total	<i>Total N</i>
Tn	Transposón	<i>Transposon</i>
Tp	Trimetoprima	<i>Trimethoprim</i>
UC-Davis	Universidad de California (en Davis)	<i>University of California, Davis</i>
UE	Unión Europea	<i>European Union</i>
UEA	Universidad de Anglia Oriental	<i>University of East Anglia</i>
UQ	Ubiquinona	<i>Ubiquinone</i>
UQH <sub>2</sub>	Pool de ubiquinol	<i>Ubiquinol pool</i>
USDA	Departamento de Agricultura de los EEUU	<i>US Department of Agriculture</i>
UV	Radiación ultravioleta	<i>Ultraviolet radiation</i>
v/v	Volumen/volumen	<i>Volume/volume</i>
WT	Cepa silvestre	<i>Wild-type</i>
::	Fusión	<i>Fusion</i>
Δ	Delección	<i>Deletion</i>
σ	Factor sigma	<i>Sigma factor</i>

## Listado de unidades de medida

<u>Símbolo</u>	<u>Significado</u>	<u>Símbolo</u>	<u>Significado</u>
°C	Grados Celsius	mol	Mol
Da	Dalton	N	Normal
g	Gramo	Pa	Pascal
h	Hora	S	Unidad Svedberg
ha	Hectárea	s	Segundo
L, l	Litro	U	Unidad de reactivo
M	Molar	V	Voltio
m	Metro	W	Vatio o watt
min	Minuto		

## Listado de prefijos

<u>Símbolo</u>	<u>Significado</u>	<u>Equivalencia con la unidad fundamental</u>
M	Mega	$10^6$
k	Kilo	$10^3$
c	Centi	$10^{-2}$
m	Mili	$10^{-3}$
$\mu$	Micro	$10^{-6}$
n	Nano	$10^{-9}$
p	Pico	$10^{-12}$

## Listado de especies químicas

### Elementos químicos

Al	Aluminio
B	Boro
C	Carbono
Ca	Calcio
Cd	Cadmio
Cl	Cloro
Co	Cobalto
Cu	Cobre
F	Flúor
Fe	Hierro
H	Hidrógeno
Hg	Mercurio
K	Potasio
Mg	Magnesio
Mn	Manganeso
Mo	Molibdeno
N	Nitrógeno
Ni	Níquel
O	Oxígeno
P	Fósforo
Pb	Plomo
Rb	Rubidio
S	Azufre
Zn	Cinc

### Iones y moléculas

$\text{Ca}^{2+}$	Ion calcio
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloruro cálcico dihidratado
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sulfato cálcico dihidratado
$\text{CH}_4$	Metano
$\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Ácido oxálico
CO	Monóxido de carbono
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato cobaltoso heptahidratado
$\text{Cu}^+ / \text{Cu(I)}$	Ion cuproso
$\text{Cu}^{2+} / \text{Cu(II)}$	Ion cúprico

Iones y moléculas

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato cúprico pentahidratado
$\text{Fe}^{2+}$	Ion ferroso
$\text{Fe}^{3+}$	Ion férrico
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloruro férrico hexahidratado
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato ferroso heptahidratado
$\text{H}^+$	Protón
$\text{H}_3\text{BO}_3$	Ácido bórico
$\text{HCl}$	Ácido clorhídrico
$\text{HF}$	Ácido fluorhídrico
$\text{Hg}^{2+}$	Ion mercurio
$\text{HgCl}_2$	Cloruro de mercurio
$\text{HNO}_3$	Ácido nítrico
$\text{H}_2\text{O}$	Agua
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrógeno o agua oxigenada
$\text{H}_2\text{SO}_4$	Ácido sulfúrico
$\text{KCl}$	Cloruro potásico
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	Cianuro férrico potásico
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Dihidrogenofosfato de potasio
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	Hidrogenofosfato de potasio
$\text{KNO}_3$	Nitrato potásico
$\text{KOH}$	Hidróxido potásico o potasa
$\text{K}_2\text{SO}_4$	Sulfato potásico
$\text{MgCl}_2$	Cloruro de magnesio
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnesio heptahidratado
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de manganeso tetrahidratado
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de manganeso tetrahidratado
$\text{N}_2$	Nitrógeno molecular
$\text{NaCl}$	Cloruro sódico
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	Carbonato sódico
$\text{NaHCO}_3$	Bicarbonato sódico
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Dihidrogenofosfato de sodio monohidratado
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Hidrogenofosfato de sodio dihidratado
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Molibdato sódico dihidratado
$\text{NaNO}_2$	Nitrito sódico
$\text{NaOH}$	Hidróxido sódico o sosa
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	Ditionito sódico
$\text{NF}_3$	Trifluoruro de nitrógeno
$\text{NH}_3$	Amoníaco
$\text{NH}_4^+$	Amonio
$\text{NH}_4\text{Cl}$	Cloruro amónico
$\text{NH}_2\text{OH}$	Hidroxilamina
$\text{NH}_4\text{OH}$	Hidróxido de amonio
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	Persulfato de amonio (APS)
$\text{NO}$	Óxido nítrico
$\text{NO}_2$	Dióxido de nitrógeno
$\text{NO}_2^-$	Nitrito
$\text{NO}_3^-$	Nitrato
$\text{N}_2\text{O}$	Óxido nitroso
$\text{O}_2$	Oxígeno molecular

Iones y moléculas

O <sub>3</sub>	Ozono
Pb <sup>2+</sup>	Ion plomo
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (Pi)	Fosfato inorgánico
RbCl	Cloruro de rubidio
SF <sub>6</sub>	Hexafluoruro de azufre
Zn <sup>2+</sup>	Ion cinc
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Sulfato de cinc heptahidratado

**Listado de reactivos con su número CAS**

<u>Abreviatura</u>	<u>Reactivo</u>	<u>Número CAS</u>
AEBSF	<i>4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride</i>	30827-99-7
Ap	Ampicilina	69-53-4
APS	Persulfato de amonio	7727-54-0
Cm	Cloranfenicol	56-75-7
DEPC	Dietilpirocarbonato	1609-47-8
DTT	1,4-ditiotreitol	3483-12-3
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate</i>	6381-92-6
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido	367-93-1
Km	Sulfato de kanamicina	25389-94-0
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propane sulfonic acid</i>	1132-61-2
NNEDA	<i>N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride</i>	1465-25-4
ONPG	2-nitrofenil β-D-galactopiranosido	369-07-3
PVPP	Polivinilpolipirrolidona	9003-39-8
Sm	Estreptomomicina	57-92-1
Spc	Espectinomicina	1695-77-8
Tc	Tetraciclina	60-54-8
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina	110-18-9
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranosido	7240-90-6
X-Gluc	Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónico	18656-96-7





Bacterias

<i>Paracoccus denitrificans</i>	<i>P. denitrificans</i>
<i>Paracoccus pantotrophus</i>	<i>P. pantotrophus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>P. putida</i>
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>P. stutzeri</i>
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>P. syringae</i>
<i>Ralstonia eutropha</i>	<i>R. eutropha</i>
<i>Rhizobium etli</i>	<i>R. etli</i>
<i>Rhizobium galegae</i>	<i>R. galegae</i>
<i>Rhizobium sullae</i>	<i>R. sullae</i>
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	<i>R. sphaeroides</i>
<i>Salmonella enterica</i>	<i>S. enterica</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>S. mutans</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>
<i>Streptomyces lividans</i>	<i>S. lividans</i>
<i>Thermus thermophilus</i>	<i>T. thermophilus</i>

Hongos

<i>Aspergillus niger</i>	<i>A. niger</i>
--------------------------	-----------------

Plantas

<i>Aspalathus carnosa</i>	<i>A. carnosa</i>
<i>Glycine max</i>	<i>G. max</i>
<i>Machaerium lunatum</i>	<i>M. lunatum</i>
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	<i>M. atropurpureum</i>
<i>Medicago falcata</i>	<i>M. falcata</i>
<i>Medicago lupulina</i>	<i>M. lupulina</i>
<i>Medicago sativa</i>	<i>M. sativa</i>

Plantas

*Medicago truncatula*

*M. truncatula*

*Phaseolus vulgaris*

*P. vulgaris*

*Vigna radiata*

*V. radiata*

## Anexo III

### Índice de figuras

#### Introducción

<b>Figura 1.</b> Evolución de las emisiones globales de GHG por sector a lo largo de las tres últimas décadas .....	21
<b>Figura 2.</b> Rutas biológicas relacionadas con los flujos de NO y N <sub>2</sub> O del ciclo del N .....	26
<b>Figura 3.</b> Esquema general de la ruta y de los genes de la desnitrificación .....	29
<b>Figura 4.</b> Modelo general de los principales componentes necesarios para la reducción del N <sub>2</sub> O a N <sub>2</sub> , así como para la biogénesis de NosZ .....	36
<b>Figura 5.</b> Principales etapas en el proceso de nodulación .....	43
<b>Figura 6.</b> Nódulos determinados e indeterminados .....	44
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática de la ruta de la desnitrificación en <i>B. diazoefficiens</i> .....	48
<b>Figura 8.</b> Red de regulación en <i>B. diazoefficiens</i> en respuesta a bajo O <sub>2</sub> y su interacción con los genes de la desnitrificación .....	49
<b>Figura 9.</b> Esquema de los productos generados y las enzimas implicadas durante la desnitrificación llevada a cabo por <i>B. diazoefficiens</i> , <i>E. meliloti</i> y <i>R. etli</i> en nódulos .....	56

#### Objetivos/Objectives

<b>Figure 1.</b> Thesis organization .....	68
--	----

#### Material y Métodos

<b>Figura 1.</b> Gaseo de cultivos microaeróbicos en diferentes viales empleados en esta tesis .....	80
<b>Figura 2.</b> Sistema de maceta Leonard utilizado en esta tesis .....	111
<b>Figura 3.</b> Sistema de cultivo de los experimentos de cinética de nodulación y competitividad .....	112
<b>Figura 4.</b> Preparación de ensayos con plantas de alfalfa en tubos .....	113
<b>Figura 5.</b> Esquema metodológico de los experimentos con plantas de alfalfa .....	116
<b>Figura 6.</b> Revelado de nódulos en los ensayos de competitividad.....	117
<b>Figura 7.</b> Sistemas cerrados usados para las determinaciones de N <sub>2</sub> O en raíces noduladas y nódulos aislados de plantas de soja .....	121

## Results

<b>Figure 1.1.</b> Roots and nodules from soybean plants inoculated with <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 and subjected to different Cu concentrations during growth .....	132
<b>Figure 1.2.</b> N <sub>2</sub> O emissions by nodulated roots and detached nodules from soybean plants watered with different Cu concentrations .....	136
<b>Figure 1.3.</b> Linear regression of N <sub>2</sub> O emission rate and Cu accumulation of detached nodules from soybean plants watered with different Cu concentrations.....	136
<b>Figure 2.1.</b> Nodulation kinetics of alfalfa plants inoculated with strain 1021 of <i>E. meliloti</i> under different nitrate concentrations .....	144
<b>Figure 2.2.</b> Nodulation capacity of a <i>nap</i> -overexpressing <i>E. meliloti</i> strain ( <i>nap</i> <sup>+</sup> ).....	145
<b>Figure 2.3.</b> N <sub>2</sub> O emissions from detached nodules elicited by <i>E. meliloti</i> 1021 .....	146
<b>Figure 2.4.</b> MV <sup>+</sup> -NR activity and N <sub>2</sub> O emissions from <i>E. meliloti</i> 1021 (WT), the <i>napA</i> ::Ω mutant ( <i>nap</i> <sup>-</sup> ) or the <i>nap</i> <sup>+</sup> strain .....	148
<b>Figure 3.1.</b> Growth of <i>B. diazoefficiens</i> 110 <i>spc4</i> in Cu limitation (Cu-L), standard Cu (Cu-S) and high Cu (Cu-H) under oxic, anoxic or microoxic conditions .....	157
<b>Figure 3.2.</b> β-galactosidase activity from <i>napE-lacZ</i> , <i>nirK-lacZ</i> , <i>norC-lacZ</i> and <i>nosR-lacZ</i> transcriptional fusions chromosomally integrated in <i>B. diazoefficiens</i> 110 <i>spc4</i> grown under aerobic or microaerobic conditions in Cu-S for 1, 2 or 3 days .....	158
<b>Figure 3.3.</b> Expression of denitrification genes monitored as β-galactosidase activity or qRT-PCR in <i>B. diazoefficiens</i> 110 <i>spc4</i> grown aerobically in Cu-S or microaerobically in Cu-L, Cu-S or Cu-H for 3 days .....	160
<b>Figure 3.4.</b> β-galactosidase activity from the <i>norC-lacZ</i> transcriptional fusion chromosomally integrated in <i>B. diazoefficiens</i> 110 <i>spc4</i> grown under microaerobic conditions in Cu-L or Cu-S without nitrate.....	160
<b>Figure 3.5.</b> Nitrate reductase protein levels and activity .....	162
<b>Figure 3.6.</b> Nitrite reductase protein levels and activity.....	164
<b>Figure 3.7.</b> Extracellular nitrite concentration in the growth medium and MV <sup>+</sup> -NR activity of WT and the <i>nirK</i> ::Ω mutant under Cu-L or Cu-S .....	164
<b>Figure 3.8.</b> Nitric oxide reductase protein levels and activity .....	165
<b>Figure 3.9.</b> Nitrous oxide reductase protein levels and activity.....	167
<b>Figure 3.10.</b> β-galactosidase activity from the <i>nosR-lacZ</i> transcriptional fusion chromosomally integrated into <i>B. diazoefficiens</i> 110 <i>spc4</i> (WT) and the <i>nosR</i> mutant (Δ <i>nosR</i> ) strains, and N <sub>2</sub> OR activity of these strains .....	168
<b>Figure 3.1.1.</b> Deletion of the <i>csor</i> gene and schematic representation of the pDB4030 plasmid, derived from pK18 <i>mobsacB</i> .....	176
<b>Figure 3.1.2.</b> Agarose gel electrophoresis of F1 and F2 fragments amplified by PCR with Phusion® polymerase .....	177
<b>Figure 3.1.3.</b> Checking of 5' and 3' simple recombinants .....	178
<b>Figure 3.1.4.</b> Checking of the clone 19 (Δ <i>csor</i> strain), 3' recombinant .....	179

**Figure 3.1.5.** Growth of *B. diazoefficiens* 110spc4 and the  $\Delta$ csoR strain under Cu-L, Cu-S or Cu-H BVMN media under oxic or microoxic conditions..... 179

**Figure 3.1.6.** Transcriptional expression of denitrification genes monitored as  $\beta$ -galactosidase activity and qRT-PCR in *B. diazoefficiens* 110spc4 and the  $\Delta$ csoR strain grown microaerobically in Cu-L or Cu-S for 3 days ..... 181

### **Figuras suplementarias**

**Figure S1.1.** Chlorotic and necrotic symptoms in the leaves of soybean plants grown with 100  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup> ..... 139

**Figure S2.1.** Experimental set of alfalfa plants grown under different Cu conditions without nitrate for 43 days..... 151

**Figure S3.1.** Full scans of the entire gel of the western blot experiments shown in Figure 3.5A and Coomassie® blue-stained SDS-PAGE gel made to visualize protein levels loaded in each lane for NapA western blot experiments ..... 169

**Figure S3.2.** Full scans of the entire gels of the western blot experiments shown in Figure 3.6A and 3.9A and Coomassie® blue-stained SDS-PAGE gels made to visualize protein levels loaded in each lane for NirK and periplasmic or cytosolic NosZ western blot experiments..... 170

**Figure S3.3.** Full scan of the entire gel of the heme-staining experiment shown in Figure 3.8A and Coomassie® blue-stained SDS-PAGE gel made to visualize protein levels loaded in each lane for these experiments ..... 171

## Anexo IV

### Índice de tablas

#### Material y Métodos

<b>Tabla 1.</b> Cepas bacterianas .....	71
<b>Tabla 2.</b> Plásmidos .....	72
<b>Tabla 3.</b> Oligonucleótidos .....	72
<b>Tabla 4.</b> Medios de cultivo .....	74
<b>Tabla 5.</b> Antibióticos .....	77
<b>Tabla 6.</b> Mezclas de PCR por reacción en función de la ADN polimerasa utilizada.....	98
<b>Tabla 7.</b> Programa de PCR diseñado en función de la ADN polimerasa utilizada.....	98
<b>Tabla 8.</b> Endonucleasas de restricción empleadas en esta tesis .....	101
<b>Tabla 9.</b> Programas bioinformáticos empleados durante el desarrollo de esta tesis ....	126

#### Results

<b>Table 1.1.</b> Effect of Cu addition on soybean nodules and plants inoculated with <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 .....	132
<b>Table 1.2.</b> Total nitrogen content (TN), atom <sup>15</sup> N excess and proportion of nitrogen derived from the atmosphere (Ndfa) in shoots from soybean plants inoculated with <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 and grown with 4 mM K <sup>15</sup> NO <sub>3</sub> and 0 or 20 μM Cu <sup>2+</sup> .....	134
<b>Table 1.3.</b> Copper accumulation in shoots, roots and nodules of soybean plants inoculated with <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 and grown in the presence of different Cu <sup>2+</sup> concentrations .....	134
<b>Table 1.4.</b> <sup>15</sup> N-N <sub>2</sub> O emissions by nodulated roots from soybean plants inoculated with <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 and grown with 4 mM KNO <sub>3</sub> ( <sup>15</sup> N enriched or not) and 0 or 20 μM Cu <sup>2+</sup> .....	137
<b>Table 1.5.</b> MV <sup>+</sup> -NR and MV <sup>+</sup> -NIR, NOR and N <sub>2</sub> OR activities of bacteroids from nodules of soybean plants inoculated with <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 and subjected to different Cu treatments during growth .....	138
<b>Table 2.1.</b> Effect of nitrate on alfalfa nodules and plants inoculated with <i>E. meliloti</i> 1021 .....	147
<b>Table 2.2.</b> Effect of Cu <sup>2+</sup> on shoots, roots and nodules from alfalfa plants inoculated with <i>E. meliloti</i> 1021.....	149
<b>Table 2.3.</b> Effect of Cu <sup>2+</sup> on MV <sup>+</sup> -NR, MV <sup>+</sup> -NIR and N <sub>2</sub> OR activities of bacteroids from nodules elicited by <i>E. meliloti</i> 1021 or the <i>nosZ</i> mutant strain .....	150

#### Tabla suplementaria

<b>Table S1.1.</b> Parameters of the regression models fitted to experimental data of N <sub>2</sub> O emission rates from nodulated roots and detached nodules from plants grown with different Cu concentrations .....	139
--	-----





