



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas
Simbióticos

Estación Experimental del Zaidín, CSI-Granada



**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS
GENES RESPONSABLES DE LA
SÍNTESIS DE LA
ÓXIDO NITROSO REDUCTASA DE
*Bradyrhizobium japonicum***

MIC-14



TRABAJO FIN DE GRADO

Alicia Abarca Cifuentes

Granada, julio 2015

Granada, julio 2015

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos

Estación Experimental del Zaidín, CSIC-Granada

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES
RESPONSABLES DE LA SÍNTESIS DE LA ÓXIDO
NITROSO REDUCTASA DE *Bradyrhizobium*
japonicum

Memoria del Trabajo Fin de Grado presentado por la alumna de cuarto de Grado en Biología
Alicia Abarca Cifuentes para aspirar al título de Graduada en Biología.

Fdo.: Alicia Abarca Cifuentes

Granada, julio 2015

ÍNDICE

1. RESUMEN	
2. INTRODUCCIÓN.....	1
2.1. Desnitrificación en <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	3
2.2. Óxido nitroso.....	6
2.3. Óxido nitroso reductasa.....	6
3. OBJETIVOS.....	9
4. MATERIAL Y MÉTODOS	10
4.1. Técnicas microbiológicas y bioquímicas.....	10
4.1.1. Cepas bacterianas	10
4.1.2. Medios de cultivo	10
4.1.3. Antibióticos	11
4.1.4. Conservación de cepas bacterianas	11
4.1.5. Cultivos de células de <i>B. japonicum</i>	12
4.1.5.1. Cultivo aeróbico en medio PSY	12
4.1.5.2. Cultivo aeróbico en medio BS.....	12
4.1.5.3. Cultivo microaeróbico en medio BS	12
4.1.5.4. Cultivo anaeróbico en medio BS.....	12
4.2. Técnicas analíticas.....	12
4.2.1. Determinación de la actividad β -galactosidasa	12
5. RESULTADOS	14
5.1. Respuesta de la expresión de <i>nosR-lacZ</i> a oxígeno y nitrato	14
5.2. Implicación de RegR en la expresión de <i>nosR-lacZ</i>	15

6. DISCUSIÓN.....	16
7. CONCLUSIONES.....	18
8. REFERENCIAS	19

1. RESUMEN

Las bacterias del suelo capaces de llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno en simbiosis con plantas leguminosas son comúnmente conocidas como “rizobios”. Existen algunas especies de rizobios que, además de su capacidad de fijar N_2 , son capaces de desnitrificar tanto en vida libre como en simbiosis.

Bradyrhizobium japonicum es una bacteria del suelo que establece una asociación simbiótica con plantas de soja (*Glycine max*), siendo el único rizobio capaz de desnitrificar en vida libre y en simbiosis donde dicho proceso ha sido ampliamente estudiado (Bedmar *et al.*, 2005). La expresión de los genes de la desnitrificación en *B. japonicum* tiene lugar en condiciones limitantes de oxígeno y en presencia de nitrato, o un NO_x derivado de él (revisado por Bedmar *et al.*, 2005). Recientemente se ha demostrado que la proteína RegR es necesaria para la máxima inducción de los genes *nor* responsables de la síntesis de la óxido nítrico reductasa en condiciones desnitrificantes, esto es, en anoxia y nitrato como sustrato respiratorio (Torres *et al.*, 2014). En estos estudios también se identificaron los genes *nos*, responsables de la óxido nítrico reductasa, como posibles candidatos a ser regulados por esta proteína reguladora, sin embargo no se profundizó en el control de estos genes por la proteína RegR en respuesta a oxígeno y nitrato.

Considerados estos antecedentes, el objetivo fundamental de este Trabajo Fin de Grado ha consistido en estudiar el papel de la proteína RegR en el control de la expresión de los genes *nos* en respuesta a diferentes condiciones de oxígeno. Para ello se han cultivado la cepa parental de *B. japonicum* y una mutante *regR*, que contenían una fusión transcripcional *nosR-lacZ*, en condiciones de aerobiosis, microaerobiosis y anaerobiosis con nitrato. Tras el cultivo de las células, se han realizado estudios de expresión de los genes *nos* mediante la determinación de la actividad β -galactosidasa de dicha fusión transcripcional *nosR-lacZ*. Los resultados obtenidos demostraron que la proteína reguladora RegR está implicada en la activación de los genes *nos* en respuesta a anoxia y nitrato. Sin embargo, en condiciones de aerobiosis o microaerobiosis los niveles de actividad β -galactosidasa de la fusión *nosR-lacZ* en la cepa mutante *regR* fueron superiores a los detectados en la cepa parental. Esto sugiere que la proteína RegR es un activador de los genes *nos* en respuesta a anoxia y nitrato. Sin embargo, dicha proteína podría tener un papel represor sobre la expresión de los genes *nos* en condiciones de aerobiosis y microaerobiosis.

Palabras clave: *Bradyrhizobium japonicum*, desnitrificación, nitrato, óxido nítrico y oxígeno.

2. INTRODUCCIÓN

El Nitrógeno (N) es uno de los elementos químicos más abundantes en la biosfera. En plantas es el cuarto elemento más abundante después del Carbono (C), Hidrógeno (H) y Oxígeno (O). Está presente en grandes cantidades a lo largo de toda la superficie de la Tierra y constituye alrededor de un 80% de la atmósfera terrestre. A pesar de esto, la disponibilidad del N es relativamente baja, ya que la mayoría se encuentra en forma de gas dinitrógeno (N_2), el cual no puede ser utilizado por los eucariotas y muchas bacterias (Moir, 2011).

La desnitrificación es un proceso clave en el ciclo biogeoquímico del N en la biosfera, ya que es el mecanismo mediante el cual se devuelve a la atmósfera el N_2 (Figura 1). Es un modo celular de respiración anaerobia durante la cual el nitrato es secuencialmente reducido a N_2 a través de los compuestos intermedios nitrito, óxido nítrico y óxido nitroso. El proceso ocurre en muchos tipos de procariotas y algunos hongos. Constituye la principal reacción para eliminar el exceso de nitratos que, consecuencia del abuso en la utilización de fertilizantes nitrogenados en la práctica agrícola, contaminan los ecosistemas terrestres y acuáticos. El óxido nítrico y óxido nitroso, productos intermediarios de la desnitrificación, tienen también un gran impacto sobre la contaminación atmosférica, ya que son gases que se liberan a la atmósfera e intervienen en la formación de la lluvia ácida, en el calentamiento global de la atmósfera y en la destrucción de la capa de ozono. El óxido nítrico es, por otra parte, una importante molécula señal que participa en mecanismos de defensa frente a patógenos en eucariotas (Zumft, 1997).

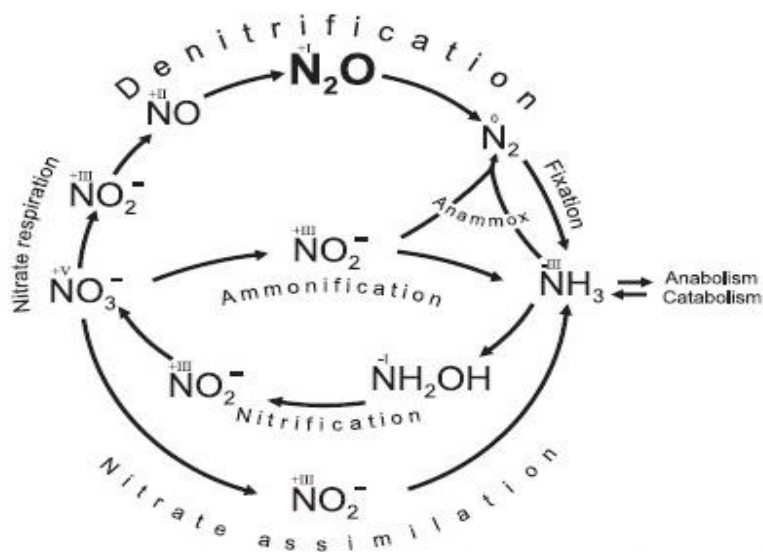


Figura 1. El ciclo biogeoquímico del Nitrógeno. En números romanos se indica el estado de oxidación de los átomos de nitrógeno. (Zumft and Kroneck, 2007).

Además de la desnitrificación, otro proceso clave del ciclo de N en la biosfera es la fijación biológica de N₂ (Figura 1). Este proceso lo llevan a cabo las bacterias comúnmente conocidas como rizobios, bacterias Gram negativas pertenecientes fundamentalmente al orden *Rhizobiales* de las α -Proteobacteria y que constituyen un número diverso de géneros: *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Ensifer* (antes *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Blastobacter*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum* y *Bradyrhizobium*, entre otros (Velazquez *et al.*, 2006).

Los rizobios son bacilos aerobios Gram negativos cuya característica principal es la de establecer asociaciones simbióticas con plantas de la familia *Fabaceae*, siendo ésta la segunda familia en importancia agrícola después de las gramíneas. Esta simbiosis posee un gran interés agrícola y medioambiental, ya que la bacteria le proporciona a la planta el nitrógeno necesario para su desarrollo y nutrición, reduciéndose la dependencia de fertilización química, lo cual tiene un impacto positivo sobre el medio ambiente. Por ello, el empleo de inoculantes microbianos para mejorar el estado nutricional de los cultivos conforma una tecnología de interés, ya que tiene una repercusión positiva sobre la sostenibilidad agrícola (Rodiño *et al.*, 2011).

Los rizobios invaden la raíz de la planta, lo que hace que se desencadenen una serie de respuestas en ambos simbioses que culminan con la formación de los nódulos, estructuras típicas de la asociación simbiótica planta-bacteria, donde se lleva a cabo el proceso de fijación biológica del N₂, esto es, la reducción del N₂ a amonio. En el interior de los nódulos las bacterias se transforman en bacteroides, que son las células que sintetizan la enzima nitrogenasa, responsable de la catálisis del N₂ el cual se reduce a amonio (Figura 2). A partir del amonio formado se originan los productos orgánicos nitrogenados esenciales para la nutrición, funcionamiento y desarrollo de las plantas. (Igarashi and Seefeldt., 2003; Peters and Szilagy., 2006).

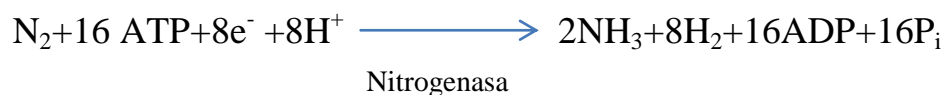


Figura 2. Ecuación estequiométrica de la fijación biológica de nitrógeno

Existen algunas especies de rizobios que, además de establecer asociaciones mutualistas fijadoras de N₂, son capaces de desnitrificar tanto en vida libre como en simbiosis (Sanchez *et al.*, 2011). La desnitrificación es una alternativa a la respiración en condiciones limitantes de oxígeno en la que los microorganismos pueden utilizar el nitrato y sus óxidos de nitrógeno derivados (NO_x) como aceptores de electrones finales para la formación de N₂. La

reducción de los NO_x está acoplada a la generación de ATP, permitiendo a la célula crecer en condiciones limitantes de oxígeno. La desnitrificación se basa en la completa reducción del nitrato (NO_3^-) o nitrito (NO_2^-) hasta nitrógeno molecular (N_2), por medio de la generación de óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O) (Figura 1). El proceso de desnitrificación ocurre a través de la acción secuencial de las enzimas nitrato reductasa (Nap/Nar), nitrito reductasa (CuNir/cd1Nir), óxido nítrico reductasa (qNor/cNor) y óxido nitroso reductasa (Nos), codificadas por los genes *nap/nar*, *nirK/nirS*, *nor* y *nos*, respectivamente (Zumft., 1997; van Spanning *et al.*, 2005; 2007; Kraft *et al.*, 2011; Richardson, 2011).

2.1. DESNITRIFICACIÓN EN *Bradyrhizobium japonicum*

Bradyrhizobium japonicum es una bacteria del suelo que establece una relación simbiótica con raíces de plantas de soja mediante la generación de nódulos fijadores de nitrógeno. En *B. japonicum*, el proceso de 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), implicados en la síntesis de las enzimas nitrato reductasa periplásmica (Nap), nitrito reductasa de cobre (NirK), óxido nítrico reductasa tipo c (cNor) y óxido nitroso reductasa (Nos), respectivamente (Figura 3).

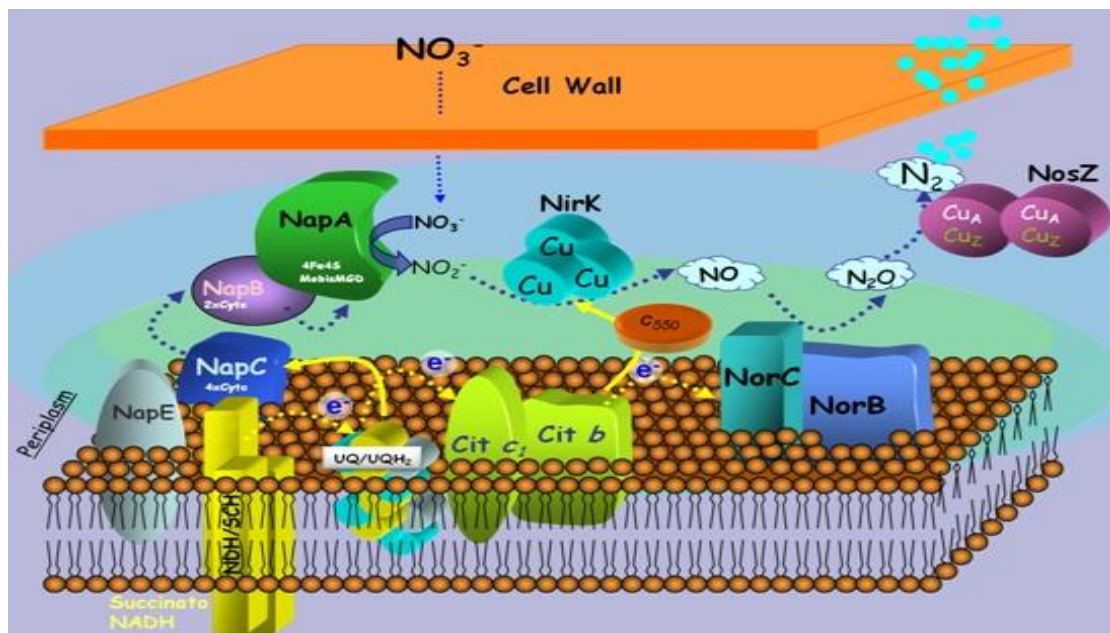


Figura 3. Esquema de la localización de las proteínas de *B. japonicum* que llevan a cabo el proceso de desnitrificación (Bueno *et al.*, 2012)

El proceso de desnitrificación de *B. japonicum* es uno de los mejores caracterizados a nivel genético y bioquímico dentro del grupo de los rizobios, de hecho es el único rizobio donde, hasta la fecha, se han aislado y caracterizado los genes de la desnitrificación y que es capaz de crecer en condiciones anaeróbicas con nitrato como aceptor de electrones de la cadena respiratoria. Por ello, *B. japonicum* es considerado el organismo modelo para el estudio de la desnitrificación en rizobios. El transporte electrónico que tiene lugar durante el proceso de desnitrificación es llevado a cabo por distintos componentes individuales encargados de transportar los electrones de forma consecutiva desde una NADH deshidrogenasa, al complejo de ubiquinonas, complejo *bc*₁, citocromo *c* y finalmente hasta las diferentes reductasas implicadas en la reducción de nitrato hasta N₂ (Figura 3).

La expresión de genes necesarios para la desnitrificación en *B. japonicum* requiere tanto la presencia de nitrato (o un óxido de nitrógeno derivado) como una limitación de oxígeno. En esta bacteria se han descrito dos cascadas reguladoras interconectadas que coordinan principalmente la expresión de los genes necesarios para la respiración microaeróbica y para la fijación biológica del nitrógeno: FixLJ-FixK₂-NnrR y la cascada RegSR-NifA, respectivamente (Sciotti *et al.*, 2003) (Figura 4). La cascada FixLJ-FixK₂-NnrR es un eficaz sistema de regulación que responde a condiciones limitantes de oxígeno. FixLJ detecta una señal de baja concentración de oxígeno (concentraciones iguales o inferiores al 5% de O₂) e induce la expresión de *fixK*₂ responsable de la síntesis del regulador transcripcional FixK₂ de tipo CRP/FNR (Figura 4). FixK₂ además de controlar la expresión de genes del metabolismo microaeróbico tales como *fixNOQP*, responsable de la síntesis de la oxidasa *cbb*₃, también induce la expresión de los genes *nap*, *nirK* y *nor* (Bedmar *et al.*, 2005, Robles *et al.*, 2006; Mesa *et al.*, 2008), así como del gen *nnrR* cuyo producto, la proteína NnrR es similar a otros reguladores transcripcionales de la familia CRP/FNR (Mesa *et al.*, 2003) (Figura 4). La utilización de fusiones transcripcionales entre las regiones promotoras de los genes *nap*, *nirK*, y *nor* y el gen informador *lacZ* ha demostrado que la máxima expresión de dichos genes depende de la proteína NnrR (Bedmar *et al.*, 2005., Robles *et al.*, 2006). De hecho, se ha demostrado recientemente, mediante calorimetría, que NnrR se une al promotor de los genes *nor* (Bueno *et al.*, enviado para publicación). Sin embargo, NnrR no se une a los promotores de los genes *nirK* y *napE*, descartando un control directo de NnrR sobre estos genes (Figura 4).

Como se ha dicho anteriormente, además de la cascada reguladora FixLJ-FixK₂-NnrR, en *B. japonicum* se ha descrito otro sistema en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno, es la cascada RegSR-NifA, la cual induce la expresión de los genes requeridos para la fijación de nitrógeno en respuesta a concentraciones mucho más limitantes de O₂ ($\leq 0.5\%$ en la fase gaseosa) que la cascada iniciada por la proteína FixL (Sciotti *et al.*, 2003). La activación de la segunda cascada de respuesta al oxígeno, RegSR-NifA se inicia por RegSR, un sistema regulador de dos componentes que induce la expresión del operón *fixR-nifA* que está

precedido por dos promotores superpuestos P1 y P2. RegR activa la transcripción de P2 bajo todas las condiciones de oxígeno a través de la unión a una secuencia de ADN situada aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción. La proteína NifA codificada por el operón *fixR-nifA* se necesita para la expresión de muchos genes requeridos para la fijación del nitrógeno en *B. japonicum* bajo condiciones de limitación de oxígeno tales como los genes *nif* implicados en la síntesis y actividad de la enzima nitrogenasa (Bauer *et al.*, 1998). RegSR pertenece a la familia de sistemas reguladores de dos componentes presentes en un gran número de Proteobacterias y que ejercen un control en respuesta a cambios en el potencial redox, donde RegS es la proteína que recibe la señal y fosforila a RegR que es la proteína reguladora (revisado por Bueno *et al.*, 2012). Esas proteínas se denominan RegSR en *B. japonicum* y *Rhodopseudomonas palustris*, RegBA en *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodovulum sulfidophilum* y *Roseobacter denitrificans*, PrrBA en *Rhodobacter sphaeroides*, ActSR en *Sinorhizobium meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens* y RoxSR en *Pseudomonas aeruginosa*.

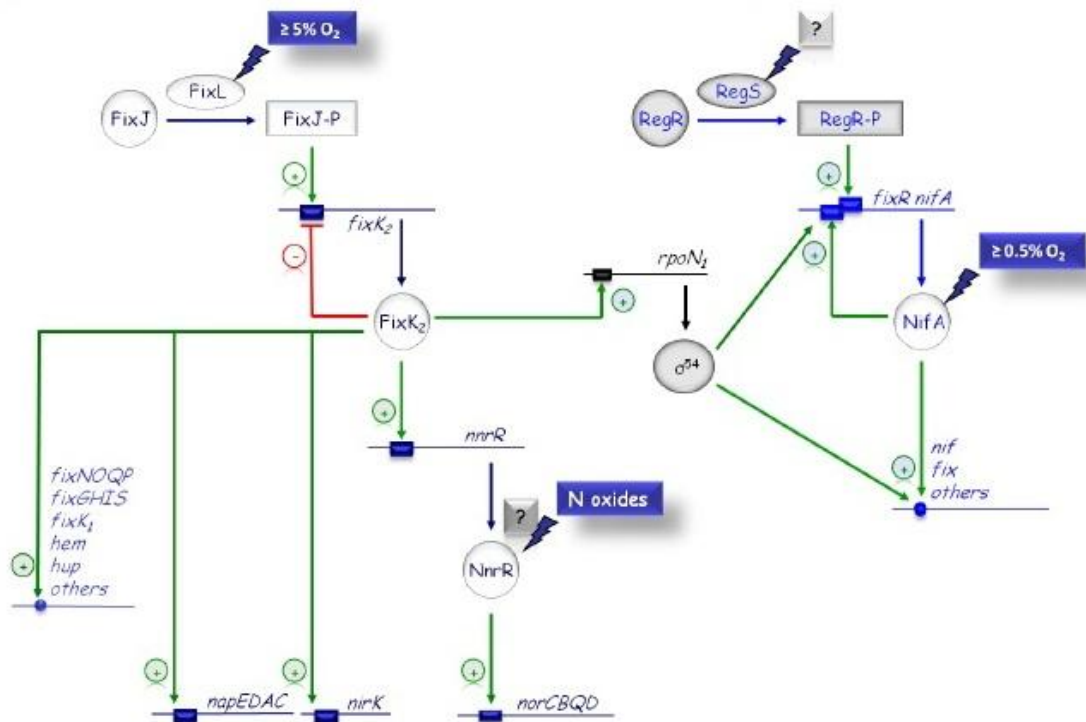


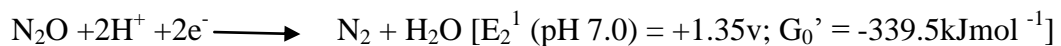
Figura 4. Red de regulación de respuesta a oxígeno en *B. japonicum* (Adaptado de Torres *et al.*, 2011).

Estudios recientes de transcriptómica de una mutante *regR* de *B. japonicum* han permitido identificar el regulón de RegR en condiciones desnitrificantes, esto es, en células cultivadas en condiciones anaeróbicas con nitrato como aceptor de electrones de la cadena respiratoria (Torres *et al.*, 2014). Entre los genes controlados por la proteína RegR, caben destacar los genes *nor* implicados en la síntesis de la óxido nítrico reductasa, y los genes *nos* responsables de la síntesis de la enzima óxido nítrico reductasa (Torres *et al.*, 2014).

2.2. ÓXIDO NITROSO

El óxido nitroso (N₂O) es un gas soluble en agua que actualmente es de gran interés debido a su contribución en el calentamiento global de la atmósfera por lo que se considera un importante gas invernadero. Su concentración ha ido incrementándose continuamente desde el inicio de la industrialización. La capacidad radiactiva del N₂O es unas 300 veces mayor que el del CO₂. Debido a perturbaciones antropogénicas como la agricultura, la tala de bosques y la quema de combustibles fósiles la concentración de N₂O se ha incrementado hasta 314ppbm y sigue creciendo de forma exponencial debido al uso de fertilizantes nitrogenados en la agricultura. (Smith *et al.*, 2008).

El N₂O es un metabolito inorgánico obligatorio de la célula bacteriana durante la desnitrificación, ya que durante este proceso respiratorio se produce dicho gas que se convierte a N₂. El N₂O sostiene toda la bioenergética necesaria para la bacteria cuando el O₂ está ausente, por eso, no es de extrañar, encontrarnos bacterias viviendo en hábitat extremos en amplísimos rangos de temperatura, pH, presión y salinidad. Por lo tanto N₂O y condiciones extremas son compatibles (Zumft, 2005). El N₂O es relativamente inerte a temperatura ambiente (a diferencia del óxido nítrico) y tiene una afinidad considerablemente baja para los centros metálicos. El potencial de reducción de la pareja N₂O/N₂ es alto, es decir la reducción del N₂O es una reacción fuertemente exergónica:



Algunas bacterias aprovechan esta propiedad mediante el uso de N₂O como aceptor final de electrones en la conservación de energía del metabolismo respiratorio. La reacción es catalizada por una enzima dimérica con centros de unión al cobre, una reductasa de tipo Z denominada óxido nitroso reductasa (Zumft., 1997, Zumft., 2005; Zumft and Kroneck., 2007).

2.3. ÓXIDO NITROSO REDUCTASA

El último paso de la desnitrificación consiste en la reducción de N₂O a N₂, como se ha dicho anteriormente, reacción que cataliza la enzima óxido nitroso reductasa (Nos) (revisado en Zumft and Kroneck., 2007; van Spanning., 2011; Spiro., 2012). Los genes que codifican la enzima Nos están organizados en el operón *nosRZDFYLX*. La enzima, de localización periplásmica, es un homodímero compuesto por dos subunidades de 65 kDa, que contiene cobre en su centro activo. El cobre es poco soluble en condiciones de limitación de oxígeno, por lo que requiere proteínas que sean capaces de captarlo en el interior celular, procesarlo

hasta su estado activo y ensamblarlo a la proteína. Cada monómero está formado por los dominios Cu_A y Cu_Z además de otras proteínas accesorias, entre las cuales algunas son chaperonas de Cu y otras conforman un sistema de transporte tipo ABC para la biogénesis del centro catalítico. La estructura recientemente publicada de la Nos de *Pseudomonas stutzeri* ha revelado que el N₂O se une a Cu_Z cercano a Cu_A (Pomowski *et al.*, 2011). Actualmente se están secuenciando gran cantidad de genomas bacterianos lo que está proporcionando una inestimable cantidad de información adicional ya que están siendo descubiertas nuevas cepas que utilizan el N₂O.

Los genes *nosR*, *nosZ*, *nosD*, *nosF*, *nosY*, *nosL* y *nosX*, responsables de la síntesis de la óxido nitroso reductasa, codifican proteínas de 85, 72, 33, 28, 19 y 38.5 kDa, respectivamente. La subunidad catalítica es la proteína NosZ que está muy bien caracterizada, no así el resto de proteínas complementarias. NosDFY constituye un transportador tipo ABC, el cual transporta un compuesto azufrado al periplasma. NosZ es exportada como apoproteína al periplasma donde se insertan a la misma los centros Cu_A, y Cu_Z. Es bastante probable que el resto de las proteínas Nos accesorias (NosLX) tengan papeles en el ensamblaje de los grupos cobre. Por último, el gen *nosR* codifica la síntesis de la proteína NosR la cual se ha propuesto está implicada, por un lado, en la regulación de los genes *nos* y por otro, en el transporte electrónico hacia la subunidad catalítica NosZ (Zumft and Kroneck., 2007).

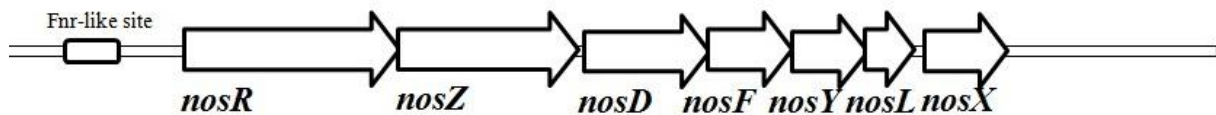


Figura 5. Organización de los genes *nos* de *B.japonicum*. (Velasco *et al.*, 2004).

En *B. japonicum*, la enzima Nos está codificada por los genes *nosRZDFYL* (Velasco *et al.*, 2004). Sin embargo, a pesar de ser esta una enzima clave para la reducción del gas invernadero N₂O, se conoce muy poco de su regulación en esta bacteria. Recientemente se ha demostrado que la proteína RegR es necesaria para la máxima inducción de los genes *nor* responsables de la síntesis de la óxido nítrico reductasa en condiciones de anoxia, nitrato y en presencia de una fuente de carbono oxidada como es el succinato (Torres *et al.*, 2014). En estos estudios también se identificaron los genes *nos* como posibles candidatos a ser regulados por esta proteína reguladora, sin embargo no se profundizó en el control de estos genes por la proteína RegR en respuesta a oxígeno y nitrato.

Considerados estos antecedentes, el objetivo fundamental de este Trabajo Fin de Grado ha consistido en estudiar el papel de la proteína RegR en el control de la expresión de los genes *nos* en respuesta a diferentes condiciones de oxígeno. Para ello se han cultivado la

cepa parental de *B. japonicum* y una cepa mutante en el gen *regR*, en medio mínimo con succinato disódico (10 mM) como fuente de carbono, con KNO_3 10 mM como aceptor final de electrones y en condiciones de aerobiosis, microaerobiosis (2% de oxígeno en la atmósfera gaseosa) y anaerobiosis. Tras el cultivo de células, se han realizado estudios de expresión de los genes *nos* mediante la determinación de la actividad β -galactosidasa de una fusión transcripcional de la región promotora de los genes *nos* al gen informador *lacZ*.

3. OBJETIVOS

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se plantean los siguientes objetivos:

1. Estudiar la expresión de una fusión transcripcional *nosR-lacZ* de *B. japonicum* en respuesta a nitrato y diferentes condiciones de oxígeno.
2. Estudiar la implicación de la proteína RegR de *B. japonicum* sobre la expresión de los genes *nos* en respuesta a oxígeno.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Técnicas microbiológicas y bioquímicas

4.1.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas de *B. japonicum* empleadas en este trabajo, así como sus principales características se presentan en la Tabla 1.

Cepa	Descripción	Fenotipo	Fuente o referencia
<i>B. japonicum</i>			
110 <i>spc4</i> -BG0301(<i>nosR-lacZ</i>)	Cepa parental conteniendo la fusión transcripcional <i>nosR-lacZ</i>	Spc ^r Tc ^r	Bueno <i>et al.</i> , enviado a publicar
<i>regR::Ω</i> BG0301(<i>nosR-lacZ</i>)	Mutante <i>regR</i> conteniendo la fusión transcripcional <i>nosR-lacZ</i>	Sm ^r Tc ^r	Bueno <i>et al.</i> , enviado a publicar

Tabla 1. Cepas bacterianas de *B. japonicum* utilizadas en este trabajo

- **110*spc4*-BG0301**: *B. japonicum* 110*spc4* que contiene al plásmido pBG0301* integrado en el cromosoma (Spc^r Tc^r)
- ***regR::Ω*-BG0301**: Mutante *regR::Ω* de *B. japonicum* que contiene el plásmido pBG0301* integrado en el cromosoma (Sm^r Tc^r)

* plásmido pBG0301: El plásmido pBG0301 contiene un fragmento de 558 pb de la región promotora de *nosR*, amplificado por PCR, digerido con *EcoRI-PstI* y clonado en el vector suicida pSUP3535 digerido con *EcoRI-PstI*. El plásmido pBG0301 se usó para transformar *E. coli* S17.1 y mediante conjugación biparental se transfirió a las cepas 110*spc4* and *nosR* de *B. japonicum* el cuál se integró en el cromosoma de ambas cepas mediante recombinación simple.

4.1.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados fueron PSY (peptone-mineral salts-yeast extract) y Bergensen, su composición química es la siguiente:

- **Medio PSY** (peptone-mineral salts-yeast extract, Regensburger y Hennecke., 1983): KH₂PO₄, 0.3g; Na₂HPO₄, 0.3g; CaCl₂ x 2H₂O, 0.005g; MgSO x 7H₂O, 0.10g; extracto de levadura, 1g; peptona, 3g; 10 ml de solución concentrada 100x de elementos traza;

agua desionizada, 1.1. Para preparar medio sólido se adicionó agar bacteriológico a una concentración de 15g/l.

- **Medio Bergensen** (Bergensen, 1977): Medio mínimo para *B. japonicum*: K₂HPO₄, 0.23g; MgSO₄ x 7H₂O, 0.10 g; glicerol, 4 ml; glutamato sódico, 1,1 g; 10ml de solución concentrada 100x de elementos traza; agua desionizada, 1.1. Este medio se suplementó o no con KNO₃ (10mM). Se adicionó, en lugar de glicerol, succinato disódico hexahidratado (10mM) como fuente de carbono oxidada. Al medio Bergensen con succinato se le ha denominado en este trabajo BS.

Las placas se prepararon con medio PSY sólido suplementado con arabinosa (0.1%) y los correspondientes antibióticos; éstas se sembraron con cada una de las cepas bacterianas y se incubaron a 30°C durante 7 días. El medio BS suplementado con o sin nitrato (KNO₃), se usó para el crecimiento de los cultivos en diferentes condiciones de oxígeno, según se detalla más adelante.

4.1.3. Antibióticos

Los antibióticos se adicionaron a los medios de cultivo a partir de soluciones concentradas de los mismos en agua desionizada y esterilización posterior con filtros Minisart NML ® (Sartorius) de 0.2 µm de tamaño de poro. La concentración final de los distintos antibióticos empleados se muestra en la Tabla 2, donde se indica la concentración (en µg/ml) de cada uno de los antibióticos en medio líquido y sólido.

Antibióticos para cultivos de <i>B. japonicum</i>	Concentración (µg/ml)	
	Líquido	Sólido
Dihidrocloruro de espectinomicina (Spc)	100	200
Sulfato de estreptomina (Sm)	100	200
Hidrocloruro de tetraciclina (Tc)*	25	100

Tabla 2. Antibióticos.

* La solución concentrada de Tc se preparó en metano: agua (1:1) ó metanol dependiendo de la concentración de la misma (1 ó 10 mg/ml, respectivamente)

4.1.4. Conservación de cepas bacterianas

Las cepas bacterianas se conservaron adicionando a criotubos que contenían glicerol estéril a una concentración final del 20%, alícuotas de cultivo en fase logarítmica. Los criotubos se pueden conservar a -80°C durante períodos prolongados o a -20°C para períodos más cortos.

4.1.5. Cultivos de células de *B. japonicum*

4.1.5.1. Cultivo aeróbico en medio PSY

Las células de *B. japonicum* se crecieron aeróbicamente en matraces de 250ml con 50ml de medio PSY suplementado con arabinosa (0,1%) y los correspondientes antibióticos durante 3 días.

4.1.5.2. Cultivo aeróbico en medio BS

Se emplearon tubos de 17 ml con 3ml de medio mínimo BS con KNO₃ (10 mM), inoculados con masa celular proveniente de los cultivos aeróbicos en PSY, de modo que la densidad óptica inicial a 600nm (DO₆₀₀) de los cultivos fuera de 0,2. Las células se incubaron en agitación (170 r.p.m.) a 30°C.

4.1.5.3. Cultivo microaeróbico en medio BS

Se emplearon tubos de 17 ml con 3 ml de medio mínimo BS con KNO₃ (10 mM), inoculados con masa celular proveniente de los cultivos aeróbicos en PSY, de modo que la DO₆₀₀ inicial de los cultivos fuera de 0,2. Las condiciones de micro-oxia o microaerobiosis a las que nos referimos en el trabajo se consiguieron gaseando al inicio de la incubación con una mezcla del 2% de oxígeno y 98% de N₂. Para mantener la atmósfera con dicha concentración de gases se gaseó también a las 12 horas. Para asegurar la esterilidad del gas se emplearon filtros Gelman® ACRO50 de 0,2 µm de tamaño de poro. Las células se incubaron en agitación (170 r.p.m.) a 30°C.

4.1.5.4. Cultivo anaeróbico en medio BS

Para el cultivo anaeróbico o en condiciones de anoxia se emplearon tubos de 17 ml provistos de tapón de rosca y enrasados hasta su volumen total con medio mínimo BS con KNO₃ (10 mM). Estos tubos se inocularon de manera que la DO₆₀₀ inicial de los cultivos fuera de 0,2. Las células se incubaron con agitación (170 r.p.m.) a 30°C.

4.2. Técnicas analíticas

4.2.1. Determinación de la actividad β-galactosidasa

Las células se recogieron por centrifugación a 6500 r.p.m. durante 12 minutos a 20°C, se lavaron dos veces con medio mínimo BS y se incubaron en condiciones aeróbicas, micro-oxicas y anóxicas según se indica en el apartado 4.1.5.2, 4.1.5.3. y 4.1.5.4. durante 24 horas. Tras la incubación de las células, se llevó a cabo la medida de la actividad β-galactosidasa siguiendo la siguiente metodología descrita por Miller (1972).

El protocolo seguido en el ensayo es el siguiente:

1. Tomar 12,5 mL del cultivo ($DO_{600}=0.2$) de *B. japonicum*. Centrifugar a 7000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C. Resuspender en 275 μ L de medio Bergensen y pasar a tubo eppendorf.
2. Añadir 450 μ l de tampón Z con SDS a una concentración final 0,1%.
3. Adicionar 100 μ l de cloroformo.
4. Adicionar 150 μ l de ONPG en tampón fosfato 0,1 mM e incubar a 30°C hasta que aparezca suficiente color amarillo. Parar la reacción con 350 μ l de Na_2CO_3 1M.
5. Una vez parada la reacción, determinar la absorbancia a 420nm.
6. Para medir la densidad óptica de la suspensión celular utilizada para la determinación de la actividad β -galactosidasa, se añadió en eppendorf 10 μ l de los 275 μ l (ver etapa 1) y 990 μ L de medio mínimo. Se determinó su absorbancia a una longitud de onda de 600nm.

La actividad β -galactosidasa se expresa en unidades Miller (UM), calculadas en este caso de acuerdo a la siguiente fórmula: $UM = \{[DO_{420} - (1,7 \times DO_{550})] / (DO_{660} \times V \times t) \times 1000$, donde DO_{420} , DO_{550} , DO_{660} son los valores de DO determinados a 420, 550 y 660 nm, respectivamente; t = tiempo de incubación; V = volumen de cultivo.

Tampón Z: $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$ (60 mM), 1,068 g; $NaH_2PO_4 \times H_2O$ (40 mM), 0,551 g; KCl (10 mM), 0,074 g; $MgSO_4$ (1mM), 0,0246 g; β -mercaptoetanol (50 mM), 0,350 ml; agua destilada, 100 ml. Ajustar a pH 7.

ONPG: 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosido: 4 mg de ONPG/ml de tampón fosfato.

Tampón fosfato: A: $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (0,1 mM), 1,245 g/70 ml; B: $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (0,1 mM), 0,689g/50 ml, 39 ml. Mezclar 61 ml de A y 39 ml de B.

Carbonato sódico (Na_2CO_3 , 1 M): 10,6 g/ 100ml.

5. RESULTADOS

5.1. Respuesta de la expresión de *nosR-lacZ* a oxígeno y nitrato.

Como se observa en la Figura 6, los niveles de actividad β -galactosidasa de la cepa parental *B. japonicum* 110*spc4* que contenía integrada en su cromosoma la fusión transcripcional *nosR-lacZ* fueron muy bajos en aerobiosis no observándose diferencias de expresión en las células cultivadas en ausencia o presencia de nitrato. Cuando las células se cultivaron en microaerobiosis se observó una inducción de actividad β -galactosidasa de aproximadamente 8 veces en comparación con los niveles de expresión observados en aerobiosis (Figura 6). Igualmente a lo observado en condiciones de aerobiosis, los niveles de expresión en microaerobiosis fueron similares independientemente de la presencia o no de nitrato en el medio de cultivo (Figura 6). Estos resultados sugieren que es la ausencia de oxígeno y no la presencia de nitrato el principal factor que controla la expresión de los genes *nos* de *B. japonicum*. Cuando las células de la cepa parental conteniendo la fusión transcripcional *nosR-lacZ* se cultivaron en condiciones anaeróbicas en ausencia de nitrato se observaron valores de actividad β -galactosidasa similares a los detectados en las células cultivadas en microaerobiosis sin nitrato. Sin embargo, la adición de nitrato al medio de cultivo de las células incubadas en condiciones anaeróbicas indujo alrededor de 6 veces la expresión de la fusión *nosR-lacZ* de la capa parental (Figura 6). Estos resultados sugieren que la máxima expresión de los genes *nos* de *B. japonicum* requiere condiciones de anoxia y nitrato tal como se había observado en trabajos previos para los genes *nor* (Torres *et al.*, 2014).

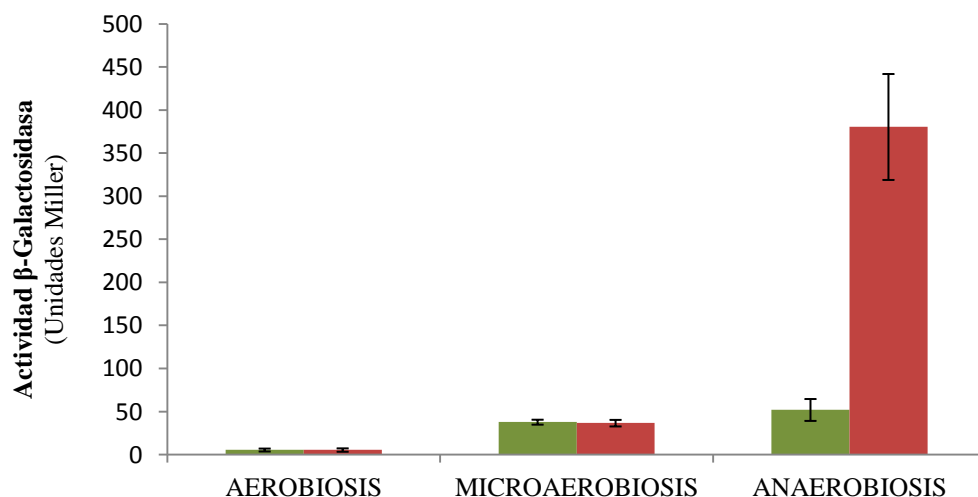


Figura 6. Actividad β -Galactosidasa de células de *B. japonicum* 110*spc4* conteniendo la fusión transcripcional *nosR-lacZ*, crecidas en medio mínimo Bergensen con succinato sódico como fuente de carbono y suplementado (en color burdeos) o no (en color verde) con KNO₃ 10mM. Las células se incubaron durante 24 horas en condiciones aeróbicas, microaeróbicas (2% de oxígeno) o anaeróbicas (0% de oxígeno). Los datos son la media con el error estándar de tres réplicas correspondientes a dos experimentos independientes.

5.2. Implicación de RegR en la expresión de *nosR-lacZ*.

Como se observa en la Figura 7, en este experimento se llevó a cabo un estudio comparativo de la expresión de la fusión *nosR-lacZ* en la cepa parental *110spc4* y en una cepa mutante en el gen *nosR* en células cultivadas en aerobiosis, microaerobiosis o anaerobiosis con nitrato. En condiciones de aerobiosis y microaerobiosis, los niveles de actividad β -galactosidasa en la cepa mutante *regR* fueron significativamente superiores a los observados en la cepa parental (Figura 7). Por el contrario, se observó una disminución significativa de la expresión de la fusión *nosR-lacZ* en la cepa mutante comparada con los niveles de expresión de la cepa parental cuando las células se cultivaron en condiciones anaeróbicas (Figura 7). Estos resultados sugieren que la proteína reguladora RegR juega un doble papel con respecto a su control sobre la expresión de los genes *nos* de *B. japonicum*. En condiciones anaeróbicas tiene un papel inductor de la expresión de dichos genes como se aprecia en la figura dado que la cepa parental presentó una elevada actividad β -galactosidasa con respecto a la observada en la mutante *RegR* cuya expresión fue significativamente menor. En contraste, en condiciones tanto aeróbicas como microaeróbicas se observa un marcado papel represor de la proteína RegR, sobre todo en el caso de microaerobiosis, donde la actividad β -galactosidasa de la mutante *regR* fue alrededor de 15 veces superior a la detectada en la cepa parental. (Figura 7).

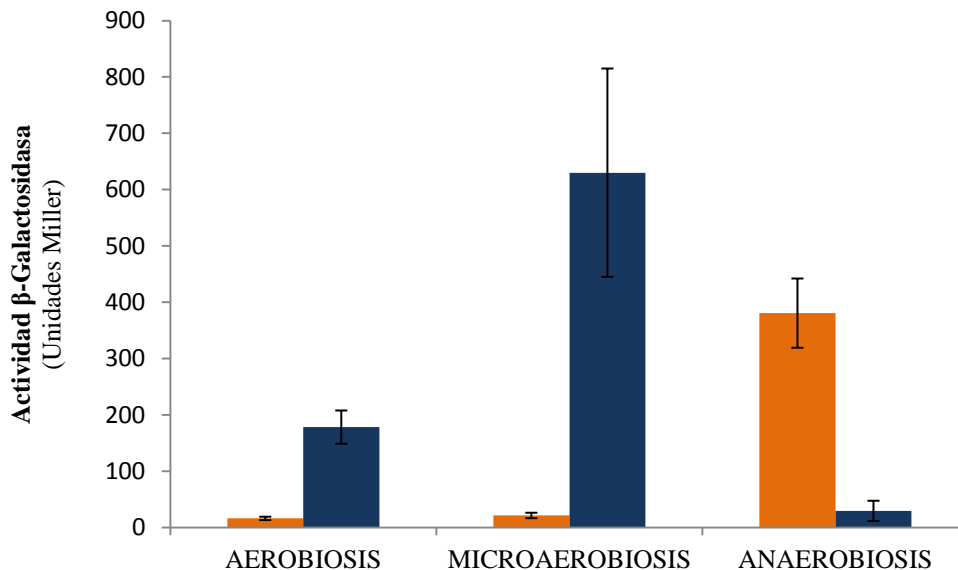


Figura 7. Actividad β -Galactosidasa de células de *B.japonicum* *110spc4* (en naranja) y mutante *regR* (en azul marino) conteniendo la fusión transcripcional *nosR-lacZ*, crecidas en medio mínimo Bergensen con succinato como fuente de carbono y suplementado con KNO_3 10mM. Las células se incubaron durante 24 horas en condiciones aeróbicas, microaeróbicas (2% de oxígeno) y anaeróbicas (0% de oxígeno). Los datos son la media con el error estándar de tres réplicas correspondientes a dos experimentos independientes.

6. DISCUSIÓN

En *Bradyrhizobium japonicum* se han identificado y caracterizado los genes *nap*, *nirK*, *nor* y *nos*, responsables de la síntesis de las enzimas nitrato reductasa periplásmica (Nap), nitrito reductasa de cobre (NirK), óxido nítrico reductasa tipo c (cNor) y óxido nitroso reductasa (Nos), respectivamente, que intervienen en la reducción secuencial de nitrato hasta nitrógeno molecular en el proceso de desnitrificación (Bedmar *et al.*, 2005). Estudios recientes de transcriptómica de una cepa mutante en el gen *regR* cultivada en condiciones desnitrificantes permitieron identificar a los genes *nor* y *nos* como candidatos a ser regulados por la proteína RegR (Torres *et al.*, 2014). En esos estudios se demostró que el papel inductor de RegR sobre los genes *nor* requería condiciones de anoxia y la presencia de nitrato (Torres *et al.*, 2014). Sin embargo, al inicio de este Trabajo Fin de Grado se desconocía si al igual que se había demostrado para los genes *nor*, eran también necesarias condiciones de anaerobiosis y nitrato para poner de manifiesto el papel inductor de RegR sobre la expresión de los genes *nos*.

Por ello, en este trabajo se decidió estudiar el posible papel de la proteína reguladora RegR sobre la expresión de los genes *nos* en diferentes condiciones de oxígeno y en presencia de nitrato. El estudio de la expresión de los genes *nos* se abordó mediante la utilización de una fusión transcripcional *nosR-lacZ* previamente construida en el Grupo de Investigación de la Dra. María Jesús Delgado (Bueno *et al.* Resultados enviados a publicar). Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron una diferencia de expresión de los genes *nos* en la cepa mutante *regR* con respecto a la cepa parental. Mientras que en aerobiosis y microaerobiosis los niveles de actividad β -galactosidasa de la fusión *nosR-lacZ* en la cepa mutante *regR* eran superiores a los de la cepa parental, ocurría lo contrario en anaerobiosis. Considerados en conjunto, estos resultados sugieren que, mientras en anoxia la proteína RegR tendría un papel de activador de la expresión de los genes *nos* en respuesta a nitrato, esta proteína podría tener un papel represor sobre la expresión de los genes *nos* en condiciones de aerobiosis y microaerobiosis.

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los previamente publicados por el grupo de investigación en los que se demostró que tanto la anoxia como nitrato son las señales necesarias para la inducción de los genes *nor* de *B. japonicum* responsables de la síntesis de la óxido nítrico reductasa siendo la proteína RegR responsable de esta inducción (Torres *et al.*, 2014). Por otro lado, en este trabajo se demuestra por primera vez el posible papel represor de la proteína RegR sobre la expresión de los genes *nos* en condiciones de aerobiosis y microaerobiosis con nitrato.

Trabajos previos del grupo de investigación donde se ha realizado este TFG han demostrado también el papel que juega la proteína reguladora RegR en la expresión de los

genes *nor* en condiciones de micro-oxia. En esos estudios se usó una cepa parental y una cepa mutante *regR* conteniendo ambas una fusión transcripcional *norC-lacZ*. En esos estudios se observó que la cepa mutante *regR* en condiciones de anoxia tenía unos niveles de actividad β -galactosidasa significativamente inferiores a los de la cepa parental (Torres *et al.*, 2014). En cambio en condiciones iniciales de microaerobiosis, se observó un leve incremento de la actividad β -galactosidasa en la cepa mutante *regR* en comparación con la cepa parental de lo que se deduce que RegR podría también ejercer un papel como represor de la expresión de los genes *nor* en condiciones iniciales de micro-oxia, al igual que se ha observado en este proyecto de TFG para los genes *nos*.

Tomados en conjunto los resultados de este TFG y los previamente obtenidos en el grupo de investigación (Torres *et al.*, 2014), podemos deducir que la proteína reguladora RegR ejerce un papel inductor de los genes *nor* y *nos* de *B. japonicum* implicados en la síntesis y reducción del gas invernadero N₂O sólo en condiciones anaeróbicas con nitrato como sustrato respiratorio. Sin embargo, esta proteína reguladora tendría un papel represor de la expresión de los genes *nor* y *nos* de *B. japonicum* en condiciones de aerobiosis y microaerobiosis, condiciones en las que el nitrato no induce la expresión de estos genes como se observa en este trabajo. Consecuentemente, proponemos que la proteína RegR tendría un papel activador o represor de los genes *nos* de *B. japonicum* dependiendo de las condiciones de oxígeno.

7. CONCLUSIONES

1. La expresión de los genes *nos* de *B. japonicum* se incrementa en condiciones de microaerobiosis respecto a su expresión basal en aerobiosis, pero dicha inducción no depende de la presencia de nitrato en el medio.
2. En condiciones de anaerobiosis, el nitrato induce significativamente la expresión de los genes *nos* de *B. japonicum*.
3. La proteína reguladora RegR de *B. japonicum* tiene un papel activador de la expresión de los genes *nos* en respuesta a anoxia y nitrato.
4. La proteína reguladora RegR tiene un papel represor de la expresión de los genes *nos* en condiciones de aerobiosis y microaerobiosis.

8. REFERENCIAS

- Bauer E., Kaspar T., Fischer H.M. and Hennecke H. (1998) Expression of the *fixR-nifA* operon in *Bradyrhizobium japonicum* depends on a new response regulator, RegR J Bacteriol 180: 3853-3863.
- Bedmar E.J., Robles E.F. and Delgado M.J. (2005) The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. Biochem Soc Trans 33: 141-144.
- Bueno E., Mesa S., Bedmar E.J., Richardson D.J. and Delgado M.J. (2012) Bacterial adaptation of respiration from oxidic to microoxic and anoxic conditions: redox control. Antioxid Redox Signal 16: 819-852.
- Delgado M.J., N.Bonnard, et al. (2003). The *Bradyrhizobium japonicum napEDABC* genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. Microbiology 149 (Pt 12): 3395-3403.
- Igarashi R.Y. and Seefeldt L.C. (2003) Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. Crit Rev Biochem Mol Biol 38: 351-84.
- Kraft B., Strous M. and Tegetmeyer H.E. (2011) Microbial nitrate respiration-genes, enzymes and environmental distribution. J Biotechnol 155: 104-117.
- Mesa S., Velasco L., et al.(2002). Characterization of the *norCBQD* genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. Microbiology 148: 3553-3560.
- Mesa S., Bedmar E.J., Chanfon A., Hennecke H., and Fischer H.M. (2003). *Bradyrhizobium japonicum* NnrR, a denitrification regulator, expands the FixLJ-FixK₂ regulatory cascade. J Bacteriol 185: 3978-3982.
- Mesa S., Hauser F., Friberg M., Malaguti E., Fischer H.M. and Hennecke H. (2008) Comprehensive assessment of the regulons controlled by the FixLJ-FixK₂-FixK₁ cascade in *Bradyrhizobium japonicum*. J Bacteriol 190: 6568-6579.
- Miller J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Moir J.W.B. (2011). Nitrogen Cycling in Bacteria: Molecular Analysis. (ed.) Norfolk,UK: Caister Academic Press. pp 197-210. ISBN: 978-1-904455-86-8.
- Peters J.W. and Szilagyi R.K. (2006) Exploring new frontiers of nitrogenase structure and mechanism. Curr Opin Chem Biol 10:101-108.
- Pomowski A., Zumft W.G., Kroneck P.M., and Einsle O. (2011) N₂O binding at a [4Cu:2S] copper-sulphur cluster in nitrous oxide reductase. Nature 477: 234-237.
- Richardson D.J. (2011). Redox complexes of the nitrogen cycle. In Nitrogen Cycling in Bacteria. Moir, J.W.B.(ed). Norfolk,UK: Caister Academic Press, pp.23-39.
- Robles E.F., Sánchez C., Bonnard N., Delgado M.J. and Bedmar E.J. (2006) The *Bradyrhizobium japonicum napEDABC* genes are controlled by the FixLJ-FixK₂-NnrR regulatory cascade. Biochem Soc Trans 34: 108-110.
- Rodiño A.P., de la Fuente M., González A.M., de Ron A.M. and Santalla M. (2011) Diversidad de las leguminosas en Europa y España. En Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismos. Mejías M.G., Rivilla R.P., Soto M.J., Delgado M.J., González E., P.F., M. et al. (eds): Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), pp. 19-34.
- Sánchez C., Bedmar E.J., Delgado M.J. (2011). Denitrification in Legume-associated endosymbiotic Bacteria. Nitrogen cycling in Bacteria. Moir, J.W.B. (ed). Norfolk, UK, Caister Academic Press:197:210.
- Sciotti M., Chanfon A., Hennecke H. and 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.
- Smith P; Martino D; Cai Z; Gwary D; Janzen H; Kumar P; McCarl B; Ogle S; O'Mara F; Rice C; Scholes B; Sirotenko O; Howden M; McAllister T; Pan G; Romanenkov V; Schneider U; Towprayoon S; Wattenbach M; and Smith J. (2008) Greenhouse gas mitigation in agriculture. Royal Society B: Biological Sciences. 363:1492-1520.

- Spiro S. (2012) Nitrous oxide production and consumption: regulation of gene expression by gas-sensitive transcription factors. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*. 367 :1213-1225.
- Torres M.J., Bueno E., Mesa S., Bedmar E.J. and Delgado M.J. (2011) Emerging complexity in the denitrification regulatory network of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem Soc Trans* 39: 284-288.
- Torres M.J., Argandoña M., Vargas C., Bedmar E.J., Fischer H-M., Mesa S. and Delgado M.J. (2014) The global response regulator RegR controls expression of denitrification genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS One* 9: 1-11.
- van Spanning R.J., Delgado M.J. and Richardson D.J. (2005) The nitrogen cycle: denitrification and its relationship to N₂ fixation. In *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology and the Environment*. Werner D. and Newton W.E. (ed). Netherlands: Springer, pp. 277-342.
- van Spanning R.J., 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. (ed). Amsterdam: Elsevier Science.
- van Spanning, R.J., (2011). Structure, function, regulation and evolution of the nitrite and nitrous oxide reductase: denitrification enzymes with a β -propeller fold. In *Nitrogen Cycling in Bacteria*. Moir, J.W.B. (ed). Norkfolk, UK, Caister Academic Press: 135-161.
- Velasco L., Mesa S., *et al.* (2001). Characterization of the *nirK* gene encoding the respiratory, Cu-containing nitrite reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochim Biophys Acta* 1521 (1-3):130-134.
- Velasco L., Mesa S. Xu Chang-ai; 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 (3): 229-235.
- Velázquez E. Mateos P.F., Trujillo M., Rivas R. and Martínez-Molina E. (2006) Diversidad de bacterias rizoendosimbióticas de plantas. Bedmar E.J., González J., Llunch C. y Rodelas B. (eds.) *Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN)*, pp. 45-52.
- Zumft W.G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 533-616.
- Zumft W.G. (2005). Biogenesis of the bacterial respiratory CuA, Cu-S enzyme nitrous oxide reductase. *J Mol Microbiol Biotechnol* 10 (2-4):154-166.
- Zumft W.G. and Kroneck P.M.(2007). Respiratory transformation of nitrous oxide (N₂O) to dinitrogen by Bacteria and Archaea. *Adv Microb Physiol* 52: 107-227.