



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

TESINA PRESENTADA PARA OBTENER
EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

“REGULACIÓN POR *QUORUM SENSING* DE LOS GENES *NOD* Y
POLISACÁRIDOS BACTERIANOS, EN CULTIVOS DE *SINORHIZOBIUM FREDII*,
UN SIMBIONTE DE SOJA”

CARLA ANDREA GATTO CÁCERES

SANTA ROSA (LA PAMPA)

ARGENTINA

2010

PREFACIO

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología, dependiente del Departamento de Química, durante el período comprendido entre el 10 de diciembre de 2009 y 06 de diciembre de 2010, bajo la dirección de la Msc. Pagliero, Fabiola; y la codirección de la Dra. Montecchia, Marcela.

28 de diciembre de 2010

Carla Andrea Gatto Cáceres

Departamento de Química

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA
PAMPA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mis padres, que me apoyaron en la elección de la carrera, que me hicieron descubrir mi interés por la ciencia, que estuvieron para mí tanto en momentos de flaqueza y como de alegría.

Agradezco a los profesores, aquellos que lo son desde el fondo del alma, que imparten conocimiento con el sólo hecho de estar, y que realmente marcaron la diferencia: Julio Peluffo, Santiago Echaniz, Estela Quirán, Graciela Alfonso, Claudia Montalvo, José Luis Hierro, Silvio Casadío, todos ellos oficiaron como guías durante los años que duró mi paso por esta Facultad.

Agradezco a mi directora Fabiola Pagliero y a Graciela Lorda, por la paciencia, por las explicaciones, por las correcciones, por alentarme cuando “el fracaso se me volvía intolerable”.

Agradezco también a todos aquellos integrantes del departamento de Química, que aceptaron días de mal humor, días de alegría extrema, días de mucho sueño, días de hablar sin parar: Carolina, Mary y Marcelo.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, Panchi y Andrea, que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme.

Agradezco a mis amigas y amigos, y a mis familias pampeana y neuquina, que estuvieron siempre presentes, dándome palabras de aliento, conteniéndome e impulsándome a seguir adelante.

Agradezco a mis compañeros, por haber compartido clases, prácticos, charlas de todo tipo, en cualquier momento y lugar, por haber hecho que este viaje sea más divertido, más interesante, más inolvidable.

RESUMEN

Las bacterias coordinan su comportamiento colectivo mediante un sistema regulatorio conocido como *quorum sensing*. La acumulación en el entorno de una molécula señal difusible producida por los microorganismos, influye en la transcripción de genes y permite acoplar la densidad celular con la expresión génica. En bacterias Gram negativas, las moléculas señal son generalmente acil-homoserina lactonas (AHLs).

Durante el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa, la planta secreta compuestos flavonoides que son reconocidos específicamente por la bacteria activando la transcripción de genes *nod*. Estos genes codifican para enzimas responsables de la biosíntesis y secreción de factores Nod. Además de estos factores, los rizobios sintetizan exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS), polisacáridos capsulares (KPS), glucanos cíclicos (GC), proteínas externas de nodulación (Nops), que son reconocidas por la planta y participan en la iniciación de la organogénesis del nódulo.

En este trabajo se determinó la influencia del hierro y el nitrógeno sobre la producción de AHLs, EPS, LPS, KPS y proteínas celulares totales en *Sinorhizobium fredii*. Se encontró que si bien no hay diferencias en la composición de LPS en los distintos tratamientos, las demás moléculas se vieron alteradas por las concentraciones variables de estos nutrientes. Estos resultados permitirán definir las condiciones óptimas de formulación de biofertilizantes alternativos para soja con una cepa de crecimiento rápido.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN).....	1
Fertilización Nitrogenada y FBN	2
Interacción Rizobio-Leguminosa	3
Factores Nod	4
Otros factores necesarios para la nodulación	5
Exopolisacáridos (EPS)	5
Lipopolisacáridos (LPS)	6
Polisacáridos Capsulares tipo Antígeno K (KPS)	6
Glucanos Cíclicos (GC).....	6
Proteínas externas de nodulación (Nops)	7
Infección y Nodulación	8
<i>Quorum Sensing</i>	9
<i>Sinorhizobium fredii</i>	12
<i>Glycine max</i>	12
Nitrógeno.....	16
Hierro	16
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Microorganismos.....	18
Medios de cultivo	18
Antibióticos	20
Conservación de cepas bacterianas	21
Determinación del crecimiento microbiano	21
Extracción y detección de moléculas autoinductoras.....	21
Bioensayo con <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	21
Bioensayo con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1-pZLR4.....	22
Determinación y análisis de lipopolisacáridos (LPS), proteínas celulares	

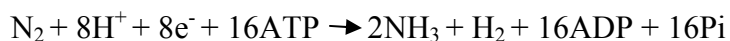
totales, exopolisacáridos (EPS) y polisacáridos capsulares (KPS)	22
Procesamiento de los cultivos bacterianos	22
Análisis de LPS	23
Electroforesis en gel de poliacrilamida para LPS.....	24
Determinación de proteínas celulares totales	26
Electroforesis en gel para proteínas celulares totales	27
Determinación del contenido de hexosas	30
Transformación de células de rizobios mediante conjugación biparental.....	30
Análisis estadístico	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
Influencia del contenido de Hierro y Nitrógeno en el medio de cultivo sobre la producción de acil-homoserina lactonas (AHLs)	31
Detección de moléculas autoinductoras (AHLs) obtenidas de medios con concentraciones variables de Hierro	32
Detección de moléculas autoinductoras (AHLs) obtenidas de medios con concentraciones variables de Nitrógeno	35
Influencia del contenido de Hierro y Nitrógeno en el medio de cultivo sobre la producción de polisacáridos y proteínas celulares.....	38
Determinación y Análisis de Lipopolisacáridos.....	39
Determinación y Análisis de Proteínas Celulares Totales.....	40
Determinación y Análisis de Exopolisacáridos	43
Determinación y Análisis de Polisacáridos Capsulares.....	44
Influencia de la concentración de Hierro y de Nitrógeno sobre la inducción de genes <i>nod</i>	46
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	47
BIBLIOGRAFÍA	49

INTRODUCCIÓN

Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN)

El nitrógeno (N) es, después del agua, el principal nutriente limitante para el desarrollo de las plantas. Es el elemento más abundante de la atmósfera terrestre y sin embargo es una fuente nutritiva muy escasa, dado que el nitrógeno atmosférico (N₂) es inerte y no es utilizable por la mayoría de los seres vivos. El N₂ se incorpora a los sistemas biológicos cuando ha sido fijado (reducido). Existen microorganismos fijadores, que combinan el N con ciertos elementos como el hidrógeno o el oxígeno, formando nitrato o amonio, en un proceso denominado Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN).

El grupo de bacterias al que se conoce colectivamente como rizobios, induce en las raíces o en el tallo de las leguminosas la formación de estructuras especializadas, denominadas nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso es reducido a amonio. La enzima nitrogenasa cataliza la reacción:



La nitrogenasa es una proteína de gran tamaño que consiste de dos componentes, una proteína homodimérica que contiene hierro y es codificada por *nifH*, encargada de transportar los electrones del donador fisiológico de electrones (ferredoxina o flavodoxina) hacia la proteína de hierro-molibdeno, y una proteína tetramérica que contiene hierro y molibdeno, codificada por los genes *nifD* y *nifK*, cuya función es reducir el nitrógeno. La nitrogenasa es sensible al oxígeno, y es capaz de reducir acetileno y N₂.

Los principales compuestos orgánicos transportados al interior de los bacteroides son los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, en particular los ácidos de cuatro carbonos succinato, malato y fumarato, que actúan como dadores de electrones para la producción de ATP y, tras su conversión a piruvato, como última fuente de electrones para la reducción del N₂. El primer producto estable que se obtiene de la fijación de N₂ es el amonio, que es asimilado por los bacteroides y puede ser transferido a la planta en forma de alanina.

Durante el proceso de simbiosis la planta también expresa proteínas específicas del nódulo, denominadas nodulinas. Entre ellas, la leghemoglobina aporta O₂ a los bacteroides y controla los niveles de O₂ en el nódulo, para que la nitrogenasa pueda funcionar correctamente. La leghemoglobina se localiza en el citosol de las células de la planta infectada, y es la que da color rosado a los nódulos funcionales (Wang *et al.* 2001)

La FBN aporta la mayor parte del N fijado a los ecosistemas terrestres. La fijación global se estima en unos 275 millones de toneladas de N al año, de las cuales 30 millones de toneladas se fijan por causas naturales como descargas eléctricas, erupciones volcánicas, etc, 70 millones de toneladas por la fijación industrial, y 175 millones de toneladas mediante fijación biológica. De estos 175 millones, 35 millones corresponden a la fijación de microorganismos de vida libre y 140 millones a la fijación de microorganismos simbióticos (Bedmar *et al.* 2006).

Fertilización Nitrogenada y FBN

Las técnicas agrícolas actuales se basan en el uso masivo de productos químicos, tanto para la fertilización de los cultivos como para la lucha contra patógenos vegetales. La aplicación de fertilizantes nitrogenados y otras acciones industriales y antrópicas han alterado las condiciones básicas del ciclo natural del N y han contribuido a la contaminación por nitratos de los ecosistemas terrestres y acuáticos con grave riesgo para la salud humana. El abuso de fertilizantes nitrogenados representa una serie de efectos negativos relacionados con a) la salud humana como la metahemoglobinemia, afecciones respiratorias, etc, b) contaminación de aguas por nitratos, nitritos, nitrosaminas, etc, c) eutrofización de ecosistemas acuáticos por el crecimiento excesivo de cianobacterias, etc, d) destrucción de la capa de ozono y efecto invernadero por la liberación a la atmósfera de óxidos de nitrógeno (Bedmar *et al.* 2006).

Los microorganismos pueden utilizarse como agentes biológicos útiles para los cultivos, a) usándose como fertilizantes por su potencial de favorecer la nutrición de las plantas, b) como inductores de resistencia sistémica frente a patógenos, y c) como inductores de producción de fitohormonas por parte de la planta (Bedmar *et al.* 2006).

Los rizobios utilizados en la formulación de biofertilizantes microbianos (inoculantes) tienen la propiedad de mejorar la nutrición y el crecimiento vegetal, y aumentar significativamente el nitrógeno combinado del suelo, por medio del proceso de simbiosis. Su adopción y uso eficaz es clave para asegurar la sustentabilidad y productividad agrícola (Sanjuán, 2007).

El uso de fuentes nitrogenadas afecta negativamente el proceso de FBN, dado que cuando existe suficiente disponibilidad de nitrógeno en el suelo, la planta, por razones de economía energética, utiliza el nitrógeno edáfico en lugar de invertir en nodulación para fijar nitrógeno atmosférico (Ferraris *et al.* 2006).

Interacción Rizobio-Leguminosa

Los rizobios son alfaproteobacterias del suelo, capaces de establecer asociaciones simbióticas con plantas leguminosas. Esta simbiosis involucra la formación de estructuras especializadas llamadas nódulos, en las raíces y en los tallos de la planta hospedadora. Dentro de esos nódulos, los rizobios se diferencian en bacteroides fijadores de nitrógeno, capaces de reducir el nitrógeno atmosférico a amonio. Este amonio puede ser asimilado por la planta y utilizado para su crecimiento y desarrollo, a cambio de lo cual, la planta hospedadora provee a la bacteria de una fuente de carbono y de un ambiente apropiado que estimula su crecimiento.

El proceso de organogénesis del nódulo requiere del intercambio de señales de simbiosis entre ambos miembros de la asociación (Fig.1). Los flavonoides, y otros compuestos exudados por las raíces de las leguminosas, como betaínas, ácidos aldónicos, xantonas, fenoles y jasmonatos, son reconocidos por la proteína rizobiana NodD, que activa la transcripción de genes *nod*. Estos genes codifican para enzimas responsables de la biosíntesis y secreción de factores Nod. Además de factores Nod, los rizobios sintetizan polisacáridos de superficie, proteínas tipo I, III y IV, N-acil homoserina lactonas (AHLs), bradióxetina, ácido indolacético (AIA), entre otros compuestos. Estas moléculas son reconocidas por la planta y participan en la iniciación de la organogénesis del nódulo (López-Baena *et al.* 2008; Cooper, 2007).

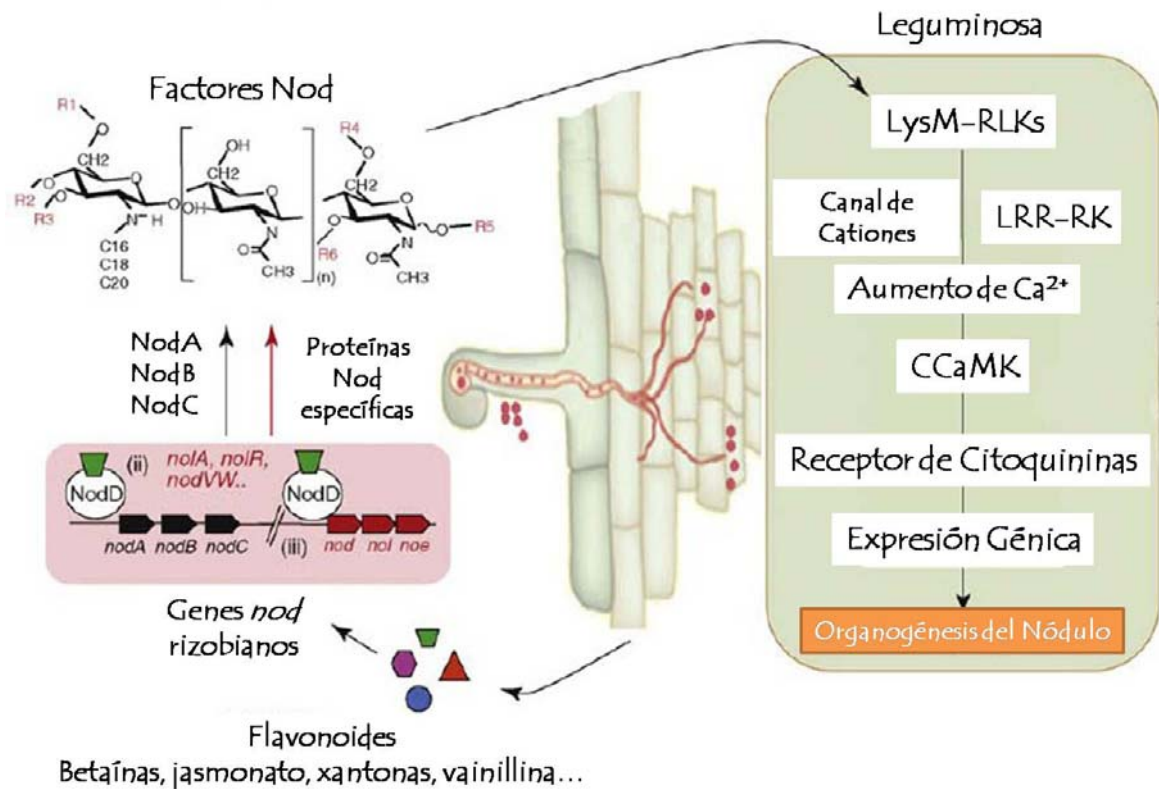


Figura 1- Diálogo Molecular. Figura modificada de Masson-Boivin C. *et al.* 2009.

Factores Nod

Los factores Nod son lipoquito-oligosacáridos con residuos de N-acetil-D-glucosamina unidos en forma β -1,4, y con una cadena de ácidos grasos hacia el terminal no reductor. Las variaciones en la estructura de estos factores surge por cambios en la longitud del esqueleto oligosacárido (entre dos y seis residuos de N-acetilglucosamina), en el tipo de ácido graso, y en el número y tipo de grupos sustituyentes (acetil, arabinosil, fucosil, manosil, etc.). Son activos a concentraciones de 10^{-12} mol/L y provocan una serie de respuestas de la planta, incluyendo: deformación de los pelos radicales, despolarización de la membrana plasmática, fluctuaciones rápidas en los niveles intracelulares de calcio libre en los pelos radicales, alteraciones en el citoesqueleto de los pelos radicales, formación del hilo de preinfección en los pelos radicales deformados, división de las células corticales en los sitios de primordios de nódulos, inhibición del sistema reactivo de generación de oxígeno, perturbación del flujo de auxinas en las raíces, e inducción de genes de la planta durante la preinfección, infección, desarrollo del nódulo y estadios funcionales del nódulo en la simbiosis.

La transcripción de genes requeridos para la síntesis de factores Nod usualmente está mediada por proteínas NodD, productos regulatorios de los genes *nodD* constitutivos. Las

proteínas NodD son miembros de la familia LysR de reguladores de la transcripción, y los rizobios pueden poseer de uno a cinco homólogos, dependiendo de la especie/biovar. Se unen a secuencias conservadas de DNA, conocidas como *nod boxes*, que se encuentran en las regiones promotoras de genes *nod* inducibles, produciendo que se curve el DNA en el sitio de unión. Tanto la proteína NodD como el coinductor flavonoide son necesarios para activar la transcripción de los genes de los factores Nod. La presencia del flavonoide apropiado agudiza la curvatura en el DNA en el sitio promotor, permitiendo que la RNA polimerasa inicie la transcripción (Cooper, 2007).

Los factores Nod afectan la expresión de más de 750 genes vegetales. Muchos de estos genes inducidos se denominan genes de nodulina temprana (ENOD), e incluyen genes asociados al remodelado del citoesqueleto, la deposición de la pared celular, el crecimiento celular y la división celular. Además, existe una regulación de genes vegetales asociados a señalización y respuestas transcripcionales inducida por factores Nod (Downie, 2010).

Otros factores necesarios para la nodulación

Los rizobios producen polisacáridos de superficie y proteínas de secreción que participan en varias etapas del desarrollo de la simbiosis, como la determinación del rango del hospedador, la colonización de la raíz, el reconocimiento del hospedador, la formación del hilo de infección y la invasión del nódulo (Fig.2). Incluyen exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS), polisacáridos capsulares (KPS), β -glucanos cíclicos (GC) y proteínas de secreción tipo III o proteínas externas de nodulación (Nops). Posiblemente estos compuesto protejan a los rizobios actuando como barreras físicas frente a los antibióticos de defensa secretados por la planta, o bien suprimiendo la respuesta inmune del hospedador (Cooper, 2007; Soto *et al.* 2009).

- **Exopolisacáridos (EPS):** son productos bacterianos extracelulares abundantes que aparecen libres en el medio, o que se asocian en mayor o menor medida a la célula bacteriana. Son polímeros de heteropolisacáridos compuestos por azúcares comunes (glucosa, galactosa, manosa, ramnosa, ácido glucurónico y ácido galacturónico) sustituidos con residuos no carbohidratos (piruvil, acetil, succinil e hidroxibutanoil), que se ensamblan en unidades repetidas a una cadena central. Participan en la invasión, el desarrollo del bacteroide, la supresión de la respuesta de defensa vegetal y proveen a la bacteria de resistencia frente a estrés osmótico, iónico y oxidativo, y protección frente a compuestos tóxicos (Skorupska *et al.* 2006; Bedmar *et al.* 2006; Ullrich, 2009; Vriezen *et al.* 2007).

- **Lipopolisacáridos (LPS):** Son componentes mayoritarios de la pared externa de las bacterias Gram-negativas. Son glucolípidos anfipáticos complejos, compuestos por tres dominios estructurales: lípido A, que ancla el LPS a la membrana plasmática, oligosacárido núcleo (ON), que posee KDO (ácido 3-deoxy-D-mano-2-octulosónico), y una cadena conocida como antígeno O. El lípido A tiene de 4 a 6 restos de 3-hidroxiácidos unidos a un disacárido de galactosamina, que puede estar o no fosforilado o unido a un ácido urónico. El oligosacárido núcleo consta de tres residuos de KDO, tres de ácido galacturónico (GalA), uno de manosa (Man) y uno de galactosa (Gal). Está unido al lípido A mediante uno de los KDO, mientras que otro de estos residuos ocupa la posición terminal donde se une el antígeno O. Los grupos carboxilos de GalA permiten unir las moléculas de LPS mediante cationes divalentes, y así estabilizar la membrana externa. El antígeno O es la parte más variable de la molécula de LPS. Presenta una unidad repetitiva que puede ser un monosacárido o un oligosacárido de hasta cinco residuos, que pueden ser azúcares comunes, como glucosa, arabinosa y manosa, aunque pueden también encontrarse deoxihexosas y aminoazúcares. Los LPS participan en la infección, en el mantenimiento del bacterioide, y en la protección ante las defensas de la planta. Los cambios estructurales en los LPS son importantes dependiendo de la naturaleza exacta de las variaciones y del par rizobio-leguminosa que se considere (Bedmar *et al.* 2006; Ormeño-Orillo, 2005).
- **Polisacáridos Capsulares tipo antígeno K (KPS):** rodean a la bacteria y constituyen una matriz hidratada, que confiere resistencia a bacteriófagos y a condiciones de desecación. Contienen una alta proporción de ácido 3-deoxy-D-mano-2-octulosónico (KDO) y son estructuralmente análogos a un subgrupo de antígenos K encontrados en *Escherichia coli*. Están localizados alrededor de la membrana bacteriana, y es posible que participen en el primer contacto entre el rizobio y los pelos radicales de la leguminosa. Estudios indican que afectarían también la iniciación y la promoción del hilo de infección, y que estarían involucrados en la determinación del rango del hospedador (Frayssé *et al.* 2003).
- **Glucanos Cíclicos (GC):** son moléculas cíclicas de glucosa, algunas están presentes en el periplasma bacteriano y otras se secretan al medio. Aumenta su secreción a baja osmolaridad y parecen ser esenciales para una osmoadaptación adecuada. Se propone que funcionan como supresores de la respuesta de defensa de

la planta y que participarían en el transporte de ciertas moléculas (Wang *et al.* 2001).

- **Proteínas externas de nodulación (Nops):** Proteínas secretadas por los sistemas de secreción tipo III, T3SS o efectores T3, ayudan a modular el rango del hospedador, y son denominadas proteínas externas de nodulación Nops. Algunas de estas proteínas son fosforiladas por kinasas de la planta, sugiriendo que afectan vías de señalización durante el establecimiento de la simbiosis con las leguminosas. El sistema de secreción de tipo III es un complejo multiproteico, muy conservado, asociado a las membranas externa e interna de muchas bacterias patógenas Gram negativas. Este sistema de secreción de proteínas participa en la inducción de enfermedades, translocando a través de él una amplia variedad de factores de virulencia, tanto al medio extracelular, como al citoplasma de la célula hospedadora. Los genes responsables de la síntesis de la maquinaria de T3SS en *S. fredii* están incluidos en la agrupación génica *tts*. El gen *ttsI* está precedido por una *nod box*. En presencia de flavonoides, los rizobios que poseen un T3SS funcional, secretan al medio extracelular una serie de proteínas denominadas Nops, en un proceso dependiente de NodD y TtsI. Probablemente, la proteína TtsI actúe como regulador transcripcional responsable de la activación de los genes implicados en la secreción de Nops. NodD, en presencia de flavonoides, activaría la transcripción de *ttsI*, cuyo producto se uniría a una secuencia conservada, la caja *tts*, que se localiza delante de los genes involucrados en la secreción de tipo III, e induciría su expresión. A través del T3SS se secretan proteínas que parecen estar involucradas en la determinación de las relaciones de compatibilidad con diversos cultivares de leguminosas (Soto *et al.* 2009; Bedmar *et al.* 2006, De Lyra *et al.* 2006).

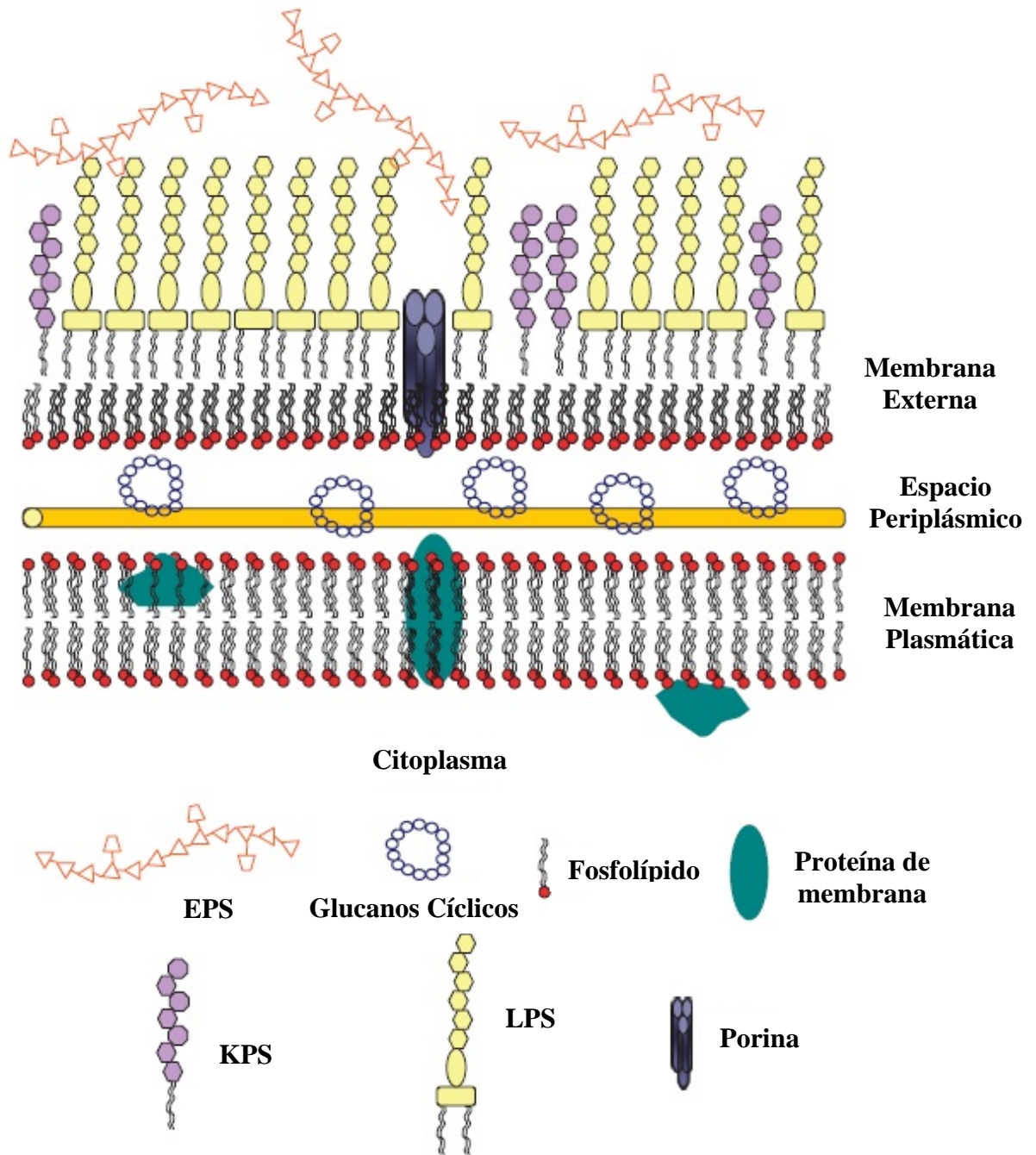


Figura 2- Composición de la superficie bacteriana en Gram negativas. Rodríguez-Navarro D. et al. 2007.

Infección y Nodulación

Luego del reconocimiento mutuo posterior al inicio del diálogo molecular, los rizobios se unen a los pelos radicales de la planta hospedadora, y estos se enroscan debido a la acción de los factores Nod. La bacteria penetra entonces en el pelo radical e induce la formación, por parte de la planta, de un tubo de composición similar a la pared celular, conocido como canal de infección, que avanza por el pelo radical. A continuación, la infección alcanza las células de la raíz adyacentes a los pelos radicales y los factores Nod estimulan la división

de las células vegetales, produciendo finalmente el nódulo. Las bacterias son liberadas desde el canal de infección al citoplasma de las células vegetales, pero quedan separados del mismo por una membrana derivada de la planta hospedadora, denominada membrana peribacterial (MPB). A continuación se desarrolla una división continua y sincronizada de los rizobios rodeados de MPBs. Al cesar la división las bacterias se transforman en unas formaciones ramificadas, hinchadas y deformes, llamadas bacteroides. Estos quedan rodeados individualmente o en pequeños grupos por la MPB, formando simbiosomas. El sistema vascular de la planta se extiende hacia dentro del nódulo y transporta nutrientes hacia y desde el nódulo. Cuando el nódulo se deteriora las bacterias vuelven al suelo. Las formas bacteroides no tienen capacidad de división, pero los nódulos contienen siempre algunos rizobios en estado de latencia. Estas formas proliferan en el suelo utilizando como nutrientes algunos de los productos del nódulo destruido y las bacterias pueden iniciar la infección en otras raíces o mantenerse en estado libre en el suelo (Wang *et al.* 2001).

Los nódulos producidos por los rizobios pueden ser indeterminados o determinados. Los indeterminados son generalmente formados por legumbres de zonas templadas, como *Medicago*, *Pisum*, *Vicia* y *Trifolium* spp.; este tipo de nódulo es elongado, y posee un meristema persistente que continuamente da origen a nuevas células del nódulo que son subsecuentemente infectadas por los bacteroides presentes en el nódulo. Los nódulos determinados son frecuentes en legumbres de zonas tropicales y subtropicales, como *Glycine max* y *Lotus japonicum*, son redondeados y su actividad meristemática es temporal (Parada *et al.* 2006).

Los EPS son requeridos para el desarrollo de nódulos indeterminados, pero son aparentemente prescindibles para la formación de nódulos determinados. En *S. fredii* HH103 los KPS, pero no los EPS, son indispensables para la nodulación con *G. max* y *C. cajan*. Los mutantes rizobianos incapaces de producir GC no pueden formar nódulos determinados ni indeterminados. Estos mutantes también se ven afectados en características de su superficie, cuando son cultivados en medios con baja osmolaridad (Parada *et al.* 2006; Crespo-Rivas *et al.* 2009).

Quorum sensing

Las bacterias están sujetas constantemente a cambios ambientales que requieren de una coordinación en su comportamiento colectivo para poder adaptarse y sobrevivir. Esto es particularmente importante en bacterias que interactúan con hospedadores eucarióticos,

durante el establecimiento de asociaciones patogénicas o simbióticas. Una forma de lograr esta coordinación es a través del sistema regulatorio conocido como *quorum sensing* (QS). Esta forma de regulación media la expresión génica a través de la interacción de moléculas señal y proteínas regulatorias en una forma dependiente de la densidad poblacional (Fig.3). Los procesos mediados por QS incluyen: patogénesis, simbiosis, conjugación de plásmidos y producción de antibióticos. Desde una perspectiva ecológica amplia, los comportamientos modulados por QS facilitan la adquisición de nutrientes, la ocupación de nichos, la respuesta colectiva ante competidores y el escape comunitario ante una probable destrucción de la población. Muchas leguminosas secretan compuestos que pueden interferir con las moléculas de QS, en un proceso conocido como *quorum quenching* (Patankar & González, 2009,a; Badri *et al.* 2009).

En respuesta a las densidades celulares, las señales de QS o autoinductores permiten a las poblaciones bacterianas coordinar la expresión de genes importantes para la colonización e infección de sus hospedadores. Estas señales también participan en la señalización entre Reinos, induciendo respuestas específicas por parte de los hospedadores. En el caso de la interacción rizobio-leguminosa, se cree que la planta podría distinguir entre señales de *quorum sensing* provenientes de distintas especies bacterianas, produciendo así respuestas específicas (Soto *et al.* 2009).

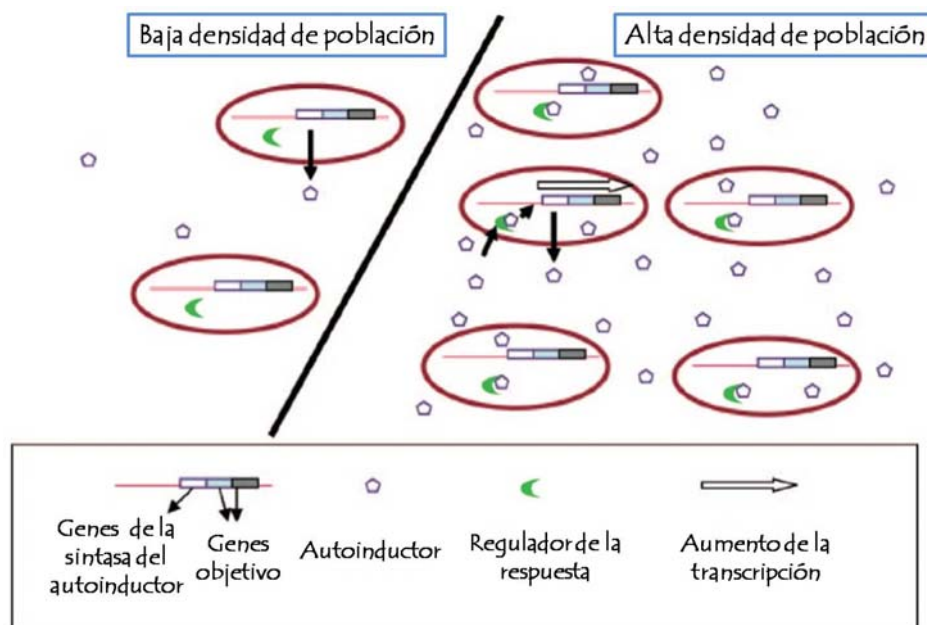


Figura 3- Representación esquemática de *quorum sensing*. González J. E. y N. D. Keshavan. 2006.

En sistemas de *quorum sensing* de bacterias Gram negativas, una sintasa de autoinductores bacterianos produce una molécula señal que se acumula a medida que aumenta la densidad poblacional. Esta molécula señal es una N-acil homoserina lactona (AHL), que posee un anillo homoserina lactona (HSL) conservado, con una cadena lateral acilo cuya longitud varía entre 3 y 12 átomos de carbono (Fig.4). Al llegar a una concentración umbral crítica, la señal interactúa con reguladores de respuesta específicos, y el complejo resultante se une a una secuencia de DNA localizada aguas arriba del promotor del gen objetivo, resultando en la regulación transcripcional (Patankar & González, 2009,b).

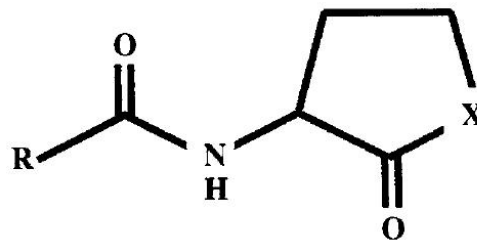


Figura 4- Estructura general de AHLs. X= O, S; R= cadena carbonada C3- C12.

La producción de autoinductores AHLs es controlada por proteínas de la familia LuxI de sintasas, que se unen y activan reguladores específicos pertenecientes a la familia LuxR. Estos reguladores controlan genes específicos. Típicamente, miembros de la familia LuxR poseen un dominio amino-terminal de unión a autoinductores y un dominio carboxi-terminal de unión a DNA. La naturaleza de la interacción DNA-proteína tipo LuxR determina si la respuesta resulta en una activación o represión de la transcripción. La activación transcripcional ocurre cuando el complejo AHL-proteína tipo LuxR se une aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción y recluta RNAPol por contacto directo. El complejo autoinductor-regulador se une específicamente a secuencias de DNA simétricas, llamadas *lux boxes*, en promotores regulados por quorum sensing centrados a aproximadamente -40 desde el sitio de inicio de la transcripción.

En ausencia de AHLs, algunas proteínas tipo LuxR actúan como represores, uniéndose a promotores de genes objetivo, bloqueando el acceso por parte de la RNAPol. Al llegar la AHL y unirse a la proteína represora, se provoca un cambio conformacional, y la proteína se libera del DNA (Patankar & González, 2009,a; Patankar & González, 2009,b).

En *Sinorhizobium meliloti*, hay ciertos genes involucrados en la efectividad de nodulación, incluyendo aquellos relacionados con la producción de exopolisacáridos, movilidad, quimiotaxis, y otras funciones metabólicas, cuya transcripción está inducida por la alta

cantidad de AHLs producidas a elevadas densidades celulares. En este caso, a mayor cantidad de autoinductores, mayor nodulación (Gurich & González, 2009).

Sinorhizobium (Ensifer) fredii

Los géneros de rizobios se definen en base a los genes 16S rRNA.

La especie *S. fredii* agrupa a rizobios de crecimiento rápido que nodulan soja (*Glycine max*) y otras leguminosas. Son bacilos que miden 0.5-1.0 x 1.2-3.0 µm. Crecen rápidamente (colonias mayores a 2 mm después de 3 a 5 días de incubación) y producen ácido en medio YEM. Plásmidos grandes y megaplásmidos son comunes en estas especies, y los genes simbióticos están localizados en esos plásmidos.

Posee un sistema de secreción de tipo III (T3SS) que, al igual que los genes de nodulación, se activa por flavonoides. A través del T3SS se secretan proteínas que parecen estar involucradas en la determinación de las relaciones de compatibilidad con los cultivares de soja. Los EPS de la bacteria no parecen jugar un papel importante en la simbiosis con soja. Sin embargo los KPS sí son necesarios para una nodulación efectiva en esta planta, ya que los mutantes afectados en su producción muestran una reducción severa de su capacidad de nodulación y de fijación de nitrógeno con la soja (Bedmar *et al.* 2006).

En la cepa HH103 se han descrito 16 factores Nod, que:

1. Poseen un esqueleto de 3 a 5 residuos de N-acetil-D-glucosamina
2. La N-acetil-D-glucosamina del extremo no reductor está N-acilada con un ácido graso de 16 a 18 átomos de carbono, que puede ser saturado o monoinsaturado
3. La N-acetil-D-glucosamina del extremo reductor tiene un residuo de fucosa o de metil-fucosa

Actualmente, para la formulación de inoculantes de soja, se utiliza *Bradyrhizobium japonicum*. La utilización de *S. fredii* sería ventajosa debido a su crecimiento rápido (36 hs), ya que *B. japonicum* es de crecimiento lento (72 hs), lo que permitiría a la industria la obtención de mayor producto en menor tiempo, disminuyendo así considerablemente los costos de producción.

Glycine max

La soja se ubica sistemáticamente dentro de la Familia Fabaceae, Orden Fabales, Subclase Rosidae, Clase Magnoliopsida.

Su altura varía entre los 20 cm y los 2 m. Las vainas, tallos y hojas están cubiertas por finos tricomas marrones o grises. Las hojas son trifoliadas, y caen antes de que las semillas

estén maduras. Las flores son grandes e inconspicuas, nacen en la axila de la hoja y son blancas, rosas o púrpuras.

La soja es cultivada por sus semillas, de contenido medio de aceite y alto de proteínas. El grano de soja y sus subproductos (aceite y harina de soja, principalmente) se utilizan en la alimentación humana y del ganado.

Se reconoce que la alta demanda de nitrógeno del cultivo, estimada en unos 80 kg/Tn de grano producido, es mayoritariamente cubierta a partir del proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico, resultado de la simbiosis con rizobios. El cultivo obtiene de esta forma entre el 30 y el 94% de sus requerimientos de nitrógeno.

El proceso de FBN ocurre en respuesta a relaciones fisiológicas reguladas por el cultivo, por lo que se requiere de su óptimo manejo agronómico, de manera tal que la provisión de fotoasimilados no limite la correcta actividad nodular durante el período de llenado de granos. En este contexto, la nutrición balanceada (en particular fosfatada) presenta un papel preponderante e insustituible dado que es un elemento que participa de todos los procesos energéticos en los seres vivos.

El uso de fuentes nitrogenadas, si bien induce a un mejor crecimiento de la soja, afecta negativamente el proceso de FBN y no es una práctica recomendable en condiciones de buen manejo de la inoculación. Cuando hay suficiente disponibilidad de nitrógeno en el suelo, la planta, por razones de economía energética, privilegia la incorporación de nitrógeno edáfico por sobre el derivado de la atmósfera.

Los beneficios por el uso frecuente de la inoculación en soja se traducen no sólo en los rendimientos de los cultivos sino también en su calidad, como por ejemplo, en la concentración de proteínas. La respuesta a la aplicación de inoculantes, en términos de rendimiento en grano o concentración de proteínas, es mucho mayor en lotes sin antecedentes del cultivo, dada la ausencia de cepas nativas capaces de formar simbiosis y fijar eficientemente nitrógeno (Ferraris *et al.* 2006).

De las veintitrés provincias de nuestro país, doce poseen superficie implantada con soja, y su mayor producción se da en las provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires (Fig.5). La producción de soja total del país se ha incrementado en forma casi exponencial a partir de la campaña 1997/98, siendo la producción de la última campaña de 52.677.371 toneladas (Fig.6). En nuestra provincia, su cultivo ha aumentado a partir de la campaña 2000/01, pasando de 38.200 hectáreas de superficie implantada en 1999/00 a 148.500 hectáreas de superficie implantada en 2000/01. Así mismo la producción aumentó de 78.800 toneladas en 1999/00 a 253.945 toneladas en 2000/01 (Fig.7). Tanto la superficie

implantada como la producción de soja en la última campaña, 2009/10, ha superado al cultivo de girasol, que hasta ahora era el cultivo más importante de la provincia, siendo la superficie implantada de soja de 405.400 hectáreas y la producción de 786.356 toneladas, frente a 334.400 hectáreas y 390.850 toneladas de girasol (www.minagri.gob.ar).

Argentina es el tercer país productor de soja a nivel mundial, ubicado detrás de Estados Unidos y Brasil, y es el primer exportador a nivel mundial de harina y aceite de soja, lo cual representa el 34 % de las exportaciones mundiales totales. La mayor parte de las exportaciones de soja y sus derivados tienen como destino China. Se calcula que los ingresos debido a la exportación ascienden a 8.600 millones de dólares, aproximadamente, para la campaña 2010/2011 (www.fyo.com; www.usda.com).

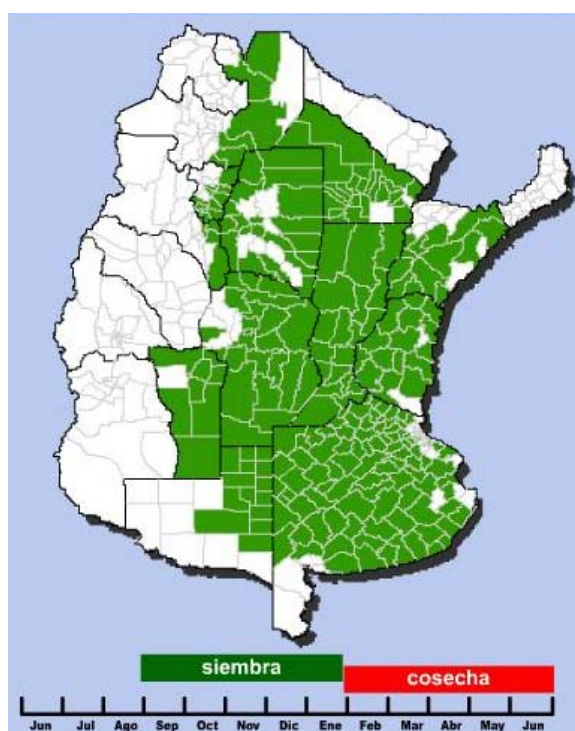


Figura 5- Dispersión geográfica del cultivo de soja en el país, en función del área sembrada promedio de las últimas cinco campañas. SAGPyA/CNA 2002.

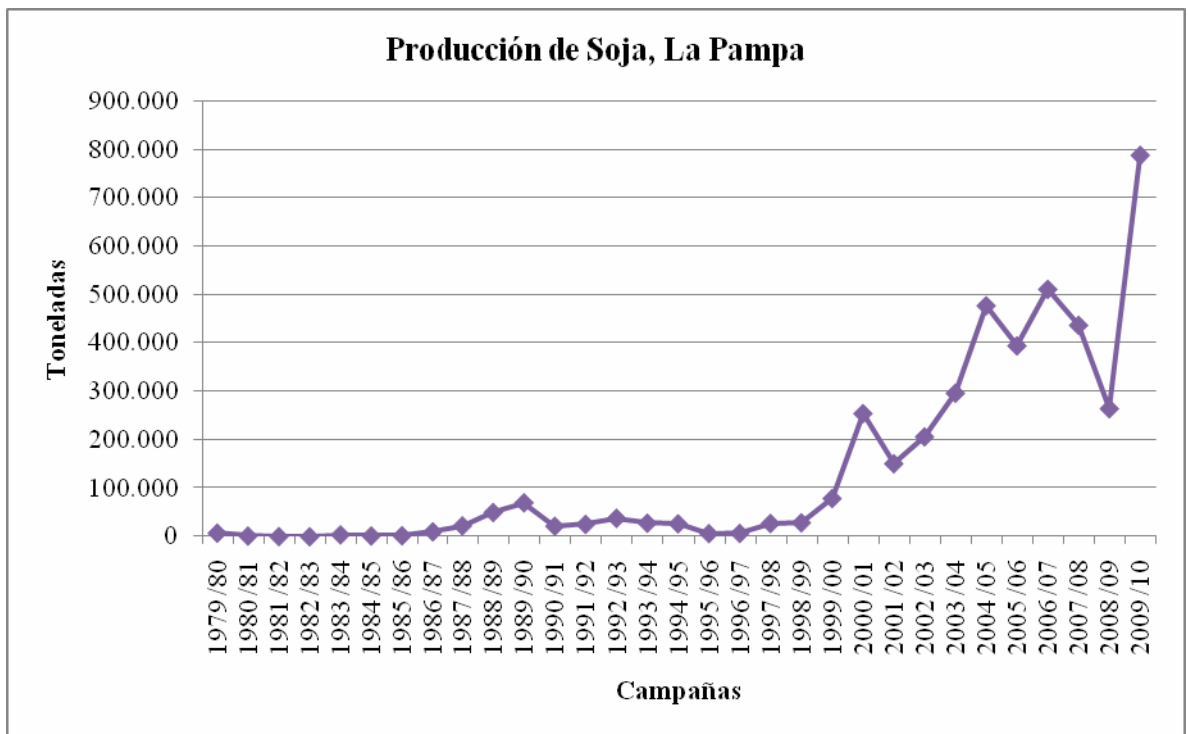


Figura 6- Producción de Soja, Total País. MAGyP.

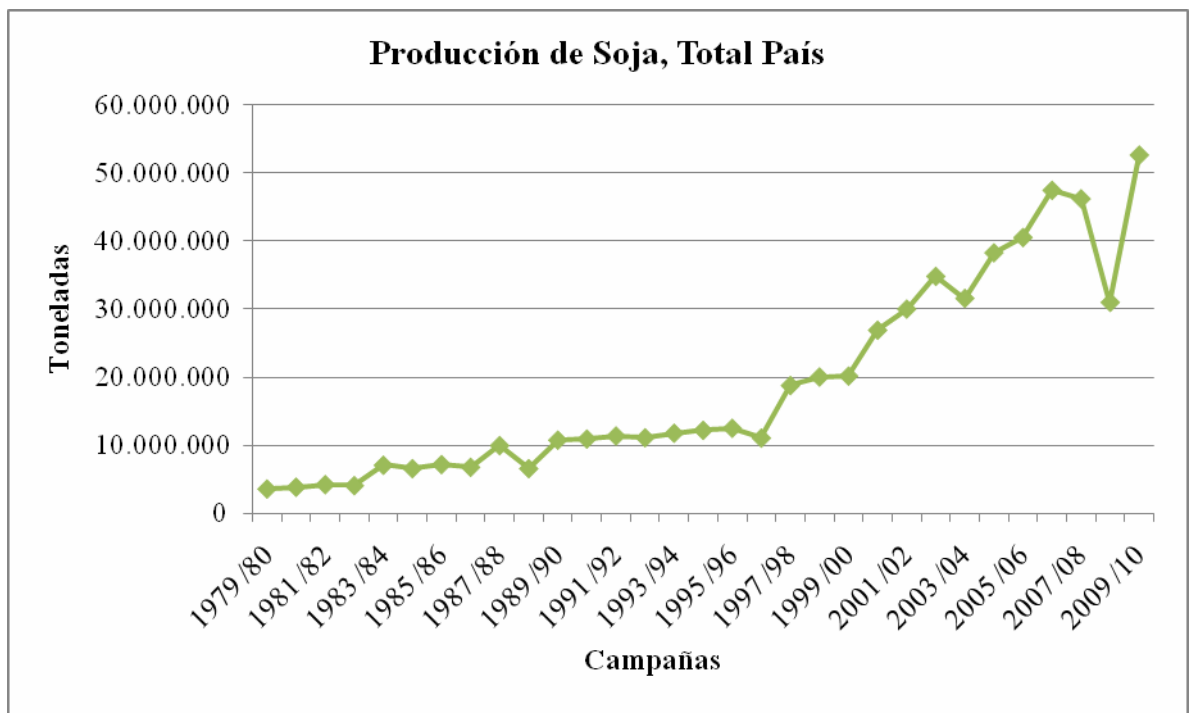


Figura 7- Producción de Soja, Provincia de La Pampa. MAGyP.

Nitrógeno

La nodulación se ve afectada por los niveles de nitrógeno del suelo: en condiciones de nitrógeno limitante, la interacción se ve favorecida, mientras que en condiciones de nitrógeno suficientes, la planta prioriza la obtención de nitrógeno edáfico por razones de economía energética.

En el suelo, generalmente, el nitrógeno es un nutriente limitante, y bajo estas condiciones los microorganismos deben ser capaces de generar respuestas fisiológicas adecuadas para lograr su supervivencia, adaptación al medio y establecimiento de la simbiosis con su hospedador específico (López García *et al.* 2001).

Hierro

La mayoría de los organismos conocidos requieren hierro para su crecimiento. Anaeróbicamente soluble, el hierro puede ser adquirido por microorganismos a través de transportadores de hierro, aunque debido a su insolubilidad bajo condiciones aeróbicas, su adquisición requiere de quelantes de alta afinidad o sideróforos, y sus transportadores.

El hierro es necesario para el correcto desarrollo de los nódulos, forma parte del sitio activo de la nitrogenasa bacteriana, enzima esencial para la fijación de nitrógeno; y de la nitrato y la nitrito reductasa del hospedador, que intervienen en la asimilación del nitrógeno por parte de la planta.

Hay estudios que muestran que moléculas de QS, del tipo no AHLs, como la PQS (quinolona señal de *Pseudomona*) en *Pseudomona aeruginosa*, y bradioxetina en *Bradyrhizobium japonicum*, adicionalmente a sus funciones como autoinductores, poseen diversas propiedades, incluida la capacidad de actuar como sideróforos (Schertzer *et al.* 2009; Oglesby *et al.* 2008; Loh *et al.* 2003).

HIPÓTESIS

La hipótesis de este trabajo es que la producción de moléculas rizobianas importantes para la simbiosis, tales como exopolisacáridos, lipopolisacáridos, polisacáridos capsulares y proteínas celulares totales, está influenciada por la densidad celular del cultivo, según el fenómeno de *quorum sensing*, y por los niveles de hierro y nitrógeno en el medio de cultivo.

OBJETIVOS

- Estudiar en el microorganismo *Sinorhizobium fredii*, simbiote de soja, la influencia de los niveles de hierro y nitrógeno de los medios de cultivo sobre:
 - La producción de componentes bacterianos de importancia para el establecimiento de la simbiosis.
 - La transcripción de genes *nod*.
- Evaluar la incidencia de estos componentes y de la densidad celular sobre el establecimiento de la simbiosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

En este trabajo fue utilizada la cepa *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* (*S. fredii*) HH103, gentilmente cedida por la Dra. Marta Dardanelli, de la UNRC.

Para los experimentos de transformación y conjugación se utilizó *Escherichia coli* (*E. coli*) TCD900, portadora del plásmido *nodY::lacZ*, Tc^r.

La detección de autoinductores se llevó a cabo mediante bioensayos donde se utilizan *Chromobacterium violaceum* (*C. violaceum*) CV026 (McClellan *et al.* 1997) y *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) NT1-pZLR4 (Cha *et al.* 1998) como bioindicadores, cedidas gentilmente por la Dra. Marcela Montechia, del Banco Nacional de Microorganismos, y la Dra. Marta Dardanelli, de la UNRC, respectivamente. Estas cepas presentan las siguientes características:

- *Chromobacterium violaceum* CV026, *cvil::mini-Tn5*
- *Agrobacterium tumefaciens* NT1-pZLR4, curada del plásmido pTiC58; *traG::lacZ*, *traR*; Gm^r.

Medios de cultivo

Para el cultivo de *S. fredii* fueron utilizados los medios descritos en las tablas 1 y 2

Medio MSM	
Solución de Sales	50 ml
Fe-EDTA 15 g/L	0,5 ml
Vitaminas y Minerales	0,5 ml
NH₄Cl 5M	2 ml
Buffer HEPES	4,776 g/L
Manitol	1,8 g
Agua deionizada	c.s.p. 1 L

Tabla 1- Composición del medio MSM. Brown y Dilworth, 1975.

- Solución de Sales

MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 g/L
NaCl	4 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,4 g/L
K ₂ HPO ₄	1 g/L

▪ Vitaminas y Minerales

NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,23 g/L
H ₃ BO ₃	0,25 g/L
MnSO ₄ ·2H ₂ O	0,14 g/L
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,001 g/L
Timina-HCl	1 g/L
Pantotenato de Calcio	2 g/L
Biotina	0,001 g/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,02 g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,16 g/L

El medio incompleto fue esterilizado en autoclave 20 minutos a 120°C, y posteriormente fueron agregadas las vitaminas y la fuente de nitrógeno, esterilizadas previamente por filtración. pH 7,0 ± 0,2.

Medio 20E	
KH₂PO₄	86 mg
K₂HPO₄	87 mg
MgSO₄·7H₂O	370 mg
CaCl₂·2H₂O	73,5 mg
KNO₃	506 mg
FeSO₄·H₂O	6,95 mg
EDTA	9,3 mg
NaMoO₄·2H₂O	4,84 mg
Glicerol	4,6 ml
Manitol	1,82 g
Extracto de Levadura	2 g
Agua deionizada	c.s.p. 1 L

Tabla 2- Composición del medio 20E. Werner, 1975.

pH 7,0 ± 0,2. Se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Para preparar medio sólido se adicionó agar bacteriológico a una concentración de 15 g/L.

Para el cultivo de *E. coli* y de *C. violaceum* se utilizó el medio descrito en la tabla 3:

Medio LB	
NaCl	5 g
Triptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
Glucosa	1 g
Agua deionizada	c.s.p. 1 L

Tabla 3- Composición del medio Luria-Bertani (LB). Miller, 1972.

Para preparar medio sólido se adicionó agar bacteriológico en una concentración de 15 g/L y para obtener medio semisólido se adicionó agar en una concentración de 8 g/L. Se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos. pH $6,8 \pm 0,2$

Para el cultivo de *A. tumefaciens* se utilizó el medio descrito en la tabla 4:

Medio YEM	
K₂HPO₄	0,5 g
MgSO₄·7H₂O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extracto de Levadura	1 g
Manitol	5 g
Agua deionizada	c.s.p. 1 L

Tabla 4- Composición del medio YEM. Vincent, 1970.

pH $7,0 \pm 0,2$. Para preparar medio sólido se adicionó agar bacteriológico en una concentración de 20 g/L, y para obtener medio semisólido se adicionó agar en una concentración de 7 g/L. Se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Antibióticos

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se realizó a partir de soluciones concentradas de los mismos en agua deionizada y posterior esterilización con unidades de filtración Minisart® NML (Sartorius) de 0,2 µm de tamaño de poro. En el caso de las soluciones de tetraciclina se empleó una mezcla hidroalcohólica para disolver el antibiótico.

Se utilizó cloruro de espectinomicina·2H₂O (spc) en cultivos de *S. fredii* y cloruro de tetraciclina·H₂O (Tc) en cultivos de *S. fredii* y *E. coli*; en los ensayos de transconjugación. Las concentraciones de trabajo para *S. fredii* fueron de 100 µg/ml y para *E. coli* de 10 µg/ml.

En ensayos de detección de autoinductores se utilizó 10 µg/ml de Gentamicina (Gm) para los cultivos de *A. tumefaciens*.

Conservación de cepas bacterianas

Para la conservación prolongada de las distintas cepas se utilizaron criotubos conteniendo alícuotas de cultivos en fase exponencial adicionados de glicerol estéril a una concentración final del 30%. Los criotubos se almacenaron en freezer a -20°C.

La conservación a corto plazo se realizó en tubos con agar inclinado a 4°C.

Determinación del crecimiento microbiano

Se midió en base a determinaciones de Densidad Óptica a una longitud de onda de 550 nm, utilizando un espectrofotómetro Metrolab 1700 UV-Visible de simple haz. Las mediciones se realizaron utilizando celdas de vidrio, usando como blanco agua destilada. La densidad óptica se expresó como Unidades de Densidad Óptica (U.D.O.).

Extracción y detección de moléculas autoinductoras

Se realizaron diferentes cultivos de *S. fredii*, en el medio descrito en la tabla 1, hasta alcanzar fases exponencial y estacionaria del crecimiento (10⁶ y 10⁹ UFC/ml respectivamente). Se separaron los sobrenadantes por centrifugación durante 10 minutos a 8000 rpm.

La detección de autoinductores presentes en los sobrenadantes, se llevó a cabo mediante bioensayos utilizando *C. violaceum* CV026 (McClellan *et al.* 1997) y *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 (Cha *et al.* 1998) como biosensores. Los resultados que se obtienen de estos ensayos son semicuantitativos, dado que el diámetro y la intensidad que presentan los halos se corresponden con la cantidad de AHLs detectadas.

Bioensayo con *Chromobacterium violaceum* CV026

La sintetasa CviI de *C. violaceum* interviene en la producción de 3-hexanoil homoserina lactona (C₆-HSL), una molécula de quórum que está involucrada en la producción de

violaceína, un pigmento púrpura. La cepa *C. violaceum* CV026 está mutada en el gen *cviI* por inserción del transposón mini-Tn5, por lo tanto es incapaz de producir C₆-HSL y violaceína. La adición de AHLs y HHLs de cadena corta (C₄-C₈) en forma exógena, restaura la producción de este pigmento.

Se realizó el cultivo de *C. violaceum* en 5ml de medio LB líquido, en agitador rotatorio durante 36 horas a 28° C de temperatura. Se colocaron 1,6 ml de cultivo en 40 ml de medio LB semisólido (0,8 % agar). Luego se volcaron 5 ml de este medio en placas de Petri previamente preparadas, conteniendo 15 ml de medio LB sólido. Posteriormente se realizaron pocillos en el medio solidificado, donde se sembraron 70 µL de las muestras de AHLs obtenidas de los cultivos de *S. fredii* correspondientes a los distintos tratamientos. Las placas se incubaron en estufa a 28° durante 12-14 horas.

Bioensayo con *Agrobacterium tumefaciens* NT1-pZLR4

A. tumefaciens NT1-pZLR4 es una cepa que carece del plásmido Ti y contiene el plásmido pZLR4 en el que se ha clonado el gen *traR* y una fusión *traG::lacZ*. Esta cepa es incapaz de producir su propio autoinductor, y la fusión *lacZ* sólo se expresa en presencia de moléculas autoinductoras exógenas de cadena larga (C₁₀-C₁₈).

Se cultivó *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 en 5 ml de YEM líquido durante 18 horas en agitador rotatorio durante 48 horas a 28° C de temperatura. Se colocaron 4 ml de cultivo en 40 ml de medio YEM semisólido (0,7 %), y a esto se le adicionaron 400 µl de Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido; 20 mg/ml en N,N-dimetilformamida) y 16 µl de gentamicina 80. Se prepararon placas de Petri con 15 ml de YEM sólido (2%), y sobre ellas se volcaron 5 ml del medio YEM semisólido conteniendo las bacterias, la Xgal y el antibiótico. Al solidificar, se realizaron pocillos, en los cuales se sembraron 70 µL de los sobrenadantes conteniendo las AHLs obtenidas de los cultivos de *S. fredii* sometidos a los diferentes tratamientos. Las placas se incubaron en estufa a 28°C durante 12-14 horas.

Determinación y análisis de lipopolisacáridos (LPS), proteínas celulares totales, exopolisacáridos (EPS) y polisacáridos capsulares (KPS)

Procesamiento de los cultivos bacterianos

La extracción y determinación de EPS se realizó de acuerdo al protocolo de Skorupska *et al.* (1985). Se centrifugaron 10 ml de cada cultivo celular a 10000 rpm por 10 min a 4°C.

Los sobrenadantes se precipitaron toda la noche con tres volúmenes de etanol frío en freezer a -20°C para obtener EPS. Los pellets se resuspendieron en 10 ml de NaCl 0.5M y se agitaron en vórtex durante 60 segundos, luego se centrifugaron 15 minutos a 14000 rpm a 4°C. Estos nuevos sobrenadantes fueron precipitados con tres volúmenes de etanol frío durante toda la noche a -20°C, para obtener KPS.

Los pellets se resuspendieron en 2 ml de NaCl, y fueron utilizados para cuantificar proteínas y LPS.

Las muestras conteniendo EPS y KPS fueron centrifugadas a 12000 rpm por 30 minutos a 4°C. Se descartaron los sobrenadantes, y los pellets se resuspendieron en 2 ml de buffer fosfato salino (PBS).

Todas las centrifugaciones fueron realizadas en centrífuga refrigerada Hitachi Himac CR22G.

Análisis de LPS

Se tomó una alícuota del precipitado de los cultivos bacterianos y se procedió al tratamiento alcalino en ebullición según la técnica descrita por Hitchcock y Brown (1983). Se tomó 1 ml de cada muestra, se centrifugó en microcentrífuga a velocidad máxima por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 50 µl de buffer de lisis y se calentó por 10 minutos en baño a 100°C. Posteriormente se agregaron 10 µl de Proteinasa K, se incubó una hora en baño a 60° C, y se realizó una nueva centrifugación por 15 minutos a velocidad máxima. Se tomaron 50 µl del sobrenadante y se agregaron 100 µl de buffer muestra. Todas las muestras procesadas fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de la siembra en el gel.

- Buffer Lisis

1M Tris HCl (Tris; pH: 6,8)

2% SDS (Dodecil Sulfato de Sodio)

4% β-mercaptoetanol

10% Glicerol

0,005% BPB (Azul de Bromofenol)

- Proteinasa K

2,5 mg/ml buffer lisis

- Buffer Muestra
- 120 mM Tris HCl (pH: 6,8)
- 3% SDS
- 9% β -mercaptoetanol
- 30% Glicerol
- 0,03% BPB (Azul de Bromofenol)

Electroforesis en gel de poliacrilamida para LPS

Para obtener los perfiles de LPS se realizaron geles de poliacrilamida al 20% (SDS-PAGE) siguiendo la metodología descrita por Laemli, 1970. Se prepararon los geles como se indica en las tablas 5 y 6, y en cada calle se sembraron 15 μ l de cada muestra de LPS. Las condiciones de corrida fueron de 30 mA constantes, hasta que el frente de corrida se observó al final del gel.

Gel Separador (T: 16,5%; C: 6%)	
Agua MiliQ	2,3 ml
Buffer del gel	3,32 ml
Glicerol	1,04 ml
Stock acril/bis	3,32 ml
APS 10%	40 μ l
TEMED 10%	40 μ l
Volumen total	10 ml

Tabla 5- Composición del gel separador para electroforesis en gel de poliacrilamida. T: porcentaje en peso del monómero total empleado (acrilamida + entrecruzador en gramos por 100 ml) y determina la longitud promedio de la cadena del polímero. La concentración de bis-acrilamida (C) representa el porcentaje de este monómero en el gel y determina el grado de entrecruzamiento.

Gel Concentrador (T: 4%; C: 3%)	
Agua MiliQ	4,2 ml
Buffer del gel	1,5 ml
Stock acril/bis	0,5 ml
APS 10%	150 μ l
TEMED 10%	7,5 μ l
Volumen total	6,36 ml

Tabla 6- Composición del gel concentrador para electroforesis en gel de poliacrilamida.

- Buffer del gel

3M Tris	36,342 g
0,3% SDS	0,3 g
Volumen final	100 ml
pH	8,5

- Stock acril/bis

Acrilamida	93 g
Bis-Acrilamida	6 g
Volumen final	200 ml

- APS (Persulfato de Amonio)

APS	150 mg
Agua MiliQ	1,5 ml

- Buffer Ánodo

0,2M Tris base	12,11 g
Volumen final	500 ml
pH	8,95

- Buffer Cátodo

0,1M Tris	6,06 g
0,1M Tricina	8,96 g
0,1% SDS	0,5 g
Volumen final	500 ml
pH	8,25

Los geles se dejaron toda la noche en solución fijadora. Se lavaron 5 minutos con agua MiliQ, y se adicionó solución oxidante por 5 minutos, 30 segundos. Luego de un lavado por 15 minutos y dos lavados de 5 minutos con agua MiliQ, se colocó la solución de teñido durante 15 minutos, en oscuridad. Posteriormente se realizaron dos lavados de 5 minutos con agua MiliQ y se agregó la solución reveladora hasta la aparición de bandas (30 seg-2 minutos). En el caso que fue necesario, se detuvo la reacción con agregado de ácido acético al 0,5% durante 30 segundos y se lavó con agua durante 1-2 minutos.

- Solución Fijadora

40% Etanol 400 ml

5% Ácido acético glacial 50 ml

- Solución Oxidante

Ácido periódico 0,7% en agua MiliQ

- Solución de Teñido

Agua MiliQ 70 ml

NaOH 1N 1,4 ml

NH₄OH 25% 1 ml

AgNO₃ 20% 2,5 ml

- Solución Reveladora

Agua MiliQ 100 ml

Formaldehído 30% 50 µl

Ácido cítrico 100 mg/ml 50 µl

Determinación de proteínas celulares totales

Se centrifugó 1 ml de las muestras de proteínas celulares totales a 12000 rpm, y los pellets se resuspendieron en 1 ml de NaCl (0.85%). Las muestras se centrifugaron 10 minutos, y los pellets se resuspendieron en buffer de extracción. Se realizó una nueva centrifugación por 10 minutos, y los pellets fueron resuspendidos en buffer de sonicación. Se realizó la sonicación (3 pulsos de 10 segundos en cada muestra) utilizando el sonicador KONTES Microsonic Cell Disrupter, y luego se centrifugaron las muestras por 10 minutos.

- Buffer de Extracción

0,1M Tris 1,21 g

MgCl₂·6H₂O 0,101 g

Glicerol 15 g

β-mercaptoetanol 100 µl

Volumen final 100 ml

pH 7,2

- Buffer de Sonicación

0,1M Tris	1,21 g
Glicerol	15 g
Volumen final	100 ml
pH	8,8

La concentración de proteínas de los sobrenadantes se cuantificó por el método de Bradford (1976), utilizando como patrón seroalbúmina bovina (BSA, 100 µg/ml). A partir de esta solución se prepararon una serie de patrones con distintas concentraciones, como se indica en la tabla 7:

	Blanco	P1	P2	P4	P6	P8	P10	Muestra
H₂O (µl)	100	90	80	60	40	20	0	
BSA (µl)	0	10	20	40	60	80	100	
Problema (µl)								100
Reactivo de Bradford (µl)	1000							

Tabla 7- Composición de los patrones utilizados para realizar el método de Bradford, 1976.

- Reactivo de Bradford

Se disolvieron 100 mg de Coomassie Blue G-250 en 50 ml de etanol al 95%, se adicionaron 100 ml de ácido fosfórico (85% p/v) y se llevó a volumen final de 1 litro con agua MiliQ. La solución fue filtrada hasta la desaparición del color azul.

Una vez agregado el reactivo de Bradford, tanto las muestras como los patrones fueron agitados en vórtex, y posteriormente se determinó la absorbancia a 595 nm.

Electroforesis en gel para proteínas celulares totales

Para obtener los perfiles de proteínas celulares totales mediante SDS-PAGE se siguió el protocolo descrito por Laemli (1970). A las muestras de proteínas se le agregó el 10% de su volumen de buffer muestra (90 µl buffer muestra en 900 µl de cada muestra de proteínas). Se prepararon los geles como se indica en las tablas 8 y 9, y en cada calle se sembraron 50 µl de cada muestra de proteínas. Las condiciones de corrida fueron de 200 V constantes, hasta que el frente de corrida se observó al final del gel.

- Buffer Muestra

Agua MiliQ	3 ml
0,5M Tris-HCl pH 6,8	1 ml
Glicerol 50%	1,6 ml
SDS 10%	1,6 ml
β -mercaptoetanol	0,4 ml
Azul de Bromofenol 5%	0,4 ml

Gel Separador	
Stock acril/bis	10 ml
Agua MiliQ	8,375 ml
1,5M Tris-HCl (pH: 8,8)	6,25 ml
SDS 10%	0,25 ml
APS 10%	125 μ l
TEMED 10%	12,5 μ l
Volumen total	25 ml

Tabla 8- Composición del gel separador para SDS-PAGE de proteínas

Gel Concentrador	
Stock acril/bis	1,3 ml
Agua MiliQ	8,375 ml
0,5M Tris-HCl (pH: 6,8)	2,5 ml
SDS 10%	100 μ l
APS 10%	50 μ l
TEMED 10%	10 μ l
Volumen total	10 ml

Tabla 9- Composición del gel concentrador para SDS-PAGE de proteínas

- Stock acril/bis

Acrilamida	29,2 g
Bis-Acrilamida	0,8 g
Volumen final	100 ml

- 1,5M Tris-HCl

Tris	18,15 g
Agua MiliQ	50 ml
pH	8,8

- 0,5M Tris-HCl

Tris	12,2 g
Agua MiliQ	50 ml
pH	6,8

- APS (Persulfato de Amonio)

APS	150 mg
Agua MiliQ	1,5 ml

- Buffer de Corrida (5x)

Tris	15 g
Glicina	72 g
SDS	5 g
Volumen final	1 l
pH	8,3

El gel se dejó toda la noche en solución fijadora. Luego se lavó 3 veces durante 15 minutos con agua MiliQ y se colocó en solución colorante durante 24 hs. Por último se colocó en solución decolorante hasta que el fondo del gel apareció limpio.

- Solución Fijadora

Metanol	67 ml
Ácido acético glacial	14 ml
Agua MiliQ	67 ml

- Solución Colorante

Coomasie Blue R-250	0,15 g
Agua MiliQ	150 ml

- Solución Decolorante

Ácido acético	7 ml
Metanol	25 ml
Agua MiliQ	68 ml

Determinación del contenido de hexosas

La cuantificación de EPS y KPS se llevó a cabo empleando el método de antrona (0.2% en H₂SO₄), midiendo posteriormente la absorbancia a 620 nm (Dische, 1962). Las concentraciones de azúcares reductores resultantes se contrastaron con una curva de calibración construida a partir de una solución patrón de galactosa (2 mg/ml) y diluciones sucesivas.

Transformación de células de rizobios mediante conjugación biparental

La transferencia de DNA plasmídico a *S. fredii* HH103 se realizó mediante conjugación biparental y se utilizó como cepa donadora *E. coli* TCD 900 (*nodY::lacZ, Tc'*).

Se cultivó *S. fredii* en medio 20E suplementado con espectomicina (*spc*) y *E. coli* en medio LB. Se tomó 1 ml de cada cultivo y se realizó una centrifugación breve para obtener un precipitado de células. Los pellets obtenidos fueron resuspendidos en 1 ml del medio correspondiente (20E para *S. fredii* y LB para *E. coli*), y fueron nuevamente centrifugados por un minuto. Este paso se repitió una vez más. Los pellets se resuspendieron en 100 µl del medio correspondiente, y las suspensiones fueron mezcladas. Se realizó una última centrifugación de un minuto, y los pellets conteniendo *S. fredii* y *E. coli* fueron resuspendidos en 20 µl de medio 20E. Estas suspensiones fueron sembradas en placas de Petri conteniendo medio 20E sólido, sobre filtros de nitrocelulosa previamente esterilizados. Tras incubación durante 48-72 horas a 30°C, las mezclas de conjugación se resuspendieron en 0,6 ml de medio 20E con 0,4 ml de glicerol. Se sembraron en placas con medio 20E suplementado con *spc* para la selección de los transconjugantes.

Análisis estadístico

Para comparar la diferencia entre las medias obtenidas en los ensayos de extracción de EPS y KPS, se recurrió a la utilización de ANOVA de un factor. Se realizaron comparaciones utilizando el test t de Student, con un nivel de confianza de 0,05.

Se utilizó el paquete estadístico InfoStat versión 2008.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia del contenido de Hierro y Nitrógeno en el medio de cultivo sobre la producción de acil-homoserina lactonas (AHLs)

Con el fin de determinar la influencia de diferentes concentraciones de hierro y nitrógeno en el medio de cultivo sobre la producción de AHLs en *Sinorhizobium fredii*, se realizaron los siguientes tratamientos:

Se preparó medio MSM, tal como se indica en Materiales y Métodos, al cual se le agregó hierro y nitrógeno en distintas cantidades, para alcanzar las concentraciones detalladas en las tablas 10 y 11. Los tratamientos con una concentración de 20 μM de hierro, y 10 mM de nitrógeno, son considerados como tratamientos control, dado que se corresponden con la formulación del medio de cultivo MSM utilizado.

Concentración de Hierro (μM)	EDTA FeNa agregado (ml/L)
10	0,25
20	0,5
50	1,25
100	2,5

Tabla 50- EDTA FeNa agregado al medio para obtener las concentraciones deseadas

Concentración de Nitrógeno (mM)	NH ₄ Cl agregado ($\mu\text{l/L}$)
1	200
5	1000
10	2000
15	3000

Tabla 11- NH₄Cl agregado al medio para obtener las concentraciones deseadas

Se utilizó medio mínimo dado que reportes anteriores indican que en medios ricos se obtiene baja producción de AHLs, debido a la secreción de inhibidores de la autoinducción (Brelles-Mariño & Bedmar, 2001).

En estos medios se sembró *S. fredii* y se cultivó hasta alcanzar las fases exponencial y estacionaria de crecimiento. En cada una de estas fases se extrajeron los sobrenadantes,

conteniendo las moléculas autoinducoras (AHLs), según la metodología descrita en Materiales y Métodos.

Los extractos de AHLs así obtenidos se sembraron en placas previamente inoculadas con las cepas reporteras *Agrobacterium tumefaciens* NT1-pZLR4 y *Chromobacterium violaceum* CV026, según lo descrito en Materiales y Métodos. Estas cepas producen halos pigmentados, cuyo diámetro e intensidad se corresponden directamente con la cantidad de AHLs exógenas detectadas. En cada placa se realizó un pocillo denominado “control” (C), en el que se sembró medio de cultivo MSM líquido estéril.

Detección de moléculas autoinducoras (AHLs) obtenidas de medios con concentraciones variables de Hierro

En fase exponencial de crecimiento, no se detectó presencia de AHLs de cadena corta con el microorganismo biosensor *C. violaceum*, en los distintos tratamientos donde se variaron las concentraciones de hierro en el medio de cultivo.

En las figuras 8 a 11 se muestran los resultados obtenidos de los ensayos realizados con *A. tumefaciens*.



Figura 8- Detección de AHLs mediante el biosensor *A. tumefaciens* NT1-pZLR4, en cultivos de *S. fredii* en fase exponencial de crecimiento, en presencia de 10 μ M de hierro. C= control.



Figura 9- Detección de AHLs mediante el biosensor *A. tumefaciens* NT1-pZLR4, en cultivos de *S. fredii* en fase exponencial de crecimiento, en presencia de 20 μ M de hierro. C= control.



Figura 10- Detección de AHLs mediante el biosensor *A. tumefaciens* NT1-pZLR4, en cultivos de *S. fredii* en fase exponencial de crecimiento, en presencia de 50 μM de hierro. C= control.



Figura 11- Detección de AHLs mediante el biosensor *A. tumefaciens* NT1-pZLR4, en cultivos de *S. fredii* en fase exponencial de crecimiento, en presencia de 100 μM de hierro. C= control.

A partir del análisis de la intensidad y diámetro de los halos obtenidos, se infiere que en fase exponencial, la concentración de AHLs de cadena larga disminuyó a medida que aumentó el hierro en el medio.

En cuanto a la fase estacionaria de crecimiento, las AHLs de cadena corta sólo fueron detectables en concentraciones de hierro 50 y 100 μM (Fig. 12 y 13).



Figura 12- Detección de AHLs mediante el biosensor *C. violaceum* CV026, en cultivos de *S. fredii* en fase estacionaria de crecimiento, en presencia de 50 μM de hierro. C= control.



Figura 13- Detección de AHLs mediante el biosensor *C. violaceum* CV026, en cultivos de *S. fredii* en fase estacionaria de crecimiento, en presencia de 100 μM de hierro. C= control.

Estos ensayos muestran que la producción de AHLs de cadena corta aumentó al aumentar los niveles de hierro en el medio, sólo en fase estacionaria de crecimiento.

En las figuras 14 a 17 se muestran los resultados obtenidos con los mismos tratamientos, para AHLs de cadena larga, en cultivos en fase estacionaria de crecimiento.



Figura 14- Detección de AHLs mediante el biosensor *A. tumefaciens* NT1-pZLR4, en cultivos de *S. fredii* en fase estacionaria de crecimiento, en presencia de 10 μM de hierro. C= control.

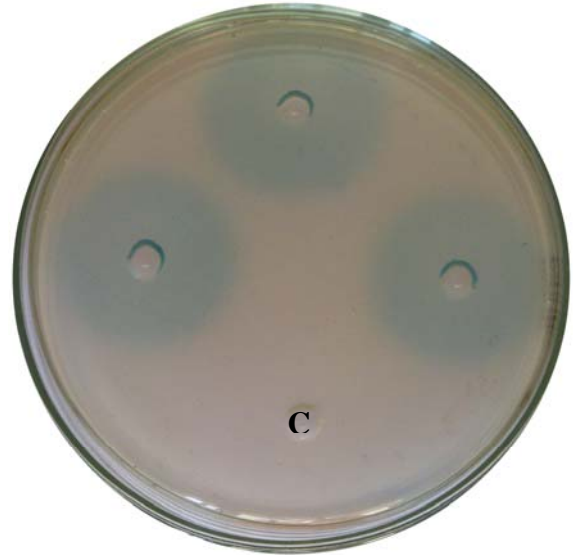


Figura 15- Detección de AHLs mediante el biosensor *A. tumefaciens* NT1-pZLR4, en cultivos de *S. fredii* en fase estacionaria de crecimiento, en presencia de 20 μM de hierro. C= control.

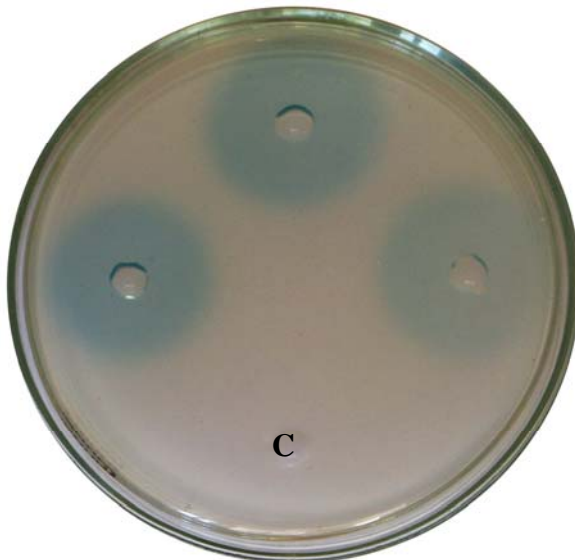


Figura 16- Detección de AHLs mediante el biosensor *A. tumefaciens* NT1-pZLR4, en cultivos de *S. fredii* en fase estacionaria de crecimiento, en presencia de 50 μM de hierro. C= control.



Figura 17- Detección de AHLs mediante el biosensor *A. tumefaciens* NT1-pZLR4, en cultivos de *S. fredii* en fase estacionaria de crecimiento, en presencia de 100 μM de hierro. C= control.

En esta fase de crecimiento, donde se alcanzaron altas densidades celulares, se observa el mismo comportamiento que en fase exponencial: a medida que se aumentaron los niveles de hierro, disminuyó la producción de AHLs de cadena larga.

Detección de moléculas autoinductoras (AHLs) obtenidas de medios con concentraciones variables de Nitrógeno

En general, a concentraciones de nitrógeno 1 mM hay baja producción de AHLs; resultado que puede atribuirse a la menor densidad celular alcanzada por los cultivos, debido probablemente a la baja concentración de nitrógeno en el medio.

Las AHLs de cadena corta en fase exponencial de crecimiento sólo se detectaron en cultivos que tenían 5 mM de nitrógeno (Fig. 18).



Figura 18- Detección de AHLs mediante el biosensor *C. violaceum* CV026, en cultivos de *S. fredii* en fase exponencial de crecimiento, en presencia de 5 mM de nitrógeno. C= control.

Las figuras 19 a 22 muestran los resultados de los ensayos correspondientes a placas sembradas con *A. tumefaciens*.



Figura 19- Detección de AHLs mediante el biosensor *A. tumefaciens* NT1-pZLR4, en cultivos de *S. fredii* en fase exponencial de crecimiento, en presencia de 1 mM de nitrógeno. C= control.



Figura 20- Detección de AHLs mediante el biosensor *A. tumefaciens* NT1-pZLR4, en cultivos de *S. fredii* en fase exponencial de crecimiento, en presencia de 5 mM de nitrógeno. C= control.

La mayor producción de AHLs, tanto de cadena corta como de cadena larga, se obtuvo cuando el nitrógeno se agregó en una concentración 5 mM, mientras que su producción disminuyó al aumentar las concentraciones de este nutriente.

Las figuras 23 a 25 muestran los resultados obtenidos en placas conteniendo *C. violaceum*, sembradas con los sobrenadantes provenientes de los distintos tratamientos con concentraciones variables de nitrógeno, en cultivos de fase estacionaria.

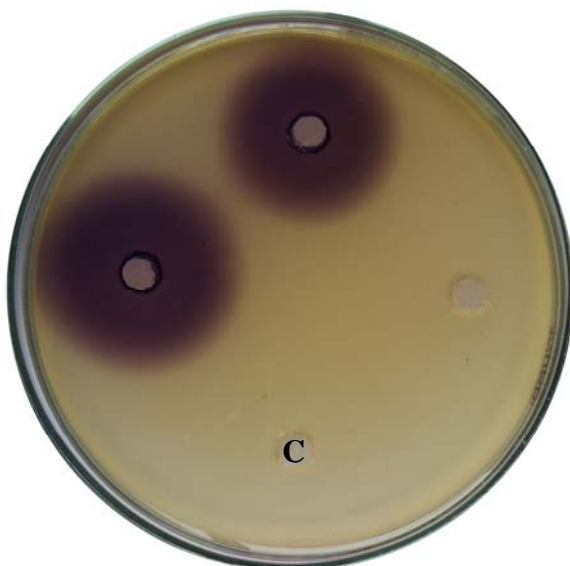


Figura 23- Detección de AHLs mediante el biosensor *C. violaceum* CV026, en cultivos de *S. fredii* en fase estacionaria de crecimiento, en presencia de 5 mM de nitrógeno. C= control.



Figura 24- Detección de AHLs mediante el biosensor *C. violaceum* CV026, en cultivos de *S. fredii* en fase estacionaria de crecimiento, en presencia de 10 mM de nitrógeno. C= control.



Figura 25- Detección de AHLs mediante el biosensor *C. violaceum* CV026, en cultivos de *S. fredii* en fase estacionaria de crecimiento, en presencia de 15 mM de nitrógeno. C= control.

En las figuras 26 a 29 se observan los resultados obtenidos de los cultivos en fase estacionaria de crecimiento, de los distintos tratamientos con concentraciones variables de nitrógeno, en placas sembradas con *A. tumefaciens*.



Figura 26- Detección de AHLs mediante el biosensor *A. tumefaciens* NT1-pZLR4, en cultivos de *S. fredii* en fase estacionaria de crecimiento, en presencia de 1 mM de nitrógeno. C= control.



Figura 27- Detección de AHLs mediante el biosensor *A. tumefaciens* NT1-pZLR4, en cultivos de *S. fredii* en fase estacionaria de crecimiento, en presencia de 5 mM de nitrógeno. C= control.



Figura 28- Detección de AHLs mediante el biosensor *A. tumefaciens* NT1-pZLR4, en cultivos de *S. fredii* en fase estacionaria de crecimiento, en presencia de 10 mM de nitrógeno. C= control.



Figura 29- Detección de AHLs mediante el biosensor *A. tumefaciens* NT1-pZLR4, en cultivos de *S. fredii* en fase estacionaria de crecimiento, en presencia de 15 mM de nitrógeno. C= control.

En fase estacionaria se observa el mismo comportamiento que en los cultivos de fase exponencial: la mayor cantidad de AHLs, tanto de cadena corta como de cadena larga, fue detectada en cultivos con concentración de nitrógeno 5 mM, y fue disminuyendo a medida que aumentó la concentración de nitrógeno.

Esto es importante teniendo en cuenta que en el hábitat natural de estos microorganismos, que es el suelo, la disponibilidad de nitrógeno puede ser muy baja. En dichas condiciones, una disminución de moléculas de *quorum sensing* podría redundar en alteraciones en la expresión de genes mediados por AHLs.

Los hallazgos de AHLs de cadena corta podrían ser comparables con los informes previos sobre actividad de sideróforos de moléculas de *quorum sensing*, tales como HHS y PQS en *P. aeruginosa*, y bradióxetina en *B. japonicum* (Diggle *et al.* 2007; Loh *et al.* 2002). Por el contrario, las AHLs de cadena larga de *S. fredii* no tendrían función de inmovilización de hierro.

Influencia del contenido de Hierro y Nitrógeno en el medio de cultivo sobre la producción de polisacáridos y proteínas celulares

Se realizaron una serie de ensayos con la finalidad de determinar si diferentes concentraciones de hierro y de nitrógeno en los medios de cultivo podrían incidir sobre la producción de polisacáridos y proteínas celulares de *S.fredii*, los que a su vez son

considerados como componentes de importancia para el establecimiento de una simbiosis efectiva entre rizobios y leguminosas (Skorupska *et al.* 2006; Bedmar *et al.* 2006; Ullrich, 2009; Vriezen *et al.* 2007; Ormeño-Orillo, 2005; Fraysse *et al.* 2003; Wang *et al.* 2001; Soto *et al.* 2009).

Para ello se diseñaron medios de cultivo con diferentes concentraciones de estos nutrientes, según se indica en las tablas 10 y 11. Cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento, aproximadamente 36 horas de desarrollo, las suspensiones celulares obtenidas en cada tratamiento se acondicionaron según cada determinación, como se indicó en Materiales y Métodos.

Luego de la extracción de lipopolisacáridos (LPS), exopolisacáridos (EPS), polisacáridos capsulares (KPS) y proteínas celulares totales, se realizaron corridas electroforéticas y cuantificaciones usando diversas técnicas, tal como se indica en Materiales y Métodos. Se detallan a continuación los resultados obtenidos.

Determinación y Análisis de Lipopolisacáridos

Con el fin de determinar si las variaciones en las concentraciones de hierro y nitrógeno en el medio afectan la producción de LPS, se realizaron gels de poliacrilamida al 20% (SDS-PAGE), donde se sembraron las muestras de LPS provenientes de los cultivos sometidos a los distintos tratamientos. La figura 30 muestra los resultados obtenidos de los tratamientos con distintas concentraciones de hierro, y la figura 31 los obtenidos de los ensayos con distintos niveles de nitrógeno.

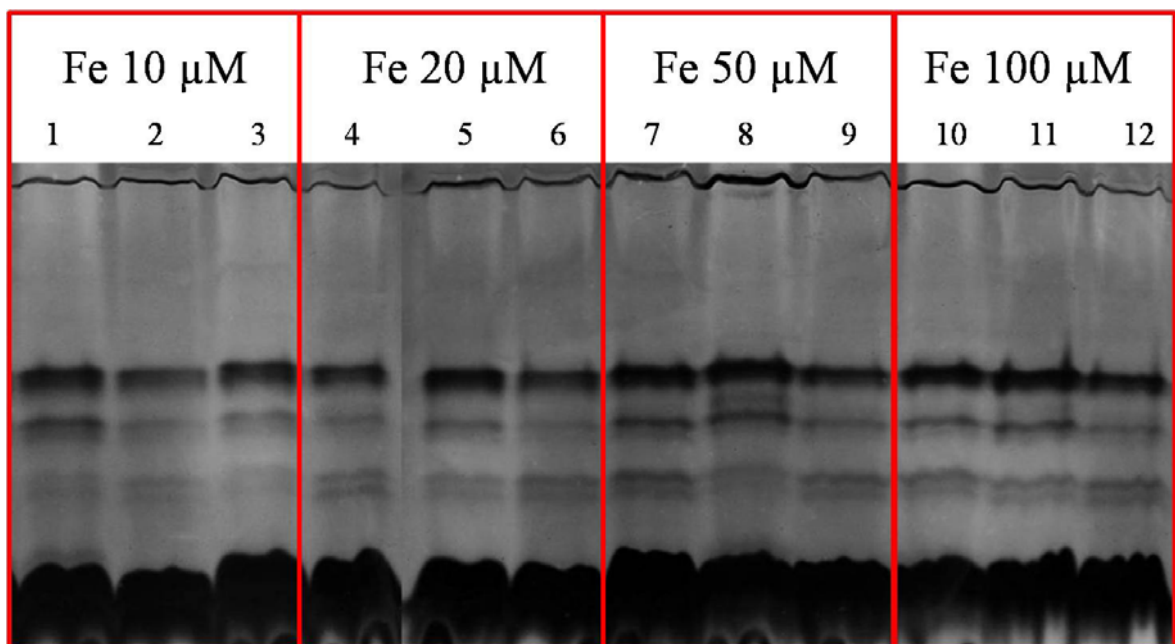


Figura 30- Perfil de bandas de LPS de cultivos de *S. fredii* sometidos a distintos tratamientos con concentraciones variables de hierro

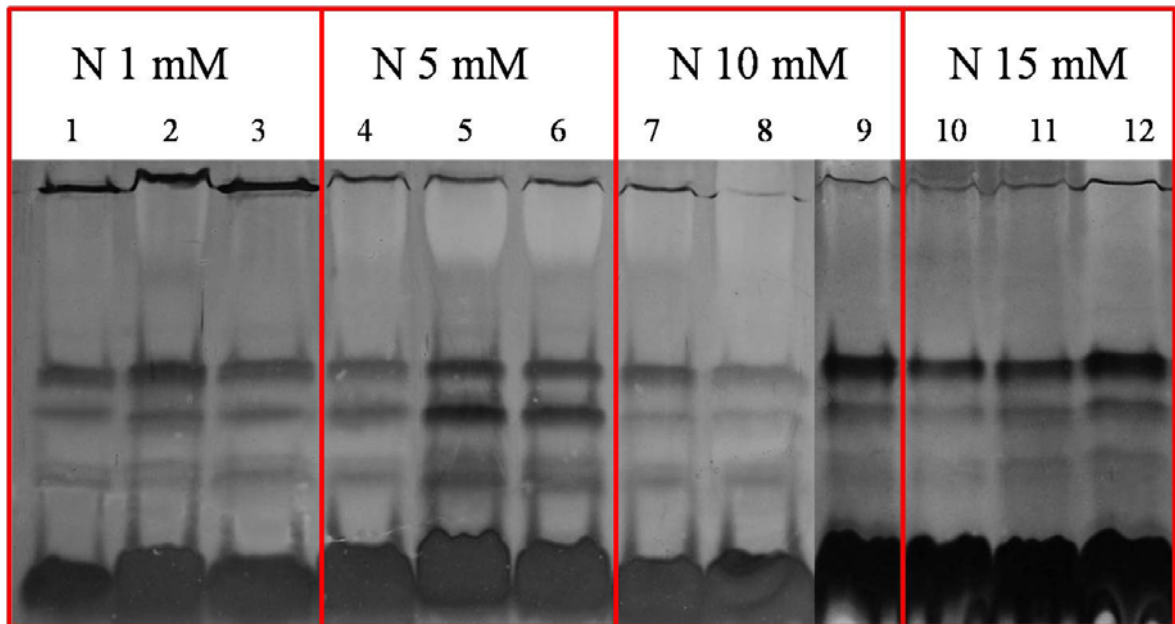


Figura 31- Perfil de bandas de LPS de cultivos de *S. fredii* sometidos a distintos tratamientos con concentraciones variables de nitrógeno

En las figuras 30 y 31, se observa que el agregado de diferentes niveles de hierro y nitrógeno a los medios de cultivo, no modificó el perfil de LPS del microorganismo estudiado, lo que permite concluir que la concentración de éstos nutrientes en el medio, no estaría afectando la estructura de los LPS de esta bacteria. Las diferencias en intensidades de algunas bandas se podrían atribuir a una concentración menor de LPS totales en las calles consideradas.

Estos resultados son de gran importancia, considerando que los cambios estructurales en los LPS son importantes para el proceso simbiótico, dependiendo de la naturaleza exacta de los cambios y del par rizobio-leguminosa que se considere (Bedmar *et al.* 2005).

Determinación y Análisis de Proteínas Celulares Totales

Con la finalidad de evaluar cambios en los perfiles de proteínas celulares totales en las suspensiones obtenidas de los diferentes tratamientos antes indicados, se realizaron geles de poliacrilamida SDS-PAGE, donde se sembraron los extractos de proteínas de los cultivos de *S. fredii*. La figura 32 muestra los resultados obtenidos de los cultivos con concentraciones variables de hierro, y la figura 33 los resultados de los distintos ensayos con concentraciones variables de nitrógeno.

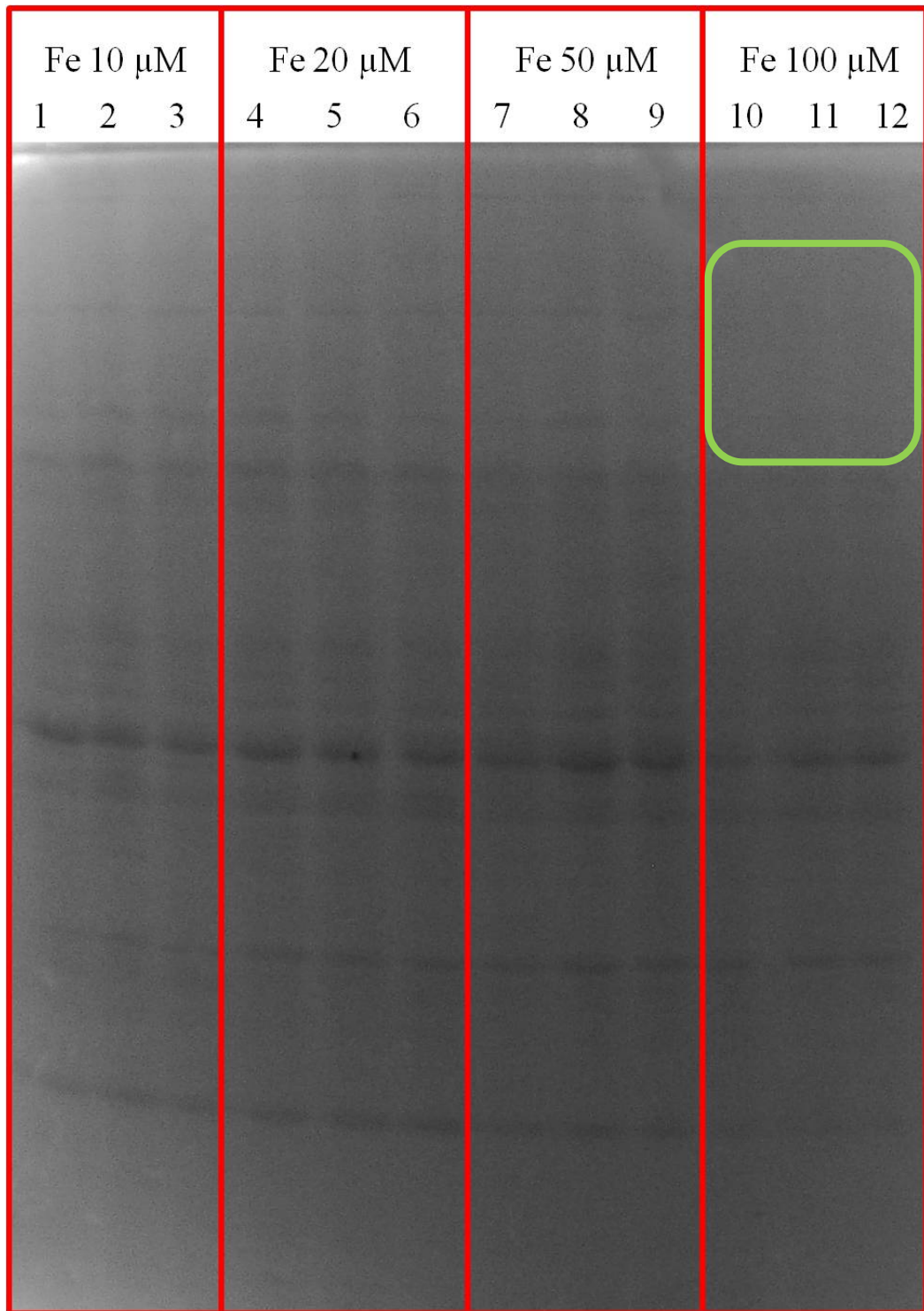


Figura 32- Perfil de bandas de proteínas de cultivos de *S. fredii* sometidos a distintos tratamientos con concentraciones variables de hierro

De la observación de los resultados obtenidos, se concluye que existen cambios en los perfiles de proteínas celulares totales cuando la concentración de hierro en el medio es de

100 μ M (Fig. 32, recuadro). Esta respuesta puede deberse a que los cambios fisiológicos que ocurren en la célula se deben a cambios en la producción de determinadas proteínas.

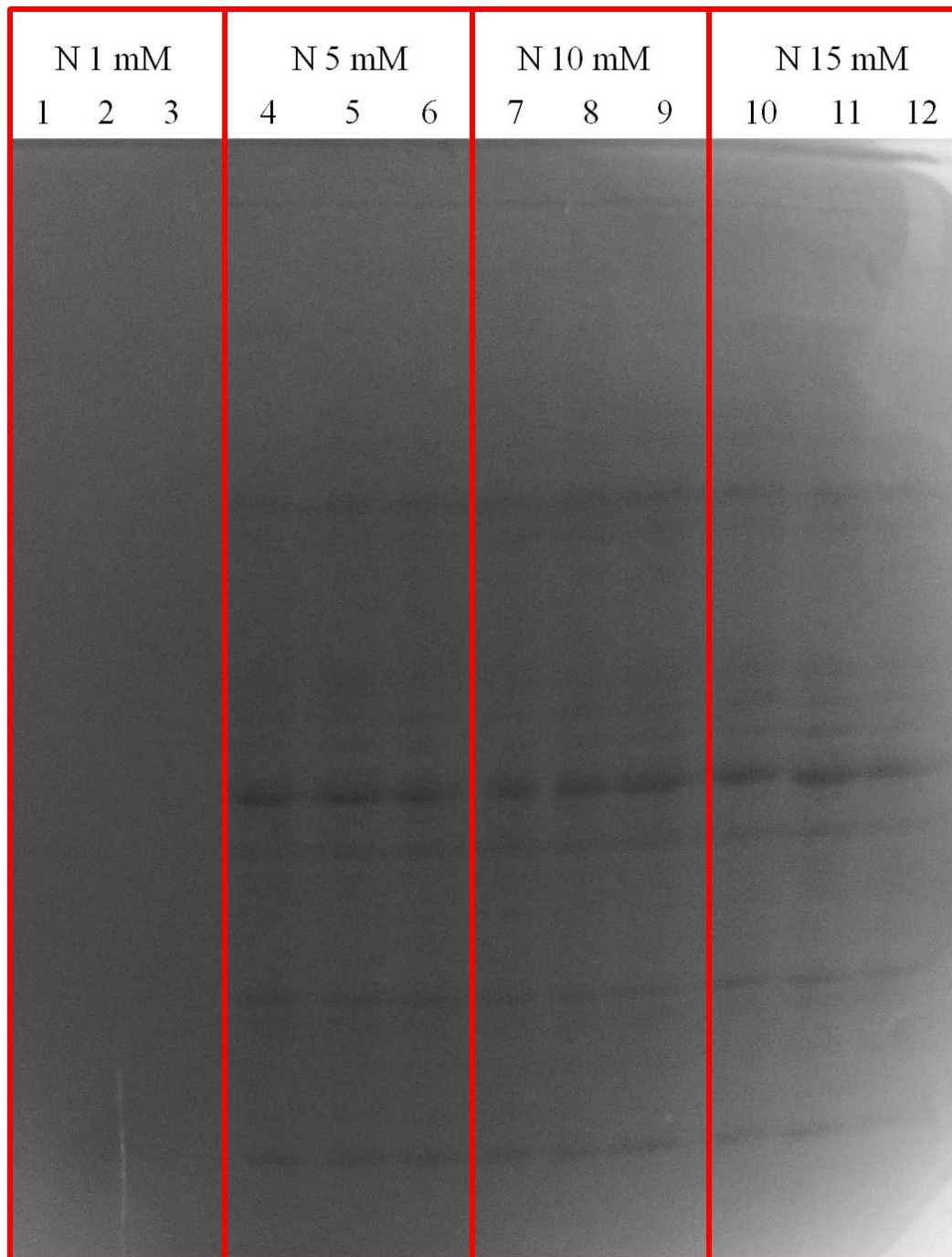


Figura 33- Perfil de bandas de proteínas de cultivos de *S. fredii* sometidos a distintos tratamientos con concentraciones variables de nitrógeno

La ausencia de bandas en el tratamiento de nitrógeno 1 mM es debido a la baja densidad celular alcanzada, lo que no permitió obtener niveles detectables de proteínas cuando se realizó la corrida electroforética.

En los demás tratamientos no se observaron diferencias apreciables con nuestro sistema de detección.

Determinación y Análisis de Exopolisacáridos

Para establecer si existían diferencias significativas en la producción de EPS en *S. fredii* al ser sometido a los distintos tratamientos, se realizó la extracción de exopolisacáridos, mediante la técnica de Skorupska et al. 1985; los extractos fueron analizados mediante el método de antrona, descrito en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de un factor.

En la figura 34 se observan los resultados obtenidos sobre la producción de EPS por *S. fredii* cultivado en medios de cultivo con concentraciones variables de hierro.

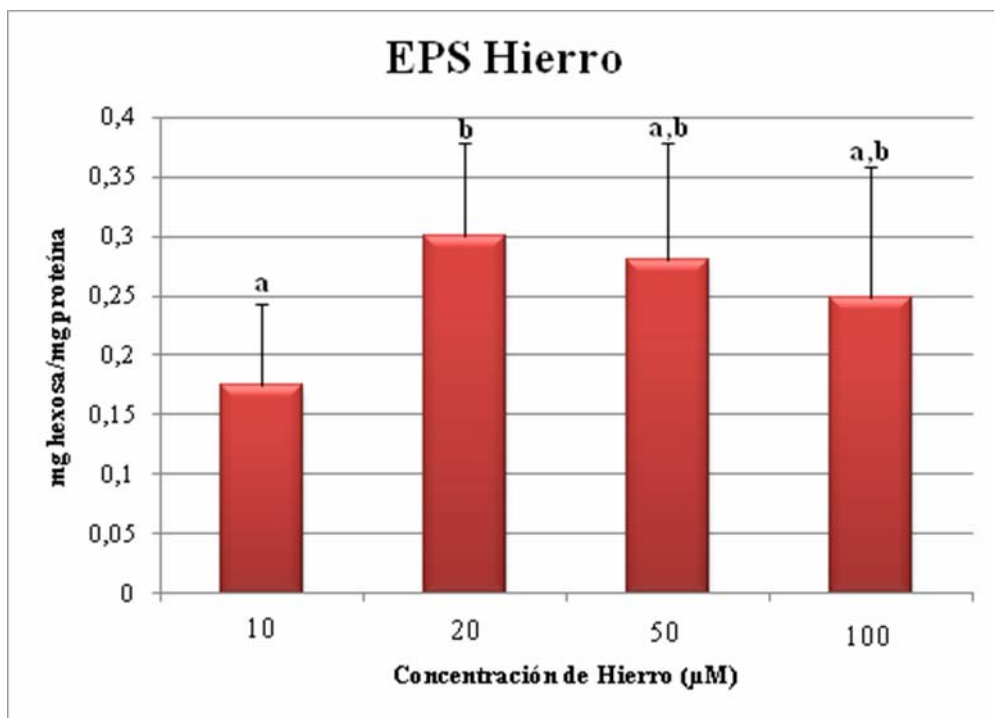


Figura 34- Concentraciones de EPS (mg hexosa/mg proteína) obtenidas en los distintos tratamientos con concentraciones variables de hierro. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Estos resultados muestran que la mayor producción de EPS se produjo a partir de 20 µM de hierro en el medio de cultivo. Este hecho puede atribuirse a la capacidad de los EPS de proteger al microorganismo frente a sustancias tóxicas, cuya síntesis temprana durante el proceso de simbiosis es esencial para su supervivencia en el medio ambiente (Vriezen *et al.* 2007).

En la figura 35 se observan los resultados obtenidos de la producción de EPS en diferentes medios con concentraciones variables de nitrógeno.

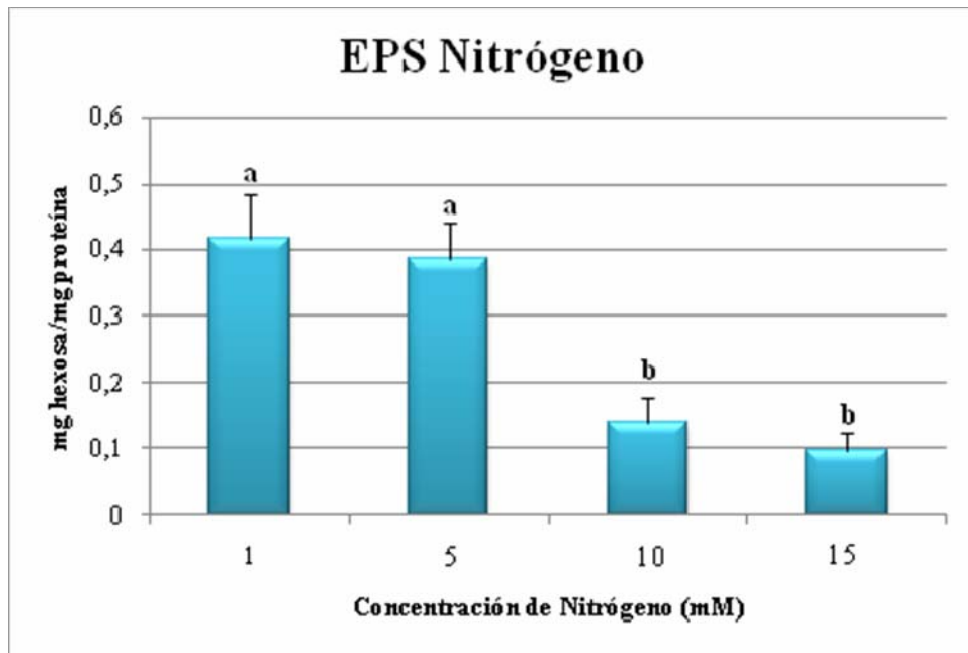


Figura 35- Concentraciones de EPS (mg hexosa/mg proteína) obtenidas en los distintos tratamientos con concentraciones variables de nitrógeno. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Puede observarse en esta figura que la cantidad de EPS producidos disminuyó cuando el contenido de nitrógeno en el medio fue superior a 5 mM. Esto puede atribuirse a que a bajas concentraciones de nitrógeno en el medio se vería favorecida la nodulación, y los EPS aumentarían para participar en la misma, ya que su acción se relaciona con la invasión, el desarrollo del bacteroide y la supresión de la respuesta inmune del vegetal (Skorupska *et al.* 2006; Bedmar *et al.* 2006)

Determinación y Análisis de Polisacáridos Capsulares

Con el fin de determinar si las diferentes concentraciones de hierro y nitrógeno ensayadas, podrían afectar la producción de KPS por parte de *S. fredii*, se realizó la extracción y cuantificación de este polisacárido mediante el método de antrona, mencionado en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de un factor, con el fin de determinar la existencia de diferencias significativas en la producción de KPS.

La figura 36 muestra las concentraciones de KPS obtenidas en los distintos tratamientos con concentraciones variables de hierro.

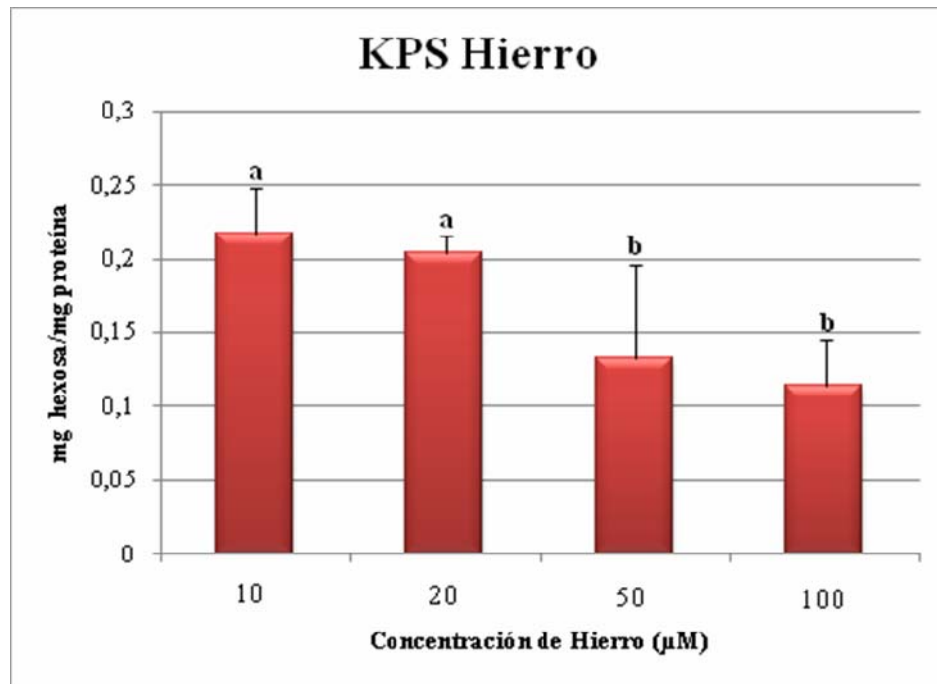


Figura 36- Concentraciones de KPS (mg hexosa/mg proteína) obtenidas en los distintos tratamientos con concentraciones variables de hierro. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Como puede observarse en los resultados obtenidos, la producción de KPS se mantuvo sin diferencias a bajas concentraciones de hierro, esto es 10 y 20 μM , mientras que disminuyó al aumentar la concentración de hierro en el medio.

En la figura 37 se observa la producción de KPS obtenidos en los distintos ensayos con concentraciones variables de nitrógeno.

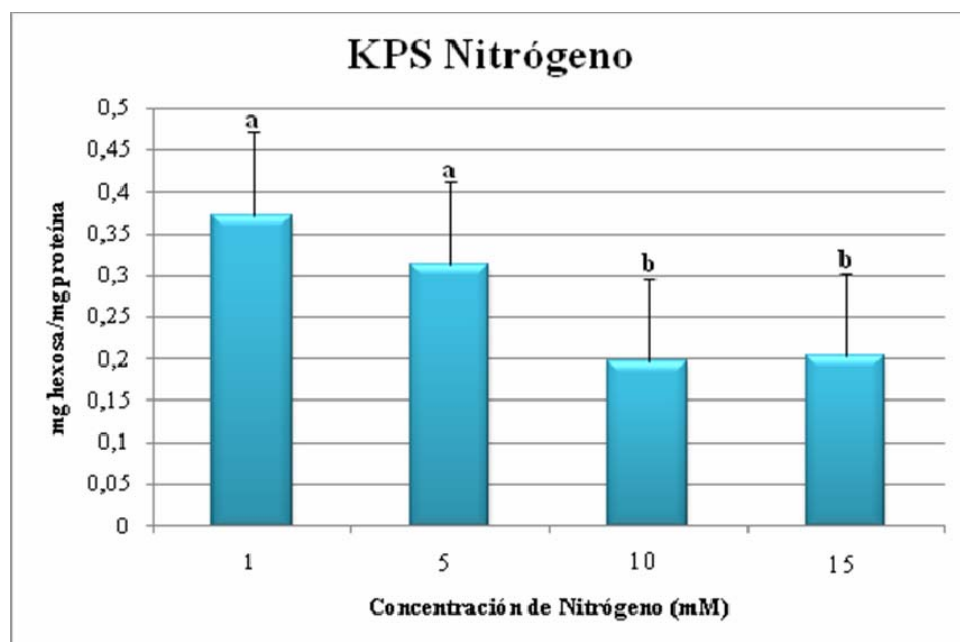


Figura 37- Concentraciones de KPS (mg hexosa/mg proteína) obtenidas en los distintos tratamientos con concentraciones variables de nitrógeno. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La producción de KPS fue la misma a 1 y 5 mM de nitrógeno, y disminuyó al aumentar la concentración de este nutriente en el medio.

Estos resultados son relevantes si consideramos el importante rol de los KPS en la nodulación de *S. fredii* con soja (Bedmar *et al.* 2006). Por otra parte, se ha reportado que los KPS poseen la capacidad de reemplazar a los EPS en sus funciones (Frayse *et al.* 2003), lo cual reviste importancia en el caso puntual de baja concentración de hierro en el medio, dado que al disminuir la producción de EPS, aumentó la producción de KPS.

Influencia de la concentración de Hierro y de Nitrógeno sobre la inducción de genes nod

El objetivo de estos ensayos fue conocer si la inducción de los genes de nodulación era influenciada por diferentes niveles de hierro y de nitrógeno en el medio de cultivo. Para ello se propuso el objetivo de obtener células transconjugantes de *S. fredii* con una fusión *nodY::lacZ* para ser utilizados como reporteros de la activación estos genes, y así poder detectar y cuantificar la expresión de los mismos.

Tal como ha sido reportado previamente (Hattermann & Stacey, 1990), han habido dificultades para obtener los transconjugantes buscados, y en consecuencia no se pudieron lograr resultados en esta serie de experimentos. Se propone para ensayos posteriores a este trabajo de tesina, y de continuidad al proyecto de investigación en el que se enmarca este plan, el ajuste a valores menores de la concentración del antibiótico utilizado para la obtención de estos transconjugantes, y la consideración de la posibilidad de transformar al microorganismo con otro plásmido de una fusión *nod::lacZ* diferente.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

- Se pudo demostrar la producción de AHLs de cadena corta y de cadena larga en *Sinorhizobium fredii*.
- El aumento de hierro en el medio de cultivo:
 - Produjo un incremento de las AHLs de cadena corta en fase estacionaria del crecimiento.
 - Produjo una disminución de las AHLs de cadena larga en fases exponencial y estacionaria del crecimiento.
 - No alteró la producción de LPS.
 - Modificó la producción de EPS, incrementándolos.
 - Modificó la producción de KPS, disminuyéndolos.
 - Alteró el perfil de proteínas celulares totales.
- El aumento de nitrógeno en el medio de cultivo:
 - Produjo una disminución de las AHLs de cadena corta en fases exponencial y estacionaria del crecimiento.
 - Produjo una disminución de las AHLs de cadena larga en fases exponencial y estacionaria del crecimiento.
 - No alteró la producción de LPS.
 - Modificó la producción de EPS, disminuyéndolos.
 - Modificó la producción de KPS, disminuyéndolos.
- Es de destacar en particular el hallazgo de moléculas autoinductoras producidas por este microorganismo, considerando que no hay reportes previos en la literatura.
- El contenido de hierro y nitrógeno en el medio de cultivo afectó la producción de polisacáridos celulares bacterianos, lo cual es de importancia, considerando la participación en el establecimiento de la simbiosis de estas moléculas en particular.
- La sensibilidad del método utilizado y/o la concentración celular alcanzada, no permitió mostrar diferencias en los patrones de bandas de proteínas celulares totales, si bien eran esperables, teniendo en cuenta las distintas condiciones en las que se desarrollaron los microorganismos, y las diferencias encontradas en la producción de las restantes moléculas estudiadas. Se propone para futuros experimentos dentro del marco del proyecto general, corroborar estas diferencias esperables mediante la utilización de otro método y condiciones de operación.

- Observando las dificultades para obtener los transconjugantes buscados se determina la necesidad de ajustar las dosis de antibiótico utilizadas para la obtención de cepas de *S. fredii* resistentes, ya que mostró una mayor sensibilidad que lo reportado en bibliografía para otras cepas, y se sugiere la posibilidad de llevar a cabo esta serie de ensayos con un plásmido con una fusión *nod::lacZ* diferente, que puedan ser utilizados como reporteros de la activación estos genes.
- Los resultados obtenidos en este trabajo, conjuntamente con otros alcanzados o previstos en el plan de investigación en el que se enmarca esta tesina, permitirán establecer la influencia de diferentes nutrientes y de moléculas de *quorum sensing* en la regulación de la expresión de los genes *nod*. Esto reviste particular importancia debido a su implicancia a nivel biotecnológico, ya que será posible, por un lado, definir la concentración celular óptima para la formulación de inoculantes y, por el otro, proponer una cepa de crecimiento rápido como alternativa para la formulación del biofertilizante específico para soja, en el que, hasta el momento, se utiliza una cepa de crecimiento lento, como lo es *Bradyrhizobium japonicum*.

BIBLIOGRAFÍA

- Bedmar E. J., Robles E.F. y M. J. Delgado. 2005. The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochemical Society Transactions*, 33: 145-148.
- Bedmar E. J., González J., Lluch C. y B. Rodelas. 2006. Fijación de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones. Capítulo 14, pp 148-159. Editorial Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno. Granada, España
- Badri D. V., Weir T. L., Van del Lelie D. y J. M. Vivanco. 2009. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology* vol 20, No. 6, pp. 642-650.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *J Gen Microbiol.* 86:39-48.
- Brelles-Mariño G. y E. Bedmar. 2001. Detection, purification and characterisation of quórum-sensing signal molecules in plant-associated bacteria. *Journal of Biotechnology* 91, pp. 197-209.
- Brown C. M. y M. J. Dilworth. 1975. Ammonia assimilation by Rhizobium cultures and bacteroids. *J Gen Microbiol.* 86:39-48.
- Cha C., Gao P., Chen Y., Shaw P. D. y S. K. Farrand. 1998. Production of acyl-homoserine lactones quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *MPMI* vol. 1, No. 11, pp. 1119-1129.
- Crespo-Rivas J. C., Margaret I., Hidalgo A, Buendía-Clavería A. M., Ollero F. J., López-Baena F. J., Murdoch P., Rodríguez-Caravajal M. A., Soria-Díaz M. E., Reguera M., Lloret J., Sumpton D. P., Mosely J. A., Thomas-Oates J. E., van Brussel A. A. N., Gil-Serrano A., Vinardell J. M. y J. E. Ruiz-Sainz. 2009. *Sinorhizobium fredii* HH103 *cgs* mutants are

unable to nodulate determinate- and indeterminate nodule-forming legumes and overproduce an altered EPS. MPMI vol. 22, No. 5, pp. 575-588.

Cooper J. E. 2007. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology* 103:1355-1365.

De Lyra M., López-Baena F. J., Madinabeitia N., Vinardell J. M., Espuny M., Cubo M. T., Bellogin R. A., Ruiz-Sainz J. E. y F. J. Ollero. 2006. Inactivation of the *Sinorhizobium fredii* HH103 *rhcJ* gene abolishes nodulation outer proteins (Nops) secretion and decreases the symbiotic capacity with soybean. *International Microbiology* 9:125-133.

Dische Z. 1962. General colours reactions. *Methods Carbohyd Chem.* 1:478-492.

Diggle S. P., Matthijs S., Wright V. J., Fletcher M. P., Chhabra S. R., Lamont I. L., Kong X., Hider R. C., Cornelis P., Cámara M. y P. Williams. 2007. The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS plan multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chemistry & Biology* 14, 87-96.

Downie J. A. 2010. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, pp. 150-170.

Ferraris G., González Anta G. y M. Díaz-Zorita. 2006. Aportes actuales y futuros de tratamientos biológicos sobre la nutrición nitrogenada y producción de soja en el Cono Sur. III Congreso de Soja del MERCOSUR, Rosario, Santa Fe.

Frayse N., Coudere F. y V. Poinso. 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Journal Biochem.* 270:1365-1380

González J. E. y N. D. Keshavan. 2006. Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* vol. 70, No. 4, pp. 859-875.

Gurich N. y J. E. González. 2009. Role of quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*-Alfalfa symbiosis. *Journal of Bacteriology* vol. 191, No. 3, pp. 4372-4382.

- Hattermann D. R. y G. Stacey. 1990. Efficient DNA transformation of *Bradyrhizobium japonicum* by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(4):833-836.
- Hitchcock P. J. y T. M. Brown. 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* Vol. 01, 154: 269-277
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227:680:685
- Loh J., Carlson R. W., York W. S. y G. Stacey. 2002. Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in the symbiotic gene regulation. *PNAS* vol 99, No. 22, pp: 14446-14451.
- Loh J. y G. Stacey. 2003. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. 2003. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 69, No. 1, pp 10-17.
- López-Baena F. J., Vinardell J. M., Pérez-Montaña F., Crespo-Rivas J. C., Bellogín R. A., Espuny M. y F. J. Ollero. 2008. Regulation and symbiotic significance of nodulation outer proteins secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103. *Microbiology* 154:1825-1836.
- López García S. L., Vázquez T. E. E., Favelukes G. y A. R. Lodeiro. 2001. Improved soybean root association of N-starved *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology*, vol. 183, No. 24, pp. 7241-7252.
- Masson-Boivin C., Giraud E., Perret X. y J. Batut. 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology*, vol. 17, No. 10, pp 458-466.
- McClellan, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., Bycroft, B. W., Stewart, G. S. A. B., y P. Williams. 1997. Quorum-sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143:3703-3711.

Miller J. H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Oglesby A., Farrow J. M., Joon-Hee Lee, Tomaras A. P., Greenberg E. P., Pesci E. C. y M. L. Vasil. 2008. The influence of iron in *Pseudomonas aeruginosa* physiology. The Journal of Biological Chemistry vol. 283, No. 23, pp. 15558-15567.

Ormeño-Orillo E. 2005. Lipopolisacáridos de Rhizobiaceae: estructura y biosíntesis. Revista Latinoamericana de Microbiología. 47 (3-4):165-175.

Parada M., Vinardell J. M., Ollero F. J., Hidalgo A., Gutiérrez R., Buendía-Clavería A. M., Wang Lei, Margaret I., López-Baena F. J., Gil-Serrano A. M., Rodríguez-Caravajal M. A., Moreno J. y J. E. Ruiz-Sainz. 2006. *Sinorhizobium fredii* HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and *Cajanus cajan*. MPMI vol. 19, No. 1, pp. 43-52.

Patankar A. V. y J. E. González. 2009,a. An orphan LuxR homolog of *Sinorhizobium meliloti* affects stress adaptation and competition for nodulation. Applied and Environmental Microbiology Vol. 74, No. 4, pp. 946-955.

Patankar A. V. y J. E. González. 2009,b. Orphan LuxR regulators of quorum sensing. FEMS Microbiol. Rev. Vol. 33, No. 4, pp. 739-756.

Rodríguez-Navarro D. N., Dardanelli M. S. y J. L. Ruiz-Sainz. 2007. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. FEMS Microbiol Lett 272, pp. 127-136.

Sanjuán J. 2007. Biofertilizantes en Iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial. Introducción, pp. 3. Eds. Izaguirre-Mayoral M.L., Labandera C. y Sanjuán J. Montevideo, Uruguay.

Schertzer J. W., Boulette M. L. y M. Witheley. 2009. More than a signal: non-signaling properties of quorum sensing molecules. Trends in Microbiology, Vol. 17, No. 5, pp 189-195.

Skorupska A., Derylo M. y Z. Lorkiewicz. 1985. Role of noncarbohydrate substitutions on *Rhizobium* exopolysaccharide in nodulation process. Arch Microbiol. 143:307-310.

Skorupska A., Janczarek M., Marczak M., Mazur A. y J. Krol. 2006. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. Microbial Cell Factories 5:7.

Soto M. J., Domínguez-Ferreras A., Pérez-Mendoza D., Sanjuán J. y J. Olivares. Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. 2009. Cellular Microbiology 11(3), 381-388.

Ullrich M. 2009. Bacterial polysaccharides: current innovations and future trends. Horizon Scientific Press. 358p.

Vincent J. M. 1970. A Manual for the practical study of root-nodule bacteria, p. 3. IBP Handbook No. 15, Oxford and Edinburgh: Blackwell Scientific Publications.

Vriezen J. A., de Bruijn F. J. y K. Nüsslein. 2007. Responses of rhizobia to dissection in relation to osmotic stress, oxygen and temperatura. Appl. Environ. Microbiol. 73:3451-3459.

Wang T., Martínez Romero J. e I. López Lara. 2001. Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. Microbios. Eds Martínez Romero E. y Martínez Romero J. C. Centro de Investigaciones sobre fijación de nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México.

Werner D., Wilcockson J. y E. Zimmerman. 1975. Adsorption and selection of rhizobia by ion exchange papers. Arch Microbiol. 105:27-32.

www.fyo.com

www.minagri.gob.ar

www.usda.com