



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

TESINA PRESENTADA PARA OBTENER
EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADO EN QUÍMICA

“INFLUENCIA DE LA DENSIDAD CELULAR SOBRE LA PRODUCCIÓN DE
COMPONENTES DE IMPORTANCIA PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LA
SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA: EXOPOLISACÁRIDOS (EPSs),
LIPOPOLISACÁRIDOS (LPSs), POLISACÁRIDOS CAPSULARES (KPSs) Y
PROTEÍNAS CELULARES TOTALES”.

María Sofía LARROULET

SANTA ROSA (LA PAMPA)

ARGENTINA

2009

PREFACIO

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química, 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, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNLPam, comenzando como auxiliar de investigación el 1° de Junio de 2006 por Res. N° 157, con fecha de aprobación del Proyecto de Tesina 18 de Diciembre de 2008, Res. N° 531 y con fecha de presentación de Tesina el día 20 de Marzo de 2009, bajo dirección de la Dra. Graciela Lorda; y bajo codirección de la MSc. Fabiola Pagliero.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Cs. Exactas y Naturales por facilitarme el lugar físico y el instrumental para desarrollar este trabajo de tesina y mi carrera de grado; a todo el personal del Departamento de Química por su buena predisposición; a Mari, Marcelo, Carolina y Gabi por brindarme su ayuda y cariño durante tantos días de trabajo; a mi directora Graciela y codirectora Fabiola por depositar su confianza en mi, por su dedicación y comprensión. A Vale y Jose, mi hermana y sobrina del corazón que gracias a su cariño, apoyo y paciencia durante estos 6 años sentí que estaba cerca de casa y aprendí de ellas que en la vida es cuestión de plantearse objetivos e ir hacia ellos sin permitir que nada ni nadie nos haga desistir de lograrlos. También quiero agradecer a todas mis amigas por acompañarme y apoyarme siempre y en especial a Mariana, Vero y Magui, mis compañeras de casa, por acompañarme en mis días buenos y malos, con mis nervios preexamen, mis depresiones post La Plata, en muchas noches de bailes universitarios, peñas, etc y por darme la posibilidad de sentirme un poco “mamá.

A mi novio que me acompañó en estos últimos meses, muy difíciles y junto con mi familia, fueron mi soporte y me ayudaron a finalizar este trabajo.

Por último, agradezco a mis padres, hermanos, cuñada y sobrino que son el pilar fundamental en mi vida y gracias a su amor incondicional, su paciencia, compañía, sus “no te vas a volver” estoy hoy a un paso de cumplir este objetivo tan importante.

Gracias a todos de corazón porque sin el apoyo de todos uds esto no hubiera sido posible.

20/03/2009

Maria. Sofia. LARROULET

Departamento de Química

FACULTAD DE CIENCIAS
EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL
DE LA PAMPA

RESUMEN

Las poblaciones bacterianas regulan coordinadamente la expresión de los genes mediante la producción de moléculas señal difusibles, las que actuarían induciendo la expresión de genes en respuesta a la densidad celular, en un proceso denominado *quorum sensing*. Este sistema se transforma entonces en un importante componente de los procesos de señalización.

En el presente trabajo se estudió si la molécula señal liberada en cultivos rizobianos de diferentes densidades celulares afecta la producción de otros componentes de importancia para el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa, tales como exopolisacáridos (EPS), polisacáridos capsulares (KPS), lipopolisacáridos (LPS), y proteínas celulares totales.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado para, posteriormente, realizar un análisis estadístico de los datos obtenidos en la determinación de concentración de EPS, KPS y proteínas celulares totales.

La determinación de EPS y KPS se realizó por peso seco y por cuantificación de la concentración de hexosas mediante la técnica de Antrona. Para determinar si se presentaban diferencias en las concentraciones de LPS en las diferentes fases comparadas, se realizó la extracción de los mismos mediante la técnica descrita por Hitchcock y Brown, seguida de corrida electroforética en geles de poliacrilamida. Por último, la determinación de proteínas celulares totales, se realizó extrayendo las proteínas de las muestras por sonicación y posterior determinación de la concentración mediante la técnica de Bradford. Luego se corrieron las muestras en gel de poliacrilamida con SDS.

Los resultados obtenidos en este trabajo, mostraron diferencias en las concentraciones de EPS, KPS y proteínas celulares totales en fase exponencial respecto de fase estacionaria de crecimiento, y también se observaron diferencias en los perfiles electroforéticos de LPS y proteínas celulares totales en las fases comparadas, para los microorganismos utilizados.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Consideraciones previas.....	1
Géneros de rizobios.....	3
Características generales de las leguminosas: soja y alfalfa.....	4
Fijación biológica del nitrógeno.....	6
Relación entre rizobios y densidad celular: <i>Quorum sensing</i>.....	8
El proceso de nodulación.....	12
Componentes bacterianos adicionales requeridos para una simbiosis efectiva.....	15
Exopolisacáridos (EPS).....	16
Polisacáridos capsulares (KPS).....	18
Lipopolisacáridos (LPS).....	18
Glucanos cíclicos.....	20
Electroforesis de lipopolisacáridos (LPS).....	21
OBJETIVOS.....	23
HIPÓTESIS.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Microorganismos.....	24
Medios de cultivo.....	24
Condiciones de operación.....	27
Conservación de microorganismos.....	28
Agar inclinado.....	28
Congelación.....	28
Determinación del crecimiento microbiano.....	28
Determinación de la densidad óptica.....	28
Determinación del número de células viables.....	29

Procesamiento de los cultivos bacterianos.....	29
Determinación de exopolisacáridos (EPS).....	30
Determinación de polisacáridos capsulares (KPS).....	30
Determinación de hexosas.....	31
Extracción de lipopolisacáridos (LPS).....	31
Electroforesis en geles de poliacrilamida para lipopolisacáridos (LPS).....	32
Revelado de lipopolisacáridos (LPS).....	34
Extracción de proteínas celulares totales.....	34
Determinación de la concentración proteica.....	35
Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio para proteínas celulares totales.....	36
Revelado de proteínas celulares totales.....	37
Análisis estadístico de los resultados obtenidos.....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
Ensayos de selección de medios de cultivo.....	39
Determinación de parámetros cinéticos de crecimiento celular.....	44
Determinación de exopolisacáridos (EPS) y polisacáridos capsulares (KPS).....	45
Concentración de EPS y KPS para la cepa <i>B. japonicum</i> E-109.....	46
Concentración de EPS y KPS para la cepa <i>S. meliloti</i> B-399.....	47
Análisis estadístico de los resultados de exopolisacáridos (EPS) y polisacáridos capsulares (KPS).....	48
Determinación de los perfiles de lipopolisacáridos (LPS)....	51
Perfil de LPS para la cepa <i>B. japonicum</i> E-109.....	51
Perfil de LPS para la cepa <i>S. meliloti</i> B-399.....	52

Determinación de la concentración de proteínas celulares totales.....	54
Análisis estadístico de los resultados de concentración proteica.....	55
Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para proteínas celulares totales.....	56
Perfil de SDS-PAGE para la cepa <i>S. meliloti</i> B-399.....	56
Perfil de SDS-PAGE para la cepa <i>B. japonicum</i> E-109....	58
CONCLUSIÓN.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	62
ANEXO I.....	66

INTRODUCCIÓN

Consideraciones previas

La adopción y uso eficaz de biofertilizantes microbianos (inoculantes) en agricultura está llamada a ser una de las tecnologías clave para asegurar la sustentabilidad y productividad de este sector, tan importante para las economías y las sociedades de los países Iberoamericanos (Sanjuán J., 2007). El término biofertilizantes está asociado a los inoculantes formulados en base a rizobios específicos para leguminosas. Esto se debe a que el mayor desarrollo tecnológico se ha dado en estos productos utilizados para ser aplicados en las semillas de leguminosas forrajeras y, fundamentalmente en las últimas décadas, acompañando el crecimiento de las áreas cultivadas con soja (Moretti E. R., 2007). En Argentina, la superficie sembrada con soja pasó de 26.000 ha en la década de los 70 a más de 15 millones de ha en el año 2006, con más del 65% del total de la siembra de soja inoculada anualmente (Corvalán D. *et al.*, 2007). Además, con respecto a la leguminosa maní, Argentina es uno de los principales exportadores a nivel mundial.

La posibilidad de obtener elevados rendimientos agrícolas y al mismo tiempo preservar el medio ambiente está irremediablemente ligada al uso generalizado de estos productos, como alternativa al uso masivo de plaguicidas y fertilizantes de origen químico, que son costosos y tienen un impacto muy negativo sobre la salud y el medio ambiente. La obtención, comercialización y aplicación eficiente de un inoculante eficaz y de alta calidad es un proceso largo y complejo (Sanjuán J., 2007).

Los rizobios utilizados en la formulación de inoculantes tienen la propiedad de mejorar la nutrición y el crecimiento vegetal por medio de un proceso de simbiosis, permitiendo así un mejor aprovechamiento de los recursos naturales del suelo y del ambiente. La simbiosis es el resultado de una interacción selectiva entre los rizobios y la familia de las leguminosas (*Leguminosae*), en el cual cada leguminosa es nodulada solamente por especies bacterianas específicas. Por ejemplo: *Medicago sativa* (alfalfa)

por *Sinorhizobium meliloti*, *Glycine max* (soja) por *Bradyrhizobium japonicum* y *Lotus spp.* por *Mesorhizobium loti*. Algunas bacterias exhiben un amplio rango de hospedadores tal como *Rhizobium* NGR234 que puede nodular más de 112 géneros de leguminosas. Por otra parte *M. loti* tiene un reducido rango de hospedador nodulando diferentes especies de *Lotus* (Lepek V., D'Antuono A., 2005).

La nodulación de las leguminosas por los rizobios requiere una serie de interacciones bioquímicas entre la bacteria (microsimbionte) y su huésped (macrosimbionte). La primera señal en la interacción la provee la planta. Los rizobios son capaces de notar la presencia de la raíz de la leguminosa por medio de moléculas de bajo peso molecular, tales como flavonoides, isoflavonoides y betaínas, secretadas por la raíz. En respuesta, los rizobios sintetizan otras señales específicas, los factores Nod, dirigidos hacia la planta hospedadora que tienen un papel clave en la inducción de las etapas iniciales de nodulación. Sin embargo, otros requerimientos son necesarios para la formación de nódulos simbióticamente efectivos (Wang T. *et al.*, 2001). Los polisacáridos bacterianos de superficie como EPS (exopolisacáridos), KPS (polisacáridos capsulares), LPS (lipopolisacáridos), y glucanos cíclicos son esenciales para la formación del hilo de infección, desarrollo del nódulo y adaptación y supervivencia de rizobios bajo diferentes condiciones ambientales (Fischer S. E. *et al.*, 2003).

Desde la década de los 80 se vienen utilizando los perfiles electroforéticos de LPS y proteínas celulares totales en estudios de diversidad e identificación de poblaciones bacterianas. El hecho de que dichos perfiles sean característicos de cada bacteria, unido a la rapidez y sensibilidad del método, además de su alta reproducibilidad y bajo costo, ha convertido la técnica en una herramienta útil, empleándose para el estudio de diversos microorganismos (Santamaría M. *et al.*, 1997).

Géneros de rizobios

Los rizobios son bacterias del suelo pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae* y se agrupan en seis géneros: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium*. Todas las especies comprendidas en éstos géneros comparten la característica distintiva de formar nódulos fijadores de nitrógeno en las leguminosas y de allí proviene su gran importancia agronómica y ecológica (Lodeiro A. R. *et al.*, 2003).

- **Género *Bradyrhizobium***: estas bacterias son bacilos de 0,5-0,9 x 1,2-3,0 μm . Se mueven con un flagelo polar o subpolar. Este género consiste de cepas de crecimiento lento, productoras de álcali. Las colonias son circulares, rara vez translúcidas, blancas y convexas entre 5 y 7 días de incubación. Las tres especies definidas de este género, *B. japonicum* (especie tipo), *B. elkanii* y *B. liaoningense*, pueden nodular la soja (*Glycine max*). *B. japonicum* tiene una amplia gama de plantas huéspedes, incluyendo muchas leguminosas tropicales y algunas de zonas templadas. El tiempo de generación es de 8 hs o más.

Se han obtenido aislamientos de *Bradyrhizobium* de otras leguminosas, por ejemplo: maní.

- **Género *Sinorhizobium***: son bacilos que miden 0,5-1,0 x 1,2-3,0 μm . Las ocho especies dentro de este género crecen rápidamente y producen ácido en medio YMA. La especie tipo, *S. meliloti* (nodula alfalfa) fue transferida del género *Rhizobium* y ha sido estudiada extensamente (Wang T. *et al.*, 2001).

Los rizobios tienen dos formas de vida: en *vida libre* se los encuentra en el suelo o en las etapas iniciales del proceso de nodulación y como *bacteroides*, se los encuentra en el interior de los nódulos (Lodeiro A. R. *et al.*, 2003). Cuando se encuentran como bacteroides expresan las enzimas necesarias para reducir el nitrógeno gaseoso que luego es utilizado por la planta huésped que provee compuestos carbonados al rizobio.

Características generales de las leguminosas: soja y alfalfa

- **Soja** (*Glycine max*): especie de la familia de las leguminosas. Es una planta de cultivo anual que se desarrolla en ambientes edafoclimáticos muy diversos. Posee un tallo erguido, vellosos, con hojas trímeras. Las flores, de color blanco o violeta aparecen en las axilas. El fruto es una vaina que encierra las semillas (Fig. 1).

Es reconocida 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 (FBN) en la simbiosis entre la leguminosa y los rizobios. El cultivo obtiene entre el 30 y el 94% de sus requerimientos de nitrógeno a partir de esta simbiosis.

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 del 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, 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 G. *et al.*, 2006).

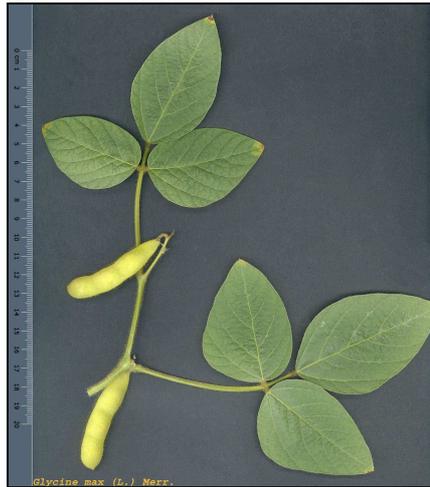


Fig. 1. Fotografía del fruto y hojas de *Glycine max*.

- **Alfalfa** (*Medicago sativa*): constituye uno de los recursos forrajeros más importantes del país, tanto por su enorme adaptación a diferentes climas y suelos, como por su elevada calidad forrajera. Además ésta pastura le brinda al productor ganadero, forraje de alta calidad durante gran parte del año y la posibilidad de transferir excedentes para los períodos críticos (Fig. 2).

Otro factor importante a la hora de elegir este cultivo es que al pertenecer a la familia de las leguminosas, capta nitrógeno atmosférico simbióticamente, disminuyendo los costos de fertilización y mejorando la fertilidad química del suelo.

La alfalfa es una especie de gran plasticidad que puede prosperar en regiones semiáridas, sub-húmedas y húmedas. Requiere de suelos bien aireados y profundos, está adaptada para resistir deficiencias hídricas prolongadas y además está dotada de una raíz que le permite penetrar en profundidad en el perfil del suelo, por ello tolera sequías, pero es muy sensible a la falta de oxigenación que ocurre cuando el suelo está anegado. La alfalfa es una de las especies más sensibles a la acidez. Con valores de pH superiores a 6,5 la disponibilidad de algunos nutrientes esenciales para el cultivo, tales como Boro, Zinc y Fósforo, se ve reducida. El mejoramiento genético experimentado en los últimos años ha llevado a contar con cultivares de alta producción que superan ampliamente a los cultivares utilizados hace 20 años. Esta mayor producción sólo se logra en

suelos de alta fertilidad, es decir sin limitaciones nutricionales (Moreno Sastre G., Talbot Wright M. L., 2007).



Fig. 2. Fotografía de la planta de *Medicago sativa*.

Fijación biológica del nitrógeno

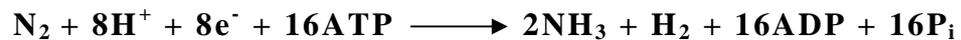
El nitrógeno es un constituyente esencial de moléculas fundamentales de todos los seres vivos: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, etcétera.

El nitrógeno molecular (N_2) es la única reserva de nitrógeno accesible en la biósfera. Prácticamente ilimitada, esta reserva no es directamente utilizada por los vegetales y animales. Para que el nitrógeno pueda ser asimilado, es necesario que sea reducido (Bacca B. E. *et al.*, 2000). Los únicos seres vivos capaces de realizar esta reacción son microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa que convierten el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado en un proceso denominado Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN).

La nitrogenasa es una proteína de gran tamaño que consta de dos componentes: la proteína tetramérica que contiene hierro (Fe) y molibdeno (Mo), codificada por los genes *nifD* y *nifK*, cuya función es reducir el

nitrógeno, y la proteína homodimérica que contiene hierro (codificada por *nifH*), cuya función es transportar los electrones del donador fisiológico de electrones (ferredoxina o flavodoxina) hacia la proteína de Fe-Mo. Esta enzima en los nódulos radiculares posee características similares a la enzima de las bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre, incluyendo la sensibilidad al O₂ y la capacidad de reducir acetileno y N₂.

La ecuación de la reacción catalizada por esta enzima es la siguiente:



Aunque el amoníaco (NH₃) es el producto directo de esta reacción, es rápidamente ionizado a amonio (NH₄⁺). Éste es asimilado por los fijadores libres o transferido al correspondiente hospedador en el caso de la asociación con plantas.

El proceso de FBN es de gran importancia económica y equilibra el ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Fig. 3) al recuperar para la biósfera el nitrógeno perdido por desnitrificación. Las transformaciones en dicho ciclo no son exclusivamente biológicas: las radiaciones ultravioleta representan el 10% del aporte global; la industria de los fertilizantes aporta un 25%, por lo que la FBN corresponde al 65% aproximadamente (Bacca B. E. *et al.*, 2000).

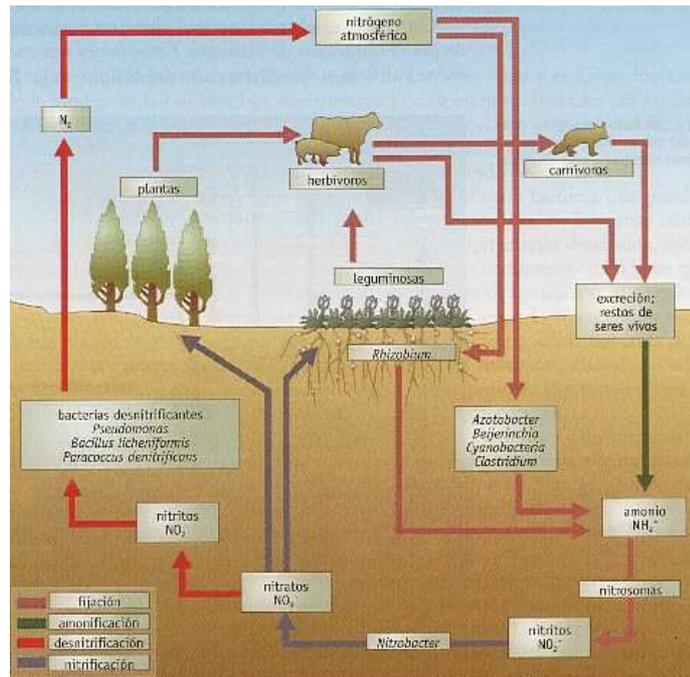


Fig. 3. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno.

Relación entre rizobios y densidad celular: *Quorum sensing*

Históricamente, se pensó que las bacterias eran individuos solitarios, creciendo cada una independientemente de la población. Sin embargo, en 1970 Nealson *et al.*, descubrieron que las bacterias pueden sentir la población y responder coordinadamente. Este fenómeno se llamó *Quorum sensing* (González, J. E., Marketon M. M., 2003).

El *quorum sensing* es ampliamente utilizado por una variedad de especies bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas para coordinar su comportamiento en comunidad. Esto implica usualmente la regulación de genes específicos en respuesta a la densidad de población. Esta expresión coordinada de los genes es alcanzada por la producción, liberación y detección de pequeñas moléculas señal llamadas autoinductores.

En bacterias Gram-negativas, por ejemplo las pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, el mayor grupo de autoinductores son las acil homoserina lactonas (AHL). Ellas tienen un

anillo homoserina lactona (HSL) conservado, con una cadena lateral acilo variable (Fig. 4).

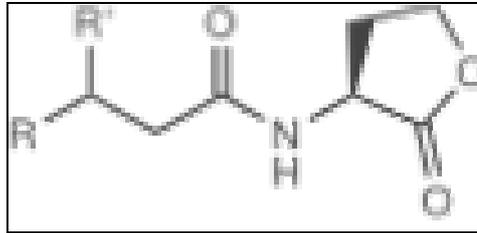


Fig. 4. Estructura general de las AHL.

Las AHLs pueden clasificarse en moléculas de cadena corta o moléculas de cadena larga, basándose en el largo de los grupos acilo. El largo y el nivel de saturación de las cadenas acilo unido a la presencia o ausencia de sustituyentes oxo o hidroxilo en la posición C-3 de dicha cadena, provee variación y especificidad para la comunicación por *quorum sensing* en una población bacteriana mixta.

Con bajas densidades de población, el gen que expresa la enzima LuxI para la síntesis de autoinductor, posee un nivel basal de expresión, que resulta en la producción de pequeñas cantidades de moléculas señal autoinductor que difunden fuera de la célula y se diluyen inmediatamente en el medio circundante. Un incremento de la población bacteriana resulta en una acumulación gradual de autoinductor alrededor de las células. El autoinductor activa específicamente una proteína reguladora transcripcional (LuxR) por unión a ella (Fig. 5). Los reguladores activados interactúan entonces, con secuencias blanco de ADN (caja *lux*) y aumentan o bloquean la transcripción de genes regulados por *quorum sensing*, que resulta en la activación sincronizada de ciertos fenotipos en una población bacteriana (González J. E., Keshavan N. D., 2006).

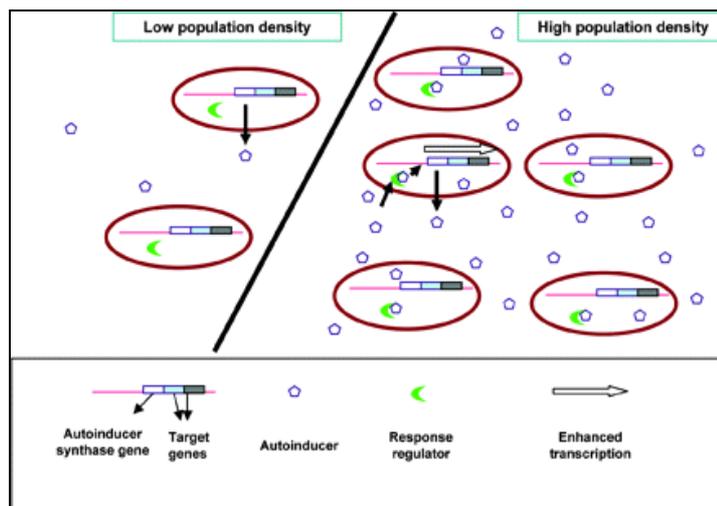


Fig. 5. Representación esquemática del *quorum sensing* bacteriano (González J. E., Keshavan N. D., 2006).

Además de las bien caracterizadas moléculas señal (flavonoides, factores Nod y exopolisacáridos) que están implicadas en el proceso de nodulación, las AHLs producidas por *quorum sensing* bacteriano pueden incluirse ahora en la lista de señales simbióticas. El *quorum sensing* ha sido relacionado recientemente con varios fenómenos que incluyen eficiencia de nodulación, desarrollo del simbiosoma, producción de exopolisacáridos y fijación de nitrógeno, todos ellos importantes para el establecimiento de una simbiosis satisfactoria (González, J. E., Marketon M. M., 2003).

Diferentes especies bacterianas pueden producir las mismas AHLs o AHLs con estructuras y propiedades similares, lo que sugiere que la comunicación cruzada entre poblaciones ocurre y es evidente que el *quórum sensing* via AHLs es más común entre bacterias que se asocian a plantas que en las poblaciones generales de bacterias del suelo (Sánchez-Contreras M. *et al.*, 2007).

Mientras que todos los otros rizobios que fijan nitrógeno caracterizados hasta aquí utilizan las AHLs para mediar una respuesta al *quorum sensing*, *B. japonicum* aparece como único, ya que utiliza otro tipo de autoinductor para mediar dicha respuesta (Fig. 6).

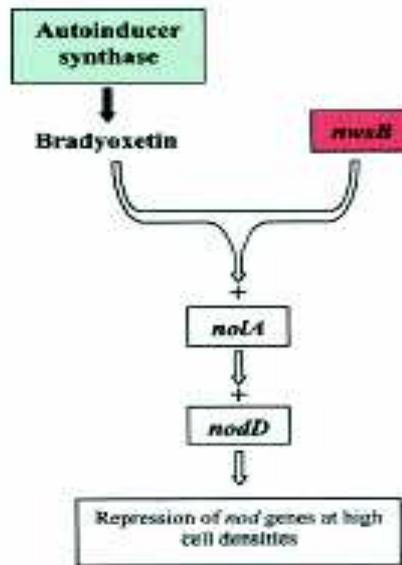


Fig. 6. *Quorum sensing* en *B. japonicum* (González, J. E., Marketon M. M., 2003).

Algunos trabajos mostraron que los genes *nod* parecen ser reprimidos en altas densidades celulares, sugiriendo un fenómeno de *quorum sensing*, pero a la fecha no se ha encontrado evidencia de producción de AHL. Este control dependiente de la densidad de población parece estar mediado por una molécula señal extracelular llamada “factor de densidad celular” (CDF). La estructura química del CDF fue elucidada recientemente y también se lo designa como bradióxetina. Esta molécula tiene una estructura similar a ciertos antibióticos y sideróforos. Se encontró que la síntesis de bradióxetina es regulada por el hierro, con una producción máxima en condiciones de bajo hierro (González, J. E., Marketon M. M., 2003).

Trabajos recientes revelaron que algunos organismos eucariotas son capaces de interferir con la comunicación bacteriana por la producción de moléculas señal, que interactúan con el sistema bacteriano de *quorum sensing*. Tales compuestos que interfieren el *quorum sensing* (QSI) han sido extensamente investigados por su potencial uso como agentes de control microbiano (González J. E., Keshavan N. D., 2006).

El proceso de nodulación

La infección de la raíz por los rizobios, es un proceso con varias etapas, que se inicia por una serie de eventos pre-infección en la *rizósfera* (parte del suelo inmediata a la raíz). Los rizobios responden por quimiotaxis positiva a los exudados de la raíz de la planta y se mueven hacia sitios localizados en la raíz de la leguminosa. Las especies de *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* son atraídos por aminoácidos, ácidos dicarboxílicos presentes en los exudados y por componentes excretados en muy bajas concentraciones, tales como flavonoides (Fig. 7) (Van Rhlin P., Vanderleyden J., 1995).

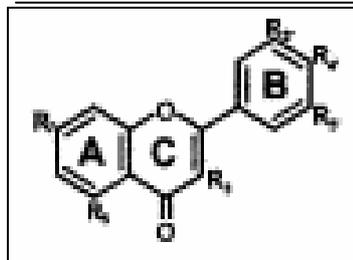


Fig. 7. Estructura general de un flavonoide

Si los compuestos flavonoides secretados por la planta son reconocidos por los rizobios, en estos últimos se inicia la transcripción de los genes de nodulación: *nod*, *nol* y *noe* (Quinto C., Cárdenas L., 2007). La transcripción de estos genes, requerida para la síntesis de los factores Nod, es mediada por las proteínas NodD, productos regulatorios de los genes *nodD* expresados constitutivamente (Cooper J. E., 2007). Los operones de los genes *nod* están precedidos por un promotor que contiene una secuencia consenso. A esta secuencia consenso se la llama caja de nodulación (caja *nod*) y es reconocida por la proteína NodD (Wang T. *et al.*, 2001). Una vez activada por los flavonoides, la proteína NodD modifica su conformación y permite que la ARN polimerasa encargada de la transcripción de los genes *nod* realice su función. Entonces, la traducción de los genes *nod*, da como resultado la producción de un conjunto de enzimas encargadas de la síntesis y secreción de los denominados factores de nodulación (factores Nod). Éstos son lipoquitooligosacáridos, que consisten de una cadena central de residuos N-

acetil-D-glucosamina con uniones β -1,4, en los cuales el azúcar terminal no reductor está N-acetilado con un ácido graso. Los factores Nod pueden estar modificados químicamente con grupos acetato, sulfato o carbonilo, o pueden tener diferentes azúcares, tal como arabinosa, manosa, fucosa o fucosa sustituidas (Fig. 8). La ubicación de estas sustituciones resulta en factores Nod específicos, que son reconocidos por una leguminosa particular (Hirsch A. M. *et al.*, 2001).

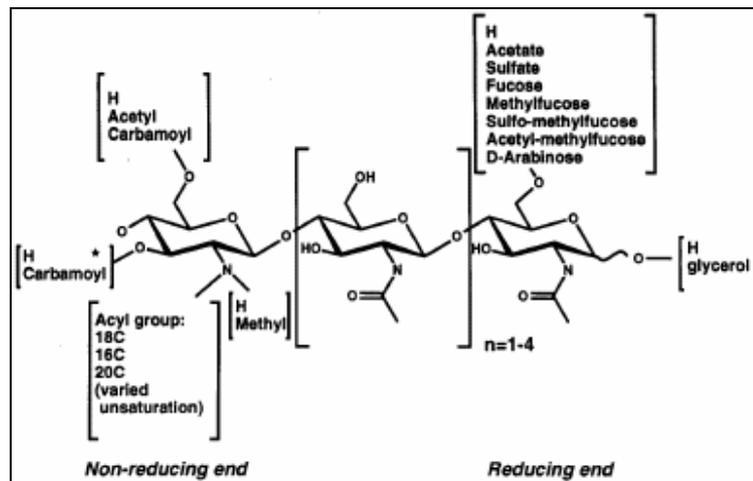


Fig. 8. Estructura general de los factores Nod (Long S. R., 1996).

Los factores Nod específicos secretados a la rizósfera por el rizobio, al ser reconocidos por la planta huésped, inducen a concentraciones del orden de picomolar (lo que indica una actividad mediada por receptor), una serie de cambios morfológicos y fisiológicos en los pelos radicales de la planta, que son células tubulares desarrolladas a partir de las células más externas de la raíz, que le permiten aumentar su superficie de absorción para adquirir nutrientes. Dentro de las respuestas inducidas, se encuentran cambios en los niveles del influjo y eflujo de ciertos iones como calcio, cloro, potasio y protones, a través de la membrana del pelo radical (produciendo su despolarización) y cambios en el pH intracelular, el cual se hace más alcalino en respuesta a los factores Nod. Además, existen rearrreglos en los microfilamentos de actina y de los microtúbulos (citoesqueleto) en respuesta a estos factores. También hay un incremento en la expresión de un gran número de genes de la planta, entre los que se incluyen aquellos

que codifican proteínas llamadas nodulinas, las cuales están involucradas en el desarrollo y funcionamiento del nódulo. Hay nodulinas tempranas que se expresan en las primeras etapas de la interacción simbiótica, antes de la fijación de nitrógeno, y nodulinas tardías que son transcritas una vez que se ha iniciado la fijación de nitrógeno. Los genes que codifican las nodulinas tempranas participan en la organogénesis del nódulo, iniciando con la formación de primordios. El primordio es el resultado de la división continua de las células del córtex, las cuales entran en un proceso de varias divisiones, dando lugar a la formación de un grupo de células a las cuales se les ha llamado primordio de nódulo. Todas las respuestas mencionadas se inducen en ausencia del rizobio (Long S. R., 1996).

Para que la bacteria se adentre en el pelo radical y llegue al córtex de la raíz, se requiere de la formación de una nueva estructura conocida como *hilo de infección*, el cual se forma mediante el estímulo continuo del rizobio y los factores Nod. El hilo de infección es una estructura tubular que se forma con material de la pared del pelo radical, previniendo de esta manera el contacto directo entre el citoplasma de la célula vegetal y el rizobio, y en consecuencia, la respuesta de defensa de la planta. Los pelos radicales son células con crecimiento polarizado, lo que significa que solamente crecen en su parte apical. El primer efecto morfológico producido por los factores Nod, previo a la formación del hilo de infección, es un hinchamiento en la zona apical del pelo que eventualmente da lugar a un enroscamiento del mismo, el cual ayuda a “atrapar” las bacterias localizadas en esta zona y generar un nuevo sitio de crecimiento, ahora hacia adentro del pelo, en forma de túnel (hilo de infección) que crece desde el ápice del pelo hasta la base del mismo. Así, las bacterias se desplazan dentro del hilo de infección e incluso se dividen en su trayectoria al interior del pelo; cuando éstas llegan finalmente a las células del primordio de nódulo, el cual se ha formado previamente, los rizobios son exocitados (liberados) del hilo de infección y al mismo tiempo son endocitados (atrapados) por las células vegetales que forman el primordio, dando lugar a la formación de estructuras membranales que contienen intracelularmente a las bacterias, llamadas *simbiosomas*. Cuando los rizobios se encuentran dentro de la célula vegetal sufren diversos cambios

morfológicos, esenciales para la nueva función que han adquirido. Estos cambios incluyen, entre otros, un aumento en el tamaño de las células y una diferenciación de la bacteria a un estado de *bacteroide*, en el cual ocurre la fijación del nitrógeno atmosférico. Durante este proceso, la expresión de las nodulinas tardías se incrementa, jugando un papel muy importante en la fisiología del nódulo; tal es el caso de la leghemoglobina, cuya función es la de mantener bajas las tensiones parciales de oxígeno, lo que crea un ambiente microanaeróbico que permite a su vez la actividad de la enzima nitrogenasa del bacteroide y la fijación biológica del nitrógeno atmosférico (Quinto C., Cárdenas L., 2007).

Junto con los factores Nod, otros componentes bacterianos han sido implicados en la adhesión bacteriana, formación y extensión del hilo de infección, liberación de la bacteria dentro de las células del nódulo y su diferenciación en bacteroides. Entre estos componentes tienen un rol relevante los polisacáridos bacterianos (Lepek V., D'Antuono A., 2005), y ciertas proteínas.

Componentes bacterianos adicionales requeridos para una simbiosis efectiva

Los rizobios sintetizan diferentes clases de polisacáridos que, también, son necesarios para la formación de nódulos simbióticamente efectivos: exopolisacáridos (EPS), polisacáridos capsulares (KPS), lipopolisacáridos (LPS) y glucanos cíclicos.

Atendiendo a su interacción con la célula microbiana, estas moléculas se pueden agrupar en tres categorías (Fig. 9):

- ✓ Moléculas que se encuentran en el espacio periplásmico: los cicloglucanos.
- ✓ Moléculas formando parte de la membrana externa: los LPS y los KPS.
- ✓ Moléculas que se encuentran normalmente en el exterior de la bacteria: los EPS. Pueden formar una capa más o menos estructurada, asociada a la

célula microbiana, en cuyo caso constituyen la cápsula o glicocáliz; en otras ocasiones pueden encontrarse completamente libres en el medio (Bedmar E. J. *et al.*, 2006).

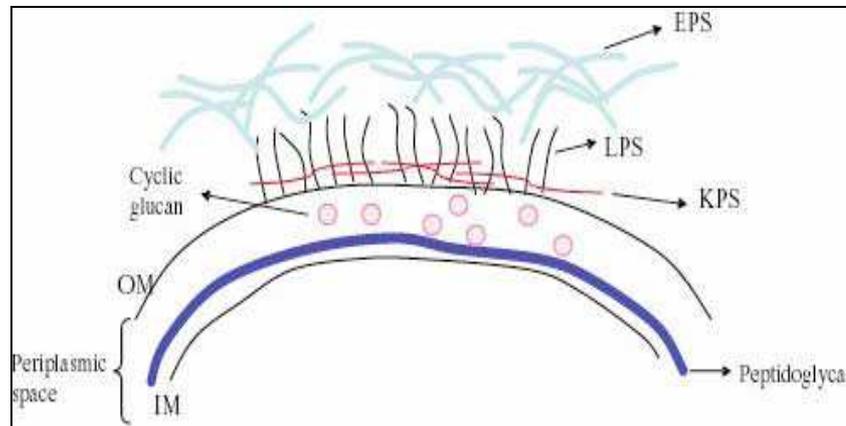


Fig 9. Representación esquemática de los polisacáridos bacterianos de superficie.

OM: outer membrane (membrana externa); IM: internal membrane (membrana interna)
(Lepek V., D'Antuono A., 2005).

- **EPS:** productos bacterianos extracelulares abundantes que aparecen libres en el medio, o que se asocian más o menos fuertemente a la célula bacteriana. Son heteropolisacáridos formados por una unidad repetitiva constituida por residuos de hexosas tal como glucosa, galactosa, manosa, ramnosa, ácido glucurónico y ácido galacturónico, con sustituyentes piruvil, acetil, succinil e hidroxibutanoil. Generalmente son iguales para todas las cepas de la misma especie. Las colonias de las cepas del género *Rhizobium* son mucosas por la cantidad de exopolisacáridos que producen, mientras que las de *Sinorhizobium* y de *Bradyrhizobium* no presentan una elevada mucosidad. No obstante, la cantidad de polisacáridos que se producen, así como su acetilación o metilación, dependen de la composición del medio de cultivo (Bedmar E. J. *et al.*, 2006).

Tradicionalmente, se pensó que tenían una función no específica en la adquisición de nutrientes, unión a las superficies, protección frente a estreses ambientales y patogénesis. Sin embargo, trabajos recientes mostraron que tienen un rol importante en el desarrollo del nódulo de la

raíz, en particular, en la invasión del nódulo en la simbiosis entre rizobios y leguminosas.

Una de la funciones atribuidas a los EPS, es la organización del citoesqueleto del pelo de la raíz, influenciando en la extensión del hilo de infección. Otros autores sugieren una función como modulador negativo de la respuesta de defensa de la planta (Lepek V., D'Antuono A., 2005).

Para *S. meliloti* fueron descritos dos EPS diferentes, el succinoglicano, EPS I y el galactoglicano, EPS II (Fig. 10).

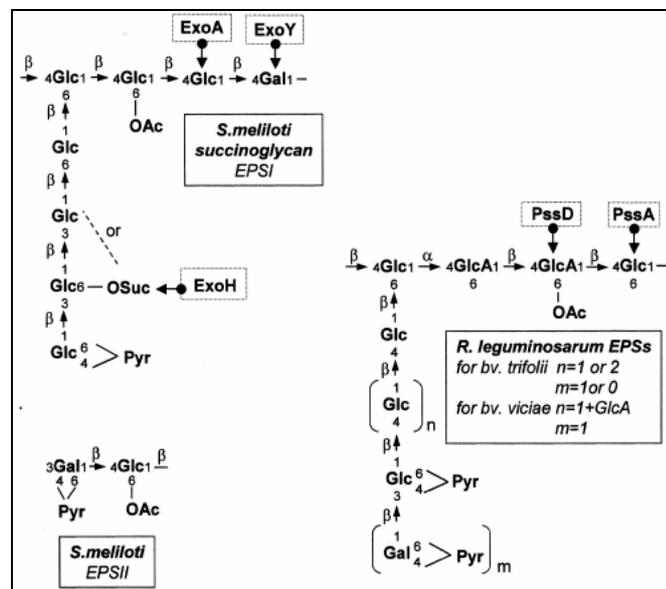


Fig. 10. Estructuras de algunos EPS de interés (Frayse N. *et al*, 2003).

Los EPS I, EPS II y KPS (de masa molecular baja) de *S. meliloti* fueron descritos como necesarios para la extensión del hilo de infección, aunque los tres no tienen la misma eficiencia en la promoción de este proceso. Los EPS II, que normalmente no se producen en vida libre (su producción se induce en escasez de fosfato), pueden sustituir al EPS I en aquellos mutantes incapaces de sintetizarlo, pero la nodulación óptima se obtiene cuando se encuentra presente el succinoglicano (Bedmar E. J. *et al.*, 2006).

- **KPS:** rodean a la bacteria y constituyen una matriz hidratada, la cual confiere resistencia a condiciones de desecación (entre otras funciones), a menudo encontradas en el ambiente de la rizósfera.

Estos polisacáridos 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*. La variabilidad estructural de estas moléculas, entre distintas cepas, es muy elevada. Parecen ser las principales responsables de la diversidad antigénica de *Sinorhizobium* y, a veces, una misma cepa puede producir más de un tipo de KPS (Bedmar E. J. *et al.*, 2006). La producción de uno o más KPS puede ser dependiente de las condiciones de cultivo de la célula.

Como los KPS están localizados directamente alrededor de la membrana bacteriana, su implicancia simbiótica comienza después del primer contacto entre el simbiote microbiano y el hospedador. También es posible que los KPS sean mediadores de tal contacto.

El rol de los polisacáridos antígeno-K ha sido estudiado extensivamente sólo en la simbiosis *S. meliloti* / alfalfa. Aparentemente, actúa de dos formas: una activa (señal) y otra pasiva. Primero, el antígeno-K puede estar implicado en la protección de la bacteria contra productos de defensa naturales de la leguminosa o frente a microorganismos, tal como fagos. El rol pasivo puede asignar al polisacárido capsular un rango de hospedador determinado, el simbiote correcto es resistente a las defensas de la planta hospedadora, mientras que otro rizobio no lo es. El rol activo del polisacárido antígeno-K parece afectar la promoción de la iniciación y desarrollo del hilo de infección (Frayse N. *et al.*, 2003).

- **LPS:** glucolípidos anfipáticos complejos, específicos de cada cepa. Estructuralmente pueden dividirse en tres dominios: lípido A, que ancla el LPS a la membrana plasmática, oligosacárido núcleo (ON), con KDO (ácido 3-deoxy-D-mano-2-octulosónico) y una cadena conocida como antígeno O (Fig. 11).

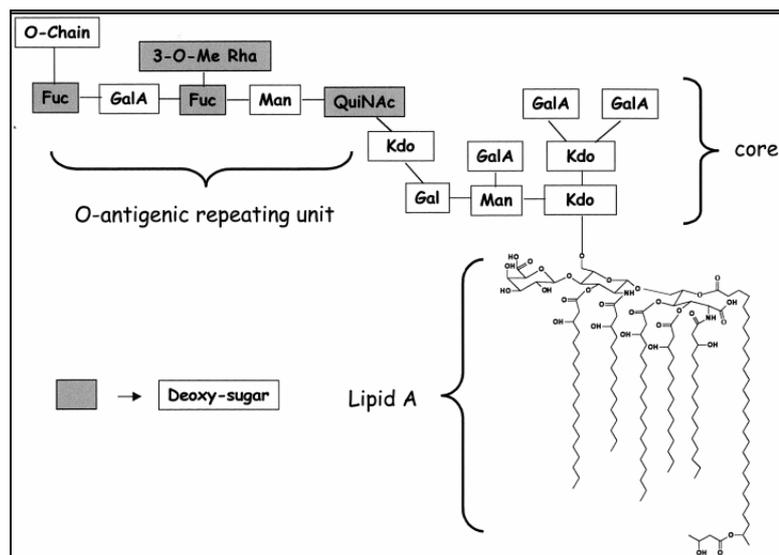


Fig. 11. Esquema general de los LPS (Frayse N. *et al.*, 2003).

Una característica común a todos los LPS rizobianos estudiados hasta la fecha es la presencia de un ácido graso de cadena muy larga.

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 (Bedmar E. J. *et al.*, 2006).

Respecto al ON, la primera estructura resuelta completamente, correspondió a la cepa CE3 de *R. etli*. La molécula 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 y otro de estos residuos ocupa la posición terminal en donde se une el antígeno O. Los grupos carboxilos de GalA (carga negativa) permiten unir las moléculas de LPS mediante cationes divalentes, y así estabilizar la membrana externa (Ormeño-Orillo E., 2005). Esta parte de la molécula presenta poca variación estructural entre los distintos rizobios.

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 (Glc), arabinosa (Ara) y manosa (Man), sin embargo es muy común la presencia de deoxihexosas y aminoazúcares.

El antígeno O puede no estar presente en algunas especies e incluso en algunas cepas de una misma especie. Cuando esto sucede, generalmente las colonias presentan una apariencia rugosa y el LPS producido se denomina LPS rugoso o LPS II, mientras que las moléculas con antígeno O son llamadas LPS liso o LPS I (Ormeño-Orillo E., 2005).

En general, las alteraciones en la estructura de los LPS, se traducen en la producción de nódulos inefectivos, o en el bloqueo del proceso de infección.

La evidencia actual es que los LPS participan en el proceso simbiótico tanto en la infección como en el mantenimiento del bacteroide, y que su papel fisiológico estaría relacionado con la protección de la bacteria ante las reacciones defensivas de la planta (por ejemplo: *S. meliloti* inhibe la producción de peróxido de hidrógeno inducida en *M. sativa*). Los cambios estructurales en los LPS serían importantes, o no, para el proceso simbiótico dependiendo de la naturaleza exacta de los cambios y del par rizobio-leguminosa que se considere (Bedmar E. J. *et al.*, 2006).

- **Glucanos cíclicos:** se encuentran fundamentalmente en el espacio periplásmico donde desempeñan un importante papel en la adaptación de la bacteria a condiciones hipoosmóticas. También aparecen, en menor concentración en el medio de cultivo, particularmente cuando la bacteria crece en condiciones hiperosmóticas. Hay dos tipos distintos de estos cicloglucanos:

- ✓ Glucanos cíclicos β -(1,2), o ciclosofarosas, de 15 a 30 residuos de glucosa, que pueden estar sustituidos por restos succinilo, fosfocolina o fosfoglicerol, lo que confiere un fuerte carácter aniónico. Se han encontrado en los géneros *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium*.

- ✓ Glucanos cíclicos con enlaces β -(1,3) y β -(1,6) en la misma molécula, y de unos 10-13 restos de glucosa. Se han encontrado en *Bradyrhizobium* y en *Azorhizobium*. También pueden presentar sustituyentes como la fosfocolina.

No se han descrito diferencias estructurales significativas de estos glucanos a nivel intragenérico, por lo que se puede descartar que tengan algún papel

en procesos de reconocimiento específico. El papel de los cicloglucanos en la simbiosis es complejo, y pueden desempeñar diferentes funciones, o ninguna, en distintos sistemas rizobio-leguminosa. En el caso de la simbiosis *B. japonicum*-soja, el papel de los β -(1,3), β -(1,6) glucanos es inhibir la respuesta defensiva de la planta ante la invasión bacteriana (Bedmar E. J. *et al.*, 2006). Algo similar ocurre en la simbiosis *S. meliloti*-alfalfa.

Electroforesis de lipopolisacáridos (LPS)

Los LPS se pueden estudiar mediante electroforesis vertical en presencia de detergentes como el dodecil sulfato de sodio (SDS). En estas condiciones las moléculas se separan por el tamaño, desplazándose más en el gel las moléculas más pequeñas. Dada la estructura de los LPS, sus diferencias en el tamaño se deben a diferencias en la longitud del antígeno O. Por consiguiente, las moléculas con antígeno más pequeño se mueven más en el gel, mientras que las moléculas con mayores antígenos O quedan más retenidas. Cuando se someten a electroforesis LPSs de tamaño variable, lo que implica la presencia de antígeno O de diversas longitudes posibles, se originan unos perfiles característicos formados por una serie de bandas en forma de escalera de mano. Los LPS rugosos originan en la electroforesis una única banda, de elevada movilidad mientras que los LPS lisos, con antígeno O, dan lugar al típico perfil con forma de escalera de mano.

En el perfil electroforético de los LPS de *Bradyrhizobium*, predominan las formas con antígeno O. Sin embargo en *Sinorhizobium* y en *Rhizobium* aparece una gran banda de elevada movilidad, a la que se denomina LPS-II, que se asemeja a la forma rugosa esto es, sin el antígeno O, y una pequeña serie de bandas de menor movilidad, generalmente minoritarias, y que se denominan LPS-I. El LPS-I de *S. meliloti* corresponde a la agregación de moléculas de LPS de tipo rugoso, esto es, sin el antígeno O, que al formar agregados presentan menor movilidad electroforética. En este caso, cada

peldaño de la escalera correspondería a un diferente estado de agregación. El análisis electroforético de los LPS se ha empleado, entre otras cosas, para buscar alteraciones de estas moléculas bajo diferentes condiciones de crecimiento, como salinidad, por ejemplo. El problema de estas aproximaciones es que los cambios en el perfil de los LPS no se pueden relacionar con modificaciones estructurales de los mismos, por lo que las observaciones se quedan a un nivel meramente fenomenológico y son de difícil interpretación (Bedmar E. J. *et al.*, 2006).

El presente trabajo de tesina se enmarca en el proyecto de investigación N° 70 del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, titulado “*Quorum sensing* como componente de regulación de la simbiosis rizobio-leguminosa, en cultivos con diferente densidad celular”.

HIPÓTESIS

La hipótesis de este trabajo es que los distintos niveles de densidad celular alcanzados por cultivos rizobianos, inducirían una respuesta fisiológica diferente, en relación con la síntesis de componentes bacterianos, tales como exopolisacáridos (EPS), polisacáridos capsulares (KPS), lipopolisacáridos (LPS) y proteínas totales.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es: conocer si las densidades celulares alcanzadas por los cultivos rizobianos en diferentes puntos de la curva de crecimiento afectan la producción de componentes de importancia para el establecimiento de la simbiosis tales como EPS, KPS, LPS y proteínas totales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron las siguientes cepas: *Bradyrhizobium japonicum* E-109 y *Sinorhizobium meliloti* B-399, cedidas gentilmente por el Ingeniero Agrónomo Alejandro Peticari del IMyZA, INTA Castelar.

Medios de cultivo

Para los recuentos en placa y la conservación de las distintas cepas se utilizó el medio de cultivo YEM indicado en la tabla 1:

Componentes	Concentración
Manitol	10 g / L
KH ₂ PO ₄	0,5 g / L
MgSO ₄	0,2 g / L
NaCl	0,1 g / L
Extracto de levadura	0,4 g / L
Agar	15 g / L
Rojo Congo (0,25 %)	10 mL / L

PH del medio: 6,8-7

Tabla 1: Composición del medio de cultivo YEM, utilizado para el desarrollo y conservación de las distintas cepas.

Los medios de cultivo utilizados para los ensayos de selección de medios se muestran en las siguientes tablas:

- Medio mínimo MSM (Brown y Dilworth, 1975):

Componentes	Concentración
Solución stock A	50 mL / L
Solución stock B	0,5 mL / L
Fuente de N ₂	2 mL / L
Buffer HEPES	4,766 g / L

Tabla 2: Composición del medio mínimo MSM utilizado para ensayos de selección de medios.

Fuente de N₂ (solución de NH₄Cl 10 mM en el medio).

Fuentes de carbono: Sacarosa o Manitol, concentración 10 mM en el medio.

Para preparar medio sólido se agregó agar en concentración 15 g / L.

pH del medio: 6,8-7.

Solución stock de sales (A):

Componentes	Concentración
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,25 g / L
NaCl	0,2 g / L
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,02 g / L
K ₂ HPO ₄	0,05 g / L

Tabla 3: Composición de la solución stock A.

Solución stock de vitaminas y minerales (B):

Componentes	Concentración
FeEDTA	15 g / L
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0,23 g / L
H ₃ BO ₃	0,25 g / L
MnSO ₄ · H 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

Tabla 4: Composición de la solución stock B.

- Medio mínimo M9 (Sambrook J. *et al.*, 1989):

Componentes	Concentración
Solución de sales 5X	200 mL / L
MgSO ₄	0,493 g / L
CaCl	0,015 g / L
Fuente de C	20 mL de una Sc. al 20%

Tabla 5. Composición del medio mínimo M9.

Solución de sales 5X:

Componentes	Concentración
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	64 g / L
KH ₂ PO ₄	15 g / L
NaCl	2,5 g / L
NH ₄ Cl	5 g / L

Tabla 6. Composición de la solución de sales 5X del medio M9.

- Medio rico 20 E (Werner D. *et al.*, 1975):

Componentes	Concentración
KH ₂ PO ₄	86 mg / L
K ₂ HPO ₄	87 mg / L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370 mg / L
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	73,5 mg / L
KNO ₃	506 mg / L
FeSO ₄ · H ₂ O	6,95 mg / L
EDTA (di sódico)	9,3 mg / L
NaMoO ₄ · 2 H ₂ O	4,84 mg / L
Glicerol	4,6 mL / L
Manitol	1,82 g / L
Extracto de levadura	2 g / L

pH del medio: 6,8-7

Tabla 7: Composición del medio de cultivo 20E, utilizado para ensayos de selección de medios.

Condiciones de operación

El cultivo de los microorganismos se realizó en escala de agitador rotatorio, a 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad, en cuarto estufa a 30 °C, hasta que se alcanzaron distintas densidades celulares.

Tanto el material utilizado como los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Las vitaminas y el NH₄Cl que se utilizaron para preparar el medio mínimo MSM se esterilizaron por filtración, con filtros Minisart de 0,22 µm y se agregaron, en condiciones de esterilidad, después que dicho medio se esterilizó en autoclave.

Para todas las determinaciones se realizaron dos ensayos independientes (uno para fase exponencial y otro para fase estacionaria de crecimiento) con tres repeticiones cada uno.

Conservación de microorganismos

Para cada cepa se prepararon 3 placas de Petri con medio YEM agarizado (tabla 1), las cuales fueron sembradas con un repique de tubos que contenían las diferentes cepas. En estas placas se obtuvieron colonias aisladas que se utilizaron para conservar los microorganismos, según las técnicas que se describen a continuación:

- **Agar inclinado** (conservación a corto plazo): se prepararon 5 tubos con medio YEM agarizado (tabla 1). La siembra se realizó por repique de las colonias aisladas obtenidas en las placas y se dejaron crecer en cuarto estufa durante diferentes tiempos, según el microorganismo. Cuando se alcanzó un buen crecimiento, se cubrió la tapa con papel film y se guardaron en heladera a 4 °C.
- **Congelación** (conservación a largo plazo): se prepararon dos inóculos por cepa, los cuales fueron sembrados con repique de las colonias aisladas obtenidas en las placas anteriormente mencionadas. Estos inóculos se cultivaron distintos tiempos, según el microorganismo. Se tomó una muestra para determinar la homogeneidad del cultivo mediante observación microscópica. Luego se colocó en tubos eppendorf, se agregó glicerol al 20% como crioprotector, se cubrió la tapa con papel film y se guardaron en freezer a -20 °C.

Determinación del crecimiento microbiano

Se tomaron muestras a distintos tiempos durante el crecimiento de los diferentes microorganismos, sobre las cuales se determinó el crecimiento microbiano por las técnicas que se describen a continuación:

- **Determinación de la densidad óptica:** 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 determinaciones se realizaron en celdas de vidrio. Como blanco se utilizó agua destilada. Las muestras se diluyeron cuando fue necesario. La densidad óptica se expresó como Unidades de Densidad Óptica (U. D. O).

- **Determinación del número de células viables:** método de dilución y plaqueo. Se realizaron diluciones seriadas de las muestras, hasta a obtener una dilución con una concentración entre $10^2 - 10^3$ células / mL. Con las diluciones así obtenidas se sembraron placas, a las que luego se le adicionó medio YEM agarizado. Éstas se colocaron en cuarto estufa a 30 °C durante un tiempo determinado, dependiendo de cada cepa y luego se contaron aquellas placas cuyo número de colonias estuvo entre 30 y 300. En este método se consideró que cada célula viable forma una colonia (Koch, A. L, 1981).

Procesamiento de los cultivos bacterianos

Se tomó, tanto en fase exponencial como en fase estacionaria de crecimiento de los diferentes microorganismos, el volumen de medio necesario para obtener entre $10^8 - 10^9$ células totales. Dicho volumen se centrifugó 10 minutos a 6 °C y 10000 rpm, en centrífuga refrigerada Hitachi Himac CR22G. El sobrenadante obtenido se utilizó para determinar exopolisacáridos (EPSs). El pellet se resuspendió en 10 mL de NaCl 0,5 M, se agitó vigorosamente en vórtex durante 1 minuto y se centrifugó a velocidad máxima otros 10 minutos, en centrífuga Rolco modelo 2036. Este segundo sobrenadante se utilizó para determinar polisacáridos capsulares (KPSs). El nuevo pellet se resuspendió en 2 mL de agua Mili Q, de los cuales 1 mL se utilizó para determinar lipopolisacáridos (LPSs) y el otro mL se utilizó para determinar proteínas celulares totales.

Determinación de exopolisacáridos (EPSs)

Para determinar el contenido de EPS en las muestras se utilizó el protocolo descrito por Skorupska A. *et al.* (1985).

Se colocaron en tubos falcon 10 mL del sobrenadante (obtenido como se describió en el apartado anterior), se adicionaron 30 mL de etanol al 95 % frío (proporción 1 : 3 de muestra / alcohol) y se dejó toda la noche a -20°C . Luego, se transvasó todo el volumen a tubos de centrifuga Hitachi Himac CR22G y se centrifugó a 14000 rpm durante 25 minutos a una temperatura de 2°C . El pellet se dejó toda la noche en estufa a 37°C . Luego se resuspendió en 1,5 mL de buffer fosfato salino (ver Anexo I). Por último, se determinaron cuantitativamente las hexosas por el método de Antrona, y las proteínas en el pellet celular por el método de Bradford. Los resultados se expresaron como mg de hexosas / mg de proteínas.

Determinación de polisacáridos capsulares (KPSs)

Para determinar el contenido de KPS en las muestras se utilizó el protocolo descrito por Skorupska A. *et al.* (1985).

Se colocaron en tubos falcon 10 mL del sobrenadante (obtenido como se describió en el apartado: Procesamiento de cultivos bacterianos), se adicionaron 30 mL de etanol al 95 % frío (proporción 1:3 de muestra / alcohol) y se dejó toda la noche a -20°C . Luego se transvasó todo el volumen a tubos de centrifuga refrigerada Hitachi Himac CR22G y se centrifugó a 14000 rpm durante 25 minutos a una temperatura de 2°C . El pellet se dejó toda la noche en estufa a 37°C . Luego se resuspendió en 1,5 mL de buffer fosfato salino (ver Anexo I). Por último, se determinaron cuantitativamente las hexosas por el método de Antrona, y las proteínas en el pellet celular por el método de Bradford. Los resultados se expresaron como mg de hexosas / mg de proteínas.

Determinación de hexosas

Para determinar la concentración de hexosas se siguió el método de Antrona descrito por Dische (1962).

Se tomaron 0,5 mL de la solución problema y se colocó en hielo durante 10 minutos. Pasado este tiempo se agregaron 2,5 mL del reactivo de Antrona (ver Anexo I), por las paredes tratando que vaya al fondo sin mezclarse con la fase acuosa. Se mezcló con agitación enérgica y se colocó rápidamente 10 minutos en baño a 100 °C. Luego, se pasó a hielo durante 5 minutos, se estabilizó a temperatura ambiente otros 5 minutos y por último se midió absorbancia a 620 nm en espectrofotómetro Metrolab 1700 UV-Visible.

Se preparó un blanco, agregando 0,5 mL de agua en lugar de solución problema. También se realizó un tubo testigo con una solución de galactosa de 0,6 µg / µL.

A partir de una solución madre de galactosa, de concentración 2 mg / mL, se prepararon una serie de patrones para construir una curva patrón.

Extracción de lipopolisacáridos (LPSs)

Para realizar la extracción de los LPS se siguió el protocolo descrito por Hitchcock y Brown (1983).

En un tubo eppendorf se colocó 1 mL de muestra, se centrifugó en microcentrífuga a velocidad máxima 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 50µL de buffer lisis (ver Anexo I) y se calentó 10 minutos en baño a 100 °C (se pinchó la tapa del eppendorf para evitar que se genere presión en su interior y se destape). Pasado este tiempo se sacó del baño, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 10µL de Proteinasas K (ver Anexo I) y se incubó 1 hora en baño a 60 °C. Se retiró del baño, se estabilizó a temperatura ambiente y se centrifugó 15 minutos a velocidad máxima. Luego, se tomaron 50µL del sobrenadante, se colocaron en un nuevo eppendorf y se agregaron 100µL de buffer muestra (ver Anexo I). La muestra así obtenida se guardó en freezer hasta el momento de la siembra en el gel.

Electroforesis en geles de poliacrilamida para lipopolisacáridos (LPSs)

Para obtener el perfil de LPS en geles de poliacrilamida se siguió el protocolo descrito por Laemli (1970).

Se prepararon dos geles: el concentrador (o de apilamiento), que como su nombre lo indica, concentra la mezcla y el separador (o de corrida).

Antes de comenzar el armado de los geles, se limpiaron los vidrios con alcohol. Una vez secos se ajustaron con los soportes. Para probar que no hubiera pérdidas se agregaron unos mililitros de agua. Luego se descartó el agua y pasando un papel absorbente entre los vidrios se eliminó el agua remanente.

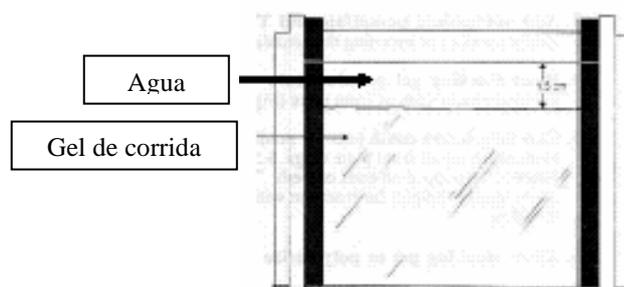
El gel separador se preparó según se muestra en la tabla 9:

Solución	Gel separador (T: 16,5%; C: 6%)*
Agua Mili Q	2,3 mL
Buffer del gel	3,32 mL
Glicerol	1,04 mL
Stock acril / bis	3,32 mL
APS (10%)	40 µL
TEMED (10%)	40 µL
Volumen Total	10mL

Tabla 8: Composición del gel separador para electroforesis de LPS (ver Anexo I).

* La concentración de acrilamida (% T) representa el 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.

Se colocó esta solución, cuidadosamente, entre los vidrios dejando 1,5 cm de distancia entre la solución de acrilamida y el vidrio de menor tamaño. Luego de añadido el gel separador, y previo a la polimerización, se agregó suavemente agua destilada para evitar que el borde del gel polimerice de manera irregular.

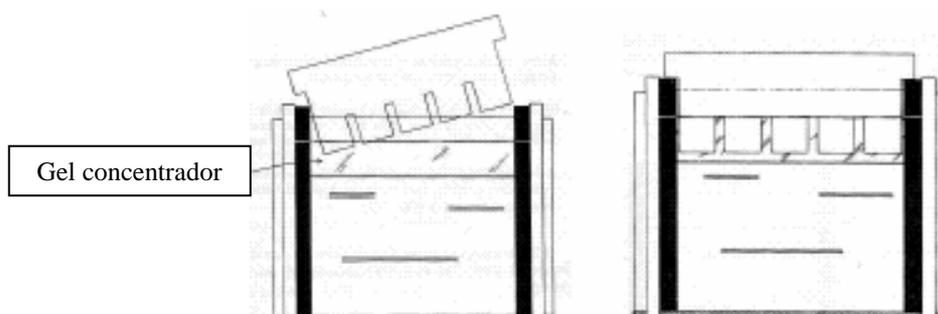


Una vez polimerizado el gel separador se descartó el agua. Luego se preparó el gel concentrador como se muestra en la tabla 10:

Solución	Gel concentrador (T: 4%; C: 3%)
Agua Mili Q	4,2 mL
Buffer del gel	1,5 mL
Stock acril/bis	0,5 mL
APS (10%)	150 μ L
TEMED (100%)	7,5 μ L
Volumen Total	6,36 mL

Tabla 9. Composición del gel concentrador para electroforesis de LPS (ver Anexo I).

Se agregó suavemente el contenido del gel concentrador sobre el gel separador ya polimerizado y se colocó cuidadosamente el peine de modo tal que no se formen burbujas.



Una vez polimerizado el gel concentrador se sacaron los vidrios del soporte y se colocaron en la cuba de electroforesis Biorad Miniprotean III. Luego se

agregó buffer cátodo (ver Anexo I) en la parte central de la cuba (entre los vidrios) y el buffer ánodo (ver Anexo I) se agregó en la parte exterior. A continuación, se quitó cuidadosamente el peine para que queden libres las calles del gel. Se enjuagaron con buffer cátodo y luego se sembraron con 10 μ L de muestra (tratadas como se describió anteriormente). Las condiciones de corrida fueron de 30mA (constante) durante 2 horas (o hasta que el frente de corrida se observó al final del gel).

Revelado de los geles de lipopolisacáridos (LPSs)

El revelado de los geles de LPS se realizó mediante tinción con nitrato de plata siguiendo el protocolo descrito por Hitchcock y Brown (1983).

Una vez finalizada la corrida, se retiró el gel de los vidrios, se sumergió en solución fijadora (ver Anexo I) y se dejó toda la noche. Luego se lavó durante 1 minuto con agua Mili Q y se colocó en solución oxidante (ver Anexo I) por 5 minutos. Seguidamente se lavó tres veces durante 10 minutos con agua Mili Q y se colocó en oscuridad la solución de teñido (ver Anexo I). Por último, se lavó 2 veces con agua MiliQ, se agregó solución reveladora (ver Anexo I) y se agitó hasta aparición de las bandas. Para detener la reacción se agregó ácido acético diluido (ver Anexo I).

Extracción de proteínas celulares totales

En un tubo eppendorf se colocó 1 mL de muestra y se centrifugó, en microcentrífuga Centrifuge 5414, a velocidad máxima 10 minutos. Se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió con 1 mL de NaCl 0,85 % (ver Anexo I). Luego se centrifugó 10 minutos en microcentrífuga a velocidad máxima. Se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió con 0,5 ml de tampón de extracción (ver Anexo I) y se centrifugó nuevamente por 10 minutos en microcentrífuga a velocidad máxima. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de tampón de sonicación (ver Anexo I). Luego se sometió la muestra a la acción de 3 pulsos de

sonicador KONTES Microsonic Cell Disrupter, de 30 segundos cada uno (manteniendo las muestras en hielo). A continuación, las muestras se centrifugaron 10 minutos en microcentrífuga. Del sobrenadante se tomaron 100 μL para cuantificar proteínas por el método de Bradford y el resto se guardó en freezer hasta el momento de la siembra en el gel.

Determinación de la concentración proteica

Para cuantificar la concentración de proteínas celulares totales en las muestras se siguió el protocolo descrito por Bradford, M. M. (1976), utilizando seroalbúmina bovina (BSA) como patrón proteico.

Del sobrenadante obtenido después de sonicar las muestras, se tomaron 100 μL y se colocaron en un nuevo eppendorf.

A partir de una solución madre de seroalbúmina bovina (ver Anexo I) se prepararon una serie de patrones con distintas concentraciones.

El tratamiento al que se sometió la muestra y los patrones (con sus respectivos triplicados) está indicado en la tabla 11:

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

Tabla 10: Tratamiento realizado a las muestras y patrones siguiendo el micro método de Bradford (ver AnexoI).

Una vez agregado el reactivo de Bradford, tanto las muestras como los patrones, se agitaron en vórtex y se dejaron reposar 10 minutos. A continuación, se midió absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en espectrofotómetro Metrolab 1700 UV-Visible de simple haz, contra blanco de reactivos.

Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para proteínas celulares totales

Para obtener el perfil de proteínas celulares totales mediante SDS-PAGE se siguió el protocolo descrito por Laemli (1970).

Se prepararon dos geles: el concentrador (o de apilamiento) y el separador (o de corrida).

Antes de comenzar el armado de los geles, se limpiaron los vidrios con alcohol. Una vez secos se ajustaron con los soportes. Para probar que no hubiera pérdidas se agregaron unos mililitros de agua. Luego se descartó el agua y pasando un papel secante entre los vidrios se eliminó el agua remanente.

El gel separador se preparo según se muestra en la tabla 12:

Solución	Gel separador (12%)
Stock acril/bis	10 mL
Agua Mili Q	8,375 mL
1.5 M Tris-HCl (pH: 8,8)	6,25 mL
SDS 10%	0,25 mL
APS 10%	125 µL
TEMED 100%	12,5 µL
Volumen Total	25 ml

Tabla 11: Composición del gel separador para electroforesis de proteínas celulares totales (ver Anexo I).

Se colocó esta solución, cuidadosamente, entre los vidrios dejando 1,5 cm de distancia entre la solución de acrilamida y el vidrio de menor tamaño. Luego de añadido el gel separador, y previo a la polimerización, se agregó suavemente agua destilada para evitar que el borde del gel polimerice de manera irregular.

Una vez polimerizado el gel separador se descartó el agua. Luego se preparó el gel concentrador como se muestra en la tabla 13:

Solución	Gel concentrador (4%)
Stock acril/bis	1,3 ml
Agua Mili Q	6,10 ml
0.5 M Tris-HCl (pH:6,8)	2,5 ml
SDS 10%	100 μ l
APS 10%	50 μ l
TEMED (100%)	10 μ l
Volumen Total	10 mL

Tabla 12: Composición del gel concentrador para electroforesis de proteínas celulares totales (ver Anexo I).

Se agregó suavemente el contenido del gel concentrador sobre el gel separador ya polimerizado y se colocó, cuidadosamente, el peine de manera tal que no se formen burbujas.

Una vez polimerizado el gel concentrador se sacaron los vidrios del soporte y se colocaron en la cuba de electroforesis Biorad Protean II. Luego se agregó buffer de corrida (ver Anexo I) tanto en la parte central de la cuba (entre los vidrios) como en la parte exterior. A continuación, se quitó cuidadosamente el peine para que queden libres las calles del gel, se enjuagaron con buffer de corrida y luego se sembró con jeringa Hamilton el volumen de muestra correspondiente a 100 μ g de proteína, diluída con la cantidad necesaria de buffer muestra (ver Anexo I). Las condiciones de corrida fueron de 200 volt (constante) durante 4 horas (o hasta que el frente de corrida se observó en la parte final del gel).

Revelado de los geles de proteínas celulares totales

El revelado de los geles de proteínas celulares totales se realizó mediante tinción con Coomasie Blue R-250.

Una vez que finalizó la corrida, se retiró el gel de los vidrios, se sumergió en solución de fijadora (ver Anexo I) y se dejó toda la noche. Luego se lavó con agua Mili Q, 3 veces durante 15 minutos y se colocó en solución

colorante (ver Anexo I) durante 2-3 hs. Por último se agregó solución decolorante (ver Anexo I) hasta que el fondo del gel apareció limpio.

Análisis estadístico de los resultados obtenidos

Para los resultados obtenidos en la determinación de EPS, KPS y concentración de proteínas celulares totales, en ambas cepas, se realizó un ensayo ANOVA de una entrada con un $\alpha = 0,05$, en el cual se plantea como hipótesis nula (H_0) que las varianzas son iguales por lo tanto las medias no difieren al nivel de α elegido y como hipótesis alternativa (H_1) se plantea que las varianzas son diferentes, por lo tanto las medias difieren al nivel de α elegido.

Para realizar los cálculos se utilizaron las siguientes ecuaciones:

- Varianza DENTRO de los grupos:
$$S^2_{dentro} = \frac{\sum S_j^2}{h}$$

S_j^2 : varianza de cada grupo de datos

h: número de tratamientos

- Varianza ENTRE los grupos:
$$S^2_{entre} = n \times S_m^2$$

n: número de datos en cada grupo

S_m^2 : varianza de todas las medias

- F calculado:
$$\frac{S^2_{entre}}{S^2_{dentro}}$$

- F crítico: se busca en tablas para ensayos de dos colas con un $\alpha = 0,05$, con (h-1) grados de libertad para el numerador y h (n-1) grados de libertad para el denominador.

Si el F calculado es menor que el F crítico se acepta H_0 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos de selección de medios de cultivo

Para llevar a cabo los ensayos de selección de medios de cultivo se decidió trabajar, en una primera etapa, con los medios mínimos MSM y M9 (tablas 3 y 6 respectivamente) utilizando diferentes fuentes de carbono, ya que en estos medios se logra una mayor reproducibilidad de los datos, además de eliminarse las interferencias que pueden presentarse por los componentes de los medios ricos.

Se realizaron dos ensayos independientes, con tres repeticiones para cada medio, utilizando como fuentes de carbono: manitol, glucosa o sacarosa para la cepa *S. meliloti* B-399, y manitol, glucosa o glicerol para la cepa *B. japonicum* E-109.

El crecimiento de los diferentes microorganismos se siguió con las técnicas de determinación del número de células viables, recuento en placa (UFC / mL) y determinación de la densidad óptica del cultivo (UDO), como se indica en Materiales y Métodos.

A partir de estos primeros ensayos se determinó que los medios mínimos en los cuales se lograba el mejor desarrollo de las diferentes cepas, fueron los siguientes: para *S. meliloti* B-399, el medio MSM con glucosa como fuente de carbono y para *B. japonicum* E-109, el medio MSM con manitol como fuente de carbono.

Los curvas de UFC / mL y UDO en función del tiempo de proceso, obtenidas para cada microorganismo se muestran a continuación:

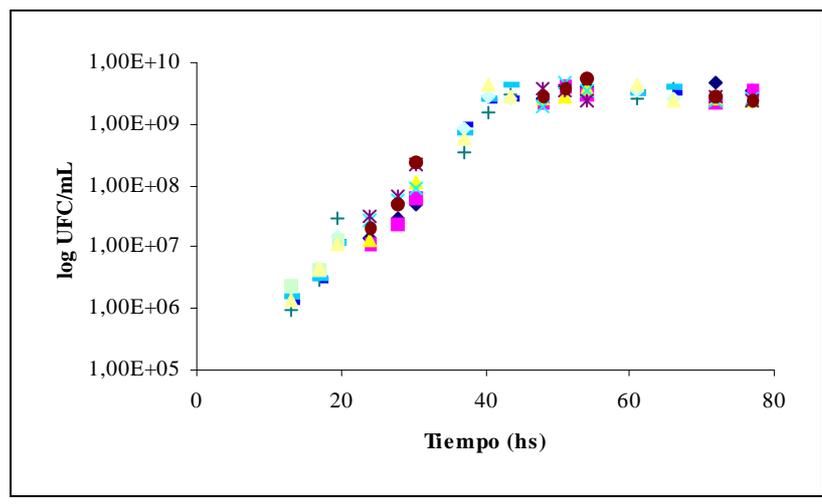


Fig. 12. Curva de crecimiento de *S. meliloti* B-399 desarrollada en el medio MSM glucosa.

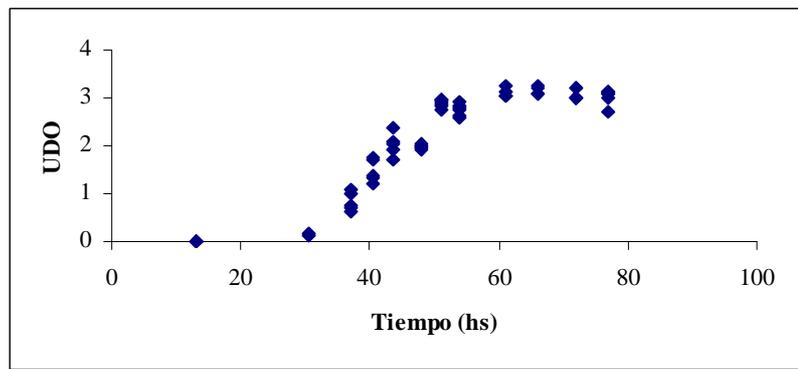


Fig. 13. Evolución de los valores de UDO para *S. meliloti* B-399 desarrollada en el medio MSM glucosa.

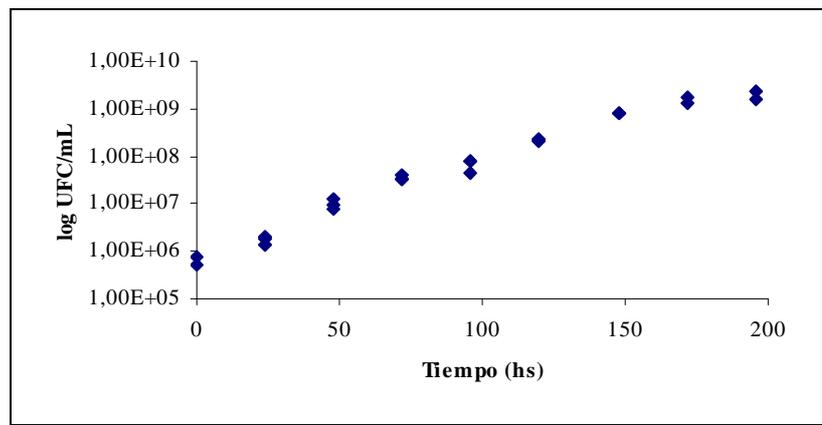


Fig. 14. Curva de crecimiento para *B. japonicum* E-109 desarrollada en el medio MSM manitol.

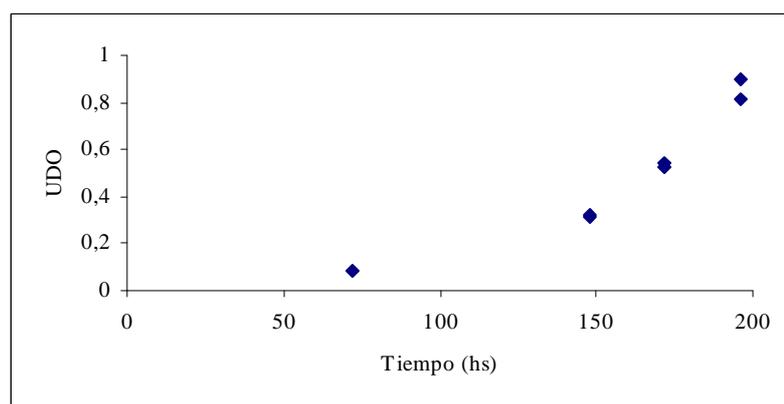


Fig. 15. Evolución de los valores de UDO para *B. japonicum* E-109 desarrollada en el medio MSM manitol.

A partir de estas curvas de crecimiento, se determinaron los tiempos de proceso en que se tomarían las muestras en una fase exponencial temprana (baja densidad celular) y una fase estacionaria (alta densidad celular), considerando que existiera, como mínimo, una diferencia de dos órdenes de magnitud en las concentraciones celulares.

A continuación se muestran los tiempos que se determinaron para la toma de muestras, los recuentos celulares promedio y UDO para cada cepa:

Cepa	Fase de crecimiento	Tiempo (hs)	UFC / mL	UDO
<i>B. japonicum</i> E-109	Exponencial	72	3,53E+07	0,086
	Estacionaria	196	1,95E+09	0,825
<i>S. meliloti</i> B399	Exponencial	12	1,00E+06	0,010
	Estacionaria	48	2,00E+09	3,000

Tabla 13. Determinación de los tiempos de proceso de diferentes fases de crecimiento, con su correspondiente concentración celular, para cada una de las cepas en estudio.

Al desarrollar nuevamente las cepas en estos medios mínimos y utilizarlos para ensayos preliminares de extracción y realización de perfiles de LPS y proteínas celulares totales, la densidad celular alcanzada no fue suficiente para el desarrollo, satisfactorio, de las técnicas electroforéticas. Por esto, se decidió plantear una segunda etapa de ensayos, desarrollando las cepas en el medio de cultivo rico 20E (tabla 8).

Se realizaron nuevamente las curvas de crecimiento, mediante las determinaciones de UFC / mL y UDO en función del tiempo de proceso. A continuación se muestran las curvas obtenidas para *S. meliloti* B-399 y *B. japonicum* E-109:

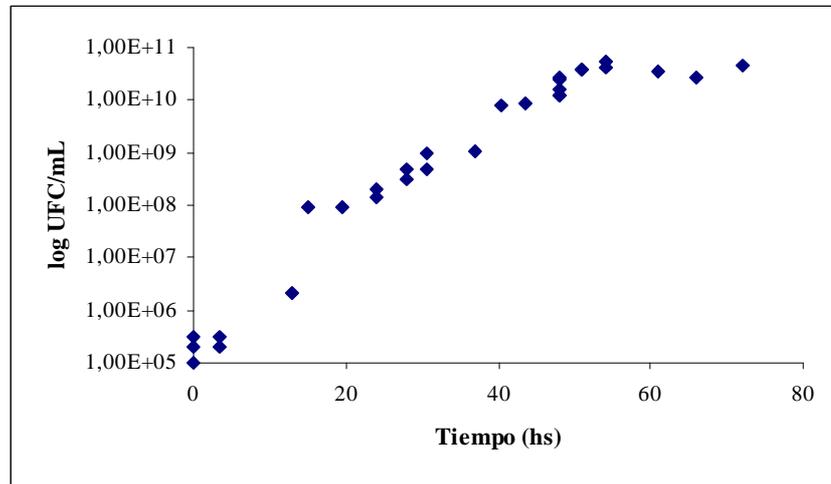


Fig. 16. Curva de crecimiento para *S. meliloti* B-399 desarrollada en medio rico 20E.

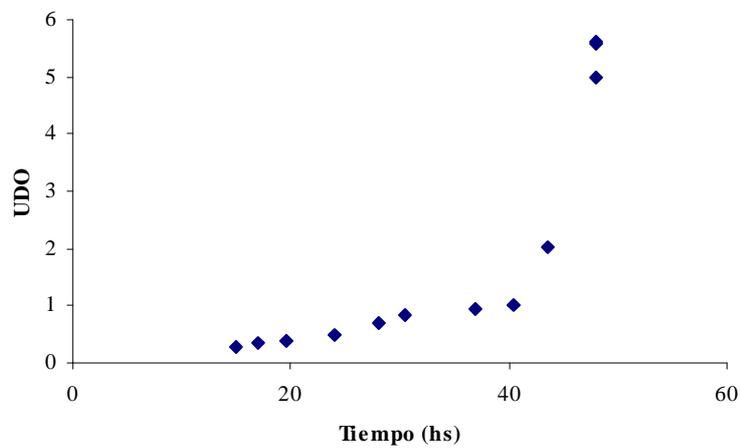


Fig. 17. Evolución de los valores de UDO para *S. meliloti* B-399 desarrollada en medio rico 20E.

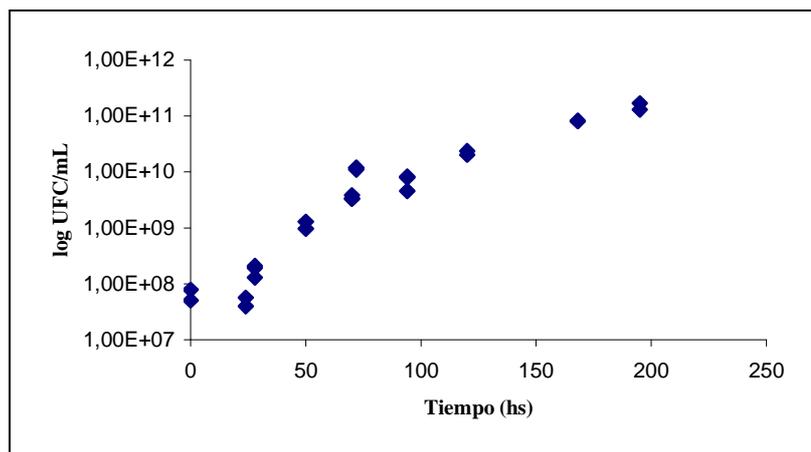


Fig. 18. Curva de crecimiento para *B. japonicum* E-109 desarrollada en el medio rico 20E.

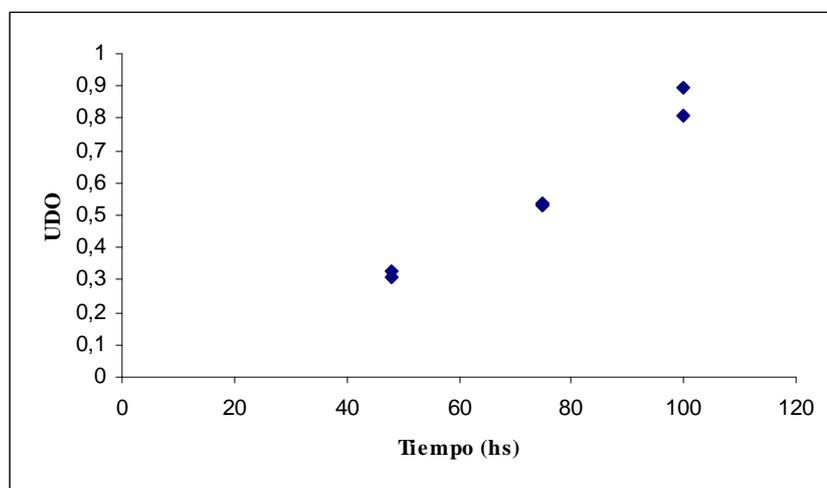


Fig. 19. Evolución de los valores de UDO para *B. japonicum* E-109 desarrollada en medio rico 20E.

En base a los datos obtenidos, se determinaron los tiempos de proceso en que se tomarían las muestras, en las diferentes fases de crecimiento, teniendo en cuenta las mismas consideraciones mencionadas anteriormente. Al realizar nuevos ensayos preliminares de extracción y perfiles de LPS y proteínas celulares totales, se logró un buen desarrollo de las técnicas electroforéticas. También se observó una disminución de los tiempos de proceso utilizando este medio. Por lo expuesto anteriormente, se decidió trabajar con el medio rico 20E para desarrollar los ensayos posteriores. En la tabla mostrada a continuación, se presentan los distintos tiempos de proceso en que se tomaron las muestras, los recuentos celulares promedios y las UDO promedio obtenidos para cada cepa:

Cepa	Fase de crecimiento	Tiempo (hs)	UFC / mL	UDO
<i>B. japonicum</i> E-109	Exponencial	24	4,80E+07	0,210
	Estacionaria	72	1,16E+10	0,528
<i>S. meliloti</i> B399	Exponencial	12	4,36E+08	0,335
	Estacionaria	48	1,89E+10	5,393

Tabla 14. Determinación de los tiempos de proceso de diferentes fases de crecimiento, con su correspondiente concentración celular, para cada una de las cepas en estudio.

Determinación de parámetros cinéticos de crecimiento celular

Utilizando los datos de recuento celular obtenidos para cada microorganismo en las diferentes fases de crecimiento en que se tomaron las muestras, se determinaron los parámetros cinéticos de crecimiento: Velocidad Específica de Crecimiento (μ) y Tiempo de Generación (θ_g). Las ecuaciones utilizadas para realizar dichos cálculos fueron las siguientes:

- $\ln X = \ln X_0 + \mu \cdot \Delta t$ Donde X es la concentración de células en un tiempo t, X_0 es la concentración inicial de células, μ es la velocidad específica de crecimiento y Δt es la diferencia entre los tiempos en que se obtuvieron X y X_0 .
- $$\theta_g = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Los resultados obtenidos para cada uno de los microorganismos se muestran a continuación:

- $S. meliloti$ B399: $\mu = 0,250 \text{ h}^{-1}$
 $\theta_g = 2,772 \text{ h}$

- *B. japonicum* E-109: $\mu = 0,137 \text{ h}^{-1}$
 $\theta_g = 5,058 \text{ h}$

Estos parámetros permiten realizar una caracterización cinética del microorganismo e indican un determinado estado fisiológico para las condiciones de trabajo. En base a los resultados obtenidos, se caracteriza a *S. meliloti* B-399 como cepa de crecimiento rápido y a *B. japonicum* E-109 como cepa de crecimiento lento, si bien, ésta tiene mayor velocidad de crecimiento que *S. meliloti* B-399, según lo indican los valores de velocidad específica de crecimiento (μ).

Determinación de exopolisacáridos (EPS) y polisacáridos capsulares (KPS)

Las determinaciones de EPS y KPS, se realizaron con el objetivo de estudiar si existían diferencias en relación a las distintas densidades celulares alcanzadas en las etapas consideradas de la curva de crecimiento.

Para estas determinaciones, se realizaron dos ensayos independientes, con tres repeticiones para cada uno, y las concentraciones de estos componentes en las distintas muestras, se determinaron mediante la técnica de Antrona y por peso seco, descritas en Materiales y Métodos.

Para llevar a cabo la técnica de Antrona, en principio se realizó una curva de calibración, con patrones conteniendo distintas concentraciones conocidas de galactosa. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

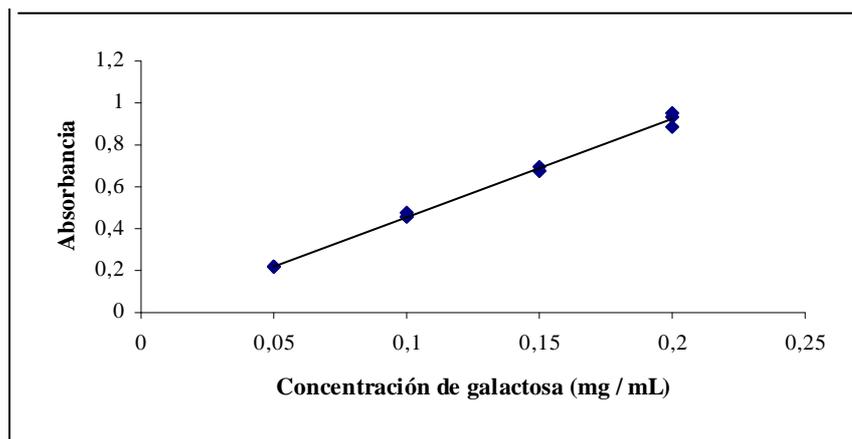


Fig. 20. Curva de calibración con patrones conteniendo diferentes concentraciones de galactosa, utilizada para la técnica de Antrona.

Al realizar la regresión lineal sobre los valores de los diferentes patrones, se obtuvo la siguiente ecuación y su valor de R^2 :

$$y = 4,6947x - 0,0148 \quad (1)$$

$$R^2 = 0,9963$$

Ingresando en la ecuación (1) los valores de absorbancia correspondientes a las muestras, se obtuvieron las concentraciones de EPS y KPS presentes en cada una de ellas, expresándolas como los miligramos de hexosas con respecto a los miligramos de proteínas que contenían las diferentes muestras (determinado por el micro método de Bradford). El peso seco obtenido para cada muestra, también se expresó en función de la concentración proteica.

- **Concentraciones de EPS y KPS para la cepa *B. japonicum* E-109**

A continuación se presentan los valores de peso seco y concentración promedio de EPS y KPS (respectivamente), cada una con sus respectivos desvíos, obtenidos para la cepa *B. japonicum* E-109, en las distintas fases de crecimiento:

	Fase Exponencial	Fase Estacionaria
Peso seco de EPS (mg de hexosas/mg de proteínas)	3,831 ± 1,142	9,955 ± 1,008
Concentración de EPS (mg de hexosas/mg de proteínas)	3,332 ± 0,607	25,172 ± 4,846

Tabla 15. Valores obtenidos en la determinación de EPS para la cepa *B.japonicum* E-109. Los datos presentados corresponden a los valores promedios con sus respectivos desvíos.

	Fase Exponencial	Fase Estacionaria
Peso seco de KPS (mg de hexosas/mg de proteínas)	2,661 ± 0,285	3,137 ± 0,607
Concentración de KPS (mg de hexosas/mg de proteínas)	2,210 ± 0,478	2,670 ± 0,629

Tabla 16. Valores obtenidos en la determinación de KPS para la cepa *B.japonicum* E-109. Los datos presentados corresponden a los valores promedios con sus respectivos desvíos.

Estos resultados indican que hay un aumento en la concentración de EPS y KPS en fase estacionaria respecto de fase exponencial de crecimiento, siendo mayor en el caso de los EPS.

- **Concentraciones de EPS y KPS para la cepa *S. meliloti* B-399**

A continuación se presentan los valores de peso seco y concentración promedio de EPS y KPS (respectivamente), cada una con sus respectivos desvíos, obtenidos para la cepa *S. meliloti* B-399, en las distintas fases de crecimiento:

	Fase Exponencial	Fase Estacionaria
Peso seco de EPS (mg de hexosas/mg de proteínas)	2,315 ± 0,044	4,647 ± 0,682
Concentración de EPS (mg de hexosas/mg de proteínas)	1,024 ± 7,07E-04	11,209 ± 1,485

Tabla 17. Valores obtenidos en la determinación de **EPS** para la cepa *S.meliloti* B399. Los datos presentados corresponden a los valores promedios con sus respectivos desvíos.

	Fase Exponencial	Fase Estacionaria
Peso seco de KPS (mg de hexosas/mg de proteínas)	2,304 ± 0,374	3,480 ± 0,242
Concentración de KPS (mg de hexosas/mg de proteínas)	0,126 ± 0,046	0,338 ± 0,086

Tabla 18. Valores obtenidos en la determinación de **KPS** para la cepa *S.meliloti* B399. Los datos presentados corresponden a los valores promedios con sus respectivos desvíos.

En base a estos resultados, se puede observar un comportamiento similar a la cepa *B. japonicum* E-109, mostrando también un aumento en la concentración de EPS y KPS en fase estacionaria respecto de fase exponencial de crecimiento, siendo mayor en el caso de los EPS.

Análisis estadístico de los resultados de exopolisacáridos (EPS) y polisacáridos capsulares (KPS)

Para determinar si los valores de concentración de EPS y KPS, obtenidos en fase exponencial eran significativamente diferentes de los obtenidos en fase estacionaria, se realizó un ensayo ANOVA de una entrada con un $\alpha = 0,05$ y un $n=3$. Los resultados obtenidos del análisis de los datos de peso seco de EPS, para las dos cepas, se muestran en la siguiente tabla:

Cepa	Varianza Dentro	Varianza Entre	F calculado	F crítico
<i>B. japonicum</i> E-109	1,16	56,24	48,45	12,22
<i>S. meliloti</i> B399	0,23	8,16	34,95	

Tabla 19. Resultados del ensayo ANOVA para los datos obtenidos en las determinaciones de peso seco de EPS.

En ambos casos el F calculado es mayor que el F extraído de tabla por lo tanto se rechaza H_0 y se acepta H_1 , lo que significa que las medias difieren significativamente al nivel de α elegido.

En la tabla siguiente se muestran los resultados del ensayo ANOVA aplicado a los valores de concentración de EPS obtenidos con el método de Antrona:

Cepa	Varianza Dentro	Varianza Entre	F calculado	F crítico
<i>B. japonicum</i> E-109	11,93	715,52	59,99	12,22
<i>S. meliloti</i> B399	1,25	92,56	73,86	38,51

Tabla 20. Resultados del ensayo ANOVA aplicado a los datos de concentración de EPS obtenidos por el método de Antrona.

Nuevamente, en ambos casos el F calculado es mayor que el F extraído de tabla por lo tanto se rechaza H_0 y se acepta H_1 , lo que significa que las medias difieren significativamente al nivel de α elegido.

Todos los resultados anteriores indican que hay diferencia significativa en la concentración de EPS, en fase exponencial respecto de fase estacionaria de crecimiento, para las dos cepas.

A continuación se presentan los resultados obtenidos al aplicar el ensayo ANOVA a los datos de concentración de KPS obtenidos por determinación de peso seco y por el método de Antrona, respectivamente:

Cepa	Varianza Dentro	Varianza Entre	F calculado	F crítico
<i>B. japonicum</i> E-109	0,22	0,34	1,51	12,22
<i>S. meliloti</i> B399	9,93 E -02	2,07	20,86	

Tabla 21. Resultados del ensayo ANOVA para los datos obtenidos en las determinaciones de peso seco de KPS.

Cepa	Varianza Dentro	Varianza Entre	F calculado	F crítico
<i>B. japonicum</i> E-109	0,31	0,32	1,02	12,22
<i>S. meliloti</i> B399	4,78 E -03	6,78 E -02	14,19	

Tabla 22. Resultados del ensayo ANOVA aplicado a los datos de concentración de KPS obtenidos por el método de Antrona.

En este caso para la cepa *B. japonicum* E-109 los F calculado, tanto para los datos de peso seco como para los del método de Antrona, son menores que el F crítico, por lo tanto se acepta H_0 , lo que significa que las medias no difieren significativamente al nivel de α elegido.

En cambio, para *S. meliloti* B399 el F calculado es mayor que el F crítico por lo tanto se rechaza H_0 y se acepta H_1 , lo que significa que las medias difieren significativamente al nivel de α elegido. Esto implica que hay diferencia significativa en los valores de concentración de KPS obtenidos en fase exponencial respecto de fase estacionaria de crecimiento.

Las diferencias observadas en las concentraciones de EPS y KPS, al comparar los resultados obtenidos en fase exponencial (baja densidad

celular) y estacionaria (alta densidad celular) de crecimiento, se relaciona con lo planteado por Sánchez-Contreras *et al* (2007), respecto a que los rizobios utilizan el sistema de *quorum sensing* para regular la producción de polisacáridos superficiales, entre otras cosas.

Determinación de los perfiles de lipopolisacáridos (LPS)

A fin de estudiar si existía alguna relación entre la densidad celular alcanzada en distintos puntos de la curva de crecimiento y la composición de los LPS en las células, se realizaron los perfiles de bandas para cultivos de las diferentes cepas , en las distintas fases de crecimiento.

Para dicha determinación, se realizaron dos ensayos independientes, con tres repeticiones para cada uno. Una vez realizada la extracción de LPS, según la metodología indicada, se corrieron las muestras en el gel de poliacrilamida, como se indica en Materiales y Métodos. Luego, se revelaron los geles mediante la técnica del nitrato de plata (descrita en el apartado Materiales y Métodos) para poder visualizar las bandas.

- **Perfil de LPS para la cepa *B. japonicum* E-109**

El perfil de bandas obtenido para las muestras de la cepa *B. japonicum* E-109, se muestra en la figura siguiente:

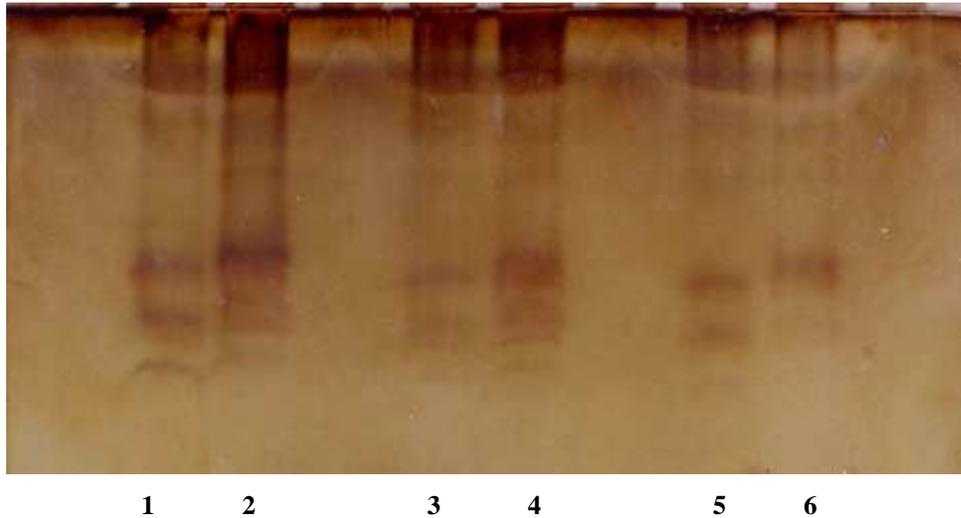
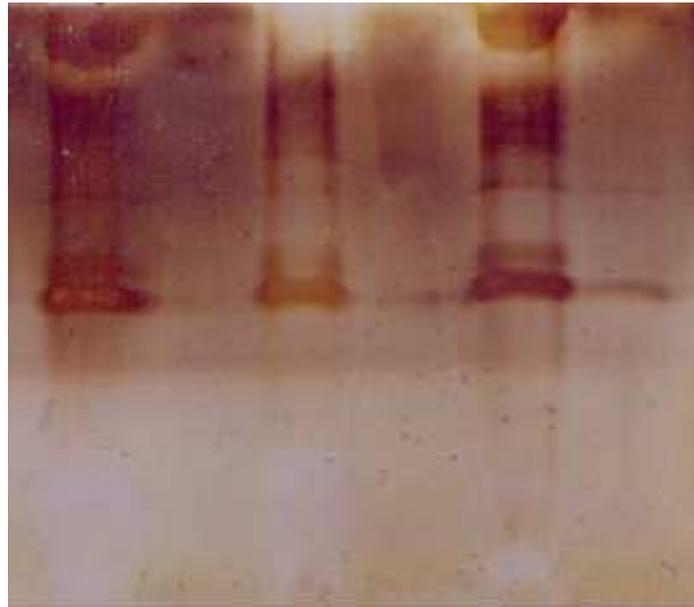


Fig. 21. Perfil de bandas de LPS para la cepa *B. japonicum* E-109. Calles 1, 3 y 5 corresponden a muestras de cultivos en fase exponencial; calles 2, 4 y 6 corresponden a muestras de cultivos en fase estacionaria.

En esta figura se puede ver, que las muestras en fase estacionaria presentan mayor concentración de LPS respecto a las de fase exponencial, por lo que las bandas se ven más oscuras. También se observa que las bandas correspondientes a las muestras en fase estacionaria se desplazaron menos en el gel que las correspondientes a la fase exponencial. Por otra parte, en fase estacionaria se ve mayor separación de bandas respecto de la fase exponencial.

- **Perfil de LPS para la cepa *S. meliloti* B-399**

A continuación se muestra el perfil de bandas de LPS obtenido para las muestras de *S. meliloti* B-399:



1 2 3 4

Fig. 22. Perfil de bandas de LPS para la cepa *S. meliloti* B399. Calles 1 y 3 corresponden a muestras de cultivos en fase exponencial; calles 2 y 4 corresponden a muestras de cultivos en fase estacionaria.

En este caso, se puede ver una pequeña variación en el perfil de bandas obtenido en las distintas fases, mostrando mayor separación en la fase estacionaria. Además se observa diferente intensidad, lo que indicaría una variación en la concentración de los LPS en las distintas fases.

Los resultados obtenidos cuando se comparan las figuras 21 y 22, coinciden con lo planteado por Bedmar *et al* (2006), respecto a las características de los perfiles electroforéticos de las cepas pertenecientes a los géneros *Bradyrhizobium* y *Sinorhizobium*. Estos autores plantean que en las cepas del género *Bradyrhizobium* predominan las formas de LPS con antígeno O de diferentes longitudes, por lo que se obtiene un perfil de bandas con una forma que se asemeja al de una escalera de mano. En cambio, para las cepas del género *Sinorhizobium* se observa una banda de mayor tamaño y movilidad que correspondería a los LPS rugosos y una serie de bandas más pequeñas y de menor movilidad que corresponderían a los LPS lisos.

Se puede ver para las dos cepas en estudio, que la etapa de crecimiento celular en la que se encuentra la bacteria, condiciona la composición de la capa de LPS de la célula.

Determinación de la concentración de proteínas celulares totales

Para los ensayos de determinación de la concentración de proteínas celulares totales, se realizaron dos ensayos independientes, con tres repeticiones para cada uno. La determinación de la concentración proteica en las distintas muestras se realizó mediante la técnica de Bradford, descrita en Materiales y Métodos. En principio se realizó una curva de calibración con patrones, conteniendo distintas concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA). La recta obtenida se muestra a continuación:

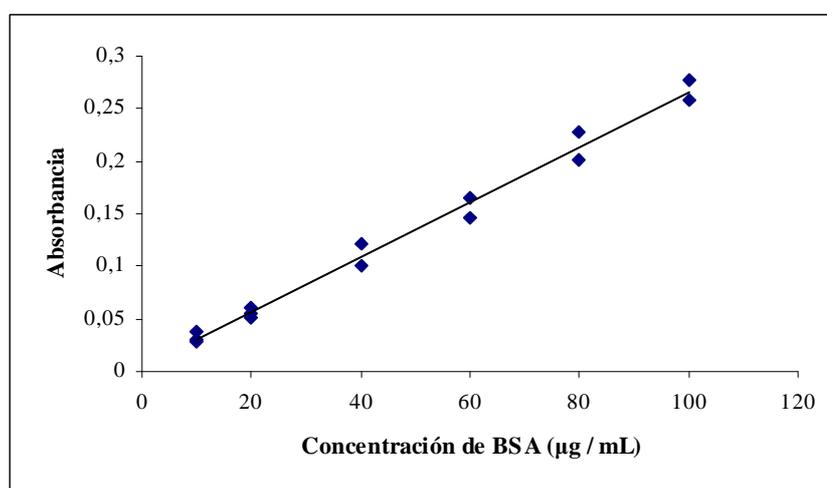


Fig. 23. Curva de calibración con patrones conteniendo diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina, para la determinación de la concentración proteica.

Al realizar la regresión lineal sobre los valores obtenidos para los patrones, se obtuvo la siguiente ecuación y su valor de R^2 :

$$y = 0,0026x + 0,0044 \quad (2)$$

$$R^2 = 0,9895$$

Ingresando en la ecuación (2) los valores de absorbancia correspondientes a las muestras, se obtuvieron las concentraciones de proteínas presentes en cada una de ellas, expresándolas como microgramos de proteínas por mililitro.

En la siguiente tabla se muestran, los resultados promedios obtenidos con sus respectivas desviaciones estándar, para ambas cepas:

Cepa	Fase Exponencial ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	Fase Estacionaria ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
<i>B. japonicum</i> E-109	22,201 \pm 2,255	171,387 \pm 20,176
<i>S. meliloti</i> B399	70,123 \pm 0,814	323,563 \pm 14,682

Tabla 23. Valores de concentración proteica obtenidos para cada cepa en las diferentes fases de crecimiento celular comparadas.

Estos resultados mostraron que hay diferencia en las concentraciones de proteína para las dos cepas en las diferentes fases de crecimiento comparadas.

Análisis estadístico de los resultados de concentración proteica

Para determinar si los valores de concentración proteica, obtenidos en fase exponencial eran significativamente diferentes de los de fase estacionaria, se realizó un ensayo ANOVA de una entrada con un $\alpha = 0,05$.

Los resultados para el análisis de los datos, para las dos cepas se muestran a continuación:

Cepa	Varianza Dentro	Varianza Entre	F calculado	F crítico
<i>B. japonicum</i> E-109	206,08	33384,69	161,99	12,22
<i>S. meliloti</i> B399	108,12	96347,75	891,15	

Tabla 24. Resultados del ensayo ANOVA para los datos de concentración proteica.

En ambos casos el F calculado es mayor que el F extraído de tabla por lo tanto se rechaza H_0 y se acepta H_1 , lo que significa que las medias difieren significativamente al nivel de α elegido.

Estos resultados indican que hay diferencia significativa entre los valores de concentración proteica en las fases de crecimiento comparadas.

Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para proteínas celulares totales

A fin de comparar los perfiles de proteínas celulares totales en cultivos con alta y baja densidad celular, se realizaron los correspondientes perfiles mediante SDS-PAGE siguiendo el protocolo descrito por Laemli (1970). Luego se realizó el revelado de los geles siguiendo la técnica del Coomassie Blue R-250, descritas en Materiales y Métodos.

Para realizar la siembra de las muestras en el gel, se calculó a partir de los valores de concentración proteica obtenidos con el método de Bradford, el volumen de buffer muestra que se debía agregar a cada una de ellas de manera tal que al sembrarlas, se consiguiera tener en cada calle aproximadamente 100 μg de proteína, lo que permitiría una buena resolución de bandas en los geles.

- **Perfil de SDS-PAGE para la cepa *S. meliloti* B-399**

En la figura 24, se muestra el perfil de proteínas celulares totales, obtenido al realizar el SDS-PAGE y revelar con Coomassie Blue las muestras de la cepa *S. meliloti* B399 (la imagen se muestra en escala de grises porque permite una mejor diferenciación de bandas):

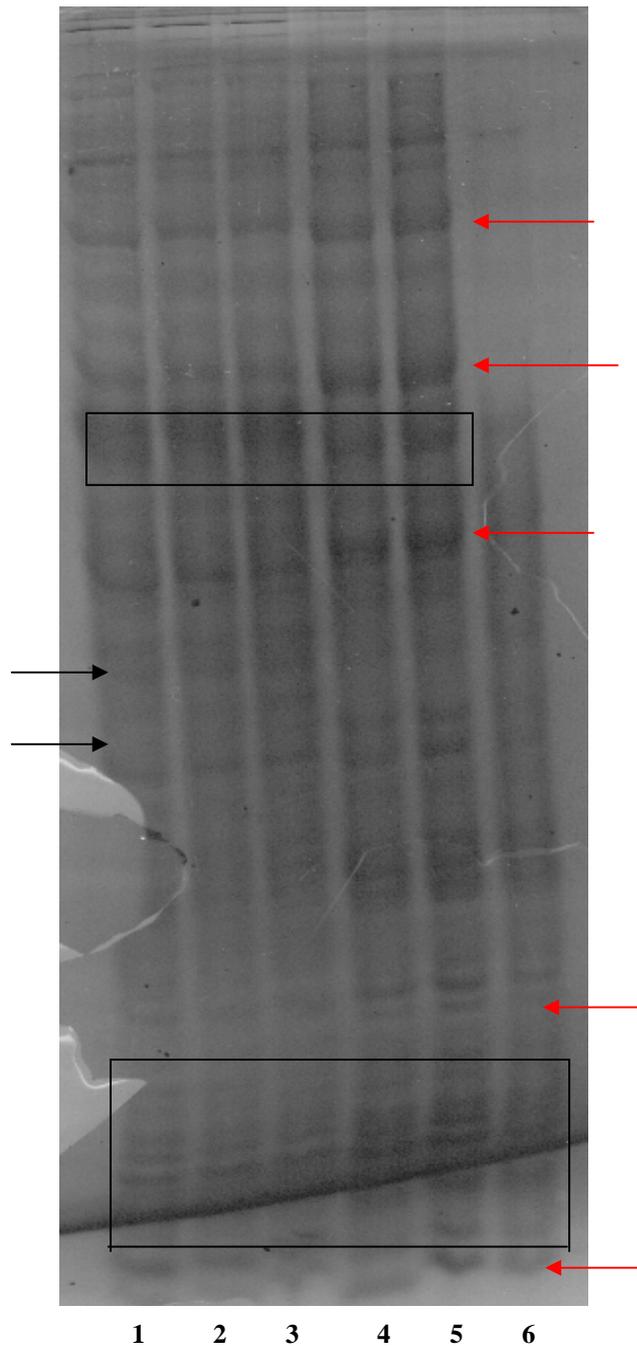


Fig. 24. Perfil de proteínas para *S. meliloti* B399. Las calles 1, 2 y 3 corresponden a las muestras de cultivos en fase exponencial; las calles 4, 5 y 6 corresponden a las muestras de cultivos en fase estacionaria.

En esta imagen, las flechas de color rojo indican bandas que estaban presentes en los cultivos en fase estacionaria (calles 4, 5 y 6) pero no en los cultivos en fase exponencial de crecimiento (calles 1, 2 y 3) y las flechas de color negro indican bandas que estaban presentes en los cultivos en fase exponencial y no en los cultivos en fase estacionaria de crecimiento. El recuadro que se encuentra en la parte superior de la imagen, delimita un

conjunto de bandas (iguales en ambas fases) que mostraron mayor desplazamiento en muestras de cultivos en fase estacionaria respecto de las muestras de cultivos en fase exponencial, y el recuadro que se encuentra en la parte inferior de la imagen, indica un conjunto de bandas que mostraron mayor desplazamiento en muestras de cultivos en fase exponencial respecto de las muestras de cultivos en fase estacionaria. Además se puede observar una diferencia en la intensidad de las bandas correspondientes a fase estacionaria respecto de las correspondientes a fase exponencial, lo que se correlaciona con los resultados obtenidos en la determinación de concentración proteica por el método de Bradford (ver tabla 10), donde también se muestra un aumento significativo en los valores de concentración proteica.

- **Perfil de SDS-PAGE para la cepa *B. japonicum* E-109**

A continuación se muestra el perfil de proteínas celulares totales, obtenido al realizar el SDS-PAGE y revelar con Coomassie Blue, las muestras de la cepa *B. japonicum* E-109 (la imagen se muestra en escala de grises porque permite una mejor diferenciación de bandas):

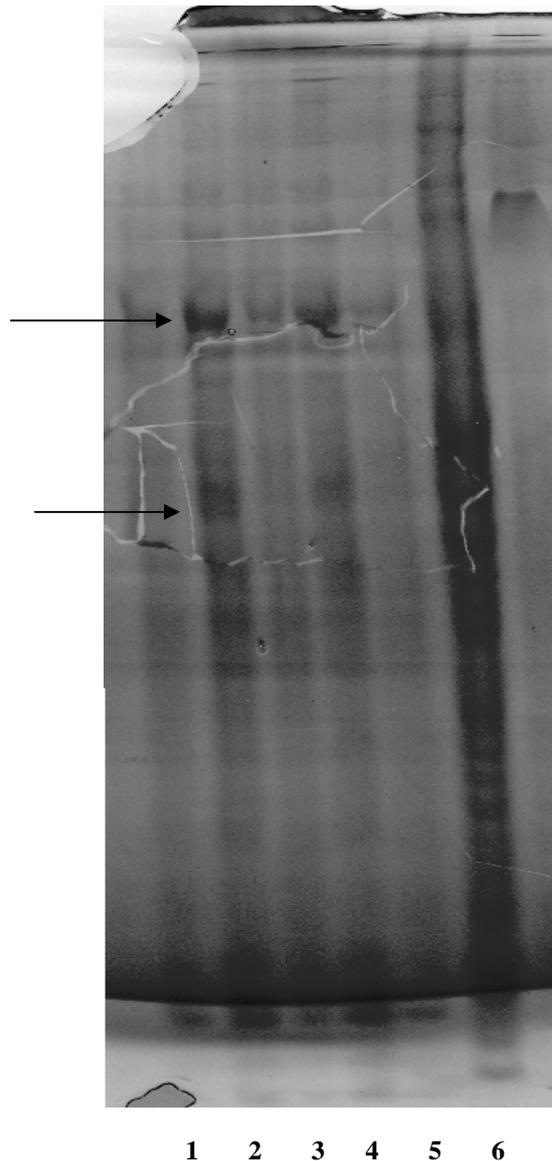


Fig. 25. Perfil de proteínas celulares totales para *B. japonicum* E-109. Las calles 1, 3 y 5 corresponden a muestras de cultivos en fase exponencial; las calles 2, 4 y 6 corresponden a muestras de cultivos en fase estacionaria.

En esta imagen, las dos flechas indican bandas que se encuentran presentes en las muestras de cultivos en fase estacionaria (calles 2 y 4) y no en las muestras de cultivos en fase exponencial de crecimiento (calles 1, 3 y 5). En esta cepa no se presentaron grandes diferencias en los perfiles de bandas en las distintas fases de crecimiento, pero si se pudo observar un aumento en la concentración relativa de proteínas en la fase estacionaria respecto de la fase exponencial de crecimiento, lo que se relaciona con los resultados de concentración proteica obtenidos mediante la técnica de Bradford (ver tabla 10) donde también se muestra un aumento significativo en los valores de concentración proteica.

El perfil de bandas de la muestra corrida en la calle número 6 es mucho más intenso y no pueden distinguirse las diferentes bandas, lo que podría atribuirse a que la muestra se sembró muy concentrada.

El aumento de concentración proteica observado en los cultivos celulares en fase estacionaria respecto de los de fase exponencial y la aparición de nuevas bandas o desaparición de otras en las distintas fases de crecimiento comparadas, para ambas cepas, puede relacionarse con lo planteado por Unni S. y Rao K (2001), quienes describen que en fase estacionaria, los microorganismos se encuentran en una situación de estrés, al verse disminuida la concentración de nutrientes, al haber mayor población, al producirse una acumulación de productos del metabolismo microbiano, etc. Esto puede llevar a que se sintetizen nuevas proteínas o que aumente la concentración de las ya existentes, en respuesta al estrés que sufre el microorganismo. También se relaciona con lo planteado por Sánchez-Contreras *et al* (2007), respecto a que los rizobios utilizan el sistema de *quorum sensing* para regular, entre otras cosas, la adaptación a la fase estacionaria de crecimiento.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Analizando los resultados obtenidos para los diferentes ensayos realizados en este trabajo de tesina, podemos concluir que:

- El contenido de EPS en fase exponencial fue significativamente menor que en fase estacionaria de crecimiento, para ambas cepas.
- La cepa *B. japonicum* E-109 mostró una pequeña diferencia en las concentraciones de KPS presentes en fase exponencial respecto de fase estacionaria, en cambio, la cepa *S.meliloti* B399 mostró diferencias significativas en los valores de concentración de KPS en las diferentes fases comparadas.
- Se observaron diferencias en los perfiles electroforéticos de LPS para ambas cepas, en fase exponencial respecto de fase estacionaria de crecimiento.
- Se observaron diferencias en los perfiles electroforéticos y concentración de proteínas celulares totales para ambas cepas, en fase exponencial respecto de fase estacionaria de crecimiento.

Por lo dicho anteriormente, se acepta la hipótesis de este trabajo, en la cual se planteó que los distintos niveles de densidad celular alcanzados por cultivos rizobianos, inducirían una respuesta fisiológica diferente, en relación con la síntesis de componentes bacterianos, tales como exopolisacáridos (EPS), polisacáridos capsulares (KPS), lipopolisacáridos (LPS) y proteínas totales.

En un futuro, estos estudios se continuarán con ensayos en plantas para poder determinar si la nodulación de las plantas leguminosas se ve influenciada por las diferentes densidades celulares de los cultivos rizobianos utilizados. Estos estudios se encuentran previstos dentro del proyecto de investigación en el que se enmarca este trabajo de tesina.

BIBLIOGRAFÍA

Bacca B. E., Soto Urzúa L., Pardo Ruiz Ma. P. A. (2000). “Fijación biológica de nitrógeno”. Elementos, Ciencia y Cultura. 38:43-49.

Bedmar E. J., González J., Lluch C., Rodelas B. (2006). “Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones”. Capítulo 14. pp 148-159. Editorial Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). Granada, España.

Bradford M. M. (1976). “A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Brown C. M. y Dilworth M. J. (1975). “Ammonia assimilation by Rhizobium cultures and bacteroids”. J Gen Microbiol. 86: 39-48.

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

Corvalán D., Dubois M., Medana M., Peticari A., Racca R., Ruiz O. A. (2007). “Situación actual y perspectivas del mercado de semillas y biofertilizantes en la Argentina”. Capítulo 1. pp 4-11. Imprenta Denad Internacional S.A. Montevideo, Uruguay.

Dische Z. (1962). “General colours reactions”. Methods Carbohyd Chem. 1: 478-492.

Ferraris G., González Anta G., Díaz-Zorita M. (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 Fé.

Fischer S. E., Marioli J. M., Mori G. B. (2003). “Effect of root exudates on the Exopolysaccharide composition and the Lipopolysaccharide profile of *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress”. FEMS Microbiology Letters. 219:53-62.

Frayse N., Couderc F., Poinso V. (2003). “Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis”. Journal Biochem. 270:1365-1380.

González J. E., Keshavan N. D. (2006). “Messing with Bacterial Quórum Sensing”. Microbiology and Molecular Biology Reviews. American Society for Microbiology. 70(4):859-875.

González J. E., Marketon M. M. (2003). “Quórum Sensing in Nitrogen-Fixing Rhizobia”. Microbiology and Molecular Biology Reviews. American Society for Microbiology. 67(4):574-592.

Hirsch A. M., Lum M. R., Downie J. A. (2001). “What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special?”. Plant Physiology. American Society of Plant Biologist. 127:1484-1492.

Hitchcock P. J y Brown T. M (1983). Journal of Bacteriology. 154:269-277.

Koch A. L. (1981). Growth measurement in Manual of Methods for General and Bacteriology. Gerhardt P ed. American Society for Microbiology. Washington D.C. pp 179-207.

Laemli U. K (1970). Nature. 227:680-685.

Lepek V., D’Antuono A. (2005). Bacterial surface polysaccharides and their role in the rhizobia-legume association. *Lotus* Newsletter. 35:93-105.

Lodeiro A. R., López García S. L., Mongiardini E., Quelas J. I., Peticari A. (2003). Los rizobios y la inoculación de las leguminosas para

la fijación simbiótica de nitrógeno. Microbiología Agrícola Un Aporte de la Investigación Argentina. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Santiago del Estero. Argentina

Long S. R. (1996). “*Rhizobium* Symbiosis: Nod Factors in Perspective”. The Plant Cell. American Society of Plant Physiologists. 8:1885-1898.

Moreno Sastre, G., Talbot Wright, M. L. (2007). “Fertilización equilibrada de alfalfa”. Informe técnico. Departamento técnico Stoller Argentina S. A. www.stoller.com.ar

Moretti E. R. (2007). “Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica, científica y empresarial”. Capítulo 1. pp 13-15. Eds. Izaguirre-Mayoral M.L., Labandera C.y Sanjuán J. Montevideo, Uruguay.

Nealson K. H., Platt T., Hastings J. W. (1970). “Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescencesystem”. J. Bacteriol. 104:313-322.

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

Quinto C., Cárdenas L. (2007). “Una ventana al quehacer científico”. Capítulo 24. pp 273-280. Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). Molecular cloning-A laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Sánchez-Contreras M., Bauer W. D., Gao M., Robinson J. B., Downie J. A. (2007). “Quórum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes”. Philosophical Transactions of The Royal Society. 362:1149-1163.

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

Santamaría M., Gutiérrez-Navarro A. M., Corzo J. (1997). “Perfiles de lipopolisacáridos de nódulos como marcadores para determinar la diversidad de poblaciones naturales de *Bradyrhizobium*”. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y de Microbiología y Biología Celular. Universidad de La Laguna. Tenerife.

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

Unni S., Rao K. K. (2001). “Protein and lipopolysaccharide profiles of a salt-sensitive *Rhizobium* sp and its exopolysaccharide-deficient mutant”. Soil & Biochemistry. 33: 111-115.

Van Rhlin P., Vanderleyden J. (1995). “The *Rhizobium*-Plant Symbiosis”. Microbiological Reviews. American Society of Microbiology. 59(1):124-142.

Wang T., Martínez Romero J., López Lara I. (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, México.

Werner D., Wilcockson J., Zimmermman E. (1975). “Adsorption and selection of rhizobia by ion exchange papers”. Arch Microbiol. 105: 27-32.

ANEXO I

Soluciones y reactivos

Extracción de exopolisacáridos y polisacáridos capsulares

- Etanol 95%
- Buffer Fosfato Salino (PBS)

NaCl	8 g / L
KCl	0,2 g / L
Na ₂ HPO ₄	1,44 g / L
KH ₂ PO ₄	0,24 g / L

Determinación de hexosas

- Reactivo de Antrona

H ₂ SO ₄	250 mL
H ₂ O	100 mL

Se tomaron 60 mL de esta solución y se agregaron 120 mg de Antrona.
Este reactivo se preparó en el momento de utilizarlo.

Extracción de LPS

- 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

Electroforesis en geles de poliacrilamida para LPS

- Buffer del gel
3M Tris 36,342 g
0,3% SDS 0,3 g
Volumen final 100 mL
Se llevo a pH 8,46 con HCl (C).

- Stock acril/bis
Acrilamida 93 g
Bisacrilamida 6 g
Volumen final 200 mL

- APS (Persulfato de Amonio)
APS 150 mg
Agua Mili Q 1,5 mL

- Buffer ánodo
0,2M Tris base 12,11 g
Volumen final 500 mL
Se llevo a pH 8,95 con HCl (C)

- 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 de la solución: 8,25.

Revelado de LPS

- Solución fijadora

40% etanol 400 mL

5% ácido acético glacial 50 mL

- Solución oxidante

Ácido periódico 0,7 % en agua Mili Q

- Solución de teñido

Agua Mili Q 70 mL

NaOH 1N 1,4 mL

NH₄OH 25% 1 mL

AgNO₃ 20% 2,5 mL

Esta solución se preparo en el momento de usarla y se agrego en oscuridad.

- Solución reveladora

Agua Mili Q 100 mL

Formaldehído 30% 50 µL

Ácido cítrico 100 mg / ml 50 µL

- Ácido acético diluido

Se colocaron 20 mL de ácido en 100 mL de agua Mili Q.

Extracción de proteínas celulares totales

- Cloruro de sodio (NaCl) 0,85 %

NaCl 0,85 g

Agua Mili Q 100 ml

- Tampón de extracción (pH: 7,2)

Tris 0,1 M 1,21 g

MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,101 g
Glicerol	15 g
β – mercaptoetanol	100 μL
Volumen final	100 mL

Se llevó a pH 7,2 con HCl (C).

- Tampón de sonicación

Tris 0,1 M	1,21 g
Glicerol	15 g
Volumen final	100 mL.

Se llevo a pH: 8,8 con HCl (C).

Determinación de la concentración proteica

- Solución madre

Seroalbúmina bobina	0,016 mL
Volumen final	50 mL.

- Reactivo de Bradford

100 mg de Azul de Coomassie brillante G-250 se disolvieron en 50 mL de etanol al 95 % y se adicionaron 100 mL de ácido fosfórico (85% p/v), completándose hasta un volumen final de 1 L con agua Mili Q. La solución se filtró 3 veces a través de papel de filtro hasta que perdió la coloración azul.

SDS-PAGE para proteínas celulares totales

- Stock acril/bis

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

Información de seguridad: La acrilamida en polvo y en solución es neurotóxica, por lo tanto se debe usar máscara, guantes y lentes de protección para su manipulación.

- Tris - HCl 1,5M

Tris	18,15 g
Agua Mili Q	50 mL
Volumen final	100 mL

Se llevo a pH 8,8 con HCl (C).

- Tris-HCl 0,5 M

Tris	12,1 g
Agua Mili Q	50 mL
Volumen final	100 mL

Se llevo a pH 8,8 con HCl (C).

- SDS 10%

SDS	10 g
Volumen final	100 mL

Información de seguridad: El SDS es un polvo fino neurotóxico, por lo tanto se debe usar máscara, guantes y lentes de protección para su manipulación.

- APS (Persulfato de Amonio)

APS	150 mg
Agua Mili Q	1,5 mL

- Buffer muestra

Agua Mili Q	3 mL
Tris-HCl 0,5M pH: 6,8	1 mL
Glicerol 50%	1,6 mL
SDS 10%	1,6 mL
2 – β - mercaptoetanol	0,4 mL
Azul de bromofenol 5%	0,4 mL

- Buffer de corrida (5X)

Tris	15 g
------	------

Glicina	72 g
SDS	5 g
Volumen final	1L

pH aproximadamente 8,3.

Revelado de proteínas celulares totales

- Solución fijadora

Metanol	67 mL
Acido acético glacial	14 mL
Agua Mili Q	67 mL

- Solución colorante

Coomasie Blue R-250	0,15 g
Agua Mili Q	150 mL

- Solución decolorante

Ácido acético	7 mL
Metanol	25 mL
Agua Mili Q	68 mL