FACULTAD DE CIENCIAS
EXACTAS Y NATURALES
Uruguay 151 - (6300) Santa Rosa - La Pampa
Tel.: 02954-425166 7 422026 - Fax.: 432679
Email: fexactas@unlpam.edu.ar
Página Web: http://www.exactas.unlpam.edu.ar

UNIVERSIDAD NACIONAL
de LA PAMP

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

TESINA PRESENTADA PARA OBTENER
EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADO EN QUIMICA

"RELACIÓN ENTRE CULTIVOS RIZOBIANOS DE DIFERENTE DENSIDAD CELULAR Y SÍNTESIS DE COMPONENTES IMPORTANTES PARA LA SIMBIOSIS"

GABRIELA CAROLINA SANCHEZ

SANTA ROSA (LA PAMPA) ARGENTINA

2008

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 Laboratorio de Microbiología, dependiente del Departamento de Química, durante el período comprendido entre el 2 de Junio del 2006, como auxiliar de investigación, Res. Nº157/06 (fecha de aprobación de proyecto de tesina 4 de abril del 2008) y el……, bajo la dirección de MSc. Pagliero, Fabiola; y bajo la codirección de Dra. Lorda Graciela.

Día/mes/año

Gabriela Carolina SANCHEZ

Departamento de Química

FACULTAD DE CIENCIAS
EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
LA PAMPA

Indice

Resumen..... 1
1. Introducción..... 2
1.1 Ciclo del nitrógeno..... 2
1.1.1 La Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)..... 3
1.1.1.1 Proceso de infección..... 4
1.1.1.2 Transferencia del nitrógeno fijado a la planta..... 5
1.2 Características de los rizobios..... 7
1.2.1 Características de los géneros *Bradyrhizobium y Rhizobium*..... 7
1.3 Las leguminosas..... 8
1.4 Componentes bacterianos importantes para la simbiosis..... 13
1.4.1 Exopolisacáridos (EPSs)..... 13
1.4.1.1 Biosíntesis..... 14
1.4.1.2 Importancia de los EPSs..... 14
1.4.2 Polisacáridos capsulares (KPS)..... 14
1.4.2.1 Características..... 15
1.4.2.2 Funciones de los KPS..... 15
1.4.3 Lipopolisacáridos (LPSs)..... 16
1.4.3.1 Estructura de los LPSs..... 16
1.4.3.2 Importancia de los LPSs..... 19
1.4.3.3 Análisis de LPS..... 19
1.5 Rizobios y densidad celular..... 19
2. Objetivos..... 21
3. Materiales y Métodos..... 22
3.1 Microorganismos..... 22
3.1.2 Métodos de conservación..... 22
3.1.3 Condiciones de operación..... 22
3.1.4 Medios de cultivo..... 23
3.1.5 Determinación del crecimiento celular..... 24
3.1.5.1 Recuento de número de células viables..... 24
3.1.5.2 Medición de unidades de densidad óptica (UDO) 25
3.1.5.3 Cálculo de los parámetros cinéticos de crecimiento celular..... 25

3.2 Determinación de lipopolisacáridos celulares (LPSs) 26
3.2.1 Preparación de la muestra..... 26
3.2.2 Preparación del gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para lipopolisácaridos.. 27
3.2.3 Desarrollo de la electroforesis..... 27
3.2.4 Revelado del gel..... 28
3.3 Determinación de proteínas celulares totales..... 29
3.3.1 Preparación de la muestra..... 29
3.3.2 Determinación de la concentración de proteínas..... 29
3.3.3 Preparación del gel de poliacrilamida con SDS para proteínas..... 30
3.3.4 Desarrollo de la electroforesis..... 31
3.4 Extracción y determinación de exopolisacáridos (EPS)..... 31
3.4.1 Determinación de EPS..... 31
3.4.2 Cuantificación de los EPS por el método de la Antrona..... 32
3.4.4 Determinación de polisacáridos capsulares (KPS)..... 32
4. Resultados y Discusión..... 33
4.1 Caracterización del crecimiento de los microorganismos en estudio..... 33
4.1.1 Determinación de las curvas de crecimiento celular en medio de cultivo mínimo..... 33
4.1.1.1 Curva de crecimiento celular de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 5019 34
4.1.1.2 Curva de crecimiento celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899..... 35
4.1.2.3 Curva de crecimiento celular de *B. japonicum* SEMIA 5080..... 36
4.1.2 Curvas de crecimiento celular en medio de cultivo rico..... 37
4.1.2.1 Curva de crecimiento celular de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 5019 38
4.1.2.2 Curva de crecimiento celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899..... 40
4.1.2.3 Curva de crecimiento celular de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080 42
4.2 Determinación de proteínas celulares totales..... 43
4.2.1 Concentración de proteínas celulares totales..... 44
4.2.2 Realización del gel de proteínas..... 46
4.3 Determinación de los perfiles de lipopolisacáridos..... 49
4.4 Determinación del contenido de exopolisacáridos..... 51
4.5 Determinación del contenido de polisacáridos capsulares..... 54

Resumen

Bajo condiciones de nitrógeno limitante, bacterias del género *Rhizobium, Sinorhizobium, Mesorhizobium, Philorhizobium, Bradyrhizobium, Azorhizobium* (rizobios) son capaces de inducir la formación de hipertrófias (nódulos) en las raíces de ciertas plantas, permitiéndoles, de esta manera, asimilar el nitrógeno atmosférico. En la unión de las bacterias a la superficie de la raíz están implicados compuestos como fibrillas de celulosa, que pueden ayudar a enredar al rizobio en la superficie radicular, y proteínas dependientes de Ca^{2+}, producidas por la bacteria. Se requiere, de la síntesis y la percepción de moléculas señal como lipoquitooligosacáridos, llamados factores Nod. Además, en relación al establecimiento de la simbiosis, son importantes distintas macromoléculas como: exopolisacáridos (EPSs), lipopolisacáridos (LPSs) y polisacáridos capsulares (KPSs). Para el estudio de las mismas se utilizaron los microorganismos *Rhizobium tropici* CIAT 899, *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 5019 y *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080, en distintas fases de la curva de crecimiento celular: fase exponencial y estacionaria. Previamente, se seleccionaron los medios de cultivo y las fuentes de carbono necesarias para lograr un crecimiento celular óptimo y, la caracterización cinética de dicho crecimiento, mediante el estudio de las UFC/ml y las UDO con respecto al tiempo. Los resultados mostraron que la producción de los compuestos bacterianos EPSs, KPSs, LPSs y proteínas totales, dependen de la fase de crecimiento celular del microorganismo. Se concluyó que el estado fisiológico y/o la densidad celular están implicados en dicha producción.

1. Introducción

1.1 Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno es el factor limitante más importante, después del agua, para el desarrollo de las plantas, que lo necesitan para formar macromoléculas tales como: proteínas, ácidos nucleicos, etc. Dentro de los ciclos biogeoquímicos de los elementos minerales, el del nitrógeno (figura 1) es especialmente complejo por encontrarse, en condiciones naturales, en distintos estados de valencia (de +5 a -3) formando compuestos estables.

El ciclo del nitrógeno es de importancia crítica para todos los organismos. Este comprende varias etapas: la amonificación, degradación de compuestos orgánicos nitrogenados a amoníaco o ion amonio; la nitrificación, la oxidación del amoníaco o el amonio a nitratos que son incorporados por las plantas; y la asimilación, conversión de nitratos a amoníaco y su incorporación a compuestos orgánicos. Los compuestos orgánicos que contienen nitrógeno regresan finalmente al suelo o al agua, completándose el ciclo (Curtis, 2003).

Uno de estos compuestos, el nitrato, es la forma más usual tomada por la planta. Es clave en su nutrición y puede hallarse en el suelo derivado del contenido mineral del mismo, y diferenciarse de aquel que se pueda incorporar de la atmósfera o de la biotransformación de las moléculas orgánicas, que lo contienen formando parte de los restos vegetales y animales que allí llegan, o de los propios microorganismos que lo habitan. La desnitrificación, o reducción del nitrato hasta nitrógeno molecular o dinitrógeno N_2 es una actividad microbiana importante. Las pérdidas de nitrógeno asimilable que esta actividad conlleva son compensadas por la llamada fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Olivares, 2003).

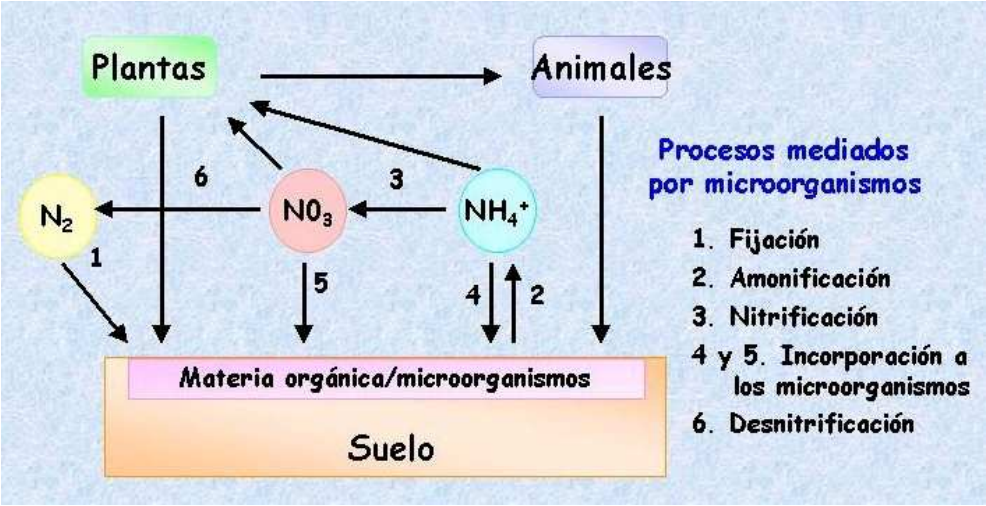

Figura 1: Ciclo del nitrógeno atmosférico (Olivares, 2003).

1.1.1 <u>La Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)</u>

Hoy día la FBN cobra valor dentro del contexto de la agricultura sostenible, ya que puede evitar el uso abusivo de fertilizantes nitrogenados con el consiguiente ahorro en el consumo de energía y la disminución de la degradación del medio. Desde este punto de vista ecológico, también es interesante señalar la importancia de la FBN en el mar, por la necesidad de nitrógeno asimilable disponible que requieren los océanos para actuar como sumideros del CO_2 de la atmósfera.

La FBN es llevada a cabo por microorganismos procarióticos en vida libre o en simbiosis: esto último ocurre en asociación mutualista con las plantas. Hay una gran diversidad de especies microbianas portadoras de esta característica pertenecientes a este grupo de bacterias, entre los que se destacan los rizobios (Olivares, 2003).

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico, consistente en la reducción de N_2 a NH_4^+ por vía enzimática es, después de la fotosíntesis, la ruta metabólica más importante para el mantenimiento de la vida en la biosfera.

La reacción biológica de reducción de nitrógeno a amoníaco es:

$$N_2 + nATP + 8e- + 8H^+ \leftrightarrow 2NH_3 + H_2 + nADP + nPi$$

Donde Pi significa fosfato inorgánico y n es mayor o igual a 16, dependiendo de las condiciones del flujo de protones; si éstas son limitantes se requiere un mayor consumo de ATP (Halbleib y Ludden, 2000). Esta reacción es catalizada por una enzima conocida como nitrogenasa, que en realidad es un complejo multienzimático que cataliza varias etapas de la reacción.

En la agricultura, estos sistemas han encontrado su aplicación en el aprovechamiento de asociaciones naturales de dichos rizobios con plantas cultivadas, siendo las más importantes las leguminosas, pero contándose también con cultivos de otras familias, entre ellos gramíneas como el arroz y la caña de azúcar.

Es de destacar la especificidad leguminosa-rizobio que establece la compatibilidad entre grupos de especies de leguminosa y grupos de rizobios (Lodeiro *et al.*, 2003). En esta simbiosis, la planta huésped obtiene nutrientes nitrogenados de la bacteria (rizobios) y ofrece a ésta una fuente de carbono y un ambiente favorable para fijar nitrógeno. Esta simbiosis contribuye con una parte considerable del nitrógeno combinado en la tierra y permite a las plantas leguminosas crecer sin fertilizantes nitrogenados y sin empobrecer los suelos (Tao Wang *et al.*, 2001).

1.1.1.1 Proceso de infección

Cuando las raíces de las plantas penetran en el suelo, se producen cambios importantes en la composición química del suelo debido a que exudan una variedad de aminoácidos, proteínas, azúcares, carbohidratos complejos, flavonoides, alcoholes, vitaminas, hormonas y ácidos orgánicos, entre otros. Este ambiente enriquecido en nutrientes puede promover el crecimiento de las poblaciones microbianas del suelo y su movilización hacia las raíces.

Para iniciar el proceso de infección, los rizobios no sólo deben colonizar la rizósfera, sino también unirse a la raíz. La unión o adsorción de los rizobios a la raíz es el evento más temprano de contacto físico entre la planta y los rizobios y depende de múltiples factores, tanto de la bacteria, de la planta como del ambiente (Lodeiro *et al.,* 2003).

Para dicha colonización son esenciales una serie de eventos:

- Reconocimiento entre la bacteria y su huésped a través de la liberación de moléculas señal, flavonoides (planta) y lipoquitooligosacáridos o factores Nod (bacteria).
- Adherencia de los rizobios a la superficie radicular, a través de componentes de superficie celular bacteriana: exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS), polisacáridos capsulares (KPS y ricadhesina) y lecitinas de la planta huésped.
- Curvamiento del pelo radicular, cuando la infección es por esta vía, ya que otra forma de infección es intracelular directa.
- Penetración de la bacteria en la pared radicular y formación de un cordón de infección tubular.
- Proliferación de células corticales en respuesta a la invasión. Las células corticales se alargan, dividen y emergen como tejido nodular diferenciado, infectado con los rizobios.

1.1.1.2 Transferencia del nitrógeno fijado a la planta

Los bacteroides, dentro de las células hospedantes de nódulos efectivos, fijan nitrógeno y excretan amonio en el citosol de las células del hospedante, donde es asimilado por la planta y transportado como amida o ureídos, según el tipo de leguminosa (Rosas *et al.*, 2003).

El amoníaco producido durante la reducción del N_2 se libera al espacio peribacteroidal, donde predominan condiciones de acidez que desplazan el equilibrio: $NH3 + H^+ \leftrightarrow NH_4^+$ hacia la formación de amonio, el cual a diferencia del amoníaco, no puede atravesar las membranas del bacteroide debido a su carga. Dado que el transportador de aminoácidos en el interior del bacteroide está ausente, porque su síntesis fue inhibida como parte de la diferenciación del bacteroide, la única ruta posible para dicho amonio es transformarse en aminoácidos o ureídos en las células del nódulo para luego continuar hacia el xilema de la planta (figura 2).

En una primera etapa, el amonio es incorporado en una molécula del aminoácido glutamato, en una reacción catalizada por la glutamino sintetasa (GS) para producir otro aminoácido con mayor contenido de

nitrógeno, la glutamina. Este aminoácido puede ser exportado al xilema o bien puede reaccionar con el α-cetoglutarato para dar como producto dos moléculas de glutamato, en una reacción catalizada por la glutamato sintetasa (GOGAT). Una de las moléculas de glutamato así producidas, puede utilizarse en la biosíntesis de otros aminoácidos y purinas y la segunda molécula reingresar a este ciclo GS/GOGAT para incorporar una nueva molécula de amonio. Así, la GOGAT juega un papel central en la asimilación del nitrógeno no sólo en los nódulos, sino en todos los procesos de asimilación del nitrógeno a partir de fuentes inorgánicas que finalmente se reducen a amonio, o bien del reciclado de proteínas de la misma planta (Temple *et al.*, 1998).

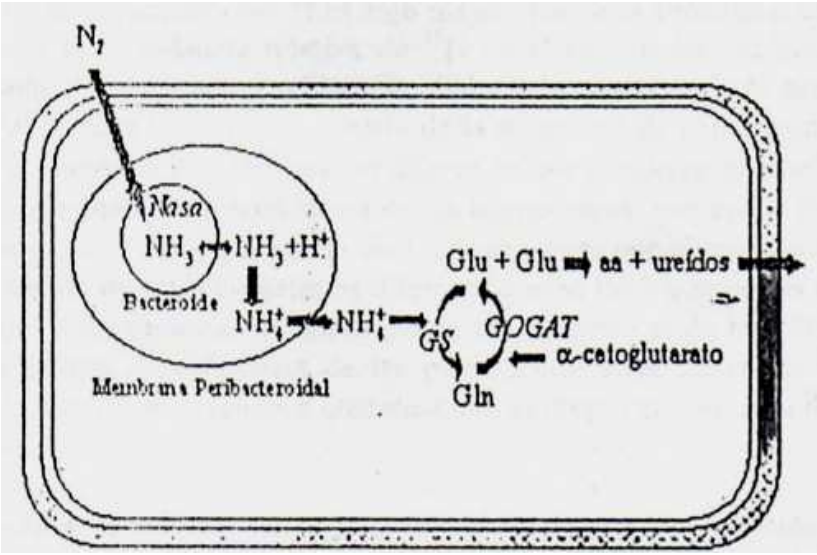

Figura 2: Esquema de la asimilación de nitrógeno por las leguminosas. (Glu: glutamato; Gln: glutamina; Aa: aminoácidos; GS: glutamino sintetasa; GOGAT: glutamato sintetasa). (Lodeiro *et al.*, 2003)

1.2 Características de los rizobios

Los rizobios son bacterias del suelo pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae* y se agrupan en seis géneros: *Allorhizobium, Azorhizobium, Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Rhizobium y Sinorhizobium.* Todas las especies comprendidas en estos géneros comparten la característica de formar nódulos fijadores de nitrógeno en las leguminosas; de allí proviene su gran importancia agronómica y ecológica.

Dependiendo del sistema simbiótico podemos encontrar dos tipos de nódulos: determinados o indeterminados. Ello va a venir dado por el lugar en donde se induzcan las divisiones mitóticas en la raíz. Así, si se producen en el córtex interno se originan nódulos indeterminados y si lo hacen en el córtex externo, nódulos determinados. Ambos tipos de nódulos, además de presentar una estructura anatómica distinta, también difieren en la forma en que se comporta la bacteria dentro del nódulo en formación. A pesar de ello, la inducción del ciclo celular en ambos sistemas sigue la misma regulación (Redondo Nieto *et al.*, 2004).

Los rizobios tienen dos formas de vida: en vida libre, se los encuentra en el suelo o en las etapas iniciales de la colonización e infección de la raíz, y como bacteroides se los encuentra en el interior de los nódulos. Ambas formas difieren en su metabolismo y morfología. Entre las diferencias más sobresalientes, los rizobios en vida libre son bacilos móviles, incapaces de fijar nitrógeno y utilizan una variedad de fuentes de carbono, mientras que los bacteroides tiene formas irregulares, son inmóviles, fijan nitrógeno y sólo pueden utilizar ácidos dicarboxílicos como succinato o malato como fuente de carbono (Lodeiro *et al.,* 2003).

1.2.1 Características de los géneros *Bradyrhizobium y Rhizobium*

**Bradyrhizobium*: las bacterias pertenecientes a este género son bacilos de 0.5-0.9 x 1.2-3.0 µm. Se mueven con un flagelo polar o subpolar. Las cepas son de lento crecimiento, productoras de álcali. Las colonias son circulares, rara vez translúcidas, blancas y convexas con un diámetro menor a 1 mm

luego de 5 a 7 días de incubación. Las tres especies definidas en este género, *B. japonicum* (especie tipo), *B. elkanii* y *B. liaoningense* pueden nodular a la soja (*Glycine max*).
De las especies identificadas dentro de este género, ninguna tiene plásmido simbiótico y los genes simbióticos están localizados en el cromosoma. Se ha reportado que existe sólo un operón del gen ribosomal (Tao Wang *et al.*, 2001).

* *Rhizobium:* las bacterias que pertenecen a este género son bacilos que miden 0.5-1.0 x 1.2-3.0 µm. Se mueven por medio de 1 a 6 flagelos que pueden ser peritricales o subpolares. Las colonias generalmente son blancas o de color beige, circulares, convexas, semitranslúcidas u opacas y mucilaginosas; generalmente miden 2-4 mm de diámetro a los 3-5 días de incubación en YEM. El crecimiento en medio de carbohidratos generalmente está acompañado de reacción ácida y abundante cantidad de polisacáridos extracelulares. Son quimio-organotróficas, utilizando una gran variedad de carbohidratos y ácidos orgánicos. Algunas cepas requieren biotina, ácido nicotínico, pantotenato o tiamina como factores de crecimiento. Las cepas son de rápido crecimiento, productoras de ácido en YEM. Hay nueve especies definidas: *R. leguminosarum* (especie tipo), *R. etli*, *R. galegae*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. hainanense*, *R. huautlense*, *R. mongolense* y *R. tropici*. Nodulan diferentes especies de leguminosas en zonas templadas o tropicales (Tao Wang *et al.*, 2001).

1.3 Las leguminosas

En el presente trabajo de investigación se utilizaron para su estudio *B. japonicum y R tropici,* simbiontes de las leguminosas soja y maní respectivamente.
Las leguminosas son plantas pertenecientes al grupo de las dicotiledóneas, componen la familia de plantas más grandes y ampliamente distribuídas en el mundo. Incluyen especies muy diversas desde el punto de vista de la morfología, hábitat y ecología (Polhill *et al.*, 1978)

Las leguminosas forman parte fundamental de la dieta humana y animal. En estas plantas, para lograr una buena síntesis de proteínas y clorofila, es necesaria la presencia de nitrógeno; por ello se requiere aplicar fertilizante nitrogenado a los suelos empobrecidos. En general la reserva de nitrógeno en la naturaleza es del 70%, aunque las plantas sólo lo absorben y asimilan como amonio y/o nitratos, de ahí la necesidad de usar fertilizantes nitrogenados. En el caso de utilizar fertilizantes químicos, además de su elevado costo, se suma el riesgo de una acción contaminante del medio ambiente (Alexander, 1980). Lo anterior obliga a buscar alternativas de solución que reduzcan su uso, pero que mantengan el rendimiento del cultivo vegetal.

Se considera que la fijación biológica del nitrógeno (FBN) es una de las alternativas más viables para recuperar el nitrógeno en el ecosistema (Kimball, 1980); se ha estimado que 175 millones de toneladas/año se fijan biológicamente, del cual el 70% va al suelo (Burity *et al.*, 1989) y de éste, el 50% proviene de asociaciones nodulares como las causadas por rizobios (Carrera *et al.*, 2004; Long, 1989).

La FBN es una ventaja para las leguminosas ya que pueden tomar nitrógeno del aire a través de la simbiosis con rizobios (Luna *et al.*, 1991; Sanaratne *et al.*, 1987). Esta es una manera de reducir la cantidad del nitrógeno derivado de fertilizantes al incrementar la proporción de nitrógeno fijado vía rizobios. Por eso se asegura el máximo beneficio de la asociación mediante el establecimiento de una bacteria que reúna cualidades de competencia y efectividad para fijar nitrógeno en las raíces de la leguminosa. En los suelos agrícolas la asociación rizobio-leguminosa es la más importante fuente de nitrógeno, pues se ha reportado que en las leguminosas noduladas, bajo determinadas condiciones ambientales (suelos pobres en este elemento), pueden fijar hasta los 100 kg N_2/Ha/año (FAO, 1995). Este mecanismo provee la demanda del nitrógeno para satisfacer las necesidades nutricionales más importantes de la planta.

Dentro de los sistemas simbióticos relacionados con la FBN, se encuentran los de *Bradyrhizobium*-soja y *Rhizobium*- poroto.

Soja (*Glycine max*)

La soja tuvo su origen en oriente y se ha cultivado por muchos siglos. Para occidente es un cultivo introducido en Estados Unidos en el siglo XIX, pero comenzó a desarrollarse en gran escala a fines de los años '60. Estados Unidos, China, Brasil y Argentina tienen el 80% de la producción mundial. La soja es considerada una planta muy eficiente en la producción de proteínas de buena calidad y puede proveer cinco veces más proteínas aprovechables, por unidad de superficie cultivada, que la que se obtiene del ganado.

Es un tipo de planta herbácea anual cuyo ciclo vegetativo oscila de tres a siete meses. Las hojas son alternas, compuestas y de color verde, los tallos y las vainas son pubescentes. Sus flores son de color blanquecino o púrpura y en cuanto a los frutos contiene de tres a cuatro semillas. Estas semillas son esféricas, de pequeño tamaño y de color amarillo. Son comercialmente empleadas en la producción de aceite y proteínas.

Glycine max, fija nitrógeno en valores que van de 51 a 195 kg/ha (Schepers and Mossior, 1993). Estas cantidades de nitrógeno fijado durante el ciclo del cultivo dependen de diversos factores, principalmente de las condiciones hídricas del suelo y de la disponibilidad del nitrógeno (González, 1994).

Cultivo de soja

En el mundo, su distribución está demarcada por límites climáticos, por exceso o defecto de las necesidades vitales para los individuos que conforman los distintos biotipos. El resto de los otros elementos pueden y son modificados por el hombre; por ejemplo, el suelo puede mejorarse, eliminando malezas, combatiendo plagas y enfermedades.

En el país, en más de las 2/3 partes del territorio, no existen limitaciones térmicas que impidan satisfacer a la soja sus necesidades bioclimáticas.

El déficit hídrico afecta uno de los procesos fisiológicos más tempranos de la soja. En consecuencia una sequía durante el período vegetativo influye en la reducción del índice foliar y en la captación de energía radiante, que

es la que permite la acumulación de materia seca y se traduce en un mayor potencial de rendimiento en el cultivo.

La FBN se ve afectada tanto por el déficit como por el exceso de agua. Una perdida de agua del 20% produce en los nódulos el cese irreversible de la actividad de la fijación y la respiración. Por otra parte un exceso de agua en el suelo, también la anula por deficiencias en la llegada del oxígeno a la planta.

En el sistema *Bradyrhizobium*-soja, el nitrógeno es fundamental en la definición del rendimiento por el gran contenido proteico de sus granos. La FBN fija entre el 25 y el 80% de su nitrógeno total. Los tratamientos inoculados registran incrementos en los rendimientos de hasta 700 a 1000 Kg/ha para la mejor relación cepa cultivar (González, 1994).

*__**Poroto (*Phaseolus vulgaris L.*)**__

Dentro del conjunto de legumbres secas, el poroto constituye el principal cultivo que en condiciones de secano y en forma extensiva, es sembrado en la región noroeste de la República Argentina.

Es una planta anual de crecimiento arbustivo, con raíces superficiales fasciculadas. El tallo principal posee nudos vegetativos que originan ramas secundarias y las hojas son compuestas, formadas por tres folíolos (trifoliadas). Posee de 2 a 4 flores completas dispuestas en racimo y los frutos tienen de 4 a 6 semillas. Estas son de color verde claro, planas, sin hilo, miden entre 15-20 cm y se consumen al estado inmaduro o fresco.

La fase reproductiva es inducida por alrededor de 12 horas de luz. Sin embargo la mayoría de las variedades comerciales son insensibles al fotoperíodo, es decir que la floración se produce bajo cualquier condición de largo de día.

El almacenamiento de la planta de poroto se realiza a temperaturas bajas de 4-5 °C y bajo contenido de humedad ambiental (10%). Bajo estas condiciones se establece que la viabilidad de la planta es de dos años aproximadamente.

Desde el punto de vista de la comercialización, a nivel regional y teniendo en cuenta que prácticamente la totalidad del poroto recolectado tiene como destino final la exportación, su producción adquiere relevancia, dado que constituye la mayor fuente de ingresos de divisas agroindustriales que genera dicho destino (SAGPYA; INTA, 2008).

Cultivo de poroto

El poroto es una especie termófila, es decir que no soporta las heladas. Se cultiva tanto en el trópico como en zonas templadas. El desarrollo vegetativo normal, se logra cuando se presentan temperaturas medias mensuales entre 16ºC y 25ºC, siendo la mínima mensual 10ºC y la máxima 28ºC.

La luz, además de relacionarse con la fotosíntesis, también afecta la fenología y morfología de la planta, por medio de reacciones de fotoperíodo y elongación. Si bien el cultivo de poroto es indiferente al fotoperíodo, responde a días cortos y los días largos causan demoras en la floración y la maduración.

El requerimiento óptimo de agua oscila entre 350 y 400 mm distribuidos uniformemente. El poroto posee periodos críticos, durante los cuales una deficiencia de agua causa un serio decrecimiento de la producción. La deficiencia hídrica más perjudicial es la ocurrida en la fase de floración y llenado del grano. El estrés provoca bajo número de retención de flores y aborto de los óvulos. El exceso de agua también es perjudicial, ya que ocasiona graves daños en la producción. Debido a la reducción en la difusión de gas en los suelos inundados, la presencia de oxigeno es casi nula, se acumula CO_2 y etileno en la zona radical. Dentro de los dos días de producido el anegamiento se detiene el crecimiento de las hojas y la raíz, lo cual esta en relación con la disminución de la tasa respiratoria.

El cultivo de poroto es exigente respecto al suelo. Los suelos con las características óptimas para el crecimiento deben ser: bien drenados, con el terreno levemente inclinado y permeabilidad elevada; de textura granular, con materia orgánica presente, poroso y de buena infiltración; en pH neutro o levemente ácido (5,5- 7,2) y salinidad ausente (INTA, 2004).

1.4 Componentes bacterianos importantes para la simbiosis

La unión de las bacterias a la superficie de la raíz es un paso preliminar muy importante que precede a la invasión. Fibrillas de celulosa producidas pueden ayudar a enredar al rizobio en la superficie mucilaginosa de la raíz, proceso reforzado por la presencia de proteínas dependientes de Ca^{2+}, ricadhesinas, producidas por la bacteria. Es por ello que los polisacáridos y proteínas producidos por rizobios pueden jugar un papel importante en la interacción física entre la planta y la bacteria (Redondo-Nieto *et al*. 2004). Además se requiere de la síntesis y la percepción de moléculas señal como lipoquitooligosacáridos, llamados factores Nod (Skorupska *et al*., 2006).
Las macromoléculas mayormente estudiadas en relación a su función en el establecimiento de la simbiosis son: exopolisacáridos (EPSs), lipopolisacáridos (LPSs), polisacáridos capsulares (KPSs) y glucanos cíclicos (Tao Wang *et a.,* 2001).

1.4.1 Exopolisacáridos (EPSs)

Los EPSs rizobianos son polímeros de heteropolisacáridos compuestos por azúcares comunes sustituidos con residuos no carbohidratos, que se ensamblan en unidades repetidas a una cadena central.
La producción de exopolisacáridos está influenciada por una compleja red de factores ambientales.
Una gran diversidad de estructuras químicas de EPS se pueden encontrar entre rizobios, en relación con la composición de azúcar y su vinculación a la única subunidad, repitiendo tamaño de la unidad y el grado de polimerización, así como residuos de no carbohidratos. Dentro de los residuos no carbohidratos se encuentran moléculas de succinato, piruvato o acetato, a las que se deben la parte acídica de las moléculas de EPSs.
Las unidades formadas son secretadas al medio ambiente, formando los EPSs o se pueden mantener en la superficie bacteriana formando un polisacárido capsular (KPS) (Skorupska *et al*., 2006).

1.4.1.1 Biosíntesis

La biosíntesis de EPSs representa un proceso con múltiples pasos y depende de la actividad de una proteína localizada en el interior y otra en la membrana externa. Para esta producción de EPSs se requiere de la presencia de precursores como azúcares difosfo nucleótidos que son transferidos a la cadena de polisacáridos, mediante la actividad específica de una glucotransferasa.

La polimerización de la cadena de polisacáridos tiene lugar en el espacio periplasmático. Esta polimerización estaría coordinada con la exportación de un polímero a la superficie celular (Fraysse *et al.*, 2003).

Uno de los EPSs mejor estudiado es el de *Sinorhizobium meliloti* conocido como succinoglicano. La síntesis de éste consiste en que las subunidades repetidas son ensambladas en una cadena central como una molécula de oligosacárido poliprenil difosfato. Estas subunidades son moléculas de galactosa o glucosa provenientes de UDP-galactosa y UDP-glucosa respectivamente. Luego de esta polimerización las subunidades son secretadas al exterior celular (Leigh, 1994).

1.4.1.2 Importancia de los EPSs

Los EPSs son especialmente importantes para la invasión de las leguminosas por parte de las bacterias, el desarrollo del bacteroide, la supresión de la respuesta de defensa vegetal y la protección de la planta contra condiciones climáticas desfavorables (Skorupska *et al.*, 2006).

1.4.2 <u>Polisacáridos capsulares (KPS)</u>

Los polisacáridos capsulares se encuentran rodeando a la bacteria y constituyen una matriz hidratada, la cual confiere resistencia bacteriana a bacteriófagos y a condiciones de sequía frecuentes en el ambiente rizosférico.

La primera estructura de un KPS rizobial fue descripta en *Sinorhizobium fredii* y en *Sinorhizobium meliloti*. Estos contienen una alta proporción de KDO (cetodesoxioctanato).

1.4.2.1 Características

Las características generales descriptas de los KPS son:

- Distintos polisacáridos pueden ser producidos por una misma cepa, por ejemplo *S. fredii* USDA 205, produce dos KPS, uno con galactosa y otro con 2-O-metilmanosa.
- Dentro de una misma especie, la producción de uno o varios podrían ser dependientes de las condiciones de crecimiento de las células cultivadas.
- Difieren en tamaño.
- Contienen subunidades repetidas de hexosas ligadas al KDO o relacionadas con azucares 1-carboxi-2-ceto-3-deoxi, como ácidos pseudoamínico y neuramínico.
- Como los KPS sólo se encuentran en torno a la membrana de la bacteria y no son secretados, su participación simbiótica se produce después del primer contacto entre el simbionte y el hospedador. Incluso es posible que los KPS medien este tipo de contacto (Fraysse *et al.,* 2003).

1.4.2.2 Funciones de los KPS

Dentro de las principales funciones de los KPS, se encuentra que:

- Pueden estar involucrados en la protección de la leguminosa frente a otros microorganismos o plagas.
- Son capaces de codificar distintas enzimas involucradas en los pasos de la biosíntesis de isoflavonoides, ayudando de esta manera al reconocimiento entre las bacterias y las raíces de las leguminosas.
- Intervienen en la formación de nódulos indeterminados (Fraysse *et al.,* 2003).

1.4.3 Lipopolisacáridos (LPSs)

Los lipopolisacáridos (LPS) son componentes mayoritarios de la pared externa de las células Gram-negativas y, por su ubicación, son importantes mediadores de las interacciones entre estas bacterias con su medio ambiente y otros organismos.

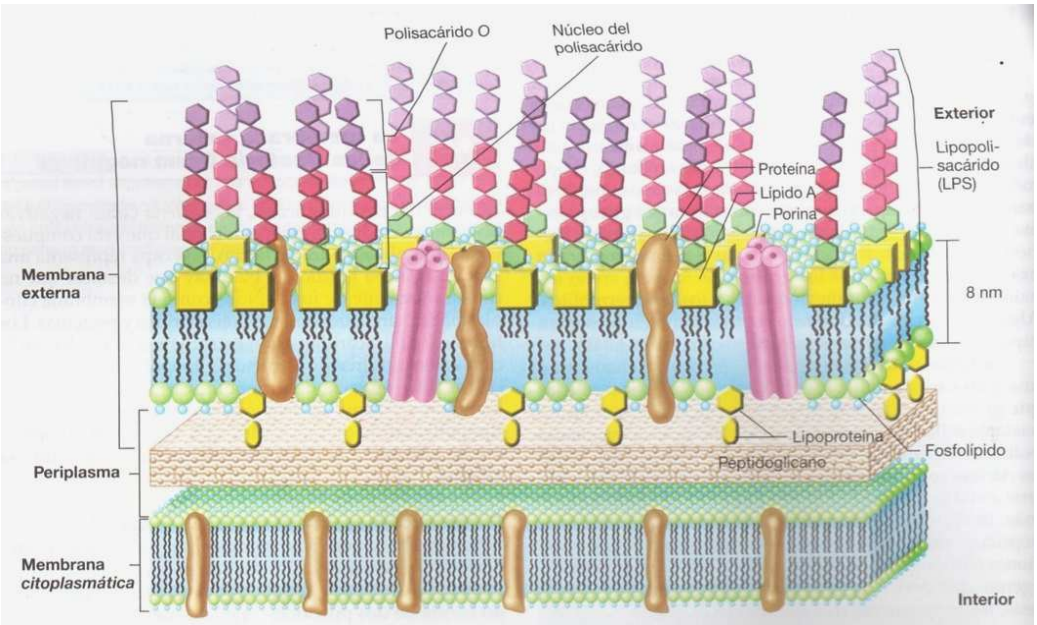

Figura 3: Pared celular Gram-negativa. Disposición de lipopolisacáridos, lípido A, porinas y lipoproteínas en la membrana externa
(Madigan *et al.*, 2004).

1.4.3.1 Estructura de los LPSs

Los LPS son glucolípidos anfipáticos complejos que estructuralmente pueden dividirse en tres dominios: lípido A, núcleo del polisacárido (NP) y antígeno O.

Una cadena corta de monosacáridos, unida al lípido A, constituye el núcleo del polisacárido. El antígeno O es un polisacárido constituido por unidades

de monosacáridos u oligosacáridos repetidos, muy variables; está unido al NP y es el dominio distal de la molécula de LPS (figura 3).

Lípido A

La parte lipídica del lipopolisacárido la constituye el lípido A. Este no es un lípido de glicerol, sino que los ácidos grasos se unen por una unión amino éster a un disacárido compuesto de N-acetilglucosamina-fosfato. El disacárido se une al núcleo de polisacárido a través del KDO (cetodesoxioctanato).

Los ácidos grasos que normalmente se encuentran en el lípido A son: ácido caproico, laúrico, mirístico, palmítico y esteárico (Madigan *et al.*, 2004).

Al comparar las estructuras descriptas en al familia *Rhizobiaceae,* se observa una gran heterogeneidad en los patrones de acilación. Gran parte de esta heterogeneidad se encuentra en la unidad proximal del disacárido.

En *Rhizobiaceae* sólo hay un derivado aciloxi-acil, unido por un enlace amida a la GlcN (N acetilglucosamina) distal. Este derivado contiene un ácido graso hidroxilado extra largo que es típico de toda la familia *Rhizobiaceae* y también está presente en otras bacterias simbióticas o patógenas (Ormeño-Orrillo, 2005).

Núcleo del polisacárido (NP)

Este dominio de los LPS es el que ha sido estudiado con menos detalle a nivel estructural. Hasta la fecha sólo se han determinado las estructuras completas de dos NP en *Rhizobiaceae.*

La primera estructura resuelta completamente correspondió a la cepa CE3 de *R. etli*. La molécula consta de tres residuos de KDO, tres de GalA (ácido galacturónico), uno de Man (manosa) y uno de Gal (galactosa). 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.

Si bien no se ha determinado la estructura del NP de alguna cepa de *Sinorhizobium*, sí se ha determinado la composición de azúcares en cepas de *S. meliloti y S. fredii*. Todas poseen KDO, Glc (glucosa), Gal

(galactosa), GlcA (ácido glucurónico) y GalA (ácido galacturónico). La mayoría tienen Man (manosa) y algunas tienen DHA (ácido 3-desoxi-2-heptulosárico) (Ormeño-Orrillo, 2005).

En general, el NP está compuesto por KDO, azúcares de siete carbonos (heptosas), glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina. (Madigan *et al.*, 2004)

Antígeno O

Esta es la parte más variable de la capa de LPS. Esta variabilidad surge por la naturaleza, el orden y los enlaces de los diferentes azúcares que lo componen. También pueden presentarse sustituciones, como metilaciones y acetilaciones, que añaden complejidad a la molécula.

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 (Ormeño-Orrillo, 2005).

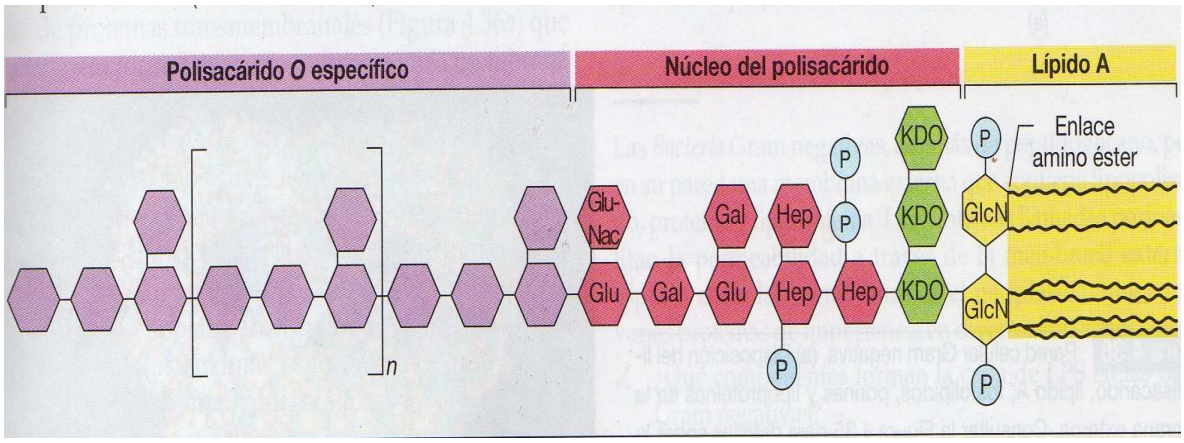

Figura 4: Estructura del lipopolisacárido de bacterias Gram-negativas. La composición química exacta del lípido A y de los polisacáridos varía entre las diferentes especies de Gram negativas, pero la secuencia de los elementos principales (lípido A—KDO—núcleo--antígeno O específico) suele ser uniforme. El polisacárido O varía siempre entre especies (Madigan *et al.*, 2004).

1.4.3.2 Importancia de los LPSs

Gracias a los LPS, la membrana externa tiene la capacidad de excluir compuestos hidrofílicos, siendo así una barrera de permeabilidad protectora contra muchos antibióticos y xenobióticos.
Los polisacáridos de superficie, incluidos los LPS, intervienen en la interacción entre las plantas y las bacterias simbiontes o patógenas.
En rizobios, los LPS son esenciales para que las bacterias colonicen las células del interior de los nódulos de tipo determinado. La función de los LPS no fue clara durante muchos años, sin embargo ahora se reconoce que son determinantes de la competitividad y efectividad simbióticas. En *Agrobacterium* los LPS son factores de virulencia que intervienen en la adhesión de las células a las raíces de la planta hospedera (Ormeño-Orrillo, 2005).

1.4.3.3 Análisis de LPS

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 *et al.*, 1997).

1.5 Rizobios y densidad celular

Las poblaciones rizobianas regulan coordinadamente la expresión de los genes mediante la producción de moléculas señal difusibles. Estas señales, conocidas como autoinductores, se acumulan extracelularmente e interactúan específicamente con proteínas receptoras. De esta forma, dichas señales difusibles actuarían induciendo la expresión de genes en respuesta a la densidad celular, en un proceso denominado *quorum sensing*.

El fenómeno de *quorum sensing* ha sido implicado en la regulación de algunos aspectos del proceso de simbiosis. Uno de los mecanismos de *quorum sensing* mejor caracterizados, se encuentra en los bacterias Gram-negativas, e involucra la síntesis de homoserina lactonas (AHLs) como molécula señal. Para el caso específico de *B. japonicum* (simbionte de soja), se ha determinado que en cultivos de alta densidad, se liberaría, además, una molécula pequeña, CDF, por "cell density factor", también designada como bradyoxetina, que inhibiría la expresión de los genes nod. (Swift *et al.,* 1996; Parsek *et al.*, 2000; Fuqua *et al.,* 2001; Whitehead *et al.*, 2001; Withers *et al.,* 2001; Winzer *et al.*, 2002; Loh and Stacey, 2003). Por lo tanto la expresión óptima de los genes de nodulación en esta especie rizobiana ocurre solamente a bajas densidades celulares (Yuen and Stacey, 1996; Fuqua and Greenberg, 1998; Loh *et al.*, 2001; Wisniewski and Downie, 2002).

Como se describió anteriormente, los polisacáridos bacterianos son esenciales en diferentes etapas de la simbiosis efectiva entre los rizobios y el huésped específico. El hecho de que los sistemas *quorum sensing* bacterianos afectan el proceso simbiótico, permite plantear la posibilidad de que regulen la producción de polisacáridos.

Con respecto a EPS, Pellok y col. (2002) hallaron que la síntesis de EPS II en la especie S. meliloti está regulada por señales quorum. Por otra parte, Marketon y col. (2003), demostraron que una mutante con el sistema quorum afectado era incapaz de producir EPS II y de inducir nodulación efectiva.

Estos hallazgos enfatizan el rol del sistema de sensado de quorum en la simbiosis afectando la síntesis y nivel de expresión de polisacáridos intervinientes en la simbiosis rizobio-leguminosa.

Estos antecedentes en su conjunto explicarían el comportamiento simbiótico de los inoculantes de soja en lo referido a la escasa capacidad competitiva observada en algunos casos, ya que los mismos son elaborados y aplicados a campo en altas densidades. Se desconoce hasta el momento si idénticos efectos son producidos en otras especies rizobianas como consecuencia de señales que se disparan por la acción del sistema de percepción del quorum.

2. Hipótesis y Objetivos

La hipótesis de este trabajo fue 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 EPS, LPS, KPS y proteínas totales.

El objetivo fue conocer si las diferentes 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 exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS), polisácaridos capsulares (KPS) y proteínas totales.

3. Materiales y métodos

3.1 Microorganismos

Se utilizaron para el desarrollo del trabajo los siguientes microorganismos: *Rhizobium tropici* CIAT 899, cedido gentilmente por el Dr Jorge Angellini, UNRC, *Bradyrhizobium elkanii* U1302 y *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080, cedidos gentilmente por el MSc Carlos Labandera, Laboratorio de Microbiología del Suelo y Control de Inoculantes, MGAP (Uruguay).

3.1.2 Métodos de conservación

Los métodos de conservación para los microorganismos que se utilizaron fueron: agar inclinado y congelación.

agar inclinado: esta técnica de conservación consistió en sembrar por estriado, tubos inclinados con medio sólido YEM (tubos pico de flauta). Para ello, se sembró desde el fondo del tubo y se avanzó hasta la superficie realizando movimientos ascendentes en zig-zag.
Luego de sembrar los tubos, se colocaron en estufa a 29ºC. Una vez desarrollados, se cubrieron con film plástico y se guardaron en heladera a una temperatura de 4ºC.

congelación: esta técnica consistió en resuspender las células a congelar en glicerol (agente crioprotector) y mantenerlas a baja temperatura. La suspensión celular se colocó en forma aséptica en tubos eppendorff con glicerol al 30%. Posteriormente, se agitaron en vortex hasta lograr una suspensión homogénea. Luego se colocan en freezer a -14ºC (Hunter, 1995).

3.1.3 Condiciones de operación

Las células, sembradas en el medio de cultivo en una proporción al 10% del volumen, fueron cultivadas en escala de agitador rotatorio, a 250 rpm y 2,5

cm de excentricidad, en cuarto estufa a 30ºC, hasta alcanzar distintas densidades celulares.

3.1.4 Medios de cultivo

Los medios de cultivos que se utilizaron para el crecimiento de los microorganismos fueron:

componentes	composición (g/l)
KH_2PO_4	0,085
K_2HPO_4	0,085
$MgSO_2.7H_2O$	0,37
$CaCl_2.2H_2O$	0,075
KNO_3	0,505
$FeSO_4.H_2O$	0,005
$EDTANa_2$	0,01
$NaMoO_4.2HO$	0,005
glicerol	4,6
manitol	1,82
extracto de levadura	2
pH	7

Tabla 1: Composición del medio de cultivo 20-E (medio rico).

Drogas	cantidad/ l
sales*	50ml
Fe-EDTA	500µl
vitaminas**	500µl
HEPES	4,766g
NH_4CL	2mg
manitol	20mg

Tabla 2: Composición del medio de cultivo MSM (medio mínimo)

*<u>*Solución de sales*</u>: 0,25 g/l de $MgSO_4.7H_2O$; 0,2 g/l de NaCl; 0,02 g/l de $CaCl_2$.$2H_2O$; 0,05 g/l de K_2HPO_4

**Solución de micronutrientes:* 15 g/l de Fe- EDTA; 0,23 g/l de $NaMoO_4$. $2H_2O$; 0,25 g/l de H_3BO_3; 0,14 g/l de $MnSO_4$. H_2O; 0,001 g/l de $CaCl_2$.6 H_2O; 1 g/l de Tiamina. HCl; 2 g/l Pantotenato de Ca; 0,001 g/l de Biotina; 0,02 g/l $CuSO_4.5H_2O$; 0,16 g/l de $ZnSO_4.7H_2O$

Componentes	Composición (g/l)
manitol	7,3
sales*	200 ml
$MgSO_4$	0,493
$CaCl_2$	0,015

Tabla 3: Composición del medio de cultivo M 9 (medio mínimo)

* Sales: 64 g/l de $Na_2HPO_4.7H_2O$; 15g/l de KH_2PO_4; 2,5 g/l de NaCl; 5 g/l de NH_4Cl. pH: 7

3.1.5 Determinación del crecimiento celular

3.1.5.1 Recuento de número de células viables

Uno de los métodos que se utilizó para la determinación del crecimiento celular fue mediante la técnica de recuento de células viables, que consistió en diluciones seriadas de la muestra y posterior siembra en placas de Petri adicionadas de medio de cultivo (Koch, 1981).

El medio utilizado para el crecimiento bacteriano es YEM, cuya composición se muestra en la tabla 4.

componentes	cc
manitol	
KH_2PO_4	
MgSO	
NaCl	
Ext. de levadura	
Rojo congo	
Agar	

Tabla 4: Composición del medio de cultivo YEM

Las placas se llevaron a estufa a 29ºC hasta que se desarrollaron colonias. Se consideró que cada célula viable forma una colonia y se tomaron como valores estadísticamente válidos, aquellos que se encontraron en el intervalo 30-300 colonias por placa.

3.1.5.2 Medición de unidades de densidad óptica (UDO)

Otro método utilizado para la determinación del crecimiento celular fue la determinación de UDO, que se realizó utilizando un espectrofotómetro Metrolab UV-visible a una longitud de onda de 550 nm, usando un blanco de agua destilada. Se consideraron valores óptimos los que se encontraron en el intervalo 0,2-0,8.

3.1.5.3 Cálculo de los parámetros cinéticos de crecimiento celular

Los parámetros cinéticos que se determinaron fueron: **velocidad específica de crecimiento (μ)** y **tiempo de generación (tg)**. Los mismos, se calcularon de acuerdo a las ecuaciones siguientes:
(Ertola *et al.*, 2001)

Velocidad espécifica de crecimiento= $\mu = \ln(x/x_0)/t$
Tiempo de generación= $tg = \ln 2/\mu$

donde:
x: concentración final de células (expresada como número de células viables/ml o en unidades de DO)
x_0: concentración inicial de células (expresada como número de células viables/ml o en unidades de DO)
t: intervalo de tiempo considerado.

3.2 <u>Determinación de lipopolisacáridos celulares (LPSs)</u>

3.2.1 Preparación de la muestra

Se sembró un cultivo bacteriano a partir de una ansada de un cultivo bacteriano conservado en agar inclinado sembrado en 100 ml de medio rico. Luego, se procedió al centrifugado de los 100 ml a 12000 rpm durante 30 minutos.

Posteriormente, se llevó a cabo la extracción realizando un tratamiento alcalino en ebullición según la técnica descripta por Hitchock y Brown (1983).

Los pasos de la misma se describen a continuación:

- Se resuspendió el pellet en 50µl de buffer lisis*
- Se incubó en baño de agua a 100ºC durante 10 minutos
- Se enfrió a temperatura ambiente
- Se agregó 10µl de proteinasa K
- Se incubó a 60ºC durante una hora
- Se centrifugó 15 minutos a 4000 rpm
- Se tomó 50µl del sobrenadante
- Se agregó 100 µl de buffer muestra*
- Se guardó en freezer a -20ºC

*Composición de buffers:

-*Buffer de lisis*: 1M Tris-HCL pH: 6,8; 2% SDS; 4% ß-mercaptoetanol; 10% glicerol; 0,005% azul de bromofenol

-*Buffer de muestra:* 120mM Tris-HCL pH: 6,8; 3%SDS; 9% ß-mercaptoetanol; 30% glicerol; 0,03% azul de bromofenol.

3.2.2 Preparación del gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para lipopolisácaridos

Para la realización de los geles de poliacrilamida se utilizó la técnica descripta por Laemmli *et al.*, 1970.

En la tabla 5 se indican las diferentes soluciones y la concentración de las mismas para la realización de los distintos geles:

soluciones	gel separador	gel concentrador
H_2O (mili Q)	2,3ml	4,2ml
buffer del gel*	3,35ml	1,5ml
glicerol	1,04ml	
Stock Acril Bis**	3,35ml	0,5ml
APS***	40ụl	150ụl
TEMED	40ụl	1 gota

Tabla 5: Composición de los geles para la determinación de LPS

* Buffer del gel: se preparo añadiendo 36,342 g de Tris 3M y 0,3 g de SDS 0,3% a 100 ml de agua mili Q, pH: 8,46.

**Stock Acril Bis: se preparó de la siguiente manera: a 100 ml de agua bidestilada se le agregan 46,5 g de acrilamina y 3 g de bisacrilamina.

***APS: Persulfato de amonio: se preparó disolviendo 150 mg de persulfato de amonio en 1,5 ml de agua miliQ.

3.2.3 Desarrollo de la electroforesis

La electroforesis se llevó a cabo en una cuba electroforética MiniProtean 3 de Biorad de 10×10 cm, manteniendo el amperaje constante (30 mA) y utilizando buffer cátodo y buffer ánodo.

Composición de buffers:

-*Buffer ánodo*: 0,2M Tris-HCL pH: 8,9

-*Buffer cátodo*: 0,1M Tris; 0,1M Tricina; 0,1% SDS pH: 8,5

3.2.4 Revelado del gel

El revelado se efectuó según los siguientes pasos:

- Se colocó el gel en solución fijadora durante toda la noche
- Se lavó con agua destilada
- Se adicionó solución oxidante y se dejó reposar durante 5 minutos
- Se lavó 3 veces con agua mili Q durante 15 minutos
- Se colocó la solución de teñido durante 10 minutos (en oscuridad)

- Se lavó con agua destilada durante 15 minutos
- Se agregó solución reveladora hasta la aparición de bandas (30 seg.-2 minutos)
- Se detuvo la reacción con la solución correspondiente, tal como se detalla a continuación.

Soluciones utilizadas:

-*Solución fijadora*: 400 ml de etanol al 40%; 50 ml de ácido acético glacial al 5%
- *Solución oxidante*: ácido peryódico al 0,7% en agua
-*Solución de teñido*: 70 ml de agua mili Q; 1,4 ml de NaOH; 1 ml de NH_4OH al 25%; 2,5ml de $AgNO_3$ al 20% (agregar gota a gota)
- *Solución reveladora*: 100 ml de agua mili Q; 50 µl de formaldehido al 37%; 50 µl de ácido cítrico (100 mg/ml)
-*Solución para detener la reacción*: ácido acético al 0.5%

3.3 Determinación de proteínas celulares totales

Para realizar la determinación de las proteínas celulares totales, las muestras se trataron siguiendo el protocolo descripto por Laemmli UK., 1970.

3.3.1 Preparación de la muestra

La extracción de las proteínas totales se realizó siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

- Se centrifugó los cultivos bacterianos (100 ml) a 12000 rpm
- Se resuspendió el pellet en 1 ml de NaCl (0.85%)
- Se centrifugó 10 minutos
- Se resuspendió el pellet en 0.5 ml de tampón de extracción.
- Se centrifugó 10 minutos.

- Se resuspendió el pellet en 1 ml de tampón de sonicación.
- Se sonicó (3 vueltas de 30 segundos c/u)
- Se centrifugó 10 minutos.

Soluciones utilizadas

-*Tampón de extracción*: 1,21 g de Tris en 100 ml de agua pH: 7,2 con HCl 0,1M; 0,101 g de $MgCl_2$. $6H_2O$ en 5 ml de agua destilada; 15 g de glicerol; 100 µl de mercaptoetanol

-*Tampón de sonicación*: 1,21 g de Tris (0,1 M); 15 g de glicerol. Llevar a 100 ml con agua destilada, pH: 8,8 con HCl

3.3.2 Determinación de la concentración de proteínas

Para la determinación de proteínas se utilizó el micro método de Bradford (1976) para el cual se tomaron 100µl del sobrenadante de las muestras sonicadas y se le adicionaron 1 ml del reactivo de Bradford.
Luego se leyó la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 595 nm utilizando un blanco con agua mili Q y el reactivo.
También, se realizó una serie de patrones con la siguiente concentración:

	Blanco	**P1**	**P2**	**P4**	**P6**	**P8**	**P10**
H_2O (µl)	100	90	80	60	40	20	0
BSA (µl)	0	10	20	40	60	80	100
Reactivo Bradford (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

BSA: solución patrón: seroalbúmina bovina

Preparación del reactivo de Bradford: se disolvió 100 mg de Azul de Coomasie brillante G-250 en 50ml de etanol al 95% y se adicionó 100 ml de ácido fosfórico (85% p/v), completándose hasta un volumen final de 1 litro con agua mili Q. La solución se filtró 3 veces a través de un papel de filtro hasta desaparición de color azul.

3.3.3 Preparación del gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) para proteínas

En la siguiente tabla se detalla la composición y concentración de las soluciones utilizadas para la preparación de los geles separador y concentrador.

soluciones	gel separador (12%)	gel concentrador (4%)
Acril- Bis	12 ml	1,3 ml
Agua	10,05 ml	6,1 ml
SDS 10%	0,3 ml	100 µl
Tris HCL*, pH:8,8	7,5 ml	
APS 10%	150 µl	50 µl
TEMED	15 µl	10 µl
Tris HCL**, pH:6,8		2,5 ml

Tabla 6: Composición y concentración de las soluciones para la preparación de los geles.

**Tris/HCl 1,5M pH 8,8*: 18,15 g de Tris en 50 ml de agua destilada, se añadió gota a gota HCl concentrado hasta que el pH baje a 8,8 y se completó con agua destilada hasta el volumen final (100 ml)

***Tris/HCl 1 M pH 6,8*: 12,1 g de Tris en 50 ml de agua destilada, se añadió gota a gota HCl concentrado hasta que el pH baje a 6,8 y se completó con agua destilada hasta el volumen final (100 ml)

3.3.4 Desarrollo de la electroforesis

La electroforesis se desarrolló en una cuba electoforética Protean II de Biorad de 20×20 cm, a voltaje constante (200 V) y utilizando buffer de corrida de la siguiente composición: 3 g/l de Tris; 14,4 g/l de glicina; 1 g/l de SDS.

3.4 Extracción y determinación de exopolisacáridos (EPS)

La extracción y determinación de EPS se realizó de acuerdo a la técnica descripta por Del Gallo y Haegi (1990):

3.4.1 Determinación de EPS

Los cultivos celulares fueron centrifugados a 8000 rpm por 30 min a 4ºC, con la finalidad de precipitar las células. El sobrenadante fue precipitado con tres volúmenes de etanol frío a -20ºC, durante toda la noche. Luego, se centrifugó a 12000 rpm por 30 min a 4ºC, para obtener los EPS.
Ese precipitado se colocó en estufa a 37ºC durante toda la noche para eliminar los restos de alcohol.
Por último, fue resuspendido en buffer PBS.

- *Buffer PBS*: 8 g/l de NaCl; 0,2 g/l de KCl; 1,44 g/l de Na_2HPO_4; 0,24 g/l de KH_2PO_4 pH: 7,4

3.4.2 Cuantificación de los EPS por el método de la Antrona

La determinación de la concentración de EPS resuspendidos en buffer PBS, se realizó siguiendo el método descripto por Dische, 1962.
Para ello, se tomaron 0,5 ml de la solución problema (EPS en buffer PBS) y se enfriaron en hielo durante 10 minutos. Luego, se agregaron 2,5 ml del reactivo A (descripto a continuación) y se mezclaron con agitación enérgica. Se colocaron rápidamente en agua a 100ºC durante 10 minutos y se pasaron a un baño de hielo por 5 min.
Se estabilizaron durante 5 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm, utilizando un blanco con agua miliQ y reactivo A.
Para la construcción de la curva patrón se realizaron una serie de patrones de distintas concentraciones, utilizando una solución madre de galactosa con una concentración de 2 mg/ml.

- *Reactivo A*: 60 ml de la solución de H_2SO_4 (250 ml de ácido + 100 ml de agua destilada); 120 mg de Antrona. Esta solución se preparó al momento de utilizarla.

3.4.4 Determinación de polisacáridos capsulares (KPS)

Para realizar la cuantificación de los polisacáridos capsulares, los cultivos celulares se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min para precipitar las células. El pellet obtenido fue resuspendido en 5 ml de NaCl 0,5 M y homogeneizado en vortex durante 5 min. Luego, se agregaron 5 ml más de NaCl 0,5 M y se centrifugaron durante 25 minutos. El sobrenadante obtenido se precipitó con tres volúmenes de etanol frío a -20ºC, y se guardó en freezer durante toda la noche. Luego, se centrifugó a 12000 rpm por 30 min a 4ºC, para obtener los KPS precipitados.

Este precipitado, se colocó en estufa a 37ºC durante toda la noche para eliminar los restos de alcohol. Por último, fue resuspendido en buffer PBS. La muestras resuspendidas se trataron según el método de la Antrona, descripto anteriormente para la cuantificación de EPS.

4. Resultados y Discusión

4.1 Caracterización del crecimiento de los microorganismos en estudio:

Para la caracterización del crecimiento celular de los microorganismos se realizaron curvas de crecimiento celular en función del tiempo mediante la determinación de las unidades formadoras de colonia (UFC/ml) y unidades de densidad óptica (UDO). Estos ensayos permitieron establecer las horas de proceso correspondientes a cultivos de alta densidad celular provenientes de fase estacionaria del crecimiento, y cultivos de baja densidad celular que corresponderían a la fase exponencial. Estos resultados, permitirían estudiar, en ensayos posteriores, si altas densidades celulares afectan la producción de los diferentes componentes celulares, tales como los perfiles de LPS y proteínas celulares totales, EPS y KPS, en relación a cultivos de baja concentración celular.

El crecimiento celular de los tres microorganismos se realizó en medios de cultivo mínimo descriptos en materiales y métodos. Se evaluó la cinética del crecimiento celular mediante el cálculo de la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de generación.

4.1.1 Determinación de las curvas de crecimiento celular en medio de cultivo mínimo

En una primera serie de ensayos se decidió realizar el desarrollo de los microorganismos en medio mínimo, con el objetivo de lograr mayor reproducibilidad de los experimentos y evitar la posible incidencia de distintos componentes de los medios de cultivos sobre las variables que se buscaban estudiar.

Para ello, se realizaron ensayos preliminares de selección de medios de cultivo y fuentes de carbono adecuadas para cada microorganismo en estudio. Se ensayaron los medios mínimos MSM y M9 (tablas 2 y 3 respectivamente), utilizando como fuente de carbono manitol, glucosa, sacarosa ó glicerol.

Para los tres microorganismos que se estudiaron, se seleccionó el medio MSM y manitol como fuente de carbono, en base al buen desarrollo y la concentración celular alcanzada.

A partir de esta selección se realizaron las curvas de crecimiento celular, considerando UFC/ml y UDO, para cada microorganismo. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

4.1.1.1 Curva de crecimiento celular de *Bradyrhizobium elkanii* U 1302

❖Determinación de las UFC/ml con respecto al tiempo en medio mínimo MSM manitol

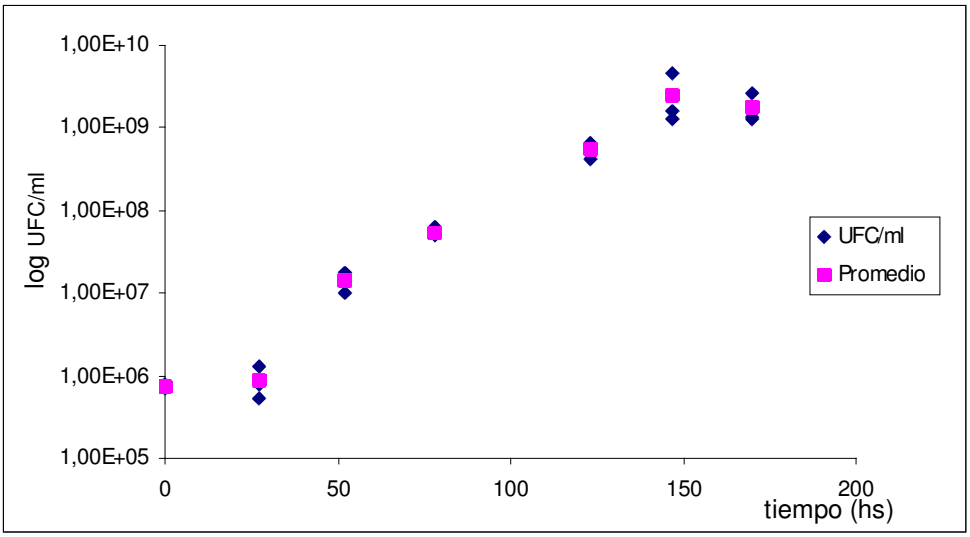

Figura 6: Curva de crecimiento celular determinada por las UFC/ml con respecto al tiempo de <u>*Bradyrhizobium elkanii*</u> U1302 *en medio mínimo MSM manitol. Los valores promedios fueron obtenidos a partir de 3 repeticiones.*

❖ **Evolución de los valores de UDO en medio mínimo MSM manitol**

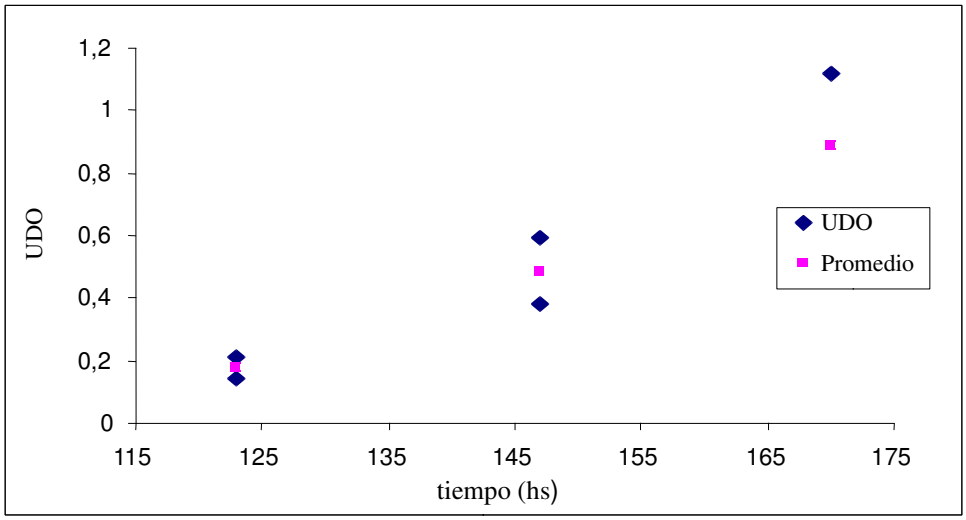

Figura 7: Curva de crecimiento celular determinada a partir de la evolución de los valores de UDO para Bradyrhizobium elkanii U1302 *en medio mínimo MSM Manitol.*

4.1.1.2 Curva de crecimiento celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899

❖**Determinación de las UFC/ml con respecto al tiempo en medio mínimo MSM manitol**

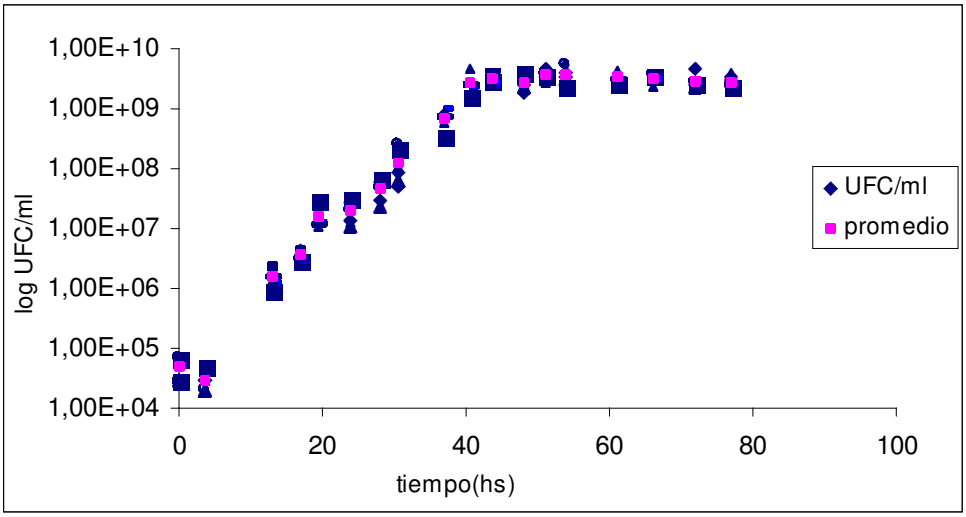

Figura 8: Curva de crecimiento celular determinada por las UFC/ml con respecto al tiempo de Rhizobium tropici CIAT 899 *en medio mínimo MSM manitol.*

❖ **Evolución de los valores de UDO en medio mínimo MSM manitol**

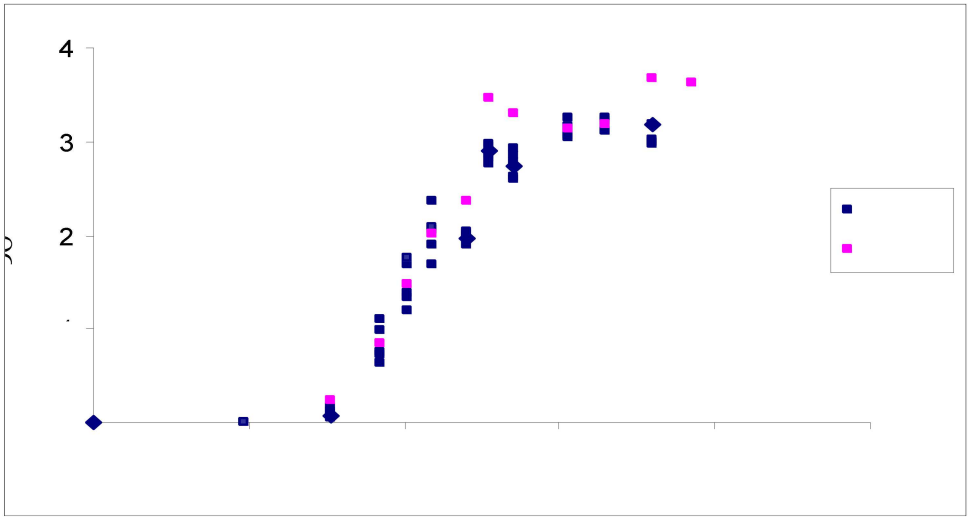

Figura 9: Curva de crecimiento celular determinada a partir de la evolución de los valores de UDO para <u>*Rhizobium tropici*</u> CIAT 899 *en medio mínimo MSM manitol.*

4.1.1.3 Curva de crecimiento celular de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080

❖**Determinación de las UFC/ml con respecto al tiempo en medio mínimo MSM manitol**

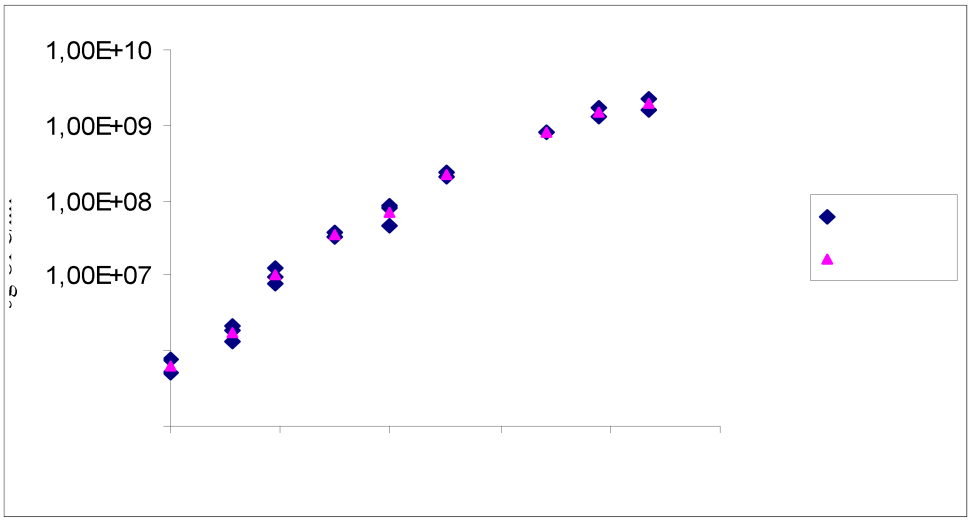

Figura 10: Curva de crecimiento celular determinada por las UFC/ml con respecto al tiempo de <u>*Bradyrhizobium japonicum*</u> SEMIA 5080 *en medio mínimo MSM manitol.*

❖ **Evolución de los valores de UDO en medio mínimo MSM manitol**

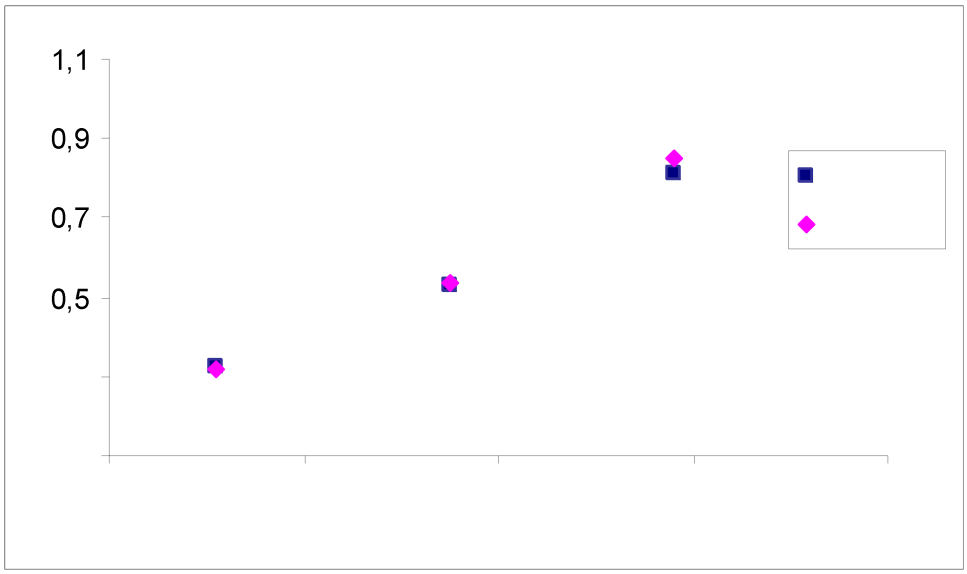

Figura 11: Curva de crecimiento celular determinada a partir de la evolución de los valores de UDO para *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080 *en medio mínimo MSM manitol.*

Luego de esta serie de ensayos, se continuó con las determinaciones propuestas en el plan de trabajo. Se observó que la concentración celular alcanzada, en fase exponencial no era suficiente como para permitir obtener los resultados buscados. Por este motivo, y con el objetivo de alcanzar mayores concentraciones celulares, a fin de obtener una buena resolución en los perfiles electroforéticos, se dicidió realizar los estudios de crecimiento celular para cada microorganismo, en medio rico.

4.1.2 Curvas de crecimiento celular en medio de cultivo enriquecido

El medio de cultivo enriquecido que se utilizó para el desarrollo de los microorganismos fue el medio 20 E, cuya formulación se detalla en materiales y métodos (tabla 1). Para la realización de este medio de cultivo se utilizó un stock de drogas constante para que su preparación no influyera de manera significativa en los parámetros analizados y, además, obtener una mayor reproducibilidad de resultados.
Los datos obtenidos se muestran en las figuras siguientes.

4.1.2.1 Curva de crecimiento celular de *Bradyrhizobium elkanii* U1302

❖**Determinación de las UFC/ml con respecto al tiempo en medio rico 20E**

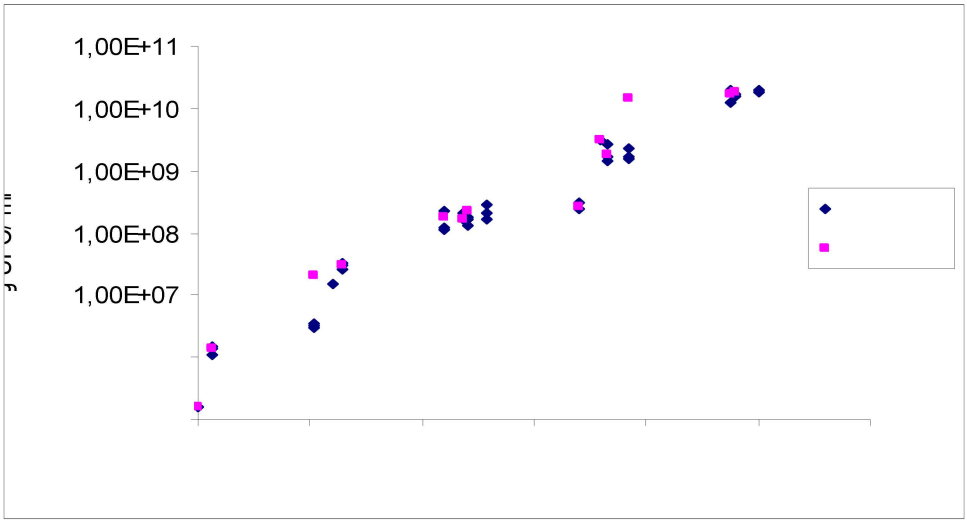

Figura 12: Curva de crecimiento celular determinada por las UFC/ml con respecto al tiempo de <u>*Bradyrhizobium elkanii*</u> U 1302 *en medio rico 20E.*

❖ **Evolución de los valores de UDO en medio rico 20E**

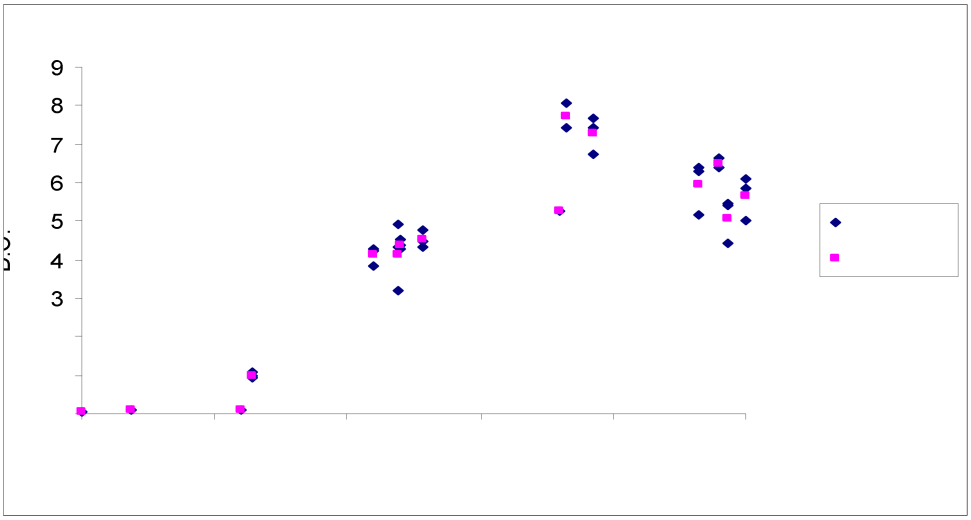

Figura 13: Curva de crecimiento celular determinada a partir de la evolución de los valores de UDO para <u>*Bradyrhizobium elkanii*</u> U 1302 *en medio en medio rico 20E.*

En base a las curvas de crecimiento celular, representadas en las figuras 12 y 13, se determinaron los parámetros cinéticos velocidad específica de crecimiento y tiempo de generación, obteniéndose los siguientes resultados:

$\mu_{máx} = 0.024\ h^{-1}$
$\mu_{total} = 0.11\ h^{-1}$
$t_g = 6.3\ h$

La $\mu_{máx}$ representa la velocidad específica máxima de crecimiento celular, que fue calculada en el intervalo de tiempo entre 44 y 51,5 h. En estos tiempos, se encontró una densidad celular de 2.3E8 y 2.76E8 respectivamente.
La μ_{total} representa la velocidad específica de crecimiento total, que se calculó en el intervalo de tiempo de 20:75 y 100 h. En este intervalo, las concentraciones inicial y final fueron de 1.88E10 y 3.07E6 respectivamente.
El t_g representa el tiempo de generación del microorganismo, que se calculó considerando la μ_{total} .

Además, se establecieron los tiempos de proceso necesarios para lograr una concentración celular adecuada, que nos permitiera establecer puntos de baja y alta densidad celular para seguir con los ensayos posteriores. Los valores de las UFC/ml y las UDO correspondientes se muestran en la siguiente tabla:

Fases	*Tiempo de proceso*	*UFC/ml*	*UDO*
Exponencial	24 hs	1,50E+07	0,081
Estacionaria	72 hs	3,00E+09	5,28

4.1.2.2 Curva de crecimiento celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899

❖ **Determinación de las UFC/ml con respecto al tiempo en medio rico 20 E**

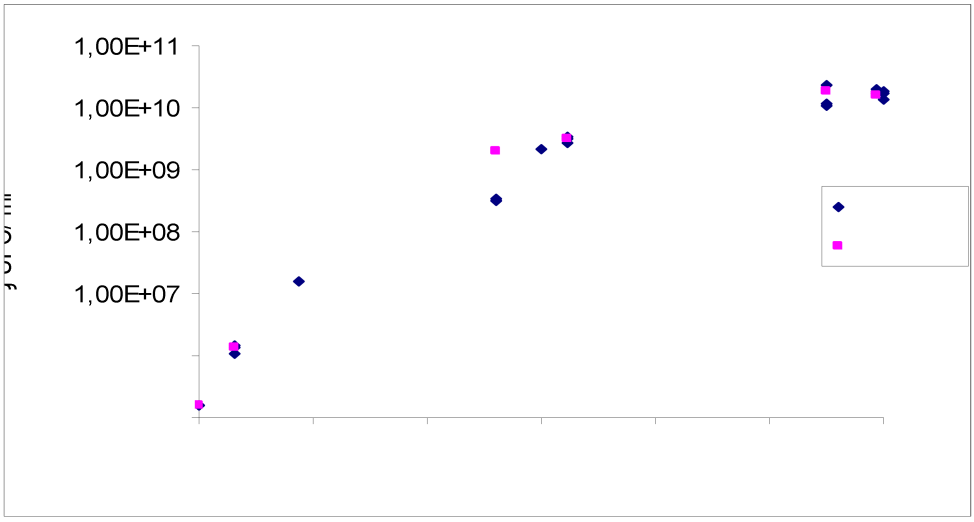

Figura 14: Curva de crecimiento celular determinada por las UFC/ml con respecto al tiempo de <u>*Rhizobium tropici*</u> CIAT 899 *en medio rico 20E.*

❖ **Evolución de los valores de UDO en medio rico 20E**

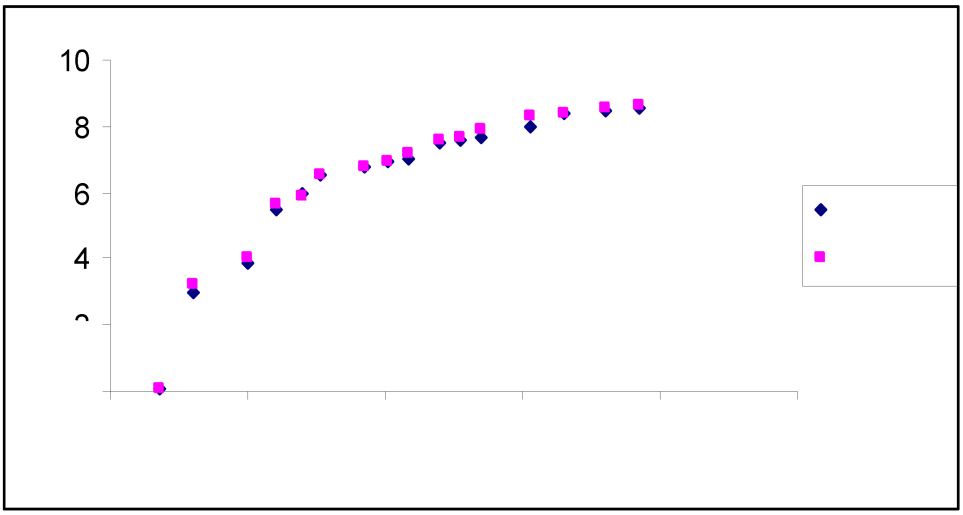

Figura 15: Curva de crecimiento celular determinada a partir de la evolución de los valores de UDO para <u>*Rhizobium tropici*</u> CIAT 899 *en medio rico 20E.*

En base a las curvas de crecimiento celular mostradas en las figuras 14 y 15 se calcularon la velocidad específica de crecimiento (máxima y total) y el tiempo de generación. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

$\mu_{máx}$ =0.461h^{-1}

μ_{total} =0.205 h^{-1}

t_{total} = 3.38 h

La $\mu_{máx}$ representa la velocidad específica máxima de crecimiento celular, que fue calculada en el intervalo de tiempo entre 15 y 20 h. En estos tiempos de proceso, se determinó una densidad celular de 1E8 y 1E9 respectivamente.

La μ_{total} representa la velocidad específica de crecimiento total, que se calculó en el intervalo de tiempo entre 2.5 y 48 h. En este intervalo, las concentraciones inicial y final fueron de 1.4E6 y 1.6E10 respectivamente.

El t_g representa el tiempo de generación del microorganismo, que se calculó considerando la μ_{total} .

Por otra parte, se calcularon los tiempos de proceso que permitieran obtener la concentración celular adecuada y las UFC/ml y las UDO alcanzadas en esos tiempos. Los resultados se muestran a continuación:

Fases	*Tiempo de proceso*	*UFC/ml*	*UDO*
Exponencial	7 hs	1,63E+07	0,094
Estacionaria	24 hs	2,10E+10	5,57

4.1.2.3 Curva de crecimiento celular de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080

❖ **Determinación de las UFC/ml con respecto al tiempo en medio rico 20E**

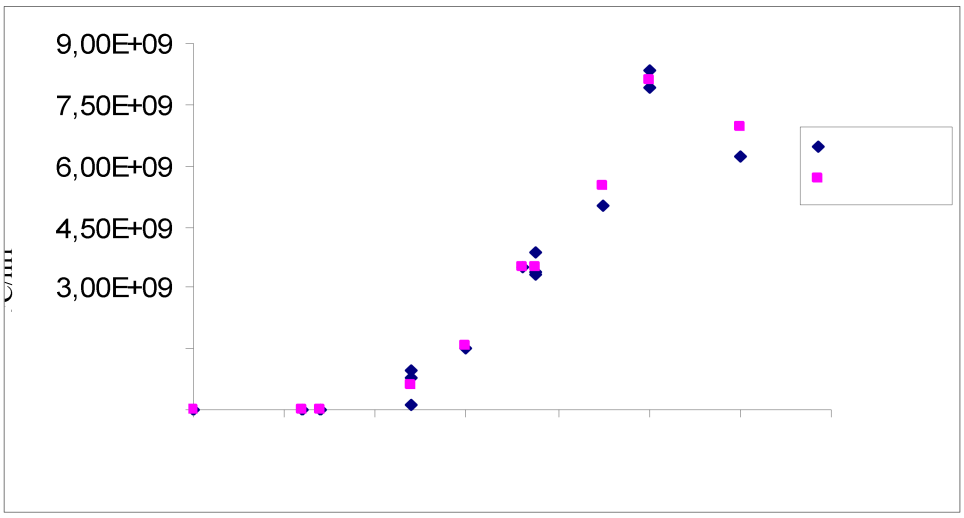

Figura 16: Curva de crecimiento celular determinada por las UFC/ml con respecto al tiempo de Bradyrhizobium japonicum SEMIA 5080 *en medio rico 20E.*

❖ **Evolución de los valores de UDO en medio rico 20E**

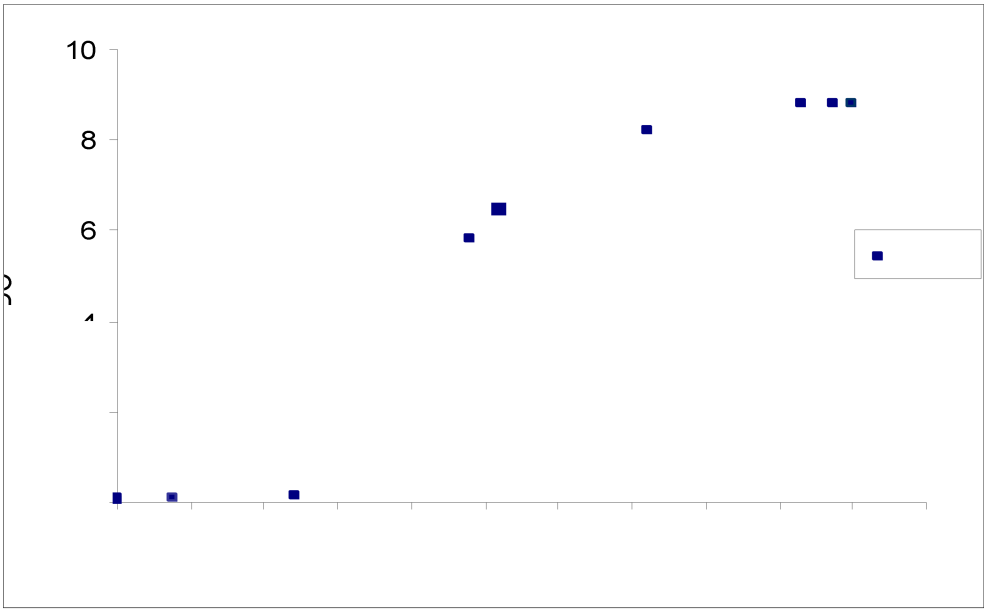

Figura 17: Curva de crecimiento celular determinada a partir de la evolución de los valores de UDO para Bradyrhizobium japonicum SEMIA 5080 *en medio rico 20E.*

Considerando las curvas de crecimiento celular representadas en la figuras 16 y 17, se calcularon los parámetros cinéticos, velocidad específica de crecimiento y tiempo de generación. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

$\mu_{máx} = 0.059 h^{-1}$

$\mu_{total} = 0.049\ h^{-1}$

$t_{total} = 14.1\ h$

La $\mu_{máx}$ representa la velocidad específica máxima de crecimiento celular, que fue calculada en el intervalo de tiempo entre 70 y 80 h. En estos tiempos de proceso, se determinó una densidad celular de 2.5E9 y 4.5E9 respectivamente.

La μ_{total} representa la velocidad específica de crecimiento total, que se calculó en el intervalo de tiempo entre 48 y 100 h. En este intervalo, las concentraciones inicial y final fueron de 6.3E8 y 8.11E9 respectivamente.

El t_g representa el tiempo de generación del microorganismo, que se calculó considerando la μ_{total} .

Además, se determinaron las UFC/ml con respecto al tiempo y las UDO, correspondientes a los puntos de la curva de crecimiento celular de alta y baja densidad celular. Los valores obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Fases	*Tiempo de proceso*	*UFC/ml*	*UDO*
Exponencial	24 hs	1,90E+07	0,095
Estacionaria	72 hs	3,50E+09	8,3

4.2 <u>Determinación de proteínas celulares totales</u>

El objetivo de esta serie de experimentos, fue comparar los perfiles de proteínas celulares totales, para los tres microorganismos en estudio, en cultivos con baja y alta densidad celular, correspondientes a las fases exponencial y estacionaria de crecimiento celular respectivamente. Para

ello, se calculó previamente la concentración de proteínas celulares totales en las muestras obtenidas en cada fase. Esta determinación permitió además estimar aproximadamente el volumen de siembra por calle del gel, que debía estar, según ensayos preliminares, alrededor de los 100µg para obtener una buena resolución.

4.2.1 Concentración de proteínas celulares totales

Para la determinación de la concentración de proteínas totales, se realizó una curva de calibración (según el método de Bradford) con las concentraciones de los patrones de SAB (seroalbúmina bovina), (detallados en materiales y métodos).
Los resultados obtenidos en esta serie de ensayos se presentan en la figura 18.

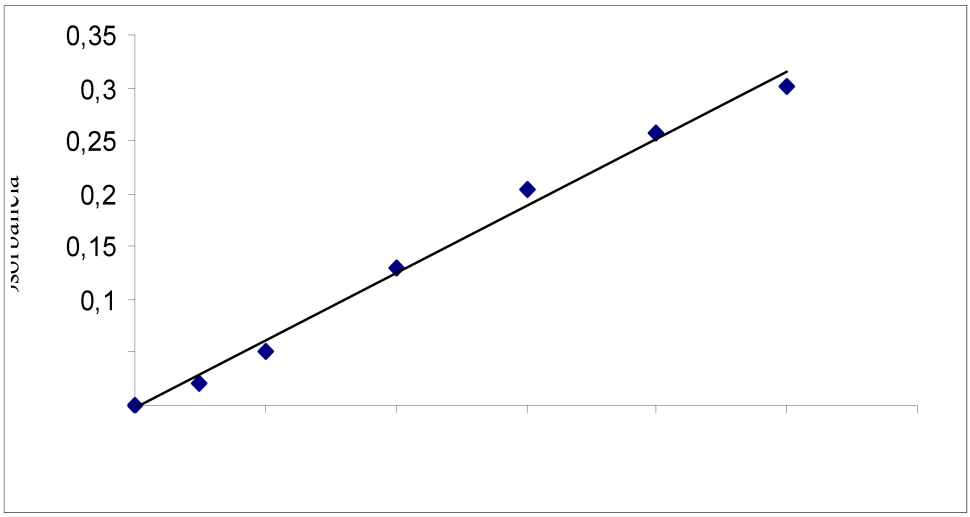

Figura 18: Relación entre Absorbancia y distintas concentraciones de SAB, obtenida para la determinación de proteínas celulares totales, según el método de Bradford.

El tratamiento estadístico de esta curva de calibración, nos permitió obtener la ecuación de la recta que relacionó las dos variables analizadas.
El valor de la misma fue

$$y= 0.0031x-0.003$$

A través de esta ecuación se calculó la concentración de proteínas celulares totales, determinando previamente las lecturas de las absorbancias obtenidas para la muestra de microorganismo en cada una de las fases estudiadas.

Los datos obtenidos se presentan en la siguiente tabla:

Microorganismo	**Fases en estudio**	**Concentración de proteínas celulares totales (µg/ml)**
Bradyrhizobium elkanii U 1302	exponencial	111,05
	estacionaria	282,2
Bradyrhizobium japonicum SEMIA 5080	exponencial	209,68
	estacionaria	367,5
Rhizobium tropici CIAT 899	exponencial	108,65
	estacionaria	212

Los resultados obtenidos mostraron que la concentración de proteínas celulares totales varía dependiendo de la fase de crecimiento del microorganismo. Para los microorganismos estudiados, se observó que los cultivos celulares en fase estacionaria presentaron una concentración de proteínas totales mayor que aquellos cultivos celulares que se encontraron en fase exponencial.

Para los microorganismos *Bradyrhizobium elkanii* U 1302, *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080 y *Rhizobium tropici* CIAT 899, se encontró una diferencia de concentración de proteínas celulares totales del 154%, 75% y 3.1% respectivamente, mayores, con respecto a las concentraciones pertenecientes a cultivos en fase exponencial.

Considerando estos resultados obtenidos, se calculó la dilución necesaria de cada muestra, con la finalidad de obtener concentraciones semejantes para cada muestra y en cada estadio considerado, de manera de poder realizar una comparación cuantitativa entre las mismas.

4.2.2 Realización del gel de proteínas

Para este ensayo, se procedió al armado de un gel de poliacrilamida para proteínas siguiendo los pasos descriptos en materiales y métodos.

Las muestras fueron diluidas con buffer muestra (detallado en materiales y métodos) hasta obtener una concentración de aproximadamente 100µg de proteína por calle del gel. Esta concentración permitió obtener una buena resolución de las bandas para ambas fases de crecimiento.

Se calculó un volumen de 20µl para la siembra de las muestras. Se realizó con una jeringa Hamilton de 10µl, para cada una de las calles del gel.

Los perfiles de proteínas celulares totales obtenidos para cada uno de los microorganismos en estudio se muestran a continuación:

*** Gel obtenido para cultivos de *Bradyrhizobium elkanii* U 1302, en distintas fases de crecimiento:**

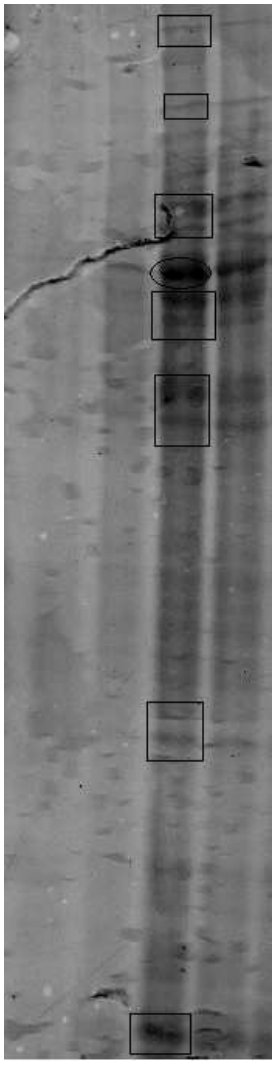

Figura 19: Perfil de proteínas celulares totales de Bradyrhizobium elkanii U 1302*: se representan bandas pertenecientes a muestras celulares en fase exponencial (calles 1 y 2) y a muestras en fase estacionaria (calles 3 y 4).*

Como se puede observar en la figura 14, las bandas de la fase estacionaria resultan diferentes con respecto a las bandas que aparecen en fase exponencial. Se observa que hay siete bandas diferentes pertenecientes a la fase estacionaria y una banda que difiere en la intensidad con respecto a la fase exponencial.

Estos resultaron mostraron que no sólo varía el contenido de proteínas celulares totales, 111 y 282µg/ml en la fase exponencial y estacionaria respectivamente, sino que también varían los perfiles de las mismas, mostrando diferencias en la expresión de genes de acuerdo a las distintas fases de crecimiento.

***Gel obtenido para *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080 en distintas fases de crecimiento:**

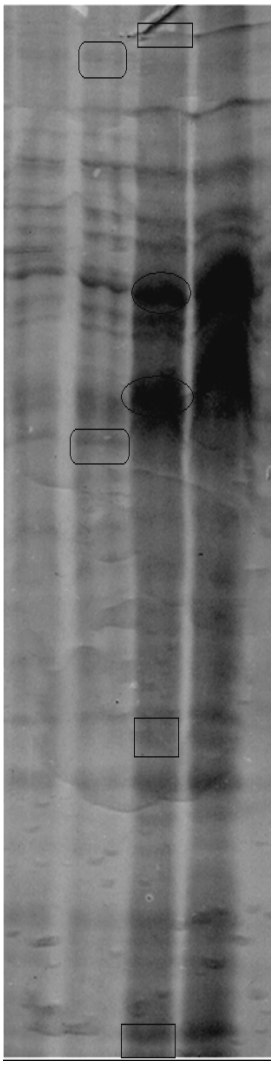

Figura 20: Perfil de proteínas celulares totales de Bradyrhizobium japonicum SEMIA 5080*: se representan las bandas pertenecientes a muestras celulares en fase exponencial (calles 1 y 2) y en fase estacionaria (calles 3 y 4) de la curva de crecimiento.*

El perfil de proteínas totales obtenido para esta cepa, muestra tres bandas que no aparecen en las calles que representan la fase exponencial. Además se visualizan dos bandas de diferente intensidad (remarcadas con un círculo) con respecto a las existentes en la fase exponencial. Al mismo tiempo, esta fase muestra dos bandas diferentes que no se presentan en las calles de fase estacionaria.

Al igual que para *Bradyrhizobium elkanii* U 1302, además de ser diferente la concentración de proteínas celulares totales, 209 y 367 µg/ml para las fases exponencial y estacionaria respectivamente, estos resultados mostraron que el tipo de proteínas que se sintetizan depende del estado fisiológico y/o de la densidad celular, según las diferentes fases de la curva de crecimiento considerada.

*** Gel obtenido para *Rhizobium tropici CIAT 899* en distintas fases de crecimiento:**

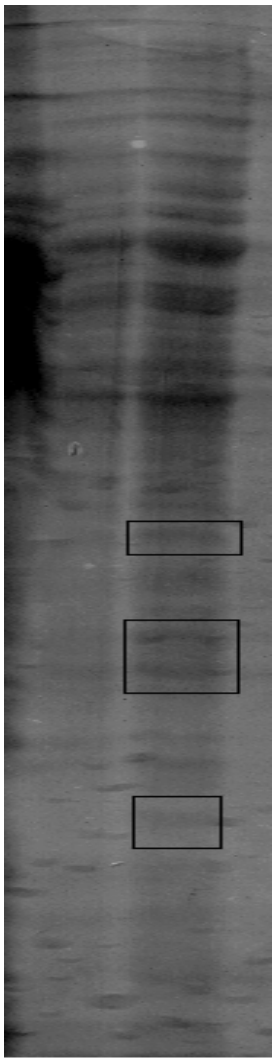

Figura 21: Perfil de proteínas totales de Rhizobium tropici CIAT 899*: en esta figura se representan las bandas pertenecientes a muestras celulares en fase exponencial (calle 1) y en fase estacionaria (calle 2).*

En este perfil de proteínas totales se observan tres bandas diferentes que no se presentan dentro del perfil de bandas que pertenecen a la fase exponencial.
En este caso, también se observa que no sólo existen diferencias en cuanto al contenido de proteínas totales, sino que también varia el peso molecular de proteínas presentes en cada estadio del crecimiento celular.

4.3 Determinación de los perfiles de lipopolisacáridos

Con la finalidad de estudiar si existe alguna relación entre las distintas densidades celulares alcanzadas en los diferentes puntos de la curva de crecimiento y la composición de los LPS en las células, se realizó un gel de poliacrilamida según el protocolo descripto en materiales y métodos.
La siembra de las muestras pertenecientes a cada estadio se realizó mediante una micropipeta con un volumen de 10µl de muestra, para cada una de la calles del gel de LPS.
Los perfiles obtenidos para cada uno de los microorganismos se muestran a continuación:

*** Perfil de LPS obtenido para *Bradyrhizobium elkanii* U 1302 en distintos puntos de la curva de crecimiento:**

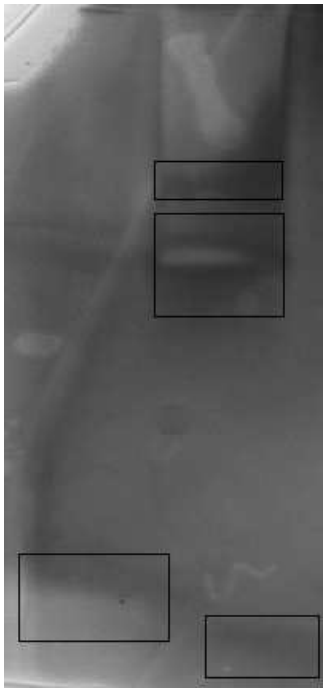

Figura 22: Perfil de LPS de *Bradyrhizobium elkanii* U 1302*: se muestran las bandas pertenecientes a cultivos celulares en fase exponencial (calle 1) y en fase estacionaria (calle 2).*

En esta figura se visualizan tres bandas pertenecientes a las muestras en fase estacionaria, que no se encuentran en el perfil que representa la fase exponencial. Además, en esta fase se encuentra una banda diferente a las existentes en la fase estacionaria.
Se concluyó, entonces, que la composición de las moléculas que componen la capa externa de lipopolisacáridos varía de acuerdo a la etapa de crecimiento celular, sin distinguir si la variable que lo determina sería el estado fisiológico de las células que componen la muestra y/o la densidad celular.

*** Perfil de LPS obtenido para *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080 en distintos puntos de la curva de crecimiento:**

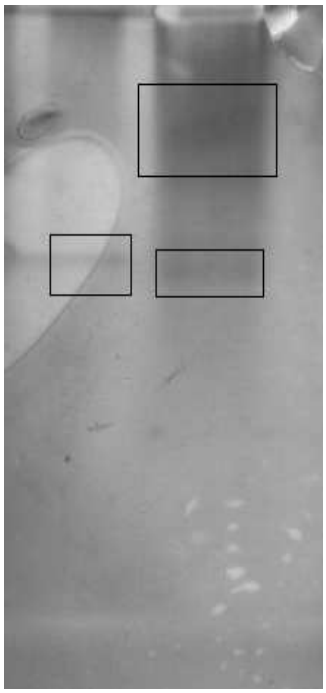

Figura 23: Perfil de LPS de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080*: se representan las bandas pertenecientes a muestras celulares en fase exponencial (calle 1) y a muestras en fase estacionaria (calle 2).*

La figura 18 mostró que el perfil de LPS de la fase exponencial es distinto al de la fase estacionaria. Se visualizaron dos bandas pertenecientes a la fase estacionaria, que no aparecen en las muestras que pertenecen a la fase exponencial. En esta última, a su vez, se encontró una banda diferente.
Al igual que para el microorganismo anterior, se observó que la composición de LPS es dependiente de la fase de crecimiento celular en la que se encuentre el microorganismo.

*** Perfil de LPS obtenido para *Rhizobium tropici* CIAT 899, en distintos puntos de la curva de crecimiento**:

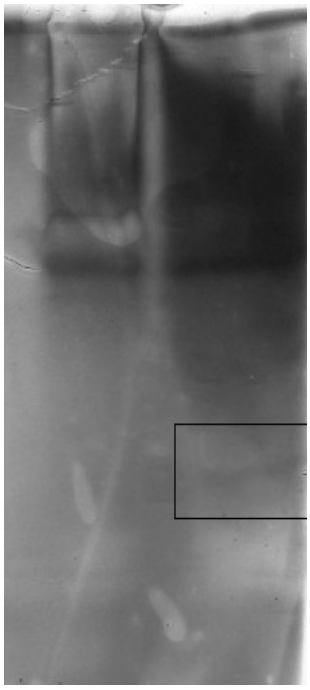

Figura 24: Perfil de LPS de *Rhizobium tropici* CIAT 899*: se representan las bandas pertenecientes a muestras celulares en fase exponencial (calle 1) y a muestras en fase estacionaria (calle 2).*

Este perfil de LPS obtenido para esta cepa, se muestra una banda que no aparece en la muestra perteneciente a la fase exponencial (calle 1º).

La conclusión que se obtuvo, al igual que para los dos microorganismos anteriores, fue que la etapa de crecimiento celular en la que se encuentra la bacteria, condiciona la composición de la capa de LPS en la célula.

4.4 Determinación del contenido de exopolisacáridos

La determinación de EPS, se llevó a cabo con el objetivo de estudiar si la densidad celular tiene alguna incidencia en la biosíntesis de EPS. Así, mediante esta determinación, se comprobó si existían diferencias en su producción respecto de las etapas consideradas en la curva de crecimiento celular. Para esto, se calculó la concentración de los EPS, según el método de la Antrona y el peso seco de los EPS precipitados.

En primer lugar, se realizó una curva de calibración utilizando galactosa como patrón, con el objetivo de poder calcular las concentraciones de EPS de cada muestra, en fase exponencial y en fase estacionaria.
La curva de calibración obtenida se muestra en la figura siguiente:

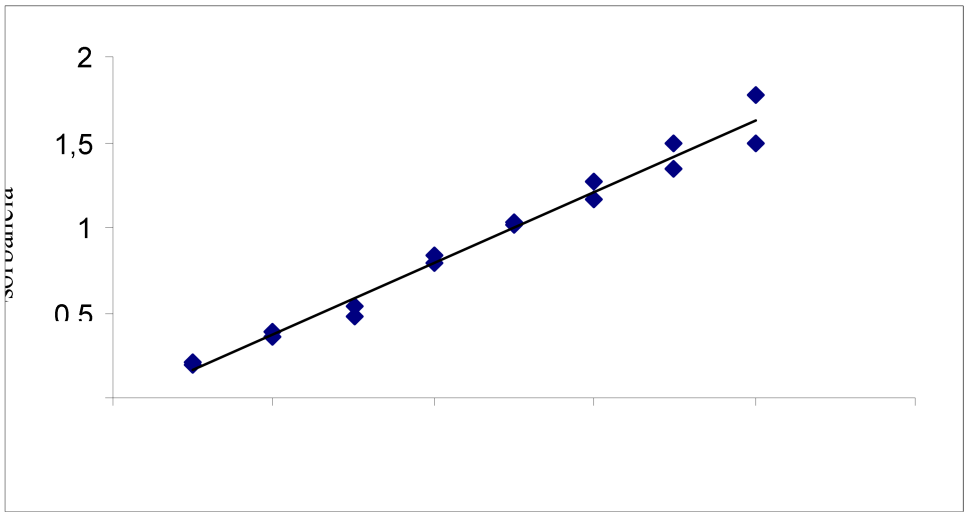

Figura 25: Relación entre Absorbancia vs. distintas concentraciones de galactosa, obtenida para la determinación EPS según el método de la Antrona.

El tratamiento estadístico de esta curva de calibración, permitió obtener la ecuación de la recta que relacionó las dos variables analizadas: concentración de galactosa, representada por la variable x, y absorbancia, representada por la variable y.
El valor de la misma es

$$y = 4.1881x - 0.0449$$

En base a esta ecuación, y teniendo en consideración las absorbancias de cada una de las muestras de los microorganismos en las etapas de la curva de crecimiento consideradas, se calculó la concentración de EPS, en función de la concentración de proteína obtenida anteriormente.
Los valores que se obtuvieron se muestran en la siguiente tabla:

Microorganismo	Fases en estudio	Concentración de EPS (mg de hexosas/mg de proteína)	Peso seco de EPS (mg)
Bradyrhizobium elkanii U 1302	exponencial	3,28	7
	estacionaria	4	15,6
Bradyrhizobium japonicum SEMIA 5080	exponencial	0,59	6
	estacionaria	0,85	16
Rhizobium tropici CIAT 899	exponencial	1,67	5,3
	estacionaria	3,7	532,3

Los datos obtenidos, muestran una producción de exopolisacáridos dependiente de la fase de crecimiento celular. Se observó que el contenido de EPS era mayor en cultivos celulares de alta densidad.

Esto se presenta de manera más notoria a través del análisis de peso seco de EPS, ya que las concentraciones obtenidas en ambas fases, se diferencian con mayor amplitud.

Considerando la determinación de EPS por el análisis de peso seco, se encontró que para *Bradyrhizobium elkanii* U 1302*, Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080 *y Rhizobium tropici* CIAT 899 la producción de EPS en fase estacionaria era mayor en un 123%, 167% y 1000%, respectivamente, con respecto a la fase exponencial.

La determinación de EPS por el método de la Antrona, mostró aumentos en el contenido de EPS de *Bradyrhizobium elkanii* U 1302*, Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080 *y Rhizobium tropici* CIAT 899 en un 22%, 44% y 122% respectivamente, respecto de la etapa estacionaria.

En general se observa que R. tropici es la cepa donde el contenido de EPS muestra mayor dependencia del estadio de la curva.

4.5 Determinación del contenido de polisacáridos capsulares

La determinación del contenido de KPS se llevó a cabo con el objetivo de determinar diferencias en la producción de los mismos, respecto a las etapas consideradas en la curva de crecimiento celular.

Para esto, se realizó la determinación de KPS mediante el cálculo de la concentración de los mismos, según el método de la Antrona y el peso seco de los KPS precipitados obtenido en los distintos estadios de la curva estudiados.

Para este ensayo, se utilizó la misma curva de calibración, descripta anteriormente para EPS.

Para las distintas muestras los resultaron fueron los siguientes:

Microorganismo	Fases en estudio	Concentración de KPS (mg de hexosas/mg de proteína)	Peso seco de KPS (mg)
Bradyrhizobium elkanii U 1302	exponencial	0,441	0,00425
	estacionaria	1,17	0,0048
Bradyrhizobium japonicum SEMIA 5080	exponencial	0,89	0,0054
	estacionaria	3,09	0,0144
Rhizobium tropici CIAT 899	exponencial	0,249	0,004
	estacionaria	0,449	0,0045

Estos datos muestran que el contenido de KPS depende de la etapa de crecimiento celular en la que se encuentre el microorganismo. Se observó que la producción de KPS obtenida para muestras celulares de alta densidad celular era mayor que la perteneciente a muestras de baja densidad celular.
La variable que permite diferenciar con mayor amplitud los datos obtenidos para los estadios estudiados, fue el análisis de la concentración de KPS según el método de la Antrona.
Considerando estas concentraciones, para *Bradyrhizobium elkanii* U 1302, *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080 *y Rhizobium tropici* CIAT 899 las diferencias fueron el 165%, 247% y 80% respectivamente.
La determinación de peso seco mostró una diferencia en la producción de KPS de un 13%, 167% y 13% respecto a la fase exponencial para los microorganismos *Bradyrhizobium elkanii* U 1302, *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080 *y Rhizobium tropici* CIAT 899 respectivamente.
En esta determinación, se observa que la cepa que más dependencia tiene la concentración de KPS con la fase de crecimiento celular es *B. japonicum* SEMIA 5080.

En las determinaciones de EPS y KPS, se observó que en etapas tardías de la curva de crecimiento probablemente aumenta el contenido de EPS y KPS, en respuesta a que las células enfrentan situaciones de estres ambiental, dado por el agotamiento inminente de nutrientes, así como también por acumulación de sustancias tóxicas y/o inhibitorias, dado por el propio metabolismo celular.

CONSIDERACIONES GENERALES

Los microorganismos que se encuentran en fase estacionaria de crecimiento celular, tienen características diferenciales en cuanto a su comportamiento fisiológico, metabólico y morfológico con respecto a aquellos que se encuentran en la fase de crecimiento exponencial (Kolter *et al.*, 1993; Nyström 1999; Ferenci *et al.*, 1999).

Es un ejemplo bien conocido que ciertos fenómenos de la interacción *Rhizobium*-leguminosa están regulados por señales químicas de comunicación intercelular. De esta forma, la densidad celular controlaría funciones de comportamiento o fisiológicas muy diversas en esta asociación simbiótica. De este modo, estas funciones dependerían del número de células de la población del microorganismo.

De acuerdo a los objetivos planteados para el desarrollo del presente trabajo de tesina, se estudió, para diferentes especies rizobianas que se asocian simbióticamente a leguminosas, la influencia de la densidad celular sobre la producción de distintos componentes de importancia para el establecimiento de la simbiosis.

De los resultados obtenidos, se pudo concluir que la densidad celular afecta la concentración y/o composición de componentes celulares, tales como LPSs, EPSs, KPSs y proteínas celulares.

Quedarían por realizar ensayos de inoculación de plantas, con las suspensiones bacterianas obtenidas en las diferentes etapas de la curva de crecimiento, que se corresponden con las distintas densidades celulares, con la finalidad de estudiar el comportamiento simbiótico de las suspensiones celulares frente a la variedad vegetal específica. Estos estudios se encuentran previstos dentro del proyecto de investigación en el que se enmarca este trabajo de tesina.

Los resultados obtenidos en este trabajo, conjuntamente con estudios posteriores previstos, permitirán en un futuro, determinar los niveles de concentración celular adecuados, tendientes a lograr un máximo de eficiencia en el proceso de fijación biológica de nitrógeno. De esta manera se lograría un aumento de la productividad de los cultivos, mediante el uso de tecnología de manejo sustentable, no contaminante; disminuyendo en

gran medida los impactos negativos en los agroecosistemas por el uso de fertilizantes químicos nitrogenados

.

5. Bibliografía

- Alexander M. Introducción a la Microbiología del suelo. John Wiley Sons. New York. p: 136-150. 1980
- Bradford M.M. "A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quintities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding". Plant and Soil. 173:29-37. 1976
- Burity H.A., Faris M.A., Culman B.E. Estimation of nitrogen fixation and transfer from alfalfa to associated grasses in mixed swards under field conditions. Plant and Soil. p: 114-249-255. 1989
- Curtis H., Barnes N. S. Biología. Sexta Edición en Español. 2003
- Deepi S., Mohammed A., Sunil K. Modulation of protein in *Rhizobium* sp. under sal stress. 1996
- Del Gallo M., Haegi, A. Characterization and quantification of exocelular polysaccharides in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* Symbiosis. 9:155-161. 1990
- Dische Z. "General colours reactions". Methods Carbohyd Chem. 1:478-492. 1962
- Ertola R., Yantorno O., Mignone C. Monografia de Programa Regional de desarrollo Científico y tecnológico de la Secretaria General de la organización de Estados Americanos. 2001
- FAO. Manual técnico de la fijación del nitrógeno. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. p: 10-35. 1995
- Ference N., Coudere F., Poinsot V. Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*- legume symbiosis. Eur. Journal Biochem. 270: 1365-1380. 1999
- Fraysse N., Courdec F., Poisond V. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. Review. 2003

- Fuqua C., Greenberg E. P. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. Curr. Opin. Microbiol. 1: 183–189. 1998
- Fuqua, C., Parsek M. R., Greenberg E. P. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. Annu. Review Genet. 35:439–468. 2001
- González N. S. Diámica de la fijación de nitógeno en soja, en suelos con alta fertilidad nitrogenada. Tesis Magister: Scientiae. Facultad de Cs Agrarias. Universidad Nacional de Mar el Plata. 1994
- González J. E., Marketon M. M. Quorum Sensing in Nitrogen-Fixing Rhizobia. Microbiology and molecular biology. Reviews, Vol. 67, No. 4. p: 574–592. 2003
- Gray K. M. Intercellular communication and group behavior in bacteria. Trends Microbiol. p: 5:184–188. 1997
- Halbleib C. M., Ludden P. W. Regulation of biological nitrogen fixation. Journal Nutr. P: 130:1081-1084. 2000
- Hitchock y Brown, Journal of Bacteriology. p: 154:269-277. 1983
- Hunter-Cevera J. Maintaining culturesfor Biotechnology and industry. Acdamic Press, Inc. 1994
- Inta.gov.ar
- Kimball. Biología. Adison Wesley Iberoamericana. p: 432-450. 1980
- Koch A. L. Growth measurement. In Manual of methods for General and Molecular Bacteriology. Gerhardt P ed. American Society for Microbiology. Washington D.C. p: 248-277. 1981
- Kolter R., Sieegele D. A., Tormo A. The stationary phase of the bacterial life cycle. Annual Rewews of Microbiology. 47: 855-874. 1993
- Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685, 1970
- Leigh J., Graham W., Exopolysaccharides of *Rhizobium*: syntesis, regulation and symbiotic function. Review. 1994
- Lodeiro A., López García S., Mongiardini E., Quelas J. y Perticari A. “Los rizobios y la inoculación de las leguminosas para la fijación

simbiótica de nitrógeno". Microbiología Agrícola, Un aporte de la investigación argentina, UNSE. 2003

- Loh J., Stacey G. Nodulation Gene Regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. Appl. Environ. Microbiol. 69:10–17. 2003
- Loh J., Carlson R. W., York W. S., Stacey G. Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99:14446–14451. 2002
- Loh J., Yuen-Tsai J., Stacey M., Lohar D., Welborn, A., Stacey G. Population density-dependent regulation of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. Mol. Microbiol. 42: 37-46. 2001
- Long S. *Rhizobium*-legume nodulation: Life together in the underground. Cell. 56: 203-214. 1989
- Luna O. H. A., Sánchez-Yáñez J. M. Manual de Microbiología del suelo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N. L. p: 113-120. 1991
- Madigan M., Martingo J., Parker J. Brock, Biología de los microorganismos. Décima edición. Editorial Pearson Educación, S. A; Cáp. 4. 2004
- Marketon M. M., Gronquist M. R., Eberhard A., Gonzalez J. E. Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* sin R/ cin I locus and the production of novel N- acyl homosiderine lactones. Journal Bacteriol 184:5686-5695. 2002
- Nyström T. Starvation, cessation of growth and bacterial again. Current opinion in Microbiology. 2: 214-219. 1999
- Olivares Pascual, J. Fijación biológica de Nitrógeno. 2003 http://www.eez.csic.es
- Ormeño-Orrillo E. Lipopolisacáridos de *Rhizobiaceae:* estructura y biosíntesis. Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol. 47, Nos. 3-4, p: 165-175. 2005
- Parsek M. R., Greenberg E. P. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in

associations with higher organisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97:8789–8793. 2000

- Pellok B. J., Teplitski M., Bainay R.P., Bauer W.D., Walker G.C. A lux R homolog controls production of symbiotically activa extracellular polysaccharide by *Sinorhizobium meliloti*. Journal Bacteriol. 184:5067-5076. 2002
- Pieternel V., Vanderleyden J., The *Rhizobium*- Plant symbiosis. Review. 1995
- Polhill R. M., Raven P.H. Avances in the legume systematics. Royal Botanic Gardens. Kew Richmond. England. 1978
- Redondo-Nieto M., Bonilla IL., Bolaños L. Fijación biológica del nitrógeno, 2004
- Rosas S., Correa N. Capitulo 7: Microorganismos que promueven el crecimiento y desarrollo vegetal (PGPRs). En: Microbiologia agrícola. Un aporte de la investigación Argentina. UNSE 2003. ISBN987-99-083-5-X
- Sagpya.mecon.gov.ar
- Sanaratne R., Amornpimol C., Hardarson G. Effect of combined nitrogen fixation of soybean (Glycine ma L. Marill) as affected by cultivar and Rhizobial strains. Plant and Soil. 103:45-50. 1987
- Santamaría M., Gutiérrez-Navarro A. M., Corzo J. 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. 38071 Tenerife; 1997
- Schepers J. S., Mossier A. R. Accounting for nitrogen in nonequilibrium soil crop systems. In R.F. follet et al, d. Managing nitrogen for grownd water quality and farm profitability. SSSA. Madison, Wisconsin EEUU. 1993
- Skorupska A., Janczarek M., Marcazak M., Mazur A., Krol J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic controland symbiotic functions. Microbial Cell Factories. Review. 2006

- Swift S., Throup J. P., Williams P., Salmond G. P., Stewart G. S. Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. Trends Biochem. Sci. 21:214–219. 1996
- Tao W., Martínez Romero J., López Lara I. Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. 2001 http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap8/.
- Temple S. J., Vance C: J., Gantt J. S. Glutamate syntetaze and nitrogen assimilation. Trends Plant Sci. 3:51-56. 1998
- Whitehead N. A., Barnard A. M., Slater H., Simpson N. J., Salmond G. P. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Review. 25:365–404. 2001
- Winzer K., Hardie K. R., Williams P. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now – gone to lunch! Curr. Opin. Microbiol. 5: 216–222, 2002
- Wisniewski F., Downie J. A. Quorum-sensing in *Rhizobium Antonie van Leeuwenhoek*. 81: 397–407. 2002
- Withers H., Swift S., Williams P. Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. Curr. Opin. Microbiol. 4:186–193. 2001.
- Yuen J.P., Stacey G. Inhibition of *nod* gene expression in *B. japonicum* by organic acids. Mol. Plant-Microb Interact. 9:424-428. 1996