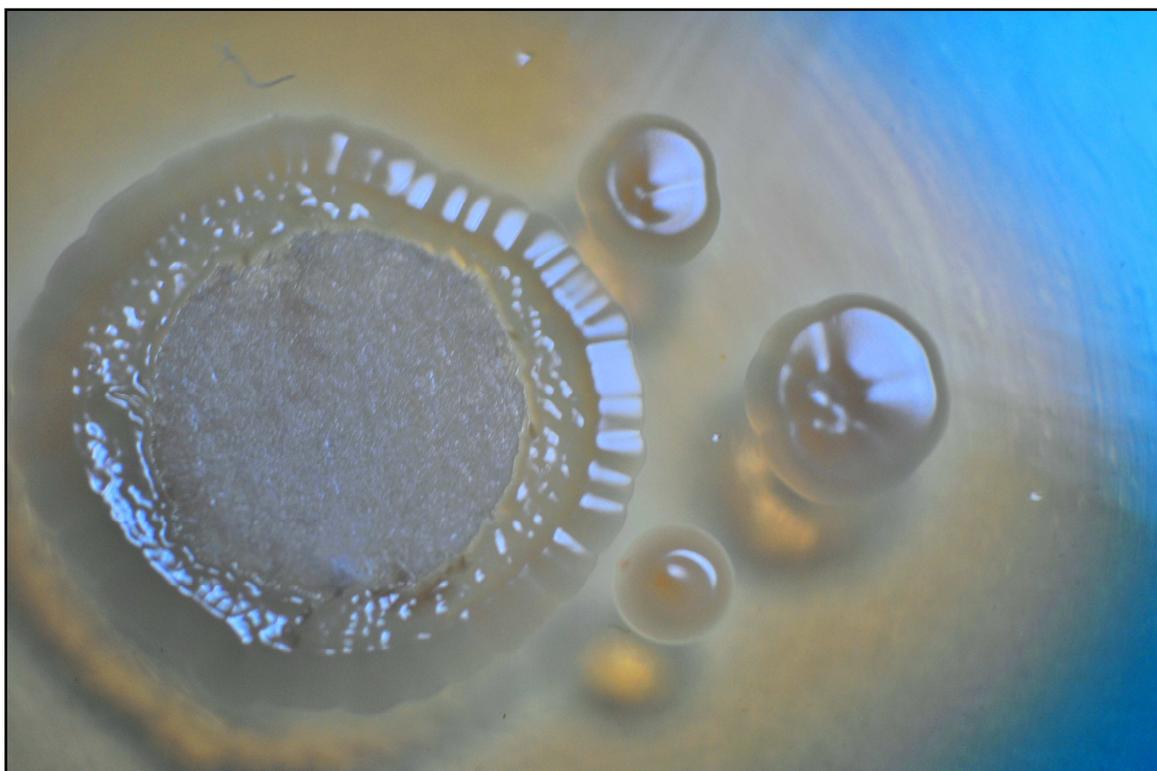

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
- 2015 -**

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Rol de la Nitrato Reductasa Periplásmica y el Óxido Nítrico en el
Metabolismo del Hierro y Formación de Biopelículas en
Azospirillum brasilense.**



Licenciado: ANDRES ARRUEBARRENA DI PALMA

Directora: Dra. CECILIA MONICA CREUS

Co-director: Dr. LORENZO LAMATTINA

Fotografía de portada:

Colonias de *Azospirillum brasilense* Sp245 creciendo sobre disco de papel y aisladas en placas de agar CAS, indicador de la producción de sideróforos. Aumento 10X. (Fotografía de la Dra. Cecilia Creus).

***Esta tesis esta dedica a todas las “personas” y “momentos”
que de una u otra manera me llevaron,
en cada coyuntura de este camino,
a formar el individuo y el profesional
que hoy soy***

De todo se aprende... siempre.

Índice

• Resumen.....	1
• Listado de Figuras y Tablas.....	3
• Publicaciones.....	5
• Glosario de abreviaturas.....	6
• Introducción general.....	8
○ La colonización de la raíz por los microorganismos.....	10
○ Las bacterias promotoras del crecimiento.....	11
○ El género PGPR <i>Azospirillum</i>	12
○ Nuevos actores en la interacción <i>Azospirillum</i> -planta.....	14
▪ El oxido nítrico (NO) y la desnitrificación.....	14
▪ El NO y su relación con la formación de biopelículas y metabolismo del hierro.....	17
○ Planteo del problema.....	18
○ Referencias.....	19
• Hipótesis de trabajo y objetivos	
○ Hipótesis general de trabajo.....	25
○ Hipótesis particulares.....	25
○ Objetivo general.....	26
○ Objetivos particulares.....	26
• Capítulo 1. Metabolismo del hierro en <i>Azospirillum brasilense</i> y su relación con la nitrato reductasa periplásmica	
○ Introducción.....	28
○ Materiales y métodos.....	35
○ Resultados.....	42
○ Discusión y conclusiones.....	56
○ Referencias.....	68
• Capítulo 2. Formación de biopelícula en <i>Azospirillum brasilense</i> y el rol del óxido nítrico	
○ Introducción.....	73
○ Materiales y métodos.....	78
○ Resultados.....	85
○ Discusión y conclusiones.....	96
○ Referencias.....	102
• Conclusiones generales.....	105
○ Metabolismo del hierro y NO/Nap.....	106
○ Formación de biopelículas y NO.....	109
○ Perspectivas.....	110
○ Referencias.....	113
• Anexos.....	114

Rol de la Nitrato Reductasa Periplásmica y el Óxido Nítrico en el Metabolismo del Hierro y Formación de Biopelículas en *Azospirillum brasilense*.

Autor: Lic. en Ciencias Biológicas Andrés Arruebarrena Di Palma

El género *Azospirillum* es conocido por su efecto de promoción del crecimiento vegetal y el incremento en los rendimientos de especies de interés agronómico. Numerosos estudios permitieron concluir que *Azospirillum* actúa influenciando la morfología, arquitectura y fisiología del sistema radical. Este efecto sobre las raíces esta dado principalmente por la capacidad de producción de fitohormonas. Sin embargo, en los últimos años han surgido a la luz nuevos factores involucrados en la interacción *Azospirillum*-planta. Entre estos podemos mencionar las poliaminas, el ácido absícico, el óxido nítrico (NO) y la producción de sideróforos.

Frente a una deficiencia de hierro, tanto las plantas como los mamíferos, aumentan la concentración de NO, llevando a que éste desencadene una respuesta. En bacterias se conoce poco acerca del rol del NO en este aspecto. Por otro lado, para establecer una íntima relación con la planta, *Azospirillum* debe formar lo que se denomina una biopelícula sobre la raíz. En los últimos años se ha observado, en otros microorganismos, que el NO modula este proceso.

En esta tesis se estudió el rol del NO y de la presencia de una nitrato reductasa periplásmica (Nap) funcional, la cual es parte de la vía de síntesis de NO, sobre los mecanismos de adquisición de hierro y formación de biopelículas en la bacteria promotora del crecimiento vegetal *Azospirillum brasilense*Sp245.

Los resultados hallados permiten concluir que el NO modula ambos procesos y que además, la enzima Nap a través de su actividad de reducción de nitrato a nitrito ejerce un efecto de disipación de poder reductor, modulando también el metabolismo del hierro en esta bacteria.

**Periplasmic Nitrate Reductase and Nitric Oxide Roles on
Iron Metabolism and Biofilm Formation in *Azospirillum brasilense*.**

Author: Lic. en Ciencias Biológicas Andrés Arruebarrena Di Palma

The genus *Azospirillum* is known for its plant growth promoting effect. When inoculated it increases agronomic crop yields. Numerous studies indicate that *Azospirillum* acts influencing morphology, physiology and architecture of root system. This effect is given primarily by its phytohormones production capability. In recent years however, new factors have emerged in *Azospirillum*-plant interaction. Among them, we can mention polyamines, abscisic acid, nitric oxide (NO) and the production of siderophores.

To cope with iron deficiency, both plants and mammals increase the concentration of NO which trigger a specific response. In bacteria, little is known about the role of NO in this regard. Furthermore, to establish an intimate relationship with the plant, *Azospirillum* must form a biofilm on the root surface. In recent years it has been observed in other microorganisms that NO participates modulating this process.

In this thesis the role of NO and the presence of a functional periplasmic nitrate reductase (Nap), which is part of the NO synthesis pathway was studied. The effect of NO and Nap on iron acquisition and formation of biofilms in the model plant growth promoting rhizobacteria *Azospirillum brasilense* Sp245 was investigated.

The results showed that NO participates in both processes and the Nap enzyme, through its nitrate to nitrite reduction activity, has an effect on the dissipation of reductants equivalents in excess leading to modulate iron metabolism.

Listado de Figuras y Tablas

<i>Sección</i>	<i>Página</i>
INTRODUCCION GENERAL	
Figura 1.i. <i>El entorno radical en el suelo</i>	9
Figura2.i. <i>Vía de desnitrificación</i>	16
Capitulo 1.	
METABOLISMO DEL HIERRO EN <i>Azospirillum brasilense</i> Y SU RELACION CON LA NITRATO REDUCTASA PERIPLÁSMICA.	
Figura 1.1. Mecanismos de adquisición de hierro en bacterias Gram-negativas.....	31
Figura 2.1. Producción de sideróforos en <i>A. brasilense</i>	43
Figura 3.1. Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de nitrito.....	44
Figura 4.1. Características de la secuencia proteica AzFrp.....	45
Figura 5.1. Estructura terciaria modelada de AzFrp y comparación con otras proteínas relacionadas.....	47
Figura 6.1. Reducción <i>in vivo</i> de Fe ³⁺ por <i>Azospirillum brasilense</i>	48
Figura 7.1. Expresión de genes involucrados en el metabolismo del hierro en <i>A. brasilense</i>	49
Figura 8.1. Efecto de dadores de NO, nitrito y sequestrante de NO sobre la producción de sideróforos.....	50
Figura 9.1. Concentración de nitrito en función de la disponibilidad de hierro.....	51
Figura 10.1. Cinéticas de crecimiento de <i>A. brasilense</i> bajo diferentes disponibilidades de hierro.....	52
Figura 11.1. Contenido de PHB en <i>A. brasilense</i> y su relación con la disponibilidad de hierro.....	53
Figura 12.1. Efecto del GSH, GSSG o NADPH sobre la producción de sideróforos.....	55

Tabla 1.1. Contenido de hierro total en <i>A. brasilense</i> Sp245 y Faj164.....	44
--	----

Capítulo 2.

FORMACION DE BIOPELICULA EN *Azospirillum brasilense* Y EL ROL DEL OXIDO NITRICO.

Figura 1.2. El óxido nítrico y su relación con el diGMPc.....	75
Figura 2.2. Morfología de las colonias de <i>A. brasilense</i>	86
Figura 3.2. Formación de agregados celulares en <i>A. brasilense</i>	87
Figura 4.2. Crecimiento estático de <i>A. brasilense</i> Sp245 y su mutante Faj164.....	88
Figura 5.2. Formación de biopelícula en <i>A. brasilense</i> Sp245 y Faj164.....	90
Figura 6.2. Producción <i>in vivo</i> de NO en condiciones de formación de biopelícula....	91
Figura 7.2. Efecto del agregado exógeno del dador de NO GSNO sobre la formación de biopelícula.....	93
Figura 8.2. Efecto del aumento de la dosis génica de <i>ChsA</i> sobre la formación de biopelícula.....	94
Figura 9.2. Formación de biopelícula en respuesta a la disponibilidad de hierro en <i>Azospirillum</i>	95
Tabla 1.2. Producción de nitrito en cultivos estáticos.....	91

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis han sido publicados en:

- Arruebarrena Di Palma A, Lamattina L, Creus C. 2011. Nitric oxide as a signal molecule in intracellular and extracellular bacteria-plant interactions, *en* Ecological aspects of nitrogen metabolism in plants. (eds J. C. Polacco and C. D. Todd), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA, pp 397-420.
- Arruebarrena Di Palma A, Pereyra CM, Moreno Ramirez L, Xiqui Vázquez ML, Baca BE, Pereyra MA, Lamattina L, Creus CM. 2013. Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters* 338:77-85.
- Salcedo MF, Pereyra CM, Arruebarrena DI Plama A, Lamattina L, Creus CM. 2015. Methods for Studying Biofilms in *Azospirillum* and Other PGPRs, *en* Handbook for *Azospirillum*, (eds Fabricio Dario Cassán, Yaacov Okon, Cecilia M. Creus), Springer International Publishing, pp.199-229.

Glosario de abreviaturas

- μl : microlitro
- μM : micromolar
- $\cdot\text{OH}$: radical hidroxilo
- 16S: ARN ribosomal bacteriano de la subunidad 30S
- ^{32}P : fosforo radioactivo
- ACC: 1-aminociclopropano 1-carboxilato deaminasa
- ACR: Agar Rojo Congo
- ADN: acido desoxirribonucleico
- ADNc: acido desoxirribonucleico copia
- AMPc: adenosin monofosfato cíclico
- ARN: acido ribonucleico
- ARNr: Acido ribonucleico ribosomal
- AzFrp: marco de lectura abierto de putativa Fe^{3+} -reductasa
- C/N: relación de las concentraciones de carbono y nitrógeno para un determinado medio de cultivo
- CAS: Chrome azurol S
- cm: centímetros
- ChsA: chemotactic signaling protein A
- cPTIO: (2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-oxil-3-oxido de potasio)
- C-terminal: región carbono terminal de una cadena polipeptidica
- CV: cristal violeta
- DGC: diguanilato ciclasa
- diGMPc: 3`5`-di-guanosín-monofosfato-cíclico
- DO_{XXXnm} : densidad óptica XXX nanómetros
- Dps: iron detoxification protein
- eGFP: enhanced green fluorescent protein
- EPS: exopolisacáridos
- FAD/FADH₂: flavín adenín dinucleótido oxiado/raducido
- Faj164: cepa mutante nula en la Nap de *Azospirillum brasilense* Sp245
- FBN: fijación biológica de nitrógeno
- FDE: fosfodiesterasas
- Fe: hierro
- Fe^{2+} : ion ferroso
- Fe^{3+} : ion férrico
- FeCl_3 : tricloruro férrico
- FhuE: transportador de sideróforos del tipo coprogen
- FNR: feredoxin reductasa
- Fur: ferric uptake regulator, factor de transcripción central del metabolismo del hierro
- GSH: glutatión reducido,
- GSNO: S-nitrosoglutatión
- GSSG: glutatión oxidado
- H_2O_2 : peróxido de hidrógeno
- HCl: acido clorhídrico

- KI: ioduro de potasio
- Km: concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción catalizada por una enzima es la mitad de la velocidad máxima
- KNO₃: nitrato de potasio
- LB: medio de cultivo Luria-Bertari
- ml: mililitro
- mM: milimolar
- N: nitrógeno
- NaCl: cloruro de sodio
- NAD/NADH: nicotinamida adenina dinucleótido oxidado/reducido
- NADP/NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado/reducido
- Nap: nitrato reductasa periplásmica
- Nfb: medio de cultivo nitrogen fixing broth
- NH₄Cl: cloruro de amonio
- nm: nanómetros
- NO/NO·: óxido nítrico
- NO⁻: ion nitroxilo
- NO⁺: ion nitrosil
- NO₂Na: nitrito de sodio
- N-terminal: región nitrógeno terminal de una cadena polipeptídica
- O₂⁻: superóxido
- OAB: medio de cultivo Okon Albrech Burris
- °C: grados centígrados
- ORF: open reading frame – marco de lectura abierto
- P: fosforo
- PAS: dominio estructural que se encuentra presente en muchas proteínas involucradas en señalización
- PEP: sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa dependiente de azúcar
- PGPR: plant growth promoting rhizobacteria
- pH: potencial hidrogeno
- PHB: polihidroxibutirato
- ppm: partes por millón
- prs: producción relativa de sideróforos
- rpm: revoluciones por minuto
- SNP: nitroprusiato de sodio
- Sp245: cepa salvaje de *Azospirillum brasilense*
- UFC: unidades formadoras de colonias
- $\frac{v}{v}$: porcentaje volumen en volumen



INTRODUCCIÓN GENERAL

Algunas de las más complejas interacciones que las plantas terrestres pueden experimentar ocurren entre las raíces y su entorno (Bais *et al.* 2006). Todas las plantas se desarrollan en íntima asociación con gran cantidad de microorganismos y estos colonizan las superficies, los espacios intercelulares en los tejidos o incluso el interior de las células vegetales (Brencic y Winans 2005). Es precisamente en el suelo donde estas interacciones se encuentran bajo una diversa cantidad de condiciones que determinan el éxito o fracaso de la colonización de las raíces, dando lugar a efectos sobre los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas.

El suelo puede ser dividido en tres zonas principales según la proximidad a la raíz: (1) la rizoplana o la superficie de la raíz, (2) la ectorizósfera, es decir la porción del suelo bajo la influencia de la raíz y (3) el suelo que está desprovisto de plantas (Manthey *et al.* 1994, Figura 1.i). Formalmente la ectorizósfera, la rizoplana y la endorizósfera (que constituye los espacios intercelulares de la raíz), se denominan en conjunto: rizósfera.

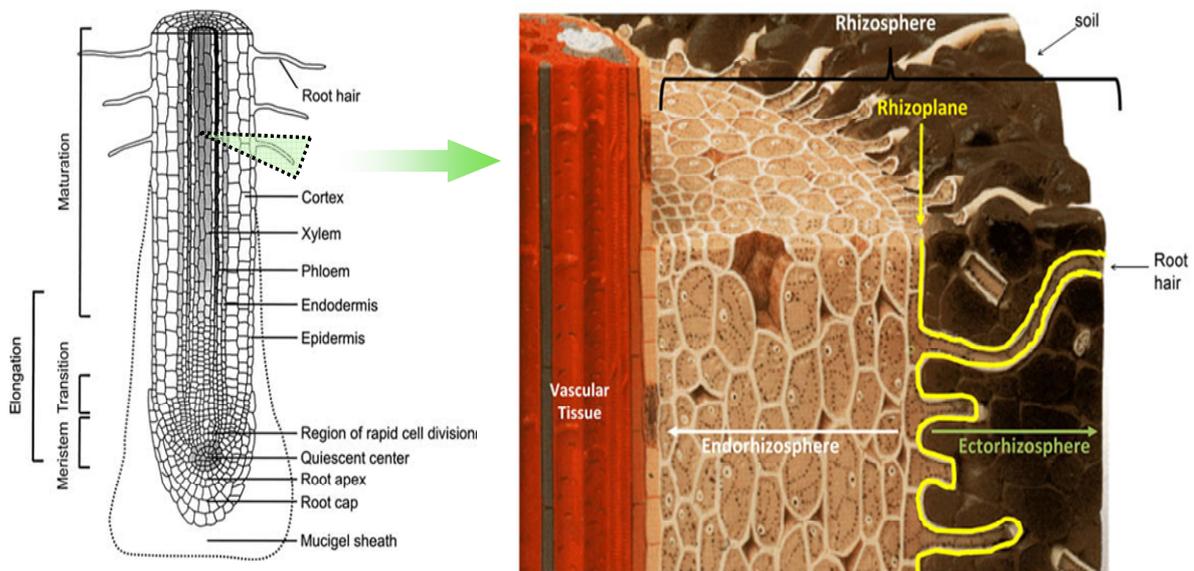


Fig. 1.i. **El entorno radical en el suelo.** En función de la relación de la raíz con el suelo circundante se pueden distinguir diferentes zonas. La ectorizósfera es el suelo afectado por los exudados de la raíz y queda inmediatamente después de la rizoplana, que consiste en la superficie de las células en contacto con el suelo. La endorizósfera comprende los espacios intracelulares de la raíz. Estos tres sectores conforman conjuntamente la rizósfera. Modificado de Bloom *et al.* (2003) y McNear Jr (2013).

Las bacterias que habitan el suelo pueden afectar el crecimiento y desarrollo de plantas y las interacciones que establecen con las raíces de éstas pueden variar desde beneficiosas a perjudiciales o resultar neutras (Hirsch *et al.* 2003). Los microorganismos en la rizósfera pueden clasificarse en forma simple en base al sitio de colonización preferido dividiéndose en microorganismos extracelulares, donde se encontrarían las bacterias de la rizoplana y las que habitan los espacios intercelulares; y las intracelulares, es decir los microorganismos que penetran dentro del citoplasma de las células vegetales (Gray y Smith 2005).

La colonización de la raíz por los microorganismos.

Desde las primeras observaciones de Rovira *et al.* (1974) sobre la colonización por microorganismos de la rizósfera al presente, se ha establecido que la mayoría de los microorganismos existen en estructuras organizadas llamadas biopelículas cuando colonizan diferentes partes de la planta, en contraste con su estado plantónico, más extensamente estudiado (Rudrappa *et al.* 2008). Las biopelículas son estructuras mono- o multi- especie en donde las células bacterianas están embebidas en una matriz extracelular de polisacáridos, ADN y proteínas, y adheridas a una superficie (O'Toole *et al.* 2000, Ramey *et al.* 2004, Danhorn y Fuqua 2007). Las células que conforman una biopelícula responden a gradientes de nutrientes y desechos, modulan su metabolismo en función de su posición dentro de la misma, contactan a las células adyacentes y establecen comunicación célula - célula. Esta forma de vida confiere a las bacterias mayor resistencia al estrés y además constituye una parte del ciclo de vida de los microorganismos (Stoodley *et al.* 2002).

Tanto las interacciones benéficas o dañinas de la planta con microorganismos, involucran la formación de biopelículas en algún estadio de la interacción. Particularmente en la raíz, el inicio de la formación de la biopelícula es complejo y aún poco comprendido debido a la naturaleza dinámica de los procesos que ocurren en la superficie de la raíz (Rudrappa *et al.* 2008). Los exudados radicales actúan como los principales factores responsables de desencadenar la colonización radical (Lugtenberg *et al.* 1999) y la formación de la biopelícula (Walker *et al.* 2004). Se estima que una planta excreta aproximadamente entre un 10% y un 44% de los fotosintatos en forma de exudados radicales, y estos compuestos orgánicos pueden nutrir a los

microorganismos de la rizósfera y permitir el desarrollo de los mismos llevando a la formación de la biopelícula (Lugtenberg *et al.* 1999). Además, cabe mencionar que las bacterias asociadas a la raíz no solo se encuentran expuestas a los nutrientes, sino también a una amplia gama de moléculas que podrían actuar como señal, las cuales pueden afectar el metabolismo de los microorganismos en la interacción. Es así el caso de las auxinas excretadas por las raíces, las cuales afectan el metabolismo de esta hormona en la bacteria, modulando su producción y estableciendo así un ciclo de regulación (Lambrech *et al.* 2000).

Las bacterias promotoras del crecimiento.

Un importante grupo de microorganismos que habitan el suelo y que establecen interacciones con las raíces del tipo extracelulares, son las bacterias que afectan favorablemente el crecimiento de las plantas denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en ingles de *plant growth promoting rhizobacteria*) (Burdman *et al.* 2000, Steenhoudt y Vanderleyden 2000, Lucy *et al.* 2004, Dobbelaere y Okon 2007). Las PGPR son un grupo de bacterias de vida libre conformado por una diversidad de especies muy amplia (Kloepper *et al.* 1989). Su importancia no solo es ecológica si no que cuando estas bacterias se desarrollan en asociación con cultivos de importancia agronómica, el rendimiento por unidad de superficie puede aumentar (Döbereiner 1997, Veseey 2003).

Los modos de acción de las PGPR para ejercer su efecto promotor pueden ser divididos en directos o indirectos (Beauchamp 1993, Glick 1995, Glick 2012). Entre los mecanismos directos podemos reconocer los que involucran la facilitación de la adquisición de recursos como la fijación biológica del nitrógeno (FBN) (Shanmugam *et al.* 1978), solubilización de fosforo (P) (Rodriguez *et al.* 2006) y el aumento de la disponibilidad de hierro (Crowley *et al.* 1988, Jin *et al.* 2006). También podemos mencionar los mecanismos en los que las PGPR modulan los niveles de fitohormonas (Barbieri y Galli 1993, Dobbelaere *et al.* 1999). Muchos microorganismos PGPR producen auxinas, giberelinas y citoquininas que modifican el desarrollo de las plantas (Spaepen *et al.* 2009) y además pueden reducir los niveles de etileno a través de la actividad de la 1-aminociclopropano 1-carboxilato (ACC) deaminasa (Glick *et al.* 1998). Además, se ha demostrado que algunas PGPR producen compuestos volátiles capaces

de promover el crecimiento vegetal (Ryu *et al.* 2003). Por otro lado, los mecanismos indirectos se relacionan con el biocontrol, en donde las bacterias PGPR protegen a la planta de diferentes patógenos y esto lleva a la promoción del crecimiento (Compant *et al.* 2005). Algunos de estos mecanismos de biocontrol están basados en: la producción de antibióticos (Raaijmakers *et al.* 2002, Haas y Keel 2003), de enzimas líticas, como las celulasas que degradan las paredes celulares de hongos patógenos (Singh *et al.* 1999), y de moléculas con alta afinidad por el hierro denominadas sideróforos, los cuales son incorporados por la planta y/o la PGPR adquiriendo el hierro y haciéndolo menos disponible para el patógeno (O`Sullivan y O`Gara 1992). Además, la competencia entre patógenos y PGPR por los espacios a colonizar (Innerebner *et al.* 2011) y la promoción de la respuesta inmune inducida, en donde las plantas en contacto con PGPR se encontrarían “mejor preparadas” y reaccionarían más rápidamente frente a un eventual ataque de patógenos (Verhagen *et al.* 2004, Bakker 2007), constituyen mecanismos indirectos de promoción del crecimiento.

El género de PGPR *Azospirillum*.

Las bacterias pertenecientes al género *Azospirillum* son conocidas por su efecto de promoción del crecimiento vegetal y el incremento en los rendimientos de especies de interés agronómico bajo condiciones apropiadas (Fages 1994, Bashan 1999, Dobbelaere *et al.* 2001). El género *Azospirillum* se encuentra incluido en la subclase de las alfa-proteobacterias Gram negativas, perteneciendo a la superfamilia ARNr IV (Xie *et al.* 1994).

Como una de las bacterias PGPR más extensamente investigadas (Bashan y de-Bashan 2010), *Azospirillum* se ha convertido en la piedra angular de la investigación de las interacciones benéficas planta-bacteria en la rizósfera, además de su aplicación en la agricultura. Esta bacteria resulta un excelente modelo para el estudio de la asociación planta-bacteria (Bashan y Levanony 1990) y aunque fue aislada por primera vez de raíces de cultivos de cereales, ésta puede ser encontrada en asociación con las raíces de casi cualquier especie de planta, estableciéndose como un colonizador radical ubicuo (Bashan y Holguin 1997).

Los estudios iniciales llevados a cabo para comprender cómo *Azospirillum* produce la promoción del crecimiento vegetal fueron enfocados en su capacidad de

realizar la FBN. Numerosos trabajos revisados extensamente por Bashan y Levanony (1990) muestran que luego de la inoculación con *Azospirillum* existe un aumento en el contenido total de nitrógeno (N) en la planta. Acorde a esto último, la actividad enzimática nitrogenasa observada en raíces inoculadas fue mayor (Berg *et al.* 1980, Kapulnik *et al.* 1981). Sin embargo, en algunos casos plantas que respondían positivamente a la inoculación no mostraban actividad nitrogenasa detectable en sus raíces (Lethbridge y Davidson 1983, Kapulnik *et al.* 1985). La prueba final de que la FBN no era el único factor de promoción del crecimiento se obtuvo mediante la utilización de mutantes nulas de la nitrogenasa, en donde las plantas inoculadas con estas cepas respondían aún positivamente en varios parámetros del crecimiento (Barbieri *et al.* 1986).

Numerosos estudios permitieron concluir que *Azospirillum* actúa principalmente influenciando la morfología, arquitectura y fisiología del sistema radical más que por un efecto directo de la FBN (Dobbelaere *et al.* 2001). Poco después de la inoculación con *Azospirillum*, la raíz incrementa significativamente el número y largo de los pelos radicales, la tasa de aparición y número de raíces laterales, el diámetro y largo tanto de raíces laterales como adventicias y el área total de la raíz (Jain y Patriquin 1984, Kapulnik *et al.* 1985, Fallik *et al.* 1994, Dobbelaere *et al.* 1999, Pereyra *et al.* 2010). Además, un incremento en la división celular en el ápice meristemático de las raíces fue reportado en maíz (Levanony y Bashan 1989).

Bashan y de-Bashan (2010) revisaron extensamente los mecanismos por los cuales bacterias del género *Azospirillum* ejercen su efecto promotor sobre las plantas. Estos resultan ser en esencia los mecanismos generales que muestran otras PGPRs, mencionados anteriormente. Esta multiplicidad de procesos realizados por *Azospirillum* que llevarían a la modificación del crecimiento vegetal, condujo al planteo de la denominada hipótesis aditiva (Bashan y Lavanony 1990) la cual ha acumulado gran cantidad de evidencia a su favor a lo largo los últimos 20 años de investigación (Bashan y de- Bashan 2010). Esta hipótesis considera que múltiples mecanismos, en lugar de sólo uno, participan en la promoción del crecimiento vegetal por *Azospirillum*. Estos mecanismos operan simultáneamente y/o de manera sucesiva, y la contribución individual de un mecanismo resulta menos significativa cuando es analizada de manera

separada del resto. La suma de las actividades de cada mecanismo resulta en los cambios observados en el crecimiento vegetal (Bashan y Lavanony 1990).

Nuevos actores en la interacción *Azospirillum*-planta

En los últimos años han surgido a la luz nuevos factores involucrados en la interacción *Azospirillum*-planta. Entre los nuevos actores participantes de la promoción del crecimiento podemos mencionar las poliaminas (Thuler *et al.* 2003, Perrig *et al.* 2007), el ácido absícico (Cohen *et al.* 2008, Cohen *et al.* 2009) y, de particular interés en esta tesis, el óxido nítrico (NO) (Creus *et al.* 2005, Molina Favero *et al.* 2008) y la producción de sideróforos (Tortora *et al.* 2011).

El óxido nítrico y la desnitrificación.

El NO es una molécula gaseosa simple con una química única y fascinante. Es un radical libre hidrosoluble aunque también lipofílico el cual es sintetizado tanto por organismos procariotas como eucariotas y que tiene una profunda influencia en la fisiología de estos organismos. En plantas se ha reportado que participa en numerosos procesos incluyendo defensa, señalización, respuestas a estrés, desarrollo y crecimiento, entre otros (Lamattina *et al.* 2003, Grün *et al.* 2006).

En organismos procariotas, el NO también participa en numerosos procesos que van desde regulación de la vía de desnitrificación (Zumft 2002), respuesta a estrés oxidativo (Cruz-Ramos *et al.* 2002, Gusarov y Nudler 2005), respuesta a estrés por UV (Patel *et al.* 2009), procesos de colonización (Cohen y Yamasaki 2003, Wang *et al.* 2010), regulación de la formación de biopelículas (Schmidt *et al.* 2004, Barraud *et al.* 2006), metabolismo del hierro (D'Autréaux *et al.* 2002, Mukhopadhyay *et al.* 2004), entre otros.

Se ha demostrado que *Azospirillum brasilense* Sp245 produce NO a partir de amonio o nitrato como fuentes de nitrógeno (Creus *et al.* 2005, Molina Favero *et al.* 2008), y que este NO producido en la interacción con raíces de tomate tiene un rol importante en la modificación de la arquitectura radical (Molina Favero *et al.* 2008).

Si bien *Azospirillum* puede producir NO utilizando amonio, el mecanismo que da cuenta de esta producción resulta aún poco claro, aunque existe evidencia que

indicaría que el proceso responsable es la nitrificación heterotrófica ⁽¹⁾ (Creus *et al.* 2005, Molina Favero *et al.* 2008, Arruebarrena Di Palma 2008).

Por otro lado, es conocido que *Azospirillum* posee la capacidad de realizar el proceso de desnitrificación. El mecanismo general de desnitrificación puede definirse como la utilización de nitrato de manera no asimilatoria en donde esta forma del nitrógeno es secuencialmente reducida a nitrito, NO, óxido nitroso y finalmente a nitrógeno gaseoso por las correspondientes reductasas (Figura 2.i). En este proceso el nitrato es utilizado como aceptor final de electrones en la respiración en ausencia de oxígeno. Este mecanismo permite a los microorganismos desnitrificadores generar energía para su crecimiento bajo condiciones de baja tensión o ausencia de oxígeno (Zumft 1993, Zumft 1997, Cutruzzolá 1999). Aunque durante años se consideró que el proceso de desnitrificación operaba bajo estrictas condiciones de anaerobiosis, hoy en día es ampliamente aceptado que este mecanismo puede tener lugar en presencia de oxígeno (Meiberg *et al.* 1980, Zumft 1997). Resulta esencial en este último caso la presencia de una nitrato reductasa periplásmica (Nap), la cual no es reprimida en su actividad ni expresión por la presencia de oxígeno (Steenhoudt *et al.* 2001).

Azospirillum brasilense Sp245 posee una Nap activa (Steenhoudt *et al.* 2001) que le permite realizar el proceso de desnitrificación aeróbica (Molina Favero *et al.* 2008). Como se mencionó anteriormente, el NO es un intermediario obligado de la desnitrificación y es a través de esta ruta que *A. brasilense* Sp245 produce mayoritariamente esta molécula. *A. brasilense* Sp245 posee dos operones que codificarían para la Nap y ambos poseen los genes que se han reportado para todas las Nap hasta ahora documentadas: *NapA*, *NapB* y *NapC* (Steenhoudt *et al.* 2001).

Los genes *NapA* y *NapB* codifican para las proteínas estructurales de la nitrato reductasa periplásmica. *NapA* codifica para la subunidad catalítica mayor del complejo enzimático en el cual el cofactor molibdopterina guanidino dinucleotido y un centro 4Fe-4S estarían involucrados en la transferencia de electrones (Zumft 1997). El polipeptido *NapB* contiene el cofactor di-hemo citocromo *c*, esencial para la transferencia de electrones.

⁽¹⁾Nitrificación heterotrófica: proceso por el cual algunas bacterias heterótrofas transforman secuencialmente el amonio en hidroxilamina, nitrito y finalmente nitrato. La producción de NO puede darse cuando el nitrito generado es reducido por una nitrito reductasa des-asimilatoria.

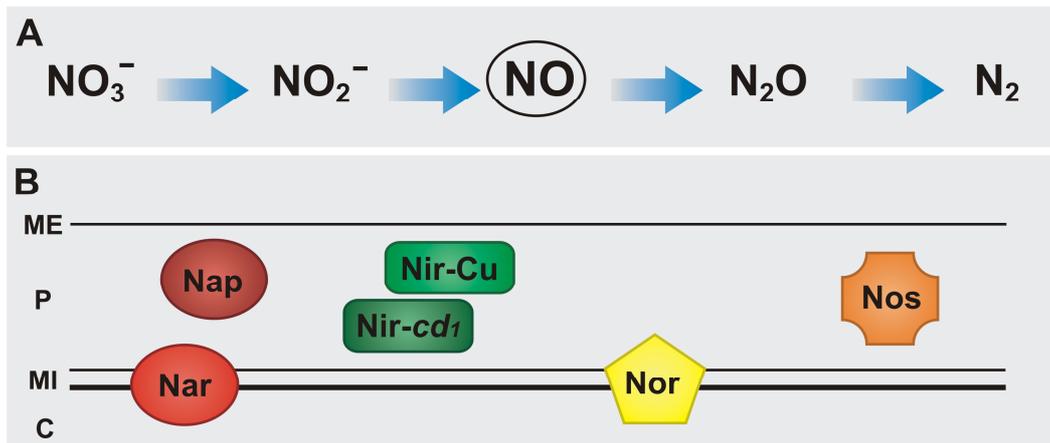


Fig. 2.i. **Vía de desnitrificación.** A) Esquema de los pasos secuenciales de reducción del nitrato (NO_3^-) a nitrógeno gaseoso (N_2) en un organismo desnitrificante. B) Se indican los nombres de las diferentes enzimas involucradas (símbolos en color) y su ubicación en la bacteria. NO_3^- : nitrato, NO_2^- : nitrito, NO: óxido nítrico, N_2O : óxido nitroso, N_2 : dinitrógeno. Nap: nitrato reductasa periplásmica, Nar: nitrato reductasa de membrana, Nir-Cu: nitrito reductasa con cofactor cobre, Nir-cd₁: nitrito reductasa citocromo cd₁, Nor: óxido nítrico reductasa, Nos: óxido nitroso reductasa. ME: membrana externa, P: periplásmo, MI: membrana interna, C: citoplasma.

Ambas proteínas son solubles y se encuentran en el espacio periplásmico. Finalmente NapC es el componente que contiene el cofactor tetra-hemo *citocromo c* y se encuentra anclado a la membrana plasmática (Zumft 1997). El nitrito generado por la actividad de la Nap es reducido por una nitrito reductasa, también de localización periplásmica. Pothier *et al.* (2007) identificaron dos copias del gen *NirK* en *A. brasilense* Sp245 que poseen una alta homología con las nitrito reductasas que utilizan cobre como cofactor.

El rol fisiológico de la Nap es muy diverso, al contrario de otras nitrato reductasas eucariotas o de las Nar bacterianas en donde su función central se encuentra siempre conservada. La Nap ha sido implicada en la reducción desasimilatoria de nitrato, desnitrificación y reducción de nitrato para la formación de amonio, mantenimiento del potencial oxido-reductor en la célula, así como de la toma de nitrato cuando este se encuentra en muy bajas concentraciones (Sparacino-Watkins *et al.* 2014 y referencias incluidas). Se ha observado que esta enzima funciona en la adaptación de la condición aeróbica a la anaeróbica en la bacteria *Alcaligenes eutrophus* (Siddiqui *et al.* 1993, Warnecke-Eberz y Friedrich 1993) mientras que en *Escherichia coli* tiene un rol en la utilización del nitrato en bajas concentraciones (Potter *et al.* 1999). Asimismo, existe evidencia de que la Nap permite disipar el poder

reductor en exceso permitiendo modular el balance redox óptimo en la célula (Zumft 1997, Gates *et al.* 2008).

El NO y su relación con la formación de biopelículas y metabolismo del hierro

En los últimos años han salido a la luz numerosos trabajos demostrando el rol del NO en la regulación de la formación y/o dispersión de biopelículas bacterianas (Schmidt *et al.* 2004, Barraud *et al.* 2006, Barraud *et al.* 2009, Plate y Marletta 2012). El NO sería el primer componente de una cascada de señales que tiene como último componente a la molécula señal al 3`5`-di-guanosín-monofosfato-cíclico (diGMPc, Barraud *et al.* 2009, Plate y Marletta 2012). El diGMPc participa de numerosos procesos celulares bacterianos y tiene un rol central y clave en la formación de biopelículas (Hengge 2009, Karatan y Watnick 2009). En *Azospirillum*, los reportes son escasos y se han identificado algunos genes involucrados en la formación de biopelículas, los cuales están relacionados a la síntesis de exopolisacáridos (EPS, Sheludko *et al.* 2008, Lerner *et al.* 2009a, 2009b) o con el regulador de la respuesta quimiotáctica *Che1* (Siuti *et al.* 2011). Sin embargo, no se ha estudiado hasta el momento de la realización de esta tesis que rol podrían tener el NO y el diGMPc en la formación de biopelícula en esta bacteria. Resulta importante el conocimiento de los mecanismos de formación de la biopelícula ya que como se mencionó anteriormente, una correcta colonización e interacción con la raíz es fundamental para el potencial éxito de promoción del crecimiento.

Por otro lado, el NO participa de la regulación del metabolismo del hierro en plantas (Graziano y Lamattina 2005) y animales (Richardson y Lok 2008), y evidencia reciente aunque escasa indicaría que también podría hacerlo en organismos procariontes. D`Antreaux *et al.* (2002) muestran que el NO puede interactuar no covalentemente con el factor de transcripción Fur modificando su afinidad por los promotores que regula. Fur es un factor de transcripción central en la regulación del metabolismo del hierro y estado redox en bacterias (Escolar *et al.* 1999). Además, el NO ha mostrado en estudios a gran escala por microarreglos que modifica la expresión de genes vinculados a la adquisición y metabolismo del hierro (Moore *et al.* 2004, Mukhopadhyay *et al.* 2004). Si bien existe en la bibliografía información sobre la producción de sideróforos en *Azospirillum* y su regulación (Saxena *et al.* 1986,

Bachhawat y Ghosh 1989, Saxena *et al.* 1989, Mori *et al.* 1992, Mori *et al.* 1996, Alahari *et al.* 2006, Cui *et al.* 2006, Tortora *et al.* 2011), los reportes, en comparación con otros mecanismos de promoción del crecimiento, son escasos y este aspecto ha quedado relegado en la investigación a lo largo de los años. La posible relación entre la producción de NO por esta bacteria y la regulación del metabolismo del hierro no han sido abordadas aún.

Planteo del problema

Aunque la participación del NO producido por *Azospirillum* sobre la fisiología de la planta ha sido estudiada anteriormente (Creus *et al.* 2005, Molina Favero *et al.* 2008), el rol de esta molécula sobre la propia fisiología de la bacteria carece de estudios. Al momento, sólo el trabajo de Tibelius y Knowles (1984), en el que se estudia el efecto del NO sobre la hidrogenasa de *A. brasilense*, ha abordado el tema. Además, teniendo en cuenta el rol de la Nap en otros microorganismos, resulta importante no solo entender el funcionamiento de esta enzima como parte clave de la síntesis de la molécula señal NO, sino también como un posible componente central de la regulación del estado redox de las células. En este contexto, se buscó establecer el rol del NO y la presencia de una Nap activa sobre dos procesos en *Azospirillum brasilense* Sp245: el metabolismo del hierro y la formación de biopelículas.

Referencias

- Alahari A, Tripathi AK, Le Rudulier D. 2006. Cloning and characterization of a fur homologue from *Azospirillum brasilense* Sp7. *Current Microbiology* 52:123-127.
- Arruebarrena Di Palma. 2008. Producción de óxido nítrico por nitrificación heterotrófica en *Azospirillum*. Tesis de Frado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN), Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP).
- Bachhawat AK, Ghosh S. 1989. Temperature inhibition of siderophore production in *Azospirillum brasilense*. *Journal of bacteriology* 171:4092-4094.
- Bais PH, Weir LT, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review in Plant Biology* 57:233-266.
- Bakker PAHM, Pieterse CMJ, van Loon LC. 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 97:239-243.
- Barbieri P y Galli E. 1993. Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. *Research in Microbiology* 44:69-75.
- Barbieri P, Zanelli T, Galli E, Zanetti G. 1986. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiology Letters* 36:87-90.
- Barraud N, Hassett DJ, Hwang SH, Rice ASA, Kjelleberg S, Webb JS. 2006. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 188:7344-7353.
- Barraud N, Schleheck D, Klebensberger J, Webb JS, Hassett DJ, Rice SA, Kjelleberg S. 2009. Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *Journal of Bacteriology* 191:7333-7342.
- Bashan Y, de-Bashan L. 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical review. *Advances on agronomy* 108:77-136.
- Bashan Y, Holguin G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: Environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology* 43:103-121.
- Bashan Y, Levanony H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology* 36:591-608.
- Bashan Y. 1999. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. *Biology and Fertility of Soils* 29:246-256.
- Beauchamp CJ. 1993. Mode of action of plant growth-promoting rhizobacteria and their potential use as biological control agents. *Phytoprotection* 71:19-27.
- Berg RH, Tyler ME, Novick NJ, Vasil V, Vasil IK. 1980. Biology of *Azospirillum*-sugarcane association: enhancement of nitrogenase activity. *Applied and Environmental Microbiology* 39:642-649.
- Bloom AJ, Meyerhoff PA, Taylor AR, Rost TL. 2003. Root development and absorption of ammonium and nitrate from the rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation* 21:416-431.
- Brencic A, Winans SC. 2005. Detection of and response to signals involved in host microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69:155-194.
- Burdman S, Okon Y, Jurkevitch E. 2000. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Critical Reviews in Microbiology* 26:91-110.
- Cohen A C, Bottini R, Piccoli PN. 2008. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. *Plant Growth Regulation* 54:97-103.
- Cohen AC, Travaglia CN, Bottini R, Piccoli PN. 2009. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. *Botany* 87:455-462.
- Cohen MF, Yamasaki H. 2003. Involvement of nitric oxide synthase in sucrose-enhanced hydrogen peroxide tolerance of *Rhodococcus* sp. strain APG1, a plant-colonizing bacterium. *Nitric Oxide* 9:1-9.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and environmental microbiology* 71:4951-4959.

- Creus CM, Graziano M, Casanovas EM, Pereyra MA, Simontacchi M, Puntarulo S, Barassi CA, Lamattina L. 2005. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta* 221:297-303.
- Crowley DE, Reid CPP, Szaniszlo PJ. 1988. Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. *Plant Physiology* 87:685–688.
- Cruz-Ramos H, Crack J, Wu G, Hughes MN, Scott C, Thomson AJ, Green J, Poole RK. 2002. NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. *EMBO Journal* 21: 3235–3244.
- Cui Y, Tu R, Guan Y, Ma L, Chen S. 2006. Cloning, sequencing, and characterization of the *Azospirillum brasilense* *fhuE* gene. *Current Microbiology* 52:169-177.
- Cutruzzolá F. 1999. Bacterial nitric oxide synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411:231–249.
- D’Autréaux B, Touati D, Bersch B, Latour JM, Michaud-Soret I. 2002. Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:16619–16624.
- Danhorn T, Fuqua C. 2007. Biofilm formation in plant-associated bacteria. *Annual Review of Microbiology* 61:401-422.
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, Labandera-Gonzalez C, Caballero-Mellado J, Aguirre JF, Kapulnik Y, Brener S, Burdman S, Kadouri D, Sarig S, Okon Y. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Functional Plant Biology* 28:871-879.
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Vande Broek A, Vanderleyden J. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil* 212:155–164.
- Dobbelaere S, Okon Y. 2007. The plant growth-promoting effect and plant responses, in Associative and Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. Elmerich Cy Newton WE eds. 145–170. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Dobereiner J. 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biology and Biochemistry* 29:771–774
- Escolar L, Perez-Martin J, de Lorenzo V. 1999. Opening de iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *Journal of Bacteriology* 181:6223-6229.
- Fages J. 1994. *Azospirillum* inoculants and field experiments, in *Azospirillum/plant associations*. Okon Y ed. 87-110. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Fallik E, Sarig S, Okon Y. 1994. Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In: *Azospirillum Plant Associations* (Okon, Y., Ed.), pp 75–85. CRC Press, Boca Raton.
- Gates AJ, Richardson DJ, Butt JN. 2008. Voltammetric characterization of the aerobic energy-dissipating nitrate reductase of *Paracoccus pantotrophus*: exploring the activity of a redox-balancing enzyme as a function of electrochemical potential. *Biochemical Journal* 409:159-168.
- Glick BR, Penrose DM, Li J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology* 190:63–68.
- Glick BR. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41:109–117.
- Glick BR. 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*. Article ID 963401. doi:10.6064/2012/963401.
- Gray EJ, Smith DL. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signalling processes. *Soil Biology and Biochemistry* 37:395–410.
- Graziano M, Lamattina L. 2005. Nitric oxide and iron in plants: an emerging and converging story. *Trends in Plant Science* 10:4-8.
- Grün S, Lindermayr C, Sell S, Durner J. 2006. Nitric oxide and gene regulation in plants. *Journal of Experimental Botany* 57:507–516.
- Gusarov I, Nudler E. 2005. NO-mediated cytoprotection: Instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:13855–13860.
- Haas D, Keel C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 41:117–153.

- Hengge R. 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews in Microbiology* 7:263-273.
- Hirsch AM, Bauer WD, Bird DM, Cullimore J, Tyler B, Yoder JI. 2003. Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecology* 84:858–868.
- Innerebner G, Knief C, Vorholt JA. 2011. Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. *Applied and Environmental Microbiology* 77:3202–3210.
- Jain DK, Patriquin DG. 1984. Root hair deformation, bacterial attachment, and plant growth in wheat-*Azospirillum* associations. *Applied and Environmental Microbiology* 48:1208–1213.
- Jin CW, He YF, Tang CX, Wu P, Zheng SJ. 2006. Mechanisms of microbially enhanced Fe acquisition in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Plant, Cell and Environment* 29:888–897.
- Kapulnik Y, Feldman M, Okon Y, Henis Y. 1985. Contribution of nitrogen fixed by *Azospirillum* to the N nutrition of spring wheat in Israel. *Soil Biology and Biochemistry* 17:509-515.
- Kapulnik Y, Okon Y, Henis Y. 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Canadian Journal of Microbiology* 31:881–887.
- Kapulnik Y, Okon Y, Kegel J, Nur I, Henis Y. 1981. Effects of temperature, nitrogen fertilization, and plant age on nitrogen fixation by *Setaria italica* inoculated with *Azospirillum brasilense* (strain Cd). *Plant Physiology* 68:340-343.
- Karatan E, Watnick P. 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73:310-347.
- Kloepper JW, Lifshitz R, Zablotowicz RM. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology* 7:39–44.
- Lamattina L, Garcia-Mata C, Graciano M, Pagnussat G. 2003. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annual Review in Plant Biology* 54:109–136.
- Lambrecht M, Okon Y, van de Broek A. 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends in Microbiology* 8:298–300.
- Lerner A, Castro-Sowinski S, Lerner H, Okon Y, Burdman S. 2009a. Glycogen phosphorylase is involved in stress endurance and biofilm formation in *Azospirillum brasilense* Sp7. *FEMS microbiology letters* 300:75–82.
- Lerner A, Castro-Sowinski S, Valverde A, Lerner H, Dror R, Okon Y, Burdman S. 2009b. The *Azospirillum brasilense* Sp7 *noeJ* and *noeL* genes are involved in extracellular polysaccharide biosynthesis. *Microbiology* 155:4058-4068.
- Lethbridge G, Davidson MS. 1983. Root-associated nitrogen-fixing bacteria and their role in the nitrogen nutrition of wheat estimated by ¹⁵N isotope dilution. *Soil Biology and Biochemistry* 15:365- 374.
- Levanony H, Bashan Y. 1989. Enhancement of cell division in wheat root tips and growth of root elongation zone induced by *Azospirillum brasilense* Cd. *Canadian Journal of Botany* 67:2213-2216.
- Lucy M, Reed E, Glick BR. 2004. Applications of free living plant growth promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86:1–25.
- Lugtenberg BJJ, Kravchenko LV, Simons M. 1999. Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environmental Microbiology* 1:439–446.
- Manthey JA, McCoy DL, Crowley DE. 1994. Stimulation of rhizosphere iron reduction and uptake in response to iron deficiency in citrus rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry* 32:211–215.
- McNear Jr DH. 2013. The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between. *Nature Education Knowledge* 4:1.
- Meiberg JB, Bruinenberg MPM, Harder W. 1980. Effect of dissolved oxygen tension on the metabolism of methylated amines in *Hyphomicrobium* X in the absence and presence of nitrate: evidence for aerobic denitrification. *Journal of General Microbiology* 120:453–463.
- Molina-Favero C, Creus CM, Simontacchi M, Puntarolo S, Lamattina L. 2008. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 21:1001–1009.

- Moore CM, Nakano MM, Wang T, Ye RW, Helmann JD. 2004. Response of *Bacillus subtilis* to nitric oxide and the nitrosating agent sodium nitroprusside. *Journal of bacteriology* 186:4655–4664.
- Mori E, Fani R, Gallori E, Fantappiè O, Bazzicalupo M. 1992. Mutants of *Azospirillum brasilense* altered in the uptake of iron. *Symbiosis* 13: 115-122.
- Mori E, Fulchieri M, Indorato C, Fani R, Bazzicalupo M. 1996. Cloning, nucleotide sequencing, and expression of the *Azospirillum brasilense lon* gene: involvement in iron uptake. *Journal of Bacteriology* 178:3440-3446.
- Mukhopadhyay P, Zheng M, Bedzyk LA, LaRossa RA, Storz G. 2004. Prominent roles of the NorR and Fur regulators in the *Escherichia coli* transcriptional response to reactive nitrogen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:745–750.
- O'Sullivan DJ, O'Gara F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiological Reviews* 56:662–676.
- O'toole G, Kaplan HB, Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology* 54:49-79.
- Patel BA, Moreau M, Widom J, Chen H, Yin L, Hua Y, Crane BR. 2005. Endogenous nitric oxide regulates the recovery of the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* from exposure to UV light. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:18183–18188.
- Pereyra CM, Ramella NA, Pereyra MA, Barassi CA, Creus CM. 2010. Changes in cucumber hypocotyl cell wall dynamics caused by *Azospirillum brasilense* inoculation. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:62–69.
- Perrig D, Boiero ML, Masciarelli OA, Penna C, Ruiz OA, Cassan FD, Luna MV. 2007. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75:1143–1150.
- Plate L, Marletta MA. 2012. Nitric oxide modulates bacterial biofilm formation through a multicomponent cyclic-di-GMP signaling network. *Cell* 46:449-460.
- Pothier JF, Prigent-Combaret C, Haurat J, Moëgne-Loccoz Y y Wisniewski-Dyé F. 2007. Duplication of plasmid-borne nitrite reductase gene *nirK* in the wheat-associated plant growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245. *Molecular Plant Microbe Interactaction* 21:831-842.
- Potter LC, Millington P, Griffiths L, Thomas GH, Cole JA (1999) Competition between *Escherichia coli* strains expressing either a periplasmic or a membrane-bound nitrate reductase: does Nap confer a selective advantage during nitrate-limited growth? *Biochem J* 344:77–84.
- Potter LC, Millington P, Griffiths L, Thomas GH, Cole JA. 1999. Competition between *Escherichia coli* strains expressing either a periplasmic or a membrane-bound nitrate reductase: does Nap confer a selective advantage during nitrate-limited growth?. *Biochemical Journal* 344:77–84.
- Raaijmakers JM, Vlami M, de Souza JT. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:537–547.
- Ramey BE, Koutsoudis M, von Bodman SB, Fuqua C. 2004. Biofilm formation in plant-microbe association. *Current Opinion in Microbiology* 7:602-609.
- Richardson DR, Lok HC. 2008. The nitric oxide–iron interplay in mammalian cells: Transport and storage of dinitrosyl iron complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1780:638–651.
- Rodriguez H, Fraga T, Bashan Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil* 287:15–21.
- Rovira AD, Newman EI, Bowen HJ, Campbell R. 1974. Quantitative assessment of the rhizoplane microflora by direct microscopy. *Soil Biology and Biochemistry* 6:211–216.
- Rudrappa T, Biedrzycki ML, Bais HP. 2008. Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* 64:153–166.
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepper JW. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:4927-4932.
- Saxena B, Modi M, Modi VV. 1986. Isolation and characterization of siderophores from *Azospirillum lipoferum* D-2. *Journal of General Microbiology* 132: 2219-2224.
- Saxena B, Vithlani L, Modi VV. 1989. Siderophore-mediated transport of molybdenum in *Azospirillum lipoferum* strain D-2. *Current microbiology* 19:291-295.

- Schmidt I, Steenbakkens PJM, op den Camp HJM, Schmidt K, Jetten MSM. 2004. Physiologic and proteomic evidence for a role of nitric oxide in biofilm formation by *Nitrosomonas europaea* and other ammonia oxidizers. *Journal of Bacteriology* 186:2781–2788.
- Shanmugam KT, O'Gara F, Andersen K, Valentine RC. 1978. Biological nitrogen fixation. *Annual Review of Plant Physiology* 29:263-276.
- Sheludko AV, Kulibyakina OV, Shirokov AA, Petrova LP, Matora LYu, Katsy EI. 2008. The effect of mutations affecting synthesis of lipopolysaccharides and calcofluor-binding polysaccharides on biofilm formation by *Azospirillum brasilense*. *Microbiology* 77:313–317.
- Siddiqui RA, Warnecke-Eberz U, Hengsberger A, Schneider B, Kostka S, Friedrich B. 1993. Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Journal of Bacteriology* 175:5867–5876.
- Singh PP, Shin YC, Park CS, Chung YR. 1999. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* 89:92–99.
- Siuti P, Green C, Edwards AN, Doktycz MJ, Alexandre G. 2011. The chemotaxis-like *Che1* pathway has an indirect role in adhesive cell properties of *Azospirillum brasilense*. *FEMS microbiology letters* 323:105–112.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Okon Y. 2009. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Advances in Botanical Research* 51:283-320.
- Sparacino-Watkins C, Stolz JF, Basu P. 2014. Nitrate and periplasmic nitrate reductases. *Chemical Society Reviews* 43:676-706.
- Steenhoudt O, Keijers V, Okon Y, Vanderleyden J. 2001. Identification and characterization of periplasmic nitrate reductase in *Azospirillum brasilense* Sp245. *Archive in Microbiology* 175:344–352.
- Steenhoudt O, Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews* 24:487–506.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology* 56:187-209.
- Thuler DS, Floh EIS, Handro W, Barbosa HR. 2003. Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp in chemically defined media. *Letters in Applied Microbiology* 37:174–178.
- Tibelius KH, Knowles R. 1984. Hydrogenase activity in *Azospirillum brasilense* is inhibited by nitrite, nitric oxide, carbon monoxide and acetylene. *Journal of bacteriology* 160:103-106.
- Tortora ML, Diaz-Ricci JC, Pedraza RO. 2011. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives in Microbiology* 193:275–286.
- Verhagen BWM, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, van Loon LC, Pieterse CMJ. 2004. The transcriptome of rhizobacteria- induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17:895–908.
- Vessey JK .2003. Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255:571–586.
- Walker TS, Bais HP, Déziel E, Schweizer HP, Rahme LG, Fall R, Vivanco JM. 2004. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiology* 134:320–331.
- Wang Y, Dufour YS, Carlson HK, Donohue TJ, Marletta MA, Ruby EG. 2010. H-NOX-mediated nitric oxide sensing modulates symbiotic colonization by *Vibrio fischeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:8375–8380.
- Warnecke-Eberz U, Friedrich B. 1993. Three nitrate reductase activities in *Alcaligenes eutrophus*. *Archives in Microbiology* 159:405–409.
- Xie Y, Embley TM, O'Donnell AG. 1994. Phylogenetic analysis of *Azospirillum* by direct sequencing of PCR-amplified 16S rDNA. *Systematic and Applied Microbiology*, 17:197–201.
- Zumft WG. 1993. The biological role of nitric oxide in bacteria. *Archives in Microbiology* 160:253–264.
- Zumft WG. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiological and Molecular Biology Reviews* 61:533–616.
- Zumft WG. 2002. Nitric oxide signaling and NO dependent transcriptional control in bacterial denitrification by members of the FNR-CRP regulator family. *Journal of Molecular Microbiology Biotechnology* 4: 277–286.



HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS GENERAL DE TRABAJO

La nitrato reductasa periplásmica (Nap) de *Azospirillum brasilense* Sp245 está involucrada en la regulación del metabolismo del hierro y en la formación de biopelículas a través de su rol en la síntesis de óxido nítrico (NO) y de regulación del estado redox de la célula por su acción de disipación de poder reductor en exceso.

Hipótesis particulares

- 1- Las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas para el crecimiento de *A. brasilense* modifican la capacidad de producción de sideróforos y la producción de nitrito por la Nap.
- 2- *A. brasilense* posee actividad Fe^{3+} -reductasa de membrana y/o periplásmica.
- 3- La deficiencia de hierro induce un aumento en la síntesis de NO.
- 4- La mutante de *A. brasilense* Faj164, nitrato reductasa periplásmica nula, no responde aumentando la expresión de genes relacionados al metabolismo del hierro frente a una deficiencia de este metal.
- 5- La presencia de NO producido endógenamente y por agregado exógeno aumenta la producción de sideróforos.
- 6- La función de disipación de poder reductor de la Nap modifica los niveles de polihidroxibutirato (PHB) y la síntesis de sideróforos.
- 7- La formación de biopelícula es diferente en función de la fuente de nitrógeno utilizada, siendo mayor en amonio que en nitrato.
- 8- La morfología de la colonia y la capacidad de formación de agregados celulares en la mutante Faj164 se ve alterada por la ausencia de una Nap funcional.
- 9- La complementación de la mutación *nap⁻* mediante un vector conteniendo el operon *Nap* salvaje y tratamientos farmacológicos con NO restaura el fenotipo salvaje de formación de biopelícula.
- 10- Un aumento de la dosis génica del gen *ChsA*, el cual codifica para una fosfodiesterasa que degrada el diGMPC, en el fondo genético de la cepa salvaje que produce NO, disminuye la producción de biopelícula.
- 11- La deficiencia de hierro afecta negativamente la producción de biopelícula.

OBJETIVO GENERAL

Indagar sobre el rol del óxido nítrico (NO) y la nitrato reductasa periplásmica (Nap) de *Azospirillum brasilense* Sp245 en dos mecanismos relacionados a la promoción del crecimiento vegetal por esta bacteria como son el metabolismo del hierro y la formación de biopelículas.

Objetivos particulares

- 1- Estudiar los mecanismos de adquisición de hierro en *A. brasilense* Sp245 y su relación con la actividad Nap.
- 2- Determinar la acción del NO como modulador de la síntesis de sideróforos en *A. brasilense* Sp245.
- 3- Establecer el rol de la Nap como mecanismo de disipación de poder reductor y la relación con el metabolismo del hierro.
- 4- Caracterizar la morfología de colonia, la formación de agregados celulares, el crecimiento estático y la formación de biopelícula de *A. brasilense* Sp245 y su mutante Faj164.
- 5- Estudiar la participación del NO como regulador del proceso de formación de biopelícula.
- 6- Determinar la contribución a la formación de biopelículas del gen *ChsA* y su interacción con el NO.
- 7- Establecer la relación entre la deficiencia de hierro y la formación de biopelículas en la cepa salvaje y mutante en la *Nap*.



CAPITULO 1.
METABOLISMO DEL HIERRO EN *Azospirillum brasilense* Y
SU RELACIÓN CON LA NITRATO REDUCTASA
PERIPLÁSMICA.



INTRODUCCIÓN

El hierro es un metal de transición que bajo condiciones fisiológicas existe en dos estados redox interconvertibles: la forma reducida (ion ferroso, Fe^{2+}) y la forma oxidada (ion férrico, Fe^{3+}). Estas propiedades hacen al hierro un componente prostético extremadamente versátil para la incorporación en proteínas como biocatalizadores o transportadores de electrones. El hierro es un metal abundante sobre la tierra, siendo el cuarto elemento más cuantioso sobre ésta (Andrews *et al.* 2003).

El hierro es absolutamente requerido para la vida por la gran mayoría de los organismos, con la excepción de algunas bacterias, como *Lactobacillus plantarum* que solo contiene uno o dos átomos de hierro por célula (Archibald 1983). El hierro participa en la mayoría de los más importantes procesos biológicos, como fotosíntesis, fijación biológica del nitrógeno atmosférico (FBN), metanogénesis, producción de hidrógeno gaseoso, respiración, en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, transporte de oxígeno, regulación de la expresión génica y en la síntesis de ADN (Andrews *et al.* 2003).

Teniendo en cuenta estas importantes funciones que dependen del hierro resulta obvio que los organismos han desarrollado mecanismos para obtener este metal y controlar su metabolismo. Sin embargo, a pesar de estar en grandes cantidades en el suelo, su biodisponibilidad en ambientes oxigénicos y a pH neutro es extremadamente limitada. En los suelos aeróbicos, el hierro se encuentra principalmente en la forma férrica formando polímeros de oxihidróxidos de muy baja solubilidad (Schmidt 1999). Si bien el hierro es necesario para la mayoría de los organismos, sus propiedades en ambientes oxigénicos hacen que pueda ser extremadamente tóxico. El oxígeno y las especies reducidas del oxígeno interactúan con el hierro de una manera que puede resultar devastadora para la célula (Touati 2000). En los organismos aeróbicos, el uso del oxígeno molecular para la respiración u oxidación de los nutrientes para obtener energía conlleva a la generación de subproductos reactivos como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los altamente reactivos radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Estas especies son generadas continuamente en células creciendo activamente en condiciones aeróbicas (Cabiscol *et al.* 2000). La reacción de Fenton, es aquella en la que el hierro es oxidado por una molécula de H_2O_2 generando $\cdot\text{OH}$ y causando enorme daño celular. El $\cdot\text{OH}$ es un

poderoso oxidante poco selectivo que reacciona con casi virtualmente todas las moléculas orgánicas (Imlay 2013). Esta naturaleza dual del hierro, como es su requerimiento vital y la peligrosidad de la generación de $\cdot\text{OH}$ por la reacción de Fenton, llevan a que la célula regule de manera muy precisa el metabolismo de este metal.

Los mecanismos de adquisición de hierro y manejo del mismo por la célula han sido caracterizados ampliamente en numerosas especies bacterianas. Uno de los principales mecanismos para adquirir este metal es la síntesis de los denominados sideróforos. Estas moléculas de bajo peso molecular poseen una alta afinidad por el ion Fe^{3+} (Neilands 1995). Cuando los microorganismos enfrentan condiciones de deficiencia de hierro sintetizan sideróforos, excretándolos al medio circundante y, una vez que estos secuestran el hierro, el complejo ferri-sideróforo es nuevamente internalizado a fin de que el metal ingrese en la célula (Figura 1.1, Andrews *et al.* 2003)

Existen principalmente tres tipos estructurales de sideróforos: hidroxamatos, catecoles y los relacionados al ácido hidroxicarboxílico (Boukhalifa y Crumbliss 2002, Bonnefoy y Holmes 2012). Además, en su esqueleto pueden contener aminoácidos del tipo no proteico y su síntesis en bacterias es principalmente por la vía no ribosomal (Crosa y Walsh 2002). Una vez sintetizado el sideróforo, éste es exportado activamente hacia el exterior de la célula, proceso que requiere energía, por diversos transportadores dependiendo de la especie bacteriana. Existen tres grupos de proteínas que mayormente están involucradas en la excreción: la superfamilia facilitadora mayor (MFS, major facilitator superfamily), la superfamilia de resistencia, nodulación y división celular (RND, resistance nodulation and cellular division), y la superfamilia ABC (Saha *et al.* 2012). Fuera de la célula los sideróforos interactúan con el Fe^{+3} y este complejo ingresa a la célula nuevamente gracias a transportadores que pueden o no interactuar con el complejo ExbB/ExbD/TonB (Figura 1.1 A, Braun y Hantke 2013). Cuando este complejo está involucrado, asocia una proteína canal ubicada en la membrana exterior con el transportador ABC de membrana citoplasmática, permitiendo el paso del ferri-sideróforo (Wanderman y Delepelaire 2004, Braun y Hantke 2013, Andrews *et al.* 2003).

intracelular son normales, Fur está unido al Fe^{2+} de modo que permanece asociado en forma de dímero a los promotores de los genes que regula, evitando la expresión génica (Figura 1.1 B). Sin embargo, cuando la concentración intracelular de hierro cae, Fur se disocia del Fe^{2+} , y esto lleva a que se separe de las regiones de interacción en el promotor y la expresión de los genes de respuesta a la deficiencia de hierro se active (Figura 1.1 C). El rol de Fur no solo se ha establecido en relación al metabolismo del hierro, sino que también este factor de transcripción regula respuestas frente a estrés oxidativo o de acidez, quimiotaxis, bioluminiscencia, entre otras (Escolar *et al.* 1999 y referencias incluidas). Es interesante notar que Fur interacciona con el hierro y éste a su vez tiene una íntima relación con las especies reactivas de oxígeno y el estado redox de la célula (Escolar *et al.* 1999, Touati 2000), siendo entonces Fur un punto nodal para la integración de señales tanto de hierro como de estado redox de la célula.

Como se indicó en la sección “Introducción General”, el rol de la Nap en la fisiología bacteriana puede ser muy variable. La Nap fue primeramente reportada en microorganismos fotoautótrofos y en bacterias desnitrificantes, pero actualmente se conoce que está distribuida ampliamente entre los microorganismos Gram-negativos (Sparacino-Watkins *et al.* 2014). El rol fisiológico de la Nap puede variar en diferentes organismos o incluso dentro de la misma bacteria bajo condiciones metabólicas diferentes. Existen claras evidencias de que la Nap actúa como enzima desasimilatoria usada para balancear el estado redox de la célula, disipando equivalentes de poder reductor (Berks *et al.* 1995, Moreno y Ferguson 1998, Richardson *et al.* 1988, Roldan *et al.* 1994, Sears *et al.* 1997, Gates *et al.* 2008). En *A. brasilense*, la función fisiológica de la Nap ha sido asignada (hipotéticamente) a su rol en mantener el balance del estado redox (Steenhuodt *et al.* 2001), aunque esto no ha sido confirmado experimentalmente hasta el momento de escritura de esta tesis. Además, el NO es un subproducto obligado del metabolismo desasimilatorio del nitrato (Zumft 1997) y la Nap actúa como primera enzima generadora del sustrato (nitrito) para la formación de esta molécula señal en *A. brasilense* Sp245 (Molina Favero *et al.* 2008).

Aunque en animales y plantas la relación entre la regulación del metabolismo del hierro y el NO ha sido ampliamente caracterizada (Graziano y Lamattina 2005, Richardson y Lok 2008), en bacterias los reportes de vínculo entre éstos dos actores son muy escasos. Evidencias de esta relación fueron encontradas por D`Auntreaux *et*

al. (2008) donde muestran que el complejo Fur-Fe²⁺ interacciona directamente con el NO, y este complejo Fur-Fe²⁺-NO tiene menor afinidad por las secuencias de reconocimiento en los promotores regulados por Fur, desreprimiendo la expresión de los genes. Por otro lado, evidencia adicional de la relación del NO con el metabolismo del hierro en bacterias surge de estudios macro de expresión génica por tratamientos con dadores de NO como nitroprusiato de sodio (SNP) o S-nitrosoglutation (GSNO) (Moore *et al.* 2004, Mukhopadhyay *et al.* 2004). Estos estudios muestran que ciertos genes vinculados al metabolismo del hierro modifican su expresión frente al tratamiento con estos dadores aunque no se indica qué mecanismo de regulación podría estar operando.

Por otro lado, el rol de la Nap como reguladora del balance redox de la célula y su efecto sobre el metabolismo del hierro tiene un claro ejemplo en un microorganismo donde este metal es clave en su fisiología. La alfa-proteobacteria *Magnetospirillum gryphiswaldense* posee los denominados magnetosomas, que consisten en cristales de magnetita (Fe₃O₄) envueltos en una membrana. Para la síntesis de estas estructuras son requeridas grandes cantidades de hierro. Li *et al.* (2012) demostraron que una mutante nula en la Nap poseía una baja biomineralización del hierro, generando deficiente producción de magnetosomas. Estos autores adjudicaron este fenotipo a la posible alteración del balance redox requerido para la síntesis de estas estructuras. Trabajos posteriores de este grupo reforzaron esta hipótesis donde el mantenimiento de un balance redox adecuado permite una correcta síntesis de los magnetosomas.

Las investigaciones desarrolladas en el campo del metabolismo del hierro en *Azospirillum* fueron abordadas por varios trabajos en los que se analizaron las características bioquímicas de los sideróforos (Saxena *et al.* 1986) y la regulación de la adquisición de este metal (Bachhawat y Ghosh 1987a, Bachhawat y Ghosh 1987b, Mori *et al.* 1992, 1996, Shah *et al.* 1992). Más recientemente, análisis de mutantes y expresión de genes relacionados al metabolismo del hierro fueron descritos y estudiados (Alahari *et al.* 2006, Cui *et al.* 2006, Xie *et al.* 2005) y el rol de la síntesis de sideróforos en la interacción *Azospirillum*-planta fue establecido (Tortora *et al.* 2011).

En este capítulo se estudió la regulación de los mecanismos de adquisición de hierro en *Azospirillum brasilense* Sp245 como son la síntesis de sideróforos y actividad

Fe³⁺-reductasa. Asimismo, se realizaron ensayos para comprender el rol del NO y/o la Nap sobre estos mecanismos.



MATERIALES y MÉTODOS

Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

Para el estudio del metabolismo del hierro se utilizaron las cepas de *A. brasilense* Sp245 (Baldani *et al.* 1986) y su mutante isogénica Faj164, la cual posee interrumpido el gen *NapA* por un cassette de resistencia a kanamicina (Steenhoudt *et al.* 2001). Esta cepa posee reducida su capacidad de producir NO en un 95% con respecto a la cepa salvaje cuando ambas utilizan nitrato como fuente de nitrógeno (Molina Favero *et al.* 2008). Ambas cepas fueron estriadas en placas de medio ACR (Rodríguez Cáceres 1982) y llevadas a incubación por 4-5 días. Colonias de *A. brasilense* fueron transferidas a 25 ml de medio LB en erlemmeyers de 125 ml. Estos precultivos fueron llevados a incubación a 100 rpm, 30°C hasta alcanzar una DO_{540nm} de 1-1.2 (típicamente 16 horas). Los cultivos fueron lavados con solución fisiológica (NaCl 0.85% P/v) y resuspendidos a una DO_{540nm} ajustada de 1. La relación de volúmenes de inóculo/medio utilizada para iniciar los cultivos fue de 1/1000. Se incubaron los cultivos a 100 rpm, a 30°C, hasta alcanzar la fase estacionaria.

El medio utilizado para el estudio del metabolismo del hierro en *Azospirillum* fue Nfb (Dobereiner y Day 1976) con las siguientes modificaciones. No se colocó azul de bromotimol ni extracto de levadura, se lo suplementó con NH_4Cl 18 mM o KNO_3 18 mM como fuente de nitrógeno y con fructosa 37 mM o ácido málico 37 mM como fuente de carbono. El Fe-EDTA fue reemplazado por $FeCl_3$ en concentraciones de 37 μM (control), 29 μM , 9 μM , 6 μM , 3 μM o sin agregado del mismo, según el experimento. Para evitar la contaminación con trazas de hierro, se utilizó en todos los casos necesarios agua ultra pura.

Todas las determinaciones obtenidas a partir de cultivos líquidos fueron realizadas en el estadio fisiológico de entrada en fase estacionaria (aproximadamente 24 horas). En algunos casos se trataron los cultivos con el quelante de hierro 2,2'-dipyridyl (Sigma) a una concentración final de 78 μM .

Cinéticas de crecimiento.

Cultivos de *A. brasilense* Sp245 o Faj164 fueron iniciados como se mencionó anteriormente en Erlenmeyers de 250 ml conteniendo 100 ml de medio. Se llevaron a incubación y cada 2 ó 3 horas se determinó DO_{540nm} y se tomaron muestras de 1 ml para determinar proteínas totales según Bradford (1976). La toma de muestras y

medición de DO fue seguida hasta que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento. Las curvas se realizaron con tres réplicas biológicas por cada tratamiento en dos ensayos independientes.

Determinación de la producción de sideróforos.

Para la determinación de la producción de sideróforos se utilizó el medio CAS (Schwyn y Neilands 1987) modificado, en donde se usó medio Nfb (indicado anteriormente) como soporte para el crecimiento de *Azospirillum*. Cien ml de la solución CAS se mezclaron con 1000 ml de medio Nfb y se colocaron 15 g de agar. El medio Nfb contenía como fuente de nitrógeno amonio o nitrato y como fuente de carbono fructosa o ácido málico. Para el caso particular de la fructosa, fue esterilizada por filtración y agregada al momento de verter el medio de cultivo en las placas.

Precultivos de ambas cepas en LB fueron lavados con solución fisiológica y resuspendidos a una DO_{540nm} ajustada de 2. Diez μ l de cultivo resuspendido fueron colocados sobre un disco de papel de filtro estéril (5,5 mm de diámetro) depositado sobre el medio de cultivo CAS. Se colocaron tres discos de papel por placa de medio CAS. Las placas fueron llevadas a incubación en cámara húmeda a 30°C por 6 días.

Los tratamientos para estudiar la producción de sideróforos fueron realizados colocando sobre el disco de papel previamente inoculado con *Azospirillum*, en forma diaria y por el lapso de 3 días, 5 μ l de los siguientes compuestos: i) como dadores de NO se utilizó GSNO (S-nitrosoglutation, Hart 1985) o SNP (nitroprusiato de sodio) en concentraciones crecientes (5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M o 500 μ M); ii) como sustrato para la producción de NO vía desnitrificación se trató con $NaNO_2$ en las mismas concentraciones mencionadas; iii) como secuestrante de NO se utilizó cPTIO (2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-oxil-3-oxido de potasio) en concentraciones de 0.125 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM y 2 mM; iv) para alterar el balance redox de la célula se trataron las cepas con GSH (glutación reducido), GSSG (glutación oxidado) o NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) también en concentraciones crecientes de 0.5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M o 20 μ M (20 μ M solo para tratamientos con GSH y GSSG).

Pasados 3 días de cultivo, las placas fueron escaneadas y analizadas mediante el programa ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). La determinación de la producción de

sideróforos para cada tratamiento se estableció utilizando el criterio de Tortora *et al.* (2011) donde se expresa la producción relativa de sideróforos como:

$$prs = [(diámetro halo sideróforo - diámetro colonia)/diámetro colonia] \times 100$$

Cuantificación del hierro total.

El método está basado en el reportado por Graziano y Lamattina (2007) con modificaciones para su utilización en cultivos bacterianos. Cultivos de *A. brasilense* (entre 6 y 15 ml) creciendo bajo diferente disponibilidad de hierro fueron cosechados por centrifugación a 5000 rpm, lavados con solución fisiológica y resuspendidos en 200 μ l de agua ultrapura. Cincuenta μ l fueron utilizados para determinación de proteínas (Bradford 1976) y los restantes 150 μ l fueron tratados con 83 μ l de HCl concentrado (12M) e incubados a 50°C durante una noche. Se llevó el volumen a 500 μ l con agua ultrapura y los tubos fueron centrifugados 10 minutos a 10000 rpm a 4°C. Se colectaron 400 μ l del sobrenadante el cual fue transferido a un nuevo tubo y se adicionaron 125 μ l de hidroxilamina 10% (P/V) en una solución 0.1 mM HCl incubándose a 70°C por dos horas con ocasionales agitaciones manuales. Luego se agregó 500 μ l de buffer acetato de amonio (pH 5.5 1% (P/V) en una solución 12 % (V/V) de hidróxido de amonio) llevando el pH a 4. Finalmente se agregó 4 μ l de Ferrozina 100 mM (ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-*p,p'*-disulfónico monosódico, Sigma), se mezcló y se determinó la absorbancia a 562nm. La curva estándar se realizó utilizando sulfato de amonio ferroso ($Fe(NH_4)_2SO_4$).

Cuantificación del nitrito.

Cultivos de *Azospirillum* creciendo en medio Nfb fueron centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos y 100 μ l de sobrenadante fueron transferidos a un nuevo tubo y conservado a -20°C hasta su uso. La determinación del contenido de nitrito en los sobrenadantes se realizó transformando este ion en NO y detectando este último mediante un electrodo específico (inNO-T-II system, Innovative Instruments, Inc). Entre 10 μ l y 50 μ l de una dilución 1/25 del sobrenadante obtenido fue colocado en una solución ácida (HCl 100 mM) conteniendo 0,1% (P/V) de KI y en contacto constante con la punta del electrodo. En esta solución el nitrito es rápidamente reducido a NO el cual genera un cambio de potencial en el electrodo proporcional a la concentración. Este

cambio de potencial es registrado por el programa del equipo y transformado a concentración de nitrito. Previamente a las determinaciones, se calibró el equipo con concentraciones conocidas de NaNO_2 .

Contenido de polihidroxitirato (PHB).

El contenido de PHB en *Azospirillum* fue determinado mediante la adaptación y fusión de los protocolos de Law y Slepecky (1961) y Hahn *et al.* (1994) estimando el PHB a través de la determinación de ácido crotónico, el cual es un producto de la hidrólisis acida del PHB. Dos ml de cultivos de *Azospirillum* fueron cosechados a 5000 rpm por 10 minutos, lavados con solución fisiológica y resuspendidos enérgicamente en 500 μl de lavandina comercial al 30% (v/v). Luego se agregaron 500 μl de cloroformo y se llevó a agitación (100-150 rpm) a 30°C por 120 minutos. Los tubos fueron centrifugados a temperatura ambiente a 6000 rpm por 10 minutos y se separaron 200 μl de la fase inferior (conteniendo el cloroformo) transfiriéndola a un nuevo tubo. El cloroformo fue evaporado a 65°C en estufa, el residuo resuspendido en 500 μl de H_2SO_4 concentrado e incubado a 80°C por 60 minutos. Luego, se realizó una dilución 1/50 y se determinó absorbancia a 210nm. El contenido de ácido crotónico fue calculado utilizando el coeficiente de extinción molar $15.5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Slepecky y Law 1960).

Determinación de la reducción de Fe^{3+} *in vivo*.

La reducción de Fe^{3+} en células intactas de *Azospirillum* se llevó adelante según el protocolo de Graziano y Lamattina (2007), con modificaciones para el tratamiento de cultivos bacterianos. *Azospirillum* fue crecido hasta alcanzar el inicio de la fase estacionaria y 1 ml fueron centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos. El pellet fue lavado en buffer fosfato (66 mM) y resuspendido a $\text{DO}_{540\text{nm}}$ ajustada de 2. En tubos de 1.5 ml se colocaron 164 μl de buffer fosfato (66 mM), 30 μl de CaSO_4 (5 mM), 3,5 μl Fe-EDTA (46 mM) y 100 μl del cultivo resuspendido. En la tapa de cada tubo se colocaron 1.4 μl de Ferrozina 100 mM, se cerraron y se invirtió suavemente para iniciar la reacción. Se llevaron los tubos a incubación en oscuridad a 30°C por 90 minutos. Los tubos fueron centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se transfirió a nuevos tubos y se determinó absorbancia a 562nm. Como controles se utilizó buffer

fosfato en lugar de cultivo y células inactivadas por calor (microondas máximo poder 1 minuto). La concentración μM de Fe^{3+} reducido fue obtenida utilizando el coeficiente de extinción molar de la Ferrozina: $27.9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Análisis *in silico*

La búsqueda de una/s putativa/s Fe-reductasa/s de membrana se realizó a través del análisis de la base de datos (versión inicial no curada) del genoma de *Azospirillum brasilense* Sp245 (<http://genomics.ornl.gov/research/azo/>, consultada en 2009). La secuencia obtenida fue analizada para la búsqueda de péptido señal mediante los programas PrediSI (<http://www.predisi.de/>) y SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), regiones transmembrana con los programas TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>) y TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) y dominios conservados mediante los programas pfam (<http://pfam.xfam.org/>), Scanprosite (<http://prosite.expasy.org/>) y el análisis de rutina que realiza el sistema BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Además, la posible proteína fue modelada *in silico*. Para ser modelada la secuencia debió ser dividida en dos secciones, una región conteniendo el dominio citoplasmático y otra conteniendo el dominio transmembrana. El primero fue modelado mediante el programa Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). El modelo de esta región fue analizado mediante el programa Ramapage (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) a fin de obtener el gráfico Ramachandran. El dominio transmembrana fue modelado *de novo* mediante el programa I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Los modelos obtenidos fueron visualizados y editados usando PyMOL (<https://www.pymol.org/>). Se analizó también con estas herramientas bioinformáticas las secuencias de la proteína Fe^{3+} -reductasa de *Schizosaccharomyces pombe* (NCBI AAA68045.1) y HMP de *E. coli* (PDB 1GVH_A).

Extracción de ARN y PCR transcriptasa reversa (RT-PCR)

Cultivos de *A. brasilense* Sp245 y Faj164 con diferentes condiciones de disponibilidad de hierro fueron cosechados a 5000 rpm y se extrajo ARN total según el protocolo del Trizol (Anexo 1). El ARN extraído fue tratado con DNasa Promega según las indicaciones del proveedor y posteriormente se realizó la síntesis del ADN copia (ADNc) (Anexo2). El ajuste de la carga de ADNc se realizó mediante la amplificación del gen *16S* utilizando los primers *Fw-16S*: AGGCTTGA CTTC CGGAGAGG y *Rv-16S*: TGGTAAGGTTCTGCGGTTG con 18 ciclos de amplificación (Anexo 3). Como control de la ausencia de ADN genómico, se realizó una PCR utilizando el ARN tratado con DNasa como templado.

Los genes estudiados en su expresión fueron: *AzFrp* (putativa hierro reductasa de membrana, este estudio), *FhuE* (transportador de hierro-sideróforo, Cui *et al.* 2006) y *Fur* (regulador global de la respuesta a hierro, Alahari *et al.* 2006). Los primers directo y reverso utilizados para cada uno de ellos fueron: *Fw-Fur*: ATGAAGAGGCGTCCACCGAC, *Rv-Fur*: TCGAGAGACACGCCGTCGAG, *Fw-FhuE*: AGCTACAGCAAACGGTCCGAG, *Rv-FhuE*: ACGTAGGTCATCATCCGCTGG, *Fw-AzFrp*: CTCACGATGTTATGGCTTGC, *Rv-AzFrp*: GTGGAAAACCAGCACGAGAT. Las reacciones de RT-PCR para cada gen se detallan en el Anexo 3. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa 1% $\frac{P}{V}$ teñidos con GelRed (Biotium).

La cuantificación de los niveles de expresión se realizó analizando las imágenes obtenidas de los geles de agarosa 1 % $\frac{P}{V}$ mediante el programa ImageJ y relativizando la expresión de los genes a la del gen *16S*.

Diseño experimental

Los experimentos fueron realizados utilizando de 3 a 6 réplicas biológicas en uno o dos ensayos independientes. En las leyendas de cada figura se indica puntualmente el número de réplicas y de ensayos realizados para obtener los datos correspondientes.



RESULTADOS

Uno de los primeros puntos que se analizó fue la producción de los sideróforos frente a la utilización de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en la cepa Sp245. Adicionalmente, y en busca del posible rol de la Nap, este ensayo fue realizado también con la cepa mutante Faj164. Como se puede observar en la Figura 2.1, tanto la fuente de nitrógeno como la de carbono utilizadas por la cepa salvaje afectaron marcadamente la producción de sideróforos tanto al día 3 como al día 6 de cultivo. Al respecto se puede mencionar que la producción de sideróforos es notablemente mayor cuando la bacteria utiliza nitrato en lugar de amonio para su crecimiento (notar escala en Figura 2.1). Además, tomando a cada fuente de nitrógeno de manera independiente, se puede observar que la producción de sideróforos es de 3 a 5 veces mayor cuando la bacteria utiliza ácido málico que cuando crece en fructosa. Para el caso de la cepa mutante Faj164, la producción de sideróforos fue en todos los casos similar a la observada para la cepa salvaje, a excepción de la combinación ácido málico/nitrato, en donde mostró una reducción de aproximadamente un 50% en la producción de sideróforos respecto de la salvaje tanto para el día 3 como al día 6.

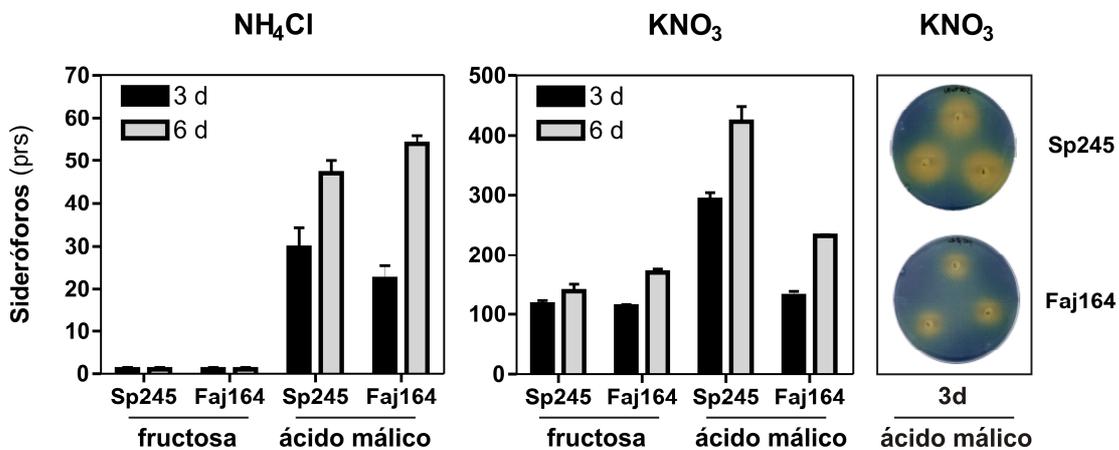


Fig. 2.1. **Producción de sideróforos en *A. brasilense*.** *A. brasilense* Sp245 y su mutante isogénica Faj164 *nap⁻* fueron cultivadas en placas de medio CAS conteniendo ácido málico o fructosa como fuente de carbono y amonio o nitrato como fuente de nitrógeno. Las placas fueron incubadas a 30°C en cámara húmeda por 3 ó 6 días. La producción de sideróforos en cada medio de cultivo fue cuantificada según Tortora *et al.* (2011). Los valores corresponden a la media con su desvío estándar de 2 ensayos independientes con 3 réplicas cada uno. prs: producción relativa de sideróforos. Las fotografías muestran la producción de sideróforos por Sp245 y Faj164 a los 3 días de incubación en medio CAS conteniendo ácido málico y nitrato como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente. El halo amarillo da cuenta de la presencia de sideróforos.

Teniendo en cuenta que no se observaron diferencias en la producción de sideróforos en la combinación fructosa/nitrato, pero si en la ácido málico/nitrato entre la cepa salvaje y mutante, se buscó conocer si la función Nap se encontraba modificada por la fuente de carbono en estas dos cepas. La Figura 3.1 muestra que la producción de nitrito fue modificada por la fuente de carbono utilizada, siendo 6 veces menor en fructosa que en ácido málico para la cepa Sp245. En el caso de Faj164 y, como era de esperar dada la mutación que esta bacteria posee, en ambos casos se registraron cantidades mínimas de nitrito.

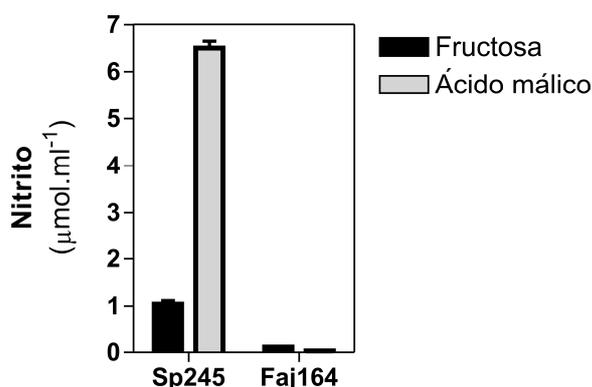


Fig. 3.1. **Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de nitrito.** *A. brasilense* Sp245 y Faj164 fueron cultivadas en medio Nfb conteniendo ácido málico o fructosa y nitrato. Los cultivos fueron incubados hasta alcanzar la fase estacionaria y sobrenadantes de éstos cultivos se utilizaron para determinar la concentración de nitrito. Los valores corresponden a las medias con sus desvíos de un ensayo representativo con 4 réplicas por condición.

Dado que las diferencias observadas entre ambas cepas en la producción de sideróforos se observó en la combinación ácido málico/nitrato, los siguientes experimentos fueron llevados a cabo en este medio de cultivo en particular.

Teniendo en cuenta la producción reducida de sideróforos en la cepa mutante respecto de la salvaje, resultó necesario conocer si el contenido de hierro total de ambas cepas estaba alterado. La Tabla 1.1 muestra que el contenido intracelular de este metal fue similar tanto entre ambas cepas como para diferentes concentraciones de hierro iniciales presentes en el medio de cultivo.

Tabla 1.1. **Contenido de hierro total en *A. brasilense* Sp245 y Faj164.** Al final de la fase de crecimiento exponencial en medio Nfb con agitación, bajo diferentes disponibilidades de FeCl₃ al inicio del cultivo, se determinó hierro total. Valores obtenidos de un ensayo con 3 réplicas biológicas por condición.

	FeCl ₃ en medio Nfb (µM)		
	37	3	0
<i>iFe</i> Sp245	0.796 ± 0.0556	0.575 ± 0,0429	0.286 ± 0.0245
<i>iFe</i> Faj164	0.869 ± 0.0404	0.628 ± 0.0383	0.332 ± 0.0721

iFe: hierro intracelular (ng Fe.µg proteína⁻¹)

Otro de los mecanismos de adquisición de hierro presentes en algunos microorganismos es la reducción de este metal por Fe^{3+} -reductasas de membrana, periplásmicas y/o extracelulares. Luego del paso de reducción, el ion Fe^{2+} es internalizado. En primera instancia se buscó establecer si existía en el genoma de *A. brasilense* Sp245 algún marco de lectura abierto (ORF) con cierta homología a proteínas que cumplen esta función. El genoma de *Azospirillum* fue puesto en dominio público en el año 2011 (Wisniewski-Dyé *et al.* 2011). Sin embargo el grupo de trabajo en donde se realizó esta tesis pudo tener acceso al borrador de este genoma en el año 2009. Utilizando este borrador se pudo encontrar un ORF que codificaría para una Fe^{3+} -reductasa, que posee dominios transmembrana y un posible péptido señal en su secuencia. Además, esta proteína posee dominios conservados putativos de la superfamilia de hierro reductasas (NCBI cl01043) y un dominio de la superfamilia tipo FNR (Ferredoxina reductasa, NCBI cl06868), involucrado en la transferencia de electrones en numerosas reacciones redox de las células (Figura 4.1). Esta información obtenida desde el borrador fue corroborada en la nueva información curada publicada en 2011. Esta Fe^{3+} -reductasa putativa se denominó en esta tesis AzFrp (NCBI CCC98243).

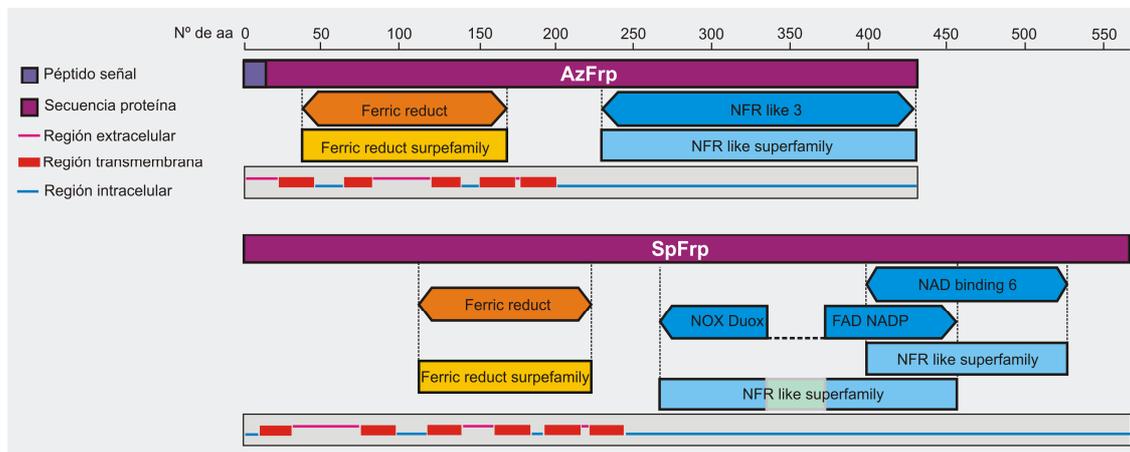


Fig. 4.1. **Características de la secuencia proteica AzFrp.** La secuencia de aminoácidos (aa) de una Fe^{3+} -reductasa putativa de *A. brasilense* AzFrp (Nº de acceso NCBI CCC98243) y SpFrp de *Schizosaccharomyces pombe* (Nº acceso NCBI AAA68045.1) fueron usadas para realizar un BLASTP utilizando la base de datos nr (non redundant protein sequences). Automáticamente, este programa también incluye en los resultados los dominios conservados putativos, los cuales se muestran debajo de la secuencia de proteína. Además, se analizó la presencia de secuencias péptido señal (AzFrp) y regiones transmembrana, como se indica en materiales y métodos.

Es interesante notar que AzFrp muestra una alta homología de dominios con una proteína de *Schizosaccharomyces pombe* que ha sido caracterizada experimentalmente como una Fe³⁺-reductasa de membrana (Roman *et al.* 1993, Figura 4.1). Ambas poseen una misma organización de dominios: el N-terminal que contiene el dominio Fe³⁺-reductasa y las regiones transmembrana y el C-terminal que posee el dominio de la superfamilia NFR con función de transferencia de electrones.

De hecho, en un modelado de estas dos proteínas se puede observar la similitud estructural de las mismas a nivel del dominio C-terminal, no sólo entre sí, sino con la proteína HMP de *E. coli*, la cual está cristalizada (Ilari *et al.* 2002) y fue utilizada en ambos casos por el programa Phyre como templado para el modelado (Figura 5.1).

Se puede notar que AzFrp así como SpFrp poseen el denominado plegamiento de Rossmann (Rossmann 1973, Figura 5.1, panel superior, color rosa). Esta estructura se encuentra en proteínas que poseen interacción con nucleótidos, como los cofactores FAD, NAD o NADP (Hanukoglu 2015). Además, ambas proteínas poseen el dominio de unión a flavina. Esta gran similitud en el C-terminal de las proteínas no fue observada para el caso del N-terminal, en donde ni para AzFrp ni para SpFrp el programa Phyre pudo modelar estructura alguna. Fue necesario entonces hacer un modelado *de novo* de estas regiones para ambas proteínas mediante el programa I-TASSER, el cual tiene el poder de resolver estructuras basándose solo en la secuencia aminoacídica sin necesidad de un templado. Este programa mostró que estas secuencias poseían estructuras secundarias α -hélices las cuales coinciden con las regiones transmembrana predichas para ambas proteínas (Figuras 4.1 y 5.1). Esta región de AzFrp se muestra similar a SpFrp dada su posible ubicación en la membrana. Ambos modelados se muestran muy diferentes a la región N-terminal de HMP, la cual es una proteína citoplasmática. Estas coincidencias permiten inferir que AzFrp podría efectivamente actuar como una Fe³⁺-reductasa de membrana en *A. brasilense* Sp245.

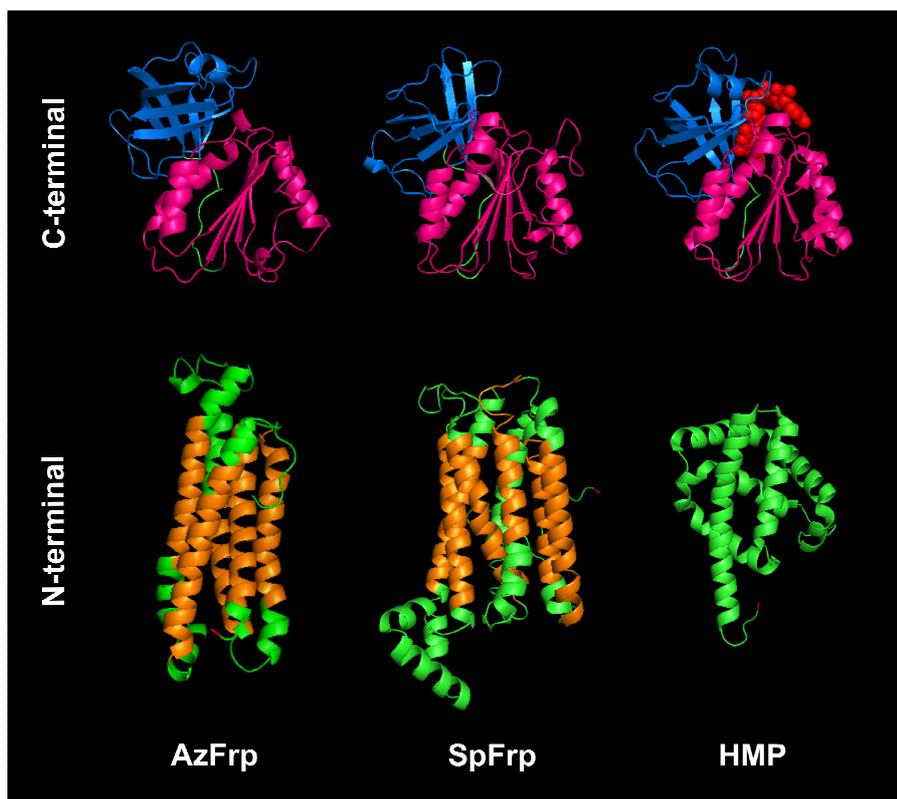


Fig. 5.1. **Estructura terciaria modelada de AzFrp y comparación con otras proteínas relacionadas.** Utilizando la secuencia de AzFrp y de SpFrp se modelaron ambas proteínas mediante el programa Phyre. Este programa permitió el modelado, basado en la proteína de *E. coli* HMP como templado, de la región C-terminal comprendida desde el aa 220 hasta el final de la proteína para AzFrp y desde el aa 214 hasta el final de la proteína para SpFrp (panel superior). Por otro lado, fue necesario realizar un modelado *de novo* utilizando el programa I-TASSER de la región N-terminal de ambas proteínas (panel inferior). La proteína HMP, utilizada como templado por el programa Phyre, se muestra en la figura dividida en dos regiones correspondientes al C-terminal y con homología a AzFrp y SpFrp (panel superior) y la región N-terminal sin ningún tipo de relación estructural con las otras dos (dominio globina, panel inferior). En color verde se indica la estructura general de las proteínas sin características particulares a destacar, en color rosa se indica el dominio de unión a NAD, en color azul el dominio de unión a flavina en donde para HMP se incluyó en color rojo la molécula de FAD y, en color naranja las regiones transmembrana predichas mostradas en la figura 4.1. La proteína HMP no mostró la presencia de regiones transmembrana en su sección N-terminal acorde a su ubicación citosólica.

Finalmente, teniendo en cuenta la posible existencia de una Fe^{3+} -reductasa de membrana, se determinó la presencia de esta actividad en células vivas de *Azospirillum*. Como se observa en la Figura 6.1, tanto en la cepa salvaje como en la mutante se pudo determinar la presencia de reducción de Fe^{3+} . Cuando la concentración de hierro en el medio de cultivo fue control ($37 \mu\text{M}$), la cepa Faj164 mostró el doble de reducción de Fe^{3+} que la cepa salvaje. Sin embargo cuando los

valores de hierro fueron deficientes (3 μM) o nulos (0 μM) la reducción de Fe^{3+} se redujo a los valores observados en la cepa salvaje. En el caso de Sp245, en todas las concentraciones de hierro presentes durante el crecimiento se observó la misma cantidad de Fe^{3+} reducido.

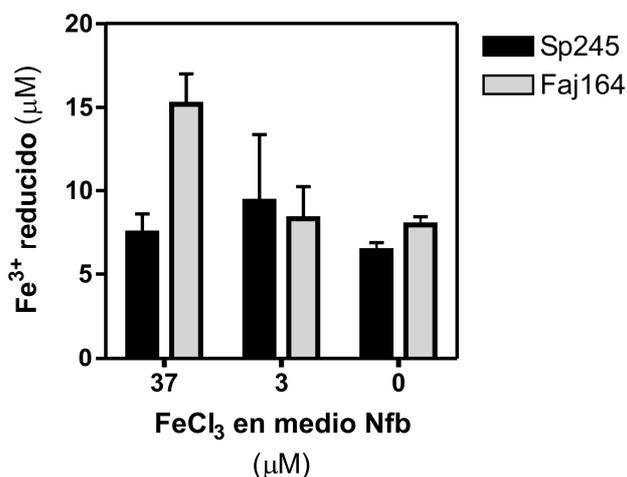


Fig. 6.1. Reducción *in vivo* de Fe^{3+} por *Azospirillum brasilense*. *A. brasilense* Sp245 o su mutante isogénica Faj164 fueron cultivadas en medio Nfb conteniendo las concentraciones de hierro indicadas. Cultivos en fin de fase exponencial fueron cosechados y se determinó la capacidad de reducción de Fe^{3+} en las células enteras (según materiales y métodos) al cabo de 30 minutos de reacción. Las barras corresponden a la media con su desvío de 2 ensayos independientes con 3 réplicas cada uno.

Teniendo en cuenta la menor producción de sideróforos observada en los ensayos con las placas de agar CAS ácido málico/nitrato (Figura 2.1), así como la actividad Fe^{3+} -reductasa aumentada en la cepa mutante respecto de la salvaje (Figura 6.1), se buscó analizar si la expresión de genes caracterizados en *Azospirillum* y vinculados al metabolismo del hierro, se encontraba alterada en la cepa mutante. Se estudió la expresión de tres genes: el regulador global de metabolismo del hierro (*Fur*), un transportador del complejo Fe-coprogen (*FhuE*) y de la Fe^{3+} -reductasa putativa (*AzFrp*). Como se puede observar (Figura 7.1 A y B), en el caso de la cepa salvaje la expresión del gen *FhuE* fue aumentando gradualmente conforme el hierro era depletado del medio, mientras que para el gen *AzFrp* tanto en 37 μM como en 9 μM de hierro se observó la misma expresión, aumentando gradualmente en 3 μM o ausencia de hierro. Para el caso de *Fur*, la tendencia parece la misma que *AzFrp*, aunque no de manera tan marcada. Sin embargo, la cepa mutante muestra un patrón diferente de expresión de los genes *Fur*, *FhuE* y *AzFrp* respecto de la cepa salvaje. A pesar de poseer una concentración de hierro normal (37 μM) en el medio de cultivo, para los tres genes estudiados la expresión fue comparable con la condición de ausencia de hierro de la cepa salvaje, oscilando levemente en torno a este valor.

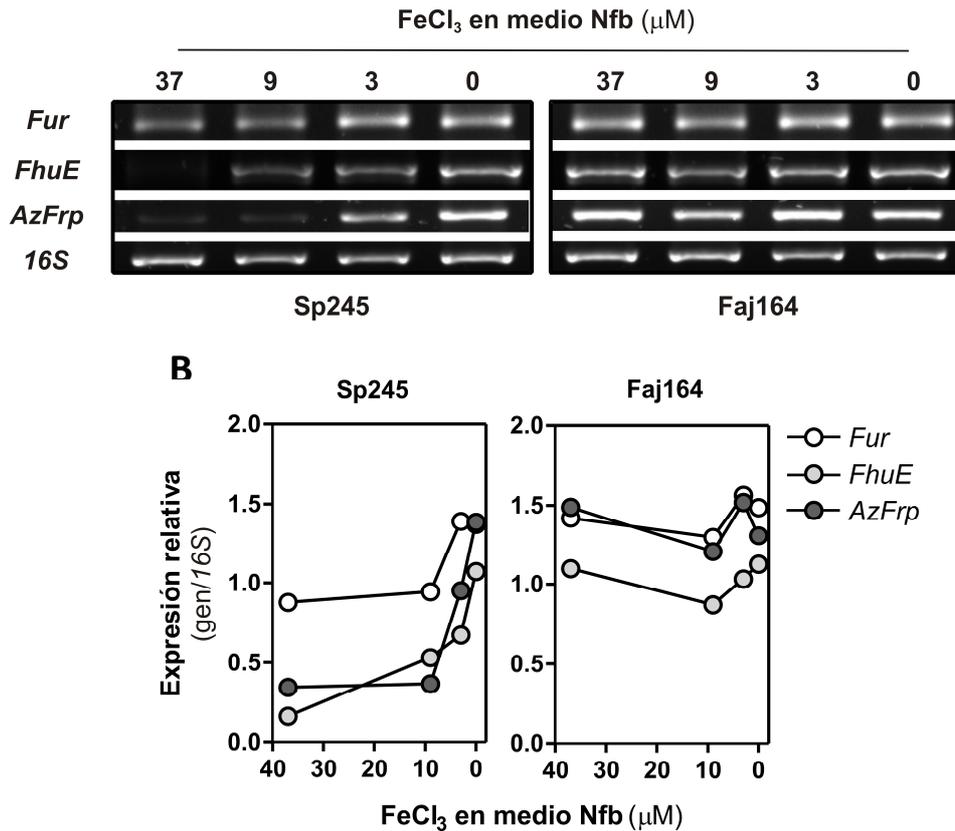


Fig. 7.1. **Expresión de genes involucrados en el metabolismo del hierro en *A. brasilense*.** Las cepas Sp245 y Faj164 fueron cultivadas en medio Nfb ácido málico/nitrato conteniendo diferentes concentraciones de FeCl₃ (37 μM, 9 μM, 3 μM, o sin hierro). Los cultivos crecieron por un periodo de 22-24 horas y se cosecharon las células por centrifugación. Se extrajo ARN total por el método del Trizol y se sintetizó el ADN copia. La carga de ARN para cada RT-PCR fue estandarizada por amplificación del gen de la subunidad pequeña ribosomal (16S). A) geles de agarosa 1 % ^P/_V donde se muestra los amplicones de las diferentes RT-PCR para cada gen. B) gráfico de la expresión de cada gen relativo al control 16S. *Fur*: factor de transcripción de regulación global del metabolismo del hierro, *FhuE*: transportador de sideróforos del tipo coprogen, *AzFrp*: putativa hierro reductasa de membrana.

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, el NO podría estar regulando a través de su acción sobre el factor de transcripción Fur la síntesis de sideróforos, en particular, así como la expresión de otros genes vinculados al metabolismo del hierro. Teniendo en cuenta que la mutación sobre la Nap en la cepa Faj164 no le permite la producción de nitrito, el cual posteriormente es reducido a NO, se decidió complementar de manera externa esta deficiencia, incorporando dadores químicos de NO así como nitrito. De esta manera se buscó restaurar la presencia de NO y evaluar su rol en la síntesis de sideróforos. Si bien en la cepa mutante no existe una Nap completa dado que el gen *NapA* del operon está interrumpido por el gen de resistencia a kanamicina, la nitrito reductasa podría ser funcional, como ocurre en

condiciones de crecimiento con amonio, permitiendo la síntesis de NO a partir de nitrito adicionado externamente (Arruebarrena Di Palma 2007). Además, en forma alternativa, se utilizó un secuestrante de NO para tratar cultivos de la cepa salvaje Sp245 a modo de simular la condición de baja presencia de NO.

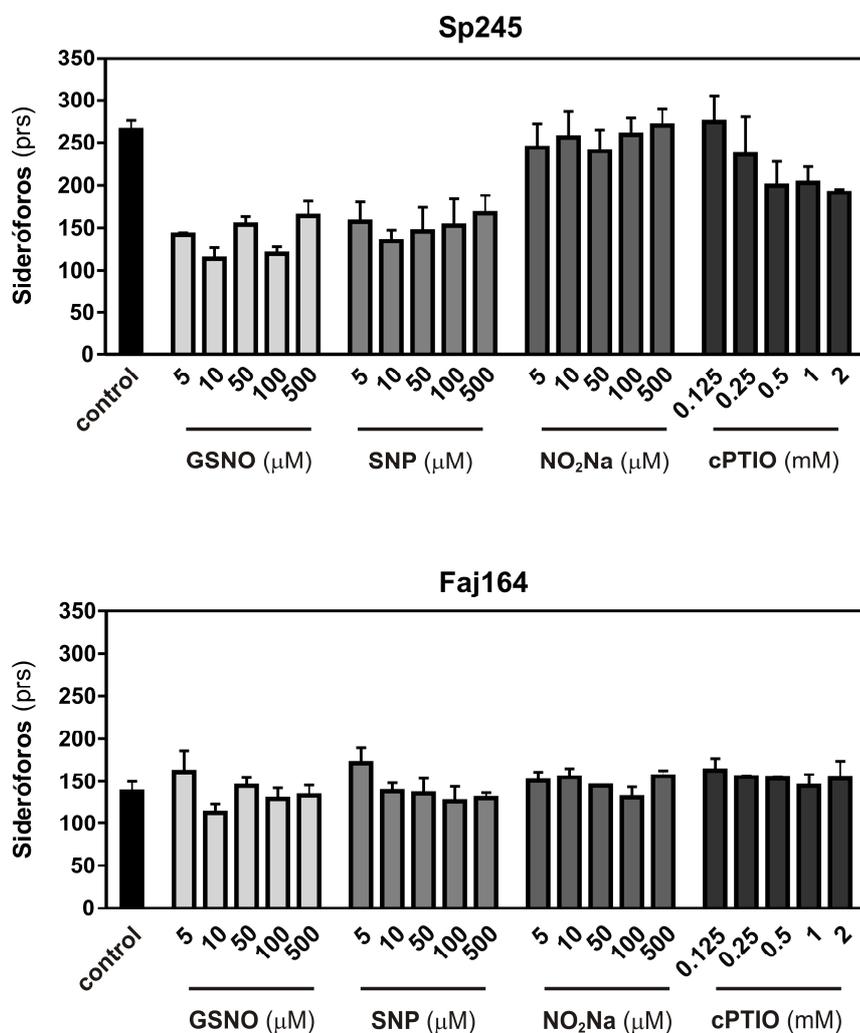


Fig. 8.1. Efecto de dadores de NO, nitrito y secuestrante de NO sobre la producción de sideróforos. Cultivos de Sp245 y Faj164 colocados en placas CAS fueron tratados diariamente por 3 días con los compuestos indicados en las concentraciones indicadas. La producción relativa de sideróforos (prs) fue calculada según Tortora *et al.* (2011). Las barras corresponden a la media con el desvío estándar de un ensayo representativo de 2 ensayos independientes con 3 réplicas cada uno.

En primer lugar, se pudo observar que el tratamiento con dadores de NO como GSNO y SNP en la cepa salvaje afectaron negativamente la producción de sideróforos (Figura 8.1) incluso hasta en las concentraciones más bajas. Sin embargo, el tratamiento con el producto de la actividad Nap, es decir nitrito, no modificó la producción de sideróforos en ninguna de las concentraciones utilizadas. Por otro lado,

el secuestrante de NO cPTIO redujo la producción de sideróforos, aunque a diferencia de los dadores de NO, gradualmente conforme las concentraciones usadas aumentaban. En segundo lugar, cuando los tratamientos mencionados anteriormente se efectuaron sobre la cepa mutante Faj164, ninguno de ellos afectó la síntesis de sideróforos (Figura 8.1) respecto del control sin tratamiento.

Cabe mencionar que las concentraciones ensayadas de dadores de NO, nitrito y cPTIO fueron testeadas en su efecto sobre el crecimiento de ambas cepas, observándose que en ninguna de las concentraciones utilizadas el crecimiento fue modificado respecto del control (datos no mostrados).

Una de las respuestas observadas en otros sistemas biológicos (plantas y animales) en donde se ha estudiado qué mecanismos operan frente a la deficiencia de hierro, es el aumento de la concentración de NO (Graziano y Lamattina 2005, Richardson y Lok 2008). Para analizar si *A. brasilense* presentaba este mismo comportamiento se establecieron cultivos de la cepa salvaje Sp245 con diferentes concentraciones de hierro y se determinó la presencia de nitrito en el medio de cultivo como estimador de la producción de NO y función de la Nap. La Figura 9.1 muestra que a pesar de la reducción de la concentración de hierro a casi un cuarto en el medio de cultivo (hasta 10 μM), la concentración de nitrito determinada en los sobrenadantes no se modificó de manera apreciable. Concentraciones menores de hierro en el medio de cultivo Nfb (3 μM ó 0 μM) disminuyeron la presencia de nitrito considerablemente incluso hasta anularla completamente.

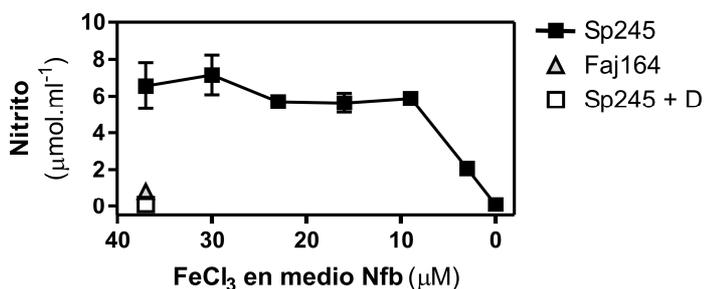


Fig. 9.1. **Concentración de nitrito en función de la disponibilidad de hierro.** *A. brasilense* Sp245 fue cultivada en medio Nfb conteniendo diferentes concentraciones de FeCl_3 y se determinó nitrito en los sobrenadantes. Además, se determinó nitrito en Sp245 conteniendo hierro en suficiencia (37 μM) y tratado con el quelante de hierro 2,2'-dipyridyl (Sp245 + D, cuadrado vacío) y de la cepa Faj164 en condición de suficiencia (37 μM , triángulo gris). Los valores corresponden a la media y desvíos de un ensayo representativo con 3 réplicas para cada tratamiento de 2 ensayos independientes.

La importancia del hierro para la función Nap en Sp245, queda establecida cuando cultivos crecidos en concentraciones control de hierro (37 μM) pero tratados con el quelante de hierro 2,2'-dipyridyl, redujeron considerablemente la concentración de nitrito en el medio.

El hecho de que la concentración de nitrito es cada vez menor en el medio de cultivo conforme se reduce la concentración de hierro, indicando que la actividad Nap es menor, llevó al interrogante de si en ausencia de hierro, ambas cepas podrían comportarse de manera similar dado que en la cepa salvaje la Nap estaría inactiva mientras que en la mutante no sería funcional dada su mutación. Para evaluar esto, se analizaron las cinéticas de crecimiento de ambas cepas en condiciones de suficiencia (37 μM), deficiencia (3 μM) o ausencia de hierro.

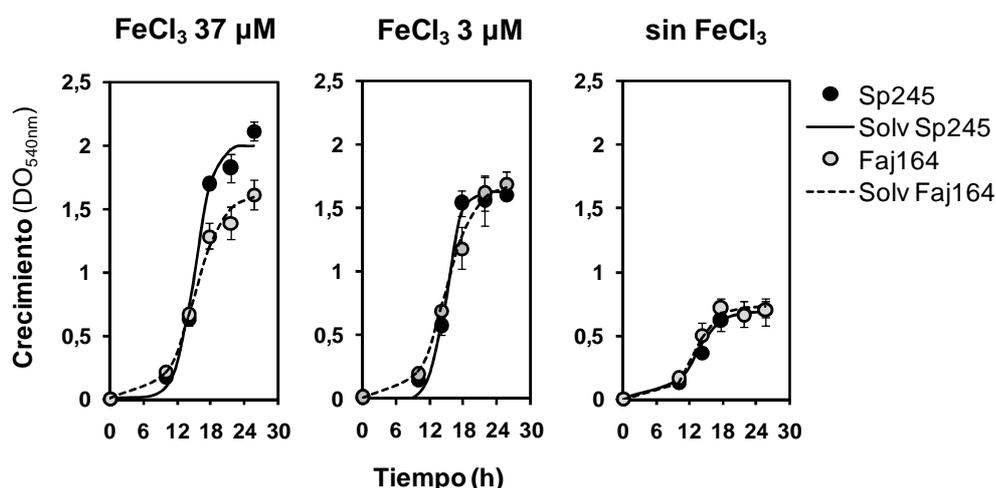


Fig. 10.1. **Cinéticas de crecimiento de *A. brasilense* bajo diferentes disponibilidades de hierro.** *A. brasilense* Sp245 y su mutante isogénica Faj164 fueron cultivadas en medio Nfb conteniendo nitrato y ácido málico como fuentes de nitrógeno y carbono respectivamente, y las concentraciones de FeCl_3 indicadas. Muestras para determinar $\text{DO}_{540\text{nm}}$ fueron tomadas cada 2 ó 3 horas hasta que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria. La figura muestra las $\text{DO}_{540\text{nm}}$ obtenidas experimentalmente (círculos) y un modelo ajustado a los datos mediante el componente E-solver (Excel) (línea continua y discontinua). Los datos representan la media con sus desvíos de 2 experimentos independientes con 3 réplicas cada uno.

Como se puede observar, cuando la concentración de hierro utilizada fue 37 μM , en donde la formación de nitrito es máxima (Figura 9.1), ambas cepas muestran un crecimiento similar hasta aproximadamente las 14 horas de iniciados los cultivos (Figura 10.1). Luego, en el estadio de fase estacionaria, la cepa salvaje alcanza una $\text{DO}_{540\text{nm}}$ mayor que la cepa mutante. Sin embargo, cuando las concentraciones de

hierro son deficientes (3 μM o 0 μM), donde la Nap está menos activa (Figura 9.1) ambas cepas muestran cinéticas de crecimiento solapadas.

La reducción del crecimiento final alcanzado por ambas cepas conforme se reduce el hierro en el medio de cultivo es un comportamiento conocido dado el rol central de este metal en la fisiología bacteriana (Andrews *et al.* 2003).

Además del posible rol de NO en la regulación del metabolismo del hierro en *Azospirillum*, se planteó anteriormente que la función de disipación del poder reductor a través de la Nap podría también participar de este mecanismo de regulación. En el caso de *Azospirillum*, se ha postulado que cuando la célula posee muchos equivalentes de reducción (como NAD(P)H) y necesita disipar este poder reductor en exceso, la bacteria sintetiza un compuesto polimérico denominado polihidroxibutirato (PHB, Zimmer *et al.* 1984). Para conocer el estado redox de la célula se utilizó esta respuesta fisiológica y se determinó por lo tanto el contenido de PHB, estimado a través del ácido crotónico, tanto para la cepa salvaje utilizando fructosa o ácido málico como fuente de carbono (Figura 11.1 A) como en condiciones control y de deficiencia de hierro tanto para Sp25 como para Fa164 (Figura 11.1 B).

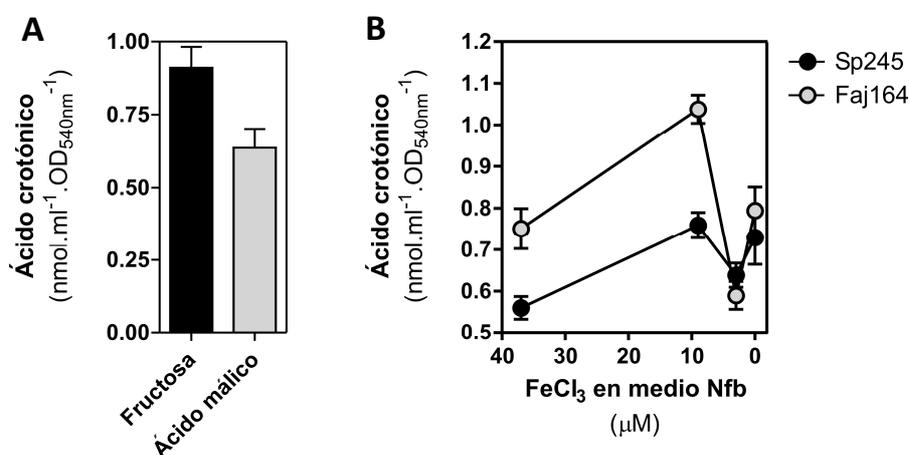


Fig. 11.1. **Contenido de PHB en *A. brasilense* y su relación con la disponibilidad de hierro.** A) *A. brasilense* Sp245 fue cultivada en medio Nfb-nitrato conteniendo fructosa o ácido málico en suficiencia de hierro. B) *A. brasilense* Sp245 y Faj164 fueron crecidas en medio Nfb conteniendo ácido málico/nitrato y las concentraciones de hierro 37 μM , 9 μM , 3 μM o sin Fe. Para A y B, en fase estacionaria se cuantificó el ácido crotónico formado por el tratamiento con ácido sulfúrico concentrado del polihidroxibutirato (PHB) extraído de las células. Los valores corresponden a la media y desvíos de un ensayo con 3 réplicas para A y de 2 ensayos independientes con 3 réplicas cada uno para B.

En condiciones control de hierro, se pudo observar que la cepa salvaje genera mayor cantidad de PHB cuando la fuente de carbono es fructosa en lugar de ácido málico (Figura 11.1 A) utilizando nitrato como fuente de nitrógeno. Por otro lado, cuando se analizó el contenido de PHB en ambas cepas creciendo con ácido málico y nitrato (Figura 11.1 B), en condiciones control de disponibilidad de hierro, se pudo observar que la cepa mutante posee mayor contenido de este polímero respecto de la salvaje. Cuando la deficiencia de hierro fue intermedia ($9 \mu\text{M}$ en el medio de cultivo), el contenido de PHB aumentó en ambas cepas manteniéndose la diferencia observada en la condición control. Sin embargo, cuando la concentración de hierro en el medio fue muy baja ($3 \mu\text{M}$) o nula (sin agregado) la concentración de PHB estimada fue similar para ambas cepas.

Teniendo en cuenta que el contenido de PHB se ve afectado en la mutante respecto de la cepa salvaje y que este resultado se correlaciona con la síntesis de sideróforos alterada en esta cepa, se buscó modificar alguno de los principales pares redox celulares (NADPH/NADP y GSH/GSSG) y evidenciar qué efecto sobre la producción de sideróforos podrían tener (Figura 12.1). Los datos obtenidos de estos tratamientos fueron ajustados a una curva polinomial de segundo orden en donde los tres tratamientos para Sp245 mostraron un buen ajuste (Sp245-GSH: 0.62; Sp245-GSSG: 0.96; Sp245-NADPH: 0.96), mientras que solo para el tratamiento con NADPH en la cepa mutante Faj164 el ajuste fue bueno (Faj164-NADPH: 0.87). Se pudo observar una respuesta antagónica frente a los tratamientos entre la cepa salvaje Sp245 y la mutante F164. Para el caso particular del par redox GSH/GSSG, en la cepa Sp245 se observa un aumento conforme aumenta la concentración de GSH mientras que cuando el compuesto agregado es su par redox GSSG, la respuesta es inversa. Esto mismo ocurre para la cepa mutante Faj164, aunque la respuesta frente a GSH o GSSG es inversa a la observada para la cepa salvaje. Por otro lado, el tratamiento con NADPH, mostró un descenso en la síntesis de sideróforos para la cepa Sp245 mientras que el comportamiento inverso se observó en la mutante Faj164.

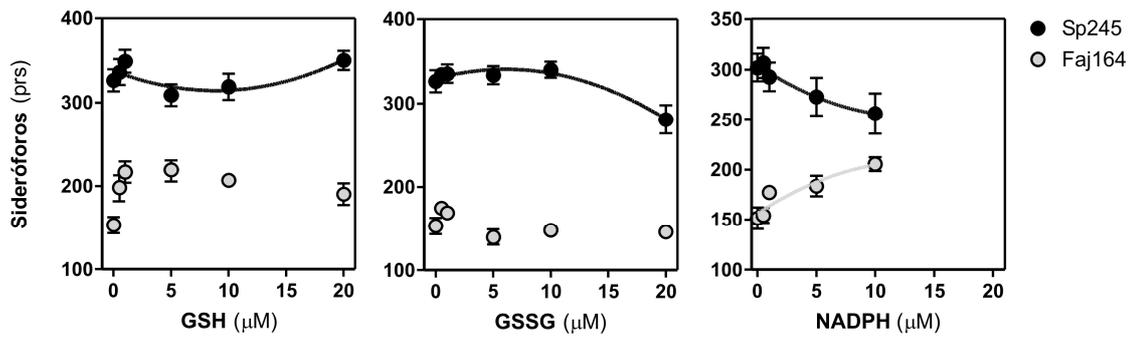


Fig. 12.1. **Efecto del GSH, GSSG o NADPH sobre la producción de sideróforos.** Cepas de *A. brasilense* Sp245 o Faj164 fueron colocadas en placas de medio CAS conteniendo ácido málico/nitrato. Diariamente se colocaron 5 μ l de las concentraciones indicadas de glutatión reducido (GSH) u oxidado (GSSG) o de la forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Todas las soluciones fueron preparadas al momento de ser usadas. Las placas se incubaron a 30°C en cámara húmeda por un periodo de 3 días. Luego se determinó la producción relativa de sideróforos según Tortora *et al.* (2011). Los valores mostrados corresponden a la media con sus desvíos un ensayo con 4 réplicas para cada uno de ellos. PRS: producción relativa de sideróforos. Se muestran las curvas de la ecuación polinomial de segundo orden que se ajusto los datos utilizando el programa GraphPad Prism. Los valores R^2 para cada pool de datos son Sp245-GSH: 0.62; Sp245-GSSG: 0.96; Sp245-NADPH: 0.96 y Faj164-NADPH: 0.87. Para el caso de Faj164-GSH y Faj164-GSSG el ajuste R^2 a la curva fue menor a 0.5 y no se muestra.



DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

Siendo el hierro un componente fundamental de muchas proteínas y enzimas vinculadas a importantes procesos muy diversos, no resulta sorprendente que el metabolismo de este metal esté finamente regulado y que los organismos desplieguen toda una batería de estrategias para la adquisición del mismo. El principal mecanismo específico y de alta afinidad por el hierro en bacterias es la síntesis de sideróforos, aunque también existe la reducción enzimática del ion férrico a ferroso para ser luego internalizado. Cuando el hierro es suficiente en el medio circundante y la célula puede tomarlo sin inconvenientes a través de mecanismos de baja afinidad, los sistemas antes mencionados se encuentran apagados mientras que cuando el hierro escasea, se encienden. La coordinación de estos procesos en bacterias Gram-negativas está a cargo del regulador transcripcional Fur, quien sensa la concentración de ion ferroso en la célula y desencadena la respuesta frente a una deficiencia, entre otras importantes funciones (Escolar *et al.* 1999).

En el contexto de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, los mecanismos de adquisición de hierro no sólo son importantes para la propia bacteria sino también para la planta con la cual interactúa, ya que mucho del hierro que es quelado o reducido por la actividad bacteriana puede ser tomado por la raíz. Esta adquisición de hierro puede darse por dos mecanismos propuestos: i) reducción del complejo Fe^{3+} -sideróforo generando Fe^{2+} el cual se acumula en el apoplasto de la raíz y/o ii) el hierro quelado por el sideróforo puede intercambiarse con los fitosideróforos producidos por la planta y así ser transportado al interior de la célula (Ahmed y Holmström 2014). La evidencia del uso de los complejos ferri-sideróforo obtenidos de sobrenadantes de cultivos bacterianos por las plantas para su nutrición es numerosa (Jin *et al.* 2014 y referencias incluidas). Teniendo en cuenta esto último, se puede inferir que los sideróforos producidos por bacterias promotoras del crecimiento en íntima relación con la raíces podrían entonces permitir una mejor nutrición de la planta. Por otro lado, el rol de la reducción de Fe^{3+} por bacterias en la rizósfera está menos estudiado. Algunos de los trabajos que han abordado este tópico estudian especies de plantas que se desarrollan en condiciones donde la rizósfera está bajo un régimen de deficiencia de oxígeno y la reducción del hierro por las bacterias que habitan esos ambientes responde a utilizar este ion como aceptor final de electrones

por el microorganismo (King y Garey 1999, Weiss *et al.* 2003) más que por la adquisición del metal. Si este mecanismo de reducción hace más disponible al hierro para la planta aún no ha sido dilucidado.

En *Azospirillum brasilense* se ha estudiado con cierto detalle la producción de sideróforos así como algunos aspectos de la regulación del metabolismo del hierro, aunque la información acerca de este último punto es algo más limitada. Por otro lado hasta el momento nada se había estudiado acerca de la presencia y funcionalidad de Fe³⁺-reductasas.

Metabolismo del hierro en *A. brasilense* Sp245 salvaje

Como primera aproximación en esta tesis al estudio del metabolismo del hierro se determinó la capacidad de producción de sideróforos utilizando dos de las fuentes de carbono y nitrógeno más comúnmente usadas en la formulación de los medio de cultivo de esta bacteria (ácido málico o fructosa y amonio o nitrato respectivamente). Cada combinación fuente de carbono/fuente de nitrógeno utilizada, mostró diferente capacidad de producción de sideróforos por *Azospirillum* indicando que ambos factores operan sobre la síntesis de estas moléculas. Reportes en otros microorganismos que demuestren la modificación de la síntesis de sideróforos dependiendo de las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas son escasos. Duffy y Defago (1999) mostraron que *Pseudomonas fluorescens* aumenta la síntesis de ácido salicílico y piochelina (precursor de sideróforo y sideróforo *per se* respectivamente) cuando es crecida con glucosa en lugar de glicerol. Contrariamente, Heggag *et al.* (2013) reportaron que *P. putida* produce más sideróforos cuando es cultivada en glicerol que cuando utiliza otras fuentes de carbono en cultivos de producción masiva. Por otro lado, una cepa de *Rhizobium* sp. aislada de nódulos de *Sesbania protucumbers* muestra la producción de sideróforos más alta utilizando manitol en lugar de glucosa o sacarosa (Sridevi *et al.* 2008). Con relación a los efectos de la fuente de nitrógeno, la mayoría de los estudios realizados suplementaron los medios de cultivo con aminoácidos, incorporando de este manera no solo nitrógeno sino también esqueletos carbonados, llevando probablemente a un efecto mixto sobre la síntesis de

sideróforos. De todos modos, Albesa *et al.* (1985) utilizaron 13 aminoácidos y dos formas inorgánicas de nitrógeno para evaluar la producción de sideróforos de *P. fluorescens* cultivados en quimiostato. Estos autores encontraron que la mayoría de los aminoácidos aumentaba la síntesis de sideróforos por sobre el control (amonio) mientras que el nitrato generaba solo un sutil aumento.

Además de la síntesis de sideróforos como mecanismo de adquisición de hierro, algunos microorganismos pueden reducir enzimáticamente el Fe^{3+} a Fe^{2+} e internalizarlo (Schröder *et al.* 2003). Hasta el momento, no se había indagado sobre este mecanismo en *Azospirillum*. En esta tesis se muestra que *A. brasilense* Sp245 presenta actividad Fe^{3+} -reductasa y que ésta no se ve modificada por la concentración de hierro en el medio de cultivo. Sin embargo, la expresión de una putativa Fe^{3+} -reductasa de membrana, denominada en esta tesis *AzFrp*, muestra dependencia de la disponibilidad de hierro en el medio. Evidencias *in silico*, así como la respuesta en su expresión ante la deficiencia de hierro, indican que *AzFrp* de *Azospirillum* es efectivamente una Fe^{3+} -reductasa probablemente funcional. Con los resultados presentados, sin embargo, no se puede concluir si la actividad *AzFrp* contribuye a la actividad Fe^{3+} -reductasa total cuantificada. A pesar de que hay escasa señal de ARN mensajero de *AzFrp* en la situación control en comparación con la situación de deficiencia completa de hierro, sería necesario determinar la presencia específica de esta proteína en estas condiciones y su actividad para poder concluir acertadamente. De todos modos, se considera que cuando existe disponibilidad de hierro en el medio circundante, los microorganismos mantienen activos mecanismos de captación de hierro, como los transportadores de membrana por ejemplo, con K_m altas para el hierro dado la abundancia de este metal (Schröder *et al.* 2003). Sin embargo, cuando el hierro escasea se produce un cambio hacia proteínas de alta afinidad por el Fe^{3+} , permitiendo así poder captar el poco metal del medio. El aumento en la expresión de *AzFrp* frente a una deficiencia de hierro, indicaría que este gen codificaría para una Fe^{3+} -reductasa de alta afinidad. Aunque nuevamente se requiere de evidencia experimental, no puede descartarse que *Azospirillum* posea alguna clase de actividad Fe^{3+} -reductasa de baja afinidad en condiciones de suficiencia, mientras que conforme descende la concentración de hierro, estos mecanismos menos eficientes (en

términos de Km por el hierro) se apagan y se enciende AzFrp. Particularmente, la bacteria podría cambiar un mecanismo por otro mientras que globalmente la adquisición de hierro a través de la reducción de Fe^{3+} no se ve afectada, como muestran los resultados obtenidos en la cepa salvaje Sp245.

Finalmente, el análisis de la expresión del gen *FhuE* conforme se redujo la concentración de hierro en el medio de cultivo, mostró un claro comportamiento de respuesta a deficiencia de hierro, aumentando su expresión cuando este metal escasea. Así mismo, se pudo observar que una reducción de la concentración de hierro en el medio de cultivo, lleva a que *Azospirillum* tenga menor contenido de hierro por célula.

Participación del NO en los mecanismos de regulación del metabolismo del hierro en *A. brasilense*.

Ambos mecanismos de adquisición de hierro mencionados anteriormente, así como la expresión de los genes vinculados al metabolismo del hierro, se ven afectados por la mutación *nap⁻* de *A. brasilense*. Se pudo observar una desregulación de estos mecanismos en condiciones control o de deficiencia baja (aproximadamente 10 μM de Fe^{3+} en el medio de cultivo), mientras que en ausencia total de hierro, no se observaron estas diferencias, teniendo ambas cepas de *A. brasilense* comportamientos similares.

Como se mencionó anteriormente, en algunas bacterias como *Bacillus subtilis*, el NO interactúa con el factor de transcripción Fur, regulando su interacción con los promotores que modula (D'Autreaux *et al.* 2002) aumentando la expresión de los mismos. Dado el tipo de interacción que ocurre entre Fur- Fe^{2+} y NO, en donde el NO se relaciona directamente con el átomo de hierro, podría esperarse que este tipo de regulación ocurra de manera similar en ambos microorganismos, dada la naturaleza físico-química de la interacción. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis respecto del rol del NO en la síntesis de sideróforos en *Azospirillum* indicaron la existencia de una regulación más compleja que la descrita para *B. subtilis*. Por un

lado, el tratamiento de los cultivos de la cepa salvaje con dadores de NO como GSNO o SNP redujeron la síntesis de sideróforos marcadamente, incluso en las concentraciones más bajas. Por otro lado, el nitrito agregado exógenamente no modificó la producción de sideróforos. En plantas, se conoce que el NO tiene un comportamiento similar al de una fitohormona, en donde su efecto fisiológico se encuentra en un rango de concentración específico; a muy bajas concentraciones no tiene efecto y a altas resulta perjudicial (Mur *et al.* 2013). Se podría hipotetizar que la cepa salvaje estaría produciendo NO en concentraciones fisiológicamente “normales” y los dadores de NO agregados exógenamente podrían alterar este nivel controlado de síntesis de NO, afectando la interacción con Fur y llevando a una reducción de la producción de sideróforos. Se puede descartar un efecto tóxico de estas concentraciones de NO, ya que en ninguno de los casos se observó que las colonias presentaran menor crecimiento. Sin embargo, sí parece estar más claro el rol de la producción endógena de NO en la síntesis de sideróforos, ya que tratamientos con el secuestrante específico de NO cPTIO redujeron la producción de los sideróforos. Estos resultados indican que se requeriría de una concentración muy precisa de NO para la correcta producción de sideróforos, en donde mayores o menores concentraciones afectan negativamente la síntesis. Por otro lado, el tratamiento con nitrito de los cultivos de la cepa salvaje de *Azospirillum* no afectó la síntesis de los sideróforos, pudiendo estar nuevamente relacionado a una regulación precisa de la actividad Nir, de modo de no aumentar en exceso la concentración de NO, pudiendo este nitrito ser metabolizado por la nitrito reductasa asimilatoria para asimilación de N y para no resultar tóxico.

Por otro lado, los intentos de restaurar la producción de sideróforos en la cepa Faj164 mediante tratamientos con nitrito o dadores de NO, fueron infructuosos. En todos los casos la producción de sideróforos no se modificó respecto del valor control para ninguna de las concentraciones utilizadas. Incluso el tratamiento con el secuestrante cPTIO tampoco modificó la síntesis. Respecto de la ausencia de respuesta a los tratamientos con nitrito, una Nap inactiva podría afectar la actividad de las otras enzimas de la vía de desnitrificación, como la Nir, afectando negativamente la síntesis de NO. Varios trabajos muestran que la presencia de NO en la bacterias *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3 (Kwiatkowski y Shapleigh 1996, Tosques *et al.* 1996) y *Paracoccus*

denitrificans (van Spanning *et al.* 1999, Hutchings y Spiro 2000) modula la expresión de la nitrito reductasa así como de la oxido nítrico reductasa. Por otro lado, se conoce que en algunos casos los dadores de NO difieren en su efecto del producido por el NO endógeno, no solo por la química del NO liberado (NO^+ , $\text{NO}\cdot$ o NO^-) si no por la cinética de liberación (Feelisch 1998). Una hipótesis que puede plantearse es que los dadores de NO utilizados en este ensayo no estén liberando la forma de NO necesaria para la regulación de la síntesis de sideróforos, impidiendo que la cepa Faj164 restaure parcial o totalmente el fenotipo salvaje. Teniendo en cuenta esta característica de los dadores de NO, una reinterpretación del descenso en la producción de sideróforos en la cepa salvaje frente a los tratamientos con SNP y GSNO pero también secuestrando el NO endógeno con cPTIO, podría ser precisamente que las formas liberadas por estos dadores actuaran en otro tipo de ruta y/o señalización. Por otro lado, un dato interesante del análisis general de los efectos del cPTIO en la cepa salvaje y de la mutación *nap⁻* en la cepa Faj164 es que la reducción en la síntesis de sideróforos siempre alcanzó un valor fijo y constante (aproximadamente 150 de prs). Este resultado podría indicar que existiría una producción basal de sideróforos independiente de la presencia de una Nap, potenciada por la actividad de la enzima.

Por otro lado, el NO endógeno aunque parece estar regulando la síntesis de los sideróforos, no participaría de la respuesta a deficiencia de hierro. Nuevamente, analizando lo que ocurre en otros sistemas biológicos, tanto en mamíferos como en plantas, frente a baja disponibilidad de hierro el NO participa como parte de la respuesta a la deficiencia (Pantoupoulos *et al.* 1996, Graziano *et al.* 2002, Graziano y Lamattina 2007). Como se pudo observar, la concentración de nitrito en el medio de cultivo fue disminuyendo, e incluso llegó a cero, conforme aumentaba el grado de deficiencia de hierro. Teniendo en cuenta que el nitrito en las condiciones de cultivo utilizadas es el único sustrato para la síntesis de NO, se presume que la capacidad de producción de NO se reduce a medida que la deficiencia de hierro se hace más marcada. Como se mencionó en la Introducción General, tanto NapA, NapB como NapC poseen hierro formando parte de su cofactor y se sabe que la falta de este metal afecta directa o indirectamente la síntesis de esta enzima (Zumft 1997).

Pese a la reducción de la síntesis de sideróforos y alteración de la actividad Fe^{3+} -reductasa observada entre cepas Sp245 y Faj164, la concentración de hierro intracelular fue similar en ambas para cultivos con diferentes disponibilidades de hierro. Un efecto análogo se observa en plantas cuando son sometidas a deficiencia de hierro y tratadas con NO. Tanto en maíz (Graziano *et al.* 2002) como en tomate (Graziano y Lamattina 2007) tratamientos con NO generan claros síntomas de mejoría frente a la deficiencia de este metal, pero sin cambiar las concentraciones absolutas en la planta. Incluso para tomate, la actividad Fe^{3+} -reductasa de raíz está aumentada. Estos autores propusieron que el efecto del NO consiste en modificar la disponibilidad del propio hierro almacenado en la planta, contrarrestando de esta manera la deficiencia. Los microorganismos pueden contener grandes cantidades de hierro dentro de la célula, pero no todo este hierro es utilizado. Mientras una fracción participa como cofactor de enzimas y proteínas, otro tanto está almacenado en las denominadas bacterioferritinas o las proteínas denominadas Dps (iron detoxification protein) (Andrews *et al.* 2003). Cuando se produce una deficiencia de este metal, además de adquirirlo desde el exterior, se produce una movilización de hierro intracelular no disponible hacia el metabolismo general, pasando a estar disponible (Andrews *et al.* 2003). Para el caso de *Azospirillum*, dado que la determinación de hierro realizada en esta tesis permite conocer la cantidad total y no la biodisponible resulta difícil establecer si la mutación en la Nap, generando menor cantidad de NO, afecta la disponibilidad intracelular de este metal. Por otro lado, resulta interesante notar que la cepa mutante posee una menor producción de sideróforos pero una mayor actividad Fe^{3+} -reductasa. En este caso, podría sugerirse un mecanismo de compensación frente a la deficiente síntesis de sideróforos mediante un aumento de la actividad Fe^{3+} -reductasa que llevaría a mantener los niveles de hierro intracelulares.

Los paralelismos entre los efectos de la ausencia de la Nap en *Azospirillum* que lleva a un menor contenido de NO con otros sistemas biológicos como las plantas, en donde se ha observado que el NO participa de la regulación del metabolismo del hierro, llevó a pensar que efectivamente el NO podría tener un rol también clave en *A. brasilense*. Con la evidencia obtenida en esta tesis se han dado los primeros pasos para

entender la conexión que existe entre el NO y el metabolismo del hierro en *Azospirillum*.

El rol de la Nap en la disipación del exceso de poder reductor y sus efectos sobre el metabolismo del hierro en Azospirillum

Finalmente otro aspecto relacionado a la Nap y que participaría de la regulación del metabolismo del hierro es la función de esta enzima como disipadora de poder reductor. Como primera aproximación pudimos observar que diferentes fuentes de carbono modifican la actividad Nap y la producción de sideróforos. La expresión y actividad de la Nap en diversos microorganismos muestra una regulación diversa, siendo afectada por factores como ausencia o presencia de nitrato, oxígeno, molibdeno y hierro, el tipo de fuente de carbono, o el potencial redox de la célula (Sparacino-Watkins *et al.* 2014). En particular, se ha reportado que *P. denitrificans* modifica la expresión y actividad de la Nap en función de la fuente de carbono y de la saturación de oxígeno durante su cultivo (Sears *et al.* 1997, Sears *et al.* 2000). Se propuso en estos trabajos que el metabolismo oxidativo de fuentes de carbono reducidas, generarían mayor poder reductor, llevando a un desbalance redox dentro de la célula en donde sería necesario disipar poder reductor a través de la actividad Nap (Sears *et al.* 1997). Cuando se determinó la producción de nitrito en cultivos con una u otra fuente de carbono en Sp245, se pudo constatar que la producción de este ion era menor cuando la fuente de carbono es fructosa en lugar de ácido málico. Precisamente, en fructosa no se observan diferencias entre la cepa salvaje y mutante en la producción de sideróforos. Se podría plantear que, cuando *Azospirillum* utiliza fructosa, se genera un descenso de la actividad Nap, lo cual lleva a una menor producción de sideróforos. El valor alcanzado por esta condición de crecimiento es de alrededor de 150 de prs, valor cercano al que se obtiene cuando se trata a la cepa salvaje con cPTIO o al que produce la cepa Faj164. Por otro lado, como se indicó anteriormente, una modificación del balance redox de la célula lleva a la alteración de la síntesis de PHB en *Azospirillum*. En este caso, la utilización de fructosa mostró una mayor acumulación de PHB en contraposición con la utilización de ácido málico,

resultado previamente reportado por Sadasivan y Neyra (1895) y correlacionado con una menor producción de sideróforos.

La vía de señalización subyacente de la relación entre la actividad Nap y la forma de carbono utilizada por *A. brasilense* Sp245 es desconocida y se presume muy compleja. Ambas fuentes de carbono pueden ser metabolizadas por múltiples vías en *Azospirillum*, pudiendo muchas de ellas controlar también la actividad Nap. Como ejemplo de esto, podemos mencionar que la fructosa debe ingresar a la célula a través del sistema de transporte de carbohidratos denominado sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa dependiente de azúcar (PEP). Cuando la fructosa es transportada, es fosforilada a través de la transferencia de un fosfato desde el fosfoenolpiruvato generando fructosa-1-fosfato, la cual luego es fosforilada nuevamente a través de la actividad de la 1-fosfofructoquinasa generando fructosa-1,6-bifosfato (Goebel y Krieg 1984, Hartmann y Zimmer 1994) siendo este último producto acoplado a la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Este mecanismo de entrada de la fructosa está vinculado con el mecanismo de represión catabólica mediada por AMP cíclico (AMPC). Esta molécula actúa como señal interactuando con la proteína Crp en bacterias Gram negativas generando el encendido o apagado de diferentes operones vinculados al metabolismo de la fuente de carbono disponible (Deutscher *et al.* 2006). Al respecto, Stewart *et al.* (2009) demostraron que el operon *Nap* de *E. coli* es efectivamente regulado por represión catabólica, ya que su promotor posee un sitio de unión a Crp. Si este control por AMPC está operando en la regulación de la *Nap* de *A. brasilense* Sp245 es incierto. Por otro lado, el ácido málico puede ingresar directamente al ciclo de los ácidos tricarbónicos o mediante la enzima málica ser transformado en piruvato y NADPH (Hartmann y Zimmer 1994) siendo su catabolismo claramente diferente del de la fructosa.

Bajo nuestras condiciones de crecimiento control (37 μ M de FeCl₃), podemos observar que la cepa mutante presenta una acumulación mayor de PHB respecto de la cepa salvaje. Se conoce que cuando *Azospirillum* posee gran cantidad de equivalentes de reducción, ésta disipa el poder reductor en exceso mediante la síntesis de PHB (Zimmer *et al.* 1984). Teniendo en cuenta el rol de la Nap en otras bacterias, la ausencia de una Nap funcional en *Azospirillum* llevaría a un aumento en los

equivalentes de reducción que se dispararían con la síntesis aumentada de PHB. Estos mayores contenidos de PHB en la cepa mutante *nap⁻* coinciden con respuestas desreguladas del metabolismo del hierro, como la expresión de genes que sólo se encienden bajo deficiencia de hierro o una mayor actividad Fe^{3+} -reductasa. De este modo, cuando se analiza la concentración mínima de Fe ($9 \mu\text{M Fe}$) en donde aún la actividad Nap es cercana al 100% respecto de suficiencia, nuevamente se observa que el PHB es mayor en la cepa mutante y la expresión de genes permanece alterada. Esta concentración de hierro es el límite inferior en donde el crecimiento general no se ve marcadamente afectado para *Azospirillum* (Dra Eugenia Baca, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, comunicación personal). Esta concentración de hierro es interesante de ser analizada, dado que es cercana a la concentración de Fe a la cual están expuestas las células en el ensayo de placas CAS ($10 \mu\text{M Fe}$). Bajo estas condiciones particulares, en donde la Nap estaría aún funcional pero las células estarían expuestas y sensando la deficiencia de hierro, es que se observa la producción diferencial de sideróforos entre las cepas Sp245 y Faj164.

Finalmente el rol de disipación de poder reductor de la Nap termina de establecerse cuando se analizan los resultados a concentraciones de hierro mínimas ($3 \mu\text{M Fe}_3\text{Cl}$) o nulas (sin Fe). Como se pudo determinar en estas condiciones, la actividad de la Nap se reduce considerablemente y los contenidos de PHB de las cepas salvaje y mutante se igualan. Precisamente en estas condiciones, tanto la expresión de los genes vinculados al metabolismo del hierro como la actividad Fe^{3+} -reductasa son similares entre ambas cepas. Incluso, el crecimiento de ambas cepas es igual. Como aproximación a la hipótesis que un desbalance del potencial redox modifica el metabolismo normal del hierro, como la síntesis de sideróforos, se pudo observar que los cultivos tratados con equivalentes de reducción como el NADPH o con el par de oxido-reducción GSSG/GSH, los cuales modifican los pools de NADP/NADPH, alteraron la síntesis de sideróforos. Si bien no puede explicarse de manera precisa el mecanismo, sí resulta claro que desregular el pool redox de la célula exógenamente puede modificar la síntesis de sideróforos.

La relación precisa entre el mantenimiento del estado redox controlado y los mecanismos de la regulación de la adquisición de hierro (síntesis de sideróforos y

actividad Fe^{3+} -reductasa) queda aún por ser dilucidada en su totalidad. Sin embargo, se pueden discutir algunas posibles explicaciones. Como se indicó en la introducción, la síntesis de los sideróforos es un proceso principalmente llevado a cabo por síntesis no ribosomal. Este mecanismo es energéticamente costoso, y en términos de moneda metabólica, se requieren grandes cantidades de poder reductor como el NADPH (Crosa y Walsh 2002). El hecho de que la mutante derive tanto poder reductor hacia la síntesis de PHB podría estar afectando la vía de síntesis de sideróforos. Por otro lado, el regulador general transcripcional Fur no sólo participa coordinando el metabolismo del hierro sino también en la regulación del estado redox de la célula (Escolar *et al.* 1999). Ambos mecanismos, como se ha mencionado, requieren un control preciso dado que un desajuste puede llevar a la generación de productos de la reacción de Fenton con efectos tóxicos para la célula. Resulta interesante notar que el rol como disipadora de poder reductor de la Nap se da en concentraciones de hierro altas, donde la desregulación del metabolismo de este metal podría llevar a efectos perjudiciales para la célula. Sin embargo cuando las concentraciones de hierro son bajas y por lo tanto el peligro de la reacción de Fenton es menor, la actividad Nap descende. Además, en el caso de la cepa mutante se observa que en condiciones de gran cantidad de poder reductor en exceso, evidenciado por la presencia de PHB (contenido de $37 \mu\text{M}$ FeCl_3 en el medio de cultivo), la actividad Fe^{3+} -reductasa está aumentada. Este aumento no solo podría estar relacionado a la adquisición de hierro sino que, al actuar también como una reductasa, podría disipar poder reductor en exceso.

Finalmente, podemos mencionar que la evidencia presentada en esta tesis permite aproximarse al entendimiento de la regulación del metabolismo del hierro en *Azospirillum*, tanto en i) condiciones de suficiencia, donde la Nap es necesaria para mantener un estado redox controlado y evitar las reacciones perjudiciales del hierro, en ii) condiciones de deficiencia moderada, donde la síntesis de NO por la actividad Nap permite una mayor producción de sideróforos, como iii) en deficiencia de Fe donde la actividad Nap no parece ser necesaria para la regulación.

Referencias

- Ahmed E, Holmström SJM. 2014. Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology* 7:196-208.
- Alahari A, Tripathi AK, Le Rudulier D. 2006. Cloning and characterization of a fur homologue from *Azospirillum brasilense* Sp7. *Current Microbiology* 52:123-127
- Albesa I, Barberis LI, Pajaro MC, Eraso AJ. 1985. Pyoverdine production by *Pseudomonas fluorescens* in synthetic media with various sources of nitrogen. *Journal of general Microbiology* 131:3251-3254.
- Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quíñones F. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* 27:215-237.
- Archibald F. 1983. *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *FEMS Microbiology Letters* 19:29-32.
- Arruebarrena Di Palma. 2008. Producción de óxido nítrico por nitrificación heterotrófica en *Azospirillum*. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN), Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP).
- Bachhawat AK, Ghosh S. 1987a. Isolation and characterization of the outer membrane proteins of *Azospirillum brasilense*. *Journal of General Microbiology* 133:1751-1758.
- Bachhawat AK, Ghosh S. 1987b. Iron transport in *Azospirillum brasilense*: role of the siderophore spirilobactin. *Journal of General Microbiology* 133:1759-1765.
- Baldani VLD, Alvarez UAB, Baldani JI, Döbereiner J. 1986. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant Soil* 90:35-46.
- Berks BC, Ferguson SJ, Moir JWB, Richardson DJ. 1995. Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1232:97-173.
- Boukhalfa H, Crumbliss AL. 2002. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals* 15:325-339.
- Bradford MM. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Braun V, Hantke K. 2011. Recent insights into iron import by bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology* 15:328-334.
- Cabisco E, Tamarit J, Ros J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology* 3:3-8.
- Cowart RE. 2002. Reduction of iron by extracellular iron reductases: implications for microbial iron acquisition. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 400:273-281.
- Crosa JH, Walsh CT (2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66:223-249.
- Cui Y, Tu R, Guan Y, Ma L, Chen S. 2006. Cloning, sequencing, and characterization of the *Azospirillum brasilense* *fhuE* gene. *Current Microbiology* 52:169-177.
- D'Autréaux B, Touati D, Bersch B, Latour JM, Michaud-Soret I. 2002. Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:16619-16624.
- Deutscher J, Francke C, Postma PW. 2006. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70: 939-1031.
- Döbereiner J, Day L .1976. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganism and dinitrogen fixing sites in Proc 1st Int Symp N₂ Fixation (Newton WE & Nyman CJ, eds), pp. 518-538. Washington State University Press, Pullman, WA.
- Duffy BK, Defago G. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied Environmental Microbiology* 65:2429-2438.
- Escolar L, Perez-Martin J, de Lorenzo V. 1999. Opening de iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *Journal of Bacteriology* 181:6223-6229.
- Feilisch M. 1998. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 358:113-122.

- Gates AJ, Richardson DJ, Butt JN. 2008. Voltammetric characterization of the aerobic energy-dissipating nitrate reductase of *Paracoccus pantotrophus*: exploring the activity of a redox-balancing enzyme as a function of electrochemical potential. *Biochemical Journal* 409:159–168.
- Goebel EM, Krieg NR. 1984. Fructose catabolism in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Journal of bacteriology* 159:84-92.
- Graziano M y Lamatina L. 2005. Nitric oxide and iron in plants: an emerging and converging story. *Trends in Plant Science* 10:4-8.
- Graziano M, Beligni MV, Lamattina L. 2002. Nitric oxide improves internal iron availability in plants. *Plant Physiology* 130:1652-1859.
- Graziano M, Lamattina L. 2007. Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots. *The Plant Journal* 52:949-60.
- Haggag WM, Saleh MAE, Mostafa I, Adel N. 2013. Mass production, fermentation, formulation of *Pseudomonas putida* for controlling of die back and phomopsis diseases on grapevine. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 4:741-750.
- Hahn SK, Chang YK, Kim BS, Chang HN. 1994. Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology and Bioengineering* 44:256–261.
- Hanukoglu I .2015. Proteopedia: Rossmann fold: A beta-alpha-beta fold at dinucleotide binding sites". *Biochemistry and Molecular Biology Education* 43:206-209.
- Hart TW .1985. Some observations concerning the S-nitroso and S-phenylsulphonyl derivates of L-cysteine and glutathione. *Tetrahedron Letters* 26:2013–2016.
- Hartmann A, Zimmer W. 1994. Physiology of *Azospirillum en Azospirillum*/Plant association (Y Okon ed). CRC press, Boca Raton. Pages 15-39.
- Hutchings MI, Spiro S. 2000. The nitric oxide regulated nor promoter of *Paracoccus denitrificans*. *Microbiology* 146: 2635–2641.
- Ilari A, Bonamore A, Farina A, Johnson KA, Boffi A. 2002. The X-ray structure of ferric *Escherichia coli* flavohemoglobin reveals an unexpected geometry of the distal heme pocket . *The Journal of Biological Chemistry* 277:23725–23732.
- Imlay JA. 2013. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature Reviews Microbiology* 11:443-454.
- Jin CW , Ye YQ, Zheng SJ. 2014. An underground tale: contribution of microbial activity to plant iron acquisition via ecological processes. *Annals of Botany* 113:7–18,
- King GM, Garey MA. 1999. Ferric iron reduction by bacteria associated with the roots of freshwater and marine macrophytes. *Applied and Environmental Microbiology* 65:4393-4398.
- Kwiatkowski AV, Shapleigh JP. 1996. Requirement of nitric oxide for induction of genes whose products are involved in nitric oxide metabolism in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *Journal Biological Chemistry* 271: 24382–24388.
- Law JH, Slepecky RA. 1961. Assay of poly-β-hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology* 82:1 33-36.
- Li Y, Katzmann E, Borg S, Schüler D. 2012. The periplasmic nitrate reductase Nap is required for anaerobic growth and involved in redox control of magnetite biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Journal of bacteriology* 194:4847-4856.
- Molina-Favero C, Creus CM, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L. 2008. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 21:1001–1009.
- Molina-Favero C, Creus CM, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L. 2008. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 21: 1001–1009.
- Moore CM, Nakano MM, Wang T, Rick WY, Helmann JD. 2004. Response of *Bacillus subtilis* to nitric oxide and the nitrosating agent sodium nitroprusside. *Journal of bacteriology* 186:4655-4664.
- Moreno-Vivian C, Ferguson SJ. 1998. Definition and distinction between assimilatory, dissimilatory and respiratory pathways. *Molecular Microbiology* 29:664–666.
- Mori E, Fani R, Gallori E, Fantappiè O, Bazzicalupo M. 1992. Mutants of *Azospirillum brasilense* altered in the uptake of iron. *Symbiosis* 13: 115-122.

- Mori E, Fulchieri M, Indorato C, Fani R, Bazzicalupo M. 1996. Cloning, nucleotide sequencing, and expression of the *Azospirillum brasilense* *lon* gene: involvement in iron uptake. *Journal of Bacteriology* 178:3440-3446.
- Mukhopadhyay P, Zheng M, Bedzyk LA, LaRossa RA, Storz G. 2004. Prominent roles of the NorR and Fur regulators in the *Escherichia coli* transcriptional response to reactive nitrogen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:745-750.
- Mur LA, Mandon J, Persijn S, Cristescu SM, Moshkov IE, Novikova GV, Hall MA, Harren FJM, Hebelstrup KH, Gupta KJ. 2013. Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB plants*, 5, pls052.
- Neilands JB. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry* 270:26723-26726.
- Pantopoulos K, Weiss G, Hentze MW. 1996. Nitric oxide and oxidative stress (H₂O₂) control mammalian iron metabolism by different pathways. *Molecular and Cellular Biology* 16:3781-3788.
- Richardson DJ, King GF, Kelly DK, McEwan AG, Ferguson SJ, Jackson JB. 1988. The role of auxiliary oxidants in maintaining redox balance during phototrophic growth of *Rhodobacter capsulatus* on propionate or butyrate. *Archives in Microbiology* 150:131-137.
- Richardson DR, Lok HC. 2008. The nitric oxide-iron interplay in mammalian cells: Transport and storage of dinitrosyl iron complexes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780:638-651.
- Rodríguez Cáceres EA. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied Environmental Microbiology* 44: 990-991.
- Roldan MD, Reyes F, Moreno-Vivián C, Castillo F. 1994. Chlorate and nitrate reduction in the phototrophic bacteria *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides*. *Current Microbiology* 29:241-245.
- Roman DG, Dancis A, Anderson GJ, Klausner RD. 1993. The fission yeast ferric reductase gene *frp1+* is required for ferric iron uptake and encodes a protein that is homologous to the gp91-phox subunit of the human NADPH phagocyte oxidoreductase. *Molecular and Cellular Biology* 13:4342-4350.
- Sadasivan L, Neyra CA. 1985. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. *Journal of Bacteriology* 163:716-723.
- Saha R, Saha N, Donofrio RS, Bestervelt LL. 2013. Microbial siderophores: a mini review. *Journal of Basic Microbiology* 53:303-317.
- Saxena B, Modi M, Modi VV. 1986. Isolation and characterization of siderophores from *Azospirillum lipoferum* D-2. *Journal of General Microbiology* 132: 2219-2224.
- Schmidt W. 1999. Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytologist* 141:1-26.
- Schröder I, Johnson E, De Vries S. 2003. Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiology Reviews* 27:427-447.
- Schwyn B, Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160:47-56.
- Sears HJ, Spiro S, Richardson DJ. 1997. Effect of carbon substrate and aeration on nitrate reduction and expression of the periplasmic and membrane-bound nitrate reductases in carbon-limited continuous cultures of *Paracoccus denitrificans* Pd1222. *Microbiology* 143:3767-3774.
- Sears HJ, Sawers G, Berks BC, Ferguson SJ, Richardson DJ. 2000. Control of periplasmic nitrate reductase gene expression (*napEDABC*) from *Paracoccus pantotrophus* in response to oxygen and carbon substrates. *Microbiology* 146:2977-85.
- Shah S, Karkhanis V, Desai A. 1992. Isolation and characterization of siderophore, with antimicrobial activity, from *Azospirillum lipoferum* M. *Current Microbiology* 25:347-351.
- Sparacino-Watkins C, Stolz JF, Basu P. 2014. Nitrate and periplasmic nitrate reductases. *Chemical Society Reviews* 43:676-706.
- Sridevi M, Kumar KG, Mallaiah KV. 2008. Production of catechol-type siderophores by *Rhizobium* sp. Isolated from stem nodules of *Sesbania procumbens* (Roxb) W and A. *Research Journal of Microbiology* 3:282-287.

- Steenhoudt O, Keijers V, Okon Y, Vanderleyden J. 2001. Identification and characterization of a periplasmic nitrate reductase in *Azospirillum brasilense* Sp245. *Archives in Microbiology* 175:344–352.
- Steenhoudt O, Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews* 24:487–506.
- Stewart V, Bledsoe PJ, Chen LL, Cai A. 2009. Catabolite repression control of *napF* (periplasmic nitrate reductase) operon expression in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 191:996–1005.
- Tortora ML, Díaz-Ricci JC, Pedraza RO. 2011. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives in Microbiology* 193:275–286.
- Tosques IE, Kwiatkowski AV, Shi J, Shapleigh JP. 1996. Characterization and regulation of the gene encoding nitrite reductase in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *Journal of Bacteriology* 179: 1090–1095.
- Touati D. 2000. Iron and oxidative stress in bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373:1–6.
- van Spanning RJM, Houben E, Reijnders WNM, Spiro S, Westerhoff HV, Saunders N. 1999. Nitric oxide is a signal for NNR-mediated transcription activation in *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Bacteriology* 181: 4129–4132.
- Wandersman C, Delepelaire P. 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annual Review of Microbiology* 58:611–647.
- Weiss JV, Emerson D, Backer SM, Megonigal JP. 2003. Enumeration of Fe(II)-oxidizing and Fe(III)-reducing bacteria in the root zone of wetland plants: Implications for a rhizosphere iron cycle. *Biogeochemistry* 64:77–96.
- Wisniewski-Dyé F, Borziak K, Khalsa-Moyers G, Alexandre G, Sukharnikov LO, Wuichet K, Hurst GB, McDonald WH, Robertson JS, Barbe V, Calteau A, Rouy Z, Mangenot S, Prigent-Combaret C, Normand P, Boyer M, Siguier P, Dessaux Y, Elmerich C, Condemine G, Krishnen G, Kennedy I, Paterson AH, González V, Mavingui P, Zhulin IB. 2011. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. *PLoS Genetics* 7:e1002430.
- Xie B, Xu K, Zhao HX, Chen SF. 2005. Isolation of transposon mutants from *Azospirillum brasilense* Yu62 and characterization of genes involved in indole-3-acetic acid biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters* 248:57–63.
- Zimmer W, Pentado Stephan M, Bothe H. 1984. Denitrification by *Azospirillum* Sp7. I. Growth with nitrite as respiratory electron acceptor. *Archives in Microbiology* 138:206–211.
- Zumft WG. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiological and Molecular Biology Reviews* 61:533–616.



CAPITULO 2.
FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA EN *Azospirillum brasilense*
Y EL ROL DEL ÓXIDO NÍTRICO.



INTRODUCCIÓN

Las biopelículas son estructuras mono- o multi- específicas en donde las células bacterianas están embebidas en una matriz extracelular de polisacáridos, ADN y proteínas, y adheridas a una superficie que puede ser tanto biótica como abiótica (O'Toole *et al.* 2000, Ramey *et al.* 2004, Danhorn y Fuqua 2007).

La formación de una biopelícula bacteriana sobre una superficie involucra numerosos pasos. En primera instancia la formación de la biopelícula comienza cuando la bacteria sensa condiciones ambientales que disparan la transición de la vida planctónica a la vida sobre una superficie (O'Toole *et al.* 2000). Estas condiciones que desencadenan la formación de biopelícula varían ampliamente dependiendo de los microorganismos. Algunas de éstas pueden ser la disponibilidad de nutrientes (como la disponibilidad de hierro), cambios de temperatura, osmolaridad, pH y oxígeno, señales mecánicas, presencia de antibióticos, señales de quórum sensing, entre muchas más (Karatan y Watnick 2009).

Las variaciones en los factores mencionados disparan cambios en las concentraciones de las moléculas señal involucradas en el proceso de transición entre ambas formas de vida, siendo el 3'5'-guanosín-monofosfato-cíclico (diGMPc) una de las más estudiadas y con un rol central en este proceso (D'Argenio y Miller 2004, Ryan *et al.* 2006). El diGMPc está presente en casi todas las bacterias y regula procesos tan variados como las transiciones en el desarrollo, comportamiento de agregación, adhesión, formación de biopelículas, virulencia en organismos patógenos de plantas y animales, entre otros (Ryan *et al.* 2006 y referencias incluidas). Los niveles de diGMPc en la célula son mantenidos por los procesos de síntesis y de degradación de esta molécula (Figura 1.2 A). Las diguanilato ciclasas (DGC) son proteínas que poseen el dominio GGDEF y son las responsables de la síntesis de diGMPc. Por otro lado, las fosfodiesterasas (FDE) que pueden contener los dominios EAL o HD-GYP son las encargadas de la hidrólisis del diGMPc (D'Argenio y Miller 2004, Ryan *et al.* 2006). Los genomas bacterianos contienen varios genes que codifican proteínas con estos dominios y que adicionalmente poseen un dominio sensor, el cual recibe una señal y la transmite al dominio GGDEF o EAL/HD-GYP modificando la actividad enzimática, alterando el pool de diGMPc celular y desencadenando una respuesta (Ryan *et al.* 2006).

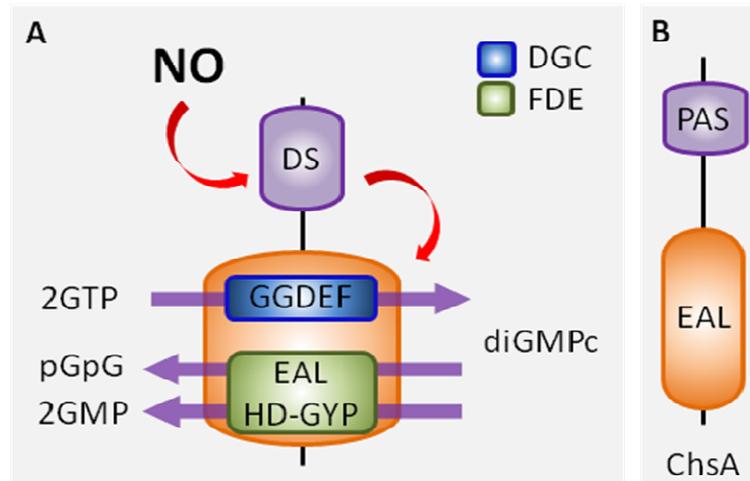


Fig. 1.2. **El óxido nítrico y su relación con el diGMPc.** A) Mecanismo general de modulación de la síntesis y degradación del diGMPc. El NO interactúa físicamente con un dominio sensor (DS) el cual transfiere la señal a la región catalítica de la proteína, la cual puede consistir en una diguanilato ciclasa (DGC, que poseen el dominio GGDEF) o una fosfodiesterasa (FDE, que posee el dominio EAL o HD-GYP). La DGC sintetiza a partir de 2 moléculas de guanosin trifosfato (GTP) una molécula de diGMPc, mientras que el diGMPc se degrada al producto 5'-fosfoguanidil-(3'-5')-guanosina (pGpG) en el caso de FDE con dominio EAL, o a 2 moléculas de guanosin monofosfato en el caso de la FDE de dominio HD-GYP. Adaptado de McDougald *et al.* (2012) y Boyd y O'Toole (2012). B) Esquema de la proteína ChsA (chemotactic signaling proteína A) de *A. brasilense* Sp7 (Carreño-Lopez *et al.* 2009) conteniendo un dominio sensor del tipo PAS y un dominio de FDE (EAL).

Al respecto, en *Azospirillum brasilense* se ha reportado que la cepa Sp7 posee el gen *ChsA* (chemotactic signaling gene A) el cual presenta el dominio EAL (Figura 1.2 B) con actividad (Villegas 2012), y que está involucrado en la regulación de la respuesta quimiotáctica (Carreño-Lopez *et al.* 2009). Además, la proteína ChsA posee un dominio del tipo PAS, el cual se ha descrito en proteínas de todos los reinos de la vida. Dependiendo del sistema biológico, la unión de pequeñas moléculas o iones a los dominios PAS puede servir como una señal directa o proveer un cofactor que permita la percepción de señales como gases, potencial redox o luz visible (Henry y Crosson 2011). En las bacterias se encuentran generalmente en proteínas involucradas en señalización como histidinkinasas, diGMPc sintasas/hidrolasas y proteínas aceptoras de metilos relacionadas a la quimiotaxis (Henry y Crosson 2011). La interacción de los dominios PAS con un diverso rango de pequeñas moléculas, entre ellas óxido nítrico (NO) (Barraud *et al.* 2009, Rao *et al.* 2011), es la característica de esta familia.

Los estudios sobre los mecanismos que regulan la formación de biopelículas en *Azospirillum* son escasos, aunque en los últimos años ha surgido la atención por este

tópico. Además de los trabajos que indagan sobre el rol de los exopolisacáridos (EPS), la mayoría de los reportes relacionados a este tema, investigan cómo ocurre la interacción de la bacteria con las raíces y qué componentes participan (revisado extensamente por Bashan y Holgin 1997 y Bashan *et al.* 2004), pero desde una óptica macro y sin indagar en las posibles rutas de regulación del proceso en la bacteria.

Por otro lado, una de las moléculas que en los últimos años ha salido a la luz en la regulación de la formación de biopelículas es el NO. El primer reporte de este rol fue realizado por Schmidt *et al.* (2004), donde se muestra que el tratamiento de biopelículas de *Nitrosomonas europaea* con NO en concentraciones de 5 ppm promueve el desensamblado de la biopelícula, pero a concentraciones mayores (30 ppm) genera que ésta se ensamble. Posteriormente, trabajos como los de Barraud *et al.* (2006) en *Pseudomonas aeruginosa* aportaron nuevos datos al rol de NO, demostrando que el tratamiento con donadores de esta molécula estimula el desensamblado de las biopelículas en esta especie.

El mecanismo por el cual el NO ejerce efecto sobre la formación o dispersión de las biopelículas ha sido en parte dilucidado en los últimos años. Se ha reportado que el NO interactúa con dominios receptores del tipo PAS o H-NOX (hemo NO/oxígeno) los cuales están unidos a dominios GGDEF o EAL/HD-GYP regulando la actividad de éstos y por lo tanto alterando la concentración celular de diGMPc. Se ha observado que el NO puede actuar como promotor de la formación de la biopelícula o regular el desensamblado de la misma dependiendo de qué clase de actividad (DGC o FDE) regule. Barraud *et al.* (2009) mostraron que en *P. aeruginosa* el NO interactuaría con el dominio PAS de la proteína BdlA la cual lleva a una caída en la concentración de diGMPc y posterior desensamblado de la biopelícula. Por otro lado, Carlson *et al.* (2010) identificaron en *Legionella pneumophila* el dominio H-NOX adyacente a la proteína Lpg1057 la cual posee los dominios GGDEF y EAL, aunque solo mostró actividad *in vitro* de DGC. Los dominios de interacción H-NOX son una familia de hemoproteínas sensoras ampliamente distribuidas en los genomas bacterianos, aunque se dispone de información limitada sobre su función (Plate y Marletta 2013). El dominio H-NOX de *L. pneumophila* interacciona con NO y lleva a la inhibición de la actividad DGC de Lpg1057 regulando así la formación de la biopelícula (Carlson *et al.* 2010).

El rol de NO como actor en la formación o desensamble de las biopelículas parece ser incluso diferente dentro del mismo género de bacterias. En *Shewanella oneidensis* se ha reportado que la interacción del NO con el dominio H-NOX lleva a la inhibición de la actividad FDE elevando los niveles de diGMPC dando la señal para la formación de biopelícula (Plate y Marletta 2012). Sin embargo, en *S. woody* concentraciones nM de NO llevan a la activación de la FDE reduciendo los niveles de diGMPC y llevando a la formación de biopelículas muy delgadas (Liu *et al.* 2012).

Teniendo en cuenta la información presentada, en este capítulo se buscó conocer de qué modo se desarrolla la biopelícula de *Azospirillum brasilense* Sp245 y establecer, en este proceso, el rol del NO producido por la vía de desnitrificación aeróbica. Además, teniendo presente la evidencia de la interacción de las moléculas señal NO/diGMPC, se indagó acerca del posible rol de la proteína ChsA sobre la formación de biopelícula y su interacción con el NO. Finalmente, se estudió que efectos tiene la deficiencia de hierro sobre la formación de biopelículas en presencia o ausencia de NO endógeno.



MATERIALES y MÉTODOS

Cepas utilizadas, condiciones de cultivo y medios utilizados para la formación de biopelícula.

Para el estudio de la formación de biopelículas se utilizaron: la cepa salvaje de *A. brasilense* Sp245 (Baldani *et al.* 1986) y la mutante isogénica de Sp245 llamada Faj164, la cual posee interrumpido el gen *NapA* por un cassette de resistencia a Kanamicina (Steenhoudt *et al.* 2001). Esta cepa posee reducida su capacidad de producir NO en un 95% con respecto a la cepa salvaje cuando utiliza nitrato como única fuente de nitrógeno (Molina Favero *et al.* 2008). Para la observación de las biopelículas en microscopio confocal de fluorescencia, las cepas de *A. brasilense* Sp245 y Faj164 fueron transformadas con el plásmido pMP2444 (Bloemberg *et al.* 2000) que contiene la proteína verde fluorescente (eGFP) la cual se expresa constitutivamente en *Azospirillum*. El análisis del rol de la proteína ChsA en la formación de biopelícula se llevó adelante utilizando las cepas de Sp245 y Faj164 transformadas con el plásmido pJB6.8 (Moreno-Ramirez 2011). Como control se utilizaron las cepas transformadas con el vector sin inserto pJB3Tc20 (Blantny *et al.* 1997, Moreno-Ramirez 2011). Por último, se generaron las cepas de Sp245 y Faj164 transformadas con el plásmido pNapO construido en este estudio. Para más detalles de las cepas utilizadas y vectores, consultar Anexo 5.

Las diferentes cepas de *Azospirillum* utilizadas en este capítulo fueron estriadas desde stocks en medio papa a placas de ACR (Rodríguez Cáceres 1982) conteniendo los diferentes antibióticos (Kanamicina 25 µg/ml, Gentamicina 25 µg/ml o Tetraciclina 10 µg/ml) según corresponda (Anexo 5). Las placas fueron incubadas por 4-5 días a 30°C. Luego, una o dos colonias fueron cultivadas en 25 ml de medio LB suplementado con CaCl₂ 3.3 mM y MgCl₂ 5 mM en Erlenmeyer de 125 ml por 16 horas a 100 rpm, 30°C. Los cultivos que alcanzaron una densidad óptica 540nm (DO_{540nm}) cercana a 1, fueron seleccionados, centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos, lavados con buffer fosfato (66 mM) y re-suspendidos a una DO_{540nm} ajustada igual a 2.

Para el estudio de la formación de biopelículas, se utilizó medio Nfb (Döbereiner y Day 1976) modificado de modo que la relación carbono-nitrógeno (C/N) del mismo fuera igual a 2 (Burdman *et al.* 1998). De esta manera el medio Nfb utilizado en este estudio contenía 27.6 mM de ácido málico y 13.8 mM de amonio o 13.8 mM nitrato. Los cultivos ajustados previamente a una DO_{540nm} de 2 fueron diluidos 1/100

en medio NFB fresco y se colocaron 2 ml en placas de 24 pocillos de fondo plano (Costar) las cuales fueron incubadas sin agitación por un período total de 5 días a 30°C. A las 24, 96 ó 120 horas (días 1, 3 y 5 respectivamente) de iniciado los cultivos estáticos se determinaron las UFC/ml y DO_{540nm} totales (sumatoria de células planctónicas y en biopelícula). La formación de biopelícula fue evaluada por el método de Cristal Violeta (O'Toole y Kolter 1998) con algunas modificaciones. A los pocillos conteniendo 2 ml de cultivo se le agregaron 500 µl de una solución cristal violeta 0.5 % ^{v/v} filtrada. Estos se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente y luego, el contenido de los pocillos fue descartado por inversión de la placa. La placa fue lavada cuidadosamente con agua de la canilla y el Cristal Violeta adherido fue extraído con 2 ml de una solución 33% ^{v/v} de ácido acético. Se determinó absorbancia 590nm y los datos fueron normalizados en función del crecimiento estimado por DO_{540nm}.

Formación de agregados celulares, morfología de colonias y adherencia de Rojo Congo.

Para evaluar la formación de agregados celulares, la morfología de las colonias y la adherencia de Rojo Congo, las cepas Sp245 y Faj164 fueron cultivadas en el medio reportado por Burdman *et al.* (1998) utilizando nitrato en lugar de amonio como fuente de nitrógeno (OAB-NO₃⁻). Brevemente, 1 ml de cultivo ajustado a una DO_{540nm} de 2 fue colocado en 100 ml de medio OAB-NO₃⁻ (C/N = 2 o C/N = 9.2) y llevado a incubación por 24 horas a 100 rpm. Para la obtención de la relación C/N = 2 se colocó 18 mM de nitrato y para la relación C/N = 9.2, 4 mM. Diez ml de estos cultivos fueron colocados en 2 tubos Falcon de 15 ml y mediante acción mecánica una de las muestras fue disgregada. El otro tubo fue incubado en forma vertical sin movimiento, permitiendo la precipitación de los agregados. Se determinó la DO_{540nm} del tubo disgregado (DO_{540nm} total) y de la parte superior del tubo sin tratamiento mecánico (DO_{540nm} plantónicas). El porcentaje de agregación se calculó como: $(DO_{540nm} \text{ total} - DO_{540nm} \text{ plantónicas}) / DO_{540nm} \text{ total} \times 100$.

Para el análisis de la morfología de las colonias y adherencia de Rojo Congo, el medio utilizado fue el mismo mencionado anteriormente, pero conteniendo 1,5 % (^{p/v}) de agar y 1,5 % (^{v/v}) ml de una solución 1:400 de Rojo Congo estéril. Una ansada de

cultivo o 10 µl de cultivo lavado y ajustado a una DO_{540nm} de 2 fueron colocados en las placas e incubadas a 30°C por 4 a 5 días.

Extracción de ADN plasmídico, genómico y transformación de *Escherichia coli* y *Azospirillum brasilense*.

La extracción del ADN plasmídico de cultivos de *Escherichia coli* se realizó mediante el protocolo de lisis alcalina modificado (Anexo 10). El ADN genómico de *A. brasilense* fue extraído utilizando el kit QIAamp DNA Mini Kit de QUIAGEN según las especificaciones del proveedor.

Se generaron células competentes por el método químico (Inoue *et al.* 1990) de las cepas *E. coli* DH5α, *E. coli* TOP10 y de la cepa conjugativa S17.1. Una vez preparadas, las células fueron fraccionadas y guardadas a -80°C hasta su uso. La transformación de estas células se realizó mediante el protocolo de choque térmico (Anexo 4) y se seleccionó mediante el antibiótico correspondiente en placas de LB.

Los diferentes plásmidos utilizados (Anexo 5) fueron transferidos a la cepa conjugativa dadora *E. coli* S17.1 por choque térmico. Luego de obtenidas las cepas, mediante conjugación bi-parental se transfirió el plásmido a la cepa de *Azospirillum* receptora (Anexo 6). La cepa generada fue seleccionada por sucesivos repiques en medio agar Rojo Congo (ACR; Rodríguez-Cáceres 1982) conteniendo el antibiótico correspondiente.

Plásmidos y construcciones.

El plásmido pJB6.8 es un derivado del plásmido pJB3Tc20 (Blantny *et al.* 1997) que contiene un fragmento de 6.8 kpb obtenido del plásmido pAB6.8 (Carreño-Lopez *et al.* 2009). El plásmido pAB6.8 fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI*, y la digestión fue corrida en gel de agarosa 0.8 % p/v. El fragmento correspondiente a 6.8 kpb fue purificado del gel y ligado al vector pJB3Tc20 cortado con las mismas enzimas de restricción, generando el plásmido pJB6.8 (Moreno-Ramirez 2011, Anexo 5).

Para la generación del plásmido pNapO se amplificó el operón Nap utilizando los siguientes primers: *Fw-NapO*: CTGCTGCGCCGCATCTGC y *Rv-NapO*: GCCGGAGCCAAAATCAACCTT. Para la amplificación de este fragmento de

aproximadamente 4600 pb (Anexo 7) se utilizó la *Taq* platinum polimerasa (Invitrogene) high fidelity y el programa indicado en el Anexo 7 utilizando como templado ADN genómico de la cepa Sp245. El producto de PCR fue corrido en gel de agarosa 0.8 % ^p/_v y la banda correspondiente extraída del mismo con el kit Zymoclean según las especificaciones. Este fragmento amplificado se clonó inmediatamente en el vector pCR2.1 TOPO (Invitrogene) según especificaciones del vendedor y se transformaron células TOP10 (Invitrogene) competentes químicas. Las células fueron plaqueadas en medio conteniendo ampicilina como agente de selección, IPTG y X-gal para identificar las colonias que incorporaron el plásmido con inserto. Las colonias ampicilina resistentes, X-gal negativas fueron nuevamente estriadas en el mismo medio para asegurar la presencia del vector con inserto y posteriormente las colonias obtenidas fueron analizadas por PCR multiplex (Anexo 8) para la presencia del inserto utilizando los primers NapA (*Fw-NapA*: GGACCCCAACGCCGCACTG, *Rv-NapA*: CCTTGCCGTCCTTGTTGCCGTAGA) y NapBC (*Fw-NapBC*: GCTCCTGGTGTCCGGCGTGTTCCG, *Rv-NapBC*: GCGGGTTCTGGCGGGTGATGTCC). Este vector fue llamado pCR2.1 NapO 58. Una vez chequeado por PCR y restricción la presencia del inserto, este vector fue digerido con las enzimas *XhoI* y *HindIII* extrayendo el fragmento NapO y ligándolo al vector pJB3Tc20 cortado con las mismas enzimas generando el vector pJB3TcNapO. Este último fue chequeado por PCR multiplex y restricción para la presencia del inserto.

Para más detalle de los plásmidos utilizados consultar Anexo 5.

Análisis de la biblioteca genómica de *Azospirillum brasilense* Sp7.

A partir de una biblioteca genómica de *Azospirillum brasilense* cepa Sp7 construida sobre el cósmido pCP13 (Friedman *et al.* 1982) conservada en glicerol stock en la cepa *E. coli* HB101 (clones) en el cepario del laboratorio de Interacción bacteria planta de la BUAP, México, se repicaron aproximadamente 800 clones en placas de LB conteniendo tetraciclina como agente de selección. Grupos de 25 clones fueron cultivados en LB 5 ml a 200 rpm por 16 horas y el ADN plasmídico extraído con el kit QIAamp DNA Mini (QUIAGEN). Posteriormente se realizó la reacción de PCR multiplex *NapA-NapBC* (Anexo 8) utilizando como templado el ADN plasmídico extraído previamente. El grupo de clones positivo fue recuperado de las placas

originales y se realizaron extracciones de ADN plasmídico independientes de cada uno de ellos. Finalmente se realizó PCR multiplex *NapA-NapBC* sobre el ADN plasmídico de estos 25 clones. El clon obtenido fue estriado en placas LB con tetraciclina y mantenido a 4°C. Se denominó a este clon de *E. coli*: C7-11 y al plásmido que éste contenía donde se encontraba el operon Nap: pC7-11.

El pC7-11 fue extraído y cortado con las enzimas *XbaI* y *PstI*, enzimas que permitirían liberar completo el operon Nap, según el análisis *in silico* de la región. El producto de la digestión fue corrido en geles de agarosa 0.9% ^{p/v} y se realizó el protocolo de hibridación radioactiva (Sambrook *et al.* 1989). Como sondas se utilizaron los amplicones *NapA* y *NapBC*, amplificados usando los mismos primers antes mencionados, marcando las sondas con fósforo radioactivo utilizando [α -³²P] dCTP.

Microscopia confocal de fluorescencia de las biopelículas.

Utilizando las cepas de *Azospirillum* conteniendo el plásmido pMP2444, el cual contiene la proteína verde fluorescente (eGFP) de expresión constitutiva en *A. brasilense*, se establecieron cultivos estáticos como se indicó anteriormente. A los tres días de cultivo, se retiraron las células planctónicas y las placas conteniendo la biopelícula fueron observadas directamente bajo microscopio confocal de fluorescencia con excitación a 505 nm y emisión a 488 nm (Zeis, Axioskop 2 Mot).

Determinación de la producción de NO, nitrito y tratamientos con el dador de NO GSNO.

La determinación de NO en tiempo real en los cultivos estáticos se realizó mediante electrodo específico de NO utilizando el sistema inNO-T-II (Innovative Instruments, Inc) según indica el proveedor. El electrodo permaneció en contacto con los cultivos por un periodo de 40 minutos con un registro constante de datos.

Por otro lado, sobrenadantes de los cultivos estáticos fueron utilizados para la determinación de nitrito, un estimador de la producción de NO (Mur *et al.* 2011). La determinación del contenido de nitrito en los sobrenadantes se realizó transformando este ion en NO y detectando este último mediante un electrodo específico (inNO-T-II).

El aparato fue calibrado con concentraciones conocidas de nitrito y las determinaciones realizadas referidas a esta curva estándar.

El efecto del dador de NO S-nitrosoglutatión (GSNO) sobre la formación de biopelícula se estudió tratando diariamente desde el inicio del experimento y por 3 días con concentraciones de 1 μM , 25 μM , 50 μM ó 100 μM del dador. EL GSNO fue preparado diariamente según Hart (1985) y utilizado inmediatamente.

Diseño experimental

Los experimentos fueron realizados utilizando de 3 a 6 réplicas biológicas en uno o dos ensayos independientes. En las leyendas de cada figura se indica puntualmente el número de réplicas y de ensayos realizados para obtener los datos correspondientes.



RESULTADOS

Las diferencias en la morfología de colonia entre cepas de una especie bacteriana o mutantes de una cepa, suelen ser indicativas de diferencias fenotípicas a nivel de los componentes extracelulares (principalmente los EPS) y estas pueden estar íntimamente relacionadas con una alteración de la formación de biopelículas. Precisamente esta simple observación fue el disparador de la investigación de las biopelículas en *Azospirillum* y su relación con el NO.

Rutinariamente ambas cepas son estriadas en medio ACR y fue allí donde se observó que la morfología de las colonias era diferente. Dado que este medio es indefinido, se decidió analizar esta característica en un medio definido como el reportado por Burdman *et al.* (1998), el cual está especialmente descrito para este tipo de estudio con la salvedad de reemplazar el amonio por nitrato como fuente de nitrógeno. La Figura 2.2 muestra la morfología y adherencia de Rojo Congo en ambas cepas Sp245 y Faj164 crecidas durante 5 días en medio OAB (C/N=2). En la Figura 2.2 A, se puede observar que la cepa salvaje Sp245, obtenida por agotamiento de estría, presenta una morfología de colonia redondeada, roja por absorción del Rojo Congo, levemente brillante, umbilicada con borde entero. Para el caso de la cepa mutante Faj164 se observa que la colonia presenta forma circular aunque irregular, de color rojo, brillante, de borde ondulado y con su centro colapsado (Figura 2.2 B). Por otro lado cuando en este mismo medio se colocaron 10 µl de cultivos con igual cantidad de bacterias se pudo observar, aunque sutil, diferencia en la adherencia de Rojo Congo entre ambas cepas (Figura 2.2 C y D). En este caso también es evidente que las colonias de Faj164 son más rugosas que las de la cepa salvaje.

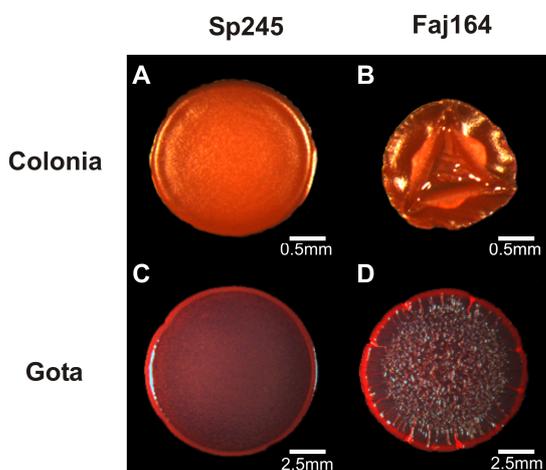


Fig. 2.2. **Morfología de las colonias de *A. brasilense*.** A partir de un cultivo en medio LB crecido por 16 horas a 100 rpm y 30°C de Sp245 o Faj164, se estriaron placas de medio reportado por Burdman *et al.* (1998) con Rojo Congo y nitrato como fuente de nitrógeno de modo de obtener colonias aisladas (A y B). Además, se colocaron 10 µl de cultivo con igual DO_{540nm} (C y D). Las placas de Petri se incubaron a 30°C por 5 días en cámara húmeda.

Teniendo en cuenta que estas primeras observaciones indicaron que podrían existir diferencias en la composición de EPS y que otro fenotipo asociado a esta diferencia en EPS es la agregación celular, se estudió si entre ambas cepas existían diferencias en este aspecto. Se cultivaron ambas cepas en dos condiciones, una de alta relación carbono/nitrógeno (C/N=9.2) y otra de relación carbono/nitrógeno considerada normal, utilizada de rutina en el crecimiento de *Azospirillum* (C/N=2). En la Figura 3.2 A y B, se puede observar que en condiciones de relación de C/N normal, la cepa Sp245 forma pocos agregados celulares (microagregados) mientras que la cepa mutante acumula cerca de un 50 % de sus células en agregados celulares. Según lo reportado por Burdman *et al.* (1998) un aumento en la relación carbono/nitrógeno estimula la formación de agregados celulares en la cepa Sp7 de *A. brasilense*. En este caso, el aumento de la relación C/N no afectó a la cepa salvaje Sp245, la cual incluso mostró en ocasiones menor cantidad de microagregados, pero sí modificó claramente los microagregados formados por la cepa Faj164 los cuales fueron de mayor tamaño (Figura 3.2 A). La cuantificación del porcentaje de agregación para la relación C/N=9.2 resultó infructuosa dado que los agregados formados por Faj164 no pudieron ser disgregados en su totalidad.

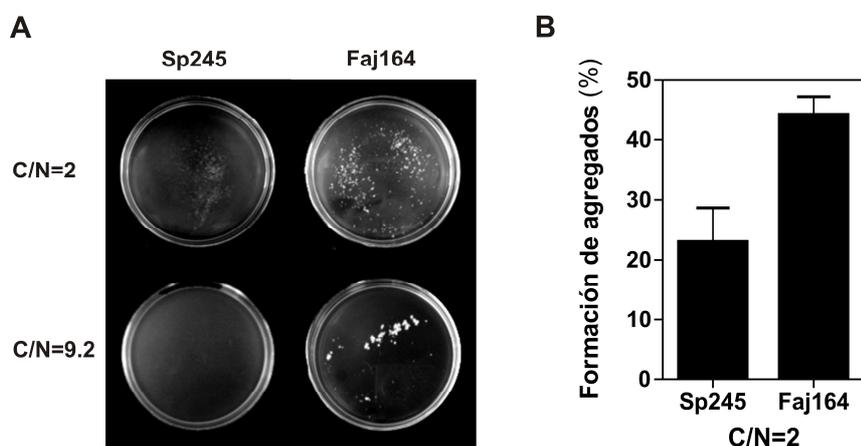


Fig. 3.2. **Formación de agregados celulares en *A. brasilense*.** Las cepas Sp245 y Faj164 fueron cultivadas en medio Nfb modificado según Burdman *et al.* (1998) en dos condiciones de relación carbono/nitrógeno (C/N). Los cultivos fueron incubados en agitación por 24 horas a 100 rpm 30°C. A) aspecto de los cultivos luego de 24 horas de crecimiento volcados en placas de Petri. B) cuantificación de la formación de agregados celulares para la condición C/N=2 a las 24 horas de cultivo. Los valores representan la media de 2 experimentos con 3 réplicas cada uno con su correspondiente desvío estándar.

Los resultados antes expuestos muestran que existen diferencias entre ambas cepas tanto en la formación de agregados celulares como en la morfología de la colonia. La modificación de estos aspectos en otros microorganismos puede ser indicativo de diferencias también en la formación de biopelículas (Kirisits *et al.* 2005, Chen *et al.* 2006).

La formación de biopelículas en *Azospirillum* fue estudiada en condiciones estáticas, la cual no es la condición comúnmente utilizada para el crecimiento de este microorganismo, por lo tanto en primera instancia se determinaron las cinéticas de crecimiento en cultivos estáticos (Figura 4.2). Cuando las dos cepas crecieron en medio conteniendo como fuente de nitrógeno amonio (NH_4Cl), ambas mostraron cinéticas similares con una pequeña diferencia hacia el quinto día (5d) de crecimiento (Figura 4.2 A). Este resultado concuerda con las observaciones realizadas en curvas de crecimiento utilizando amonio y en agitación, donde ambas cepas tienen cinéticas de crecimiento superpuestas (Molina Favero *et al.* 2008). Por el contrario, cuando ambos microorganismos fueron crecidos en medio conteniendo nitrato (KNO_3) como fuente nitrogenada, mostraron un comportamiento de crecimiento muy distinto entre sí (Figura 4.2 B). La cepa Sp245 alcanzó rápidamente su máxima $\text{DO}_{540\text{nm}}$ (aproximadamente 0.37) al primer día del ensayo y mantuvo este valor a lo largo de los siguientes días hasta finalizar el experimento.

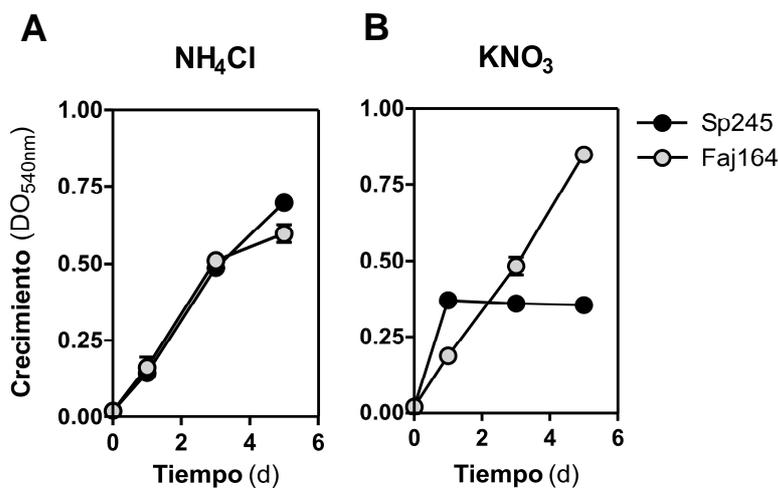


Fig. 4.2. Crecimiento estático de *A. brasilense* Sp245 y su mutante Faj164. *A. brasilense* Sp245 y Faj164 fueron cultivados por 5 días sin agitación en medio Nfb suplementado con amonio (A) o nitrato (B). El crecimiento total (células plantónicas + adheridas) fue determinado por densidad óptica $\text{DO}_{540\text{nm}}$. Se muestra la media con sus desvíos de 2 ensayos independientes con 4 réplicas cada uno. El desvío estándar de los datos se encuentra oculto en algunos casos por el tamaño del punto.

Por el contrario, la mutante Faj164 creciendo en nitrato se comportó de manera similar a la observada en crecimiento con amonio en los días 1 y 3. Sin embargo al 5d de crecimiento estático con nitrato los valores de DO_{540nm} alcanzados por la Faj164 superaron a los alcanzados cuando la fuente de nitrógeno fue amonio. Por otro lado, entre el día 2 y 3 en medio conteniendo nitrato, el crecimiento estimado por DO_{540nm} para ambas cepas fue similar (aproximadamente 0.37).

La formación de biopelícula, fue analizada en los mismos tiempos antes mencionados. Cuando la fuente de nitrógeno utilizada fue amonio, la formación de biopelícula a lo largo del experimento fue igual entre ambas cepas, notándose ambas curvas solapadas (Figura 5.2 A). Para el caso de nitrato como fuente de nitrógeno, al día 1 no se detectó formación de biopelícula en ninguna de las dos cepas. Sin embargo, al día 3 la cepa salvaje mostraba aproximadamente un 50 % más de biopelícula que la cepa mutante (Figura 5.2 A y B), diferencia que se redujo hacia el final del experimento donde la cepa Sp245 superaba a la Faj164 en un 20 % aproximadamente (Figura 5.2 A). La observación de las biopelículas en microscopio confocal de fluorescencia mostró resultados similares a los antes mencionados (Figura 5.2 C). Estos resultados también muestran que la presencia de nitrato en el medio de cultivo resulta en una producción de biopelícula mayor que cuando se utiliza amonio (Figura 5.2 A).

Se conocía previamente que la mutante Faj164 produce aproximadamente un 5 % de NO en comparación con la cepa salvaje Sp245 creciendo con nitrato como fuente de nitrógeno, mientras que en amonio la producción de NO en ambas es muy baja (Molina Favero *et al.* 2008). Sin embargo, estos datos fueron obtenidos en cultivos con agitación y no en las condiciones utilizadas para el estudio de las biopelículas. Por lo tanto, se determinaron la producción de nitrito, el cual constituye una medida indirecta de la producción de NO, y el NO producido en tiempo real en las condiciones estáticas de cultivo.

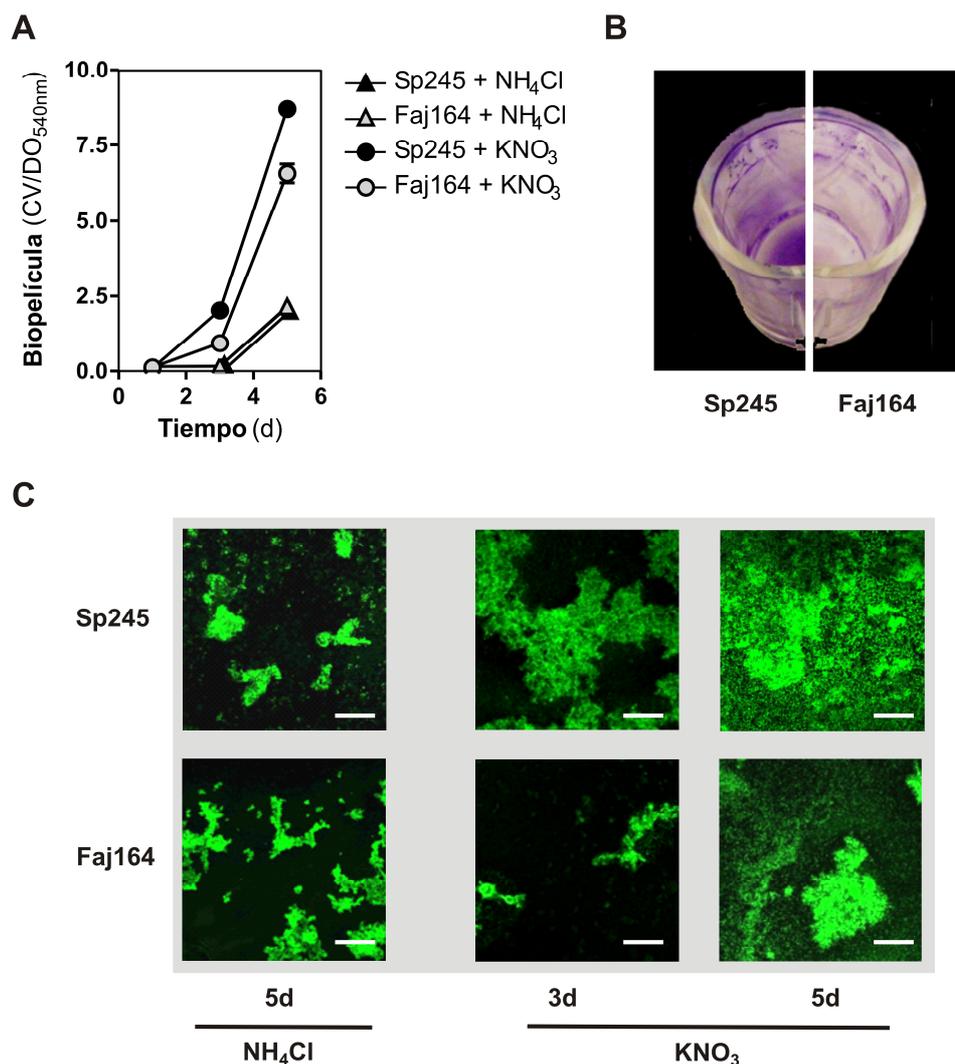


Fig. 5.2. **Formación de biopelícula en *A. brasilense* Sp245 y Faj164.** A) Cinética de formación de biopelícula por *A. brasilense* Sp245 y Faj164 en condiciones estáticas de crecimiento teniendo como fuentes de nitrógeno amonio o nitrato. Al primer, tercer o quinto día de cultivo se determinó la formación de biopelícula por la técnica del Cristal Violeta (CV). Los valores de CV se relativizaron al crecimiento total (DO_{540nm}). Se muestra la media con sus desvíos de 2 ensayos independientes con 4 réplicas cada uno. B) Pocillos de crecimiento de Sp245 o Faj164 al día 3 teñidos con Cristal Violeta. C) Microscopia de fluorescencia de las biopelículas formadas por las cepas Sp245 o Faj164 conteniendo el plásmido pMP2444 el cual posee el gen eGFP. Las barras blancas representan 25 nm.

Las determinaciones de nitrito mostraron que la cepa Sp245 acumula gran cantidad de este metabolito en los sobrenadantes el primer día de crecimiento estático con nitrato como fuente de nitrógeno y que con el correr de los días esta concentración decrece gradualmente, aunque no llega a ser nula, al menos en el transcurso del experimento (5 días) (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. **Producción de nitrito en cultivos estáticos.** Se determinó la concentración de nitrito en sobrenadantes de cultivos de *A. brasilense* Sp245 y Faj164 creciendo con diferente fuente de nitrógeno. Los datos corresponden a un ensayo con 6 replicas por condición.

cepa	producción de nitrito ($\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$)					
	amonio			nitrato		
	día 1	día 3	día 5	día 1	día 3	día 5
Sp245	nd	nd	nd	$28,58 \pm 7,95$	$24,39 \pm 3,16$	$19,09 \pm 5,88$
Faj164	nd	nd	nd	nd	$0,70 \pm 0,30$	$6,03 \pm 2,96$

nd: no detectado

En estas condiciones estáticas, la cepa mutante Faj164 produjo una cantidad marcadamente menor de nitrito respecto de la Sp245 (aproximadamente 34,8 y 3,2 veces menor para los días 3 y 5, respectivamente) tendencia similar a la reportada para cultivos en agitación crecidos en el mismo medio (Molina Favero *et al.* 2008). Aunque la concentración de nitrito fue aumentando gradualmente en la cepa Faj164, nunca superó la determinada en la cepa salvaje (Tabla 1.2) en el tiempo de desarrollo del ensayo. En el caso de los cultivos con amonio, no se detectó nitrito en ninguna de las cepas ninguno de los días muestreados.

La medición de NO en tiempo real mediante electrodo específico fue realizada al día 3 de crecimiento en medio con nitrato dado que la cuantificación del crecimiento estimada por $\text{DO}_{540\text{nm}}$ fue similar entre ambas cepas estudiadas (Figura 4.2 B). Este ensayo mostró que la cepa Sp245 produce y libera $10 \mu\text{M}$ de NO en un período de 40 minutos de toma de datos, mientras que la cepa Faj164 muestra una leve acumulación al inicio y se mantiene en $2 \mu\text{M}$ de NO hasta la finalización del ensayo (Figura 6.2). Es importante notar que la pendiente de la Sp245 no se hace asintótica a ningún valor al menos en el periodo de toma de datos (40 minutos), indicando que la concentración estable de NO en el cultivo podría ser mayor aún.

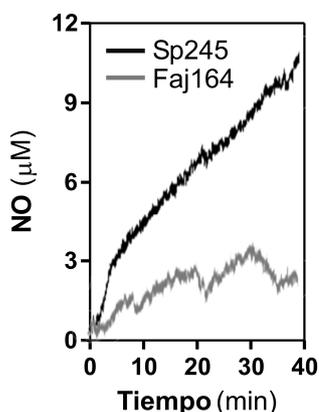


Fig. 6.2. **Producción *in vivo* de NO en condiciones de formación de biopelícula.** Utilizando un electrodo específico para NO se determinó la producción en tiempo real de esta molécula en pocillos conteniendo cultivos estáticos de Sp245 o Faj164 al día 3 de crecimiento con nitrato como fuente de nitrógeno. Las determinaciones se realizaron por un periodo de 40 minutos con toma de datos constante. Los pA (pico amperes) obtenidos fueron transformados a μM de NO utilizando una curva estándar con nitrito en medio ácido. La figura muestra un set de datos representativo de 2 ensayos independientes.

Las evidencias hasta ahora presentadas indican que existen diferencias en la formación de biopelículas entre la cepa salvaje y mutante, y que esta diferencia se correlaciona con una deficiente producción tanto de nitrito como de NO en la cepa Faj164. Para establecer el rol claro de la Nap y/o del NO como componentes necesarios para la formación de biopelícula, se buscó revertir la mutación en la Faj164 transformándola con un vector conteniendo la secuencia del operón *Nap*. En primera instancia, el operón *Nap* completo se buscó en una biblioteca construida con ADN de la cepa Sp7. Si bien se pudo encontrar una colonia que poseía un fragmento conteniendo al menos los genes *NapA*, *NapB* y *NapC*, luego de restricción de este vector e hibridación radioactiva se constató que el fragmento que contenía dichos genes era de gran tamaño para poder ser subclonado y transformar *Azospirillum* sin que otros posibles genes que pudieran influenciar los resultados sean incluidos (Anexo 9). Esta estrategia fue finalmente descartada.

Por otro lado, como estrategia alternativa, se transformaron ambas cepas de *Azospirillum* con una construcción que contenía el operón *Nap* (*NapEDABC*) más 420 pb río arriba del ATG de *NapE* amplificado por PCR utilizando como templado ADN de Sp245 (Anexo 7). Si bien pudo construirse el vector denominado pJB3TcNapO y transformar ambas cepas con éste, las determinaciones de nitrito en cultivo líquido en agitación, mostraron que ambas cepas permanecieron inalteradas en su capacidad de producción de este ion. La cepa Sp245-pNapO produjo aproximadamente $6 \mu\text{moles.ml}^{-1}$, mientras que no se detectó nitrito en la Faj164-pNapO. Los mismos valores se obtuvieron para las cepas sin plásmido (ver Capítulo 1, Figura 3.1). Este resultado indicó que el operón *Nap* clonado en el vector generando el plásmido pJB3TcNapO no era funcional.

Si bien las estrategias antes mencionadas no fueron exitosas, también se decidió realizar un enfoque farmacológico, tratando a los cultivos con un dador de NO de modo de evaluar los efectos sobre las biopelículas y si este dador podría revertir la deficiencia en la formación de biopelícula en la Faj164. Los cultivos de Sp245 y Faj164 fueron tratados con concentraciones crecientes de GSNO, dador de NO, y al 3d se evaluó la formación de biopelícula, momento en que la diferencia en la formación de biopelícula es de aproximadamente del 50% entre ambas cepas (Figura 5.2). Cuando las biopelículas se analizaron en medio conteniendo amonio, la respuesta frente al

agregado de GSNO fue dosis dependiente, aumentando la formación de biopelícula tanto para la cepa Sp245 como para la Faj164 con respuestas similares en ambas. Para la concentración mayor utilizada de GSNO (100 μ M) la formación de biopelícula se duplicó tanto para la cepa salvaje como para la mutante en medio con amonio. En el caso del medio de cultivo con nitrato, el agregado del GSNO a la cepa Sp245 incrementó gradualmente la formación de biopelícula hasta el tratamiento con 50 μ M de GSNO, siendo la concentración siguiente máxima usada (100 μ M de GSNO) perjudicial para la formación de la biopelícula. En el caso de la mutante, la concentración de 50 μ M de GSNO pudo revertir el fenotipo deficiente en la formación de biopelícula, alcanzando los valores de adherencia similares a los registrados por la cepa salvaje (Figura 7.2).

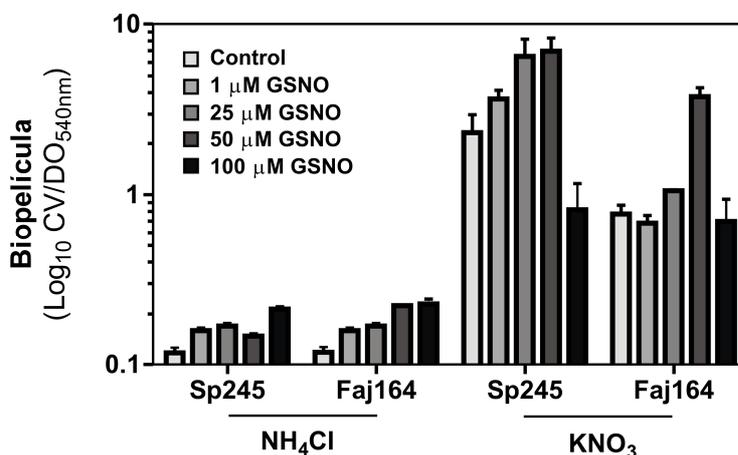


Fig. 7.2. Efecto del agregado exógeno del dador de NO GSNO sobre la formación de biopelícula. Cultivos estáticos de *Azospirillum* Sp245 y Faj164 creciendo en medio Nfb con fuente de nitrógeno amonio o nitrato, fueron tratados diariamente, por un período de 3 días, con diferentes concentraciones del dador de NO GSNO. Al tercer día de crecimiento, se determinó la formación de biopelícula por CV y crecimiento total por DO540nm. Se muestra un set de datos representativo de 2 ensayos independientes con 6 réplicas por cada condición. El eje Y se encuentra en escala logarítmica.

Además del rol del NO en la formación de biopelículas, se estudió qué vínculo podía tener esta molécula señal con el segundo mensajero diGMPc. Para tal fin se utilizaron las cepas de Sp245 y Faj164 transformadas con el vector pJB6.8 que contiene el gen *ChsA* y se analizó la formación de biopelículas. Este vector posee la secuencia completa de *ChsA*, que codifica una PDE, junto con su promotor natural, de modo que las cepas de Sp245 y Faj164 transformadas tienen un aumento en la dosis de este gen y el control de la expresión del mismo no es exógeno. En este caso se observó que

ambas cepas conteniendo el vector pJB6.8 experimentaron un aumento en la formación de las biopelículas respecto de sus controles transformados con el vector vacío (Figura 8.2 A). Sin embargo este aumento fue diferente entre ambas cepas, en donde Sp245 aumentó 0.58 veces respecto del valor control, mientras que la Faj164 lo hizo 2 veces (Figura 8.2 B). Estos resultados indicarían que el efecto del aumento de la dosis génica de *ChsA* incrementa la formación de biopelícula y que tiene un efecto mayor cuando el fondo genético es el de la mutante Nap.

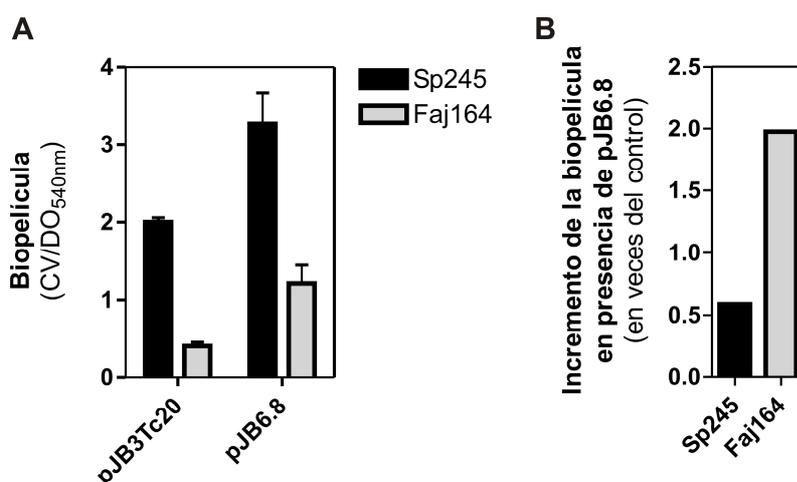


Fig. 8.2. **Efecto del aumento de la dosis génica de *ChsA* sobre la formación de biopelícula.** Cepas de Sp245 y Faj164 transformadas con el plásmido control pJB3Tc20 (vector vacío) o con pJB6.8, el cual contiene el gen *ChsA*, fueron cultivadas en condiciones estáticas por 3 días en placas de 24 pocillos. Se determinó formación de biopelícula por Cristal Violeta (CV) relativizando los valores al crecimiento (DO_{540nm}) (A) y se calculó a partir de los valores obtenidos el incremento respecto del control para ambas cepas (B). Los valores para A corresponden a la media con su desvío estándar de 3 experimentos independientes con 4 réplicas cada uno.

Otro de los mecanismos que se conoce regula el proceso de formación de biopelícula es la disponibilidad de nutrientes. De particular interés en esta tesis fue estudiar qué efectos podría tener la deficiencia de hierro sobre la formación de las biopelículas de *Azospirillum brasilense*. En la Figura 9.2 se puede observar que concentraciones de 3 μ M o ausencia de hierro, disminuyen marcadamente la formación de la biopelícula en la cepa salvaje Sp245, mientras que la condición de disponibilidad de 9 μ M de FeCl₃ no altera la formación de la biopelícula siendo similar al control (37 μ M FeCl₃). Para el caso de la cepa mutante, concentraciones de 9 μ M de

FeCl₃ elevaron la adherencia a casi el doble, aunque la concentración más baja (3 μM) o ausencia disminuyeron la biopelícula al nivel similar al del control.

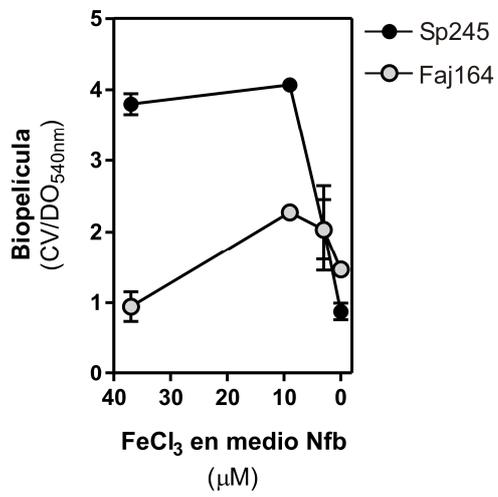


Fig. 9.2. **Formación de biopelícula en respuesta a la disponibilidad de hierro en *Azospirillum*.** Ambas cepas de *A. brasilense* Sp245 y su mutante Faj164 fueron cultivadas estáticamente en medio Nfb conteniendo nitrato como fuente de nitrógeno y diferentes concentraciones de FeCl₃. Las placas se incubaron por 3 días y se determinó biopelícula por cristal violeta. Se muestra un experimento representativo de 2 ensayos independientes con 3 réplicas cada uno.



DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

El objetivo general de este capítulo fue comprender algunos aspectos del proceso de formación de biopelículas en *Azospirillum brasilense* dada su potencial importancia en el establecimiento de la íntima interacción de la bacteria con la raíz, además de sumar nueva información de un aspecto poco estudiado hasta ahora en este microorganismo.

La primera observación realizada fue la existencia de diferencias en la adherencia del Rojo Congo y morfología de la colonia entre la cepa salvaje y su mutante isogénica. Al respecto, Wai *et al.* (1998) determinaron que colonias traslúcidas de *Vibrio cholerae* O1 cepa TSI-4 podían convertirse en rugosas frente a un hambreado de nutrientes. Este nuevo fenotipo presentaba mayor agregación celular y capacidad de formación de biopelícula. Por otro lado, mutantes en el gen *cheA1* y *cheY1* que forma parte de la ruta de señalización de quimiotaxis en *A. brasilense* Sp7, mostraron alteraciones en la producción de EPS. Estas mutaciones alteraron la adherencia de Rojo Congo, la morfología de las colonias y la formación de agregados celulares (Bible *et al.* 2008).

Además de la diferencia en la morfología de la colonia y adherencia de Rojo Congo observada en la cepa mutante respecto de la salvaje, la formación de agregados celulares entre ambas cepas también fue diferente y, como se mencionó, este fenotipo también indica una posible modificación de los EPS. Burdman *et al.* (1998, 2000) mostraron que modificaciones de la relación C/N en los medios de cultivo de *A. brasilense* llevaba a un aumento en el contenido de arabinosa en la composición de la pared celular de la bacteria y esto conducía finalmente a la formación de mayor cantidad de agregados celulares. La posible participación de una Nap activa y/o del NO en la regulación de la composición de la pared celular es un aspecto muy interesante a investigar a futuro.

Respecto de la formación de biopelículas en *A. brasilense*, en primera instancia se pudo observar que bajo las condiciones experimentales utilizadas en esta tesis, la formación de biopelículas es mayor cuando la fuente de nitrógeno es nitrato, mientras que en amonio es menor. Resultados similares fueron obtenidos paralelamente a la realización de esta tesis por Siuti *et al.* (2011) quienes reportaron que en la cepa de *A. brasilense* Sp7 la mayor formación de biopelículas se observa cuando la fuente de nitrógeno es nitrato, en contrapartida con amonio o nitrógeno gaseoso molecular. Por

otro lado, el crecimiento también se ve marcadamente afectado por el tipo de fuente de nitrógeno utilizada, donde la utilización de amonio permite a la cepa salvaje alcanzar mayores densidades ópticas que en nitrato, donde rápidamente se detiene el crecimiento.

Desde el punto de vista metabólico, estas dos fuentes de nitrógeno difieren en algunos aspectos respecto de la utilización por la cepa salvaje. En primer lugar, el amonio puede ser transportado hacia el interior de la célula y metabolizado rápidamente por el sistema de asimilación de glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa (Hartmann y Zimmer 1994). Por otro lado, el amonio también podría ser metabolizado por la vía de nitrificación heterotrófica, de la cual solo se posee evidencia preliminar de su existencia en *Azospirillum* (Creus *et al.* 2005, Arruebarrena Di Palma 2008, Molina Favero *et al.* 2008). Aunque no dilucidado el mecanismo aún, sí es un hecho que *A. brasilense* Sp245 produce NO cuando la única fuente de nitrógeno disponible es amonio aunque en menor medida que cuando utiliza nitrato (Molina Favero *et al.* 2008). Por otro lado, cuando la única fuente es nitrato, la célula debe realizar al menos dos pasos metabólicos adicionales para poder incorporar esta forma de nitrógeno. Una vez que el nitrato es transportado al interior de la célula, en primer lugar éste debe ser reducido a nitrito para luego ser transformado en amonio, que ahora sí continúa la ruta de igual manera que se mencionó anteriormente (Hartmann y Zimmer 1994). Además, el nitrato puede ser reducido de manera desasimilatoria hasta NO por la vía de desnitrificación (Steenhoudt *et al.* 2000), lo que ocurre tanto en condiciones aeróbicas, como de baja aireación y/o microaerofilia cuando actúa como aceptor final de electrones. Es importante mencionar que la producción de NO en estas condiciones es aproximadamente 25 veces mayor que en amonio (Molina Favero *et al.* 2008).

Si bien esta diferencia en el metabolismo del nitrato podría ser responsable de las diferencias en el crecimiento con amonio o nitrato en la cepa salvaje, el hecho de que la mutante Faj164 (la cual asimila el nitrato de igual manera que la cepa salvaje, Steenhoudt *et al.* 2000) creciendo con nitrato como fuente de nitrógeno se comporte de manera muy similar en su crecimiento a la condición de amonio, hace pensar que estos pasos adicionales de reducción del nitrato para su conversión a amonio, no serían responsables de las diferencias observadas en la cepa salvaje. Sin embargo, la

presencia de una Nap funcional cuando la fuente de nitrógeno es nitrato parece tener un rol muy importante. En esta tesis no pudo establecerse si las diferencias observadas en el crecimiento son causadas por la presencia de una Nap funcional en sí misma, y/o por la producción de NO asociada. Asimismo, el rol propuesto para la Nap modulando el estado redox de las células, podría tener un importante desempeño en la regulación del crecimiento, dado el requerimiento de poder reductor para la síntesis de los componentes celulares y el control del balance redox para poder alcanzar este objetivo. Por otro lado, si bien no hay estudios en bacterias sobre la existencia de regulación por NO de las diferentes etapas del crecimiento, en vertebrados (Villalobo 2006) y plantas (Correa-Aragunde *et al.* 2006) es conocida la regulación del ciclo celular por NO.

El rol de Nap/NO en la formación de biopelícula queda claramente expuesto cuando se analizan conjuntamente los resultados de crecimiento y formación de biopelícula. La cepa salvaje rápidamente detiene su crecimiento y comienza a adherirse a la superficie, mientras que la mutante continúa creciendo y su adherencia se muestra más lenta. Este resultado da cuenta de que Nap/NO dispara alguna señal que indica al microorganismo que las condiciones están dadas para formar la biopelícula.

Al igual que en otros microorganismos, el NO parece tener un rol en la regulación de la formación de biopelícula. Como se mencionó anteriormente, los efectos del NO pueden ser promotores de la formación de la biopelícula o llevar a que ésta se desensamble, dependiendo de la especie y/o condición de crecimiento. En el caso de *A. brasilense* Sp245, pudimos demostrar que el NO participa en el proceso de formación de la biopelícula, dado que la mutante Faj164 no forma la misma cantidad de biopelícula que la cepa Sp245 y que suplementando estas biopelículas con NO exógeno se restaura el fenotipo salvaje. De igual manera, la capacidad de formación de biopelícula en medios conteniendo amonio o nitrato coincide con la presencia de muy bajas o altas cantidades de NO, respectivamente.

Por otra parte, por lo general se considera establecido que un aumento en el nivel intracelular de diGMPc suprime la movilidad aumentando la formación de biopelículas en los microorganismos, mientras que por el contrario, un descenso en su concentración conlleva a que se desensamble la misma (Hengge 2009). Sin embargo,

se ha mostrado que este paradigma puede resultar una sobre simplificación de las vías de transducción de señales que disparan variaciones en la concentración de diGMPc. Un ejemplo de ello, es demostrado por Russell *et al.* (2013) en *A. brasilense* Sp7, que si bien cumple este paradigma ya que el aumento persistente de diGMPc lleva a la pérdida de movilidad y formación de agregados y biopelículas, un pico temporal elevado de este segundo mensajero promueve el aumento en la movilidad permitiendo que la bacteria se desplace a zonas de menor tensión de oxígeno.

En esta tesis se observó que tanto en la cepa salvaje como en la mutante *nap⁻* la presencia de una dosis génica mayor de *ChsA*, con probada capacidad FDE (Moreno Villegas 2012) aumentó la biopelícula, indicando que un posible descenso en la concentración de diGMPc llevaría a un aumento de la formación de biopelícula, resultado contrario a la noción de diGMPc como inductor de biopelícula. Sin embargo, este incremento en la formación de biopelícula no fue igual para ambas cepas de *Azospirillum*, en donde la cepa mutante aumentó 4 veces más que la salvaje respecto de sus controles. La diferencia entre Sp245 y Faj164 en su capacidad de formar NO parece relacionarse con la dosis génica de *ChsA* presente indicando que la función Nap y por ende el contenido de NO influye en la respuesta de la biopelícula a la disminución de diGMPc. Dado que la proteína ChsA posee un dominio PAS, que se conoce podría interactuar con NO (Barraud *et al.* 2009, Rao *et al.* 2011), éste podría estar modulando la actividad PDE del dominio EAL de ChsA llevando a alterar el contenido intracelular de diGMPc y finalmente modificando la formación de la biopelícula. Por lo tanto el efecto de aumentar la dosis génica de una FDE (en este caso ChsA) es diferente en fondos genéticos con diferentes niveles de NO. Finalmente, se podría hipotetizar que el NO que interacciona con el dominio PAS de la ChsA estaría incrementando su actividad con lo que disminuirían los niveles de diGMPc lo cual conllevaría en este sistema experimental y en estas condiciones de cultivo a aumentar la biopelícula. Esto deberá comprobarse midiendo efectivamente el contenido de diGMPc en ambas cepas.

Por otro lado, ChsA no es la única proteína que posee un dominio que posiblemente esté sensando al NO. En el genoma de *Azospirillum* existen numerosos dominios PAS asociados tanto a dominios GGDEF como a EAL (análisis de la base CDD y BLAST, datos no mostrados) los cuales podrían estar estableciendo el vínculo entre

ambas señales de modo de regular la formación de biopelícula. Las evidencias de esta intrincada red de regulación por diGMPc en bacterias han sido extensamente revisadas por Boyd y O'Toole (2012).

Finalmente, como ocurre en otros microorganismos, se pudo observar que variaciones en la disponibilidad de hierro afectan la biopelícula. Dependiendo del microorganismo en estudio, los efectos de esta deficiencia pueden variar considerablemente (Karatan y Watnick 2009). En algunos casos como el de *P. aeruginosa*, limitaciones en la disponibilidad de hierro afectan negativamente la formación de la biopelícula (Banin *et al.* 2005). Por otro lado, tanto *Actinomyces naeslundii* (Moelling *et al.* 2007) como *Staphylococcus epidermidis* (Deighton y Borland 1993) aumentan la formación de biopelícula frente a la deficiencia de este metal. Particularmente para *A. brasilense* Sp245, concentraciones de 3 μ M o ausencia de hierro disminuyeron considerablemente la biopelícula. Resulta interesante notar que los efectos de la deficiencia de hierro sobre la biopelícula coinciden con los efectos de la deficiencia de este metal en la formación de nitrito por la Nap (véase Capítulo 1, Figura 9.1), indicando que el efecto de la deficiencia de hierro sobre la biopelícula de *Azospirillum* se debe a una baja o nula actividad de la Nap, por lo que la concentración de NO baja conllevaría, como se mostró en este capítulo, a una menor formación de biopelícula.

En resumen, los resultados presentados en este capítulo permiten establecer que el NO producido por el metabolismo desasimilatorio del nitrato, tiene un rol clave en la formación de biopelícula en *Azospirillum*. Además, se ha podido mostrar evidencia preliminar de su interacción en la regulación de la biopelícula de *Azospirillum* con el segundo mensajero diGMPc y su participación en los efectos de la deficiencia de hierro sobre la formación de la biopelícula.

Referencias

- Arruebarrena Di Palma. 2008. Producción de óxido nítrico por nitrificación heterotrófica en *Azospirillum*. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN), Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP).
- Baldani VLD, Alvarez UAB, Baldani JI, Döbereiner J. 1986. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant Soil* 90:35–46.
- Barraud N, Schleheck D, Klebensberger J, Webb JS, Hassett DJ, Rice SA, Kjelleberg S. 2009. Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *Journal of Bacteriology* 191: 7333–7342.
- Bashan Y, Holgin G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology* 43: 103-121.
- Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Canadian Journal of Microbiology* 50: 521–577.
- Bible AN, Stephens BB, Ortega DR, Xie Z, Alexandre G. 2008. Function of a chemotaxis-like signal transduction pathway in modulating motility, cell clumping, and cell length in the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology* 190:6365–6375.
- Blantny JM, Brautaset T, Winter-Larsen CH, Haugan K, Valla S. 1997. Construction and use of a versatile set broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Applied and Environmental Microbiology* 63:370–379.
- Bloemberg GV, Wijfjes AHM, Lamers GEM, Stuurman N, Lugtenberg BJJ. 2000. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. *Molecular Plant Microbe Interaction* 13:1170-1176.
- Boyd CD, O'Toole GA. 2012. Second messenger regulation of biofilm formation: breakthroughs in understanding c-di-GMP effector systems. *Annual Review in Cell Development and Biology* 28:439–462.
- Burdman S, Jurkevitch E, Schwartsburd B, Hampel M, Okon Y. 1998. Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. *Microbiology* 144:1989–1999.
- Burdman S, Jurkevitch E, Soria-Diaz ME, Gil Serrano AM, Okon Y. 2000. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. *FEMS Microbiology Letters* 189:259-264.
- Carlson HK, Vance RE, Marletta MA. 2010. H-NOX regulation of c-di-GMP metabolism and biofilm formation in *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology* 77:930–942.
- Carreño-López R, Campos-Reales N, Elmerich C, Baca BE. 2000. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Molecular Genetics and Genomics* 264:521–530.
- Chen JM, German GJ, Alexander DC, Ren H, Tan T, Liu J. 2006. Roles of Lsr2 in colony morphology and biofilm formation of *Mycobacterium smegmatis* *Journal of Bacteriology* 188: 633–641.
- Correa-Aragunde N, Graziano M, Chevalier C, Lamattina L. 2006. Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *Journal of Experimental Botany* 57:581-588.
- Creus CM, Graziano M, Casanovas EM, Pereyra MA, Simontacchi M, Puntarulo S, Barassi CA, Lamattina L. 2005. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta* 221:297-303.
- D'Argenio DA, Miller SI. 2004. Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology* 150: 2497–2502.
- Danhorn T, Fuqua C. 2007. Biofilm formation by plant associated bacteria. *Annual Review in Microbiology* 61: 401–422.
- Deighton M, Borland R. 1993. Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. *Infection and Immunity* 61:4473-4479.

- Dobereiner J, Day L .1976. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganism and dinitrogen fixing sites *in* Proc 1st Int Symp N₂ Fixation (Newton WE & Nyman CJ, eds), pp. 518–538. Washington State University Press, Pullman, WA.
- Friedman AM, Long SR, Brown SE, Buikema WJ, Ausubel FM. 1982. Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* 18:289–296.
- Hart TW .1985. Some observations concerning the S-nitroso and S-phenylsulphonyl derivates of L-cysteine and glutathione. *Tetrahedron Letters* 26:2013–2016.
- Hartmann A, Zimmer W. 1994. Physiology of *Azospirillum* *en* *Azospirillum*/Plant association (Y Okon ed). CRC press, Boca Raton. Pages 15-39.
- Hengge R. 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 7:263-273.
- Henry JT, Crosson S. 2011. Ligand binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annual Review in Microbiology* 65:261-286.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Karatan E, Watnick P. 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73:310-347.
- Kirisits MJ, Prost L, Starkey M, Parsek MR. 2005. Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 71:4809-21.
- Liu N, Xu Y, Hossain S, Huang N, Coursolle D, Gralnick JA, Boon EM. 2012. Nitric oxide regulation of cyclic di-GMP synthesis and hydrolysis in *Shewanella woody*. *Biochemistry* 51:2087-2099.
- McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S. 2012. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology* 10:35-50.
- Moelling C, Oberschlacke R, Ward P, Karijolic J, Borisova K, Bjelos N, Bergeron L. 2007. Metal-dependent repression of siderophore and biofilm formation in *Actinomyces naeslundii*. *FEMS Microbiology Letters* 275:214-20.
- Molina-Favero C, Creus CM, Simontacchi M, Puntarolo S, Lamattina L. 2008. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 21:1001–1009.
- Moreno Ramirez L. 2011. Participación de la fosfodiesterasa (chsA), diguanilato ciclasa (dgc) y nitrato reductasa periplásmica (NapA) en la formación de biopelícula de *Azospirillum brasilense*. Tesis de Maestría, Benemerita Universidad Autónoma de Puebla.
- Moreno Villegas J. 2012. Purificación y caracterización cinética de la proteína ChsA de *Azospirillum brasilense*. Tesis de Maestría. Benemerita Universidad Autónoma de Puebla.
- Mur LAJ, Mandon J, Cristescu SM, Harren FJM, Prats E. 2011. Methods of nitric oxide detection in plants: a commentary. *Plant Science* 181: 509–519.
- O’Toole GA, Kolter R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways a genetic approach. *Molecular Microbiology* 28: 449–461
- O’Toole G, Kaplan HB, Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology* 54: 49-79.
- Plate L, Marletta MA. 2012. Nitric oxide modulates bacterial biofilm formation through a multicomponent cyclic-di-GMP signaling network. *Cell* 46:449-460.
- Plate L, Marletta MA. 2013. Nitric oxide-sensing H-NOX proteins govern bacterial communal behavior. *Trends in Biochemical Sciences* 38:566–575 .
- Ramey BE, Koutsoudis M, von Bodman SB, Fuqua C. 2004. Biofilm formation in plant-microbe associations. *Current Opinion on Microbiology* 7: 602–609.
- Rao F, Ji Q, Soehano I, Liang Z. 2011. Unusual heme-binding PAS domain from YybT family proteins. *Journal of Bacteriology* 193:1543-1551.
- Rodríguez Cáceres EA. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied Environmental Microbiology* 44: 990–991.
- Russell MH, Bible AN, Fang X, Gooding JR, Campagna SR, Gomelsky M, Alexandre G. 2013. Integration of the second messenger c-di-GMP into the chemotactic signaling pathway. *mBio* 4:e00001-13.

- Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, Dow JM. 2006. Cyclic diGMP signaling in bacteria: recent advances and new puzzles. *Journal of Bacteriology* 188:8327-8334.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Siuti P, Green C, Edwards AN, Doktycz MJ, Alexandre G. 2011. The chemotaxis-like Che1 pathway has an indirect role in adhesive cell properties of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters* 323: 105–112.
- Steenhoudt O, Keijers V, Okon Y, Vanderleyden J. 2001. Identification and characterization of a periplasmic nitrate reductase in *Azospirillum brasilense* Sp245. *Archives in Microbiology* 175:344–352.
- Villalobo A. 2006. Nitric oxide and cell proliferation. *FEBS Journal* 273:2329–2344.
- Wai SN, Mizunoe Y, Takade A, Kawabata S, Yoshida S. 1998. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* 64:648-3655.



**CONCLUSIONES GENERALES Y
PERSPECTIVAS**

En esta tesis se muestra evidencia del rol dual de la nitrato reductasa periplásmica de *Azospirillum brasilense* Sp245 como productora de la molécula señal NO y de su participación en la disipación del exceso de poder reductor en la célula, procesos que regulan el metabolismo del hierro y la formación de biopelículas.

Teniendo en cuenta la hipótesis general planteada, se puede concluir que ésta no es rechazada dado que para la regulación de uno de los mecanismos de adquisición de hierro, como es la producción de sideróforos, el NO endógeno resultó ser importante mostrando que su ausencia reducía la producción de estas moléculas, mientras que por otro lado las evidencias obtenidas indican que el NO participa de la regulación de la formación de biopelícula. Asimismo la ausencia de una Nap funcional se pudo correlacionar con la modificación de los niveles de PHB, indicando un desbalance redox, el cual finalmente afecta globalmente el metabolismo del hierro en *Azospirillum*.

Metabolismo del hierro y NO/Nap

Como fue mostrado por Molina Favero *et al.* (2008), la utilización de nitrato o amonio en los medios de cultivo de *A. brasilense* Sp245 conlleva a una producción de NO diferente. La vía de desnitrificación, la cual reduce el nitrato secuencialmente hasta NO, produce mayor cantidad de esta molécula señal (aproximadamente 25 veces más) que cuando la bacteria utiliza amonio. Teniendo en cuenta esto se determinó la producción de sideróforos en éstas condiciones, además de combinarlo con dos fuentes de carbono diferentes utilizadas comúnmente en la formulación de medios de cultivo de *Azospirillum*. La hipótesis particular N°1 que planteaba que tanto la fuente de carbono como la de nitrógeno modifican la síntesis de sideróforos en *A. brasilense* no se rechaza. Asimismo, se pudo constatar que la producción de nitrito a través de la actividad de la Nap también fue modificada por la fuente de carbono presente en el medio de cultivo.

La hipótesis N°2 que planteaba que *A. brasilense* Sp245 posee actividad Fe^{3+} -reductasa periplásmica y/o de membrana no se rechaza. La evidencia obtenida

permite concluir que efectivamente *A. brasilense* posee esta actividad y que posee al menos un ORF que codificaría para una Fe³⁺-reductasa putativa, la cual muestra dominios y estructura terciaria similares a otras Fe³⁺-reductasas caracterizadas (Roman *et al.* 1993). Si bien con la evidencia obtenida no se puede determinar si la actividad observada es producto de la presencia de una Fe³⁺-reductasa periplásmica o de membrana, estos resultados constituyen el primer reporte de esta actividad en *A. brasilense* Sp245.

Como se mencionó en la introducción del Capítulo 1, en otros sistemas biológicos donde se ha estudiado el rol del NO en el metabolismo del hierro, y especialmente en la deficiencia de este metal, se ha observado que ante una biodisponibilidad limitada de hierro los organismos responden aumentando la concentración de NO (Graziano y Lamattina 2005, Richardson y Lok 2008). Esta hipótesis también fue planteada para *A. brasilense* (hipótesis N°3), siendo sin embargo rechazada, dado que al menos hasta 10 µM de FeCl₃ en el medio de cultivo la producción de nitrito (el cual puede ser utilizado como estimador de la concentración de NO) se mantuvo relativamente constante, disminuyendo luego conforme el hierro era reducido hasta la ausencia total en el medio de cultivo.

Cuando se utilizó la cepa Faj164 para evaluar la respuesta de genes vinculados al metabolismo de hierro, se pudo observar que la expresión de los mismos estaba alterada. La hipótesis particular planteada para este caso (hipótesis N°4) fue que la mutante de *A. brasilense* Faj164, nitrato reductasa periplásmica nula, no responde aumentando la expresión de genes relacionados al metabolismo del hierro frente a una deficiencia de este metal. Esta hipótesis es rechazada dadas las evidencias en donde se puede observar que la desregulación de la expresión de los genes vinculados al metabolismo del hierro se da en suficiencia o moderada deficiencia del mismo (37 µM o 9 µM) y no en deficiencia severa o total. Cuando la concentración de hierro fue tan baja que la actividad Nap estaba afectada negativamente y la producción de nitrito estaba reducida, la expresión de los genes analizados fue similar en ambas cepas.

Si bien el NO no aumentó como respuesta a una deficiencia de hierro, el tratamiento con el secuestrante de NO cPTIO mostró que la presencia de NO endógeno en condiciones limitadas de hierro (10 µM FeCl₃, concentraciones presente

en las placas de agar CAS) es necesaria para la máxima producción de sideróforos. Por otro lado, el tratamiento con dadores de esta molécula señal no pudo revertir el fenotipo observado (menor producción de sideróforos) de la cepa mutante Faj164. Si bien se discutió este último aspecto en el Capítulo 1, la hipótesis particular planteada N°5 se rechaza en forma parcial. El agregado de los dadores de NO en búsqueda de revertir el fenotipo de la cepa mutante es un aspecto a optimizar para una interpretación más acabada del proceso.

Como se ha observado en otros microorganismos, la presencia de la Nap funcional les permite la regulación de su estado redox, dado el rol de esta enzima en la disipación de poder reductor en exceso (Sparacino-Watkins *et al.* 2014). Una de las respuestas de *Azospirillum* a un exceso de poder reductor consiste en sintetizar PHB, el cual requiere gran cantidad de poder reductor para su síntesis (Zimmer *et al.* 1984). Si bien la relación precisa entre la actividad Nap como disipadora de poder reductor y la síntesis de sideróforos es desconocida, la evidencia reportada para *Magnetospirillum gryphiswaldense*, bacteria con un preciso y regulado control del metabolismo del hierro, muestra que una Nap activa es necesaria para una correcta incorporación de hierro a los cristales de magnetita (Li *et al.* 2012). Teniendo en cuenta esta evidencia, se estudió en *A. brasilense* si existía una correlación entre la presencia de PHB y el metabolismo del hierro (hipótesis N°6). Los resultados muestran que la ausencia de la Nap funcional en la cepa Faj164 generó que ésta presente mayor contenido de PHB en las concentraciones de hierro más altas utilizadas (37 μM y 9 μM), correlacionado esto con las observaciones donde tanto la actividad Fe^{3+} -reductasa, expresión de genes y síntesis de sideróforos están alterados. Por otro lado, el tratamiento con equivalentes de reducción mostró una alteración de la síntesis de sideróforos, reforzando la hipótesis de que el rol de disipación de poder reductor de la Nap se relaciona con la síntesis de sideróforos. De esta manera la hipótesis particular N°6 no se rechaza.

Formación de biopelículas y NO

Para el caso particular de la relación del NO con la formación de biopelícula, existe en la bibliografía mayor cantidad de información acerca de los mecanismos que operan en diferentes microorganismos estudiados (ver Introducción Capítulo 2).

Nuevamente, teniendo en cuenta la producción diferencial de NO cuando *A. brasilense* utiliza amonio o nitrato, se estudió la formación de biopelícula en estas dos condiciones de crecimiento. La hipótesis desprendida de este antecedente fue que la producción de biopelícula sería mayor en nitrato, donde la producción de NO era mayor que en amonio (hipótesis N°7). Estos resultados conducirían a no rechazar esta hipótesis. Sin embargo no se puede descartar que la actividad Nap, como disipadora de poder reductor, no sea también responsable de los resultados observados.

Asimismo, la ausencia de una Nap funcional en la cepa Faj164, y por lo tanto de menores concentraciones de NO y/o menor capacidad de controlar el balance redox de la célula, llevaron no solo a alterar la formación de biopelículas sino también a la modificación de la morfología de la colonia en placa y la formación de agregados celulares, no rechazando la hipótesis N°8 planteada. Estos tres aspectos en conjunto llevarían a hipotetizar que la composición de los EPS de la pared celular de *A. brasilense* salvaje y mutante son diferentes, explicando los resultados en esta tesis presentados. Este aspecto deberá ser debidamente analizado caracterizando la composición de la pared celular a fin de confirmar esta presunción.

Para establecer si el NO está involucrado directamente con la deficiente formación de biopelícula en la cepa mutante Faj164, se trataron los cultivos con el dador de NO GSNO, pudiendo restaurar el fenotipo salvaje. De esta manera, parte de la hipótesis particular N°9 planteada para este punto no es rechazada. Sin embargo, los intentos de una complementación a través de la incorporación de un plásmido conteniendo el operón *Nap*, resultado que reforzaría el rol de la Nap y complementaría el enfoque farmacológico, fueron infructuosos. Al menos este aspecto queda abierto a mejoras, de modo de obtener una cepa complementada correctamente que permita amalgamar el rol del NO/Nap en la formación de biopelículas.

Por otro lado, la molécula señal diGMPC está íntimamente involucrada en la regulación de la formación de biopelículas y en línea con esta evidencia previa fue que se planteó la hipótesis N°10 que indica que un aumento de la dosis génica del gen *ChsA*, el cual codifica para una fosfodiesterasa que degrada el diGMPC, en el fondo genético de la cepa salvaje que produce NO, disminuye la producción de biopelícula. Esta hipótesis se rechaza en función de los resultados, dado que por el contrario, la formación de biopelícula se incrementó considerablemente cuando se aumentó la dosis génica de *ChsA*. Además, en el fondo genético de la cepa Faj164, este aumento fue mayor indicando que la interacción entre el diGMPC y el NO podría ser antagónica.

Finalmente, la formación de biopelículas es afectada por una gran cantidad de factores externos (Karatan y Watnick 2009). Uno de sumo interés para esta tesis en particular es la disponibilidad de hierro. Los efectos de la deficiencia de hierro sobre la formación de biopelículas en otros microorganismos dependen de la especie estudiada, afectando positivamente en algunos casos y negativamente en otros. Para el caso particular de *A. brasilense*, un descenso de la concentración de hierro en el medio de cultivo llevó a que la biopelícula formada fuera menor, por lo que la hipótesis N°11 no se rechaza. Asimismo, se mostró que conforme el hierro es depletado del medio de cultivo, la formación de nitrito (sustrato para la formación de NO) también decae. Esto último está en línea con la evidencia mostrada en el Capítulo 2, donde se observa que una menor cantidad de NO, como presenta la cepa Faj164, genera una menor formación de biopelícula.

Perspectivas

La información generada en esta tesis acerca de los mecanismos de adquisición de hierro y formación de biopelícula, y analizada en el contexto de *Azospirillum* y de la interacción con las raíces, permite inferir la importancia de los mismos. Para ambos mecanismos, la presencia de una u otra fuente de nitrógeno (amonio o nitrato) modifica sustancialmente la fisiología de la bacteria y, claramente, la actividad de la Nap. En los suelos pueden encontrarse ambas fuentes de nitrógeno (Bloom *et al.* 2003). Sin embargo, cuando se analizan las aplicaciones de *Azospirillum* como

inoculante bacteriano de cultivos, también se debe tener presente que muchas veces (si no todas), la inoculación está acompañada de la fertilización nitrogenada química, aunque las experiencias a campo indican que se pueden tratar los cultivos con menor cantidad de fertilizante cuando se inocula con *Azospirillum* (Fages 1994, Okon y Labandera-Gonzalez 1994). En este sentido, la fertilización nitrogenada (con amonio, nitrato o urea como fuente de N), en conjunto con la práctica de inoculación, deberá tenerse en cuenta dado que esta bacteria en particular puede modular diferencialmente algunos de los mecanismos de promoción del crecimiento que posee en función de la fuente de nitrógeno disponible.

En particular, respecto del metabolismo del hierro, ya se ha demostrado al menos en una especie vegetal, que la producción de sideróforos por *Azospirillum* tiene un rol en la promoción del crecimiento, actuando como biocontrolador (Tortora *et al.* 2011). Por otro lado, no se puede descartar que la producción y liberación de sideróforos en la rizósfera no solo sea beneficioso para la nutrición de la bacteria sino también para la planta. Además, la actividad Fe^{3+} -reductasa, posiblemente de membrana, de *A. brasilense* transformaría la forma insoluble del hierro Fe^{3+} a Fe^{2+} el cual podría ingresar directamente por transportadores dentro de la células de la raíz.

Por otro lado, para una óptima promoción del crecimiento de la planta por las PGPR es necesaria una buena colonización de la raíz y la formación de la biopelícula es crucial (Danhorn y Fuqua 2007). Podemos inferir de los resultados obtenidos en esta tesis que, nuevamente, la fuente de nitrógeno utilizada o predominante en el suelo puede afectar la capacidad de formación de biopelícula de *Azospirillum*, pudiendo afectar en última instancia la colonización y por lo tanto la promoción del crecimiento.

Por otro lado, desde un punto de vista tecnológico para la formulación de inoculantes comerciales, las influencias de las fuentes de nitrógeno y carbono utilizadas no deben ser obviadas. A la hora de generar los cultivos en masa para la formulación, utilizar una u otra fuente de nitrógeno o carbono lleva a modificar la síntesis de moléculas bioactivas (como los sideróforos y el NO) y la fisiología de la bacteria (modificación de la actividad Fe^{3+} -reductasa y de la formación de biopelícula). Estos factores pueden ser utilizados para ofrecer un producto que contenga moléculas

bioactivas promotoras del crecimiento que actuarían en los primeros momentos de la inoculación, hasta que los microorganismos fisiológicamente optimizados establezcan la colonización y formación de biopelícula sobre la raíz. Un planteo similar fue realizado por Perrig *et al.* (2007) para la producción de fitohormonas y poliaminas en las cepas de uso agronómico de *A. brasilense* Cd y Az39.

Por último, si bien el potencial de los resultados mostrados en esta tesis fue expuesto anteriormente, las evidencias obtenidas deberán ser contrastadas analizando qué ocurre en la interacción con la planta para establecer realmente en qué medida estos mecanismos descritos participan en el resultado final de la promoción del crecimiento vegetal. El entendimiento de cada uno de los factores que modifican la relación de *Azospirillum* con la planta permitirá contar con herramientas biotecnológicas para mejorar la interacción generando que ésta sea óptima a fin de obtener los mejores beneficios.

Referencias

- Bloom AJ, Meyerhoff PA, Taylor AR, Rost TL. 2003. Root development and absorption of ammonium and nitrate from the rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation* 21:416–431.
- D'Argenio DA, Miller SI. 2004. Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology* 150: 2497–2502.
- Danhorn T, Fuqua C. 2007. Biofilm formation by plant associated bacteria. *Annual Review in Microbiology* 61: 401–422.
- Fages J. 1994. *Azospirillum* inoculants and field experiments, in *Azospirillum/plant associations*. Okon Y ed. 87-110. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Graziano M, Lamattina L. 2007. Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots. *The Plant Journal* 52:949-60.
- Karatan E, Watnick P. 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73:310-347.
- Li Y, Katzmann E, Borg S, Schüller D. 2012. The periplasmic nitrate reductase Nap is required for anaerobic growth and involved in redox control of magnetite biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Journal of bacteriology* 194:4847-4856.
- Molina-Favero C, Creus CM, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L. 2008. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 21: 1001–1009.
- Okon Y, Labandera-Gonzalez CA. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry* 26:1591-1601.
- Perrig D, Boiero ML, Masciarelli OA, Penna C, Ruiz OA, Cassán FD, Luna MV. 2007. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75:1143-1150.
- Richardson DR, Lok HC. 2008. The nitric oxide–iron interplay in mammalian cells: Transport and storage of dinitrosyl iron complexes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780:638-651.
- Roman DG, Dancis A, Anderson GJ, Klausner RD. 1993. The fission yeast ferric reductase gene *frp1+* is required for ferric iron uptake and encodes a protein that is homologous to the gp91-phox subunit of the human NADPH phagocyte oxidoreductase. *Molecular and Cellular Biology* 13:4342-4350.
- Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, Dow JM. 2006. Cyclic diGMP signaling in bacteria: recent advances and new puzzles. *Journal of Bacteriology* 188:8327-8334.
- Sparacino-Watkins C, Stolz JF, Basu P. 2014. Nitrate and periplasmic nitrate reductases. *Chemical Society Reviews* 43:676-706.
- Tortora ML, Diaz-Ricci JC, Pedraza RO. 2011. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives in Microbiology* 193:275–286.
- Zimmer W, Pentado Stephan M, Bothe H. 1984. Denitrification by *Azospirillum* Sp7. I. Growth with nitrite as respiratory electron acceptor. *Archives in Microbiology* 138:206-211.

Anexos.

ANEXO 1. *Extracción de RNA de Azospirillum brasilense por método Trizol.*

1. Cosechar 1 ml de un cultivo de DO_{540nm} cercana a 1 a 8000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Lavar el pellet con buffer TES (This-HCl 50 mM pH 8, EDTA 0.2 mM, NaCl 300 mM).
3. Centrifugar nuevamente 8000 rpm 5 minutos y resuspender el pellet en buffer TES y Lisozima 1mg/ml preparada en el momento. Incubar 10 minutos a 37°C.
4. Centrifugar las muestras 8000 rpm 5 minutos y resuspender el pellet en 1 ml de Trizol (Sigma).
5. Vortexar durante 2 minutos e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
6. Agregar 200 µl de cloroformo, vortexear por 15 segundos y dejar reposar sobre mesada 5 minutos.
7. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos en frio y traspasar la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo conteniendo 0.5 ml de isopropanol.
8. Mezclar por inversión algunas veces e incubar en la mesada por 10 minutos.
9. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos en frio. Notar la formación de un precipitado blanco. Descartar el sobrenadante.
10. Lavar el pellet con 1 ml de etanol 75% preparado con agua DEPC⁽¹⁾. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos en frio.
11. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet boca abajo en mesada o flujo laminar.
12. Resuspender el pellet de RNA en 30 µl de agua DEPC. Cuantificar A_{260nm} y sembrar en geles de agarosa 1% para chequear calidad del RNA.

⁽¹⁾1 ml de DEPC por litro de agua, incubado toda una noche a 30°C

ANEXO 2. *Síntesis de ADN copia.*

- 1- Colocar 1 µl de Random primers (0.5 µg/µl) y 1 µl dNTPs 10 mM. Agregar 11,5 µl de ARN extraído o equivalente a 2 µg totales.
- 2- Incubar a 65 °C durante 10 minutos. Pasar luego rápidamente las muestras a hielo.
- 3- Hacer una premix conteniendo por reacción: 1 µl buffer RT 5X, 2 µl DTT 10 mM, 0.5 µl enzima MMV 200 U/µl. Mezclar con vortex y centrifugar brevemente.
- 4- Colocar 7 µl de esta premix en los tubos conteniendo el ARN. Mezclar.
- 5- Llevar a 37°C por 75 minutos y luego inactivar la enzima a 70°C 15 minutos.

ANEXO 3. *Reacción de RT-PCR genes vinculados al metabolismo del hierro.*

Los primers utilizados para la RT-PCR fueron los siguientes:

1. *Fw-16S*: AGGCTTGACTTCCGGAGAGG

2. *Rv-16S*: TGGTAAGGTTCTGCGCGTTG
3. *Fw-fur*: ATGAAGAGGCGTCCACCGAC
4. *Rv-fur*: TCGAGAGACACGCCGTCGAG
5. *Fw-FhuE*: AGCTACAGCAAACGGTCGGAG
6. *Rv-FhuE*: ACGTAGGTCATCATCCGCTGG
7. *Fw-AzFrp*: CTCACGATGTTATGGCTTGC
8. *Rv-AzFrp*: GTGGAAAACCAGCACGAGAT

Por reacción de PCR de 10 µl contenía:

1. ADNc	segun corresponda ⁽¹⁾
2. Buffer 10X	1 µl
3. Cl ₂ Mg 50 mM	1 µl
4. dNTPs 1,25 mM	1,6 µl
5. Primer Fw 25 µM	1 µl
6. Primer Rv 25 µM	1 µl
7. DMSO	0,25 µl
8. Taq invitrogen	0,06 µl
9. Agua	hasta completar volumen
<hr/>	
Total	10 µl

⁽¹⁾Dado que se estaba realizando RT-PCR el contenido de templado de cada reacción de PCR se ajusto en función de la abundancia del ADNc 16S para cada muestra.

El programa consistió en:

1. 3 minutos 95°C
2. 30 segundos 95°C
3. 30 segundos 60°C (*16S*), 64°C (*fur*, *fhuE*, *AzFrp*)
4. 1 minuto 72°C
5. 5 minutos 72°C

El paso 2 a 4 fue repetido 18 ciclos para el *16S* y 40 ciclos para *fur*, *fhuE*, *AzFrp*.

ANEXO 4. Transformación por choque térmico de *E. coli*.

1. Colocar de 1 µl a 5 µl de plásmido en 100 µl de células competentes.
2. Incubar en hielo por 5 minutos.
3. Transferir a 42°C por 1 minuto.
4. Colocar en hielo por 5 minutos.
5. Transferir la totalidad de las células a 2.5 ml de LB sin antibiótico e incubar a 37°C por una hora a 200 rpm.
6. Sembrar 50 µl, 100 µl, 200 µl y un concentrado de 1 ml en placas LB con el antibiótico de selección.
7. Incubar por un día a 37°C.

ANEXO 5. Cepas y plásmidos utilizados.

Cepa o plasmido	características relevantes	referencia o fuente
Cepas		
Sp245	cepa salvaje de <i>A. brasilense</i>	Baldani <i>et al.</i> 1986
F164	derivada de Sp245, <i>NapA::Kan</i> , <i>Kan^R</i> .	Steenhoudt <i>et al.</i> 2001
Sp245 pJB3Tc20	<i>Tc^R</i> , control con plásmido vacío	Moreno Ramirez 2011/este estudio
F164 pJB3Tc20	<i>NapA::Kan</i> , <i>Kan^R</i> , <i>Tc^R</i> , control con plasmido vacío	Moreno Ramirez 2011/este estudio
Sp245 pJB6.8	<i>Tc^R</i> , <i>ChsA</i> multicopia	Moreno Ramirez 2011/este estudio
F164 pJB6.8	<i>NapA::Kan</i> , <i>Kan^R</i> , <i>Tc^R</i> , <i>ChsA</i> multicopia	Moreno Ramirez 2011/este estudio
Sp245 pMP2444	<i>Gm^R</i> , expresión constitutiva de la <i>eGFP</i>	Moreno Ramirez 2011/este estudio
F164 pMP2444	<i>NapA::Kan</i> , <i>Kan^R</i> , <i>Gm^R</i> , expresión constitutiva de la <i>eGFP</i>	Moreno Ramirez 2011/este estudio
Sp245 pNapO	cepa derivada de Sp245 transformada con el vector pNapO	esta tesis
F164 pNapO	cepa derivada de Faj164 transformada con el vector pNapO	esta tesis
<i>E. coli</i> S17.1	cepa conjugativa (funciones de transferencia RP4)	
<i>E. coli</i> DH5α	cepa comercial para mantenimiento de plásmidos	
<i>E. coli</i> TOPO	cepa commercial	invitrogen
Plasmidos		
pJB3Tc20	plásmido de amplio rango de hospedero, <i>Tc^R</i> , <i>Ap^R</i>	Blantny <i>et al.</i> 1997
pJB6.8	fragmento EcoRI-KpnI del plasmido pAB6.8 conteniendo el gen <i>chsA</i> y 2 marcos abiertos de lectura clonado en pJB3Tc20. <i>Tc^R</i> , <i>Am^R</i> .	Moreno Ramirez 2011/este estudio
pMP2444	plásmido de amplio rango de hospedador conteniendo la <i>eGFP</i> bajo un promotor constitutivo, <i>Gm^R</i> .	Bloemberg <i>et al.</i> 2000
pNapO	pJB3Tc20 conteniendo el operon NapO amplificado por PCR	esta tesis

ANEXO 6. Conjugación de *Azospirillum*-*E. coli* S17.1.

- 1- Sembrar desde placas una colonia de *Azospirillum* receptora y *E. coli* S17.1 dadora (conteniendo el plásmido de interés) en 5 ml de medio LB con antibiótico (Ampicilina para *Azospirillum*, el antibiótico indicado para la *E. coli* S17.1) e incubar ambos a 200 rpm, 30°C para *Azospirillum*, 37°C para *E. coli* S17.1 durante una noche.
- 2- A primera hora utilizar ambos cultivos como inóculos de:
Azospirillum: 50 µl de precultivo en 5 ml de medio MMAB, llevar a incubar por 6-7 horas a 200rpm.
***E. coli* S17.1**: 50 µl de precultivo en 2 ml de medio LB sin antibiótico, llevar a incubación a 37°C sin agitación por 3 horas.
- 3- transcurridos los tiempos de incubación, sembrar 10 µl del cultivo de *E. coli* S17.1 en 4 puntos equidistantes en un aplaca de medio MMAB y dejar absorber por 10-15 minutos.
- 4- A partir del cultivo de *Azospirillum*, colectar 1 ml de cultivo a 3500 rpm por 5 minutos y resuspender el pellet celular en 150 µl de medio. Tomar 30 µl de este cultivo y colocar encima de la gota de *E. coli* S17.1. Dejar absorber por 10-15 minutos. Llevar a incubación a 30°C por 48-72 horas.
- 5- Tomar con anza todo el crecimiento en cada punto y colocar en tubos eppendorf resuspendiendo en solución fisiológica (NaCl 0.85 %), agitar con vortex hasta formar una solución homogénea. Tomar una alícuota y realizar una dilución 1/10.
- 6- Plaquear 100 µl de ambos tubos (concentrado y 1/10) en LB agar suplementado con antibiótico (ampicilina para seleccionar *Azospirillum*, y el

correspondiente para seleccionar las colonias que posean el plásmido) e incubar a 30°C.

- Adicionalmente, si no se desea usar ampicilina o la *E. coli* es resistente a este antibiótico, se puede estriar por agotamiento en placas de Nfb-amonio con Rojo Congo conteniendo el antibiótico de selección del plásmido repetidas veces hasta obtener colonias aisladas de *Azospirillum* transformada.

ANEXO 7. Amplificación del Operon Nap (*NapO*).

Utilizando ADN genómico de la cepa Sp245 extraído con kit QIAamp DNA Mini Kit de QUIAGEN se amplifico aproximadamente 4600 pd del operon Nap. Los primers utilizados fueron:

- Fw-NapO*: CTGCTGCGCCGCCATCTGC
- Rv-NapO*: GCCGGAGCCAAAAATCAACCTT

La reacción de PCR utilizada fue la siguiente:

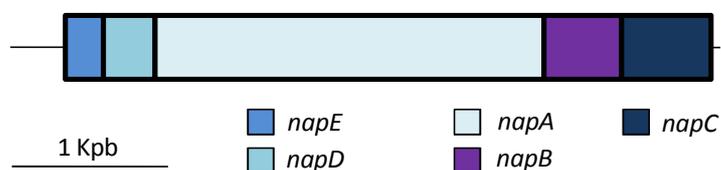
1. ADNg Sp245	3 µl
2. Buffer 10X	2 µl
3. Cl ₂ Mg 50 mM	1,5 µl
4. dNTPs 1,25 mM	3,2 µl
5. Primer Fw 25 µM	1 µl
6. Primer Rv 25 µM	1 µl
7. DMSO	1 µl
8. Taq HF invitrogen	0,3 µl
9. Agua	7 µl
<hr/>	
Total	20 µl

El programa consistió en:

- 10 minutos 95°C
- 30 segundos 95°C
- 1 minuto 71°C
- 5 minutos 72°C
- 10 minutos 72°C

El paso 2 a 4 fue repetido 30 ciclos.

Esquema de amplicon *NapO* (dirección de la transcripción: →)

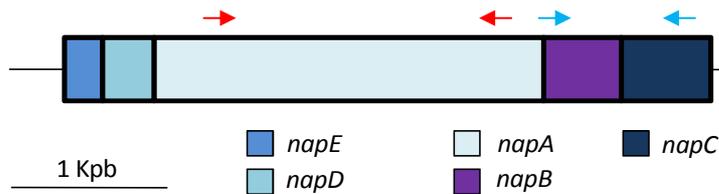


ANEXO 8. PCR multiplex *NapA-NapBC*

A modo de chequear la presencia del operon *Nap*, se estableció un set de PCR-multiplex, donde se amplificaba simultáneamente parte de *NapA* y parte de *NapBC*

1. *Fw-NapA*: GGACCCCAACGCCCGCCACTG (→)
2. *Rv-NapA*: CCTTGCCGTCCTTGTTGCCGTAGA(←)
3. *Fw-NapBC*: GCTCCTGGTGTCCGGCGTGTTTCG (→)
4. *Rv-NapBC*: GCGGGTTCTGGCGGGTGATGTCC (←)

Esquema de la ubicación de los primers.



El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

1. ADN	1 µl
2. Buffer 10X	2 µl
3. Cl ₂ Mg 50 mM	1,5 µl
4. dNTPs 1,25 mM	3,2 µl
5. Fw-NapA 25 µM	0,5 µl
6. Rv-NapA 25 µM	0,5 µl
7. Fw-NapBC 25 µM	0,5 µl
8. Rv-NapBC 25 µM	0,5 µl
9. DMSO	1 µl
10. Taq invitrogen	0,2 µl
11. Agua	9.1 µl

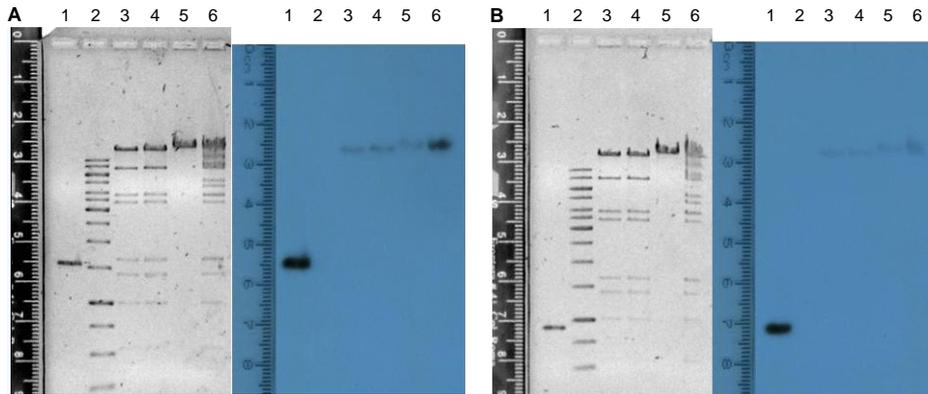
Total 20 µl

El programa consistió en:

1. 10 minutos	95°C
2. 30 segundos	95°C
3. 1 minuto	71°C
4. 2 minutos	72°C
5. 10 minutos	72°C

El paso 2 a 4 fue repetido 30 ciclos.

ANEXO 9. Hibridación radiactiva utilizando pC7-11.



Hibridación radioactiva del operon *NapO* de la clona C7-11. ADN plasmidico extraído de la clona C7-11 fue cortado con las enzimas de restricción *XbaI* y *PstI* y corrido en geles de agarosa 0,9% en buffer TBE 0.5X. 1: control positivo, en A: *NapA*, en B: *NapBC*, 2: marcador de peso molecular, 3: corte con *PstI* (Promega), 4: corte con *PstI* (Fermentas), 5: vector sin cortar, 6: corte doble con *XbaI* y *PstI* (Promega).

ANEXO 10. Extracción de ADN plásmidico.

1. Tomar una colonia de un cultivo fresco de *E. coli* y crecer a 37 °C durante 14-16 horas a 200 rpm en 5 ml de medio LB.
2. Cosechar los cultivos (de 3 a 5 ml) por centrifugación a 8.000 rpm por 1 minuto en tubos eppendorff de 1.5 ml.
3. Eliminar sobrenadante por decantación y conservar el pellet celular.
4. Resuspender en 200 μ l de solución de lisis: Solución 1 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, lisozima 4mg/ml). Preparar esta solución con la lisozima en el momento.
5. Mantener el tubo con la solución 1 durante 5 min a T° ambiente.
6. Agregar 400 μ l de la solución de lisis Solución 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) mezclar por inversión suavemente de 3-6 veces y mantener 5 min en hielo, no excederse de ese tiempo. Nota: La suspensión debe ser clara y viscosa.
7. Agregar 300 μ l la solución de precipitado Solución 3 (acetato de potasio 3.0 M pH 5.5 ajustado con ácido acético), mezclar suavemente por inversión de 3 a 6 veces.
8. Incubar a -20 °C por 30 minutos (precipita mayor contenido en proteína, RNA de alto peso molecular y DNA cromosómico).
9. Centrifugar por 15 min a 14,000 rpm a 4°C.
10. Tomar el sobrenadante y transferirlo a un segundo tubo limpio y estéril, centrifugar nuevamente a 14000 rpm por 15 minutos.
11. Tomar el sobrenadante y transferirlo a otro tubo limpio y estéril, agregar 200 μ l fenol saturado con Tris-HCl 0.1 M ajustado a un pH 8 y 200 μ l cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), previamente preparados; mezclar suavemente por inversión durante 5 minutos y centrifugar a 10,000 rpm por 5 minutos.

12. Repetir paso 11.
13. Después de haber hecho dos lavados con la mezcla de fenol/cloroformo-alcohol isoamílico hacer un último lavado con cloroformo:alcohol Isoamílico (24:1) para eliminar el exceso de fenol; mezclar por inversión y centrifugar a 10,000 rpm por 5 minutos.
14. Tomar el sobrenadante y transferirlo a un tubo nuevo y añadir 0.6 volúmenes de isopropanol (400 μ l-500 μ l) e incubar a T° ambiente por 10 min para precipitar el DNA que se encuentra en el sobrenadante.
15. Centrifugar por 30 minutos a 14,000 rpm a 4° C.
16. Eliminar el sobrenadante por decantación cuidando no perder la pastilla que se encuentra en el fondo del tubo que presenta un aspecto, que va de transparente a blanco.
17. Posteriormente eliminar las sales que puedan haber precipitado junto con la pastilla, tratando con 1ml de etanol al 70%, mezclar suavemente por inversión de 2-3 veces y centrifugar por 5 min a 10,000 rpm a 4° C, repetir el proceso 2 veces.
18. Colocar los tubos invertidos sobre un papel filtro para secar la pastilla y eliminar el exceso de etanol por 15 minutos a T° ambiente.
19. Resuspender la pastilla en 50 μ l de una solución de RNAsa (0.1 mg/ml) e incubar a 37 °C por 20 minutos.