

Luis Andrés Sandoval Lozano

Papel de los reguladores
transcripcionales Fur (Ferric
Uptake Regulator) en la síntesis
de exopolisacáridos y formación
de biofilms en *Anabaena* sp.
PCC7120

Director/es

Fillat Castejón, María Francisca
Sevilla Miguel, Emma
González Rodríguez, Andrés

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

PAPEL DE LOS REGULADORES
TRANSCRIPCIONALES FUR (FERRIC UPTAKE
REGULATOR) EN LA SÍNTESIS DE
EXOPOLISACÁRIDOS Y FORMACIÓN DE
BIOFILMS EN ANABAENA SP. PCC7120

Autor

Luis Andrés Sandoval Lozano

Director/es

Fillat Castejón, María Francisca
Sevilla Miguel, Emma
González Rodríguez, Andrés

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2021

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Facultad de Ciencias



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

TESIS DOCTORAL

**Papel de los reguladores transcripcionales Fur (Ferric Uptake Regulator)
en la síntesis de exopolisacáridos y formación de *biofilms*
en *Anabaena* sp. PCC7120.**

Memoria presentada por

Luis Andrés Sandoval Lozano

para optar al título de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Mayo 2021

Quiero dedicar esta tesis a María Denis Lozano Tovar, mi madre. Porque gracias a ella y a su constante sacrificio he podido formarme académicamente y como persona y espero algún día poder decir que he heredado su carácter, pero especialmente su valentía. También quiero agradecer a mi padre, Luis Arturo Sandoval Ramírez, por ayudarme a ver las cosas con otra perspectiva y por enseñarme a conservar la calma en los momentos de tormenta.

Son muchas las personas que directa o indirectamente te ayudan a sacar adelante un trabajo como este y seguramente olvidaré mencionar a algunas personas en estos párrafos, por lo que pido disculpas de antemano. Quiero agradecer a mi directora y codirectores María Fillat, Emma Sevilla y Andrés González, por su paciencia y apoyo. Los tres tienen formas muy diferentes de enseñar y los tres son muy buenos. A Emma le agradezco sus palabras en esos momentos de vulnerabilidad emocional.

A los profesores María Luisa Peleato, Jesús Arenas e Inmaculada Yruela por su ayuda con los experimentos de germinación de arroz, cuantificación de *biofilm* en placas de microtitulación y el procesamiento bioinformático y diseño de árboles filogenéticos. A Marisa, especialmente muchas gracias por ser siempre tan amable y carismática.

A los gestores de mi beca, la Gobernación del Tolima-Colombia, la Universidad del Tolima, el Grupo Interdisciplinario de Investigación en Fruticultura Tropical y a Jonh Jairo Méndez y Angélica Torres, directores del proyecto Formación de Talento Humano de Alto Nivel, así como a todos los integrantes del proyecto, por su ayuda y buena disposición con todas las gestiones relacionadas.

A Pili Jiménez, Manoli Castejón, y Fina Marco por ser siempre tan atentas cuando hay que resolver problemas y cuando necesitas equipo y materiales. A Marta Fajes le debo un agradecimiento especial por su cordialidad y porque con ella todas las gestiones administrativas son menos complicadas.

A todas las personas que me brindaron su amistad y apoyo moral. A mis compañeros de la facultad de ciencias: Sandra, Juanjo, María, Elena, Ritwik, Silvia, Patty, Ruth y Guillermina. Mis amigos de matemáticas: Carlos Alquezar, Vicente Luis y Vanessa Ángeles. A mis amigos de veterinaria, Silvia Gimeno, Melissa Cavajal y Luis Herrera. Gracias por las charlas a la hora del café, gracias por las palabras de ánimo y gracias por los juepinchos, las cervezas, los mensajes de cumpleaños y esas cosas que solían hacerse antes de la pandemia.

A mis compañeros y otros integrantes del laboratorio, los que están y los que se han ido a otros grupos de investigación: a German Ibarra, que vino desde México solo por unos meses, pero de cierta forma se quedó todo este tiempo, a la profesora Teresa Bes, a Irene, Isabel, Laura, y a Jorge. A Jorge que es para mí el ejemplo de un excelente investigador, le guardo gran aprecio y le agradezco toda su ayuda con los EMSAs. También quiero agradecer a Sara y a Raúl, a quienes además considero buenos amigos y de quienes estoy seguro les espera un futuro muy bonito.

Finalmente, a la familia de Camila González Ávila, por acogerme en España como uno de los suyos, después de que he estado tantos años lejos de los míos y a Camila por acompañarme sin condiciones en esos días de estrés y porque sus mascotas fueron una buena terapia para combatirlo.

A todos, muchas gracias.

Papel de los reguladores transcripcionales Fur (Ferric Uptake Regulator) en la síntesis de exopolisacáridos y formación de *biofilms* en *Anabaena* sp. PCC7120.

Resumen:

Las cianobacterias presentan un gran potencial como biofertilizantes debido a sus numerosas estrategias de adaptación, entre las que destaca la producción de *biofilms*. La matriz del *biofilm* protege a la cianobacteria y le permite crecer en condiciones hostiles, como deficiencia de nutrientes o altos niveles de salinidad, por lo que puede proliferar en suelos erosionados por la sobrecarga de actividades agrícolas y proveer un soporte para el crecimiento de otros microorganismos beneficiosos. Además, algunas cianobacterias como *Anabaena* contribuyen a la fertilización con el proceso de fijación biológica de nitrógeno. Trabajos preliminares llevados a cabo por el grupo de investigación en Regulación Génica y Fisiología de Cianobacterias de la Universidad de Zaragoza, sugieren que las tres proteínas de la familia de reguladores transcripcionales FUR (FurA, FurB y FurC) presentes en *Anabaena* sp. PCC7120, pueden controlar algunos de los factores que influyen en la producción de *biofilms* en esta cianobacteria. En este trabajo se ha analizado el impacto de la desregulación de las proteínas FUR de *Anabaena* en la producción de *biofilms* en diferentes condiciones de estrés. Para ello se ha estudiado cómo afecta la deficiencia de nitrógeno y altos niveles de salinidad a la producción de exopolisacáridos presentes en los sobrenadantes de cultivos de *Anabaena* y como se ven afectadas otras características como su metabolismo, crecimiento y morfología. Además, se han seleccionado un conjunto de genes relacionados con la síntesis de exopolisacáridos y se ha evaluado su posible regulación por FurA y FurC mediante ensayos de cambio en la migración electroforética (EMSA). Estos genes fueron escogidos con base en resultados previos de q-RT-PCR en los que se observó un alto nivel de expresión en condiciones de deficiencia de nitrógeno. Un total de seis glicosiltransferasas fueron evaluadas como dianas potenciales de FUR, la presencia de *Fur boxes* para FurA y FurC confirmó estos resultados. Adicionalmente, se cuantificó en sobrenadante la cantidad de exopolisacárido producido por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp.

PCC7120 y sus variantes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC en deficiencia de nitrógeno y en 300 mM de NaCl. Así mismo se evaluó la capacidad de estas cepas para producir *biofilms*. Finalmente, se estudió la capacidad protectora de los exopolisacáridos obtenidos del sobrenadante de *Anabaena* sp. PCC7120 en la germinación de semillas de arroz (*Oryza sativa*) de la variedad Ariete, sometiendo las semillas durante su germinación en placas de Petri a condiciones de estrés salino (100 mM de NaCl). Los resultados sugieren que FurA y FurC están relacionados con el control de la expresión de genes implicados en la formación de *biofilms* en *Anabaena*.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Origen y evolución.....	1
1.2. El genoma de las cianobacterias.....	6
1.3. Diferenciación celular	7
1.3.1. Hormogonios	8
1.3.2. Acinetos.....	9
1.3.3. Heterocistos	9
1.4. Fijación de nitrógeno en cianobacterias filamentosas.	11
1.5. Adaptación a la salinidad.....	12
1.6. Metabolismo del hierro en procariontas	15
1.6.1. La familia de reguladores FUR. Características generales.	16
1.6.2. Proteínas de la familia Fur de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120	20
1.6.2.1. FurA.....	20
1.6.2.2. FurB (Zur).....	21
1.6.2.3. FurC (PerR).....	22
1.7. Producción de <i>biofilms</i> en cianobacterias	23
1.7.1. Exopolisacáridos de cianobacterias (EPSs).....	24
1.7.2. Características fisicoquímicas de los EPSs de cianobacterias.....	26
- Tolerancia a la deshidratación	27
- Tolerancia a la radiación ultravioleta	27
- Tolerancia a metales pesados	27
1.7.3. Biosíntesis de exopolisacáridos de cianobacterias.	28
1.7.4. Factores que afectan la biosíntesis de EPSs en cianobacterias	31
1.8. Glicosiltransferasas: características generales y clasificación.	32

1.9. Cianobacterias como biofertilizantes y sus implicaciones agroambientales en Colombia.	36
2. Objetivos	41
3. Materiales y métodos	43
3.1. Condiciones de cultivo y cepas empleadas.....	43
3.2. Técnicas de trabajo con ADN y proteínas	45
3.2.1. Extracción de ADN genómico de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120	45
3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	46
3.2.3. Electroforesis de ADN	48
3.2.4. Cuantificación de proteínas	48
3.2.5. Ensayos de retardo en gel (EMSA)	49
3.3. Caracterización de las estirpes	50
3.3.1. Determinación de clorofila	50
3.3.2. Determinación de carotenoides.....	51
3.3.3. Determinación de ficobiliproteínas	51
3.4. Determinación de las tasas fotosintética y respiratoria	52
3.5. Técnicas de microscopía.....	53
3.5.1. Microscopía óptica	53
3.5.2. Conteo celular	53
3.5.3. Microscopía de fluorescencia	55
3.5.4. Microscopía electrónica	56
3.6. Cuantificación de exopolisacáridos en sobrenadante mediante método fenol-sulfúrico.	56
3.7. Cuantificación y caracterización de <i>biofilms</i>	58
3.8. Ensayos de germinación de semillas de arroz.	59
3.9. Análisis estadístico:.....	60
3.10. Identificación de glicosiltransferasas y análisis filogenéticos.....	60
4. Resultados	62

4.1. Influencia de diferentes factores ambientales en la síntesis de exopolisacáridos y formación de <i>biofilms</i> en <i>Anabaena</i> sp. PCC7120:.....	62
4.1.1. Síntesis de exopolisacáridos:	62
4.1.2. Formación de <i>biofilms</i>	65
4.2. Consecuencia de la desregulación de proteínas FUR en la síntesis de exopolisacáridos y la formación de <i>biofilm</i> en <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.....	67
4.2.1. Caracterización fenotípica de las estirpes de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC en condiciones de deficiencia de nitrógeno y estrés salino:	67
4.2.1.1. Efecto de la deficiencia de nitrógeno y la alta salinidad sobre la agregación y la pigmentación.....	67
4.2.1.2. Influencia de la deficiencia de nitrógeno y la alta salinidad sobre el crecimiento	70
4.2.1.3. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos y proteínas totales.	80
4.2.1.4. Actividades fotosintética y respiratoria:	80
-Fotosíntesis:.....	81
-Respiración:	82
4.2.2. Efecto de la desregulación de FurA, FurB y FurC en la síntesis de exopolisacáridos.....	84
4.2.3. Efecto de la desregulación de FurA, FurB y FurC en la síntesis de exopolisacáridos en cultivos en deficiencia de nitrógeno.	85
4.2.4. Efecto de la desregulación de FurA, FurB y FurC en la síntesis de exopolisacáridos en exposición a altas concentraciones de sal.....	89
4.2.4. Efecto de la desregulación de FurA, FurB y FurC en la formación de <i>biofilm</i> en diferentes condiciones ambientales: deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado.....	93
4.2.5. Efecto de la desregulación de FurA, FurB y FurC en la formación de <i>biofilm</i> en exposición a altas concentraciones de sal.	99
4.3. Análisis de las glicosiltransferasas presentes en el genoma de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.....	104
4.3.1. Clasificación y relación con otras proteínas.	104

4.3.2. Análisis filogenético.....	112
4.4. Presencia de cajas FUR en los promotores de las glicosiltransferasas. .	114
4.5. Identificación de glicosiltransferasas potencialmente reguladas por FurA y FurC mediante ensayos de retardo en gel (Electrophoretic Mobility Shift Assay: EMSA).....	120
4.6. Efecto de la presencia de exopolisacáridos y otros metabolitos en el sobrenadante de estirpes de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 sobre la germinación de <i>Oryza sativa</i> de la variedad Ariete.....	122
4.6.1. Consecuencias del estrés salino y su efecto sobre la germinación:.....	122
4.6.1.1. Efecto en el crecimiento de la raíz pivotante:	124
4.6.1.2. Efecto en la longitud del tallo.....	125
4.6.1.3. Efecto en la cantidad de hojas.	126
4.6.2. Ensayos de germinación en otras condiciones de estrés.....	127
5. Discusión	128
5.1. Influencia de diferentes factores ambientales en el fenotipo de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y de las variantes de sobreexpresión de los parálogos FurA, FurB y FurC:	129
5.1.1. Influencia de la deficiencia de nitrógeno y la alta salinidad sobre el crecimiento y la morfología de <i>Anabaena</i> sp. PCC7119.	130
5.1.2. Efecto de la deficiencia de nitrógeno y la alta salinidad sobre la agregación y el contenido en pigmentos fotosintéticos y proteína total.....	135
5.1.4. Actividades fotosintética y respiratoria	137
5.2. Síntesis de exopolisacáridos.....	141
5.2.1 Consecuencias del déficit de nitrógeno y el estrés salino en la síntesis de EPSs en <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.....	141
5.2.2. Efecto de la desregulación de FurA, FurB y FurC en la síntesis de exopolisacáridos.....	142
5.2.3. Efecto de la desregulación de FurA, FurB y FurC en la síntesis de exopolisacáridos en cultivos en deficiencia de nitrógeno.	143

5.2.2. Efecto de la desregulación de FurA, FurB y FurC en la síntesis de exopolisacáridos en exposición a altas concentraciones de sal.....	144
5.3. Formación de <i>biofilms</i> en condiciones de estrés.....	145
5.3.1. Efecto de la desregulación de FurA, FurB y FurC en la formación de <i>biofilm</i> . Consecuencias de la deficiencia de nitrógeno.	147
5.3.2. Efecto de la desregulación de FurA, FurB y FurC en la formación de <i>biofilm</i> en exposición a altas concentraciones de sal.....	147
5.4. Análisis filogenético de las glicosiltransferasas presentes en el genoma de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.....	148
5.5. Presencia de cajas FUR en los promotores de las glicosiltransferasas potencialmente reguladas por FurA y FurC y ensayos de retardo en gel (Electrophoretic Mobility Shift Assay: EMSA).....	152
5.6. Efecto de la presencia de exopolisacáridos y otros metabolitos en el sobrenadante de estirpes de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 sobre la germinación de <i>Oryza sativa</i> de la variedad Ariete.....	153
6. Conclusiones	155
Bibliografía	160

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del aumento en el nivel de oxígeno en la Tierra durante la historia temprana de la vida hace 4500 millones de años y sus respectivos periodos geológicos.	1
Figura 2. Esquema comparativo entre un cloroplasto y una cianobacteria.	2
Figura 3. Diferentes tipos de organización pluricelular y unicelular en cianobacterias.	3
Figura 4. Comparación microscópica de la envoltura celular Gram-negativa de la cianobacteria <i>Phormidium uncinatum</i> (A) y <i>Escherichia coli</i> (B).	5
Figura 5. Esquema del nivel ordinario de clasificación taxonómica para cianobacterias.	6
Figura 6. Relación filogenética entre cianobacterias, con base en comparación de secuencias.	7
Figura 7. Diferentes tipos de células presentes en cianobacterias formadoras de heterocistos.	8
Figura 8. Modelo de un heterocisto rodeado de dos células vegetativas.	10
Figura 9. Modelo tridimensional generado con PyMol del dímero de FurB de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	19
Figura 10. En 1. <i>Anabaena</i> spp. con filamentos en espiral embebida en limo y observada al microscopio después de tinción con tinta china 2. visualización de la capa de exopolisacáridos formados sobre heterocistos y acinetos en campo brillante.	24
Figura 11. Diagrama esquemático simplificado tomado de Ates, 2015. En el que se resumen las rutas metabólicas (dependientes de transportadores tipo ABC y dependientes de WZX/WZY) responsables de la síntesis de EPs en microorganismos.	30
Figura 12. Mecanismo propuesto para las reacciones de inversión y retención en glicosiltransferasas.	34

Figura 13. Clasificación jerárquica de las glicosiltransferasas basada en el tipo de plegamiento y la formación de clanes, superfamilias estructurales y subfamilias	35
Figura 14: Diagrama que representa los cuadrantes en cámara de Neubauer	54
Figura 15: Resultado del procesamiento de imagen para el conteo celular mediante ImageJ.....	55
Figura 16. Rectas patrón para el método fenol-sulfúrico con base en diferentes monosacáridos	57
Figura 17. Formación de heterocistos (flechas blancas) en células de la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 cultivadas en BG110.....	63
Figura 18. Efecto de altas concentraciones de sal en las células de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.....	64
Figura 19. Cuantificación mediante el método fenol-sulfúrico (abs 490nm) de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 (W.T.) tomados a las 24 y 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo), en deficiencia de nitrógeno (W.T. -N) y altas concentraciones de sal (W.T. + 300mM de NaCl)	65
Figura 20. Formación de <i>biofilm</i> producido por la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo), deficiencia de nitrógeno soluble y 300 mM de NaCl.....	66
Figura 21. Diferencias en la pigmentación de 1. La estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión 2. AG2770FurA, 3. VCS2770Furb y 4. EB2770FurC, tras 48 horas de crecimiento en condiciones estándar, en deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado y en NaCl 300 mM.	68
Figura 22. Apariencia en los pocillos de la estirpe silvestre <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC (AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC) en medio BG11 a los 20 días de exposición a dos condiciones de estrés (deficiencia de nitrógeno y altas concentraciones de sal).	69

Figura 23. Conteo celular de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2070FurB y EB2770FurC bajo condiciones estándar de crecimiento.	71
Figura 24. Conteo celular de la estirpe silvestre <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y de la estirpe de sobreexpresión AG2770FurA tras 24 y 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en deficiencia de nitrógeno combinado.....	72
Figura 28. Conteo celular de la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y de la estirpe de sobreexpresión VCS2770FurB tras 24 y 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en altas concentraciones de sal (300 mM NaCl). Cantidad de células/ml.	77
Figura 29. Conteo celular de la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y de la estirpe de sobreexpresión EB2770FurC tras 24 y 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en altas concentraciones de sal (300 mM NaCl). Cantidad de células/ml.	78
Figura 30. Desprendimiento de oxígeno durante la fotosíntesis de la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC (AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC) tras 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo), en deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado y en altas concentraciones de sal (300mM de NaCl).	81
Figura 31. Respiración celular de las estirpes de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC tras 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo), en deficiencia de fuente de nitrógeno combinado y en altas concentraciones de sal (300mM de NaCl). 1: estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120, 2: AG2770FurA, 3: VCS2770FurB y 4: EB2770FurC.	82
Figura 32. Cuantificación mediante el método fenol-sulfúrico (abs 490 nm) de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y por las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC procedentes de cultivos en fase exponencial de crecimiento en muestras recolectadas tras 0, 24 y 48 horas en condiciones estándar (BG11 completo).....	84

- Figura 33.** Cuantificación mediante el método fenol-sulfúrico (abs 490 nm) de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión AG2770FurA en condiciones estándar de cultivo (BG11 completo) y a las 24 y 48 horas tras retirar la fuente de nitrógeno combinado. 85
- Figura 34.** Cuantificación mediante el método fenol-sulfúrico (abs 490 nm) de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión VCS2770FurB en condiciones estándar de cultivo (BG11 completo) y a las 24 y 48 horas tras retirar la fuente de nitrógeno combinado. 86
- Figura 35.** Cuantificación mediante el método fenol-sulfúrico (abs 490 nm) de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión EB2770FurC en condiciones estándar de cultivo (BG11 completo) y a las 24 y 48 horas tras retirar la fuente de nitrógeno combinado. 87
- Figura 36.** Resumen de la cuantificación de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC tras 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado. 88
- Figura 37.** Cuantificación mediante el método fenol-sulfúrico (abs 490 nm) de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión AG2770FurA tras 24 y 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en altas concentraciones de sal (300 mM de NaCl). 89
- Figura 38.** Cuantificación mediante el método fenol-sulfúrico (abs 490 nm) de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión VCS2770FurB tras 24 y 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en altas concentraciones de sal (300 mM de NaCl). 90
- Figura 39.** Cuantificación mediante el método fenol-sulfúrico (abs 490 nm) de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp.

PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión EB2770FurC tras 24 y 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en altas concentraciones de sal (300 mM de NaCl).	91
Figura 40. Cuantificación mediante el método fenol-sulfúrico (abs 490 nm) de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y por las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC tras 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en presencia de NaCl 300 mM.....	92
Figura 41. Cuantificación mediante cristal violeta (abs 630 nm) del <i>biofilm</i> formado por la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y por las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC los días 1, 5, 10, 15 y 20 de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo).....	94
Figura 42. Cuantificación mediante tinción con cristal violeta y abs 630 nm, del <i>biofilm</i> unido a las paredes de placas de 12 pocillos, producido por la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión AG2770FurA tras 1, 5, 10, 15 y 20 días de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado.	95
Figura 43. Cuantificación mediante tinción con cristal violeta y abs 630 nm, del <i>biofilm</i> unido a las paredes de placas de 12 pocillos, producido por la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión VCS2770FurB tras 1, 5, 10, 15 y 20 días de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado.	96
Figura 44. Cuantificación mediante tinción con cristal violeta y abs 630 nm, del <i>biofilm</i> unido a las paredes de placas de 12 pocillos, producido por la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión EB2770FurC tras 1, 5, 10, 15 y 20 días de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado.	97
Figura 45. Cuantificación mediante tinción con cristal violeta y abs 630 nm, del <i>biofilm</i> unido a las paredes de placas de 12 pocillos, producido por la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y por las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC tras 20 días de crecimiento en	

condiciones estándar (BG11 completo) y deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado.....	98
Figura 46. Cuantificación mediante tinción con cristal violeta y abs 630 nm, del <i>biofilm</i> unido a las paredes de placas de 12 pocillos, producido por la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión AG2770FurA tras 20 días de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y 300 mM de NaCl.....	99
Figura 47. Cuantificación mediante tinción con cristal violeta y abs 630 nm, del <i>biofilm</i> unido a las paredes de placas de 12 pocillos, producido por la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión VCS2770FurB tras 1, 5, 10, 15 y 20 días de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y 300 mM de NaCl.....	100
Figura 48. Cuantificación mediante tinción con cristal violeta y abs 630 nm, del <i>biofilm</i> unido a las paredes de placas de 12 pocillos, producido por la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión EB2770FurC tras 1, 5, 10, 15 y 20 días de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y 300 mM de NaCl.....	101
Figura 49. Cuantificación mediante tinción con cristal violeta y abs 630 nm, del <i>biofilm</i> unido a las paredes de placas de 12 pocillos, producido por la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y por las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC tras 20 días de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en NaCl 300 mM.....	102
Figura 50. Árbol filogenético de las glicosiltransferasas de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 que pertenecen a las superfamilias estructurales GT-A (ramas azules), GT-B (ramas negras), GT-C (ramas rojas) y 14 secuencias de glicosiltransferasas que se encuentran sin asignación a una superfamilia estructural (S.A.F.) (ramas verdes).	113
Figura 51. Las secuencias correspondientes a cajas FUR para FurA y FurC se analizaron mediante el software MEME, (Multiple Em for Motif Elicitation) (http://meme-suite.org/)	118

- Figura 52.** Ensayos de retardo en gel de los promotores de glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de exopolisacáridos y la formación de *biofilms* enfrentados a la proteína FurA y a la proteína FurC 121
- Figura 53.** Efecto de los exopolisacáridos presente en el sobrenadante de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y de las células de la estirpe silvestre y de la variante de sobreexpresión EB2770FurC en el porcentaje de germinación de *Oryza sativa* de la variedad *Ariete* tras 8 días de germinación en A. (condiciones estándar) y B. (NaCl 100 mM). 123
- Figura 54.** Efecto de los exopolisacáridos presente en el sobrenadante de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y de las células de la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC7120 y de la variante de sobreexpresión EB2770FurC en la longitud de la raíz de *Oryza sativa* de la variedad *Ariete* tras 8 días de germinación en A. (condiciones estándar) y B. (NaCl 100 mM). 124
- Figura 55.** Efecto de los exopolisacáridos presente en el sobrenadante de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y de las células de la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC7120 y de la variante de sobreexpresión EB2770FurC en la longitud del tallo de *Oryza sativa* de la variedad *Ariete* tras 8 días de germinación en A. (condiciones estándar) y B. (NaCl 100 mM). 125
- Figura 56.** Efecto de los exopolisacáridos presente en el sobrenadante de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y de las células de la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC7120 y de la variante de sobreexpresión EB2770FurC en la cantidad de hojas de *Oryza sativa* de la variedad *Ariete* tras 8 días de germinación en A. (condiciones estándar) y B. (NaCl 100 mM). 126

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Papel de los exopolisacáridos sintetizados por cianobacterias en procesos de adhesión, estructura, protección contra el estrés abiótico, procesos de bio-mineralización, motilidad bacteriana y reposición de nutrientes en <i>biofilms</i>	25
Tabla 2. Cepas de cianobacterias empleadas en este estudio.....	43
Tabla 3. Composición del medio BG-11 basal.....	44
Tabla 4. Composición del suplemento del medio BG-11.....	45
Tabla 5. Mezclas de reacción para PCR.....	46
Tabla 6. Cebadores empleados en este trabajo.....	47
Tabla 7. Se muestran las cantidades de reactivos necesarias para preparar geles del 6%.....	49
Tabla 8. Cantidad de células/ml cuantificadas en los cultivos de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2070FurB y EB2770FurC.....	71
Tabla 9. Conteo celular de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2070FurB y EB2770FurC.....	75
Tabla 10. Conteo celular de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2070FurB y EB2770FurC.....	79
Tabla 11. Contenido en pigmentos fotosintéticos y proteínas totales de la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC.....	80
Tabla 12. Volumen de oxígeno consumido y producido ($\mu\text{g}/106\text{células}$) durante los procesos de fotosíntesis y respiración de la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC.....	83
Tabla 13. Cuantificación mediante el método fenol-sulfúrico (abs 490 nm) de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y por las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC.....	93

Tabla 14. Cuantificación tinción con cristal violeta y abs 630 nm, del <i>biofilm</i> unido a las paredes de placas de 12 pocillos, formado por la estirpe silvestre de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y por las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC.....	103
Tabla 15. clasificación, de las secuencias de los genes anotados como glicosiltransferasas en el genoma de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.....	104
Tabla 16. Resultado de la búsqueda de genes codificantes para glicosiltransferasas en <i>Anabaena</i> sp. PCC7120	106
Tabla 17. Actividades de las glicosiltransferasas de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y su relación con otras rutas metabólicas de acuerdo a su organización en superfamilias estructurales y en subfamilias	110
Tabla 18. Mapa genómico de acuerdo a la base de datos KEGG (genome.jp) de glicosiltransferasas de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 organizadas en operones.	115
Tabla 19. Resultado de la búsqueda de Cajas FurA y FurC para las 80 secuencias de promotores de glicosiltransferasas de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.	119

Introducción **1**

1. Introducción

1.1. Origen y evolución.

Las cianobacterias son bacterias gram-negativas fotoautótrofas, que al igual que las plantas realizan la fotosíntesis oxigénica, en la cual el agua es el donador primario de electrones y se libera oxígeno (O_2) como subproducto. Esta característica fundamental definió un papel relevante de estos microorganismos en la evolución de la vida en la tierra, determinando el paso gradual de una atmósfera reductora anoxigénica a una atmósfera rica en oxígeno, que tras la evolución de las cianobacterias como grupo microbiano y la aparición de cianobacterias pluricelulares desencadenó lo que se denomina la Gran Oxidación (Figura 1), proceso que cambió para siempre el curso evolutivo y modificó la composición de las formas de vida en el planeta (Canfield *et al.* 2013).

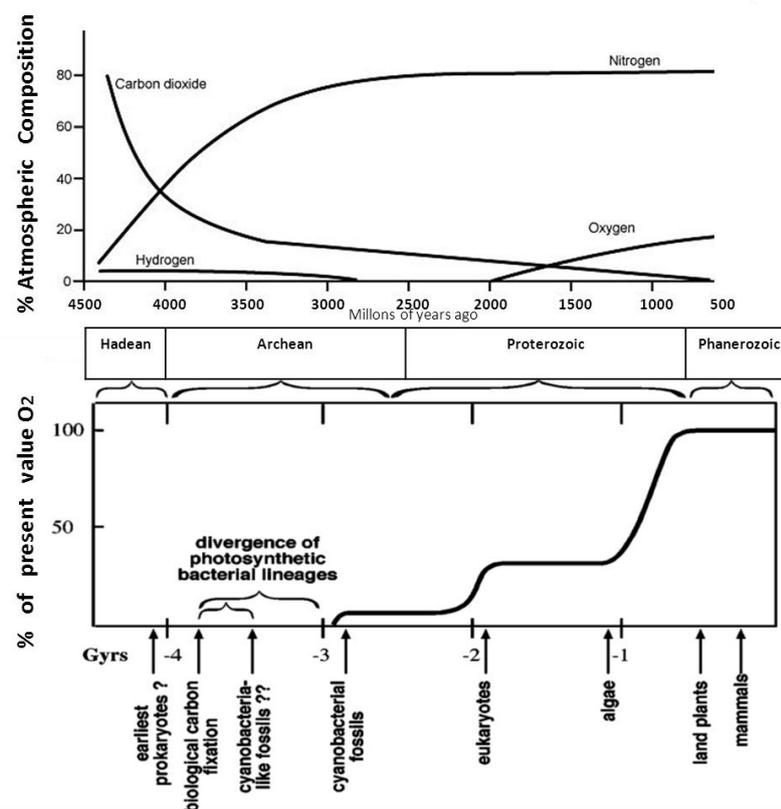


Figura 1. Representación esquemática del aumento en el nivel de oxígeno en la Tierra durante la historia temprana de la vida hace 4500 millones de años y sus respectivos periodos geológicos. Los eventos evolutivos más importantes se marcan en flechas, (Modificado de Paleomap Projec scotese.com y de Xiong 2002).

Por otro lado, según la teoría endosimbiótica, las cianobacterias dieron origen a los cloroplastos actuales. Las células eucariotas fotoautótrofas llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica mediante cloroplastos (plastidios) que podrían tener como ancestro común una cianobacteria unicelular adquirida por endosimbiosis, la cual, mediante procesos evolutivos posteriores, pudo haberse diferenciado en organelos especializados (Jensen & Leister. 2014; Oborník. 2019). Como resultado de este proceso endosimbiótico se conservan similitudes entre cianobacterias y cloroplastos, como la presencia de dos fotosistemas y la ya mencionada fotosíntesis oxigénica (Figura 2).

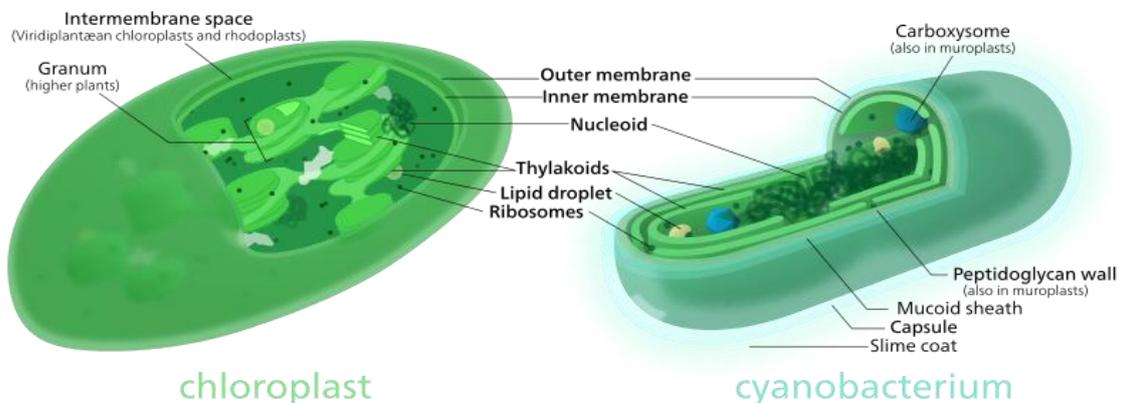


Figura 2. Esquema comparativo entre un cloroplasto y una cianobacteria. El citoplasma de la cianobacteria presenta proteínas estructurales que sostienen la maquinaria de fijación de carbono y que están reguladas espacialmente. A diferencia de otros procariontes las cianobacterias poseen múltiples cromosomas que se encuentran difusos en el citoplasma (Imagen de dominio público creativecommons.org).

Sin embargo, los tilacoides de las cianobacterias no están rodeados de una membrana formando organelos como ocurre con los cloroplastos, en lugar de ello se sitúan en la región periférica del citoplasma. Los pigmentos en las cianobacterias las distingue de otros organismos fotosintéticos, pues poseen clorofila a, pero carecen de clorofila b, que es característica de las plantas. Además, al igual que las algas rojas, las cianobacterias cuentan con estructuras supramoleculares en la membrana tilacoidal denominadas ficobilisomas que están asociadas al fotosistema II (van de Meene *et al.* 2006).

La capacidad de fijación de nitrógeno por parte de algunas especies de cianobacterias permitió su proliferación como organismos de vida libre o en

relaciones simbióticas en una gran variedad de ecosistemas, principalmente suelos húmedos y hábitats acuáticos. Estas relaciones simbióticas se aprecian en la actualidad e incluyen plantas, líquenes, hongos e incluso algunos animales como tunicados, entre otros (Hirose *et al.*, 2006). En la actualidad, las cianobacterias juegan un papel clave en el mantenimiento de la biosfera por su participación en los ciclos del carbono y el nitrógeno (Herrero & Flores., 2008).

Las cianobacterias presentan gran heterogeneidad en cuanto a morfología. Su tamaño celular puede variar hasta 100 veces entre un género y otro. Pueden ser unicelulares (Figura 3A), coloniales (Figura 3B) o filamentosas (Figura 3C, D, E y F), con filas de células individuales con sus respectivas membranas citoplasmáticas, que comparten una membrana externa común. Algunas especies como *Anabaena* sp. PCC7120 desarrollan células diferenciadas, siendo uno de los pocos casos de procariontes que presentan diferenciación celular (Figuras 3E y F).

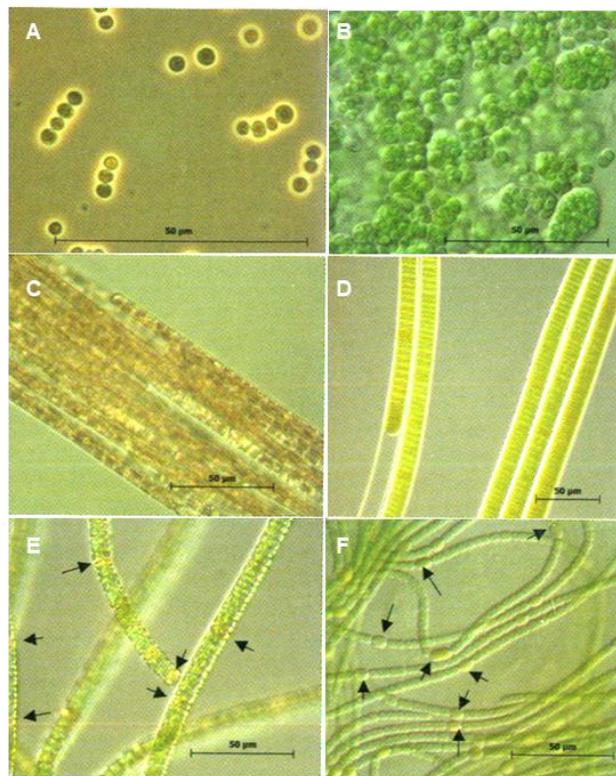


Figura 3. Diferentes tipos de organización pluricelular y unicelular en cianobacterias. En A y B células de *Cyanosphaera* sp. y *Crocosphaera* sp., en C y D filamentos de *Trichodesmium* sp y *Lyngbya* sp. en E y F filamentos de *Nodularia* sp. y *Anabaena* sp. Las flechas en E y F señalan heterocistos (Modificado de Herrero & Flores., 2008).

Así mismo, las cianobacterias filamentosas pueden presentar falsas ramificaciones, solo los miembros del orden Nostocales presentan verdaderas ramificaciones (Dvorak. 2017). Las cianobacterias se reproducen por fisión binaria, sin embargo, no se consideran organismos completamente clonales, pues presentan flujo horizontal de genes y recombinación, como otros procariotas (Cohan & Perry. 2007). Algunas cianobacterias unicelulares pueden desarrollar baeocitos o exocitos, que se distinguen de la célula madre por su tamaño y forma y por presentar fisión múltiple sucesiva con la consecuente liberación de nuevas células (Komárek & Anagnostidis. 1998).

Las cianobacterias suelen poseer una mayor longitud que otras bacterias, y su citoplasma presenta estructuras como carboxisomas, responsables de la fijación de CO₂ por contener la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (Rubisco). El citoplasma de la cianobacteria también presenta una gran cantidad de gránulos de glucógeno, polisfosfato y cianoficina. Esta última está implicada en el almacenamiento de nitrógeno. Durante este proceso el nitrógeno y el carbono se movilizan a partir de la cianoficina mediante cianoficinasas intracelulares en forma de dipéptidos de aspartato-arginina. El citoplasma de las cianobacterias también contiene vesículas gasíferas y tilacoides, donde reside el aparato molecular responsable de la fotosíntesis en la estructura denominada ficobilisoma (Prasanna *et al.* 2006).

Aunque son bacterias Gram-negativas de acuerdo a la estructura y composición de su pared celular (Figura 4A), las cianobacterias presentan algunas características típicas de las bacterias Gram-positivas (Figura 4B). Alrededor de la membrana plasmática se sitúa la pared celular compuesta por el espacio periplasmático, una capa de peptidoglicanos más gruesa que la comúnmente presente en Gram-negativas y la membrana externa. Algunas estirpes pueden sintetizar otras cubiertas denominadas S, que rodean la pared celular formando cápsulas. La membrana externa contiene lipopolisacáridos y proteínas en la cara externa y lipoproteínas, fosfolípidos y proteínas en la cara interna. La membrana externa presenta algunas características propias de Gram-positivas, como la presencia de carotenoides o ácidos grasos inusuales como el β -hidroxipalmítico. (Hoiczuk & Hansel. 2000).

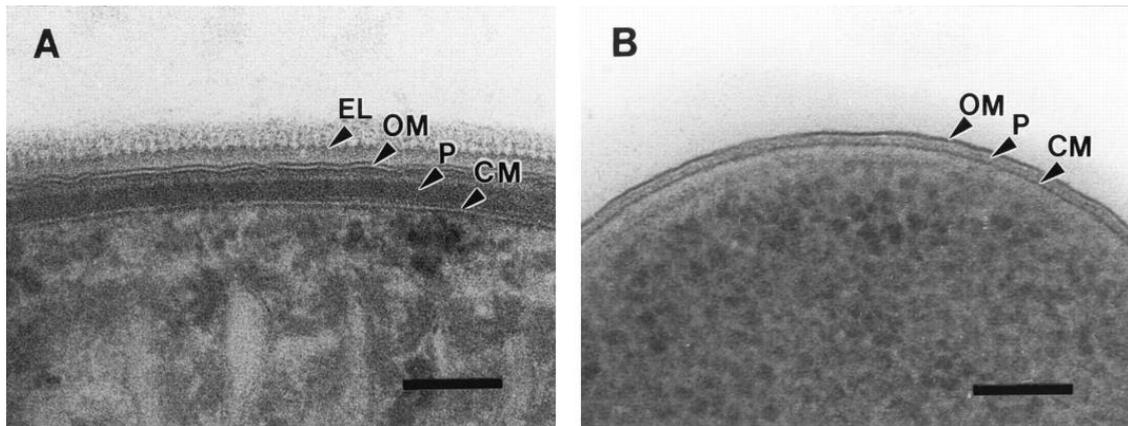


Figura 4. Comparación microscópica de la envoltura celular Gram-negativa de la cianobacteria *Phormidium uncinatum* (A) y *Escherichia coli* (B). Aquí se puede evidenciar la combinación de características de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas presentes en la pared celular de la cianobacteria. Como la gruesa capa de peptidoglicano y la membrana externa. Respectivamente: CM, membrana citoplasmática; EL, capa externa cerulada; OM, membrana externa; P, capa de peptidoglicano (la barra negra horizontal corresponde a 0,1 μm) (Tomado de Hoiczky & Hansel. 2000).

Las cianobacterias se encuentran poblando diversidad de hábitats. La gran diversidad fisiológica de las cianobacterias les permite estar presentes en una gran variedad de ecosistemas, poblando océanos, costas, suelos, y aguas continentales, proliferando exitosamente en ambientes extremos de salinidad y temperatura como géiseres, desiertos y regiones polares (González *et al.* 2013). De acuerdo a las condiciones nutricionales, las de vida acuática pueden crecer de forma masiva y sin control en lo que se ha denominado *blooms*, dando lugar a problemas medioambientales. Además, algunas estirpes de cianobacterias producen cianotoxinas (microcistinas, saxitoxinas, anatoxinas, entre otras) cuyo impacto ecológico es mayor debido a los procesos de *blooms*, lo que tiene relación con la eutrofización de las aguas (Malik *et al.* 2020).

La taxonomía tradicional clasificaba a las algas verde azules (nombre con el que se conocía anteriormente a las cianobacterias), de acuerdo al amplio rango de morfologías que exhiben. Como ya se mencionó, este grupo microbiano presenta gran diversidad en cuanto a tamaño y forma, las hay unicelulares y pluricelulares, filamentosas o coloniales. (Wilk *et al.* 2011; Herrero *et al.* 2016) (Figura 5).

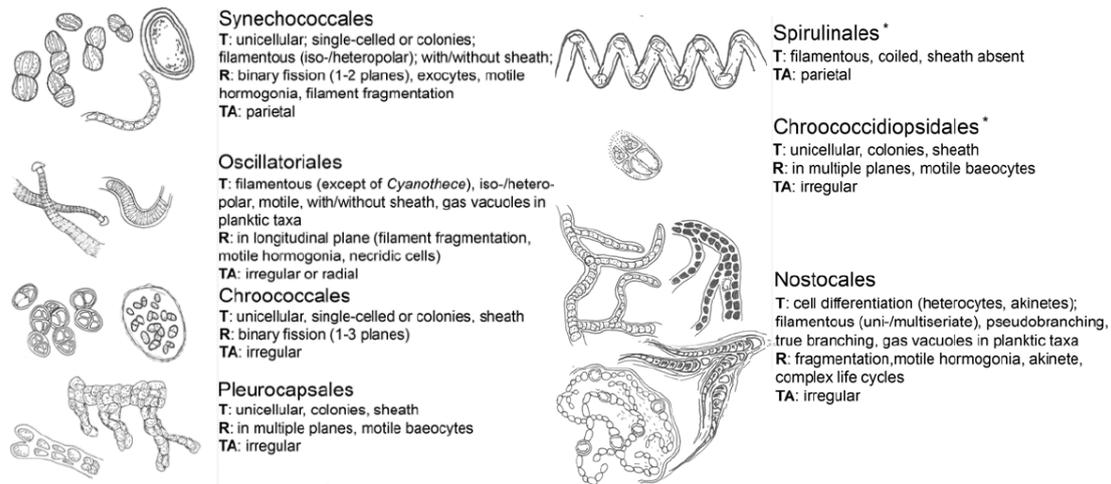


Figura 5. Esquema del nivel ordinario de clasificación taxonómica para cianobacterias propuesto por Komàrek *et al* 2014 y modificado por Dvorak 2017. El lado izquierdo contiene ejemplos de morfotipos para cada orden.

Posteriormente, los análisis basados en la secuenciación del rRNA 16S y de los genes *hetR*, el regulador que controla la diferenciación a heterocistos (Turner *et al.* 2001; Mazard *et al.* 2004; Huang *et al.* 2004; Zhaxybayeva *et al.* 2006) y el gen *rbcl* (Rubisco) (Singh *et al.*, 2015) permitieron un mejor acercamiento a la clasificación y filogenia de las cianobacterias, (Figura 6) (Sánchez-Baracaldo *et al.*, 2005).

1.2. El genoma de las cianobacterias

El genoma de las cianobacterias está formado por ADN bicatenario circular. El tamaño del genoma es diferente de acuerdo a la especie, variando desde 2 hasta 13 Mb y contienen varias copias de su genoma. La complejidad de las estructuras morfológicas de las cianobacterias, así como su habilidad para diferenciar distintos tipos de células está relacionada con el tamaño de su genoma. Por lo tanto, el proceso evolutivo de las cianobacterias depende de eventos de duplicación igual que en otros procariontes.

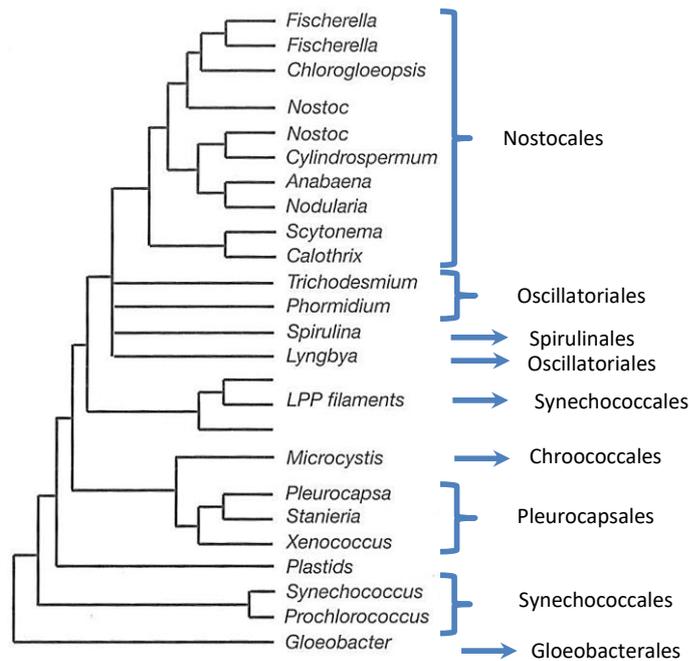


Figura 6. Relación filogenética entre cianobacterias, con base en comparación de secuencias (Sánchez-Baracaldo *et al.*, 2005., Modificado de Herrero & Flores., 2008).

Las cianobacterias más sencillas como *Synechococcus* spp. o *Synechocystis* spp. tienen un nivel de ploidía de hasta seis copias de su genoma. *Anabaena* sp. PCC7120 tiene un cromosoma de 6,4 Mb que contiene entre diez y veinte copias de su genoma (Wang *et al.* 2018). Además de su cromosoma, *Anabaena* sp. PCC7120 presenta seis megaplásmidos denominados α , β , γ , δ , ϵ , y ζ de 408, 187, 102, 55, 40 y 5 kb respectivamente (Kaneko *et al.* 2001).

La proporción de G+C es variable entre en cianobacterias, desde un 37 a un 71% dependiendo de la especie. El primer genoma secuenciado fue el de *Synechocystis* sp. PCC6830 (Kaneko *et al.* 1996). Actualmente la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG) contiene 127 genomas de cianobacterias en su página web (<https://www.genome.jp/kegg/>).

1.3. Diferenciación celular

Tal y como se ha comentado previamente, algunas cianobacterias pueden desarrollar células diferenciadas como mecanismo de defensa a condiciones ambientales adversas. Tras su diferenciación, en algunos casos, se establecen relaciones entre los diferentes tipos de células en el filamento. La conexión entre

células es de carácter nutricional o regulatorio (Kumar *et al.* 2010). Tres tipos de células especializadas son los más caracterizados hormogonios, acinetos y heterocistos (Figura 7).



Figura 7. Diferentes tipos de células presentes en cianobacterias formadoras de heterocistos, las flechas negras indican heterocistos, la flecha blanca señala un acineto y la flecha roja señala hormogonios en A. *Anabaena cylindrica*, B. *Anabaena* sp. PCC7120 y C. *Nostoc* sp. PCC 9203. Modificado de Flores & Herrero. 2009.

1.3.1. Hormogonios

Son cadenas cortas de células que se distinguen de las células vegetativas por su movilidad y por su menor tamaño. Suelen presentar vacuolas de gas y fototaxis, lo que les permiten flotar y buscar las áreas más iluminadas de su hábitat (Meeks & Elhai. 2002). Debido a la característica de movilidad de estas estructuras se cree que pueden intervenir en la dispersión de la cianobacteria en medios terrestres. También podrían intervenir en el establecimiento de relaciones simbióticas con otros organismos, principalmente con eucariotas. El género *Nostoc* por ejemplo, aumenta la producción de hormogonios en

presencia de *Anthoceros punctatus*, una planta con la cual establecen simbiosis (Campbell & Meeks. 1989, Francis *et al.* 2002).

La diferenciación de células vegetativas en hormogonios se lleva a cabo mediante una serie de divisiones celulares múltiples sin replicación del ADN o aumento de la masa celular. Aunque el ADN no se duplique, cada célula recibe al menos una copia del genoma. Tras las divisiones celulares el filamento se rompe y los hormogonios se desplazan. La diferenciación en hormogonios es sin embargo transitoria y se revierte pasadas 96 horas (Campbell and Meeks. 1989; Chang *et al.* 2019).

1.3.2. Acinetos

Los acinetos son células grandes, de pared gruesa que contienen gránulos de glucógeno, cianoficina y otras moléculas de reserva. Se desarrollan como respuesta a estrés en condiciones de baja intensidad lumínica, déficit de fosfato o exposición prolongada a bajas temperaturas (Sukenic *et al.* 2019). A diferencia de otras estructuras de resistencia, los acinetos mantienen parte de su actividad metabólica, sin embargo, en estas estructuras disminuyen procesos como la fijación del CO₂ y aumenta la respiración celular (Singh. 2019). Cuando las condiciones ambientales son nuevamente favorables para el desarrollo celular, los acinetos germinan mediante la lisis de su pared, permitiendo el desarrollo de un nuevo filamento (Perez *et al.* 2018). El gen responsable de la diferenciación de una célula vegetativa a acineto se denomina *avaK*. La mayoría de las bacterias que producen heterocistos son capaces de producir acinetos, lo que puede deberse a una relación evolutiva entre estas dos estructuras (Zhou & Wolk. 2002)

1.3.3. Heterocistos

La forma de diferenciación celular más estudiada en cianobacterias son los heterocistos, responsables de la fijación del nitrógeno (Wolk, 1996). Los heterocistos se producen como respuesta a condiciones de deficiencia de nitrógeno en el medio y se reconocen por ser células más grandes y de pared engrosada que están intercaladas entre cada 10-15 células vegetativas. El heterocisto pierde su actividad fotosintética, pues el proceso de fijación de

nitrógeno es incompatible con la fotosíntesis, debido a la alta sensibilidad de la nitrogenasa al oxígeno. Así, los heterocistos se desarrollan manteniendo un ambiente microaerofílico garantizando así la estabilidad de la enzima (Stal. 2017; Paerl. 2017) (Figura 8).

La diferenciación de una célula vegetativa a heterocisto es un proceso complejo que se inicia con el aumento de la ratio C/N y la acumulación de 2-oxoglutarato, que actúa como una señal de condiciones de nitrógeno limitado en el medio. Los niveles de 2-oxoglutarato son sensados por el regulador NtcA, que junto con HetR son esenciales para la correcta diferenciación y maduración del heterocisto (Flores & Herrero. 2010).

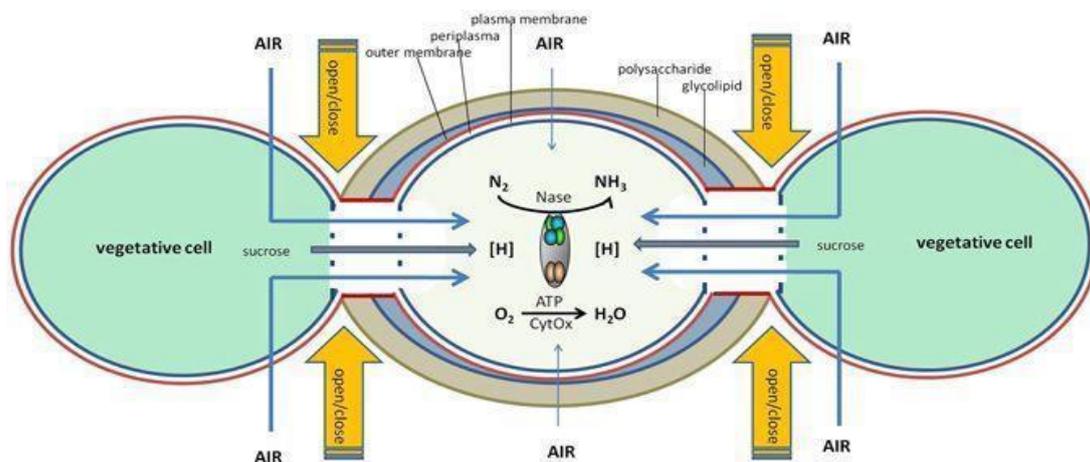


Figura 8. Modelo de un heterocisto rodeado de dos células vegetativas. El heterocisto se caracteriza por una envoltura compuesta por una capa de glicolípido que conforma la barrera principal de difusión de gases (flechas delgadas) y una capa de polisacárido. La envoltura rodea la pared celular con una membrana externa, una capa de petidoglucano y una membrana plasmática. Se ha propuesto que el intercambio gaseoso en heterocisto desde las células vegetativas puede estar regulado por un mecanismo de cierre y apertura (simbolizado con las flechas amarillas). El O_2 es asimilado para producir ATP. El N_2 y el O_2 compiten por electrones que son importados como sucrosa desde las células vegetativas. Los poros en los extremos del heterocisto algunas veces contienen cianoficina (un polímero de Poliaspartato-Multiarginina) Nase: Nitrogenasa; CytOx: Citocromo oxidasa; [H]: equivalente reductores (NAD(P)H, FdH) Derivados del metabolismo de la sucrosa, (tomado de Stal 2017).

Durante este proceso, en la célula vegetativa suceden una serie de cambios. Primero, la célula produce una capa interna de glicolípidos para evitar la difusión de gases al interior celular, simultáneamente se forma una capa externa de

polisacáridos para dar estabilidad a la envuelta de glicolípidos. El septo formado en la zona de contacto entre el heterocisto y la célula vegetativa adyacente reduce su tamaño. Posteriormente, los ficobilisomas se desmantelan y las ficobiliproteínas son degradadas, los aminoácidos que las componen son reciclados y las células en el proceso de formación del heterocisto adquieren una pigmentación diferente al de las células vegetativas. En los puntos de unión a las células vegetativas adyacentes se forman reservorios de nitrógeno en forma de cianoficina en estructuras denominadas gránulos polares (Flores & Herrero. 2010). Además, se desactiva el fotosistema II interrumpiendo así la producción de O₂ en la célula. Por lo tanto, la nitrogenasa solo tendrá que protegerse del oxígeno producido por las células vegetativas adyacentes, por ello hay un aumento en la tasa respiratoria del heterocisto, eliminando así el O₂ libre remanente, a la vez que aumentan las reservas energéticas en la célula.

En el heterocisto también se activa una alta actividad de la superóxido dismutasa de manganeso, para eliminar los radicales superóxido formados en la célula (Kaushik *et al.* 2017). La ruta principal de fijación de CO₂ es también desactivada, de esta manera las reservas energéticas y el poder reductor en la célula no se emplean en otras rutas metabólicas que no estén relacionadas con la fijación de nitrógeno (Meeks & Elhai. 2002; Kumar *et al.* 2010; Flaherty *et al.* 2011; Herrero & Flores. 2019).

1.4. Fijación de nitrógeno en cianobacterias filamentosas.

El nitrógeno puede llegar a constituir el 11% del peso seco de cianobacterias. Las cianobacterias usan como fuente de nitrógeno principalmente compuestos inorgánicos como amonio, nitrato y nitrito. Algunas especies tanto unicelulares como filamentosas, son capaces de asimilar el nitrógeno atmosférico (N₂), en un proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno. (Herrero *et al.* 2001, Bothe *et al.* 2010; Likens. 2010). La fijación biológica de nitrógeno corresponde a la siguiente ecuación:



Este proceso está catalizado por el complejo nitrogenasa reductasa, que está bastante conservado en procariotas (Thiel & Pratte. 2014). El complejo consta de dos partes: la dinitrogenasa reductasa y la dinitrogenasa, codificados por los genes *nifH*, *nifD* y *nifK*. La dinitrogenasa reductasa acepta equivalentes de reducción de la flavodoxina o la ferredoxina y los cede a la dinitrogenasa usando energía que derivada del hidrólisis de ATP. Durante este proceso, se consume una gran cantidad de energía (16 ATP por cada molécula de N₂) (Stal. 2017).

La enzima nitrogenasa requiere además la expresión de otros genes *nif*. En el cromosoma de los heterocistos de *Anabaena* sp. PCC7120 se encuentra un cluster de genes *nif* con la estructura: *nifB*–*fdxn*–*nifS*–*nifU*–*nifH*–*nifD*–*nifK*–*Orf*–*nifE*–*nifN*–*nifX*–*Orf*–*nifW*–*hesA*–*hesB*–*fdxH*. En el cromosoma de células vegetativas el cluster es similar, pero los genes *fdxN* y *nifD* están interrumpidos por fragmentos de 55 y 11 kb respectivamente que se escinden durante el proceso de maduración del heterocisto (Huang *et al.* 1999; Thiel & Pratte. 2014).

Algunas especies de cianobacterias fijadoras de N₂ forman asociaciones simbióticas con géneros como *Azolla*, *Cycas*, *Gunnera*, entre otros (Peters 1991).

Tomando en cuenta que la nitrogenasa es sumamente sensible al oxígeno, algunas especies de cianobacterias han desarrollado estrategias diferentes a la diferenciación de heterocistos, como la separación temporal de la fotosíntesis, llevando a cabo la fijación de nitrógeno en una misma célula en periodos diferentes de acuerdo al reloj circadiano (Berman-Frank *et al.* 2003; Woelfle & Johnson. 2006).

1.5. Adaptación a la salinidad

Los procesos de salinización en suelos debidos a la explotación de actividades agrícolas son un problema de importancia global, pues representan una amenaza a la seguridad alimentaria. Microorganismos como las cianobacterias son un componente fundamental de los ecosistemas y juegan un papel importante en procesos como los ciclos de carbono, nitrógeno y azufre (Newton *et al.* 2011; Linz *et al.* 2018) y por lo tanto desempeñan una labor en el mantenimiento de la fertilidad de los suelos (Aziz & Hashem. 2003; Abinandan

et al. 2019). Sin embargo, altos niveles de sal afectan los procesos metabólicos de estos microorganismos, reduciendo la diversidad y estructura de estas y otras comunidades microbianas y disminuyendo consecuentemente la fertilidad en suelos (Oren. 2008).

En condiciones ambientales, la salinidad en ecosistemas se debe generalmente a una mezcla de cationes como Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} y de aniones como Cl^- , SO_4^{2-} y HCO_3^- (Grieve & Grattan. 1999). Na_2SO_4 es prevalente en suelos marinos, así como en suelos destinados a la agricultura, irrigados con agua de mar o que han recibido deposición de gases de azufre atmosférico (Nriagu. 1978; Swapnil & Rai. 2018). El NaCl por su parte, es la sal predominante en procesos de salinidad en diferentes ecosistemas y por lo tanto su efecto en microorganismos es el más estudiado (Elanskaya *et al.* 2002, Pade & Hagemann. 2014, Swapnil *et al.* 2017).

En microorganismos como *Anabaena* spp, la salinidad induce estrés osmótico en las células al disminuir su potencial hídrico, causando la consecuente acumulación de iones intracelulares, afectando de esta manera la homeostasis iónica y alterando la permeabilidad de la membrana, ocasionando deficiencia de nutrientes (Swapnil *et al.* 2015). Estas alteraciones inducidas por la salinidad conducen a una serie de desórdenes metabólicos tales como cambios en la biosíntesis de pigmentos fotosintéticos, en la actividad de los fotosistemas I y II, en la fotosíntesis neta, la respiración, la síntesis de proteínas y la integridad de la membrana (Jeanjean & Matthijs. 1993; Hasegawa *et al.* 2000; Allakhverdiev *et al.* 2008; Rai *et al.* 2014; Swapnil *et al.* 2017). Por otra parte, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), produciendo como consecuencia daño oxidativo a la célula, conduciéndola a procesos de apoptosis (Swapnil *et al.* 2017). En cianobacterias fijadoras de nitrógeno, el estrés producido por altos niveles de salinidad afecta también la actividad de la enzima nitrogenasa (Moisander *et al.* 2002). Se ha reportado que concentraciones de 200 mM de NaCl incrementan los niveles de cAMP en cultivos de *Anabaena* sp. PCC7120. Ese metabolito podría estar actuando en una cascada de señalización con la consecuente expresión de algunos genes responsables de la diferenciación a heterocistos (Imashimizu *et al.* 2005).

Muchos organismos utilizan diferentes mecanismos de adaptación para sobrevivir estas condiciones de estrés, basados en la evolución de enzimas como superóxido dismutasas, peroxidasas, catalasas y glutatión reductasas. También se han desarrollado estrategias de defensa no enzimáticas como el uso de ácido ascórbico y glutatión (Paul *et al.* 2015). Para contrarrestar el efecto tóxico de altos niveles de salinidad, en plantas, por ejemplo, se incrementan la actividad enzimática y los niveles de moléculas antioxidantes. En cianobacterias, sin embargo, los estudios de respuesta a estrés salino son limitados (Latifi *et al.* 2009; Swapnil *et al.* 2017).

En procariontes se han desarrollado dos estrategias para la adaptación osmótica del citoplasma a los cambios en las concentraciones de sal. Una de estas estrategias está basada en la entrada de sal al citoplasma, principalmente grandes concentraciones (2-3 M) de iones inorgánicos de KCl, asegurando de esta manera la absorción de agua y el mantenimiento de la turgencia en la célula. Esta estrategia tiene un costo energético bajo, pero está restringida solo a un pequeño grupo de bacterias halófilas. Estos microorganismos extremófilos están altamente especializados a condiciones de altos niveles de salinidad, desarrollando evolutivamente proteínas con estructuras especializadas que se mantienen activas en medios ricos en sal (Müller & Oren. 2003; Oren. 2013).

Por el contrario, otros microorganismos como las cianobacterias cuando se enfrentan a altos niveles de salinidad, usan una estrategia basada en la expulsión de sal del citoplasma. La base de esta estrategia es mantener una baja concentración interna de iones y la adaptación osmótica es lograda mediante la acumulación de moléculas orgánicas pequeñas denominadas solutos compatibles, que tienen bajo peso molecular y carecen de carga neta y por lo tanto pueden acumularse hasta alcanzar altas concentraciones molares en el citoplasma, sin interferir con el metabolismo celular (Pade & Hagemann. 2014). Se han descrito variedad de moléculas actuando como solutos compatibles, desde aminoácidos y sus derivados hasta azúcares y polialcoholes (Poolman & Glaasker.1998).

En cianobacterias de agua dulce como *Synechocystis* sp. PCC6803 se ha descrito la acumulación de azúcares como trehalosa y sacarosa y otras

moléculas como glucosilglicerol y glicinia betaína actuando como solutos compatibles para resistir condiciones similares a las presentadas en ambientes marinos (600 mM NaCl). Estas moléculas parecen estar involucradas también en la resistencia a estrés por deshidratación (Potts. 1999; Singh *et al.* 2013). En esta cianobacteria, que se considera moderadamente halotolerante se han descrito entre 200 y 300 genes cuya regulación aumenta y otros 200 genes cuya regulación disminuye cuando la célula se enfrenta a altas concentraciones de sal (Marin *et al.* 2004). Algunos de estos genes en los que la regulación aumenta, son importantes para el proceso de aclimatación a la sal, por ejemplo, enzimas relacionadas con la síntesis y transporte de glucosilglicerol y proteínas que defienden a la célula de especies reactivas de oxígeno (ROS) como *sodB*. Las altas concentraciones de sal también promueven la producción de cAMP y aumentan la regulación de genes relacionados con el desarrollo de heterocistos, así como genes de transportadores de tipo ABC y genes de glicosiltransferasas (Imashimizu *et al.* 2005; Pade & Hagemann. 2014) Así mismo, en *Anabaena* spp. y otras cianobacterias del orden Nostocales una variedad de oligosacáridos y aminoácidos como la prolina, desempeñan el papel de solutos compatibles (Fischer *et al.* 2006, Singh *et al.* 2013). Otra estrategia utilizada por las cianobacterias para resistir las condiciones adversas que representa un entorno salino es la síntesis de exopolisacáridos y la formación de *biofilms*, que se describirá más adelante (ver apartado 1.10).

1.6. Metabolismo del hierro en procariontes

Procesos importantes en cianobacterias como la fotosíntesis oxigénica y la fijación del nitrógeno dependen en gran medida de la disponibilidad de hierro, siendo cofactor de proteínas transportadoras y de enzimas esenciales. La regulación de la homeostasis del hierro es muy importante también, para disminuir la exposición al daño celular por estrés oxidativo debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (Latifi *et al.* 2009). El hierro es un metal esencial en diversidad de procesos biológicos en microorganismos como la metanogénesis, el ciclo del ácido tricarboxílico, la regulación génica y la síntesis de ADN. Este metal se puede incorporar a las proteínas de diferentes maneras; como especie mono o binuclear, o siendo parte de estructuras más complejas como clúster sulfoférricos y grupos hemo (Rudolf *et al.* 2015).

A pesar de ser el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre, el hierro es un nutriente muy poco biodisponible debido a que se encuentra predominantemente en estado ferroso, que es muy insoluble a pHs fisiológicos. Por ello, todos los seres vivos han desarrollado diferentes estrategias de captación e incorporación de este nutriente esencial para su supervivencia. Una de las estrategias más frecuentes de captación de hierro por parte de los microorganismos es el uso de sideróforos, moléculas de menos de 1000 Da, que tienen una gran afinidad por el ion en cuestión y que son secretadas al medio cuando hay deficiencia del mismo (Årstøl & Hohmann-Marriott. 2019). Sin embargo, se da la paradoja de que un exceso de hierro es nocivo para la célula, ya que este metal cataliza la producción de radicales hidroxilos mediante reacciones de Fenton (Miller *et al.* 2016). Por ello, la homeostasis de hierro está estrictamente regulada en prácticamente todos los seres vivos. En procariotas, dicha regulación tiene lugar fundamentalmente por proteínas de la familia FUR (Ferric Uptake Regulator). Las proteínas FUR constituyen una de las familias de metalorreguladores más importantes en procariotas (Sevilla *et al.* 2021). Estas actúan de forma conjunta para mantener la homeostasis del hierro (Fur) y de otros metales divalentes como Zn^{2+} , Mn^{2+} o Ni^{2+} al interior de la célula, cumpliendo la función de reguladores transcripcionales de genes que intervienen en el transporte y asimilación de estos nutrientes.

1.6.1. La familia de reguladores FUR. Características generales.

Las proteínas FUR son cruciales para la correcta regulación de la homeóstasis de metales en procariotas. Fur (Ferric Uptake Regulator) es un regulador global que le da nombre a la familia y controla la homeostasis de hierro. Otros miembros de esta familia son Zur, Mur y Nur, responsables de la homeóstasis de zinc, manganeso y níquel respectivamente. Además, PerR controla la respuesta a estrés por peróxido y en alphaproteobacterias como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, Irr regula la respuesta a hierro detectando los niveles celulares de hemo (Fillat. 2014).

Además de controlar la homeostasis del hierro, muchos homólogos de FUR exhiben una gran variedad de funciones biológicas de acuerdo al metal regulador, y regulan mediante mecanismos directos o indirectos la expresión de

genes implicados en la respiración, resistencia al estrés oxidativo, glucólisis, ciclo del ácido tricarboxílico y síntesis de factores de virulencia (Andrews *et al.* 2003; Lee & Helmann. 2007). Por ejemplo, en *Salmonella enterica*, Fur media la expresión de genes implicados en tolerancia a estrés ácido, es decir que además de los niveles de hierro Fur responde también a otras señales ambientales (Hall & Foster. 1996; Wange *et al.* 2018).

Las proteínas de la familia FUR son ubicuas en procariontes. En el momento de redactar esta memoria, se registran en la base de datos Pfam (<http://pfam.xfam.org/family/PF01475>) más de 1700 secuencias que corresponden aproximadamente a 700 especies. Se asume que la forma activa de los parálogos FUR *in vivo*, y por lo tanto la que tiene capacidad de unirse al ADN, es un homodímero.

En general, las proteínas FUR actúan como un represor clásico: Cuando el metal co-represor (Me^{2+}) se encuentra en altas concentraciones, ocupa los sitios reguladores de FUR y como consecuencia se reprime la transcripción de los genes de adquisición de hierro. Esta represión es posible gracias a la unión del dímero del regulador a los promotores de los genes diana, impidiendo así el acceso de la RNA polimerasa y parando la maquinaria de la transcripción de estos genes. En el caso contrario, en condiciones de bajas concentraciones de metal regulador, FUR se encuentra en su forma apo, disociándose del ADN y permitiendo la transcripción (Lee & Helmann. 2007). En la mayoría de microorganismos, el sitio de unión a ADN por parte del complejo Fur- Me^{2+} se ubica en torno a los sitios -10 y -35 de los promotores de los genes que serán reprimidos.

Las secuencias consenso que se han determinado para los sitios de unión al ADN (FUR boxes) de los principales parálogos de la familia (Fur, Zur y PerR) presentan entre sí una considerable homología, con abundancia de adeninas y timinas (GATAATGATwATCATTATC, siendo w = A o T) (Lee & Helmann. 2007). Esta FUR box se definió inicialmente en ensayos de huella genómica usando el promotor de un sideróforo de *E. coli* (De Lorenzo *et al.* 1988). Posteriormente se determinó que en dependencia de los niveles de hierro la proteína Fur de *Helicobacter pylori* se une a secuencias semejantes, reprimiendo la expresión de

genes relacionados con la asimilación de hierro como *frpB* (Delany *et al.* 2001; Dian *et al.* 2011). En *Bacillus subtilis*, Fur y PerR se unen con gran afinidad a diversidad de secuencias de ADN, con una diferencia de apenas dos nucleótidos en sus respectivas FUR boxes. Esta similitud indica como evolutivamente se han desarrollado de forma cercana estas proteínas para tener propiedades biológicas distintivas con el cambio de apenas uno o dos aminoácidos (Caux-Thang *et al.* 2014). Con respecto a Zur, en 2008 se habían definido en *B. subtilis* al menos 10 genes relacionados con la homeóstasis del zinc, que eran reprimidos por este regulador. Uno de estos genes es *yciC*, una probable metalochaperona cuya región reguladora contiene dos Zur boxes funcionales denominadas C1 y C2. Zur se une a estos dos sitios mediando la represión de *yciC* en dependencia de zinc. Estudios de delección demostraron que la unión de Zur a cualquiera de estas dos Zur boxes es suficiente para reprimir la expresión de *yciC*, sin embargo, la unión de Zur a C2 es más eficiente (Gabriel *et al.* 2008).

En cuanto a su estructura, las proteínas de la familia FUR presentan un bajo peso molecular, entre 13 y 20 kDa, y escaso contenido en triptófano. Las proteínas FUR tienen un dominio N-terminal con una estructura hélice-giro-hélice, que es el sitio de unión al ADN. Por otro lado, presenta un dominio C-terminal, responsable de la dimerización y un motivo rico en histidinas (H2XHX2CX2C) en el comienzo del C-terminal, justo después de la región que separa ambos dominios. Algunos miembros de esta familia poseen con menor grado de conservación un motivo CXXC adyacente al C-terminal (Figura 9).

Cada uno de los monómeros que componen el dímero, presentan dos o más sitios de unión a metal. El sitio 1, es necesario para mantener la conformación adecuada de la proteína. El metal de este sitio suele estar coordinado por cuatro cisteínas organizadas en dos motivos CXXC. El metal estructural en este caso suele ser zinc, aunque esta condición no es universal para todas las proteínas FUR. El sitio 2 es el responsable de la unión al metal regulador y el sitio 3, (que no siempre está presente) es responsable de la estabilidad del dímero y está localizado en el dominio C terminal (Pecqueur *et al.* 2006; Fillat *et al.*, 2014) (Figura 9).

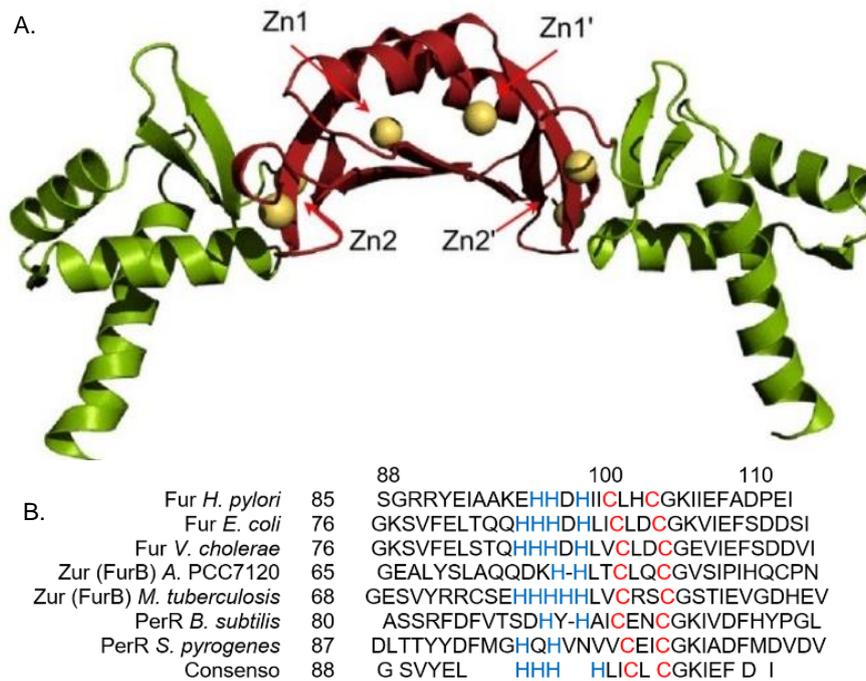


Figura 9. Modelo tridimensional generado con PyMol del dímero de FurB de *Mycobacterium tuberculosis*, (A) se presenta el dominio de unión de ADN al N-terminal en verde y el dominio de dimerización del C-terminal en rojo. Todos los iones de zinc (Zn^{2+}) se muestran como esferas doradas. Los sitios de regulación putativa aparecen marcados como Zn1 y Zn1' y los sitios estructurales como Zn2 y Zn2' respectivamente. (B) alineamiento de las secuencias de los motivos ricos en histidina de diferentes parálogos de FUR. Tomado de: (Lucarelli *et al*, 2008., Fillat 2014).

En algunos casos, se ha descrito la activación por Fur de algunos genes que codifican proteínas de almacenamiento de hierro, como ferritina, superóxido dismutasa, succinato deshidrogenasa y bacteroferritina entre otros (Andrews *et al.*, 2003). Ninguno de los genes de estas proteínas contiene las FUR boxes en sus promotores, por lo tanto, su activación por Fur se lleva a cabo de forma indirecta (Masse & Gottesman., 2002). En este caso se ha descrito un pequeño ARN antisentido, denominado RyhB, cuya transcripción está reprimida por Fur. Cuando los niveles de hierro intracelular son bajos, Fur está en forma apo y no se une al ADN, permitiendo la síntesis de RyhB, este ARN antisentido impide la traducción de los mensajeros de los genes de almacenamiento de hierro (Oglesby-Sherrouse & Murphy. 2013). Este mecanismo no es único de *E. coli*, ya que se han identificado otros RNAs antisentido con función similar a RyhB (RfrA, PrrF, PrrH, NrrF, ArrF, FsrA, RNA α) en microorganismos como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Shigella sp.*, *S. enterica*, *Klebsiella pneumonia*, *Yersinia pestis*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoea*,

Azotobacter vinelandii, *B. subtilis*, *Vibrio anguillarum* entre otros (Wilderman *et al.*, 2004, Oglesby *et al.*, 2008., Murphy & Payne., 2007, Padalon-Brauch *et al.*, 2008, Huang *et al.*, 2012, Deng *et al.*, 2012, Mellin *et al.*, 2007, Ducey *et al.*, 2009, Jung *et al.*, 2008, Smaldone *et al.*, 2012, Chen & Crosa. 1996). En cianobacterias se han reportado también este tipo de RNA antisentido regulando en dependencia de hierro procesos como la fotosíntesis en *Synechocystis* (IsrR) (Duhring *et al.*, 2006) o la propia Fur (α -*furA*) en *Anabaena* (Hernandez *et al.*, 2006) y otras cianobacterias unicelulares (Sevilla *et al.*, 2011).

Por otra parte, Fur también puede actuar como activador de la transcripción sin la intervención de un ARN antisentido. Esta activación puede llevarse a cabo por la competencia de Fur como represor por la unión a ADN, también puede darse por cambios conformacionales en el ADN causados por Fur, favoreciendo la unión de la RNA polimerasa (Delany *et al.*, 2004).

1.6.2. Proteínas de la familia Fur de *Anabaena* sp. PCC7120

En *Anabaena* sp. PCC7120, el motivo rico en histidinas (H2XH2CX2C) característico de las proteínas Fur, está presente en tres parálogos denominados *all1691(furA)*, *all2473(furB)* y *alr0957(furC)* (Hernández *et al.*, 2004).

1.6.2.1. FurA

FurA de *Anabaena* sp. PCC7120, presenta una alta homología con las proteínas Fur de bacterias heterótrofas, (40-45%). Consta de 151 aminoácidos, que además de contener la característica secuencia rica en histidinas, presenta cinco residuos de cisteína. Cuatro de estos residuos están dispuestos en motivos CXXC (C₁₀₁VKC₁₀₄C₁₄₁PKC₁₄₄). Esta configuración está altamente conservada en las distintas Fur de cianobacterias. Se ha caracterizado el papel de estos residuos de cisteína y su relación con la actividad disulfuro reductasa de este regulador (Botello-Morte & Fillat. 2014).

FurA es de vital importancia para el desarrollo y supervivencia de la célula, por esta razón los intentos para construir mutantes de delección inactivando su expresión, han dado como resultado estirpes inviables. Como alternativa para abordar el estudio de FurA en *Anabaena* sp. PCC7120, se ha construido una estirpe de sobreexpresión de *furA* (AG2770FurA) permitiendo la caracterización

fenotípica y genotípica de esta cepa y las implicaciones de FurA en la regulación de distintos procesos biológicos. (Gonzalez *et al.*, 2010). Por otra parte, la transcriptómica comparada de un mutante letal condicional, ha permitido completar la identificación del amplio regulón de FurA (González *et al.*, 2016). Además de intervenir en el proceso de captación y almacenamiento de hierro, FurA participa en la regulación de diferentes rutas metabólicas, relacionadas con la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis entre otras (Gonzalez *et al.*, 2010, González *et al.*, 2012, González *et al.*, 2016). La unión de esta proteína con el ADN siempre se produce en condiciones reductoras y en presencia del metal co-represor. Por lo tanto, la actividad de esta proteína depende la disponibilidad de hierro y del estado redox de la célula (Hernández *et al.*, 2006).

Dada su importancia, FurA se encuentra regulada por mecanismos transcripcionales, postranscripcionales y postraduccionales. A nivel transcripcional, se lleva a cabo un proceso de autorregulación negativa, esta autorrepresión de FurA permite mantener sus niveles debajo de un umbral determinado en el interior de la célula. (Hernández *et al.*, 2002, Hernández *et al.*, 2006). Por otra parte, FurA está modulada por FurB y por NtcA (Hernandez *et al.*, 2004; Lopez-Gomollon *et al.*, 2007). Postranscripcionalmente, FurA es regulada por el ARN antisentido α -*furA*. Este ARN es codificado por un gen adyacente a *furA* y solapa completamente con su ARN mensajero (Hernandez *et al.*, 2006). Procesos similares de regulación de *fur* mediante ARN antisentido, se han descrito en otras cianobacterias como *Microcystis aeruginosa* PCC7806 y *Synechocystis* sp. PCC6803 (Sevilla *et al.*, 2011). Postraduccionalmente, la actividad de FurA está modulada mediante su unión a hemo y a 2-oxoglutarato. La unión de cada uno de estos efectores dificulta la unión del regulador a sus secuencias diana (Hernandez *et al.*, 2004, Guío *et al.* 2020).

1.6.2.2. FurB (Zur)

El parólogo FurB corresponde al regulador Zur (zinc uptake regulator). Esta proteína contiene 132 aminoácidos, 5 de ellos son residuos de cisteína, dispuestos de la misma manera que en FurA CXXC (C₈₁LQC₈₄ y C₁₂₁GKC₁₂₄). Como regulador transcripcional, FurB actúa como un represor clásico. Se une directamente al ADN en forma de dímero e impide la transcripción de los genes

diana. Esto se lleva a cabo siempre en condiciones reductoras y en presencia de zinc, que es en este caso el metal regulador. Se han identificado diferentes genes regulados por FurB, entre ellos metalochaperonas, parálogos de metaloproteínas de zinc, y transportadores de la superfamilia ABC, entre otros (Napolitano *et al.* 2012).

La caracterización de mutantes de delección y sobreexpresión de FurB ha demostrado que en *Anabaena* sp. PCC7120 FurB es un factor clave en la respuesta a estrés oxidativo, aumentando la resistencia de la cepa a peróxido de hidrógeno cuando FurB se encuentra sobreexpresada (Sein-Echaluze *et al.*, 2015). En condiciones normales de cultivo el nivel de expresión de FurB en *Anabaena* es inferior al nivel de expresión de FurA, sin embargo, el nivel de expresión de FurB aumenta en condiciones de estrés oxidativo mediado por peróxido de hidrógeno. FurB además se une al ADN de forma inespecífica y lo protege de radicales hidroxilo y DNAsa I. Por lo tanto, se ha sugerido que FurB tiene doble función en la célula, actuando como regulador génico y como protector del ADN dependiendo de su nivel de expresión (López-Gomollón *et al.*, 2009). Al igual que FurA, FurB puede ser regulado postraduccionalmente al unirse al grupo hemo provocando un cambio conformacional e inhibiendo así su unión al ADN (López-Gomollón *et al.*, 2009)

1.6.2.3. FurC (PerR)

FurC corresponde al parálogo PerR (Peroxide response) (Yingping *et al.*, 2014) y presenta una menor homología con las otras proteínas Fur descritas. Consta de 149 aminoácidos, tres de ellos son residuos de cisteína, ninguno de los cuales forma parte de motivos CXXC. FurC no se une a los promotores de los otros genes *fur* de *Anabaena*, sin embargo, FurC modula la capacidad de unión de FurA y FurB al ADN aumentando la afinidad de FurA y disminuyendo la de FurB. A diferencia de sus parálogos, FurC no une hemo (López-Gomollón., 2009). La expresión de FurC aumenta en condiciones de estrés oxidativo mediado por peróxido de hidrógeno o metil viológeno (Latifi *et al.*, 2005). Al igual que FurA, construir mutantes de delección resulta en estirpes inviables. Los estudios de nuestro grupo llevados a cabo con estirpes de sobreexpresión de FurC de *Anabaena* (EB2770FurC) demostraron que en esta cianobacteria hay una

conexión mediada por *furC* entre la respuesta a estrés oxidativo y el metabolismo fotosintético. La sobreexpresión de *furC* disminuye la tasa de fotosíntesis y aumenta la actividad respiratoria de la célula. Así mismo, la estirpe de sobreexpresión presenta alteraciones en la composición y eficiencia de los dos fotosistemas. Además de ser un regulador de la respuesta a peróxido, FurC controla de forma directa genes como *ftsH* (proteasa de la membrana del tilacoide) que está relacionada con el metabolismo del PSII (Sevilla *et al.*, 2019).

1.7. Producción de *biofilms* en cianobacterias

Una de las muchas características que permiten a las cianobacterias adaptarse con éxito a entornos hostiles es su capacidad para formar *biofilms*. Los *biofilms* son matrices poliméricas extracelulares, que favorecen la formación de asociaciones microbianas con grados de complejidad variables. Estructuralmente esta matriz está formada por un conglomerado de ADN, proteínas, diversos polisacáridos (denominados exopolisacáridos) y otras sustancias poliméricas de naturaleza extracelular que le confieren una consistencia coloidal o gelatinosa por contener varias veces su peso en agua (De Philippis *et al.*, 2001, Pereira *et al.*, 2009, Rossi & De Philippis., 2016, Delattre *et al.*, 2016).

La habilidad de los microorganismos para producir *biofilms* es una respuesta directa a la presión selectiva del medio ambiente (Steenackers *et al.*, 2016). La síntesis de *biofilms* en procariontes se activa como respuesta a diferentes factores, como señales nutricionales, el reconocimiento de sitios de unión a superficies o sustratos específicos, o factores adversos como la desecación, una alta intensidad lumínica o la disponibilidad de nitrógeno combinado. El conjunto de bacterias que pertenece a la comunidad del *biofilm* tiene la posibilidad de compartir nutrientes y defenderse contra factores ambientales desfavorables como la deshidratación, el sistema inmunológico (en el caso de bacterias patógenas) o concentraciones subinhibitorias de antibióticos o altos niveles de salinidad (An & Parsek, 2007).

El crecimiento de una colonia como parte del *biofilm* implica que su comportamiento metabólico respecto a una colonia creciendo en condiciones estándar, sufre cambios que son regulados por un conjunto de genes

diferenciados, que son el principal objeto de interés de diferentes estudios en la actualidad para una gran variedad de microorganismos. Los mecanismos de regulación génica responsables del fenotipo las cianobacterias formando parte de *biofilms* están siendo dilucidados en la actualidad y muy probablemente están relacionados con las diferencias en la expresión de polisacáridos sintetizados hacia el exterior celular (exopolisacáridos). Estos exopolisacáridos tienen una gran relevancia en la formación del *biofilm* por su papel estructural, de adhesión y de protección contra diferentes tipos de estrés. (Lembre *et al*, 2012).

1.7.1. Exopolisacáridos de cianobacterias (EPSs).

Muchas cianobacterias se encuentran rodeadas por capas externas mucilaginosas (Figura 10), que con el tiempo han sido denominadas de diferentes formas, tales como capsula, vaina, mucílago, glicocálix o limo bacteriano.

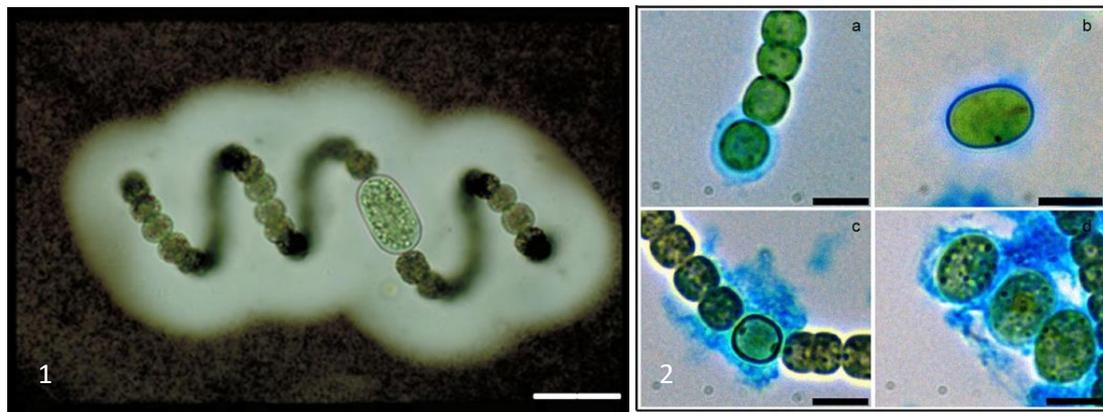


Figura 10. En 1. *Anabaena* spp. con filamentos en espiral embebida en limo y observada al microscopio después de tinción con tinta china (la barra blanca horizontal corresponde a 4,6 μ m) (fotografía de Canter-Lund, 2008 tomada de Freshwater Biological Association.-environmentdata.org). 2. visualización de la capa de exopolisacáridos formados sobre heterocistos y acinetos en campo brillante después de teñir con Alcian-Blue en *Anabaena* (a y b) y *Nostoc* (c y d) (las barras negras horizontales corresponden a 3 μ m) (tomado de Pérez *et al* 2018).

Este material extracelular mucilaginoso es básicamente de naturaleza polisacáridica y puede estar formando diferentes estructuras: La vaina o capsula que es una capa delgada de estructura uniforme que cubre la membrana celular externa y presenta fibras radiales o concéntricas de acuerdo a la cepa. El limo

bacteriano o mucílago se encuentran en estructuras más externas y resulta difícil de diferenciar de la cápsula en algunos casos. Sin embargo, a diferencia del limo bacteriano, los polisacáridos capsulares están asociados con la superficie celular mediante enlaces covalentes formando límites bien definidos. Finalmente, también se sintetizan polisacáridos solubles que son liberados por diversidad de cianobacterias al medio (Li *et al.*, 2013).

Las cianobacterias contribuyen principalmente a la síntesis de estos EPSs que forman parte de *biofilms* mixtos, lo que permite a estos microorganismos ser los primeros colonizadores de ambientes intervenidos, como suelos desérticos y sustratos en estado de descomposición o contaminados con agroquímicos, lo que resulta de gran interés en el estudio de la recuperación de suelos erosionados por procesos agrícolas. En la Tabla 1 se resumen algunas de las funciones de los EPSs de cianobacterias. Dependiendo de las características del polímero secretado, como su peso molecular, su grado de ramificación y su ultraestructura, los EPSs pueden presentar diferentes propiedades y actividades biológicas.

Tabla 1. Papel de los exopolisacáridos sintetizados por cianobacterias en procesos de adhesión, estructura, protección contra el estrés abiótico, procesos de bio-mineralización, motilidad bacteriana y reposición de nutrientes en *biofilms* (modificado de Rossi & De Philipis 2015).

Papel de los exopolisacáridos (EPSs) en la formación de <i>biofilms</i>	
Adhesión	La adhesión es determinada por las características hidrófobas de los EPSS
Estructura	La matriz polimérica extracelular constituida por EPSs confiere estructura al sistema poroso del suelo y determina la organización de partículas del suelo.
Protección contra estrés abiótico	Los EPSs contrarrestan el estrés hídrico, el estrés producto de la exposición a rayos U.V. y estreses de tipo físico y químico.
Procesos de bio-mineralización	Los EPSs promueven la concentración de minerales
Motilidad	La excreción de EPSs está involucrada en procesos de propulsión celular
Reposición de nutrientes	Los EPSs contribuyen a la concentración de nutrientes y representan una fuente de carbono para microorganismos heterotróficos.

Hay un interés creciente en los EPSs producidos por microalgas y cianobacterias y sus aplicaciones en la medicina y la industria (Li *et al.* 2001; Rossi & De

Philippis, 2016; Kumar *et al.* 2018). Se ha reportado su potencial en la industria alimenticia como estabilizantes, espesantes y emulsionantes (Jolly *et al.* 2001; Bixler & Porse, 2010; Zhang *et al.* 2011; Chun-lei *et al.* 2014). También se han estudiado las cualidades farmacéuticas de los EPSs, como antivirales y antitumorales (Pugh *et al.*, 2001) (Talyshinsky *et al.*, 2002; Chen *et al.* 2013), así como aplicaciones en otros campos como gomas o floculantes (Khangembam *et al.* 2016; Tiwari *et al.* 2015). A pesar de la importancia de los EPSs de cianobacterias, muchos aspectos relacionados con sus funciones y los factores bióticos y abióticos responsables de su síntesis aún se desconocen.

1.7.2. Características fisicoquímicas de los EPSs de cianobacterias.

Los EPSs son heteropolímeros de alto peso molecular de naturaleza polisacáridica. Los EPSs producidos por cianobacterias poseen algunas particularidades, como la presencia de grupos sulfato (una característica compartida con algunos eucariotas y con arqueas, pero no con otros procariotas), presencia de ácidos urónicos (constituyentes que confieren un carácter aniónico y permiten la adhesión a otras macromoléculas), presencia de pentosas (xilosa, arabinosa y ribosa), alta afinidad por los cationes metálicos y otras moléculas cargadas positivamente o polares (gracias a su superficie con carga negativa), presencia de desoxi-azúcares (ramnosa y fucosa) y péptidos y grupos acetilo unidos a ésteres que pueden conferir un carácter hidrófobo parcial a estas moléculas (Li *et al.*, 2013).

Monosacáridos como galactosa y glucosa se encuentran en más del 90% de los polímeros que forman EPSs de cianobacterias, aunque en algunos casos otros monosacáridos como arabinosa, xilosa o fucosa, pueden estar presentes en mayores cantidades relativas que la glucosa. *Microcystis wesenbergii* representa un caso particular, produciendo un polímero constituido exclusivamente por ácido urónico. Otros monosacáridos abundantes formando parte de los EPSs de cianobacterias son: ramnosa, manosa, ácido galacturónico y ácido glucurónico, y con menor abundancia: galactosamina, glucosamina, ribosa, fructosa y menos abundantes: N-acetil glucosamina, 2,3-O-metil-ramnosa, 3-O-metil-ramnosa, 4-O-metil-ramnosa, 3-O-metil glucosa. (Rossi & De Philippis, 2015).

Estos monosacáridos se organizan en estructuras poliméricas que contienen desde dos hasta nueve unidades dependiendo de la especie y la cepa evaluada, siendo más comunes las estructuras con cinco monosacáridos, organizados en cadena o ramificados que pueden, además, estar unidos a proteínas (Li *et al.*, 2013). Los exopolisacáridos incrementan la capacidad de colonización de las cianobacterias en entornos hostiles, haciendo frente a distintos estreses:

- **Tolerancia a la deshidratación.** Además de representar una barrera física que protege a las células durante condiciones de deshidratación, los exopolisacáridos tienden a ser higroscópicos. La presencia de cadenas laterales que contienen ácido urónico confieren carga a la molécula, aumentando su solubilidad y mejorando la habilidad de los EPSs de cianobacterias de unirse a moléculas de agua (Sutherland. 1994; Okajima *et al.* 2018). Pueden por lo tanto disminuir la pérdida de agua en células y contribuir como depósito hídrico (Potts. 1994; Helm *et al.* 2000; Yoshimura *et al.* 2007).

- **Tolerancia a la radiación ultravioleta.** Experimentos en *Nostoc commune*, han demostrado que la exposición a la radiación ultravioleta aumenta la producción de exopolisacáridos hasta tres veces. La acumulación de exopolisacárido en el medio disminuye la absorción de la radiación U.V. al aumentar consecuentemente la longitud del recorrido óptico de la misma, protegiendo así a las células del daño ocasionado por este tipo de exposición. En condiciones de estrés lumínico las cianobacterias tienden además a acumular radicales superóxido (Ehling-Schulz *et al.* 1997; Rastogi *et al.* 2015). La producción de exopolisacáridos bajo estas circunstancias provee además una matriz para los pigmentos microsporina y cionemina, que actúan como fotoprotectores contra los rayos UVA y UVB (Böhm *et al.*, 1995, Wenjuan *et al.*, 2016).

- **Tolerancia a metales pesados.** Los exopolisacáridos de cianobacterias interactúan fuertemente con diferentes cationes. Experimentos con *Microcystis aeruginosa* han demostrado que 30% del Fe adicionado al medio es acumulado en sus EPSs (Nakagawa *et al.*, 1987, Liu *et al.*, 2018). Los EPSs de *Anacystis nidulans* son por otro lado sumamente receptivos a la asimilación de Ni (75%)

(Asthana *et al.*, 1995., Huertas *et al.*, 2014). Otros exopolisacáridos exhiben afinidad por metales pesados como los EPSs de *Phormidium laminosum*, que captan en orden de mayor a menor: Pb, Fe, Cd, Cu, Zn, Ni (Sanprede *et al.* 1995; De Philippis *et al.* 2011). Aparentemente los EPSs pueden concentrar elementos metálicos esenciales y proveer de un microambiente rico en cationes metálicos disponibles entorno a la célula (Pereira *et al.*, 2009). Por otro lado, la acumulación de metales pesados puede deberse a una estrategia evolutiva de defensa, que le permitiría a las cianobacterias usar estos elementos como toxinas (Tease & Walker. 1987; De Philippis *et al.* 2001; Thichakorn. 2013; Bhunia *et al.* 2018).

1.7.3. Biosíntesis de exopolisacáridos de cianobacterias.

Los exopolisacáridos bacterianos son sintetizados bajo una gran variedad de condiciones y en diferentes fases de crecimiento dependiendo de la bacteria estudiada (Sutherland, 2001). Además, se ha observado que parámetros ambientales, nutricionales, químicos y físicos, afectan a dicha biosíntesis (Rossi & De Philippis. 2015). Estudios llevados a cabo en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas revelan que las rutas metabólicas aparentemente responsables de la síntesis de EPSs dependen de enzimas que también sintetizan polisacáridos y lipopolisacáridos que forman la pared celular (Whitfield., 1988, Mozzi *et al.*, 2003). Sin embargo, la presencia de monosacáridos de naturaleza ácida o neutra, sugieren que los exopolisacáridos de cianobacterias son producidos en rutas metabólicas más complejas. Los exopolisacáridos se sintetizarían en la célula y luego se liberarían a través de la pared celular al medio (De Philippis *et al.*, 2001, Pereira *et al.*, 2009). Las diferencias cualitativas en la composición de los polisacáridos extracelulares y los intracelulares, indican que además de las rutas metabólicas implicadas en la síntesis y ensamblaje de exopolisacáridos, hay un mecanismo selectivo de secreción (Rossi & Philippis., 2016).

El mecanismo de síntesis de EPSs parece estar altamente conservado en diferentes bacterias. Inicialmente se produce la activación de monosacáridos y su conversión a nucleótido-azúcares en el citoplasma. Estos nucleótido-azúcares actúan como donadores en reacciones de glucosilación que son

llevadas a cabo por glicosiltransferasas. Posteriormente ocurre el ensamblaje de unidades repetitivas por la adición secuencial de azúcares a un vehículo lipídico mediante glicosiltransferasas en la membrana plasmática. A continuación, se produce la polimerización de unidades repetitivas en la cara periplasmática de la membrana celular y finalmente el polímero se transporta a la superficie celular. Las enzimas encargadas de la activación y las glicosiltransferasas son específicas de cada cepa, mientras que las proteínas involucradas en la polimerización, longitud de la cadena, y el transporte son conservadas entre bacterias (Pereira *et al*, 2009).

Con base a diversas observaciones hechas en otros microorganismos, en cianobacterias se han propuesto dos rutas metabólicas diferentes implicadas en la biosíntesis y transporte de EPSs al medio (Figura 11). Una de estas rutas depende de la polimerasa de Wzy y la otra es dependiente de transportadores de tipo ABC (Willis & Whitfield. 2013; Christmas *et al*, 2016).

En el sistema dependiente de Wzy (Figura 11), exclusivo de heteropolisacáridos a menudo ramificados, la síntesis es mediada por glicosiltransferasas ubicadas en la cara citoplasmática de la membrana interna específicas para cada azúcar y tipo de enlace glicosídico y la consecuente adición secuencial de diferentes monosacáridos que constituirán una subunidad de EPS. Estas reacciones se llevan a cabo en el citoplasma. Cada subunidad ensamblada se transporta hacia el lugar de polimerización en la cara periplasmática de la célula, por una proteína transmembrana con función flipasa denominada Wzx. El mecanismo exacto de transporte de las subunidades a través de la bicapa lipídica se desconoce por ahora. El componente final característico de la vía Wzy-dependiente es la proteína Wzz, que genera la distribución modal de la longitud de las cadenas polisacarídicas (Izquierdo, 2003; Islam *et al*. 2014).

Por otro lado, el sistema dependiente de transportadores de tipo ABC (Figura 11), es característico de la biosíntesis de homopolímeros de azúcar (Whitfield. 1995; Cuthbertson *et al*. 2010; Whitfield *et al*. 2020). La extensión del polisacárido se lleva a cabo mediante la adición progresiva de azúcares en el extremo no reducido de la cadena. A diferencia de la ruta metabólica

dependiente de Wzy, no requiere de una polimerasa específica y el polímero se completa en la cara interna de la membrana citoplasmática. El transporte de la cadena polisacáridica a la cara externa es mediado por un transportador de tipo ABC (ATP-binding cassette) (Izquierdo, 2003).

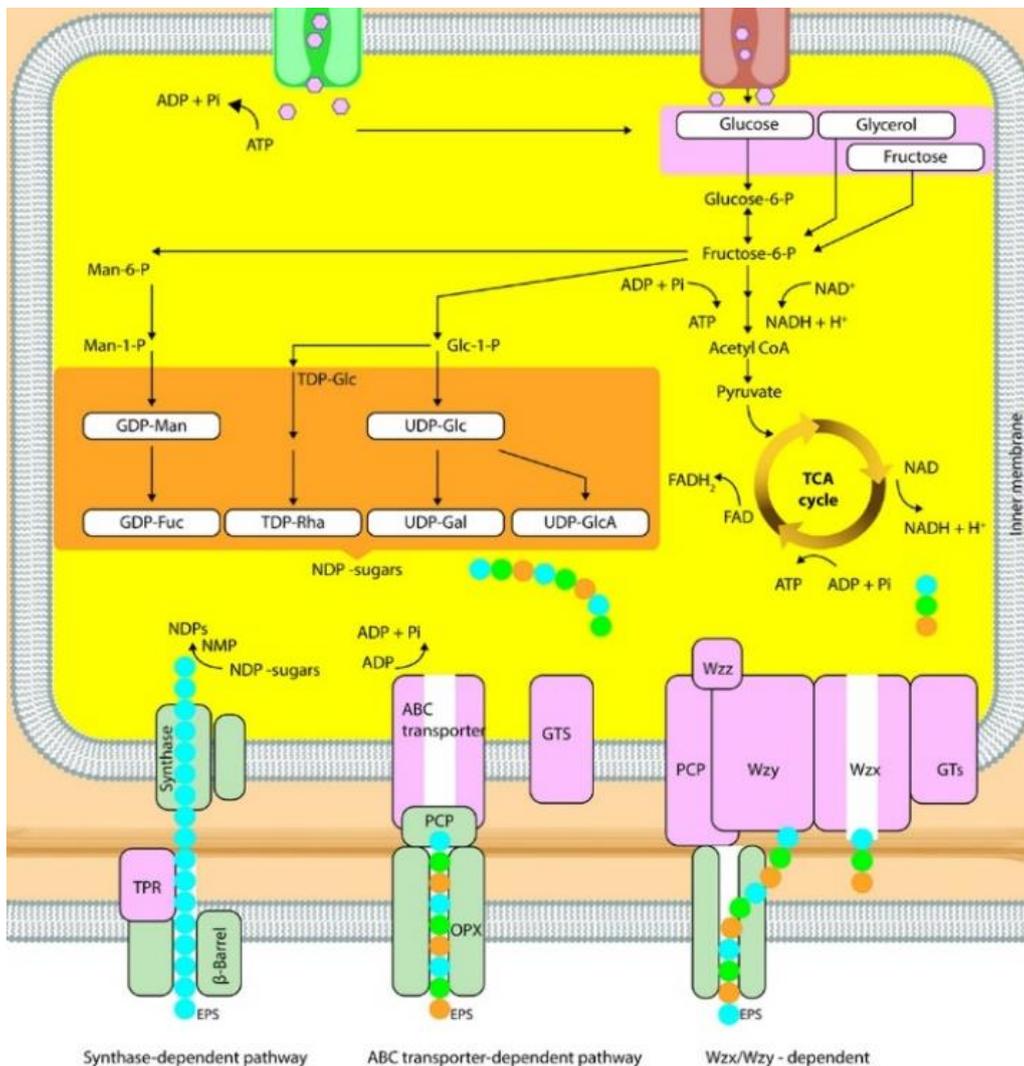


Figura 11. Resumen de las rutas metabólicas (dependientes de transportadores tipo ABC y dependientes de WZX/WZY) responsables de la síntesis de EPSs en cianobacterias. Otras rutas metabólicas como las dependientes de sintasas se han reportado en otros microorganismos. Los círculos de colores azul, verde y rojo representan monosacáridos que componen el polímero de EPS (OPX polisacáridos de la membrana externa, PCP copolimerasas de polisacáridos, TPR proteínas repetitivas de tetratricopeptido) (Ates, 2015).

Los genes relacionados con la producción de polisacáridos de superficie se pueden dividir en tres clases: a) genes que codifican las enzimas involucradas en las rutas metabólicas de la síntesis de nucleótido-azúcares, u otras moléculas

necesarias para la síntesis de polisacáridos. b) genes que codifican las glicosiltransferasas. c) genes requeridos para el procesamiento de oligosacáridos o polisacáridos (Reeves *et al*, 1996).

El primer tipo de genes es bastante diverso y no es específico para la biosíntesis de EPSs. Tomando en cuenta que los nucleótido-azúcares son requeridos para una gran variedad de procesos en los que interviene la síntesis de un rango amplio de polisacáridos. Entre estos genes están los denominados *rfaABCD*, que codifican proteínas relacionadas con la síntesis de de L-rhamnosa, una 6-deoxihexosa presente comúnmente en bacterias. La rhamnosa constituye principalmente el polisacárido denominado Antígeno O, implicado en la síntesis de lipopolisacáridos de bacterias gram-negativas (Li & Reeves, 2000).

Por otro lado, se han identificado una gran cantidad de genes que codifican glicosiltransferasas, dada la diversidad estructural de los polisacáridos extracelulares bacterianos. La función diversa de estas transferasas, que además son específicas por cepa, se refleja en la heterogeneidad de sus secuencias de ADN. El análisis *in silico* previo del genoma de cianobacterias ha revelado la presencia de numerosos genes que putativamente codifican glicosiltransferasas. Sin embargo, la mayoría de estas enzimas no se han caracterizado bioquímicamente lo que hace imposible asignar su función a la síntesis de EPSs (Pereira *et al*, 2009).

Los genes responsables de la extensión y procesamiento del polímero están organizados en clúster de forma similar y normalmente constituyen operones de gran longitud. Dentro de este clúster se puede apreciar una región central constituida por genes que codifican glicosiltransferasas, flanqueada por dos regiones que comprenden genes que codifican enzimas involucradas en la polimerización del EPSs, el control de la longitud de la cadena y el transporte al exterior de la célula (De Vuyst & Degeest, 1999).

1.7.4. Factores que afectan la biosíntesis de EPSs en cianobacterias

La deficiencia de nitrógeno a menudo se ha descrito como una condición que aumenta la síntesis de EPSs, probablemente porque esto contribuye al aumento en la relación C:N, promoviendo así la incorporación de carbono en los polímeros

de azúcares (Sohm *et al.*, 2011), (Rossi & De Philippis, 2015). En algunas cianobacterias, la cantidad de polímero producido varía de acuerdo con la fuente de nitrógeno utilizada. Sin embargo, *Anabaena flosaquae* A37 mostró una producción similar de EPSs cuando se le suministró diferentes fuentes de nitrógeno (Tischer & Davis., 1971, Rhee *et al.* 2004).

Otros factores importantes que afectan la síntesis de EPSs en cianobacterias son la disponibilidad de fosfato, sulfato y cloruro de sodio. También la aireación, la temperatura y la luz (Christmas *et al.* 2016). Se han llevado a cabo experimentos en los que se ha observado que el flujo de aire inyectado al medio de cultivo líquido aumenta la síntesis de exopolisacárido hacia el exterior. Por otro lado, los ciclos de luz y oscuridad parecen tener el mismo efecto que la exposición a luz continua, aunque la exposición a UV-A y UV-B aumentan la expresión de EPSs (Yoshimura *et al.*, 2007), (Rossi & De Philippis, 2015), (Delattre, 2016). También se ha identificado en *Anabaena* sp. PCC 7120 una región que contiene 18 marcos abiertos de lectura (ORFs) que están relacionados con la biosíntesis de EPSs en condiciones de estrés por deshidratación (Yoshimura *et al.*, 2007).

En general, cualquier condición ambiental adversa que represente estrés para la célula activa los mecanismos de síntesis y de movimiento al exterior celular de exopolisacáridos, pues las diferentes moléculas secretadas por las células, que forman los *biofilms* actúan de forma directa como una barrera física de protección celular (Rossi & De Philippis, 2016). En la actualidad se está estudiando el efecto de otros factores como el pH, la tasa de dilución, la fase de crecimiento, la presencia o ausencia de magnesio, calcio, potasio y metales pesados, la adición de glioxilato, acetato, valerato, glucosa, citrato y EDTA, entre otros (Jittawuttipoka *et al.* 2013; Rossi & De Philippis, 2015).

1.8. Glicosiltransferasas: características generales y clasificación.

Las glicosiltransferasas (GTs) son un grupo de enzimas clave en la ruta de síntesis de *biofilms*. Las GTs catalizan reacciones de transferencia de un residuo de azúcar desde una molécula activada hacia una molécula aceptora específica, formando un enlace glicosídico. Así, las GTs constituyen una gran familia de enzimas involucradas en la biosíntesis de oligosacáridos, polisacáridos y

glicoconjugados (Taniguchi *et al.* 2014). El sustrato activado es generalmente un nucleótido azúcar (GTs de Leloir), y el acceptor es más variable, pudiendo ser un azúcar, un lípido o una proteína. Hay cerca de 90.000 genes que codifican GTs. Sin embargo, se cuenta con muy poca información bioquímica y estructural sobre esta superfamilia. La mayoría de las GTs contenidas en bases de datos son marcos abiertos de lectura no caracterizados (Salinas, 2013) y muchas GTs están localizadas en membranas celulares, dificultando su purificación y caracterización. Se han propuesto tres criterios para clasificar las GTs: de acuerdo a la identidad de secuencia, al mecanismo de acción y al tipo de plegamiento (Liu *et al.* 2003; Chang *et al.* 2011; Salinas, 2013).

Atendiendo a la similitud de secuencias, hasta la fecha, las glicosiltransferasas se han clasificado en 111 subfamilias (Coutinho *et al.*, 2003), y se encuentran disponibles en la base de datos de Enzimas de Carbohidratos-activos (CAZy, por sus siglas en inglés) (<http://www.cazy.org/GlycosylTransferases.html>). Aunque esta base de datos agrupa a las GTs en familias, las GTs en general presentan una baja identidad de secuencia. La base de datos completa es corregida manualmente y los genomas son constantemente actualizados. Aquellas GTs que no pueden ser caracterizadas ni clasificadas en ninguna subfamilia, se agrupan bajo el nombre de GT0. Caracterizar bioquímicamente una proteína perteneciente a GT0 puede dar origen a una nueva subfamilia e incluir otras proteínas no caracterizadas previamente (Salinas, 2013).

En cuanto a la clasificación atendiendo al mecanismo de acción, las GTs se clasifican de acuerdo al carbohidrato que transfieren y la respectiva estereoquímica del producto catalizado. Con base en este criterio se denominan de retención o de inversión según se mantenga la configuración del carbono anomérico del dador. Los mecanismos catalíticos de las GTs de inversión se llevan a cabo mediante una sustitución nucleofílica bimolecular (reacción S_N2). Mientras que los mecanismos de retención suelen ser específicos para cada enzima incluyendo mecanismos de doble desplazamiento o reacciones de tipo S_{Ni} (Figura 12).

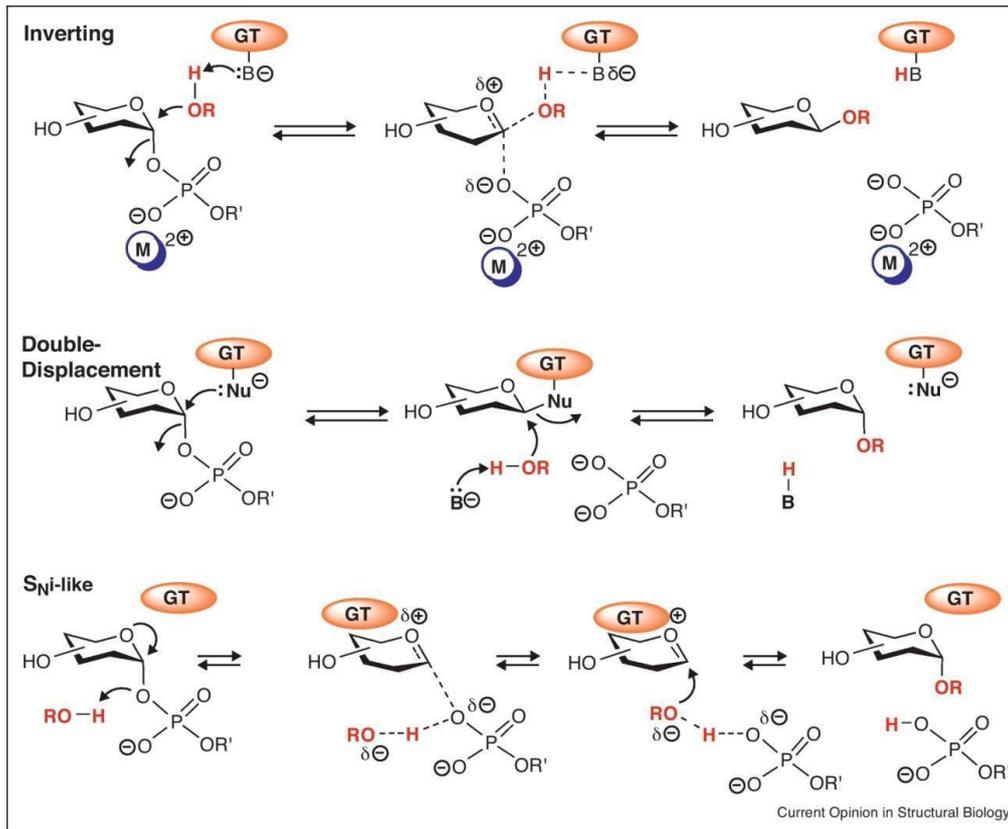


Figura 12. Mecanismo propuesto para las reacciones de inversión y retención en glicosiltransferasas. Las reacciones de inversión de las GTs parecen ocurrir mediante un desplazamiento simple con la formación de un oxocarbenio en estado de transición. Un aminoácido catalítico sirve como base general y lleva a cabo una deprotonación del grupo OH nucleófilo, (tomado de Ardèvol, 2016).

Sin embargo, todas las superfamilias estructurales (GT-A y GT-B) presentan miembros que catalizan reacciones tanto de retención como de inversión, aumentando así la complejidad en la caracterización de estos mecanismos (Salinas, 2013).

Finalmente, y a pesar de la gran variedad de familias en las que se organizan estas enzimas, su clasificación de acuerdo al plegamiento es reducida, pues se caracteriza por una arquitectura tridimensional más conservada, ya que mediante cristalografía se han identificado solamente dos tipos diferentes de plegamiento (superfamilias estructurales GT-A y GT-B). La baja variedad de plegamientos en GTs es compensada por una gran variabilidad estructural en cuanto al dominio de unión al aceptor (Breton *et al.* 2006; Breton *et al.* 2010; Breton *et al.* 2012; Bloch *et al.* 2020).

Cabe destacar que, a pesar de la baja identidad de secuencia, la mayoría de las GTs dependientes de nucleótido azúcares poseen uno de los dos plegamientos principales (GT-A y GT-B). Las enzimas agrupadas dentro de una misma familia CAZy pertenezcan a la misma superfamilia estructural, por lo tanto, las GTs presentan una gran similitud estructural. Las enzimas clasificadas en el plegamiento GT-A como en el GT-B contienen miembros que catalizan tanto reacciones de retención como reacciones de inversión (Figura 13). Hay una tercer superfamilia, denominada GT-C que comprende las GTs que utilizan un glicolípido fosforilado como sustrato dador.

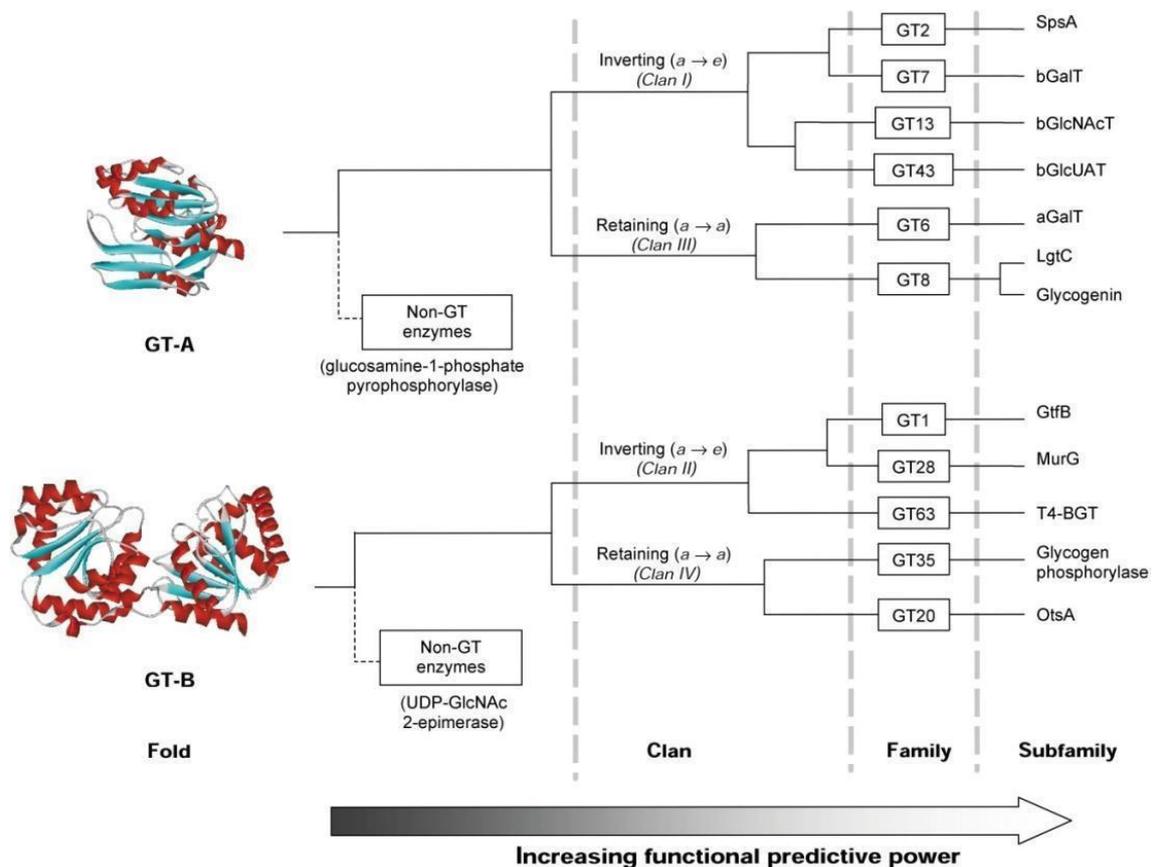


Figura 13. Clasificación jerárquica de las glicosiltransferasas basada en el tipo de plegamiento y la formación de clanes, superfamilias estructurales y subfamilias. Esta figura se llevó a cabo con base en glicosiltransferasas en organismos cuya estructura 3-D está definida (Cutinho *et al*, 2003).

La superfamilia estructural de glicosiltransferasas GT-A está caracterizada por presentar un dominio con plegamiento tipo Rossmann (alfa/beta/alfa). Los miembros de esta superfamilia necesitan la presencia de cationes divalentes

para llevar a cabo su actividad. Las estructuras resueltas en este caso, presentan metales coordinados. La coordinación de metales tiene lugar a través del motivo DXD o de sus equivalentes EXE, conservado en esta superfamilia. En general, el proceso de coordinación del metal produce cambios conformacionales en el bucle flexible número 3 de cada GT. En algunos casos, los cambios conformacionales producidos dan lugar a la formación del sitio de unión del sustrato aceptor (Qasba *et al.*, 2005).

La superfamilia estructural GT-B posee dos dominios Rossmann enfrentados y unidos por una región “bisagra”. La hendidura formada entre los dominios define al sitio activo. Al contrario de las GT-A, este grupo no necesita de cationes divalentes para llevar a cabo su actividad. Las GT-B también presentan cambios conformacionales en presencia de los nucleótidos azúcares. Este movimiento tendría como objetivo acercar ambos sustratos, ya que cada uno se une en diferentes dominios (aceptor en N-terminal y dador en C-terminal) (Salinas *et al.*, 2011).

Finalmente, la superfamilia GT-C consta de 8 familias contenidas en la base de datos CAZy. Esta familia está constituida por proteínas de naturaleza hidrofóbica localizadas en el retículo endoplásmico o en la membrana plasmática (Strahl-Bolsinger *et al.* 1993; Takahashi *et al.* 1996; Maeda *et al.* 2001). La distribución filogenética de esta familia es reducida respecto a las familias GT-A and GT-B. El mecanismo de catálisis de las enzimas pertenecientes a la superfamilia GT-C no está claro. Los genes responsables de la síntesis de estas glicosiltransferasas se encuentran en todos los genomas de eucariotas y rara vez en algunos procariontes como algunas micobacterias, sin embargo, esta superfamilia está completamente ausente en archea (Lui & Mushegian. 2003; Albuquerque-Wendt *et al.* 2019).

1.9. Cianobacterias como biofertilizantes y sus implicaciones agroambientales en Colombia.

El territorio colombiano cuenta con los océanos Pacífico y Atlántico y se extiende hasta la Amazonía. Además, abarca una buena porción de la cordillera de los Andes, por lo que gran parte del país es de carácter montañoso. La diversidad de climas y regiones se ve reflejada en la gran variabilidad de ecosistemas en el

país, presentando todo el año desde desiertos hasta bosques húmedos, tundras y nieves perpetuas. Así mismo, la variabilidad genética que corresponde a esta diversidad en la escala de Holdridge se ve reflejada en la agricultura, permitiéndose la producción de una gama amplia de cultivos de zonas tropicales y templadas, desde plátano y caña de azúcar hasta trigo, cebada y patatas. El café es uno de los productos más representativos de la economía colombiana, constituyendo aproximadamente la mitad de todas las exportaciones. Las bananas y los plátanos se exportan desde plantaciones en la región de Urabá de la costa caribeña. La caña de azúcar es un cultivo importante en las zonas cálidas y templadas cuyas plantas de procesamiento se encuentran en el del valle del Cauca, cerca de Cali (FAO 2015). De los 32 departamentos que conforman a Colombia, el departamento del Tolima es líder en producción de café, maní, arracacha, sorgo, maíz, algodón y arroz. El arroz es uno de los cultivos más importante en el mundo, pues más del 40% de la población depende de él como principal fuente de calorías. El departamento del Tolima aporta el 44% del arroz consumido en Colombia (Delgado & Ulloa. 2015; Anuario estadístico del sector agropecuario 2016).

Sin embargo, los suelos del departamento del Tolima se encuentran en riesgo debido a la sobrecarga de actividades agropecuarias. De esos 32 departamentos en los que se divide el país, el Tolima es considerado el noveno con mayor porcentaje de conflictos de uso del suelo. El 54% de los suelos tolimenses padece por la sobrecarga de las actividades agropecuarias y a esto se suma el uso indiscriminado del agua. En países que son potencia mundial en la producción de arroz como Tailandia, se usa la mitad del recurso hídrico que se usa en el Tolima (Silalertruksa *et al.*, 2017). Por estos motivos, la fertilidad de los suelos tolimenses se ha visto comprometida actualmente, siendo además suelos deficientes en materia orgánica y como consecuencia de minerales vitales. La deficiencia de minerales más común en el departamento del Tolima es la de nitrógeno, y cultivos como el arroz, el sorgo, el maíz y el algodón se ven bastante afectados (Perez., 2014).

Los requerimientos de nitrógeno de las plantas son muy altos, pero este nutriente es escasamente biodisponible en el suelo. Los suelos utilizados en prácticas agrícolas tienen una reserva de nitrógeno orgánico en forma de humus

(componente orgánico del suelo formado por la descomposición microbiana), por lo tanto, hay una relación directa entre la disponibilidad de materia orgánica y el nitrógeno del suelo. Sin embargo, aproximadamente el 98% de este nitrógeno no está disponible para el cultivo, solamente el nitrógeno que se mineraliza durante el ciclo del cultivo es el que posteriormente se procesa a formas disponibles. Un 1% de mineralización del nitrógeno orgánico durante un ciclo de cultivo es considerado un valor razonable (Castellanos *et al.*, 2005). El contenido hídrico y la temperatura son factores ambientales importantes en el control de este proceso de mineralización neta de nitrógeno a partir de la materia orgánica (Rodrigo *et al.* 1997, Castellanos *et al.* 2005; Guntiñas *et al.* 2012). Suelos de zonas tropicales cálidas y húmedas y de zonas secas con alta evapotranspiración presentan una deficiencia en el contenido de materia orgánica y consecuentemente de nitrógeno, debido entre otras cosas a las condiciones de drenaje. Suelos bien drenados permiten la descomposición de la materia orgánica e incorporación de nitrógeno, mientras que suelos mal drenados promueven la desnitrificación.

El drenaje y en general el manejo del riego también está relacionado con la salinidad del suelo. La salinidad representa una amenaza latente para cultivos que como el arroz necesitan grandes volúmenes de agua, pues el agua se infiltra en el suelo, disuelve las sales presentes en él (iones como Na, Cl, Ca, K, SO₄, NO₃, HCO₃, CO₃) y las deposita en la superficie. El aumento en la concentración de sales también cambia el pH del suelo y modifica su estructura arcillosa disminuyendo su viabilidad como sustrato. El arroz es moderadamente sensible a la salinidad, cultivos de arroz expuestos a altas concentraciones de sal presentan síntomas que van desde problemas en el crecimiento y formación del grano, hasta esterilidad (Lingeswara *et al.* 2017). La sensibilidad del arroz al estrés salino varía de acuerdo a la madurez del cultivo, siendo mayor en plantas jóvenes, pero todos los estados de crecimiento y desarrollo de la planta son vulnerables (Hussain & Khaskheli. 2018; Dam *et al.* 2019; Irakoze *et al.* 2020). De acuerdo a la velocidad relativa de infiltración de agua en el suelo, los cultivos de arroz en el departamento del Tolima se enfrentan a un riesgo entre ligero y moderado a altos niveles de salinidad, algunos municipios del departamento

tienen mayor tendencia hacia condiciones de severidad (Méndez-Delgado & Gonzalez., 2009).

Tomando en cuenta estos antecedentes, para suplir la necesidad de macro y oligoelementos en los cultivos y para solucionar la problemática que representa la pérdida de fertilidad como resultado de la salinidad, a partir del siglo XIX se recurrió masivamente a la fertilización usando como materia prima depósitos de guano (Szpak *et al.*, 2012) y posteriormente fertilizantes de síntesis química. Este incremento en el consumo de fertilizantes químicos en las últimas décadas ha ocasionado un fuerte impacto ambiental. Los fertilizantes NPK corresponden en su mayoría a la base los abonos en la actualidad, siendo el nitrógeno el macroelemento más importante entre ellos, aunque también el más controvertido debido a la gran solubilidad en el agua de los nitratos y la consecuente contaminación de aguas freáticas (Frink *et al.* 1999; Ward. 2009; Hasler *et al.* 2015).

Con la Revolución Verde a partir de 1950, Colombia se convirtió en un gran demandante de fertilizantes y otros productos agrícolas de síntesis química. En 1974 Colombia ya era el primer consumidor de agroquímicos de América Latina. En 1984, el consumo de fertilizantes pasó de 20 mil toneladas al año a más de 750 mil, y posteriormente en el 2010 este consumo se duplicó hasta llegar a un millón y medio (Bank World. 2007; Pinilla & Willebald. 2018). Actualmente Colombia aplica más de 500 kilos de fertilizante por hectárea, cuando el promedio para América Latina es de cuatro veces menos. En cultivos transitorios como el arroz, el gasto en fertilizantes corresponde aproximadamente al 30% de los costos de producción. Por lo tanto, el alto costo de los fertilizantes y la creciente eutrofización hacen necesario recurrir a alternativas más sostenibles (Pérez. 2014).

Las cianobacterias que fijan N₂ al formar asociaciones simbióticas o de vida libre con géneros como *Azolla*, *Cycas* o *Gunnera*, entre otros, pueden contribuir con cerca de 30 kg N ha⁻¹. Se ha estimado que estas asociaciones pueden suponer cerca del 30% de la flora microbiana, aportando también una importante cantidad de materia orgánica al suelo y representando una ventaja económica frente a los costosos fertilizantes nitrogenados de síntesis química

(Issa *et al.*, 2014) (Quesada & Fernández-Valiente, 1996; Jha *et al.*, 2001; Prasanna & Nayak, 2007).

En Asia, desde hace varias décadas se ha descrito la simbiosis de *Azolla* con *Nostoc spp.* para mejorar la fertilidad en campos de arroz. Actualmente, diferentes especies de cianobacterias están siendo utilizadas como un recurso en la mejora de la fertilidad del suelo y de la calidad del medio ambiente, entre ellas: *Anabaena variabilis*, *Nostoc muscorum*, *Aulosira fertissima*, y *Tolypothrix tenuis* que han demostrado ser bastante eficientes en cultivos de arroz en China, Vietnam, Filipinas, Japón e India (Singh *et al.* 2016; Shweta & Kritika. 2018; Maçik *et al.* 2020).

Además de ser un potencial biofertilizante, las cianobacterias también cumplen un papel fundamental en la recuperación de los suelos. Sumado a la baja fertilidad, los suelos erosionados por la explotación agrícola excesiva se caracterizan por presentar alta compactación, deficiencia hídrica y problemas relacionados con la salinidad. Consecuentemente, la baja aireación e infiltración del agua en el suelo disminuyen la diversidad microbiana, lo que produce un impacto adverso en el crecimiento de las plantas y en la productividad de los cultivos. Las cianobacterias desarrollan una red superficial de filamentos en el que unen las partículas de suelo y reparan además sus características fisicoquímicas, debido a su capacidad para retener agua y al aporte de minerales y nutrientes a suelos degradados, mejorando entre otras cosas su pH y su conductividad.

La diversidad de las especies de cianobacterias presentes en campo cambia a lo largo del ciclo del cultivo de arroz como consecuencia de la variación de las condiciones ambientales (Quesada & Fernández-Valiente. 1996; Rincón *et al.* 2003; Chunleuchanon *et al.* 2003; Sanchez *et al.* 2011). Sin embargo, su abundancia disminuye en condiciones de exceso de fertilizantes químicos (Fernández Valiente *et al.*, 2000). Entre los mecanismos usados por las cianobacterias para resistir las condiciones adversas que representa crecer en suelos en procesos de recuperación (deficiencia de nitrógeno, altos niveles de sal, compactación del suelo) destacan la síntesis de exopolisacáridos y el ensamblaje de *biofilms* (Nisha *et al.*, 2007). Por todo ello, es de gran interés el

estudio de dichos mecanismos al objeto de poder aprovechar el enorme potencial de las cianobacterias en este campo de la biotecnología.

Objetivos

2. Objetivos

General:

- Ampliar el conocimiento sobre la formación de *biofilms* en *Anabaena* sp. PCC7120 y su relación con la familia de reguladores transcripcionales FUR.

Específicos:

- Estudiar la influencia del estrés por deficiencia de nitrógeno y del estrés salino sobre el fenotipo de *Anabaena* sp. PCC7120 y las estirpes de sobreexpresión de proteínas FUR.
- Evaluar la influencia de diferentes factores ambientales como altas concentraciones salinas y deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado en la síntesis de exopolisacáridos y formación de *biofilms* en *Anabaena* sp. PCC7120.
- Estudiar la consecuencia de la desregulación de proteínas FUR en la síntesis de exopolisacáridos y la formación de *biofilm* en *Anabaena* sp. PCC7120
- Identificar glicosiltransferasas en el genoma de *Anabaena* sp. PCC7120 potencialmente reguladas por FurA y FurC mediante ensayos de retardo en gel (Electrophoretic Mobility Shift Assay: EMSA) y búsqueda de Fur boxes
- Evaluar el efecto de metabolitos presentes en el sobrenadante de estirpes de *Anabaena* con diferente capacidad para formar *biofilms* sobre la germinación de *Oryza sativa* de la variedad Ariete en condiciones de estrés salino.

Materiales y métodos 3

3. Materiales y métodos

3.1. Condiciones de cultivo y cepas empleadas

Las cepas de *Anabaena* empleadas se describen en la tabla 2. Inicialmente estas cianobacterias se recuperaron de la colección cepas del grupo de investigación en Regulación Génica y Fisiología de Cianobacterias de la Universidad de Zaragoza, conservadas en crioviales que contenían BG-11 líquido con un 10% de glicerol a -80 °C. Se sembraron 10 µl del contenido de cada criovial en placas de Petri con BG-11 agar 1% para la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y con BG-11 agar 1% con el respectivo antibiótico marcador (Neomicina 50 mg/ml) para las estirpes de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC (AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC). Los 10 µl se extendieron sobre las placas de Petri usando un asa bacteriológica. Todas las estirpes se cultivaron a 28 °C en iluminación constante de 10 µmol/m²/s, y se les permitió crecer por un periodo de dos semanas hasta producir suficiente biomasa.

Tabla 2. Cepas de cianobacterias empleadas en este estudio. Las estirpes de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC fueron obtenidos mediante conjugación triparental por los respectivos autores.

Cepa	Características	Procedencia
<i>Anabaena</i> sp. PCC7120	Estirpe silvestre de <i>Anabaena</i>	Instituto Pasteur, París
AG2770FurA	Estirpe de sobreexpresión de FurA (<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 conteniendo pAM2770::furA)	Gonzalez <i>et al.</i> , 2010
VCS2770FurB	Estirpe de sobreexpresión de FurB (<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 conteniendo pAM2770::furB)	C. Sein-Echaluce <i>et al.</i> , 2015
EB2770FurC	Estirpe de sobreexpresión de FurC (<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 conteniendo pAM2770::furB)	Sevilla <i>et al.</i> , 2019

Posteriormente, algunas células de cada estirpe se recuperaron de la superficie de las placas de Petri (dos asadas) y se sembraron en un volumen de 20 ml de BG-11 líquido en Erlenmeyers de 50 ml, con agitación mecánica constante de 180 rpm en un incubador orbital, hasta alcanzar fase exponencial (densidad óptica entre 0,7-1 a 750 nm). A continuación, las estirpes se escalonaron a un

volumen de 100 ml de BG-11 en Erlenmeyers de 250 ml, manteniendo siempre las condiciones de temperatura, intensidad lumínica y agitación, y con Neomicina 50 mg/ml para las estirpes de sobreexpresión. Finalmente, las estirpes se escalonaron a 250 ml de BG-11 líquido en tubos cónicos y la agitación fue remplazada por inyección constante de aire. Las estirpes creciendo en tubos cónicos se utilizaron como *stock* para los diferentes experimentos que se plantearán más adelante en este apartado.

Semanalmente los tubos cónicos se cambiaron por tubos nuevos estériles y 50% del volumen fue reemplazado con medio de cultivo fresco. La inocuidad de las cepas se evaluó siempre antes de dar inicio a cada experimento usando placas de LB-agar (Bertani., 2004), para garantizar que no había contaminación con otros microorganismos.

El medio BG-11 (Tablas 3 y 4) fue preparado según las especificaciones de Rippka *et al* (1979), Añadiendo un mililitro de suplemento a un litro de medio basal. La disolución resultante fue esterilizada en autoclave.

Tabla 3. Composición del medio BG-11 basal. Se indican las cantidades de reactivos necesarias para la preparación de 3 litros de medio y la concentración final de cada compuesto.

Medio basal 1x (3 litros)		
Reactivo	Peso (gramos)	Concentración final (mM)
NaNO ₃	4,05	16
NaHCO ₃	2,214	8,8
K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O	0,12	0,2
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,108	0,25
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,225	0,3
Na ₂ CO ₃	0,06	0,2

Para obtener cultivos en deficiencia de nitrógeno el medio fue remplazado mediante centrifugación con BG-11 sin NaNO₃ y se llevaron a cabo tres lavados con el medio sin nitrógeno. Para someter a las células a estrés salino, el medio se expuso a una concentración de 300 mM de NaCl a partir de un stock 5M.

Tabla 4. Composición del suplemento del medio BG-11. Se indican las cantidades necesarias para preparar 100 ml de suplemento concentrado y la concentración final de cada oligoelemento en el medio BG-11.

Suplemento 1000 X (100 ml)		
Reactivo	Miligramos	Concentración final (μM)
Citrato férrico amónico	600	30
Ácido cítrico	600	30
EDTA	100	190
H ₃ BO ₃	286	46
MnCl ₂ x 4H ₂ O	181	9,15
ZnSO ₄ x H ₂ O	13,8	0,77
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	39	1,61
CuSO ₄ x 5H ₂ O	7,9	0,32
CoCl ₂	4,94	0,17

3.2. Técnicas de trabajo con ADN y proteínas

3.2.1. Extracción de ADN genómico de *Anabaena* sp. PCC7120

El ADN genómico de *Anabaena* sp. PCC7120 se requirió en este trabajo para amplificar diversos promotores. Se extrajo a partir de cultivos de *Anabaena* sp. con un contenido en clorofila de 5-6 $\mu\text{g/ml}$, según el protocolo propuesto por Cai & Wolk (1990) y modificado por Calvo Sein-Echaluce *et al* (2015).

Para extraer el ADN se centrifugaron 50 ml de cultivo a 4000 rpm a 4 °C durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y posteriormente se repartieron las células en dos tubos eppendorf y se resuspendieron en 400 μl de Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 0,1 mM. La ruptura celular se llevó a cabo añadiendo 20 μl de SDS al 10%, 450 μl de fenol-cloroformo (1:1) y aproximadamente 200 μl de perlas de vidrio. A continuación, se realizaron cuatro ciclos de 1 minuto de agitación en vórtex seguido de 1 minuto de reposo en hielo. Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 13000 rpm y 4 °C y se transfirió la fase superior acuosa a tubos eppendorf nuevos. Las células se lavaron de sucesivamente con 1 volumen de fenol, 1 vol. de fenol-cloroformo (1:1) y 2 veces con 1 vol. de cloroformo hasta conseguir una fase acuosa completamente incolora, descartando la fase

orgánica inferior en todos los lavados. A la fase acuosa se añadió 1 vol. de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 2 vol. de etanol absoluto frío y se incubó durante 1 hora a -80 °C para conseguir la precipitación del ADN. Para ello las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El ADN obtenido se lavó con etanol al 70% frío y se resuspendió en 50-100 µl de agua Milli-Q estéril. El ADN cromosómico obtenido se cuantificó con el equipo NanoVue Plus™ (GE Healthcare). Tras este procedimiento se espera obtener concentraciones superiores a 60 ng/µl y una pureza de 1,8-1,9 de acuerdo a la relación de absorbancia 260/280.

3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de los promotores se empleó la enzima Taq polimerasa (BioTools). Las mezclas de reacción se muestran en la tabla 5. Las reacciones se realizaron en un termociclador Thermo Cycler 2720 (Applied Biosystems), empleando un programa de PCR estándar con las siguientes etapas:

Desnaturalización inicial: 95 °C, 5 min. 24-30 ciclos de (Desnaturalización: 95°C, 00:30., Hibridación: T_m-4 , 00:30., Elongación: 72 °C, 1 min/kb), una elongación final: 72 °C, 10 min y finalmente un paso de conservación: 4 °C, ∞.

Tabla 5. Mezclas de reacción para PCR.

Agua MQ	36,1 µl
Buffer 10X	5 µl
MgCl ₂	1,5 µl
dNTPs 10 mM	2
<i>Primer forward</i> 10 µM	2
<i>Primer reverse</i> 10 µM	2
Taq polimerasa	0,4 µl
ADN molde dil 1/10	10-40 ng (1 µl)
VOLUMEN TOTAL	50 µl

La temperatura de la etapa de hibridación se modificó para evitar amplificaciones inespecíficas siendo siempre 4 °C inferior a la temperatura de hibridación de los cebadores (Tabla 6) y nunca inferior a los 40°C. Todos los cebadores empleados se adquirieron de la empresa Biomers.

Tabla 6. Cebadores empleados en este trabajo.

Oligo	Secuencia (5'→3')	Finalidad
Palr3057_up	AAAGCAAAGTACAAGCAACTAC	EMSA promotor <i>alr3057</i>
Palr3057_dw	GGTAAAAGATGGTTAGAACTGG	
Pall4424_up	AGTTTGATAGAGAAGACAGCC	EMSA promotor <i>all4424</i>
Pall4424_dw	CCCAACCCAAAATAAATTGCC	
Pall4431_up	CAGACAACCTGAACCAGATTC	EMSA promotor <i>all4431</i>
Pall4431_dw	CCGTAAAGTACTAGCAACTGC	
Pall4432_up	GAGTGCTTTGGAGTTTAAGTG	EMSA promotor <i>all4432</i>
Pall4432_dw	CCTTGTAAGAGTCCATTGTC	
Palr5223_up	AGTTAACTAAGTGAATA	EMSA promotor <i>all5223</i>
Palr5223_dw	TGTTATTAATCCATTCGTTTAGTC	
alr5234_up	GCACTTTGGCGATTGACTAG	EMSA promotor <i>all5234</i>
alr5234_dw	TCTAATCGTTCTAAGTATACTGG	
<i>ifpkn</i> _up	AAAGATGAATTACACTGGCG	EMSA promotor <i>ifpkn22</i> (inespecífico para FurA y FurC)
<i>ifpkn</i> _dw	CTGCAAACCTGTGGCAGAATA	

3.2.3. Electroforesis de ADN

La correcta amplificación y ausencia de contaminantes o amplificaciones inespecíficas se comprobaron mediante electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa al 1%. En los casos requeridos, los productos se purificaron empleando el *illustra GFX PCR ADN and Gel Band Purification Kits*, de GE Healthcare. Esta etapa se realizó con el objetivo de eliminar los reactivos sobrantes de la PCR, principalmente los oligonucleótidos y dNTPs, que podrían interferir en etapas posteriores del trabajo.

Los geles se prepararon disolviendo agarosa en tampón TBE 1X (90 mM TRIS/HCl pH 8, 90 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA) y calentando la mezcla en horno microondas hasta disolver completamente los cristales de agarosa en el tampón. Antes de su solidificación, se añadió bromuro de etidio a los geles a una concentración final de 0,5 µg/ml. Las electroforesis se realizaron en cubetas horizontales Mini-Sub®Cell GT (Bio-Rad) con tampón TBE 1X, empleando un voltaje de 90 V durante 45-60 minutos. Para determinar el tamaño en pb de cada fragmento amplificado se usó el marcador de peso molecular 1 Kb Plus ADN Ladder de Thermo Fisher. El bromuro de etidio presente en el gel, se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN de doble hebra con alta afinidad y permite su posterior visualización en luz ultravioleta. La detección se basa en que, el bromuro de etidio presenta emisión al ser excitado por luz con una longitud de onda entre 300-360 nm, por lo que sus complejos con los ácidos nucleicos pueden ser visualizados en trasn iluminador. Para visualizar las bandas en los geles, en este trabajo se utilizó el documentador Gel Doc XR System y el *software* Quantity One 1-D Analysis Software de Bio-Rad.

3.2.4. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método del ácido bicinconínico, empleando el *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fischer Scientific). Este método colorimétrico se basa en la capacidad de los enlaces peptídicos de reducir Cu²⁺ a Cu⁺ en medio alcalino. Los iones Cu⁺ se unen al BCA, cambiando su estructura electrónica y haciendo que absorba a 562 nm. La absorción del compuesto es proporcional a la concentración de proteína en la muestra.

3.2.5. Ensayos de retardo en gel (EMSA)

La interacción *in vitro* de las proteínas FurA y FurC con distintos fragmentos de ADN se analizó mediante ensayos de retardo en gel (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA). Esta técnica se basa en que el complejo ADN-proteína tienen un mayor peso molecular que el ADN libre y, por lo tanto, esos complejos pueden diferenciarse del ADN libre porque tienen una menor movilidad electroforética. El ensayo se realizó siempre en presencia de un ADN competidor inespecífico, un fragmento interno del gen *pkn22* (*ifpkn22*) de *Anabaena* sp. PCC7120, al cual no se unen FurA y FurC. Se utilizaron geles no desnaturalizantes con un porcentaje de poliacrilamida del 6% (tabla 7), entrecruzamiento lo suficientemente bajo como para permitir la migración de los complejos ADN-proteína.

Un volumen de 20 μ l de mezclas de reacción se preparó con 50 ng de cada uno de los promotores (inespecífico y promotor a analizar), proteína (se evaluaron escaleras con concentraciones de 300-800 nM para FurA y FurC), tampón de unión 10X (1X: 10 mM bis-Tris pH 7,5., 40 mM KCl, 2 mM MgCl₂·6H₂O y glicerol 5%) y 0,05 mg/ml de BSA para simular las condiciones del interior celular. A la mezcla de reacción se añadió: 1 mM DTT y 1 mM MnCl₂. Las mezclas resultantes se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se añadieron 3 μ l de tampón de carga 6X (1X: 35 mM TRIS-HCl pH 8, 5% glicerol, 0.05% azul de bromofenol).

Tabla 7. Se muestran las cantidades de reactivos necesarias para preparar geles del 6%

Reactivo	Volumen
Acrilamida:bisacrilamida 30%	2,06 ml
Running Buffer 5X (30.28 g/l TRIS, 142 g/l glicina, pH 8)	1,86 ml
Glicerol 50%	1,4 ml
Agua MQ	4,86 ml
PSA 10%	50 μ l
TEMED (BioRad)	20 μ l

Los geles se sumergieron en Running Buffer 1X y se precorrieron durante 45 minutos a 60 V y 4 °C en un equipo Mini-Protean II de BioRad con 3 μ l de tampón de carga en cada carril (para verificar que las condiciones del gel y de la electroforesis eran adecuadas). Transcurrido ese tiempo, se cargaron las muestras en los carriles y se corrieron durante aproximadamente 150 minutos a 90 V y 4 °C. Los geles se tiñeron en cubetas de 50 ml con Running Buffer 1X y 5 μ l de SYBR®Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se visualizaron en un documentador de geles, Gel Doc XR System y el software Quantity One 1-D Analysis Software de Bio-Rad.

3.3. Caracterización de las estirpes

Para caracterizar la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y las estirpes de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC (AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC, los cultivos *stock* que se hicieron crecer inicialmente en tubos cónicos con aireación constante hasta alcanzar una D.O. de aproximadamente 0,7 se traspasaron posteriormente a Erlenmeyers diluyendo los cultivos en BG11 hasta una D.O. de 0,3 (fase exponencial temprana). De esta manera se prepararon 100 ml de cultivo de cada estirpe en Erlenmeyer de 250 ml, (28°C e iluminación de 10 μ mol/m²/s y agitación constante 180 rpm en incubador orbital). Cada estirpe se cultivó por triplicado y se tomaron muestras a las 48 horas del experimento. De esta forma se llevó a cabo la determinación de clorofila, carotenoides y ficobiliproteínas. Las mediciones se llevaron a cabo en el espectrofotómetro SPECORD® PLUS de Analytik Jena. Usando las mismas condiciones de cultivo, se llevó a cabo la determinación de las tasas fotosintética y respiratoria de cada estirpe en condiciones estándar de crecimiento, en deficiencia de nitrógeno y en NaCl 300 mM.

3.3.1. Determinación de clorofila

El contenido en clorofila se determinó según el método de Nicolaisen *et al* (2008), para ello se añadió 1 ml de metanol a 200 μ l de los cultivos de las estirpes estudiadas y se homogenizaron en vórtex durante un minuto para romper las células. Las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a 14000 rpm para depositar los restos celulares. La absorbancia de los sobrenadantes se midió a

665 nm. Se empleó es siguiente cálculo para establecer la concentración de clorofila (Sein-Echaluze *et al.*, 2016):

$$Chl a \left(\frac{mg}{ml} \right) = \frac{Abs665}{74,46 \frac{mg}{ml \cdot cm} \cdot 1 cm} \cdot 6$$

3.3.2. Determinación de carotenoides

La determinación de carotenoides se realizó según el método descrito por Davies (1976). Se centrifugaron 50 ml de cultivo de cada una de las estirpes estudiadas, a 4000 rpm durante 10 minutos y 4 °C y se eliminó el sobrenadante, las células se lavaron dos veces con 5 ml de agua destilada y se expusieron a 5 ciclos de 45 segundos de sonicación y 30 segundos de pausa (amplitud del 80% y ciclo de 0,5). Posteriormente, se añadieron 4 volúmenes de acetona a las muestras y se centrifugaron a 2500 g durante 5 minutos y 4 °C. La absorbancia de los sobrenadantes se midió a 480, 465 y 663 nm, empleando acetona al 80% como blanco. La concentración de carotenoides se calculó con la siguiente formula (Sein-Echaluze *et al.*, 2016):

$$Abs480 \text{ carotenoides} = Abs480 + 0,114 \cdot Abs663 - 0,638 \cdot Abs465$$

$$carotenoides \left(\frac{mg}{ml} \right) = Abs480 \frac{carotenoides}{\epsilon \cdot l} = Abs480 \frac{carotenoides}{250 mg^{-1} \cdot cm^{-1} \cdot 1 cm}$$

3.3.3. Determinación de ficobiliproteínas

Para la determinación de ficobiliproteínas se empleó el método descrito por Glazer, (1976) Se centrifugaron 50 ml de cultivo de cada una de las estirpes estudiadas, a 4000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Se lavaron las células dos veces con 5 ml de agua destilada y se expusieron a 5 ciclos de 45 segundos de sonicación y 30 segundos de pausa (amplitud del 80% y ciclo de 0,5). Se midió la absorbancia del sobrenadante a 620 nm, empleando

agua como blanco. La concentración de ficobiliproteínas se calculó aplicando la siguiente fórmula (Sein-Echalauce *et al.*, 2016):

$$\text{ficobiliproteinas} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Abs620}}{\varepsilon \cdot l} = \frac{\text{Abs620}}{7,41 \text{mg}^{-1} \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{cm}}$$

3.4. Determinación de las tasas fotosintética y respiratoria

La determinación de las tasas fotosintética y respiratoria de diferentes estirpes de *Anabaena* sp. se llevó a cabo mediante la medida de la producción y consumo de oxígeno a lo largo del tiempo, para ello se utilizó el dispositivo Oxytherm de Hansatech, que contiene un electrodo de tipo Clark. El manejo de los datos se efectuó mediante el software O₂View.

Para el montaje y calibración del equipo se añadieron unas gotas de KCl 2M sobre el ánodo y el cátodo del electrodo tipo Clark y se cubrió de forma sucesiva con una lámina de papel de arroz y con una membrana PTFE de teflón que permitía la entrada de oxígeno, el sistema se fijó con empaques de goma. Una vez montado el electrodo, se procedió al calibrado del sensor de luz siguiendo las instrucciones indicadas por el programa. Posteriormente se calibró el electrodo, simulando las condiciones extremas de concentración de oxígeno. Para emular la mayor concentración de oxígeno se introdujo en la cámara agua destilada aireada mediante agitador magnético. Para emular la mínima concentración de oxígeno, se agregó ditionito de sodio en la cámara, que consume el oxígeno del sistema debido a la siguiente reacción:



Se introdujo en la cámara de reacción 1 ml de cultivo de las diferentes estirpes de *Anabaena* en las diferentes condiciones evaluadas. Los parámetros utilizados para las medidas de fotosíntesis y respiración fueron las siguientes: 25 °C, 65%

de agitación e Iluminación de $100 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Durante las lecturas de respiración, la cámara se cubrió con papel de aluminio para minimizar la entrada de luz del exterior.

La variación total en la cantidad de oxígeno se calculó como la suma de la variación durante la fotosíntesis y la respiración. Todos los resultados se expresaron como $\text{mol O}_2\cdot\text{S}^{-1}$.

3.5. Técnicas de microscopía

3.5.1. Microscopía óptica

A lo largo de este trabajo se emplearon técnicas de microscopía para analizar la morfología de *Anabaena* sp. Para ello se utilizó un microscopio Leica DM 300, que mediante un adaptador del ocular se conectó a una cámara Nikon D3300 para el registro fotográfico. La estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y los mutantes de sobreexpresión evaluados AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC, presentaron morfologías diferentes. De esta forma se confirmó también el efecto de la deficiencia de nitrógeno y la consecuente aparición de heterocistos en la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120. Cambios en la turgencia de las células evaluadas, permitieron igualmente confirmar el efecto del estrés salino.

3.5.2. Conteo celular

Debido a la diferencia en tamaño, forma y cantidad de pigmentos que contienen las células de cada estirpe (Gonzalez *et al.* 2010; Sein-Echaluce *et al.*, 2015 y Sevilla *et al.*, 2019), se consideró que el conteo celular usando cámara de Neubauer resultaba más adecuado que otros parámetros como densidad óptica o volumen celular empaquetado para comparar el crecimiento entre la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC7120 y las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2070FurB y EB2770FurC. Las células se contaron usando el programa de análisis y procesamiento de imagen basado en Java ImageJ 1.47v.

Para ello se cargaron 10 μl de cada muestra evaluada en la cámara de *Neubauer* y se tomaron fotografías al microscopio óptico en 40X de los filamentos de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC en las diferentes condiciones evaluadas (condiciones estándar de crecimiento, deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado y NaCl 300 mM). Posteriormente las imágenes se procesaron, recortando cada uno de 16 recuadros que componen el cuadrante denominado “L” (Figura 14).

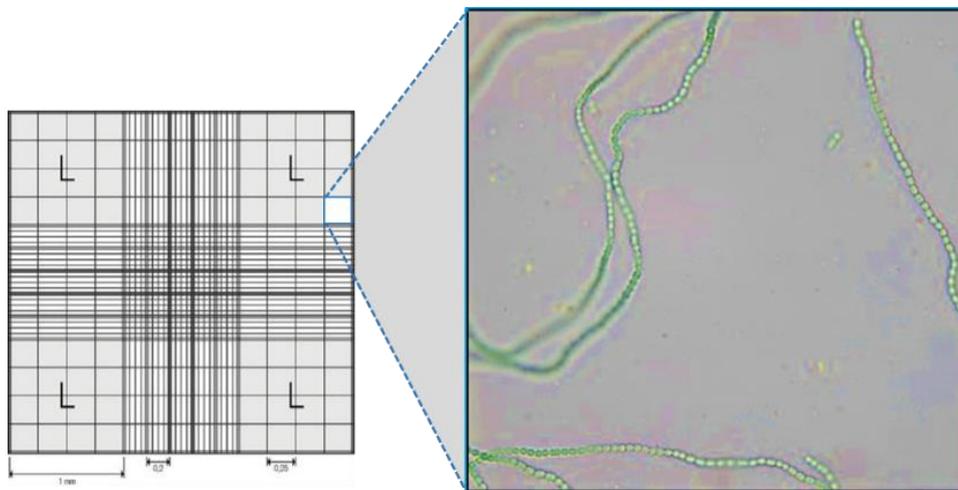


Figura 14: Diagrama que representa los cuadrantes en cámara de Neubauer. Cada L tienen un área de 1 mm^2 y 0,1 mm de altura desde la base de la cámara al cubreobjetos. Por lo tanto, el volumen en cada L es de 0,1 μl y cada uno de los 16 recuadros que lo componen tiene un volumen de 0,00625 μl . Con estos parámetros establecidos, se cuentan las células en los filamentos de cada recuadro para definir la cantidad de células por μl presentes en la muestra.

Usando el programa se abrieron las imágenes correspondientes a los recuadros que se querían contar, y se cambió el tipo de imagen de color RGB a 8 bits, de esta manera las imágenes se transformaron a escala de grises. Posteriormente, se ajustaron los valores límite de las imágenes (*threshold*) y con ello las imágenes quedaron en blanco y negro, siendo negros los filamentos y blanco el fondo de la imagen (Figura 15).

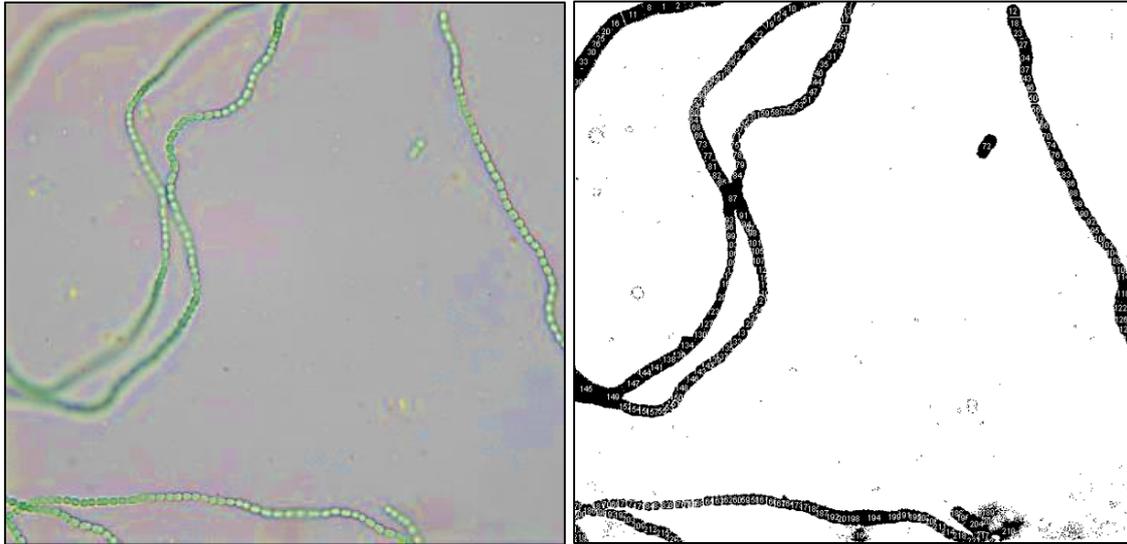


Figura 15: Resultado del procesamiento de imagen para el conteo celular mediante ImageJ. La imagen corresponde a uno de los 16 cuadrantes que pertenecen un área L en cámara de Neubauer. La imagen se transforma a 8 bits en formato binario y las células son separadas en el filamento mediante la herramienta *Watershet*. En este caso, un total de 224 células son contadas.

Luego, en las opciones de procesado las imágenes se hicieron binarias, de esta forma el programa interpretó el blanco como fondo. Después, en procesos binarios se seleccionó la opción de llenar agujeros (*fill holes*) para que los filamentos se interpretaran como una sola imagen sólida. Para que el programa interpretara cada una de las células del filamento se usó la herramienta *Watershet*, de esta manera el programa cortó los filamentos por las uniones entre células adyacentes. Posteriormente se usó la función *Analizar partículas*: Para una fotografía de aproximadamente 3000 píxeles² se escogió un intervalo de 500-infinito y una circularidad de 0-1 para que el programa reconociera solo las células y no contara el ruido de fondo. Finalmente se escogió la función *cubrir máscaras* y mostrar resultados. El programa asignó un número a cada una de las células que reconoció, los resultados son mostrados sobre la imagen y en formato Excel explicando los parámetros utilizados y el área en píxeles de cada célula.

3.5.3. Microscopía de fluorescencia

La fluorescencia de las células se analizó con un microscopio Nikon Eclipse 50i Epi-fluorescence acoplado con una cámara Nikon DXM 1200F. De esta manera

se confirmó la presencia de los heterocistos maduros observados en microscopio óptico en condición de deficiencia de nitrógeno, a diferencia de las células vegetativas, los heterocistos no producen fluorescencia debido a la pérdida de ficobiliproteínas durante su maduración.

3.5.4. Microscopía electrónica

Los cambios en la turgencia de las células evaluadas, que permitieron confirmar el efecto del estrés salino se observaron también al microscopio electrónico de barrido y de transmisión.

Para la preparación de muestras para microscopía electrónica, los cultivos *stock* que se hicieron crecer inicialmente en tubos cónicos con aireación constante hasta alcanzar una D.O. de aproximadamente 0,7 se traspasaron a Erlenmeyers diluyendo los cultivos en BG11 hasta una D.O. de 0,3 (fase exponencial temprana). De esta manera se prepararon 100 ml de cultivo de cada estirpe en Erlenmeyer de 250 ml, (28°C e iluminación de 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y agitación constante 180 rpm en incubador orbital). Se tomaron muestras a las 48 horas del experimento. Se recogieron células de 10 ml de cultivo en las condiciones de crecimiento mencionadas, centrifugando 5 min a 4000 rpm. El pellet se resuspendió en 1 ml de solución fijadora: 2.5% glutaraldehído en buffer fosfato (66 mM KH_2PO_4 : Na_2HPO_4 , pH 6,8) y se realizaron tres lavados de 5 min en buffer fosfato, este último con 300 mM de NaCl, para conservar las condiciones de estrés salino en las estirpes que se expusieron a dicho estrés.

La microscopía electrónica de barrido se realizó en el Servicio de Microscopía Electrónica de Sistemas Biológicos de la Universidad de Zaragoza. Adicionalmente la microscopía electrónica de transmisión se realizó en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la Universidad Autónoma de Madrid. Para ello, las muestras además se mezclaron en una proporción 1:1 con agar al 4% y se cortaron en trozos de 1 mm^3 .

3.6. Cuantificación de exopolisacáridos en sobrenadante mediante método fenol-sulfúrico.

Para cuantificar los exopolisacáridos presentes en el sobrenadante de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión

AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC se utilizó el método fenol-sulfúrico descrito por Michel Dubois *et al* (1956), (Figura 16). Este método se basa en que azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados producen un color anaranjado cuando se tratan con fenol y ácido sulfuro concentrado. La reacción presenta un color estable que permite además una alta sensibilidad (desde 5 microgramos en adelante). En este trabajo se utilizó una recta patrón de calibración de glucosa (10, 20, 30 y 40 mg/l) siendo la glucosa el monosacárido que se presenta en mayor abundancia como parte de la estructura de los exopolisacáridos sintetizados por cianobacterias (De Philippis *et al*, 2000).

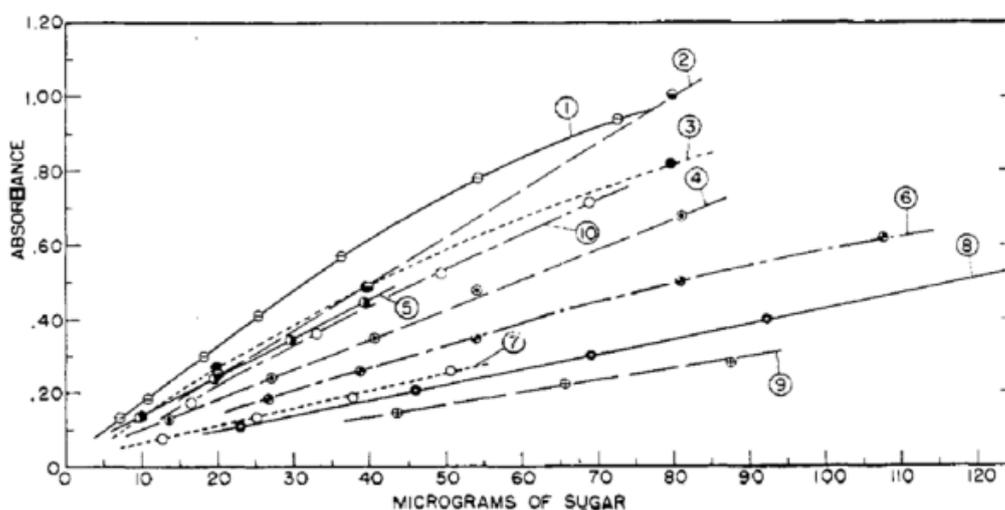


Figura 16. Rectas patrón para el método fenol-sulfúrico con base en diferentes monosacáridos. Tomado de Michel Dubois *et al* 1956. 1. D-xilosa, 2. D-manosa, 3. D-manosa (variante del método), 4. D-galactosa, 5. L-arabinosa, 6. Ácido D-galacturónico, 7. L-fucosa, 8. D-Glucurona, 9. 2,3,4,6-tetra-o-metil-D-glucosa y 10. D-Glucosa.

Para este experimento, los cultivos *stock* que se hicieron crecer inicialmente en tubos cónicos con aireación constante hasta alcanzar una D.O. de aproximadamente 0,7 se traspasaron posteriormente a Erlenmeyers diluyendo los cultivos en BG11 hasta una D.O. de 0,3 (fase exponencial temprana). De esta manera se prepararon 100 ml de cultivo de cada estirpe en Erlenmeyer de 250 ml, (28°C e iluminación de 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y agitación constante 180 rpm en incubador orbital). Cada estirpe se cultivó por triplicado en las diferentes condiciones evaluadas y se tomaron muestras a las 0, 24 y 48 horas del

experimento. Las muestras se obtuvieron centrifugando las células de las diferentes estirpes de *Anabaena* sp. para recuperar el sobrenadante.

Las rectas de calibrado (una por cada condición evaluada) se prepararon a partir de un stock de glucosa con una concentración de 100 mg/l. Se prepararon 400 µl de los diferentes puntos de la recta a concentraciones de 10, 20, 30 y 40 mg/l usando el *stock* glucosa y diluido en el BG-11 respectivo de acuerdo al experimento evaluado (BG-11 completo, BG-11 sin una fuente de nitrógeno combinado y BG-11 NaCl 300 mM). 400 µl del BG-11 respectivo fueron usados como blanco para establecer el 0 en la gráfica.

Los puntos de la recta patrón y las muestras se prepararon por triplicado y se colocaron en viales de cristal de 5 ml con tapa rosca (que soportan altas temperaturas y evitan la pérdida de la muestra por evaporación). Los viales se pusieron en una gradilla metálica y se cubrieron con papel aluminio y las muestras se calentaron a 100 °C durante 1 hora.

Posteriormente, los viales se abrieron en campana con precaución mientras aún estaban calientes y se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 15 minutos. 200 µl de fenol al 6% se agregaron al fondo de cada vial y se mezclaron por pipeteo y posteriormente 1 ml de ácido sulfúrico concentrado se agregó por las paredes de los viales, los viales se cerraron nuevamente y se mezclaron por agitación manual sosteniéndolos por las tapas, pues se produce una fuerte reacción exotérmica. En cuanto se enfriaron los viales, se leyó la absorbancia de las muestras y de los respectivos puntos de las rectas de calibración a 490 nm en el espectrofotómetro SPECORD®.

No se ejecutaron lecturas en la biomasa, solo el sobrenadante fue analizado. Pues al exponer las células a altas temperaturas se liberan los polisacáridos que corresponden a otros procesos celulares y según la literatura no se aprecian diferencias significativas, mientras que el sobrenadante resulta más informativo en la búsqueda de exopolisacáridos (Yoshimura *et al*, 2007).

3.7. Cuantificación y caracterización de *biofilms*

Para la cuantificación de *biofilms* se modificó el protocolo propuesto por O'Toole (2011). Para ello, los cultivos *stock* que se hicieron crecer inicialmente en tubos

cónicos con aireación constante hasta alcanzar una D.O. de aproximadamente 0,7 a 750 nm, se traspasaron posteriormente a placas de microtitulación de 12 pocillos diluyendo los cultivos en BG-11 hasta una D.O. de 0,3 (fase exponencial temprana). De esta manera se sembraron 1 ml de cultivo de cada estirpe en cada pocillo (28°C e iluminación de 5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Cada estirpe se cultivó por triplicado en las diferentes condiciones evaluadas (condiciones estándar de crecimiento, deficiencia de nitrógeno y NaCl 300 mM), cada pocillo contenía un cubreobjetos circular de 18 mm en condiciones estériles para posteriores observaciones al microscopio, como control negativo se cargó en los pocillos 1 ml de BG-11 por triplicado. Se llevaron a cabo observaciones los días 1, 5, 10, 15 y 20 desde el inicio del experimento, para ello, los pocillos fueron tratados por 2 minutos con 1 ml de cristal violeta al 0,25% y tres lavados con agua Milli-q. Posteriormente, el *biofilm* formado en los pocillos y teñido con cristal violeta, se desprendió de las paredes de los pocillos por pipeteo, usando 1 ml de ácido acético al 36%. Las muestras se cuantificaron a 630 nm utilizando ácido acético al 36% como blanco.

3.8. Ensayos de germinación de semillas de arroz.

Para evaluar la posible actividad protectora del exopolisacárido rescatado en sobrenadantes de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 se llevó a cabo un ensayo de germinación de semillas arroz de la variedad *Ariete* frente a condiciones de estrés de estrés salino (NaCl 100 mM) modificado de Sam (2007).

Las semillas se lavaron al principio del experimento durante 15 minutos en agitación constante en hipoclorito de sodio al 5% y posteriormente se hicieron tres lavados con agua destilada. A continuación, se colocó papel filtro Whatman estéril al interior de placas de Petri y se dispusieron un total de 20 semillas por placa, 10 ml de cada tratamiento se vertió en cada placa. Se definieron 8 tratamientos diferentes, cuatro de ellos en condiciones estándar de crecimiento y cuatro de ellos en presencia de NaCl 100 mM. Los tratamientos fueron: BG11, el sobrenadante de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120, las células de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y las células de la estirpe de sobreexpresión de FurC AG2770FurC. Las semillas se mantuvieron los primeros cuatro días del experimento en condiciones de obscuridad. Posteriormente se

pasaron a fotoperiodo de 16 horas y se tomaron datos los días 4, 6 y 8. Para ello, se dispuso de un total 9 placas por tratamiento al principio del experimento, para tener tres replicas por día. Se evaluaron, porcentaje de germinación, longitud en mm de la raíz pivotante, longitud en mm del tallo y cantidad de hojas.

3.9. Análisis estadístico:

Todos los experimentos planteados se evaluaron usando tres replicas técnicas y tres réplicas experimentales. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el Software Statistix 9. La media de los tratamientos y sus interacciones se calcularon mediante ANOVA tras llevar a cabo una prueba de normalidad y homogeneidad de varianzas. Las medias de los tratamientos se compararon con las medias de los controles, usando el test HSD de Tukey con un $P < 0,05$.

3.10. Identificación de glicosiltransferasas y análisis filogenéticos

Con el fin de identificar algunos genes involucrados en la síntesis y transporte de exopolisacáridos y formación de *biofilms* en *Anabaena* sp. PCC7120, se realizó una búsqueda de las secuencias anotadas como glicosiltransferasas en la base de datos CyanoBase (<http://genome.kazusa.or.jp>) y posteriormente se amplió la información sobre esos genes usando la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org>) y la enciclopedia de genes y genomas de Kyoto, KEGG (<https://www.kegg.jp>). La organización de estas secuencias en superfamilias estructurales y en subfamilias se verificó en la base de datos de Enzimas de Carbohidratos-activos CAZy (<http://www.cazy.org>).

Posteriormente, con las respectivas secuencias de aminoácidos, se construyeron árboles filogenéticos utilizando las herramientas proporcionadas por la plataforma web (phylogeny.fr), en la modalidad “*a la carte*”, con el objetivo de identificar que secuencias correspondientes a glicosiltransferasas, o probables glicosiltransferasas presentan mayor similitud entre ellas. Los alineamientos correspondientes se hicieron mediante MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation).

Para confirmar la implicación de las proteínas FUR en la regulación de algunas glicosiltransferasas, se buscaron cajas FurA y FurC en las secuencias de los promotores de todas las GTs descritas en el genoma de *Anabaena* sp.

PCC7120. La búsqueda de las secuencias de los promotores se llevó a cabo mediante las herramientas proporcionadas por la base de datos Ensembl Genome Browser (ensembl.org). Las cajas FUR se definieron con base en trabajos de González *et al* (2014) y Sevilla *et al* (2019), de donde se escogieron secuencias con una longitud de 23 pb para FurA y 19 pb para FurC. Con la herramienta FIMO (Find Individual Motif Occurrence) se identificaron las cajas FurA y FurC para las secuencias de glicosiltransferasas, usando como parámetro de sensibilidad un p-value menor a 0,0001.

Resultados **4**

4. Resultados.

4.1. Influencia de diferentes factores ambientales en la síntesis de exopolisacáridos y formación de *biofilms* en *Anabaena* sp. PCC7120:

Se determinó la cantidad de exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y los niveles de formación de *biofilms* de esta cianobacteria en condiciones estándar de crecimiento (medio BG11, intensidad lumínica de 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y 28°C). Así mismo, se evaluó la influencia de diferentes condiciones ambientales, concretamente la deficiencia de nitrógeno combinado y alta concentración salina (NaCl 300 mM) tanto en la producción de exopolisacáridos como en la formación de *biofilms* en la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120. Las condiciones de estrés se seleccionaron por ser similares a las experimentadas por las plantas en suelos intervenidos por la sobreexplotación agrícola (Singh *et al.* 1970; Rowell. 1994; Macedo *et al.* 2008; FAO & ITPS. 2015; Cuevas *et al.* 2019).

4.1.1. Síntesis de exopolisacáridos:

La determinación de exopolisacáridos de *Anabaena* sp. PCC7120 se llevó a cabo tras 24 y 48 horas de exposición a los diferentes estreses. Los cultivos *stock* que se hicieron crecer inicialmente en tubos cónicos con aireación constante hasta alcanzar una D.O. de aproximadamente 0,7 a 750 nm, se traspasaron posteriormente a Erlenmeyers diluyendo los cultivos en BG-11 hasta una D.O. de 0,3 (fase exponencial temprana). De esta manera se prepararon 100 ml de cultivo de *Anabaena* sp. PCC7120 en Erlenmeyer de 250 ml, (28°C e iluminación de 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y agitación constante 180 rpm en incubador orbital). Los Erlenmeyer se sembraron por triplicado en cada una de las condiciones evaluadas (condiciones estándar de crecimiento, deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado y NaCl 300 mM). Se tomaron muestras a 0, 24 y 48 horas de comenzado el experimento y seguidamente se observaron al microscopio cambios fenotípicos, debidos a la deficiencia de nitrógeno y a la salinidad.

En las células de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 cultivadas en BG11₀ se observó la presencia de heterocistos que son indicativos de la deficiencia de nitrógeno (Figura 17). Bajo el microscopio de campo brillante

pueden verse los heterocistos como células más grandes con cuerpos polares (Figura 17 A), mientras que en el microscopio de fluorescencia estas células dejan de ser observables debido a la degradación de pigmentos como las ficobiliproteínas durante la maduración de este tipo de células, y por lo tanto no presentan fluorescencia a 600 nm (canal rojo) (Figura 17 B).

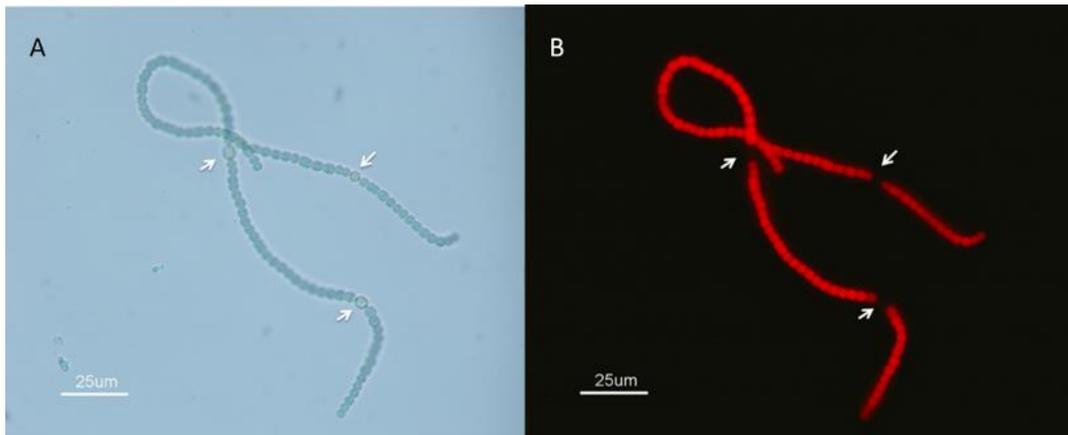


Figura 17. Formación de heterocistos (flechas blancas) en células de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 cultivadas en BG110. Las imágenes fueron tomadas en microscopio Nikon eclipse 50i epifluorescence.

El tratamiento de los cultivos con NaCl 300 mM produjo alteraciones en la morfología y ultraestructura de las células. El efecto de altas concentraciones de sal en las células de *Anabaena* sp. PCC7120 se evidenció como un cambio en la turgencia. Bajo el microscopio óptico puede verse el cambio gradual en el tamaño y forma de las células de *Anabaena* sp. PCC7120 pasadas 24 horas (Figuras 18 A y B) y 48 horas (Figura 18 C) de exposición a altas concentraciones de sal.

Bajo el microscopio electrónico de barrido se detectaron además algunos cristales de NaCl formándose en la superficie de las células (Figura 18 F). Las imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de transmisión evidenciaron como las altas concentraciones de sal afectaron la membrana celular, el espacio periplasmático y el citoplasma, produciendo células con formas irregulares (Figura 18 G, H e I).

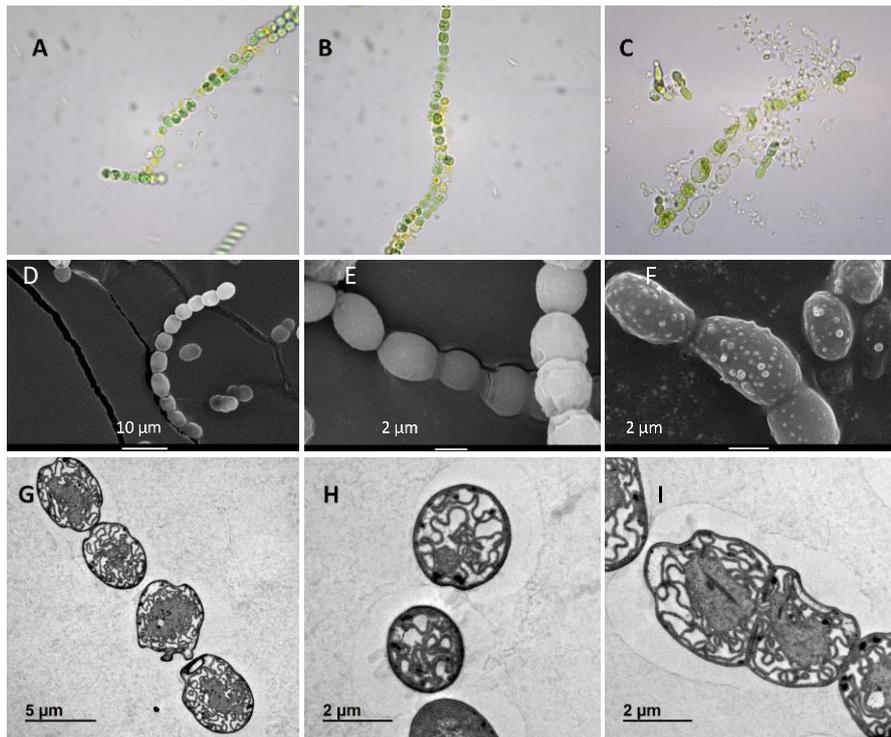


Figura 18. Efecto de altas concentraciones de sal en las células de *Anabaena* sp. PCC7120. El cambio en la turgencia como resultado de la exposición a 300 mM de NaCl se pudo ver bajo el microscopio óptico en A, B (24 horas) y C (48 horas), bajo el microscopio electrónico de barrido en D, (2000 X) E (7000 X) y F (8500 X) y bajo el microscopio electrónico de transmisión en G, H y I.

Una vez confirmado el efecto de los diferentes estreses en la morfología de *Anabaena* sp. PCC 7120, se procedió a la cuantificación de exopolisacáridos mediante el método fenol-sulfúrico (Michel Dubois *et al*, 1956; Underwood *et al*. 1995; Masuko *et al*. 2005; Teasdale *et al*, 2018) (Figura 19). Las medidas se obtuvieron usando una recta de calibrado de glucosa. Para la toma de datos se utilizaron tres réplicas técnicas y tres réplicas experimentales. En cada tiempo, los tratamientos con diferencias significativas respecto a las condiciones estándar de crecimiento se indican en el gráfico con un asterisco.

Las condiciones de estrés (deficiencia de nitrógeno combinado y tratamiento con NaCl 300 mM) afectaron significativamente el proceso de síntesis de exopolisacáridos, tal y como se confirmó mediante análisis de varianza y el test de Tukey HSD $<0,05$ de los datos obtenidos en las dos condiciones evaluadas respecto a las condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo) a las 24 horas del experimento. Estas diferencias siguieron

presentándose tras 48 horas de exposición al estrés, con mayores registros de exopolisacáridos en la exposición a 300 mM de NaCl, alcanzando valores de 1,0 y 1,4 μg de exopolisacáridos/ 10^6 células tras 24 y 48 horas de estrés salino respectivamente (Figura 19).

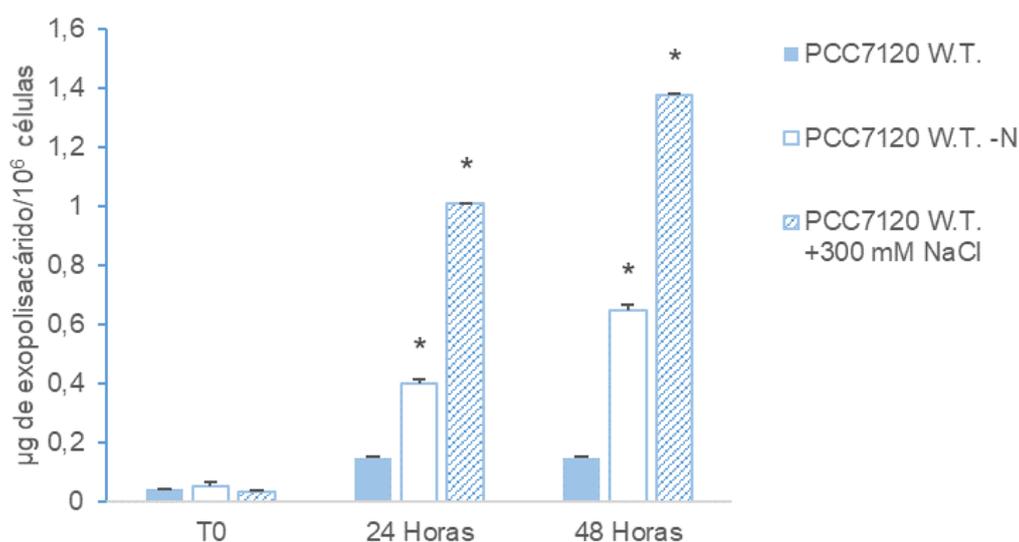


Figura 19. Cuantificación mediante el método fenol-sulfúrico (abs 490nm) de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 (W.T.) tomados a las 24 y 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo), en deficiencia de nitrógeno (W.T. -N) y altas concentraciones de sal (W.T. + 300mM de NaCl).

El incremento del exopolisacárido observado en las células enfrentadas a deficiencia de nitrógeno y a estrés salino respecto al exopolisacárido observado en condiciones estándar de crecimiento fue de 4 y 9 veces respectivamente.

4.1.2. Formación de *biofilms*

El experimento de cuantificación de *biofilms* se llevó a cabo durante 20 días. De forma similar a la cuantificación realizada en el experimento de exopolisacáridos, la cepa silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 se expuso a deficiencia de nitrógeno soluble y 300 mM de NaCl. Las células se ajustaron a una densidad óptica (abs 750 nm) de 0,3 al inicio del experimento (fase exponencial temprana), los controles permanecieron creciendo en medio BG11 en condiciones estándar y se establecieron las condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y estrés salino mediante tres pasos de centrifugación para reemplazar el medio BG11

completo por el BG11 con las condiciones de estrés respectivas. Se tomó 1ml de *Anabaena* sp. PCC7120 cultivada en condiciones estándar y en cada estrés, se aplicó en condiciones estériles en placas de microtitulación de 12 pocillos por triplicado, las placas permanecieron selladas y se expusieron a una intensidad lumínica de $50 \mu\text{mol/seg/m}^2$ durante el transcurso del experimento. La cuantificación del *biofilm* producido por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 unido a las paredes de las placas se llevó a cabo utilizando tinción con cristal violeta y la absorvación a 630 nm (O'Toole., 2011), durante 20 días de experimento, haciendo observaciones los días 1, 5, 10, 15 y 20 (Figura 20).

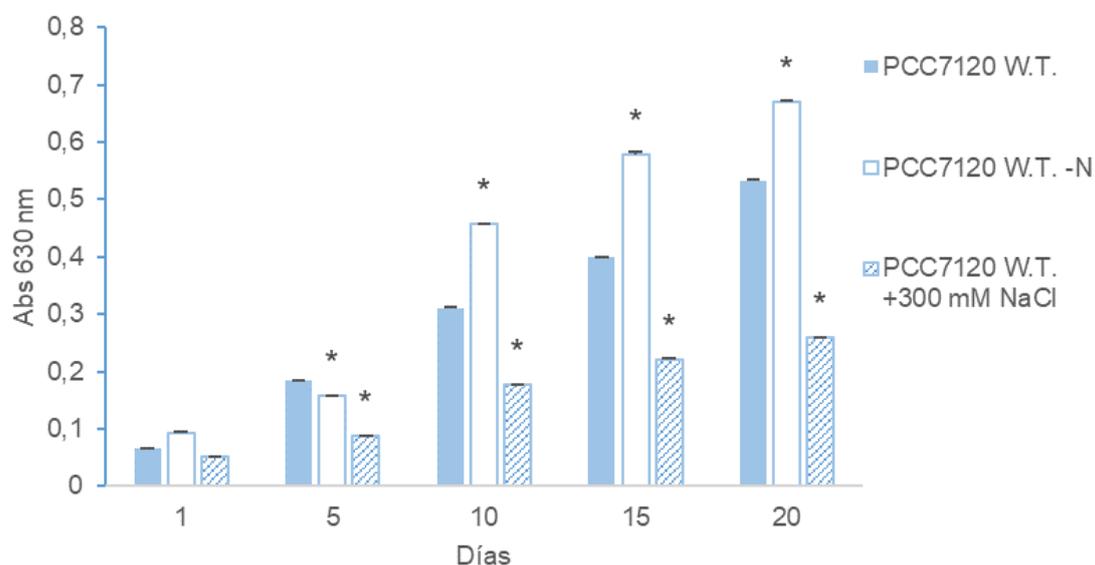


Figura 20. Formación de *biofilm* producido por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo), deficiencia de nitrógeno soluble y 300 mM de NaCl. En cada tiempo, los tratamientos con diferencias significativas respecto a las condiciones estándar de crecimiento se indican en el gráfico con un asterisco.

A partir de los 5 días de déficit nitrógeno combinado se incrementó significativamente la formación de *biofilm*, aumentando 1,45 veces tras 10 días de deficiencia. Este aumento se mantuvo a los 15 días para reducirse ligeramente tras 20 días de deficiencia de nitrógeno (1,30 veces respecto a cultivos en condiciones estándar de crecimiento). El tratamiento con NaCl 300 mM afectó notablemente la capacidad de formación de *biofilm*, produciendo una

disminución en torno al 50% a los 5 días del tratamiento, que se mantuvo en el tiempo (Figura 20).

4.2. Consecuencia de la desregulación de proteínas FUR en la síntesis de exopolisacáridos y la formación de *biofilm* en *Anabaena* sp. PCC7120.

4.2.1. Caracterización fenotípica de las estirpes de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC en condiciones de deficiencia de nitrógeno y estrés salino:

Se llevó a cabo la caracterización fenotípica parcial de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC (AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC) en condiciones de cultivo estándar (control), en deficiencia de nitrógeno combinado, así como en presencia de altas concentraciones de sal (300 mM de NaCl).

Previamente a la realización de este trabajo, se disponían de estudios del grupo describiendo la caracterización fenotípica de las estirpes de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC (Gonzalez *et al.* 2010; Calvo Sein-Echaluze. 2015 y Sevilla *et al.* 2019). En esta tesis se ha evaluado el crecimiento fotoautotrófico y agregación celular, el contenido en pigmentos y proteína total, así como la medida de la tasa fotosintética de la estirpe silvestre y las tres variantes de sobreexpresión de las proteínas FUR.

4.2.1.1. Efecto de la deficiencia de nitrógeno y la alta salinidad sobre la agregación y la pigmentación

El efecto de los estreses en las cepas de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC pudo apreciarse en el medio de cultivo, como un cambio en la pigmentación y en el grado de agregación de las células, tanto en condiciones de deficiencia de nitrógeno como en estrés salino. Estos cambios se pudieron observar en cultivos creciendo en medio BG11 líquido en las condiciones mencionadas, tanto en tubos cónicos o Erlenmeyers, como en cultivos crecidos en placas de microtitulación de 12 pocillos (Figuras 21 y 22).

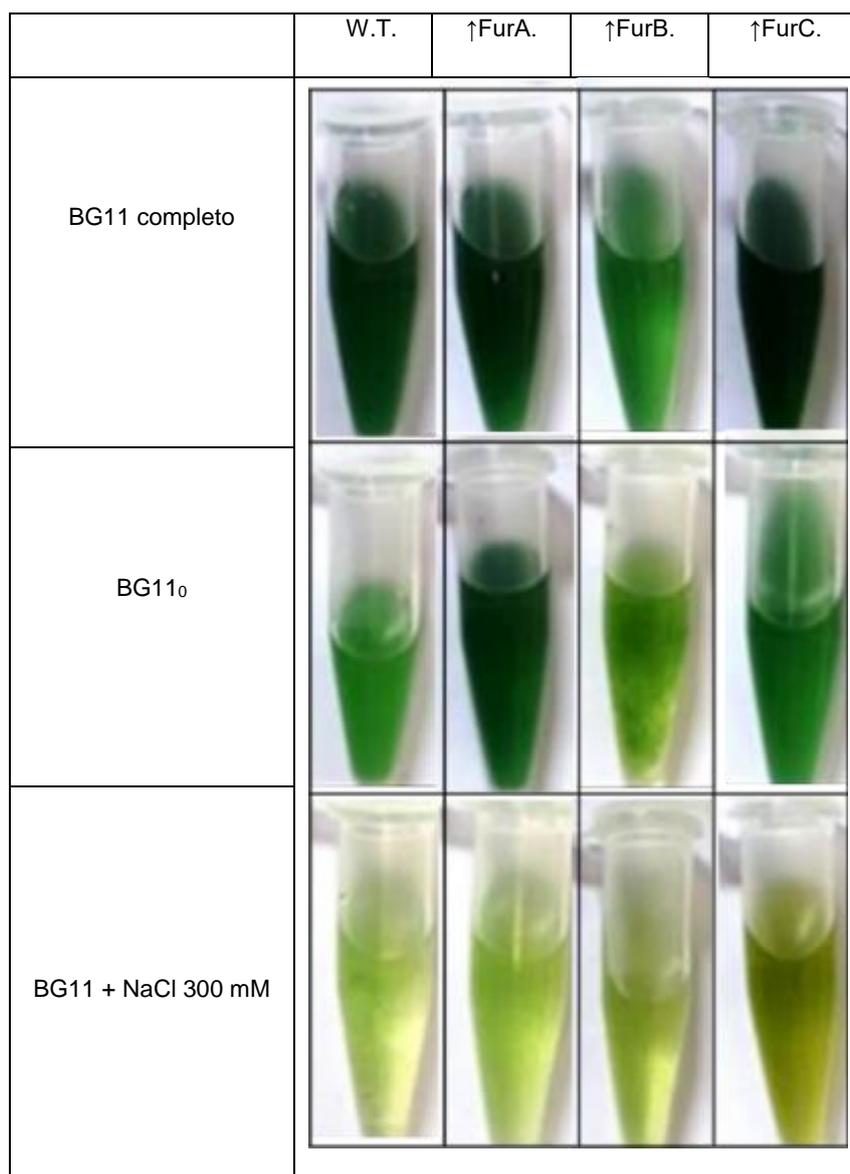


Figura 21. Diferencias en la pigmentación de 1 ml de cultivo recuperado en tubos Eppendorf tras 48 horas de crecimiento en Erlenmeyer en las condiciones de estrés estudiadas 1. La estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión 2. AG2770FurA, 3. VCS2770FurB y 4. EB2770FurC, tras 48 horas de crecimiento en condiciones estándar, en deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado y en NaCl 300 mM.

Los cultivos de las estirpes analizadas partieron de una densidad óptica de 0,3 (750 nm). Tras 48 horas de crecimiento en condiciones estándar se pudo apreciar una diferencia en la pigmentación, siendo más oscuras las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA y EB2770FurC, seguidas por la estirpe silvestre. Destacó la estirpe de sobreexpresión VCS2770FurB que presentó una coloración más tenue. Este comportamiento siguió apreciándose en deficiencia

de una fuente de nitrógeno combinado, sin embargo, este estrés disminuyó la intensidad en la pigmentación de las cuatro estirpes, siendo la estirpe de sobreexpresión AG2770FurA la que mejor se adaptó a la deficiencia conservando un color similar al que se ve condiciones estándar de crecimiento. La salinidad por otro lado, produjo una evidente clorosis en todas las estirpes evaluadas. Un comportamiento similar pudo apreciarse en los pocillos de las placas de microtitulación (Figura 22).

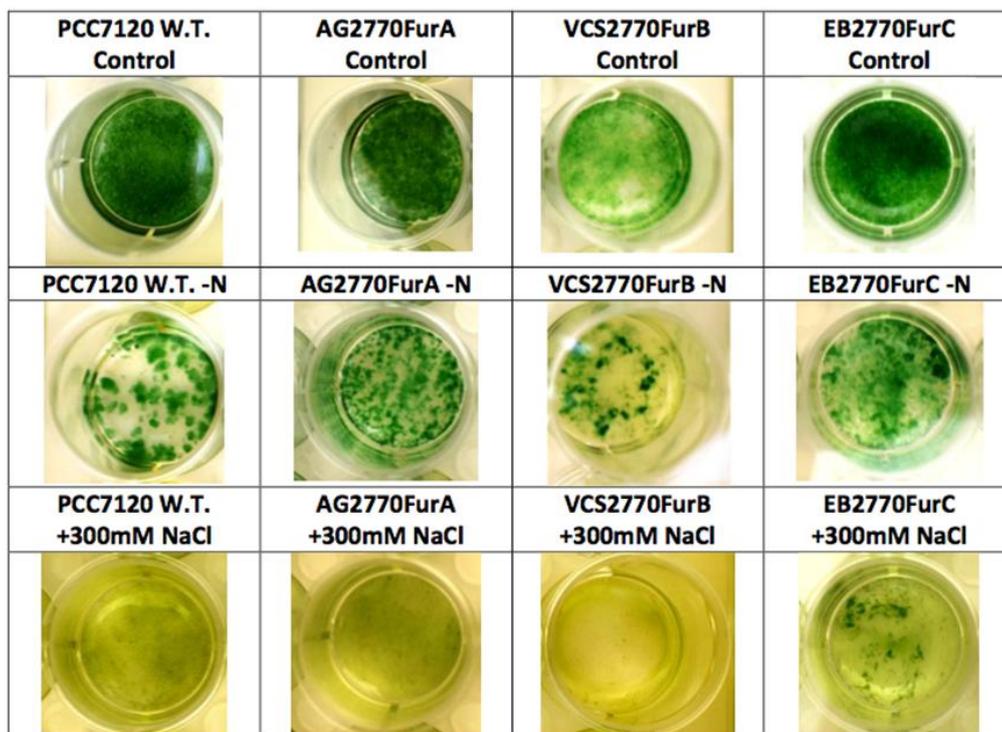


Figura 22. Apariencia en los pocillos de la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC (AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC) en medio BG11 a los 20 días de exposición a dos condiciones de estrés (deficiencia de nitrógeno y altas concentraciones de sal).

En condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo) se observaron la pigmentación y la agregación características de *Anabaena* sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC tras 20 días de cultivo en placas de microtitulación. Los cultivos de las cuatro estirpes analizadas partieron de una densidad óptica de 0,3 (750 nm). Tras 20 días de crecimiento se apreciaron diferencias en la pigmentación de dichos cultivos. En particular las células de la estirpe de sobreexpresión VCS2770FurB, que presentaron una

pigmentación más tenue. Así mismo, la deficiencia de nitrógeno produjo una evidente agregación de las células en el medio, con la formación de grumos celulares macroscópicos. Especialmente en las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA y EB2770FurC, seguidos de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120. La estirpe de sobreexpresión de VCS2770FurB fue la que presentó menor agregación tras 20 días en deficiencia de nitrógeno. Por otra parte, las altas concentraciones de sal (300 mM de NaCl) produjeron una fuerte clorosis en todas las estirpes y eventualmente la muerte celular al final del experimento. La única estirpe que sobrevivió en estas condiciones, presentando además agregación celular fue EB2770FurC (Figura 22).

4.2.1.2. Influencia de la deficiencia de nitrógeno y la alta salinidad sobre el crecimiento

Debido a la diferencia en tamaño, forma y cantidad de pigmentos que contienen las células de cada estirpe (Gonzalez *et al.*, 2010, C. Sein-Echaluce *et al.*, 2015, y Sevilla *et al.*, 2019), se consideró que el conteo celular usando cámara de Neubauer resultaba más adecuado que otros parámetros como densidad óptica o volumen celular empaquetado para comparar el crecimiento entre la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC7120 y las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2070FurB y EB2770FurC.

Para ello, los cultivos se hicieron crecer inicialmente en tubos cónicos con aireación constante hasta alcanzar una D.O. de aproximadamente 0,7 y luego se traspasaron a Erlenmeyer diluyendo los cultivos en BG11 hasta una D.O. de 0,3 (fase exponencial temprana). De esta manera se prepararon 100 ml de cultivo de cada estirpe en Erlenmeyer de 250 ml, (28°C, iluminación de 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y agitación constante a 180 rpm en incubador orbital). Cada estirpe se cultivó por triplicado y el conteo celular se llevó a cabo al inicio del experimento y pasadas 24 y 48 horas. El crecimiento de las cuatro estirpes (en condiciones estándar) puede apreciarse en la Figura 23.

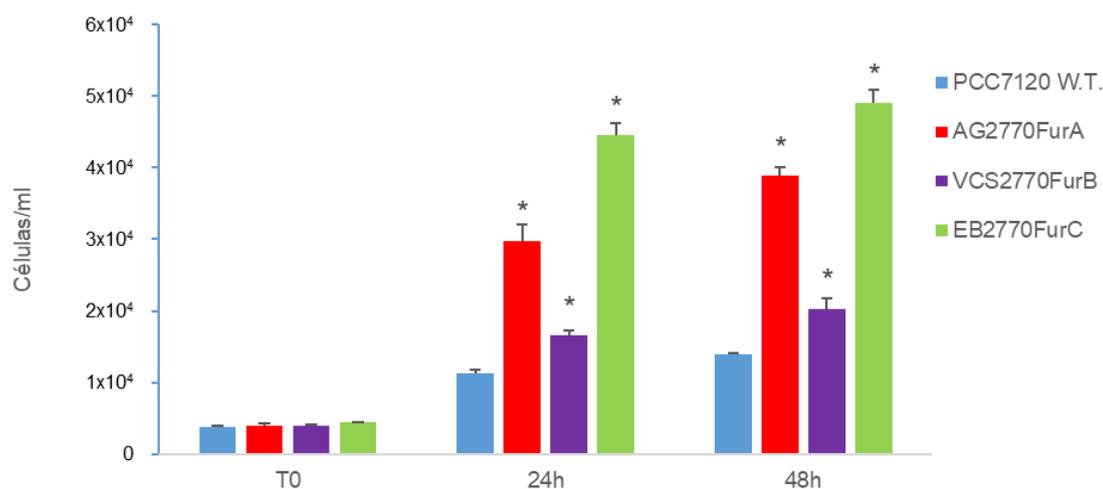


Figura 23. Conteo celular de *Anabaena* sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2070FurB y EB2770FurC bajo condiciones estándar de crecimiento.

Tras 24 horas en condiciones estándar la estirpe que presentó mayor crecimiento fue EB2770FurC, seguida de AG2770FurA, VCS2770FurB, y la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120. Este comportamiento siguió presentándose pasadas 48 horas. Usando el test de comparación de medias de Tukey se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de las cuatro estirpes con un coeficiente de variación bajo y varianzas homogéneas, en 24 y 48 horas (Figura 23). Este resultado se refleja en las respectivas tasas de crecimiento ($Tasa\ de\ crecimiento = \frac{población\ final - población\ inicial}{población\ inicial}$), la cepa silvestre registró una tasa de crecimiento de 2,68 mientras que las estirpes de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC registraron tasas de crecimiento de 8,75; 4,22; y 10,23 (Tabla 8).

Tabla 8. Cantidad de células/ml cuantificadas en los cultivos de *Anabaena* sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2070FurB y EB2770FurC. Media \pm SE bajo condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo).

Estirpes	0 horas	24 horas	48 horas	Tasa de crecimiento
PCC7120 W.T.	3762,8 \pm 144	11187 \pm 643	13876 \pm 293	2,68
AG2770FurA	3983,2 \pm 360	29809 \pm 2291	38857 \pm 1189	8,75
VCS2770FurB	3888,2 \pm 140	16523 \pm 744	20334 \pm 1481	4,22
EB2770FurC	4367,5 \pm 89	44580 \pm 1664	49086 \pm 1754	10,23

Al comparar la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo) y en deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado, con la estirpe de sobreexpresión de FurA (AG2770FurA), se observa que la deficiencia de nitrógeno redujo el crecimiento de las dos estirpes (Figura 24).

Además, en las dos condiciones evaluadas la estirpe de sobreexpresión de FurA (AG2770FurA) creció más rápido que la estirpe silvestre. Sin embargo, la estirpe de sobreexpresión de FurA fue más susceptible a la deficiencia de nitrógeno, pues a las 24 horas de retirar el nitrógeno combinado del medio, el crecimiento de la estirpe de sobreexpresión AG2770FurA se redujo un 70% con respecto al valor registrado en condiciones estándar, mientras que en la cepa silvestre la disminución fue del 40%.

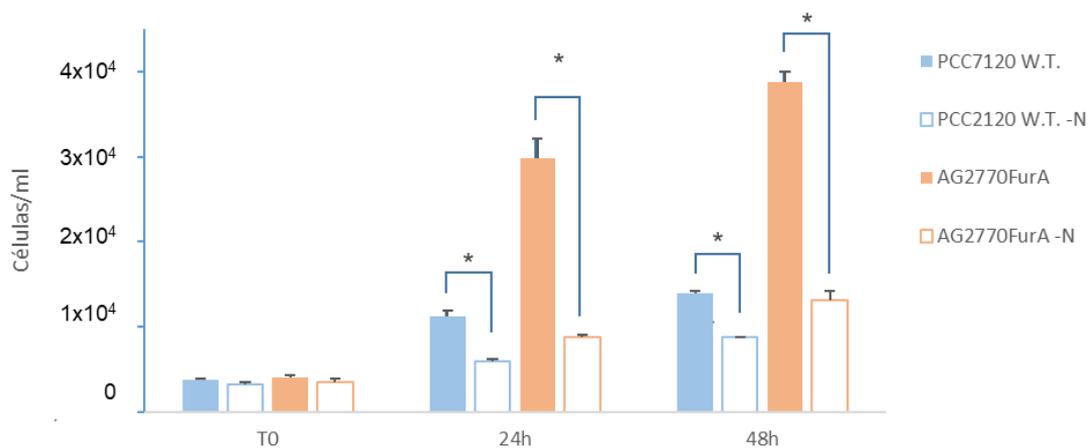


Figura 24. Conteo celular de la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC7120 y de la estirpe de sobreexpresión AG2770FurA tras 24 y 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en deficiencia de nitrógeno combinado.

Tras 48 horas de deficiencia de nitrógeno la susceptibilidad de las dos estirpes se mantuvo igual, siendo la estirpe de sobreexpresión de FurA más susceptible a la deficiencia de nitrógeno que la estirpe silvestre, la reducción del crecimiento para la estirpe de sobreexpresión AG2770FurA a las 48 horas siguió siendo un 70% frente a una disminución del 40% en la estirpe silvestre.

Del mismo modo, al comparar la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo) y en

deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado, con la estirpe de sobreexpresión de FurB, (VCS2770FurB) se observa que la deficiencia de nitrógeno redujo el crecimiento de las dos estirpes (Figura 25).

En las dos condiciones evaluadas la estirpe de sobreexpresión de FurB (VCS2770FurB) creció más rápido que la estirpe silvestre, sin embargo, las dos estirpes presentaron la misma susceptibilidad a la deficiencia de nitrógeno, pues pasadas 24 horas del experimento tanto la estirpe de sobreexpresión VCS2770FurB, como la estirpe silvestre presentaron una disminución del crecimiento del 50% con respecto al obtenido en las condiciones estándar.

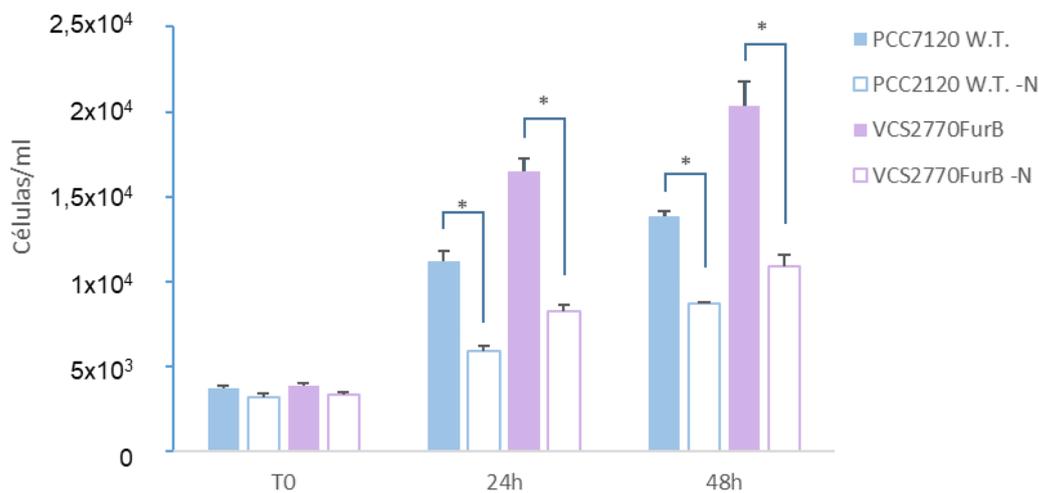


Figura 25. Conteo celular de la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC7120 y de la estirpe de sobreexpresión VCS2770FurB tras 24 y 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en deficiencia de nitrógeno combinado.

Tras 48 horas del experimento la susceptibilidad de las dos estirpes a la deficiencia de nitrógeno se mantuvo igual, siendo más susceptible la estirpe de sobreexpresión de FurB. El crecimiento a las 48 horas se redujo un 50% en la estirpe VCS2770FurB, mientras que para la estirpe silvestre la reducción en el crecimiento fue del 40%

Finalmente, al comparar la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo) y en deficiencia de una

fuente de nitrógeno combinado, con la estirpe de sobreexpresión de FurC, se observó que la deficiencia de nitrógeno redujo el crecimiento de las dos estirpes (Figura 26).

En las dos condiciones evaluadas la estirpe de sobreexpresión de FurC (EB2770FurC) creció más rápido que la estirpe silvestre sin embargo la estirpe de sobreexpresión de FurC fue más susceptible a la deficiencia de nitrógeno, pues pasadas 24 horas del experimento la estirpe de sobreexpresión de FurC presentó una disminución en el crecimiento del 80% con respecto a las medidas realizadas en cultivos en condiciones estándar, mientras que la disminución en el crecimiento de la estirpe silvestre fue del 50%.

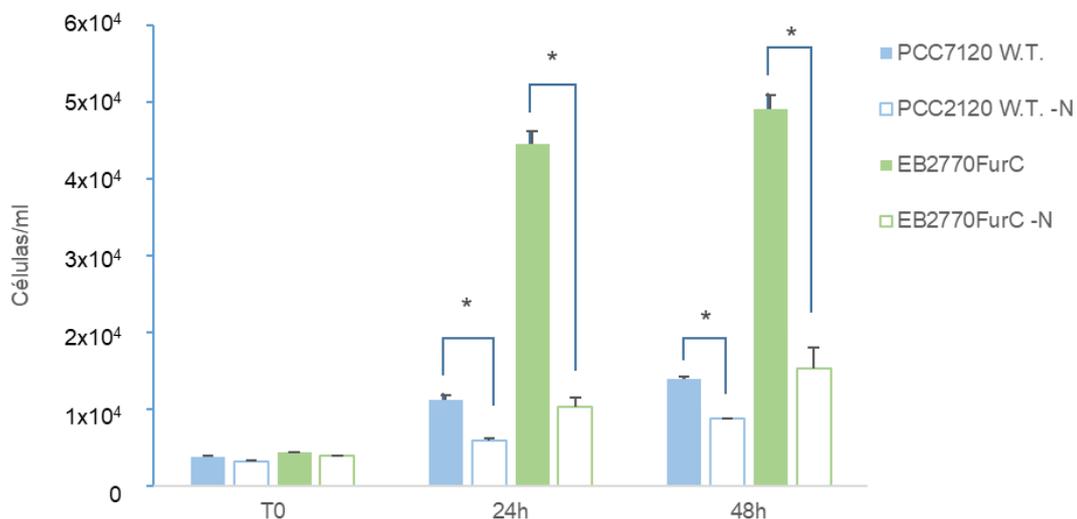


Figura 26. Conteo celular de la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC7120 y de la estirpe de sobreexpresión EB2770FurC tras 24 y 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en deficiencia de nitrógeno combinado.

Tras 48 horas del experimento, la susceptibilidad de las dos estirpes se mantuvo, siendo más susceptible a la deficiencia de nitrógeno la estirpe de sobreexpresión de FurC que la estirpe silvestre, sin embargo, la disminución del crecimiento de las dos estirpes fue menor que en 24 horas pues la reducción del crecimiento de la estirpe EB2770FurC es del 70% frente a una disminución del 40% registrada para la estirpe silvestre.

El análisis estadístico del conteo celular para todas las estirpes de sobreexpresión enfrentadas a deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado, indicó un mayor crecimiento de células/ml en la estirpe EB2770FurC, seguido de las cepas AG2770FurA y VCS2770FuB. La estirpe silvestre fue la que presentó un menor crecimiento, este comportamiento es similar al observado bajo condiciones estándar de crecimiento (Tabla 9).

La deficiencia de nitrógeno afectó a la tasa de crecimiento ($Tasa\ de\ crecimiento = \frac{población\ final - población\ inicial}{población\ inicial}$) de todas las cepas evaluadas, pero la susceptibilidad a la deficiencia de nitrógeno fue diferente, siendo la estirpe de sobreexpresión de FurC la más susceptible a la deficiencia con una disminución en el crecimiento del 80% a las 24 horas y del 70% a las 48 horas, seguido de la estirpe de sobreexpresión de FurA (70% a las 24 ya las 48 horas), y la estirpe de sobreexpresión de FurB (50% a las 24 y a las 48 horas) (Tabla 9).

Tabla 9. Conteo celular de *Anabaena* sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2070FurB y EB2770FurC. Media \pm SE bajo deficiencia de nitrógeno. Cantidad de células/ml. El porcentaje de reducción en el crecimiento debido a la deficiencia de nitrógeno de cada estirpe se calculó respecto al crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo).

Estirpes	0 horas	24 horas	48 horas	Tasa de crecimiento	Reducción en el crecimiento	
					24 horas	48 horas
PCC7120 W.T. -N	3234 \pm 179	5924 \pm 304	8741 \pm 56	1,70	40%	40%
AG2770FurA -N	3441 \pm 454	8711 \pm 285	13134 \pm 1010	2,81	70%	70%
VCS2770FurB -N	3357 \pm 146	8283 \pm 345	10892 \pm 672	2,24	50%	50%
EB2770FurC -N	3918 \pm 10	10352 \pm 1213	15277 \pm 2755	2,89	80%	70%

Cabe destacar que el comportamiento de la estirpe de sobreexpresión de FurB fue el más similar al de la cepa silvestre, cuyo crecimiento en condiciones de deficiencia de nitrógeno disminuyó al 50% a las 24 horas y hasta el 40% a las 48 horas.

Al igual que el estrés que representa la deficiencia de nitrógeno, con respecto al efecto de altas concentraciones de sal, se aprecia una reducción en

el crecimiento de todas las estirpes estudiadas, tanto de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 como de las cepas de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC. Esta reducción en el crecimiento debido a la presencia de 300 mM de NaCl en el medio, mostró diferencias significativas al comparar cada una de las estirpes enfrentadas a 300 mM de NaCl consigo mismas en condiciones estándar de crecimiento, sin embargo, el efecto en la reducción del crecimiento celular para las cuatro estirpes fue mayor en presencia del estrés salino que en deficiencia de nitrógeno.

Al comparar la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo) y en presencia de 300 mM de NaCl, con la estirpe de sobreexpresión de FurA, (AG2770FurA), se observa que el estrés producido por las altas concentraciones de sal, redujo el crecimiento de ambas estirpes (Figura 27).

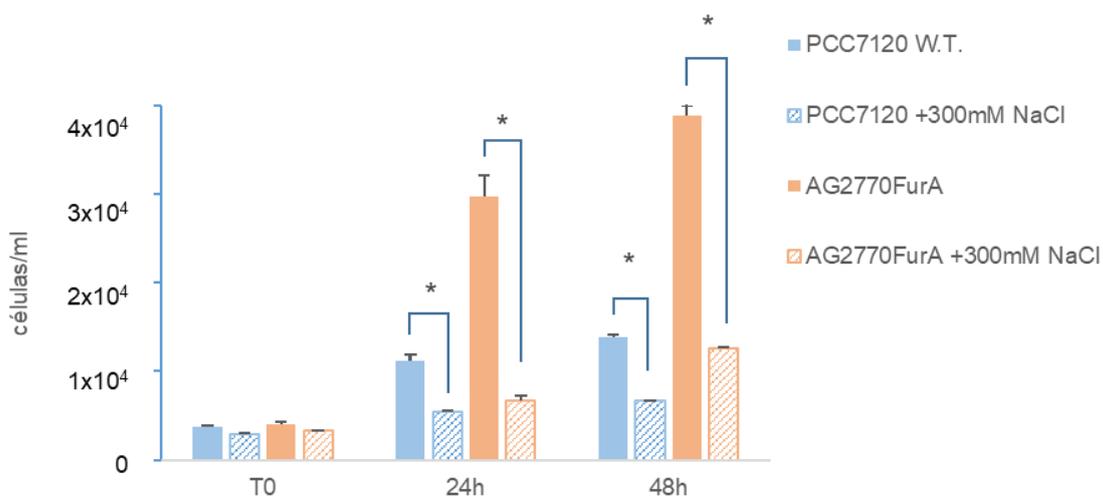


Figura 27. Conteo celular de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y de la estirpe de sobreexpresión AG2770FurA tras 24 y 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en altas concentraciones de sal (300 mM NaCl). Cantidad de células/ml.

Además, en las dos condiciones evaluadas la estirpe de sobreexpresión de FurA (AG2770FurA) creció más rápido que la estirpe silvestre, sin embargo, la estirpe de sobreexpresión de FurA fue más susceptible al estrés producido por las altas concentraciones de sal, pues pasadas 24 horas del experimento la disminución del crecimiento para la estirpe de sobreexpresión de FurA respecto a las

condiciones estándar fue del 80% mientras que la disminución del crecimiento de la estirpe silvestre fue del 50%. Tras 48 horas del experimento la susceptibilidad de las dos estirpes se mantuvo igual, siendo más susceptible la estirpe de sobreexpresión AG2770FurA al estrés salino que la estirpe silvestre, sin embargo, la disminución en el crecimiento de la estirpe silvestre se mantuvo en el 50%, mientras que la reducción del crecimiento para la estirpe de sobreexpresión de AG2770FurA fue algo menor que a las 24 horas (70% tras 48 horas de exposición a NaCl frente a la disminución observada a las 24 horas).

Del mismo modo, al comparar la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo) y en 300 mM de NaCl, con la estirpe de sobreexpresión de FurB, (VCS2770FurB), se observa que el estrés producido por las altas concentraciones de sal redujo el crecimiento de las dos estirpes (Figura 28).

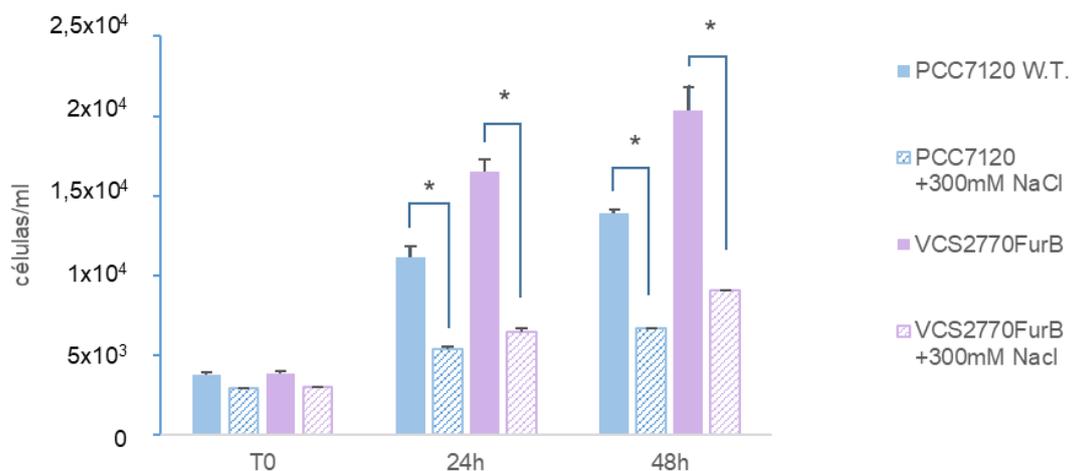


Figura 28. Conteo celular de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y de la estirpe de sobreexpresión VCS2770FurB tras 24 y 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en altas concentraciones de sal (300 mM NaCl). Cantidad de células/ml.

En las dos condiciones evaluadas la estirpe de sobreexpresión de FurB (VCS2770FurB) creció más rápido que la estirpe silvestre, sin embargo, la estirpe de sobreexpresión de FurB fue más susceptible al estrés producido por las altas concentraciones de sal, pues pasadas 24 horas del experimento, la disminución del crecimiento de la estirpe VCS2770FurB fue del 60% respecto a las

condiciones estándar, mientras que la disminución del crecimiento de la estirpe silvestre fue del 50%. Tras 48 horas del experimento la susceptibilidad de las dos estirpes se mantuvo igual, siendo más susceptible a las altas concentraciones salinas, la estirpe de sobreexpresión de FurB que la estirpe silvestre. La reducción del crecimiento para la estirpe silvestre y para la estirpe de sobreexpresión de FurB siguió siendo del 50% y el 60%, respectivamente.

Finalmente, al comparar la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo) y en 300 mM de NaCl, con la estirpe de sobreexpresión de FurC, (EB2770FurC), se observa que el estrés producido por las altas concentraciones de sal redujo el crecimiento de ambas estirpes (Figura 29).

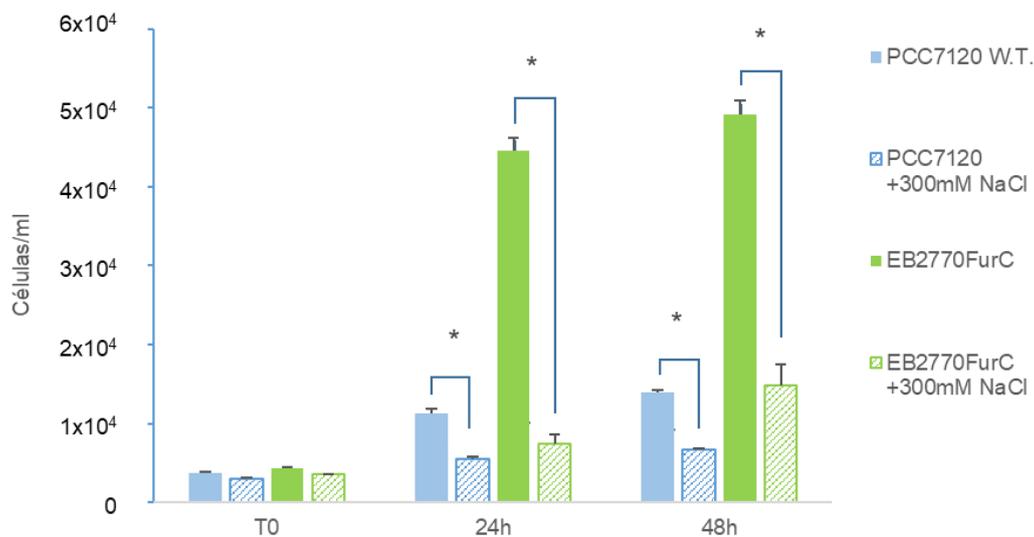


Figura 29. Conteo celular de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y de la estirpe de sobreexpresión EB2770FurC tras 24 y 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en altas concentraciones de sal (300 mM NaCl). Cantidad de células/ml.

En las dos condiciones evaluadas la estirpe de sobreexpresión de FurC (EB2770FurC) creció más rápido que la estirpe silvestre, sin embargo, la estirpe de sobreexpresión de FurC fue más susceptible al estrés producido por las altas concentraciones de sal, pues pasadas 24 horas del experimento, la estirpe de sobreexpresión de FurC disminuyó un 80% respecto a las condiciones estándar, mientras que la estirpe silvestre presentó una disminución del 50%. Tras 48

horas del experimento la susceptibilidad de las dos estirpes se mantuvo igual, siendo más susceptible a las altas concentraciones de sal, la estirpe de sobreexpresión EB2770FurC que la estirpe silvestre, sin embargo, la reducción del crecimiento para la estirpe silvestre se mantuvo en el 50%, mientras que la disminución del crecimiento para EB2770FurC fue ligeramente menor que a las 24 horas (70% tras a las 48 horas de exposición a 300 mM NaCl).

El análisis estadístico del conteo celular para todas las estirpes de sobreexpresión enfrentadas a NaCl 300 mM, indicó un mayor crecimiento de células/ml en la estirpe EB2770FurC, seguido de las cepas AG2770FurA y VCS2770FuB. La estirpe silvestre fue la que presentó un menor crecimiento. (Tabla 10).

Tabla 10. Conteo celular de *Anabaena* sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2070FurB y EB2770FurC. Media \pm SE frente a altas concentraciones de sal (300 mM de NaCl). Cantidad de células/ml

Estirpes	0 horas	24 horas	48 horas	Tasa de crecimiento	Reducción en el crecimiento	
					24 horas	48 horas
PCC7120 W.T. + NaCl	2939 \pm 28	5435 \pm 116	6691 \pm 13	1,28	50%	50%
AG2770FurA + NaCl	3268 \pm 77	6650 \pm 573	12587 \pm 128	2,85	80%	70%
VCS2770FurB + NaCl	3035 \pm 21	6510 \pm 226	9077 \pm 2	1,99	60%	60%
EB2770FurC + NaCl	3506 \pm 120	7403 \pm 401	14766 \pm 31	3,21	80%	80%

Este comportamiento fue similar a lo observado bajo condiciones estándar de crecimiento y al igual que con la condición de deficiencia de nitrógeno. El estrés salino afectó a la tasa de crecimiento ($Tasa\ de\ crecimiento = \frac{población\ final - población\ inicial}{población\ inicial}$) de todas las cepas evaluadas, pero la susceptibilidad a NaCl 300 mM, fue diferente. Las estirpes de sobreexpresión de FurC y FurA presentaron una susceptibilidad similar a la deficiencia con una disminución en el crecimiento del 80% a las 24 horas y del 70% a las 48 horas,

seguido de la estirpe de sobreexpresión de FurB (60% durante todo el experimento). La estirpe silvestre fue la menos susceptible al estrés provocado por la deficiencia de nitrógeno, con una pérdida en el crecimiento de apenas el 50% durante todo el experimento.

4.2.1.3. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos y proteínas totales.

Otros datos de caracterización de las estirpes como los pigmentos implicados en el proceso fotosintético: clorofila, carotenoides, ficobiliproteínas y proteínas totales fueron tomados al final del experimento en condiciones estándar de crecimiento durante 48 horas. Las ficobiliproteínas, constituyen hasta un 50% del total de proteínas solubles y les siguen en abundancia la clorofila a y los carotenoides. Los microgramos de cada una de estas moléculas se presentan a continuación normalizados por célula (Tabla 11).

Tabla 11. Contenido en pigmentos fotosintéticos y proteínas totales de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC en condiciones estándar de crecimiento. Los resultados son la media de tres determinaciones \pm desviación estándar.

	$\mu\text{g/célula}$			
	PCC7120 W.T.	AG2770FurA	VCS2770FurB	EB2770FurC
Clorofila	$2,8 \times 10^{-3} \pm 1,6 \times 10^{-6}$	$4,9 \times 10^{-3} \pm 1,2 \times 10^{-5}$	$3,3 \times 10^{-3} \pm 6,9 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-3} \pm 1,7 \times 10^{-3}$
Carotenoides	$7,4 \times 10^{-5} \pm 1,6 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-5}$	$7,7 \times 10^{-5} \pm 5,9 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-5} \pm 1,5 \times 10^{-3}$
Ficobiliproteínas	$4,9 \times 10^{-4} \pm 1,6 \times 10^{-6}$	$6,1 \times 10^{-4} \pm 1,3 \times 10^{-5}$	$5,5 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-4}$	$2,6 \times 10^{-4} \pm 1,8 \times 10^{-3}$
Proteínas solubles totales	$7,2 \times 10^{-2} \pm 9,5 \times 10^{-7}$	$8,5 \times 10^{-2} \pm 7,9 \times 10^{-6}$	$7,9 \times 10^{-2} \pm 3,4 \times 10^{-5}$	$3,9 \times 10^{-2} \pm 1,2 \times 10^{-3}$

En este caso, la cantidad de pigmentos fotosintéticos y proteínas totales solubles fue mayor para la estirpe AG2770FurA, seguida de VCS2770FurB, de la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC7120. La estirpe EB2770FurC fue la que presentó menor cantidad de pigmentos fotosintéticos y proteínas totales solubles.

4.2.1.4. Actividades fotosintética y respiratoria:

Se realizaron medidas de las actividades fotosintética y respiratoria de las cuatro estirpes (*Anabaena* sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión

AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC) en las diferentes condiciones evaluadas (BG11 en condiciones estándar, deficiencia de fuente de nitrógeno combinado y 300 mM de NaCl).

-Fotosíntesis:

La determinación del oxígeno desprendido durante la actividad fotosintética por parte de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión: AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC, se llevó a cabo con un electrodo de oxígeno de tipo Clark. La cuantificación se hizo después de 48 horas de crecimiento partiendo de una D.O. de 0,3 (750 nm), Para ello se aplicó al sistema una intensidad lumínica de 100 μmol de fotones/ $\text{m}^2\cdot\text{s}$, los datos se presentan en mol de oxígeno por segundo por 10^6 células (Figura 30).

En condiciones estándar de crecimiento, el desprendimiento de oxígeno durante la fotosíntesis fue mayor para la estirpe silvestre (10,4 mol O_2 $\text{s}^{-1}\times 10^6$ células), le sigue la estirpe de sobreexpresión de FurB (5,9 mol O_2 $\text{s}^{-1}\times 10^6$ células) y la estirpe de sobreexpresión de FurA (3,8 mol O_2 $\text{s}^{-1}\times 10^6$ células). La cepa que presentó menor desprendimiento de oxígeno es la estirpe de sobreexpresión de FurC (0,6 mol O_2 $\text{s}^{-1}\times 10^6$ células).

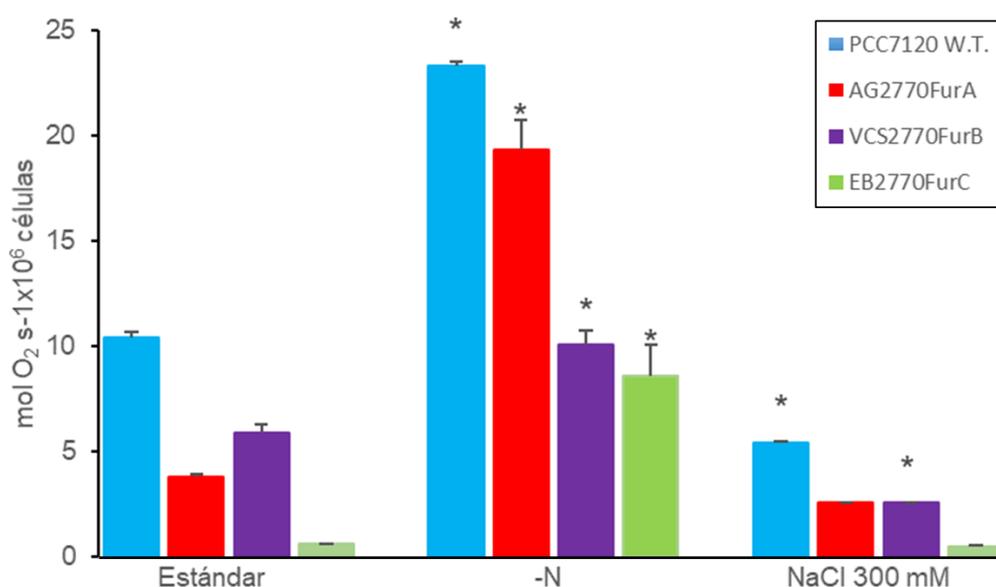


Figura 30. Desprendimiento de oxígeno durante la fotosíntesis de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC (AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC) tras 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo), en deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado y en altas concentraciones de sal (300mM de NaCl).

La condición de deficiencia de nitrógeno incrementó el desprendimiento de oxígeno por parte de las cuatro estirpes, siendo de 2 a 14 veces mayor que en condiciones estándar y con diferencias significativas en todos los casos: *Anabaena* sp. PCC7120 (2,2 mol O₂ s⁻¹×10⁶ células), AG2770FurA (5,1 mol O₂ s⁻¹×10⁶ células), VCS2770FurB (1,7 mol O₂ s⁻¹×10⁶ células), EB2770FurC (14 mol O₂ s⁻¹×10⁶ células).

El estrés salino por su parte disminuyó el desprendimiento de oxígeno durante la actividad fotosintética de todas las estirpes respecto a las condiciones estándar. Con diferencias significativas para la estirpe silvestre y para la estirpe de sobreexpresión VCS2770FurB.

-Respiración:

Del mismo modo, la determinación del oxígeno consumido por la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC7120 y para las estirpes de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC (AG2770FurA VCS2770FurB y EB2770FurC) se hicieron después de 48 horas de crecimiento en las condiciones evaluadas. Para ello, se midió con un electrodo de oxígeno Clark, la cantidad de oxígeno consumido. Las mediciones se llevaron a cabo en condiciones de oscuridad. Los datos se presentan en mol de oxígeno por segundo por 10⁶ células (Figura 31).

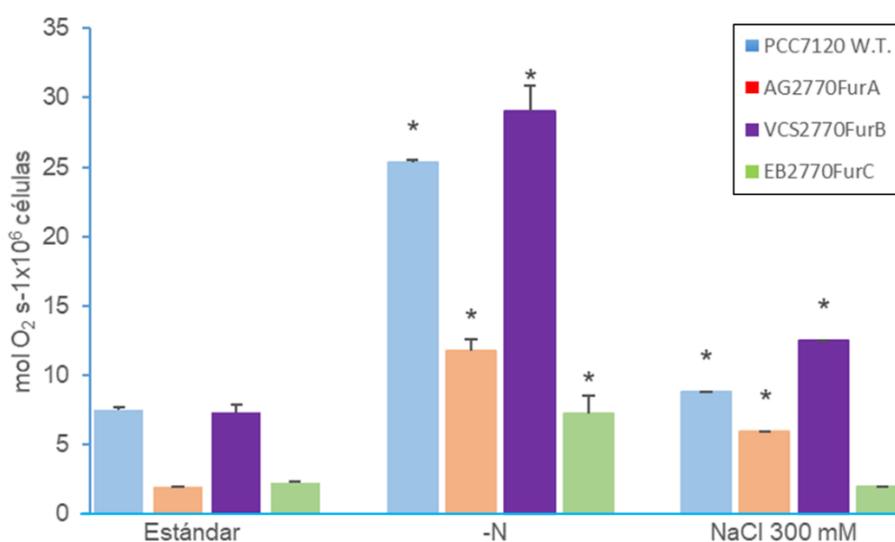


Figura 31. Respiración celular de las estirpes de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC tras 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo), en deficiencia de fuente de nitrógeno combinado y en altas concentraciones de sal (300mM de NaCl). 1: estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120, 2: AG2770FurA, 3: VCS2770FurB y 4: EB2770FurC.

La distribución de los datos de respiración por parte de las cuatro estirpes evaluadas fue similar a la observada en la cuantificación de pigmentos fotosintéticos y proteínas totales. La estirpe con mayor actividad respiratoria fue la estirpe VCS2770FurB, seguida de la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC7120, AG2770FurA y finalmente EB2770FurC.

Las condiciones de estrés incrementaron la respiración en las cuatro estirpes, especialmente la deficiencia de nitrógeno, que presentó diferencias significativas para todas las estirpes, siendo de 3 a 6 veces mayor que en condiciones estándar de crecimiento: *Anabaena* sp. PCC7120 (3,4 mol O₂ s⁻¹10⁶ células), AG2770FurA (6,1 mol O₂ s⁻¹10⁶ células), VCS2770FurB (4 mol O₂ s⁻¹10⁶ células), EB2770FurC (3,3 mol O₂ s⁻¹10⁶ células).

Asimismo, el estrés salino aumentó la respiración de todas las estirpes respecto a las condiciones estándar, pero presentó diferencias significativas solo para la cepa silvestre y para las estirpes de sobreexpresión de FurA y FurB. El compilado de todos estos datos se presentan en la Tabla 12 con sus respectivas desviaciones estándar.

Tabla 12. Volumen de oxígeno consumido y producido ($\mu\text{g}/10^6$ células) durante los procesos de fotosíntesis y respiración de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo), en deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado y frente a estrés por altas concentraciones de sal (300 mM de NaCl). Los resultados son la media de tres determinaciones \pm desviación estándar.

$\mu\text{g O}_2/10^6\text{célula}$								
	PCC7120 W.T.		AG2770FurA		VCS2770FurB		EB2770FurC	
	Fotosíntesis	Respiración	Fotosíntesis	Respiración	Fotosíntesis	Respiración	Fotosíntesis	Respiración
BG11	10,4 \pm 0,2	7,5 \pm 0,2	3,8 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	5,9 \pm 0,4	7,3 \pm 0,5	0,6 \pm 0,02	2,2 \pm 0,1
BG11 ₀	23,3 \pm 0,1	25,3 \pm 0,2	19,3 \pm 1,4	11,7 \pm 0,9	10,07 \pm 0,6	29 \pm 1,8	8,6 \pm 1,5	7,2 \pm 1,2
+ NaCl	5,4 \pm 0,01	8,8 \pm 0,02	2,6 \pm 0,03	5,9 \pm 0,01	2,5 \pm 0,0	12,5 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	1,9 \pm 0,0

4.2.2. Efecto de la desregulación de FurA, FurB y FurC en la síntesis de exopolisacáridos.

Con el objeto de conocer cómo influye la desregulación de FurA, FurB y FurC en la síntesis de exopolisacáridos, se procedió a su cuantificación en la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC en cultivos en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo). La cuantificación mediante fenol-sulfúrico del exopolisacárido producido por las cuatro estirpes mostró diferencias significativas entre las diferentes cepas, de acuerdo con el test de comparación de medias de Tukey, con un coeficiente de variación bajo y varianzas homogéneas, en muestras tomadas tras 24 y 48 horas del inicio del experimento (Figura 32).

La mayor producción de exopolisacáridos se observó en la estirpe de sobreexpresión de FurC (EB2770FurC), con un incremento de 2,4 veces a las 24 horas y de 3,7 veces a las 48 horas del experimento, con respecto a la producción en la cepa silvestre. La variante AG2770FurA también mostró una mayor producción de exopolisacáridos que *Anabaena* sp. PCC7120, en torno a 1,2 veces y a 3,1 veces a las 24 y 48 horas respectivamente (Figura 32).

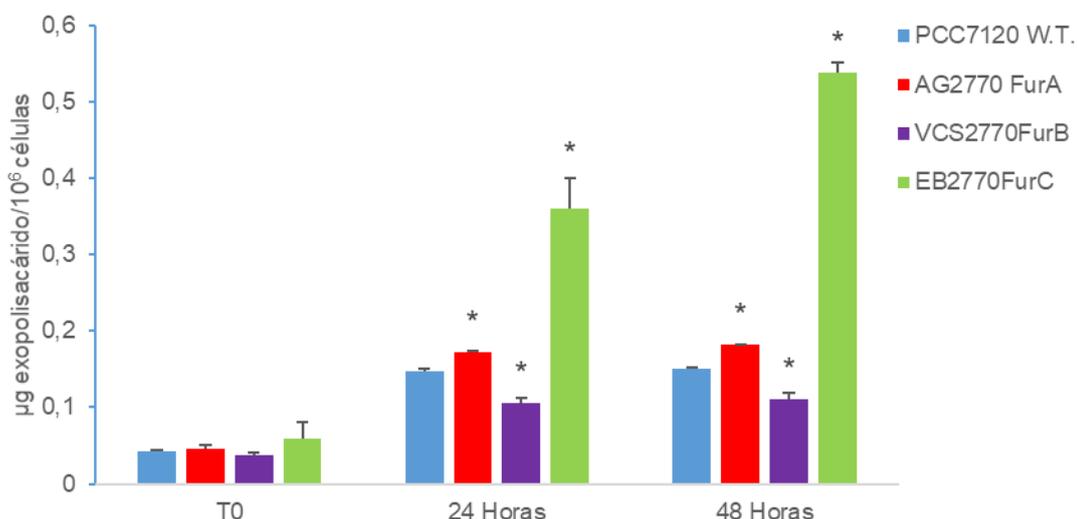


Figura 32. Cuantificación mediante el método fenol-sulfúrico (abs 490 nm) de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC procedentes de cultivos en fase exponencial de crecimiento en muestras recolectadas tras 0, 24 y 48 horas en condiciones estándar (BG11 completo).

Sin embargo, la cepa de sobreexpresión de FurB (VCS2770FurB) presentó una menor producción de exopolisacáridos, en torno al 70% de la cantidad registrada en el sobrenadante de los cultivos de *Anabaena* sp. PCC7120, tanto a las 24 como a las 48 horas del experimento.

4.2.3. Efecto de la desregulación de FurA, FurB y FurC en la síntesis de exopolisacáridos en cultivos en deficiencia de nitrógeno.

Con respecto al efecto de la deficiencia de nitrógeno, se aprecia un notable incremento en la producción de exopolisacáridos por parte de todas las estirpes estudiadas, tanto del tipo silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 como de las cepas de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC (Figura 33).

En cuanto a la evolución en la producción de exopolisacáridos de la estirpe de sobreexpresión de FurA con respecto a la cepa silvestre, se observa que, tanto en condiciones estándar de crecimiento como a las 24 y 48 horas de retirar el nitrógeno combinado del medio, la estirpe de sobreexpresión de FurA (AG2770FurA) produjo más exopolisacárido que *Anabaena* sp. PCC7120 (Figura 33).

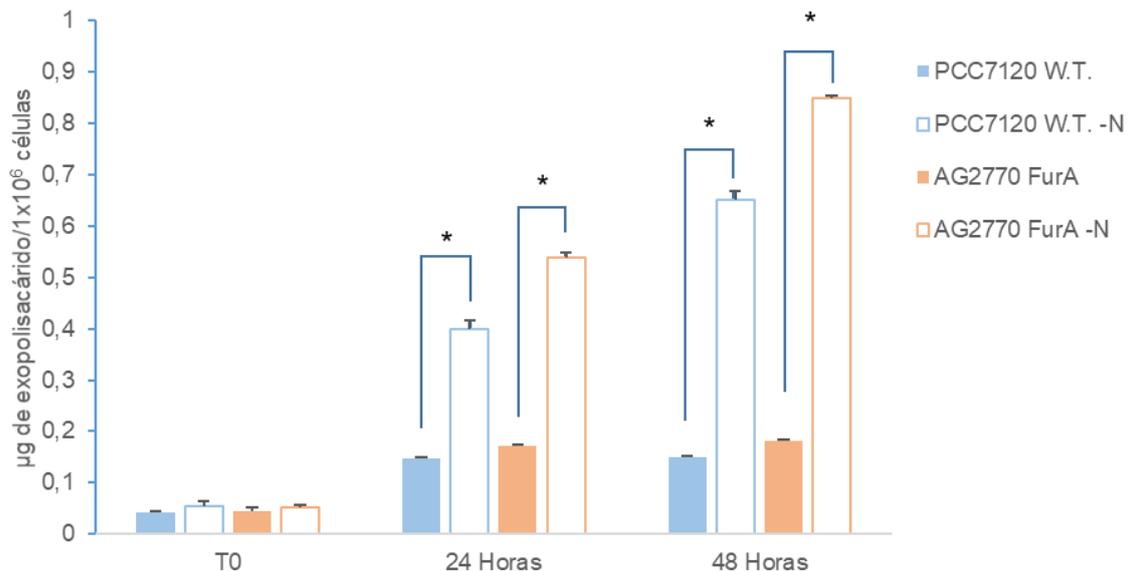


Figura 33. Cuantificación mediante el método fenol-sulfúrico (abs 490 nm) de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión AG2770FurA en condiciones estándar de cultivo (BG11 completo) y a las 24 y 48 horas tras retirar la fuente de nitrógeno combinado.

A las 24 horas del experimento, el incremento en la producción de exopolisacáridos debido a la deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado fue de 2,7 veces para la estirpe silvestre y de 3,1 veces para la estirpe de sobreexpresión de FurA con respecto a las condiciones estándar. Pasadas 48 horas, este incremento fue mayor, siendo de 4,3 veces para la estirpe silvestre y de 4,7 veces para AG2770FurA (Figura 33).

Por otro lado, al comparar la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo) y en deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado, con la estirpe de sobreexpresión de FurB, (VCS2770FurB), se observa que la deficiencia de nitrógeno también incrementó la producción de exopolisacáridos por parte las dos estirpes. En las dos condiciones evaluadas la estirpe de sobreexpresión de FurB (VCS2770FurB) produjo menos exopolisacáridos que la estirpe silvestre (Figura 34).

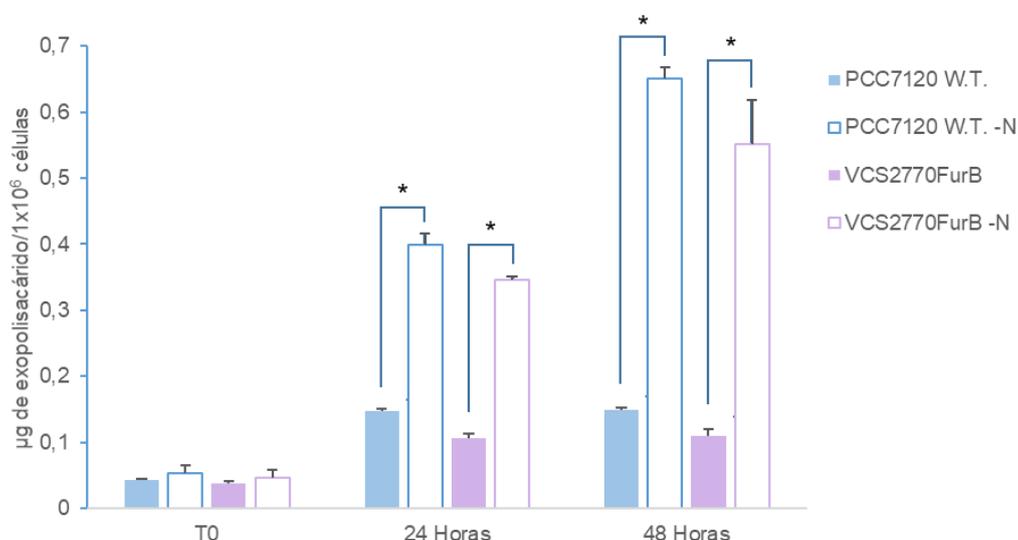


Figura 34. Cuantificación mediante el método fenol-sulfúrico (abs 490 nm) de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión VCS2770FurB en condiciones estándar de cultivo (BG11 completo) y a las 24 y 48 horas tras retirar la fuente de nitrógeno combinado.

Sin embargo, a las 24 horas del experimento, el incremento en la producción de exopolisacárido por parte de la estirpe de sobreexpresión de FurB debido a la deficiencia de nitrógeno fue 3,3 veces mayor que en condiciones estándar de

crecimiento, mientras que el incremento en la producción de exopolisacáridos por parte de la estirpe silvestre fue de 2,7 veces. Pasadas 48 horas este incremento es mayor, siendo de 5 veces para VCS2770FurB y de 4,3 veces para la estirpe silvestre (Figura 34).

Finalmente, al comparar la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo) y en deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado, con la estirpe de sobreexpresión de FurC, (EB2770FurC), se observa que al igual que en los experimentos anteriores la deficiencia de nitrógeno incrementó la producción de exopolisacárido de las dos estirpes (Figura 35).

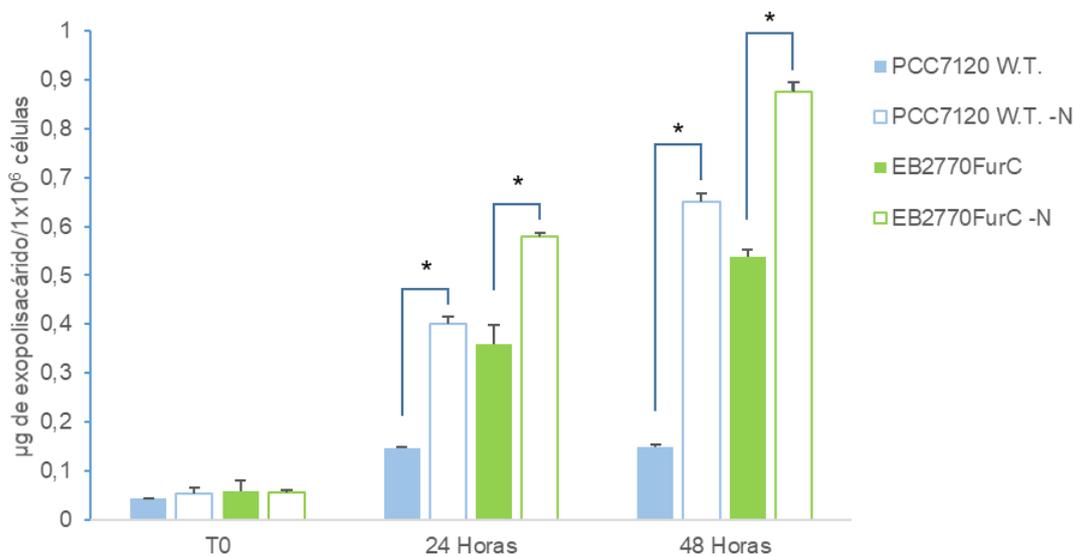


Figura 35. Cuantificación mediante el método fenol-sulfúrico (abs 490 nm) de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión EB2770FurC en condiciones estándar de cultivo (BG11 completo) y a las 24 y 48 horas tras retirar la fuente de nitrógeno combinado.

En las dos condiciones evaluadas la estirpe de sobreexpresión de FurC (EB2770FurC) produjo más exopolisacárido que la estirpe silvestre. Sin embargo, a las 24 horas del experimento, el incremento en la producción de exopolisacárido por parte de la estirpe de sobreexpresión de FurC debido a la deficiencia de nitrógeno fue de apenas 1,6 veces respecto a las condiciones estándar, mientras que el incremento en la producción de exopolisacáridos por

parte de la estirpe silvestre fue de 2,7 veces. Pasadas 48 horas del experimento, el incremento en la producción de exopolisacáridos por parte de la estirpe EB2770FurC se mantuvo en 1,6 veces, mientras que el incremento en la estirpe silvestre fue de 4,3 veces (Figura 35).

La Figura 36 muestra un resumen de los resultados anteriores, donde se reflejan los cambios en la producción de exopolisacáridos observados tanto en la estirpe silvestre como las tres variantes de sobreexpresión, a las 48 horas tras retirar el nitrógeno combinado del medio. Se observó que de las tres variantes que presentan desregulado algún parálogo FUR, las estirpes que produjeron una cantidad mayor de exopolisacáridos fueron las cepas de sobreexpresión de AG2770FurA y EB2770FurC. Sin embargo, la producción de exopolisacáridos se vio más afectada por la deficiencia de nitrógeno en la variante VCS270 FurB, cuyo aumento fue de 5 veces con respecto al registrado en condiciones estándar de crecimiento, frente a los cuantificados en las cepas AG2770FurA y EB2770FurC (4.7 y 4,3 veces), respectivamente.

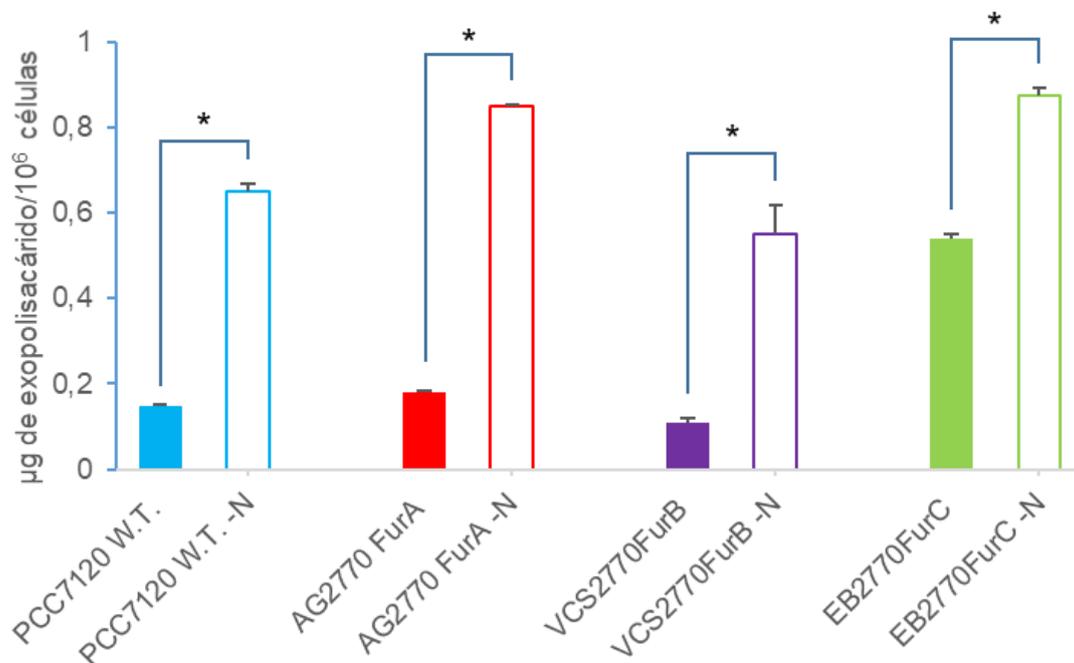


Figura 36. Resumen de la cuantificación de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC tras 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado.

4.2.4. Efecto de la desregulación de FurA, FurB y FurC en la síntesis de exopolisacáridos en exposición a altas concentraciones de sal.

Con respecto al efecto del estrés producido por la presencia de altas concentraciones de sal en el medio (300 mM de NaCl), se apreció un notable incremento en la producción de exopolisacáridos por parte de todas las estirpes estudiadas, tanto del tipo silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 como de las cepas de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC.

Al comparar el efecto de altas concentraciones de sal (NaCl 300 mM) en la producción de exopolisacáridos tanto en *Anabaena* sp. PCC7120 como en la estirpe de sobreexpresión de FurA, (AG2770FurA), se observa que la presencia de NaCl 300 mM incrementó la producción de exopolisacáridos por parte de las dos estirpes (Figura 37).

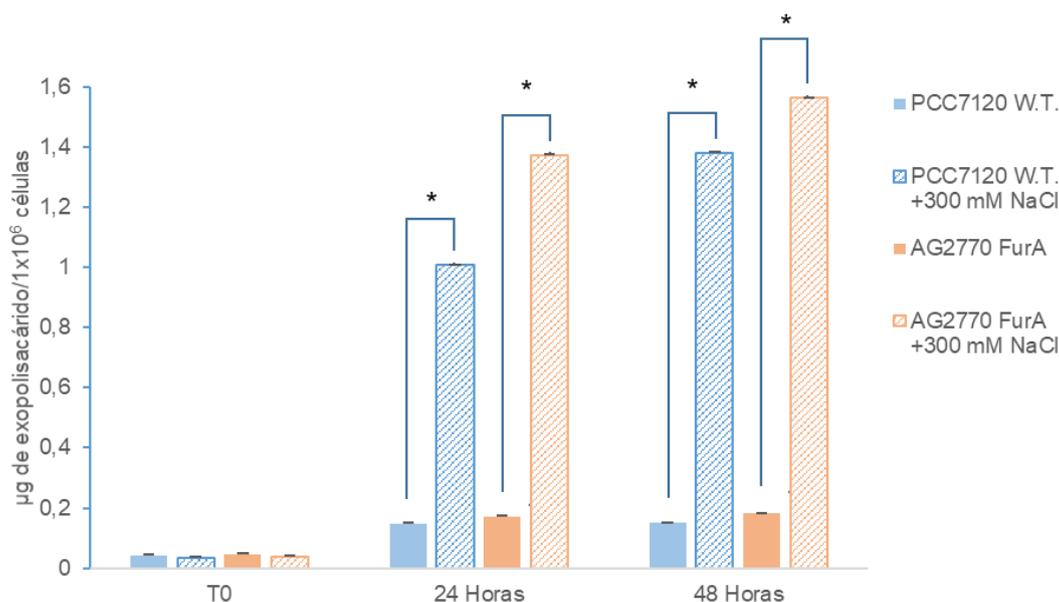


Figura 37. Cuantificación mediante el método fenol-sulfúrico (abs 490 nm) de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión AG2770FurA tras 24 y 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en altas concentraciones de sal (300 mM de NaCl).

En las dos condiciones evaluadas la estirpe de sobreexpresión de FurA (AG2770FurA) produjo más exopolisacáridos que la estirpe silvestre. A las 24 horas del experimento, el incremento en la producción de exopolisacáridos

influenciado por el estrés salino, para la estirpe de sobreexpresión de FurA fue 8 veces mayor que en condiciones estándar, mientras que para la estirpe silvestre el incremento fue de 6,9 veces. Esta situación se invirtió a las 48 horas del experimento, siendo mayor el incremento en la estirpe silvestre (9,2 veces), que en la estirpe de sobreexpresión de FurA (8,6 veces).

Por otro lado, al comparar la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo) y enfrentada a estrés por altas concentraciones de sal en el medio (300 mM de NaCl), con la estirpe de sobreexpresión de FurB, (VCS2770FurB) en las mismas condiciones, se observa que el estrés salino incrementó la producción de exopolisacáridos por parte de las dos estirpes (Figura 38).

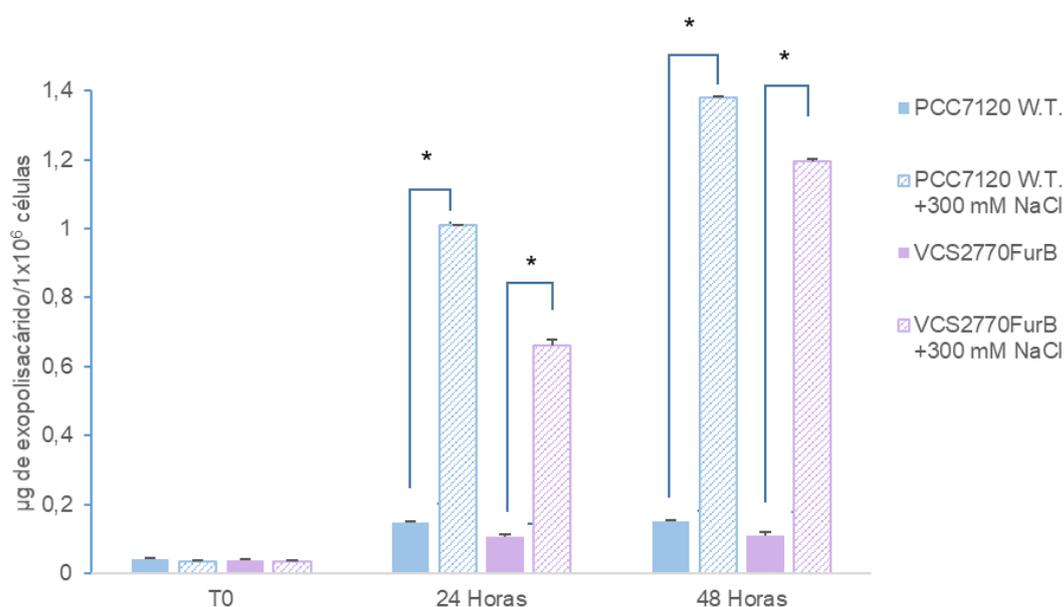


Figura 38. Cuantificación mediante el método fenol-sulfúrico (abs 490 nm) de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión VCS2770FurB tras 24 y 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en altas concentraciones de sal (300 mM de NaCl).

En las dos condiciones evaluadas la estirpe de sobreexpresión de FurB (VCS2770FurB) produjo menos exopolisacáridos que la estirpe silvestre. A las 24 horas del experimento, el incremento en la producción de exopolisacáridos por parte de la estirpe de sobreexpresión de FurB debido al estrés salino fue de

6,2 veces mientras que el incremento en la producción de exopolisacáridos por parte de la estirpe silvestre fue de 6,9 veces. Esta situación se invirtió a las 48 horas del experimento, siendo mayor el incremento en la estirpe VCS2770FurB (10,8 veces), que en la estirpe silvestre (9,2 veces).

Finalmente, al comparar la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo) y enfrentada a estrés por altas concentraciones de sal (300 mM de NaCl), con la estirpe de sobreexpresión de FurC, se observa que, al igual que en los casos anteriores, el estrés salino incrementó la producción de exopolisacáridos por parte de las dos estirpes (Figura 39).

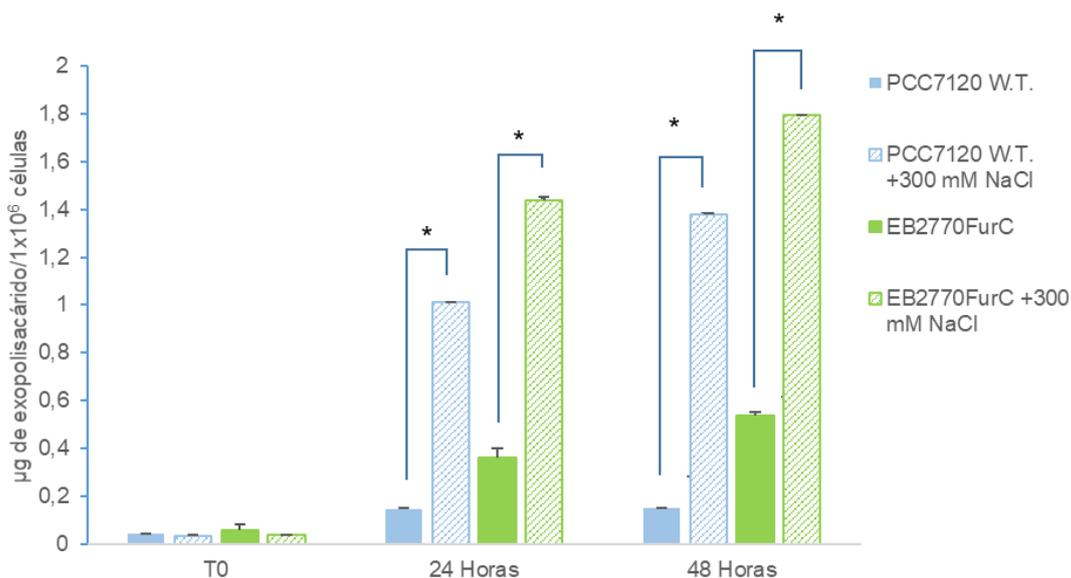


Figura 39. Cuantificación mediante el método fenol-sulfúrico (abs 490 nm) de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión EB2770FurC tras 24 y 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en altas concentraciones de sal (300 mM de NaCl).

En las dos condiciones evaluadas la estirpe de sobreexpresión de FurC (EB2770FurC) produjo más exopolisacárido que la estirpe silvestre. Sin embargo, a las 24 horas del experimento el incremento en la producción de exopolisacárido por parte de la estirpe de sobreexpresión de FurC debido al estrés salino fue de apenas 4 veces mientras que el incremento en la producción de exopolisacárido por parte de la estirpe silvestre fue de 6,9 veces. A las 48

horas el incremento en la producción exopolisacáridos por parte de la estirpe de sobreexpresión de FurC fue incluso menor que a las 24 horas (3,3 veces), mientras que para la estirpe silvestre a las 48 horas del experimento el incremento fue mayor (9,2 veces).

Por lo tanto, tal y como se resume en la Figura 40, la cantidad relativa de exopolisacáridos producidos en condiciones de estrés salino cuando se comparan las distintas cepas entre sí fue similar a la presentada en condiciones estándar de crecimiento, siendo mayor la producción en EB2770FurC, seguido de AG2770FurA y la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120. La estirpe que presentó la menor producción de exopolisacáridos es VCS2770FurB. Por otra parte, cabe destacar que, aunque la producción de esta última cepa fue menor que en el resto, es la que más se afectó por la presencia de NaCl 300 mM, con un incremento en la producción de exopolisacáridos de 10,8 veces con respecto a cultivos en condiciones estándar. El incremento en la producción de exopolisacáridos debido al estrés salino en *Anabaena* sp. PCC7120 fue de 9,2 veces, de 8,6 veces en la cepa AG2770FurA y solamente 3,3 veces en la variante EB2770FurC.

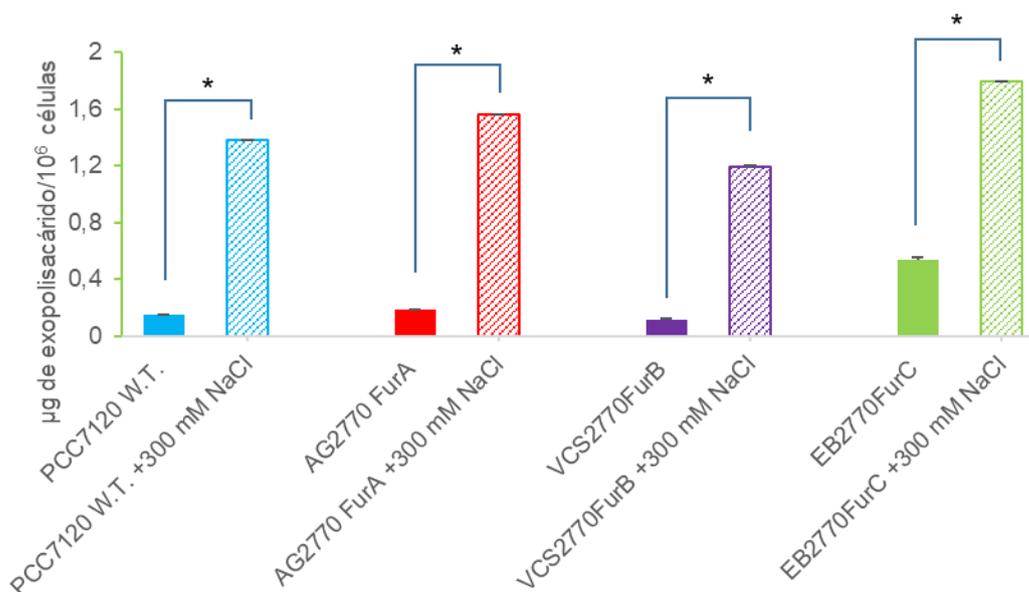


Figura 40. Cuantificación mediante el método fenol-sulfúrico (abs 490 nm) de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC tras 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en presencia de NaCl 300 mM.

Finalmente, en la Tabla 13 se resumen todos los datos numéricos relacionados con la producción de exopolisacáridos en condiciones estándar de crecimiento, en deficiencia de una fuente de nitrógeno soluble y en altas concentraciones de sal (NaCl 300 mM). Los datos corresponden a la media de tres replicas con sus respectivas desviaciones estándar, las últimas dos columnas corresponden al incremento en la producción de exopolisacáridos en condiciones de estrés.

Tabla 13. Cuantificación mediante el método fenol-sulfúrico (abs 490 nm) de los exopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC tras 24 y 48 horas de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo), en deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado y en 300 mM de NaCl. Las unidades se expresan en μg de exopolisacárido/ 10^6 células.

Estirpe	T0		24 Horas		Incremento	48 Horas		Incremento
PCC7120 W.T.	0,043 \pm	0,002	0,147 \pm	0,003	1	0,150 \pm	0,003	1
AG2770 FurA	0,046 \pm	0,005	0,172 \pm	0,002	1	0,182 \pm	0,001	1
VCS2770FurB	0,037 \pm	0,003	0,106 \pm	0,007	1	0,110 \pm	0,009	1
EB2770FurC	0,058 \pm	0,023	0,360 \pm	0,039	1	0,539 \pm	0,013	1
PCC7120 W.T. -N	0,054 \pm	0,012	0,400 \pm	0,016	2,7	0,650 \pm	0,017	4,3
AG2770 FurA -N	0,052 \pm	0,005	0,539 \pm	0,008	3,1	0,850 \pm	0,004	4,7
VCS2770FurB -N	0,047 \pm	0,012	0,347 \pm	0,005	3,3	0,552 \pm	0,066	5
EB2770FurC -N	0,056 \pm	0,006	0,579 \pm	0,009	1,6	0,875 \pm	0,019	1,6
PCC7120W.T. + NaCl	0,035 \pm	0,002	1,010 \pm	0,000	6,9	1,378 \pm	0,005	9,2
AG2770 FurA + NaCl	0,039 \pm	0,001	1,373 \pm	0,003	8	1,563 \pm	0,002	8,6
VCS2770FurB + NaCl	0,036 \pm	0,001	0,662 \pm	0,015	6,2	1,196 \pm	0,004	10,8
EB2770FurC + NaCl	0,039 \pm	0,001	1,438 \pm	0,012	4	1,792 \pm	0,003	3,3

Cabe resaltar, que el incremento en la producción de exopolisacárido debido a la presencia de sal para la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y para las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC, fue aproximadamente el doble que el registrado en condiciones de deficiencia de nitrógeno.

4.2.4. Efecto de la desregulación de FurA, FurB y FurC en la formación de *biofilm* en diferentes condiciones ambientales: deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado.

Tras la cuantificación de los exopolisacáridos producidos por las cuatro estirpes, y para entender cómo influye la desregulación de FurA, FurB y FurC en la formación de *biofilm* en deficiencia de nitrógeno combinado, se procedió a cuantificar el *biofilm* producido por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC

en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo) y en deficiencia de nitrógeno.

Al igual que ocurrió con la síntesis de exopolisacáridos, la desregulación de los parálogos FUR afectó a la formación de *biofilm* en las diferentes condiciones estudiadas. La cuantificación mediante cristal violeta, del *biofilm* producido por las cuatro cepas de *Anabaena* spp. formado en las paredes de placas de 12 pocillos, tras 20 días de experimento tomando datos los días 1, 5, 10, 15 y 20 y usando el test de comparación de medias de Tukey, permitió encontrar diferencias significativas a partir del día 5 (Figura 41).

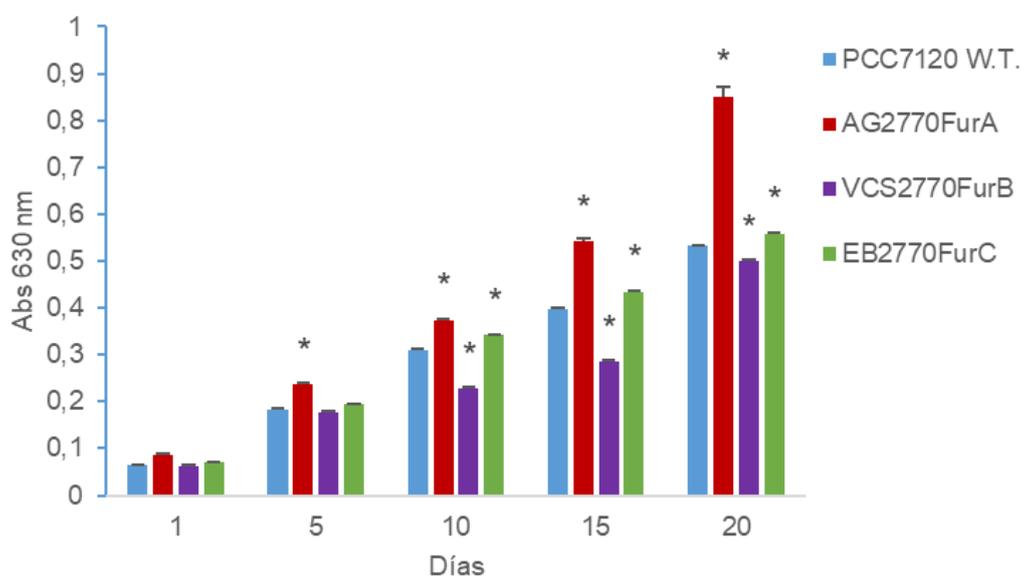


Figura 41. Cuantificación mediante cristal violeta (abs 630 nm) del *biofilm* formado por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC los días 1, 5, 10, 15 y 20 de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo).

En condiciones estándar de crecimiento, la estirpe de sobreexpresión de FurA empezó a destacar desde el día 5 del experimento, siendo la que presentó la mayor cantidad de *biofilm* (1,3 veces más que la estirpe silvestre), este comportamiento se mantuvo a lo largo del tiempo, pasados 10, 15 y 20 días, con incrementos de 1,2 veces, 1,4 veces y 1,6 veces respectivamente. Le siguió la estirpe de sobreexpresión de FurC, que empezó a producir *biofilm* con diferencias significativas a partir del día 10 del experimento y continuó haciéndolo

hasta el día 20 (1,1 veces para los días 10, 15 y 20). La estirpe que presentó una menor cantidad de *biofilm* respecto a la estirpe silvestre, fue la cepa de sobreexpresión de FurB (0,7 veces para los días 10 y 15 y 0,9 veces en el día 20).

Con respecto al efecto de la deficiencia de nitrógeno en dichas cepas, se aprecia un notable incremento en la formación de *biofilm* por parte de todas las estirpes estudiadas, tanto del tipo silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 como de las cepas de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC.

Al comparar la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo) y en deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado, con la estirpe de sobreexpresión de FurA, (AG2770FurA), se observa que tras 5 días de déficit de nitrógeno disminuyó ligeramente la formación de *biofilm* en los cultivos sometidos a estrés. Sin embargo, a partir del día 10 del experimento la deficiencia de nitrógeno incrementó la formación de *biofilm* por parte de las dos estirpes. En las dos condiciones evaluadas la estirpe de sobreexpresión de FurA (AG2770FurA) presentó una mayor formación de *biofilm* que la estirpe silvestre (Figura 42). Este comportamiento siguió presentándose hasta el final del experimento, pasados 20 días.

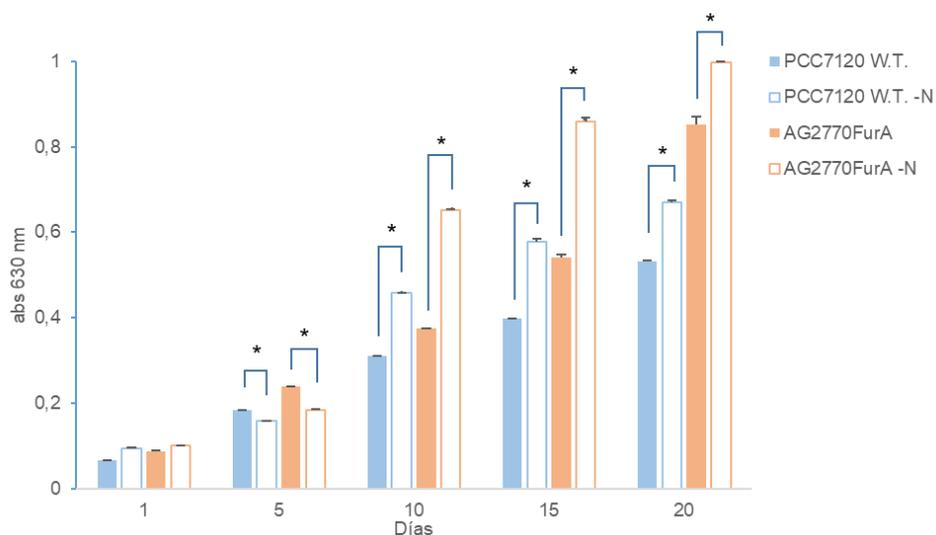


Figura 42. Cuantificación mediante tinción con cristal violeta y abs 630 nm, del *biofilm* unido a las paredes de placas de 12 pocillos, producido por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión AG2770FurA tras 1, 5, 10, 15 y 20 días de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado.

Sin embargo, el incremento en la formación de *biofilm* influenciado por la condición de deficiencia de una fuente de nitrógeno respecto a las condiciones estándar para las dos estirpes, va disminuyendo a lo largo del tiempo, siendo para la estirpe AG2770FurA de 1,8 veces 1,6 veces y 1,2 veces, los días 10, 15 y 20 respectivamente y para la estirpe silvestre de 1,5 veces para los días 10 y 15 y 1,3 veces para el día 20.

Por otro lado, al comparar la estirpe silvestre de *Anabaena sp. PCC7120* en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo) y en deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado, con la estirpe de sobreexpresión de FurB, (VCS2770FurB), se observa que al igual que en el caso anterior, el día 5 del experimento la formación de *biofilm* fue menor en condiciones de estrés. Este efecto se revirtió a partir del día 10, observándose un incremento en la formación de *biofilm* por parte de las dos estirpes en condiciones de deficiencia de nitrógeno (Figura 43).

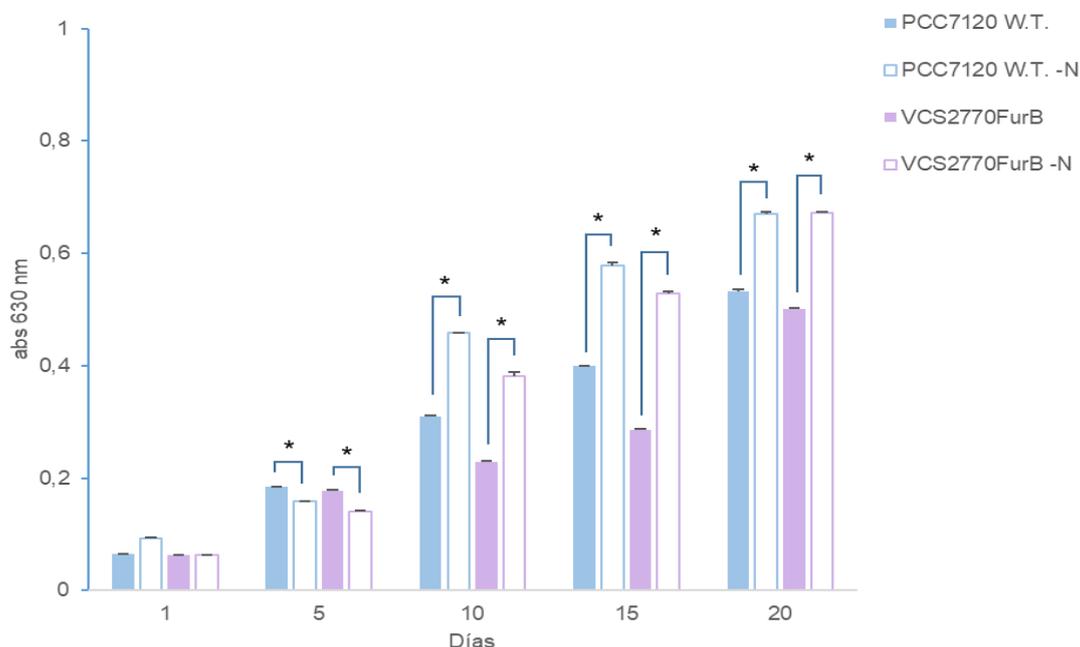


Figura 43. Cuantificación mediante tinción con cristal violeta y abs 630 nm, del *biofilm* unido a las paredes de placas de 12 pocillos, producido por la estirpe silvestre de *Anabaena sp. PCC7120* y por la estirpe de sobreexpresión VCS2770FurB tras 1, 5, 10, 15 y 20 días de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado.

En las dos condiciones evaluadas la estirpe de sobreexpresión de FurB (VCS2770FurB) presentó una menor formación de *biofilm* que la estirpe silvestre. Sin embargo, el incremento en la formación de *biofilm* influenciado por la condición de deficiencia de una fuente de nitrógeno respecto a las condiciones estándar de crecimiento fue mayor para la estirpe de sobreexpresión de FurB a partir del día 10 y se mantuvo así el día 15 (1,7 y 1,8 veces respectivamente) mientras que para el tipo silvestre el incremento fue de 1,5 y 1,4 veces. Este incremento se igualó para las dos estirpes al final del experimento, siendo de 1,3 veces para ambas estirpes el día 20.

Finalmente, al comparar la estirpe silvestre de *Anabaena sp. PCC7120* en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo) y en deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado, con la estirpe de sobreexpresión de FurC, (EB2770FurC), también se observa que la deficiencia de nitrógeno incrementó la formación de *biofilm* por parte de las dos estirpes, a partir del día 10 del experimento, mientras que en las muestras tomadas el día 5 del experimento la formación de *biofilm* fue menor en condiciones de estrés (Figura 44).

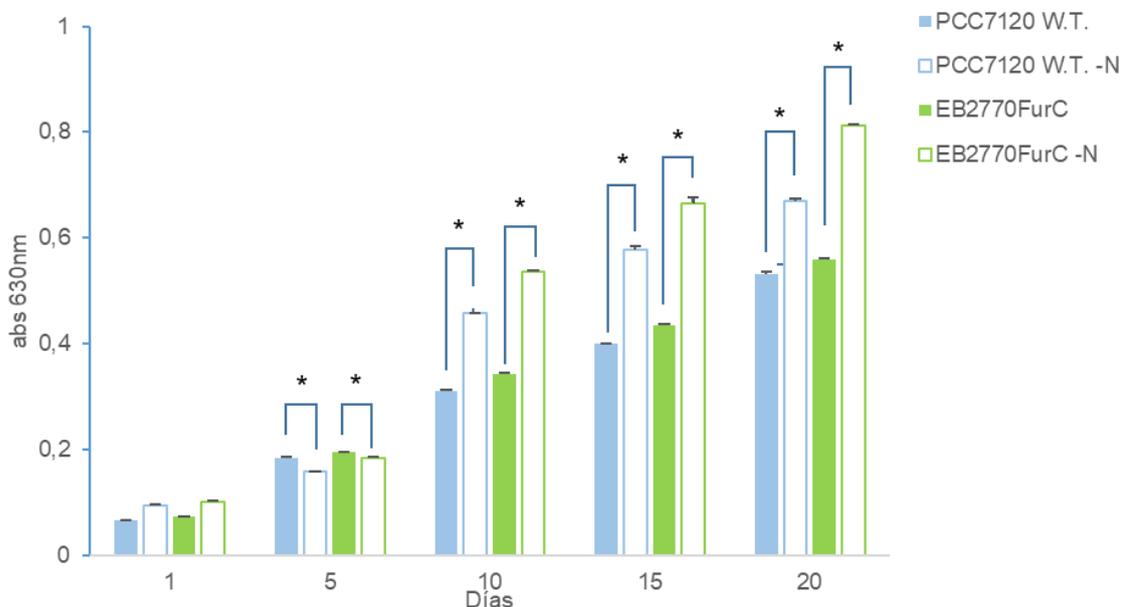


Figura 44. Cuantificación mediante tinción con cristal violeta y abs 630 nm, del *biofilm* unido a las paredes de placas de 12 pocillos, producido por la estirpe silvestre de *Anabaena sp. PCC7120* y por la estirpe de sobreexpresión EB2770FurC tras 1, 5, 10, 15 y 20 días de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado.

En las dos condiciones evaluadas la estirpe de sobreexpresión de FurC (VCS2770FurC) presentó una mayor formación de *biofilm* que la estirpe silvestre a partir del día 10, sin embargo, el incremento en la formación de *biofilm* influenciado por la condición de deficiencia de una fuente de nitrógeno respecto a las condiciones estándar, fue el mismo para las dos estirpes los días 10, 15 y 20 (1,5 veces). Al final del experimento, tras 20 días de exposición a la deficiencia de nitrógeno, la estirpe de sobreexpresión EB2770FurC continuó presentando un incremento del 1,5 en la formación del *biofilm*, mientras que la estirpe silvestre presentó un incremento más bajo (1,3 veces).

La Figura 45 resume las variaciones observadas en la formación del *biofilm* en las cuatro cepas tras 20 días de cultivo en condiciones estándar y sin nitrógeno combinado. En todos los casos, la formación de *biofilm* se incrementó en condiciones de déficit de nitrógeno. Este incremento con respecto al *biofilm* observado en condiciones estándar fue similar en las cuatro cepas, siendo ligeramente superior para la estirpe EB2770FurC (1,5 veces frente a 1,2 en AG2770FurA y 1,3 en *Anabaena* sp. PCC7120 y la variante VCS2770FurB)

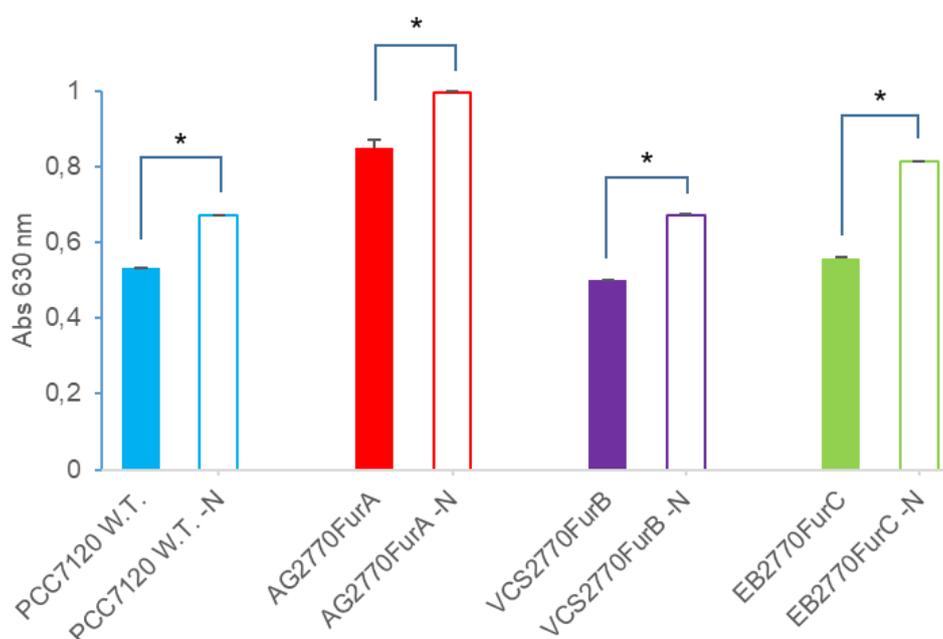


Figura 45. Cuantificación mediante tinción con cristal violeta y abs 630 nm, del *biofilm* unido a las paredes de placas de 12 pocillos, producido por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC tras 20 días de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado

4.2.5. Efecto de la desregulación de FurA, FurB y FurC en la formación de *biofilm* en exposición a altas concentraciones de sal.

Con respecto al efecto del estrés producido por la presencia de altas concentraciones de sal en el medio (300 mM de NaCl) y al contrario del efecto evidenciado en deficiencia de nitrógeno, se aprecia una notable disminución en la formación de *biofilm* por parte de todas las estirpes estudiadas.

Al comparar la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo) y enfrentada a estrés por altas concentraciones de sal (300 mM de NaCl), con la estirpe de sobreexpresión de FurA (AG2770FurA), se observa una disminución en el *biofilm* formado por parte de las dos estirpes en presencia de 300 mM de NaCl. Esta disminución se observó a partir del día 5 y se mantuvo hasta el final del experimento (Figura 46).

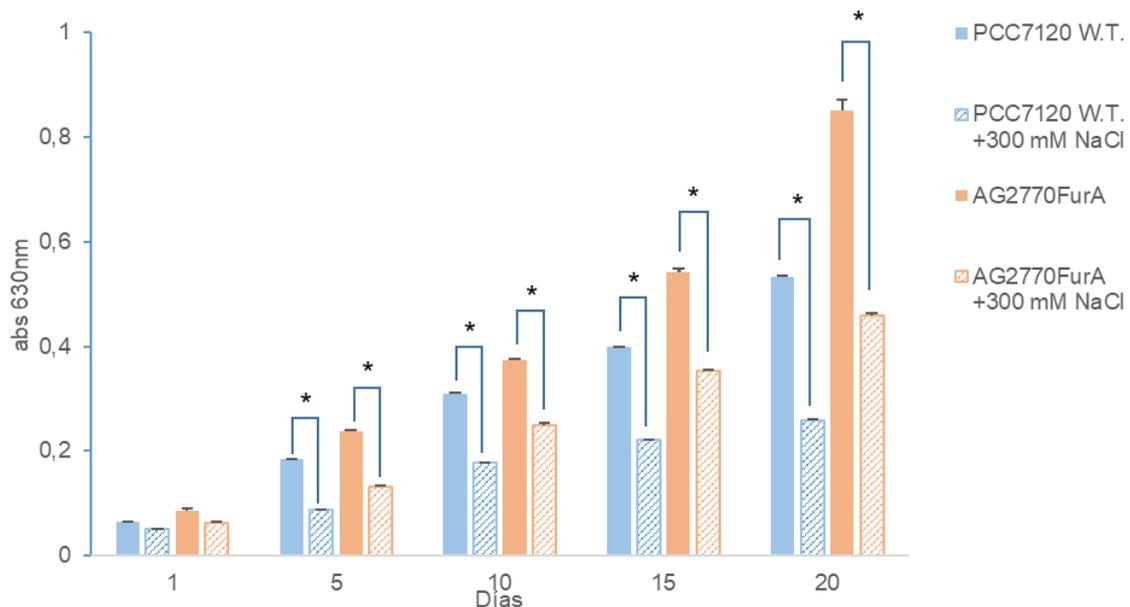


Figura 46. Cuantificación mediante tinción con cristal violeta y abs 630 nm, del *biofilm* unido a las paredes de placas de 12 pocillos, producido por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión AG2770FurA tras 20 días de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y 300 mM de NaCl.

En las dos condiciones evaluadas la estirpe de sobreexpresión de FurA (AG2770FurA) presentó una mayor formación de *biofilm* que la estirpe silvestre. Sin embargo, la susceptibilidad a las altas concentraciones de NaCl fue mayor

en la estirpe de sobreexpresión de FurA respecto a las condiciones estándar, disminuyendo la formación del *biofilm* al 60% el día 5 del experimento y hasta el 70% los días 10 y 15, mientras que la disminución en la formación del *biofilm* por parte de la estirpe silvestre fue del 50% el día 5 y un 60% los días 10 y 15. El día 20, al final del experimento la disminución en la formación del *biofilm* por parte de las dos estirpes se igualó (50% para ambas estirpes).

Del mismo modo, al comparar la estirpe silvestre de *Anabaena sp. PCC7120* en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo) y en 300 mM de NaCl, con la estirpe de sobreexpresión de FurB, (VCS2770FurB), se observa una disminución en el *biofilm* formado por parte de las dos estirpes en presencia de 300 mM de NaCl. (Figura 47).

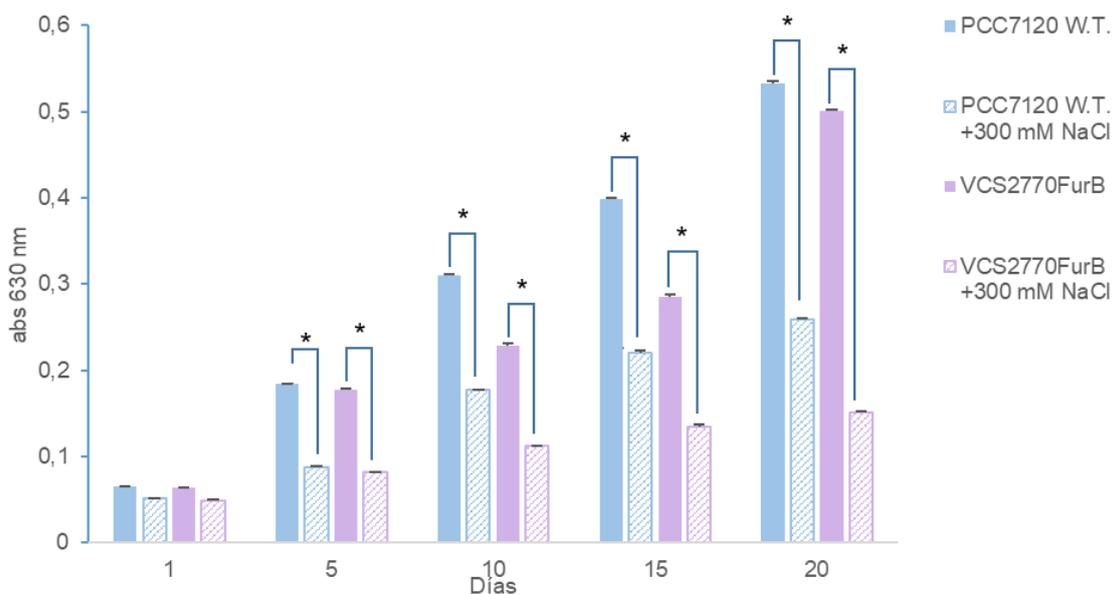


Figura 47. Cuantificación mediante tinción con cristal violeta y abs 630 nm, del *biofilm* unido a las paredes de placas de 12 pocillos, producido por la estirpe silvestre de *Anabaena sp. PCC7120* y por la estirpe de sobreexpresión VCS2770FurB tras 1, 5, 10, 15 y 20 días de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y 300 mM de NaCl.

En las dos condiciones evaluadas la estirpe de sobreexpresión de FurB (VCS2770FurB) presentó una menor formación de *biofilm* que la estirpe silvestre con diferencias significativa a partir del día 5 del experimento, este comportamiento se mantuvo durante el tiempo los días 10, 15 y 20. Sin embargo, la susceptibilidad a las altas concentraciones de sal fue similar para las dos

estirpes, pues la estirpe silvestre presentó una disminución en la formación del *biofilm* del 50% el día 5 y del 60% los días 10 y 15 y la estirpe de sobreexpresión de FurB presentó una disminución del 50% los días 5, 10 y 15. Al final del experimento, tras 20 días de exposición a NaCl 300 mM, la disminución en la formación del *biofilm* de la estirpe silvestre fue del 50% mientras que la estirpe de sobreexpresión de FurB presentó una mayor reducción (formación de un 30% con respecto a los datos registrados en BG11).

Finalmente, al comparar la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones estándar de crecimiento (BG11 completo) y en 300 mM de NaCl, con la estirpe de sobreexpresión de FurC, se observa que las altas concentraciones de sal afectaron la formación de *biofilm* de ambas estirpes (Figura 48).

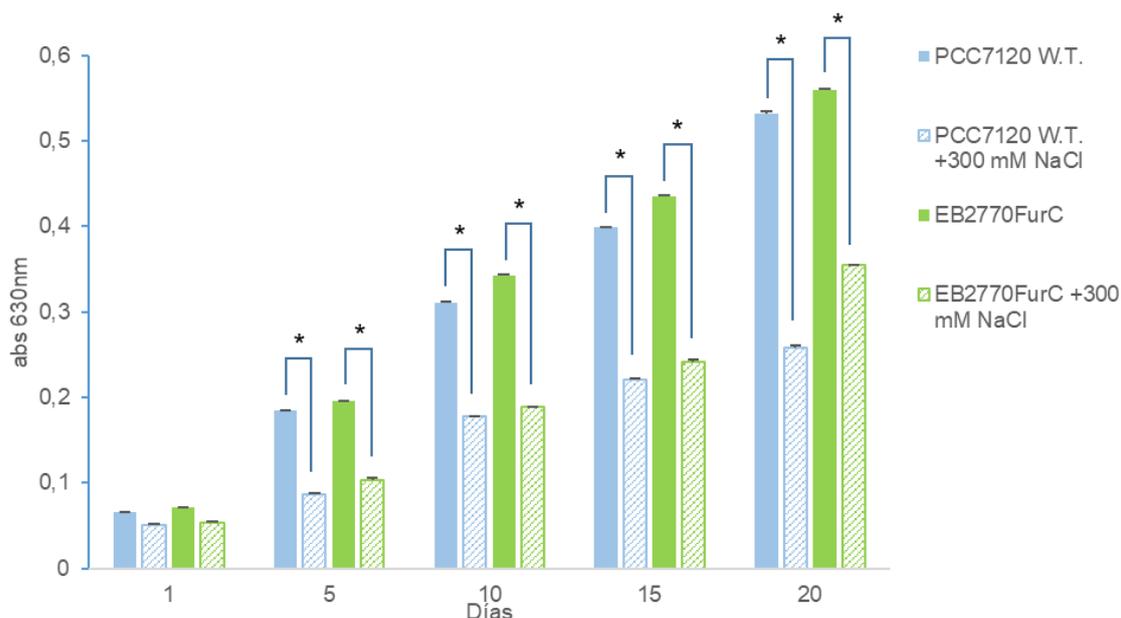


Figura 48. Cuantificación mediante tinción con cristal violeta y abs 630 nm, del *biofilm* unido a las paredes de placas de 12 pocillos, producido por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por la estirpe de sobreexpresión EB2770FurC tras 1, 5, 10, 15 y 20 días de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y 300 mM de NaCl.

En las dos condiciones evaluadas la estirpe de sobreexpresión de FurC (EB2770FurC) presentó una mayor formación de *biofilm* que la estirpe silvestre con diferencias significativas a partir del día 5 del experimento, este

comportamiento se mantuvo tras 10, 15 y 20 días. Sin embargo, la susceptibilidad de las dos estirpes a las altas concentraciones de NaCl fue similar, presentado disminuciones en la formación del *biofilm* entre un 50 y un 60% desde el día 5 y hasta el día 20 para ambas estirpes.

La Figura 49 recoge las variaciones observadas en la formación del *biofilm* en las cuatro cepas tras 20 días de cultivo en condiciones estándar y en NaCl 300 mM. En todos los casos, la formación de *biofilm* disminuyó en condiciones de altas concentraciones de sal.

Esta disminución con respecto al *biofilm* observado en condiciones estándar fue similar en las cuatro cepas, siendo ligeramente mayor para la estirpe EB2770FurC (60% frente al 50% en AG2770FurA y en *Anabaena* sp. PCC7120 y disminución hasta un 30% de producción en la variante VCS2770FurB).

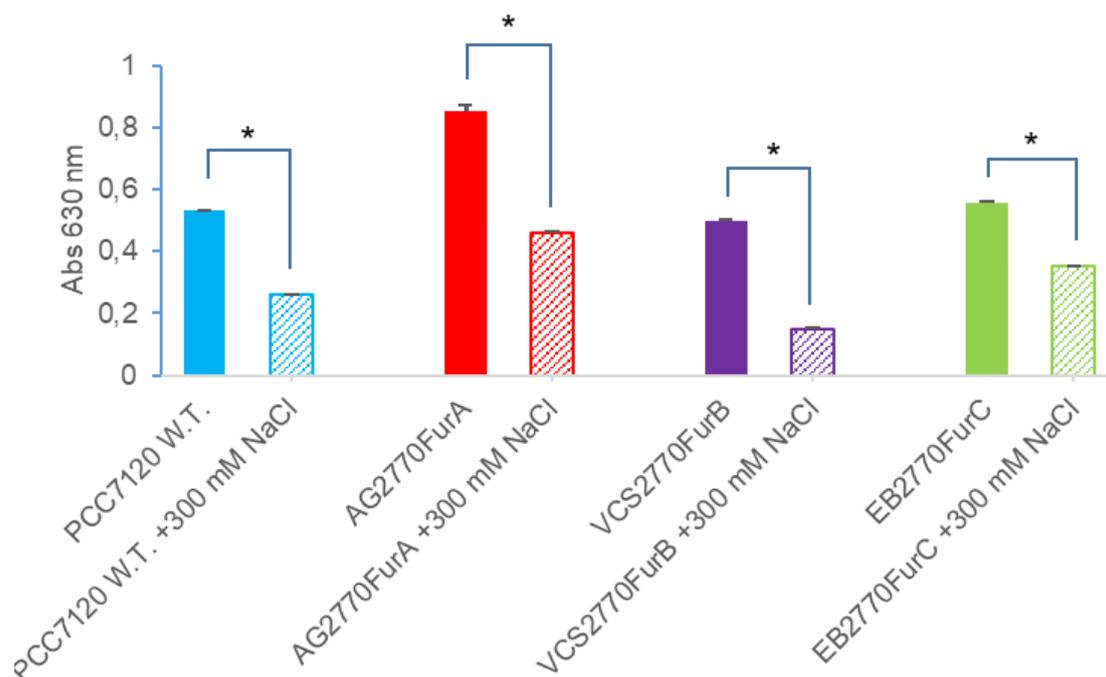


Figura 49. Cuantificación mediante tinción con cristal violeta y abs 630 nm, del *biofilm* unido a las paredes de placas de 12 pocillos, producido por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC tras 20 días de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo) y en NaCl 300 mM.

A diferencia del experimento de cuantificación de exopolisacáridos en el que el estrés por deficiencia de nitrógeno o por la exposición a altas concentraciones de sal aumentó la producción del exopolisacárido para la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y para las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC, en el experimento de formación de *biofilm* solo la deficiencia de nitrógeno produjo un incremento en las cuatro estirpes evaluadas.

Esto puede apreciarse en la Tabla 14 en la que se resumen todos los datos relacionados con la formación de *biofilm* en condiciones estándar de crecimiento, en deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado y en altas concentraciones de sal (300 mM de NaCl). Los datos corresponden a la media de tres replicas con sus respectivas desviaciones estándar, la última columna corresponde al incremento en la producción de exopolisacárido en deficiencia de nitrógeno y al porcentaje de pérdida de *biofilm* en altas concentraciones de sal.

Tabla 14. Cuantificación tinción con cristal violeta y abs 630 nm, del *biofilm* unido a las paredes de placas de 12 pocillos, formado por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y por las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC tras 20 días de crecimiento en condiciones estándar (BG11 completo), en deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado y en 300 mM de NaCl.

Estirpe	Día 1		Día 5		Día 20			
PCC7120 W.T.	0,065 ±	0,000	0,184 ±	0,000	1	0,532 ±	0,003	1
AG2770FurA	0,086 ±	0,003	0,238 ±	0,001	1	0,852 ±	0,019	1
VCS2770FurB	0,064 ±	0,000	0,177 ±	0,002	1	0,501 ±	0,001	1
EB2770FurC	0,072 ±	0,000	0,195 ±	0,001	1	0,559 ±	0,001	1
					Incremento		Incremento	
PCC7120 W.T. -N	0,093 ±	0,002	0,158 ±	0,000	0,9	0,670 ±	0,003	1,3
AG2770FurA -N	0,100 ±	0,002	0,184 ±	0,002	0,8	0,997 ±	0,003	1,2
VCS2770FurB -N	0,064 ±	0,000	0,140 ±	0,002	0,8	0,672 ±	0,003	1,3
EB2770FurC -N	0,101 ±	0,002	0,183 ±	0,003	0,9	0,813 ±	0,003	1,5
					Reducción		Reducción	
PCC7120 W.T. + NaCl	0,051 ±	0,001	0,087 ±	0,001	50%	0,258 ±	0,002	50%
AG2770FurA + NaCl	0,062 ±	0,002	0,133 ±	0,003	60%	0,460 ±	0,003	50%
VCS2770FurB + NaCl	0,049 ±	0,001	0,081 ±	0,001	50%	0,151 ±	0,001	70%
EB2770FurC + NaCl	0,054 ±	0,000	0,103 ±	0,003	50%	0,354 ±	0,000	60%

En definitiva, la exposición de las células a 300 mM de NaCl redujo la cantidad de *biofilm* formado. Esta disminución se aprecia a partir del día 5 y se mantiene hasta el final del experimento.

4.3. Análisis de las glicosiltransferasas presentes en el genoma de *Anabaena* sp. PCC7120.

4.3.1. Clasificación y relación con otras proteínas.

Las glicosiltransferasas son enzimas clave en la producción de *biofilms* bacterianos. Con el fin de identificar algunos de estos genes involucrados en la síntesis y transporte de exopolisacáridos y formación de *biofilms* en *Anabaena* sp. PCC7120, se realizó una búsqueda de las secuencias anotadas como glicosiltransferasas en la base de datos CyanoBase (<http://genome.kazusa.or.jp>) y posteriormente se amplió la información sobre esos genes usando la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org>). Hay diferentes criterios para clasificar a las glicosiltransferasas debido a su heterogeneidad. De acuerdo a su estructura tridimensional las glicosiltransferasas se han clasificado en tres superfamilias, GT-A, GT-B y GT-C. Estas tres superfamilias estructurales contienen un total de 111 subfamilias que se clasifican de acuerdo a la similitud de secuencias, la clasificación en superfamilias estructurales y subfamilias se encuentra disponibles en la base de datos de Enzimas de Carbohidratos-activos CAZy (<http://www.cazy.org>). La Tabla 15 muestra la clasificación proporcionada por CAZy, de las secuencias de los genes anotados como glicosiltransferasas presentes en el genoma de *Anabaena* sp. PCC7120.

Tabla 15. Clasificación, de las secuencias de los genes anotados como glicosiltransferasas en el genoma de *Anabaena* sp. PCC7120 (cazy.org). sa= sin clasificar.

Subfamilia de acuerdo a similitud de secuencia	1	2	4	5	9	14	19	26	28	35	39	41	51	83	sa
Número de secuencias representativas de cada familia.	4	48	51	2	1	1	1	2	1	2	1	2	6	3	4

De acuerdo a la clasificación proporcionada por la base de datos de Enzimas de Carbohidratos-activos CAZy, la mayor cantidad de secuencias de glicosiltransferasas se encuentran distribuidas en las subfamilias 2 y 4, (48 y 51 genes respectivamente), seguido de la subfamilia 51 con 6 secuencias y las subfamilias 1 y 83 con 4 y 3 secuencias respectivamente. Las subfamilias (5, 26, 35 y 41) están conformadas por 2 secuencias cada una, y las subfamilias (9, 14, 19, 28 y 39) están formadas por una única secuencia cada una. Además, 4 secuencias se encuentran sin asignación a una subfamilia específica.

En este trabajo se clasificaron las secuencias de 131 genes anotados como glicosiltransferasas o probables glicosiltransferasas, presentes en el genoma de *Anabaena* sp. PCC7120 (Tabla 16), de los cuales 50 secuencias pertenecen a la superfamilia estructural GT-A (que se caracteriza por presentar un dominio con plegamiento de tipo Rossmann sencillo), 63 secuencias a la superfamilia estructural GT-B (que se caracteriza por presentar un dominio con plegamiento de tipo Rossmann doble), 4 secuencias pertenecen a la superfamilia estructural GT-C (que son proteínas integrales de membrana con múltiples dominios transmembrana) y 14 de estas secuencias no tienen asignada una familia de acuerdo a su estructura tridimensional.

Tabla 16. Resultado de la búsqueda de genes codificantes para glicosiltransferasas en *Anabaena* sp. PCC7120.

gen	Superfamilia estructura 3D.	Subfamilia.	Número de accesión (NCBI)
<i>al/0042</i> proteína hipotética	GT-A	GT2	BAB77566.1
<i>al/0143</i> dolicol-fosfato manosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB77667.1
<i>al/0914</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB72871.1
<i>al/0915</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB72872.1
<i>al/1737</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB73436.1
<i>al/1762</i> glicosiltransferasa putativa	GT-A	GT2	BAB73461.1
<i>al/1766</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB73465.1
<i>al/1767</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB73466.1
<i>al/1768</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB73467.1
<i>al/1886</i> proteína desconocida	GT-A	GT2	BAB73585.1
<i>al/2288</i> glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB73987.1
<i>al/2289</i> glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB73988.1
<i>al/2770</i> dolicol-fosfato manosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB74469.1
<i>al/4126</i> dolicol-fosfato manosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB75825.1
<i>al/4424</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB76123.1
<i>al/4431</i> glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB76130.1
<i>al/4441</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB76140.1
<i>al/4793</i> proteína hipotética	GT-A	GT2	BAB76492.1
<i>al/4857</i> proteína hipotética	GT-A	GT2	BAB76556.1
<i>al/5102</i> proteína hipotética	GT-A	GT2	BAB76801.1
<i>al/5118</i> polisoprenil-fosfato glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB76817.1
<i>alr/0074</i> glicosiltransferasa putativa	GT-A	GT2	BAB77598.1
<i>alr/0557</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB72515.1
<i>alr/0558</i> probable glicosiltransferasa	GT-A, GT-B	GT2,GT41	BAB72516.1
<i>alr/0776</i> proteína hipotética	GT-A	GT2	BAB72733.1
<i>alr/2408</i> proteína hipotética	GT-A	GT2	BAB74107.1
<i>alr/2828</i> proteína desconocida	GT-A	GT2	BAB74527.1
<i>alr/2836</i> glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB74535.1
<i>alr/2837</i> glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB74536.1
<i>alr/2840</i> glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB74539.1
<i>alr/2866</i> glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB74565.1
<i>alr/3062</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB74761.1
<i>alr/3063</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB74762.1
<i>alr/3067</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB74766.1

Tabla 16. Resultado de la búsqueda de genes codificantes para glicosiltransferasas en *Anabaena* sp. PCC7120. Continuación.

gen	Superfamilia estructura 3D.	Subfamilia.	Número de accesión (NCBI)
<i>alr3068</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB74767.1
<i>alr3070</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB74769.1
<i>alr3071</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB74770.1
<i>alr3073</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB74772.1
<i>alr3176</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB74875.1
<i>alr3177</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB74876.1
<i>alr3380</i> dolicol-fosfato manosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB75079.1
<i>alr3757</i> celulosa sintasa	GT-A	GT2	BAB75456.1
<i>alr4487</i> proteína hipotética	GT-A	GT2	BAB76186.1
<i>alr4492</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB76191.1
<i>alr4493</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB76192.1
<i>alr5203</i> probable glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB76902.1
<i>alr5240</i> glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB76939.1
<i>all4933</i> 1,2-diacilglicerol 3-beta-glicosiltransferasa	GT-A	GT2	BAB76632.1
<i>all0160</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB77684.1
<i>all0562</i> proteína hipotética	GT-B	GT41	BAB72520.1
<i>all0919</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB72876.1
<i>all1059</i> sacarosa sintasa	GT-B	GT4	CAC87814.1
<i>all1272</i> glucógeno fosforilasa	GT-B	GT35	BAB73229.1
<i>all1345</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB73302.1
<i>all2037</i> probable galactosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB73736.1
<i>all2292</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB73991.1
<i>all2507</i> probable hexosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB74206.1
<i>all2549</i> proteína hipotética	GT-B	GT4	BAB74248.1
<i>all2720</i> glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB74419.1
<i>all2806</i> probable alfa-glucano fosforilasa	GT-B	GT35	BAB74505.1
<i>all4376</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB76075.1
<i>all4426</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB76125.1
<i>all4436</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB76135.1
<i>all4437</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB76136.1

Tabla 16. Resultado de la búsqueda de genes codificantes para glicosiltransferasas en *Anabaena* sp. PCC7120. Continuación.

gen	Superfamilia estructura 3D.	Subfamilia.	Número de accesión (NCBI)
<i>all4440</i> proteína desconocida	GT-B	GT4	BAB76139.1
<i>all4830</i> manosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB76529.1
<i>all5194</i> glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB76893.1
<i>all5195</i> glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB76894.1
<i>all5196</i> proteína hipotética	GT-B	GT1	BAB76895.1
<i>alr0031</i> glucógeno sintasa	GT-B	GT5	BAB77555.1
<i>alr0159</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB77683.1
<i>alr0477</i> fosfo-N-acetilmuramoil-pentapeptido-transferasa	GT-B	GT28	BAB72435.1
<i>alr0582</i> proteína hipotética	GT-B	GT4	BAB72540.1
<i>alr0584</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB72542.1
<i>alr1000</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB72957.1
<i>alr1117</i> proteína hipotética	GT-B	GT4	BAB73074.1
<i>alr1668</i> glicosiltransferasa putativa	GT-B	GT4	BAB78034.1
<i>alr1879</i> glucógeno sintasa	GT-B	GT5	BAB73578.1
<i>alr2265</i> proteína de la biosíntesis de sulfoquinovosildiacilglicerol	GT-B	GT4	BAB73964.1
<i>alr2274</i> lipido-A-disacárido sintasa	GT-B	GT19	BAB73973.1
<i>alr2832</i> glicosiltransferasa putativa	GT-B	GT4	BAB74531.1
<i>alr2839</i> glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB74538.1
<i>alr2864</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB74563.1
<i>alr2867</i> glicosiltransferasa putativa	GT-B	GT4	BAB74566.1
<i>alr3057</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB74756.1
<i>alr3058</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB74757.1
<i>alr3064</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB74763.1
<i>alr3069</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB74768.1
<i>alr3370</i> glicosiltransferasa putativa	GT-B	GT4	BAB75069.1
<i>alr3425</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB75124.1
<i>alr3698</i> (hepb/hepd) proteína de la síntesis de polisacáridos de la envoltura del heterocisto.	GT-B	GT4	CAB57789.1
<i>alr4168</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB75867.1
<i>alr4178</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB75877.1
<i>alr5168</i> proteína hipotética	GT-B	GT9	BAB76867.1
<i>alr5197</i> proteína hipotética	GT-B	GT1	BAB76896.1

Tabla 16. Resultado de la búsqueda de genes codificantes para glicosiltransferasas en *Anabaena* sp. PCC7120. Continuación.

gen	Superfamilia estructura 3D.	Subfamilia.	Número de accesión (NCBI)
<i>alr5198</i> proteína hipotética	GT-B	GT1	BAB76897.1
<i>alr5201</i> glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB76900.1
<i>alr5202</i> glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB76901.1
<i>alr5223</i> glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB76922.1
<i>alr5235</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB76934.1
<i>alr5237</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB76936.1
<i>alr5238</i> glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB76937.1
<i>alr5239</i> proteína hipotética	GT-B	GT4	BAB76938.1
<i>alr5307</i> probable glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB77006.1
<i>alr5341</i> glicosiltransferasa	GT-B	GT4	BAB77040.1
<i>alr4985</i> sacarosa sintasa	GT-B	GT4	AAS31679.1
<i>alr3699</i> glicosiltransferasa del envoltorio polisacárido del heterocisto.	GT-B	GT4	BAB75398.1
<i>alr3150</i> manosiltransferasa	GT-C	GT39	BAB74849.1
<i>alr2870</i> proteína desconocida	GT-C	GT83	BAB74569.1
<i>alr2076</i> proteína hipotética	GT-C	GT83	BAB73775.1
<i>alr4347</i> proteína hipotética	GT-C	GT83	BAB76046.1
<i>alr2952</i> proteína de unión a penicilina	Sin asignación	GT51	BAB74651.1
<i>alr2981</i> proteína de unión a penicilina	Sin asignación	GT51	BAB74680.1
<i>alr4422</i> UDP-N-acetil-D-manosamina transferasa	Sin asignación	GT26	BAB76121.1
<i>alr4432</i> probable proteína de la biosíntesis de exopolisacárido	Sin asignación	GTnc	BAB76131.1
<i>alr5342</i> proteína desconocida	Sin asignación	GTnc	BAB77041.1
<i>alr5343</i> proteína desconocida	Sin asignación	GTnc	BAB77042.1
<i>alr0585</i> probable glicosiltransferasa	Sin asignación	GTnc	BAB72543.1
<i>alr1705</i> UDP-N-acetil-D-manosiltransferasa	Sin asignación	GT26	BAB78071.1
<i>alr4005</i> lípido-A-disacárido sintasa	Sin asignación	GTnc	BAB75704.1
<i>alr4323</i> probable glicosiltransferasa	Sin asignación	GT14	BAB76022.1
<i>alr4579</i> proteína de unión a penicilina	Sin asignación	GT51	BAB76278.1
<i>alr5101</i> proteína de unión a penicilina	Sin asignación	GT51	AAD51129.1
<i>alr5324</i> proteína de unión a penicilina	Sin asignación	GT51	BAB77023.1
<i>alr5326</i> proteína de unión a penicilina	Sin asignación	GT51	BAB77025.1

Con respecto a las subfamilias, las secuencias de las glicosiltransferasas de *Anabaena* sp. PCC7120 que corresponden a la superfamilia GT-A, pertenecen todas a la subfamilia 2, mientras que las glicosiltransferasas que comprenden la superfamilia estructural GT-B están distribuidas en las subfamilias 1, 4, 5, 9, 19, 28, 35 y 41 y por último las glicosiltransferasas de la superfamilia estructural GT-C están distribuidas en las subfamilias 39 y 83. Debido a su gran tamaño (3042 pb), el gen *alr0558* codifica una proteína con motivos estructurales presentes en las superfamilias estructurales GT-A y GT-B y en las subfamilias 2 y 41. Por otro lado, aunque 14 genes clasificados como probables glicosiltransferasas no se encuentran asignados a una superfamilia, algunos de estos pertenecen a las subfamilias 14, 26, y 51. Cada subfamilia tiene definidas una serie de actividades y rutas metabólicas con las que estas glicosiltransferasas están relacionadas (Tabla 17).

Tabla 17. Actividades de las glicosiltransferasas de *Anabaena* sp. PCC7120 y su relación con otras rutas metabólicas de acuerdo a su organización en superfamilias estructurales y en subfamilias.

Superfamilia estructural 3D.	Subfamilia	Actividades en la subfamilia y relación con otras rutas metabólicas.
GT-A	GT2	celulosa sintasa; quitina sintasa
GT-A	GT2	dolichilfosfato β -D-manosiltransferasa
GT-A	GT2	dolichilfosfato β -glucosiltransferasa
GT-A	GT2	N-acetilglucosaminiltransferasa
GT-A	GT2	N-acetilgalactosaminiltransferasa
GT-A	GT2	hialuronano sintasa
GT-A	GT2	quitina oligosacárido sintasa; β -1,3-glucano sintasa
GT-A	GT2	β -1,4-manan sintasa; β -manosilfosfodecaprenol-manooligosacárido α -1,6-manosiltransferasa
GT-A	GT2	ramnopiranosil-N-acetilglucosaminil-PP-decaprenol β -1,4 / 1,5-galactofuranosiltransferasa galactofuranosil-galactofuranosil-ramnosil-N-acetilglucosaminil-PP-decaprenol β -1,5 / 1,6-galactofuranosiltransferasa
GT-A	GT2	dTDP-L-Rha: N-acetilglucosaminil-PP-decaprenol α -1,3-L-ramnosiltransferasa
GT-A	GT2	β -1,3 / 4-N-acetilmanano sintasa.
GT-B	GT1	UDP-glucuronosiltransferasa
GT-B	GT1	zeatina O- β -xilosiltransferasa
GT-B	GT1	2-hidroxiacilsfingosina 1- β -galactosiltransferasa
GT-B	GT1	N-acilesfingosina galactosiltransferasa
GT-B	GT1	flavonol 3-O-glucosiltransferasa
GT-B	GT1	antocianidin 3-O-glucosiltransferasa
GT-B	GT1	sinapat 1-glucosiltransferasa
GT-B	GT1	indol-3-acetato β -glucosiltransferasa
GT-B	GT1	flavonol L-ramnosiltransferasa
GT-B	GT1	esterol glucosiltransferasa
GT-B	GT1	UDP-Glc: 4-hidroxibenzoato 4-O- β -glucosiltransferasa
GT-B	GT1	zeatina O- β -glucosiltransferasa
GT-B	GT1	glucosiltransferasa limonoide
GT-B	GT1	UDP-GlcA: baicaleína 7-O- β -glucuronosiltransferasa
GT-B	GT1	UDP-Glc: chalcona 4'-O- β -glucosiltransferasa
GT-B	GT1	ecdiesterioide UDP-glucosiltransferasa
GT-B	GT1	β -glucosiltransferasa de ácido salicílico
GT-B	GT1	antocianina 3-O-galactosiltransferasa
GT-B	GT1	antocianina 5-O-glucosiltransferasa

Tabla 17. Actividades de las glicosiltransferasas de *Anabaena* sp. PCC7120 y su relación con otras rutas metabólicas de acuerdo a su organización en superfamilias estructurales y en subfamilias. Continuación.

Superfamilia estructural 3D.	Subfamilia	Actividades en la subfamilia y relación con otras rutas metabólicas.
GT-B	GT1	dTDP- β -2-desoxi-L-fucosa: α -L-2-desoxifucosiltransferasa
GT-B	GT1	UDP- β -L-ramnosa: α -L-ramnosiltransferasa
GT-B	GT1	zeaxantina glucosiltransferasa
GT-B	GT1	flavona 8-C-glicosiltransferasa
GT-B	GT1	UDP-Glc: flavona-6-C-glucosyltransferasa
GT-B	GT1	UDP-Glc: cinamato β -glucosiltransferasa
GT-B	GT1	UDP-Glc: ácido hidroxicinámico O- β -glucosiltransferasa
GT-B	GT1	UDP-Glc: cinamoil O- β -glucosiltransferasa.
GT-B	GT4	sacarosa sintasa
GT-B	GT4	sacarosa-fosfato sintasa
GT-B	GT4	α -glucosiltransferasa
GT-B	GT4	lipopolisacárido N-acetilglucosaminiltransferasa
GT-B	GT4	fosfatidilinositol α -manosiltransferasa
GT-B	GT4	GDP-Man: Man1GlcNAc2-PP-dolicol α -1,3-manosiltransferasa
GT-B	GT4	Man3GlcNAc2-PP-dolicol / Man4GlcNAc2-PP-dolichol α -1,2-manosiltransferasa
GT-B	GT4	digalactosildiacilglicerol sintasa
GT-B	GT4	1,2-diacilglicerol 3-glucosiltransferasa
GT-B	GT4	diglucosil diacilglicerol sintasa
GT-B	GT4	trehalosa fosforilasa
GT-B	GT4	NDP-Glc: α -glucosa α -glucosiltransferasa / α , α -trehalosa sintasa
GT-B	GT4	GDP-Man: Man2GlcNAc2-PP-dolicol α -1,6-manosiltransferasa
GT-B	GT4	UDP-GlcNAc: 2-desoxiestreptamina α -N-acetilglucosaminiltransferasa
GT-B	GT4	UDP-GlcNAc: ribostamicina α -N-acetilglucosaminiltransferasa
GT-B	GT4	UDP-Gal α -galactosiltransferasa
GT-B	GT4	UDP-Xil α -xilosiltransferasa
GT-B	GT4	UDP-GlcA α -glucuroniltransferasa
GT-B	GT4	UDP-GalNAc: GalNAc-PP-Und α -1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa
GT-B	GT4	UDP-GalNAc: N, N'-diacetilbacilosaminil-PP-Und α -1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa
GT-B	GT5	α -maltosa-1-fosfato sintasa dependiente de ADP
GT-B	GT5	UDP-Glc: glucógeno glucosiltransferasa
GT-B	GT5	ADP-Glc: almidón glucosiltransferasa
GT-B	GT5	NDP-Glc: almidón glucosiltransferasa
GT-B	GT5	UDP-Glc: α -1,3-glucano sintasa
GT-B	GT5	UDP-Glc: α -1,4-glucano sintasa
GT-B	GT19	lípidio-A-disacárido sintasa
GT-B	GT9	lipopolisacárido N-acetilglucosaminiltransferasa
GT-B	GT9	Heptosiltransferasa
GT-B	GT28	1,2-diacilglicerol 3- β -galactosiltransferasa
GT-B	GT28	1,2-diacilglicerol 3- β -glucosiltransferasa
GT-B	GT28	UDP-GlcNAc: Und-PP-MurAc-pentapéptido β -N-acetilglucosaminiltransferasa
GT-B	GT28	digalactosildiacilglicerol sintasa
GT-B	GT35	glucógeno o almidón fosforilasa
GT-B	GT41	UDP-GlcNAc: péptido β -N-acetilglucosaminiltransferasa
GT-B	GT41	UDP-Glc: péptido N- β -glucosiltransferasa
GT-B	GT39	α -manosiltransferasa
GT-C	GT39	Estas enzimas utilizan dolichol-P-manosa como donador de azúcar.
GT-C	GT83	fosfato de undecaprenilo- α -L-Ara4N: 4-amino-4-desoxi- β -L-arabinosiltransferasa
GT-C	GT83	ácido dodecaprenilfosfato- β -galacturónico: núcleo de lipopolisacárido α -galacturonosil transferasa
Sin asignación	GT14	β -1,3-galactosil-O-glicosil-glicoproteína β -1,6-N-acetilglucosaminiltransferasa
Sin asignación	GT14	N-acetilactosaminida β -1,6-N-acetilglucosaminiltransferasa
Sin asignación	GT14	O- β -xilosiltransferasa
Sin asignación	GT14	UDP-GlcA: arabinogalactano β -glucuronosiltransferasa
Sin asignación	GT26	UDP-ManNAcA: β -N-acetil manosaminuroniltransferasa
Sin asignación	GT26	UDP-ManNAcA: β -N-acetil-manosaminiltransferasa
Sin asignación	GT26	UDP-Glc: β -1,4-glucosiltransferasa
Sin asignación	GT26	β -1,4-galactosiltransferasa
Sin asignación.	GT51	polimerasa de mureína

4.3.2. Análisis filogenético.

Se construyó un árbol filogenético con base en las secuencias de aminoácidos de glicosiltransferasas de *Anabaena* sp. PCC7120 proporcionadas por la base de datos de Enzimas de Carbohidratos-activos (Cazy) (<http://www.cazy.org>), con el objetivo de identificar qué glicosiltransferasas presentan mayor similitud entre ellas e inferir una posible clasificación de las proteínas que no se encuentran asignadas a ninguna familia.

La construcción del árbol se realizó utilizando las herramientas proporcionadas por la plataforma web (phylogeny.fr), en la modalidad “*a la carte*”. Debido a la heterogeneidad de las secuencias de las glicosiltransferasas de *Anabaena* sp. PCC7120, los alineamientos correspondientes se hicieron mediante MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation). Las secuencias se curaron posteriormente con Gblocks, los parámetros matemáticos para la construcción de los árboles filogenéticos (estimación por máxima verosimilitud) se llevaron a cabo con PhyML y finalmente la representación gráfica de los árboles elaboró utilizando la herramienta TreeDyn (Figura 50).

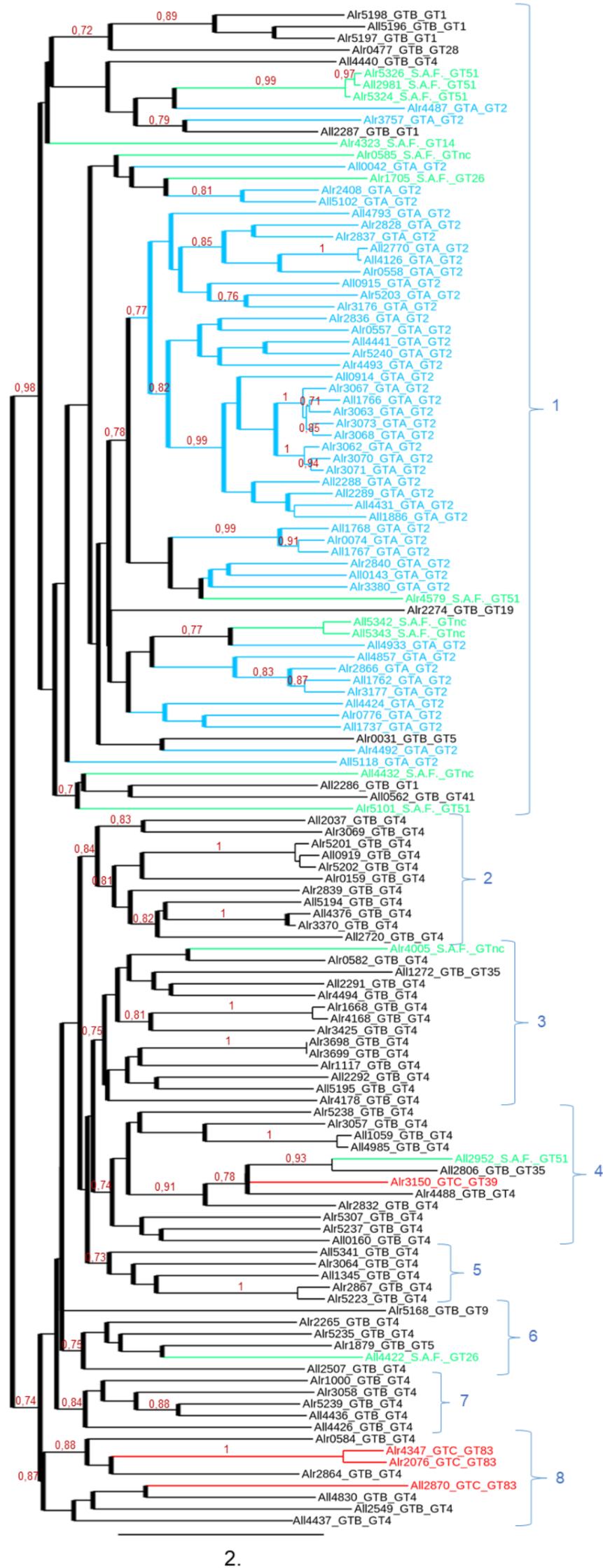


Figura 50. Árbol filogenético de las glicosiltransferasas de *Anabaena* sp. PCC7120 que pertenecen a las superfamilias estructurales GT-A (ramas azules), GT-B (ramas negras), GT-C (ramas rojas) y 14 secuencias de glicosiltransferasas que se encuentran sin asignación a una superfamilia estructural (S.A.F.) (ramas verdes). La barra de escala es de 2. sustituciones de aminoácidos por sitio. Los valores de soporte de las ramas se representan en rojo. Junto al nombre de cada glicosiltransferasa aparece la superfamilia estructural (GTA, GTB, GTC) y la subfamilia (GT1, GT2, GT4, GT5, GT9, GT14, GT19, GT26, GT28, GT35, GT39, GT41, GT51, GT83) a la que pertenecen. Las glicosiltransferasas sin clasificar en una subfamilia aparecen como GTnc.

En la Figura 50, las distancias génicas se representan por la longitud de las ramas. Los valores de soportes de las ramas, obtenidos mediante estimación por máxima verosimilitud se representan en rojo. Para definir la formación de clados y taxones pertenecientes a un mismo clado, un valor cercano a 0,9 se consideró altamente confiable y un valor de 0,7 medianamente confiable. Con base en estos parámetros el árbol filogenético para las 131 proteínas anotadas como glicosiltransferasas o probables glicosiltransferasas, presentes en el genoma de *Anabaena* sp. PCC7120 se organizaron en un total de 8 clados que aparecen señalizados del 1 al 8 con corchetes azules.

Las 50 secuencias de la superfamilia estructural GT-A (ramas azules) se organizaron en el mismo clado (clado 1) mientras que las 63 secuencias de la superfamilia estructural GT-B (ramas negras) se repartieron por los 8 clados. Tres de las cuatro secuencias (Alr4347, Alr2076 y All2870) de la superfamilia estructural GT-C (ramas rojas) se encuentran dentro del clado número 8, junto con otras proteínas que pertenecen a la familia GT-B. La secuencia Alr3150, también perteneciente a la superfamilia GT-C se encuentra dentro del clado 4, también junto con otras proteínas de la familia GT-B y la secuencia All2952 que hasta el momento está sin clasificar dentro de ninguna de las tres familias canónicas. De las 14 secuencias que se encuentran sin asignación a una familia (S.A.F.) (ramas verdes), 11 se encuentran dentro del clado 1, y las tres secuencias restantes (All4422, Alr4005 y All2952) se encuentran formando parte de los clados 3, 4 y 6 respectivamente.

4.4. Presencia de cajas FUR en los promotores de las glicosiltransferasas.

Los datos sobre la influencia de la desregulación de FUR en la formación de *biofilms*, sugieren que las proteínas FUR podrían estar implicadas en la regulación de algunas glicosiltransferasas. Por este motivo se buscaron cajas FurA y FurC en las secuencias de los promotores de todas las GTs descritas en el genoma de *Anabaena* sp. PCC7120. Cabe resaltar que, de estos 131 genes, más del 40 % se encuentra formando operones (Tabla 18). Lo que redujo la búsqueda de cajas FurA y FurC a 80 secuencias de promotores. Los operones se confirmaron mediante MicrobesOnline Operon Predictions (<http://www.microbesonline.org>).

Tabla 18. Mapa genómico de acuerdo a la base de datos KEGG (genome.jp) de glicosiltransferasas de *Anabaena* sp. PCC7120 organizadas en operones.

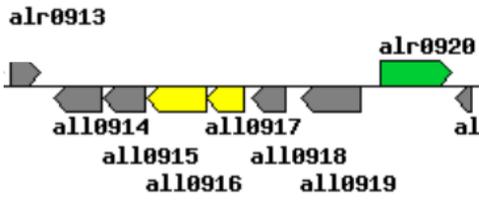
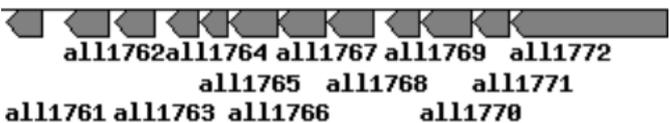
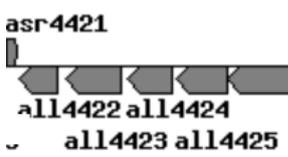
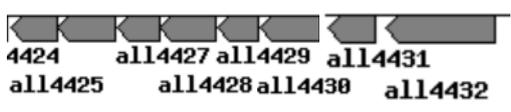
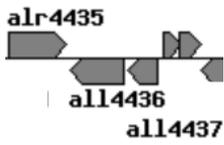
GTs formando un mismo operón	Contexto génico
<i>all0914, all0915, all0919</i>	 <p>Además de las glicosiltransferasas y otras proteínas hipotéticas presentes en el operón, los genes en amarillo son transportadores permeasas de tipo ABC.</p>
<i>all1762, all1766, all1767, all1768</i>	
<i>all2287, all2286, all2288, all2291, all2292</i>	
<i>all4422, all4424</i>	
<i>all4426, all4431</i>	
<i>all4436, all4437</i>	
<i>all4440, all4441</i>	

Tabla 18. Mapa genómico de acuerdo a la base de datos KEGG (genome.jp) de glicosiltransferasas de *Anabaena* sp. PCC7120 organizadas en operones. Continuación.

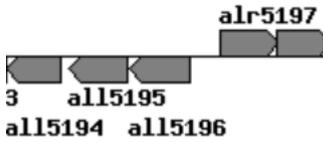
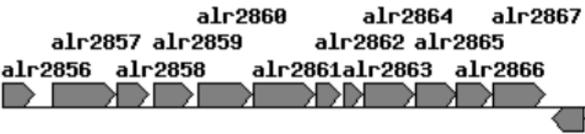
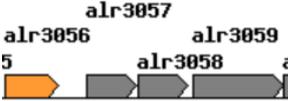
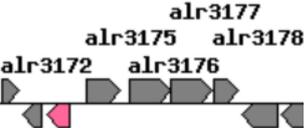
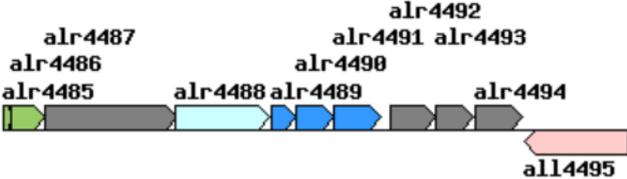
GTs formando un mismo operón	Contexto génico
<i>all5195, all5196</i>	
<i>all5342, all5343</i>	 <p>Además de las glicosiltransferasas y otras proteínas hipotéticas presentes en el operón, el gen en verde es un transportador de tipo ABC específico del heterocisto.</p>
<i>alr0557, alr0558</i>	
<i>alr0582, alr0584, alr0585</i>	 <p>Además de las glicosiltransferasas y otras proteínas hipotéticas presentes en el operón, el gen en amarillo es una proteína de unión a ATP de un transportador de tipo ABC.</p>
<i>alr2836, alr2837, alr2839, alr2840</i>	 <p>Además de las glicosiltransferasas y otras proteínas hipotéticas presentes en el operón, el gen en amarillo es una proteína de unión a ATP de un transportador de tipo ABC relacionado con la diferenciación a heterocisto.</p>
<i>alr2864, alr2866, alr2867</i>	

Tabla 18. Mapa genómico de acuerdo a la base de datos KEGG (genome.jp) de glicosiltransferasas de *Anabaena* sp. PCC7120 organizadas en operones. Continuación.

GTs formando un mismo operón	Contexto génico
<i>alr3057, alr3058</i>	
<i>alr3063, alr3064</i>	
<i>alr3069, alr3070, alr3071</i>	
<i>alr3176, alr3177</i>	
<i>alr4487, alr4488, alr4492, alr4493, alr4494</i>	
<i>alr5197, alr5198, alr5201, alr5202, alr5203</i>	
<i>alr5235, alr5237, alr5238, alr5239, alr5240</i>	

En la Tabla 18 se muestran las glicosiltransferasas de *Anabaena* sp. PCC7120 organizadas en operones. Muchos de estos operones están formados solo por genes de GTs y otros son más heterogéneos, conteniendo transportadores de tipo ABC y otros genes relacionados con la diferenciación a heterocisto, como

también varias proteínas hipotéticas. El mapa genómico de acuerdo a la base de datos KEGG (genome.jp) ilustra las GTs formando un mismo operón y otros genes adyacentes al operón. Los colores dentro del contexto génico corresponden a diferentes categorías funcionales: Amarillo (procesamiento de información ambiental), Anaranjado (metabolismo de aminoácidos), verde brillante (metabolismo de terpenoides y poliquétidos), rosa brillante (metabolismo de cofactores y vitaminas), rosa tenue (procesamiento de información genética), verde tenue (procesos celulares), azul brillante (metabolismo de carbohidratos), azul tenue (metabolismo y síntesis de polisacáridos).

Una vez definidas las secuencias de GTs formando operones, se definieron los promotores, la búsqueda de las secuencias de los promotores se llevó a cabo mediante las herramientas proporcionadas por la base de datos Ensembl Genome Browser (ensembl.org). Las cajas FUR se definieron en base a los trabajos de Gonzalez *et al.*, 2014 y Sevilla *et al.*, 2019, de donde se escogieron secuencias con una longitud de 23 pb para FurA y 19 pb para FurC, que se ilustran en la Figura 51 mediante WebLogo (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

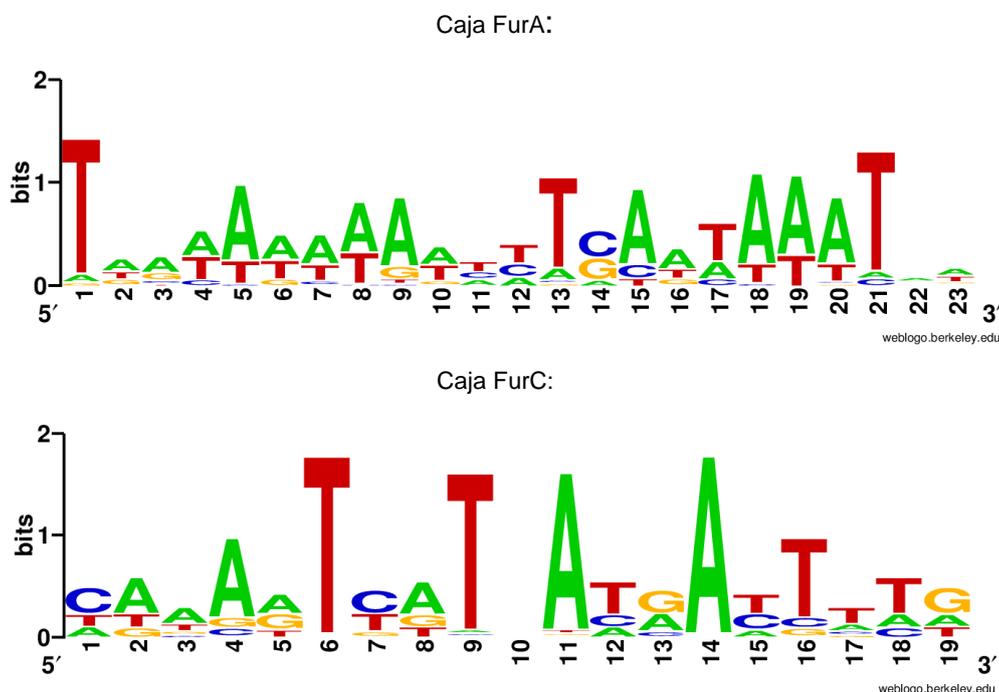


Figura 51. Secuencias correspondientes a cajas FUR para FurA y FurC que se analizaron mediante el software MEME, (Multiple Em for Motif Elicitation) (<http://meme-suite.org/>)

Con la herramienta FIMO (Find Individual Motif Occurrence) se identificaron las cajas FurA y FurC para las secuencias de glicosiltransferasas (Tabla 19). Las cajas se detectaron usando como parámetro de sensibilidad un p-value menor a 10^{-5} . En este caso, el p-value se define como la probabilidad de que una secuencia aleatoria de la misma longitud que el motivo analizado coincida con esa posición de la secuencia.

Tabla 19. Resultado de la búsqueda de Cajas FurA y FurC para las 80 secuencias de promotores de glicosiltransferasas de *Anabaena* sp. PCC7120.

Caja FurA		
Secuencias de GTs de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120	p-value	Matched Sequence
<i>alr2408</i>	$1,23 \times 10^{-8}$	TGCAAAATAGTCTCAATAAATCT
<i>alI0042</i>	$2,42 \times 10^{-7}$	TGATAAGAATTTTCAATAAATTT
<i>alr2828</i>	$1,42 \times 10^{-6}$	TTGTATAAAGAATGAGTAAATAT
<i>alr5307</i>	$4,35 \times 10^{-6}$	TAATTTTATTCCTCATAAAATGA
<i>alr3699</i>	$4,64 \times 10^{-6}$	TTATAAATGATTTAAAAAATAG
<i>alr3698</i>	$4,64 \times 10^{-6}$	TTATAAATGATTTAAAAAATAG
<i>alr1668</i>	$5,41 \times 10^{-6}$	TAATATTAATAATTGATTTGCTT
<i>alI1345</i>	$5,64 \times 10^{-6}$	TAAAAAATGAATACAACAAATAA
operón <i>alr0557-alr055</i>	$6,97 \times 10^{-6}$	TGAAAAATATTTTGCCTAAATCC
<i>alI2549</i>	$9,38 \times 10^{-6}$	TTGAAAAAATCATCAACAAAAAT
operón <i>alr3057-3073</i>	$1,15 \times 10^{-5}$	TAGAATTTAATTTTCATTAATTTA
<i>alI2806</i>	$1,66 \times 10^{-5}$	TACAAGATATAAAGAATAAACAT
<i>alI4376</i>	$1,7 \times 10^{-5}$	TTACATTTAATCTCTTTATATAT
<i>alr4347</i>	$1,92 \times 10^{-5}$	TACTTTAATTATTCAATATATGG
operón <i>alr3370-alr3380</i>	$2,21 \times 10^{-5}$	TAAAATAAAGCTGGAAAATATAG
<i>alI1059</i>	$2,32 \times 10^{-5}$	TTAAAAAATATCAACTTTTGA
<i>alr2076</i>	$3,01 \times 10^{-5}$	TAATTATTGTCATGTAAAAATGA
<i>alr5326</i>	$3,65 \times 10^{-5}$	TCATAAAAAATCTGACTTTATGA
<i>alr1705</i>	$3,87 \times 10^{-5}$	TATTAGAAAATTTGATAAACTAT
<i>alI2952</i>	$4,27 \times 10^{-5}$	TAAAATAACAATACATTAATAA
<i>alr1117</i>	$4,83 \times 10^{-5}$	TAATTGTTTACTCCTTTATTTA
<i>alr5101</i>	$5,33 \times 10^{-5}$	TGGATTTAAAAATCAAAATTTAT
<i>alr4005</i>	$5,63 \times 10^{-5}$	AGATATTTAACTACAAAAAATTA
<i>alI2770</i>	$5,78 \times 10^{-5}$	TGGCAAAAAACCTGAACCAATAC
operón <i>alr5234-5238</i>	$5,97 \times 10^{-5}$	TTAAAATCAACATCAATAAATGC
operón <i>alr2836-alr2840</i>	6×10^{-5}	TGAATACAATCCTCATTAAATTA
<i>alr2832</i>	$6,14 \times 10^{-5}$	TAGAATCAATTTTGAGTTTATTT
<i>alI4424</i>	$6,24 \times 10^{-5}$	GAAAATCAAATCTGCAAAAAATAA
<i>alr4323</i>	$7,34 \times 10^{-5}$	TTGTTAATGTATTAATTATATAA
<i>alI4793</i>	$8,03 \times 10^{-5}$	TATTAATAAATTTCCCATTAATCA
<i>alI4985</i>	$8,27 \times 10^{-5}$	TTGTCGATATTCTAAGTAAATAA
<i>alr3425</i>	$8,89 \times 10^{-5}$	TAGAATAAACCCCTCAGTAATTCT
operón <i>alI4431-alI4425</i>	$9,41 \times 10^{-5}$	TGACAGAAATGCTGCGTAATTAT
<i>alI4432</i>	$3,6 \times 10^{-4}$	TTTATAAAAAGTTTGTATATATGA
<i>alr5223</i>	$3,33 \times 10^{-4}$	AACCAATAATCATGAATAAATG
Caja FurC		
Secuencias de GTs de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120	p-value	Matched Sequence
<i>alI1345</i>	$8,63 \times 10^{-5}$	TATCTTGAGAACATGACAACA
<i>alI4376</i>	$9,09 \times 10^{-5}$	TAGTGTGCTGACACCACTATA
<i>alI4432</i>	$1,46 \times 10^{-4}$	AGAATACAGTACAGATTTTG

Con FIMO se identificaron un total de 35 posibles cajas FurA y 3 posibles cajas FurC para las 80 secuencias de promotores de glicosiltransferasas analizadas. Los resultados de la búsqueda bioinformática de cajas FUR realizadas en este

apartado se validaron experimentalmente con un conjunto de genes seleccionados mediante ensayos de retardos en gel (EMSA).

4.5. Identificación de glicosiltransferasas potencialmente reguladas por FurA y FurC mediante ensayos de retardo en gel (Electrophoretic Mobility Shift Assay: EMSA).

Los genes para los ensayos de retardos en gel (EMSA) se escogieron en base a la presencia de posibles cajas FUR en los promotores, junto con la información publicada por otros autores (Mitschke *et al.* 2011 y Yoshimura *et al.* 2007 y 2012) donde identificaron glicosiltransferasas cuyo nivel de transcripción cambia significativamente en condiciones de estrés salino, deshidratación y deficiencia de nitrógeno.

Se seleccionaron cinco glicosiltransferasas *alr3057*, *alr4424*, *alr4431*, *alr5223*, *alr5237* y un gen responsable de la síntesis de polisacáridos extracelulares (*alr4432*) los ensayos de retardos en gel se realizaron siempre en presencia de un DNA competidor inespecífico, un fragmento interno del gen *pkn22* (*ifpkn22*) de *Anabaena* sp. PCC7120, al cual no se unen FurA y FurC y en presencia de Mn^{2+} y DTT (Figura 52).

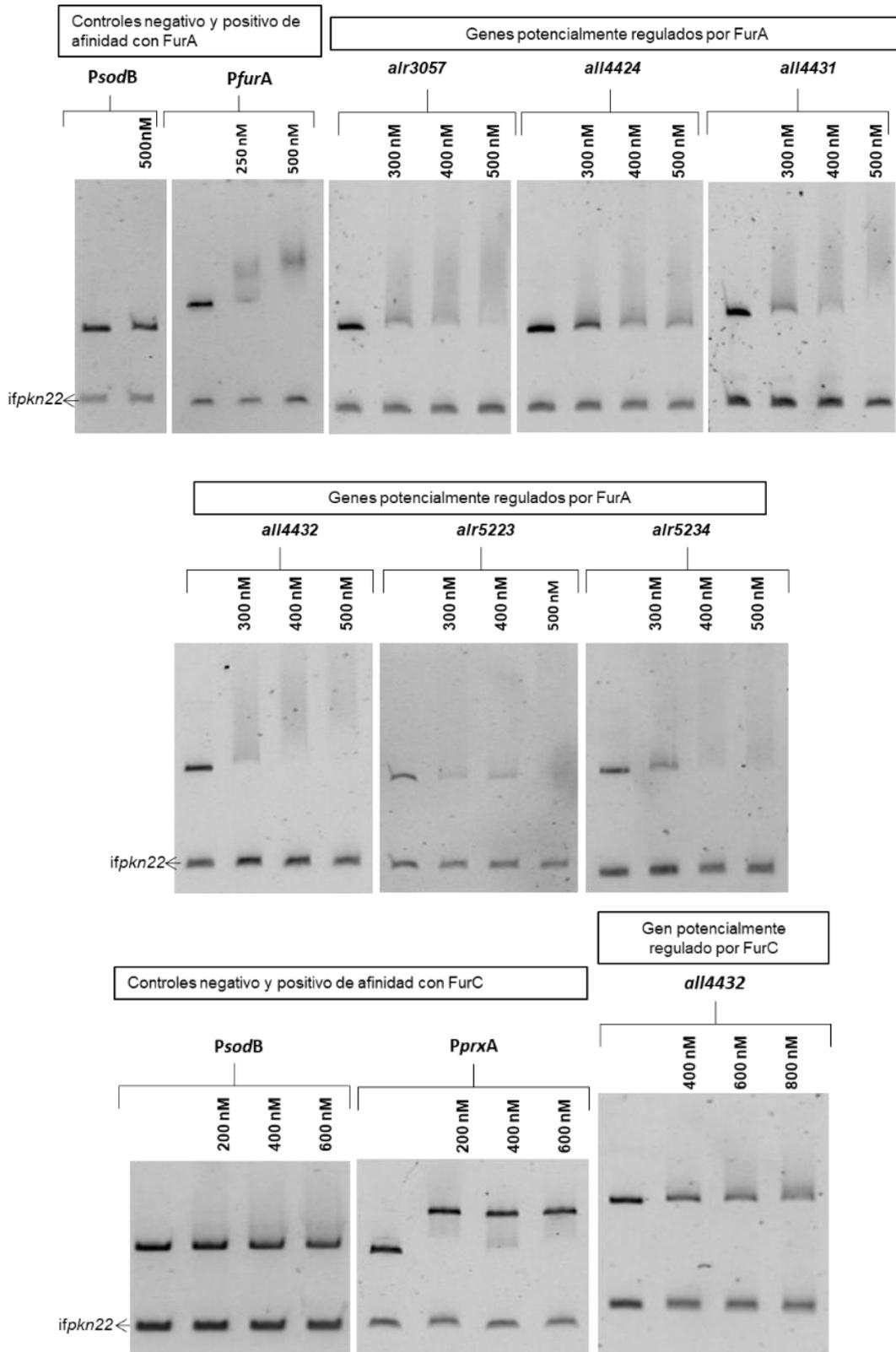


Figura 52. Ensayos de retardo en gel de los promotores de glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de exopolisacáridos y la formación de *biofilms* enfrentados a la proteína FurA y a la proteína FurC. En cada gel, el primer carril de izquierda a derecha corresponde al control negativo (sin proteína). Los siguientes carriles contienen la proteína a una concentración final de 300, 400 y 500 nM para FurA y 400, 600 y 800 nM para FurC. Se cargaron geles con controles de afinidad para FurA (500 nM para *sodB* y 250 nM y 500 nM para *pfurA*) y controles de afinidad para FurC (200, 400 y 600 nM para *sodB* y para *prxA*)

Los seis promotores evaluados presentaron retardo en presencia de FurA, mientras que solo el gen *all4432* responsable de la síntesis de polisacáridos extracelulares, presentó retardo al ser enfrentado a FurC.

4.6. Efecto de la presencia de exopolisacáridos y otros metabolitos en el sobrenadante de *Anabaena* sp. PCC7120 sobre la germinación de *Oryza sativa* de la variedad Ariete.

En Asia, se ha descrito el uso de cianobacterias para mejorar la fertilidad en campos de arroz y para recuperar suelos intervenidos por la sobreexplotación agrícola (Nisha *et al.* 2007; Maçik *et al.* 2020). La matriz del *biofilm* protege a la cianobacteria y le permite crecer en condiciones hostiles, como deficiencia de nutrientes o altos niveles de salinidad, por lo que puede proliferar en suelos erosionados por la sobrecarga de actividades agrícolas y proveer un soporte para el crecimiento de otros microorganismos beneficiosos. Además, *Anabaena* contribuye a la fertilización con el proceso de fijación biológica de nitrógeno. En este trabajo, se estudió la capacidad protectora de los exopolisacáridos obtenidos del sobrenadante de *Anabaena* sp. PCC7120 en la germinación de semillas de arroz (*Oryza sativa*) de la variedad Ariete, sometiendo las semillas durante su germinación en placas de Petri a condiciones de estrés salino.

El análisis del efecto los exopolisacáridos y otros metabolitos de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 sobre la germinación de semillas de arroz en condiciones estándar, así como bajo condiciones de salinidad (NaCl 100 mM) evidenció la actividad de las células de estas dos estirpes como promotoras de crecimiento, incrementando el porcentaje de germinación, el crecimiento de la raíz pivotante, y la longitud del tallo. También se evidenció que la susceptibilidad de las semillas de arroz al estrés salino, fue menor en presencia de las células y el sobrenadante de este microorganismo.

4.6.1. Consecuencias del estrés salino y su efecto sobre la germinación:

El porcentaje de germinación de las semillas de arroz de la variedad *Ariete* fue similar en condiciones estándar (90% en BG-11, 92% en el sobrenadante de la estirpe silvestre y 80% en las células de la estirpe silvestre) (Figura 53A). Sin

embargo, el estrés salino disminuyó notablemente el porcentaje de germinación en BG-11 (48%) (Figura 53B).

Esta susceptibilidad de las semillas de arroz durante la exposición al estrés salino fue menor cuando las semillas germinaron en presencia de los tratamientos.

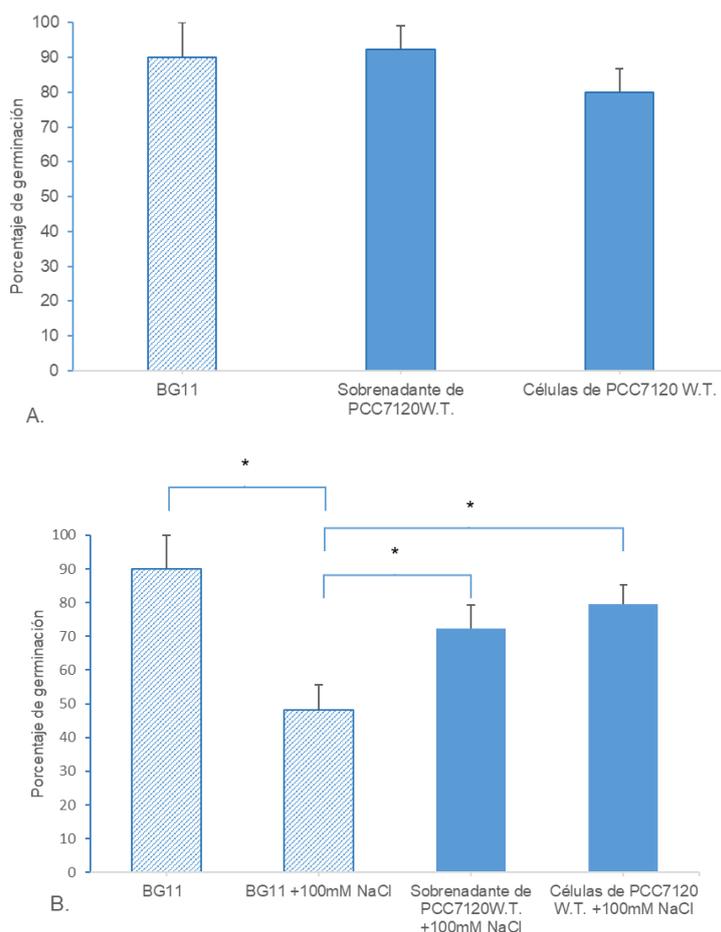


Figura 53. Efecto de los exopolisacáridos presentes en el sobrenadante y las células de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 en el porcentaje de germinación de *Oryza sativa* de la variedad *Ariete* tras 8 días de germinación en A. condiciones estándar y B. NaCl 100 mM.

Comparando las semillas de arroz que germinaron en BG-11 en condiciones estándar (Figura 53A), con las semillas que germinaron en BG-11 NaCl 100 mM (Figura 53B), se observa que exponer las semillas de arroz a altas concentraciones de NaCl, disminuyó su porcentaje de germinación en 0,5 veces. Sin embargo, en condiciones de salinidad, la exposición de las semillas a los tratamientos (sobrenadante de la estirpe silvestre y células de la estirpe silvestre) permitió una recuperación en el porcentaje de germinación (72% y 79% respectivamente).

4.6.1.1. Efecto en el crecimiento de la raíz pivotante:

Por otro lado, el crecimiento de la raíz pivotante de las semillas de arroz de la variedad *Ariete* que germinaron en condiciones estándar fue mayor en el BG-11 (27 mm), que en presencia del sobrenadante de la estirpe silvestre (16 mm). Sin embargo, las células de la estirpe silvestre parecen promover el crecimiento de la raíz pivotante (38 mm y 31 mm respectivamente) (Figura 54A).

Con respecto al estrés salino, hubo una notable disminución en el crecimiento de la raíz en BG-11 (4 mm). Esta susceptibilidad de las semillas de arroz durante la exposición al estrés salino fue menor cuando las semillas germinaron en presencia de los tratamientos (Figura 54B).

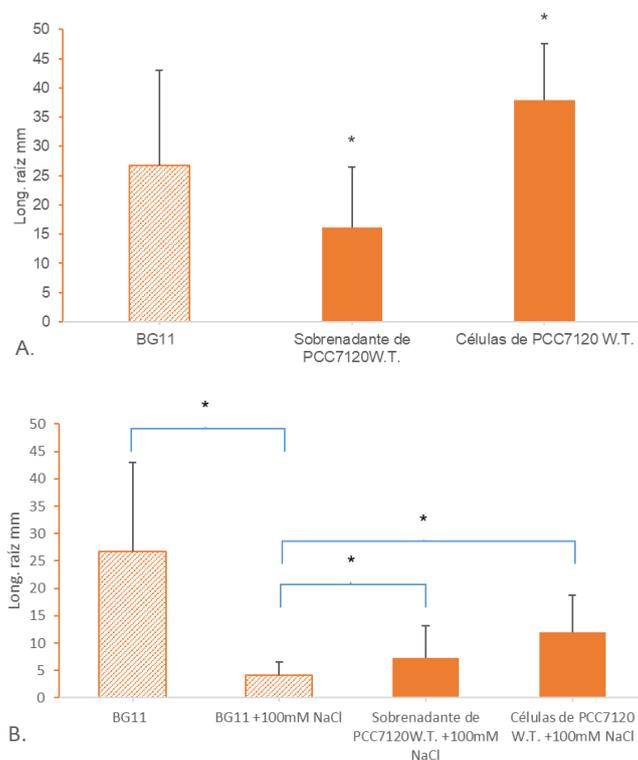


Figura 54. Efecto de los exopolisacáridos presentes en el sobrenadante y las células de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 en la longitud de la raíz de *Oryza sativa* de la variedad *Ariete* tras 8 días de germinación en A. condiciones estándar y B. NaCl 100 mM.

Comparando las semillas de arroz que germinaron en BG-11 en condiciones estándar con las semillas que germinaron en BG-11 NaCl 100 mM, se observó que exponer las semillas de arroz altas concentraciones de NaCl, disminuyó la longitud de la raíz en 6,5 veces. Sin embargo, en condiciones de salinidad, la exposición de las semillas a los tratamientos (sobrenadante de la estirpe silvestre

y células de la estirpe silvestre) permitió una pequeña recuperación en la longitud de las raíces (7,3 mm y 12 mm respectivamente).

4.6.1.2. Efecto en la longitud del tallo.

La evaluación del efecto del sobrenadante y las células de la estirpe silvestre sobre la longitud del tallo, mostró un comportamiento similar al observado para el crecimiento de la raíz. La longitud del tallo de las semillas de arroz de la variedad *Ariete* que germinaron en condiciones estándar fue mayor en BG-11 (21,6 mm), que en presencia del sobrenadante de la estirpe silvestre (12,4 mm) y no presentó diferencias significativas con el tratamiento de las células de la estirpe silvestre (22,1mm). (Figura 55A).

Con respecto al estrés salino, nuevamente, hubo una notable disminución en el crecimiento del tallo (8,3 mm) y no hubo diferencias significativas cuando las semillas germinaron en presencia del sobrenadante y en presencia de las células de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120. (Figura 55B).

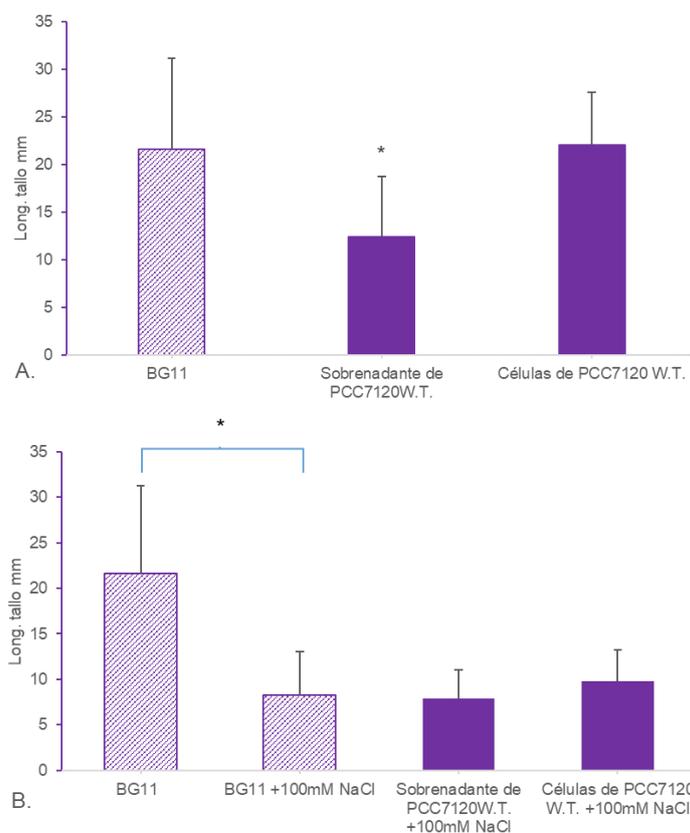


Figura 55. Efecto de los exopolisacáridos presentes en el sobrenadante y las células de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 en la longitud del tallo de *Oryza sativa* de la variedad *Ariete* tras 8 días de germinación en A. condiciones estándar y B. NaCl 100 mM.

Comparando las semillas de arroz que germinaron en BG-11 en condiciones estándar con las semillas que germinaron en BG-11 NaCl 100 mM, se observó que exponer las semillas de arroz altas concentraciones de NaCl, disminuyó la longitud del tallo en 2,6 veces. En este caso, sin embargo, los tratamientos no consiguieron una recuperación en la longitud del tallo (18 mm).

4.6.1.3. Efecto en la cantidad de hojas.

Finalmente, la cantidad de hojas desarrolladas por las plántulas de arroz de la variedad *Ariete* que germinaron en condiciones estándar fue mayor en BG-11 (3 hojas), que en los tratamientos con el sobrenadante de la estirpe silvestre (2 hojas) y con las células de la estirpe silvestre (1 hoja (Figura 56A). El estrés salino no permitió el desarrollo de hojas por parte de las semillas en BG-11 y en presencia del sobrenadante de la estirpe silvestre (Figura 56B).

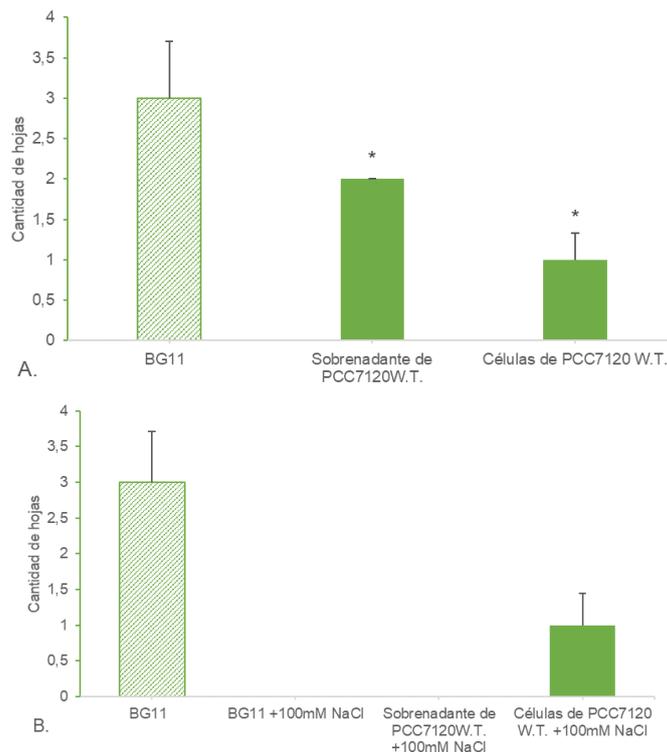


Figura 56. Efecto de los exopolisacáridos presente en el sobrenadante y las células de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 en la cantidad de hojas de *Oryza sativa* de la variedad *Ariete* tras 8 días de germinación en A. condiciones estándar y B. NaCl 100 mM.

Comparando las semillas de arroz que germinaron en BG-11 en condiciones estándar con las semillas que germinaron en BG-11 NaCl 100 mM, se observó que exponer las semillas de arroz a altas concentraciones de NaCl no permitió el desarrollo de hojas. Sin embargo, en condiciones de salinidad, la exposición de las semillas al tratamiento (células de la estirpe silvestre) permitió que se desarrollaran hojas por parte de las semillas.

4.6.2. Ensayos de germinación en otras condiciones de estrés

Además de evaluar la capacidad de los sobrenadantes y las células de *Anabaena* sp. PCC7120 de promover la germinación de semillas de arroz y protegerlas contra el estrés salino, se realizaron ensayos en presencia de otros estreses. Se testó un posible efecto protector de la cianobacteria y sus metabolitos frente al tratamiento con el herbicida (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), el pesticida lindano y la cianotoxina microcistina. Esto con base en experimentos propuestos por Morita *et al.*, 1999, Moore & Kroger 2010 y Saqrane *et al.*, 2008. Sin embargo, en el caso del 2-4D la concentración experimentada fue letal y para los otros experimentos no se encontraron diferencias significativas respecto al control, por lo que se propone realizar futuros estudios modificando las concentraciones usadas y exponiendo las semillas a otros estreses para evaluar la capacidad de la cianobacteria como promotora de germinación y crecimiento.

Discusión **5**

5. Discusión

El objetivo global de este trabajo fue ampliar el conocimiento sobre los factores que modulan la formación de *biofilms* en *Anabaena* sp. PCC7120 y su posible relación con la familia de reguladores transcripcionales FUR. También se evaluó la capacidad de los exopolisacáridos de *Anabaena* sp. PCC7120 de proteger las semillas de arroz contra condiciones de estrés similares a las presentadas en suelos intervenidos por la sobreexplotación agrícola durante la germinación.

Para ello se emplearon diferentes estrategias experimentales. En primer lugar, se caracterizó la influencia de factores ambientales como son la deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado en el medio y altas concentraciones de NaCl. Se llevó a cabo inicialmente una caracterización fenotípica parcial de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y de las estirpes de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC. Una vez definidos estos parámetros, se estudió el efecto de la desregulación de las proteínas FUR en la respuesta a la deficiencia de nitrógeno y a la salinidad (NaCl 300 mM), determinando cómo afectan estas condiciones de estrés a la síntesis de exopolisacáridos y la formación de *biofilm* en la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y en las diferentes estirpes de sobreexpresión.

Estos resultados se complementaron mediante un análisis bioinformático de las glicosiltransferasas presentes en el genoma de *Anabaena* sp. PCC7120. Aunque las glicosiltransferasas son enzimas clave en la producción de *biofilms* bacterianos, hasta el momento no se dispone de estudios sistemáticos de las mismas en cianobacterias. En este apartado se presenta una clasificación de las glicosiltransferasas de *Anabaena* sp. PCC7120 y su relación con otras rutas metabólicas de acuerdo a su disposición en superfamilias estructurales y en subfamilias, que posteriormente se organizaron mediante un análisis filogenético. Dicho análisis ha permitido clasificar y establecer las relaciones filogenéticas más próximas de un número de glicosil transferasas que hasta el momento no habían sido asignadas a ninguna familia estructural.

Por otra parte, se obtuvieron las secuencias de las regiones promotoras de las glicosiltransferasas presentes en *Anabaena* sp. PCC7120 y se analizó la presencia de posibles cajas FUR, como base para la identificación de

glicosiltransferasas potencialmente reguladas por FurA y FurC, que se corroboró mediante ensayos de retardo en gel (Electrophoretic Mobility Shift Assay: EMSA). Finalmente, se estudió el efecto de los exopolisacáridos presentes en el sobrenadante de *Anabaena* sp. PCC7120 sobre la germinación de *Oryza sativa* de la variedad Ariete y su efecto sobre la germinación, el crecimiento de la raíz pivotante, la longitud del tallo y el desarrollo de hojas, en condiciones estándar de crecimiento y en estrés salino.

Las diferentes estrategias empleadas proporcionaron una valiosa información acerca del papel de la familia de proteínas FUR en la regulación de genes implicados en la síntesis de exopolisacáridos y formación de *biofilms*, así como del potencial de *Anabaena* sp. PCC7120 como biofertilizante. Se presentan a continuación la discusión e implicaciones de los resultados obtenidos.

5.1. Influencia de diferentes factores ambientales en el fenotipo de *Anabaena* sp. PCC7120 y de las variantes de sobreexpresión de los parálogos FurA, FurB y FurC:

Para este trabajo se seleccionaron dos condiciones de estrés, la deficiencia de nitrógeno combinado y la presencia de NaCl 300 mM en el medio de cultivo por ser similares a las condiciones experimentadas por las plantas en suelos intervenidos por la sobreexplotación agrícola (Singh *et al.* 1970; Perez., 2014). Ambas condiciones produjeron cambios importantes en el fenotipo tanto de las células de *Anabaena* sp. PCC7120 como de las cepas de sobreexpresión de las diferentes proteínas FUR. La presencia de heterocistos fue indicativa de la deficiencia de nitrógeno y el tratamiento de los cultivos con NaCl 300 mM produjo alteraciones en la morfología y ultraestructura de las células que se evidenció como un cambio en la turgencia afectando a la membrana celular, al espacio periplasmático y al citoplasma, produciendo células con formas irregulares. Las condiciones de estrés evaluadas también produjeron cambios en el crecimiento, la agregación, la pigmentación, la producción de pigmentos fotosintéticos y de proteínas totales, así como de las actividades fotosintética y respiratoria. Así mismo, estos estreses afectaron a la cantidad de exopolisacáridos y a los niveles de formación de *biofilms*, tal y como se discutirá en los siguientes apartados.

5.1.1. Influencia de la deficiencia de nitrógeno y la alta salinidad sobre el crecimiento y la morfología de *Anabaena* sp. PCC7119.

La deficiencia de nitrógeno produce cambios drásticos en el metabolismo de las cianobacterias que se traducen en la ralentización del crecimiento, el desmantelamiento del ficobilisoma, que es concomitante con un descenso de la fotosíntesis y síntomas de clorosis (Wood & Haselkorn, 1980., Adir *et al*, 2006., Tamary *et al*, 2012., Sendersky *et al*, 2015, Krauspe *et al*, 2021). Además, en el caso de la mayoría de las cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno, como *Anabaena* sp. PCC7120, se produce una reorganización del genoma que conduce a la diferenciación y desarrollo de los heterocistos claramente diferenciables de las células vegetativas y de los acinetos (Adams, 2000., Gerdtzen *et al*, 2009., Kumar *et al*, 2010., Herrero *et al*, 2016). Por lo tanto, tal y como es habitual, la deficiencia de nitrógeno se siguió mediante la aparición de heterocistos visualizados con un microscopio óptico convencional.

En cuanto a la salinidad, ésta produce señales de alerta que también inducen cambios transcripcionales y metabólicos que son esenciales para la defensa de la célula, como la modificación de la composición de la membrana y la inducción de procesos de transporte relacionados con la homeóstasis intracelular (Mauch-Mani *et al*, 2017). Hay dos respuestas celulares fundamentales contra el estrés salino, una de ellas es la acumulación de iones K^+ y la consecuente expulsión de iones Na^+ . Alternativamente, otra estrategia consiste en acumular solutos compatibles como betaina glicina, glucosil glicerol y carbohidratos de bajo peso molecular como trehalosa y sacarosa, todas estas moléculas son altamente solubles, sin carga y con baja masa molecular, que no tienen efecto adverso en la maquinaria enzimática de la célula y que además exhiben protección de la actividad nitrogenasa (Singh *et al*, 2013, Pade & Hagemann 2014).

Como resultado de la deficiencia de nitrógeno y la alta salinidad, en este trabajo se aprecia una reducción en el crecimiento de todas las estirpes estudiadas, tanto de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 como de las cepas de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC. Sin embargo, el efecto en la

reducción del crecimiento celular para las cuatro estirpes fue mayor en presencia del estrés salino que en deficiencia de nitrógeno. En el caso de *Anabaena* sp. PCC 7120, su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico le permite adaptarse a esta condición adversa. Nuestro trabajo demuestra que tanto en condiciones estándar (BG11), como en deficiencia de nitrógeno combinado, la estirpe que presentó mayor tasa de crecimiento fue EB2770FurC, seguida de AG2770FurA, VCS2770FurB, y la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 (Figuras 24, 25 y 26 y Tabla 10). Sin embargo, la deficiencia de nitrógeno afectó a la tasa de crecimiento de todas las cepas evaluadas, y la susceptibilidad a la deficiencia de nitrógeno fue diferente, siendo la estirpe de sobreexpresión de FurC la más susceptible a la deficiencia con una disminución en el crecimiento de un 80% a las 24 horas y del 70% tras 48 horas, seguido de la estirpe de sobreexpresión de FurA (disminución del 70% tanto a las 24 como a las 48 horas), y la estirpe de sobreexpresión de FurB (disminución del 50% a las 24 y a las 48 horas). La estirpe silvestre fue la menos susceptible al estrés provocado por la deficiencia de nitrógeno, con una disminución de apenas un 40%. Trabajo previo de nuestro grupo mostró que tanto FurA como FurC están relacionadas con la regulación de la diferenciación y el desarrollo del heterocisto y la fijación de nitrógeno (González *et al.*, 2013 y Sarasa-Buisán, Tesis doctoral).

FurA modula la expresión de NtcA, conectando de esta manera la homeostasis del hierro y con la regulación del metabolismo nitrogenado en cianobacterias (Gonzalez *et al.*, 2013). La sobreexpresión del metalorregulador FurA bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado en el medio de cultivo bloquea de manera parcial el proceso de diferenciación a heterocistos en estadios tempranos del desarrollo (González *et al.*, 2016). FurA reconoce y se une específicamente al promotor de NtcA, por lo tanto, la sobreexpresión del metalorregulador afecta el incremento transitorio de NtcA que tiene lugar en las primeras horas del desarrollo y que resulta esencial para la expresión de una variedad de genes implicados en la cascada regulatoria que define este proceso de diferenciación. Como se ha mencionado, la variante de sobreexpresión de FurC es la cepa más afectada por la deficiencia de nitrógeno. Trabajo realizado en nuestro grupo (Sarasa-Buisán *et al.* enviada para publicar) indica que esta estirpe tiene afectada su capacidad para diferenciar heterocistos, lo que

explicaría su mayor susceptibilidad a la deficiencia de nitrógeno combinado. Aunque la cepa que sobreexpresa FurA también presenta una ralentización en la diferenciación de estas células especializadas, el efecto de la desregulación de FurA es mucho menor que el observado en la variante de sobreexpresión de FurC. Por otra parte, esta cepa está sometida a un mayor estrés oxidativo que la cepa silvestre y que las otras cepas de sobreexpresión de FurA y FurB (Sevilla *et al.* 2019., González *et al.*, 2010., Sein-Echaluce, 2015). Recientemente se ha demostrado que el estrés oxidativo interfiere con el sistema de señalización de la cianobacteria, afectando a la detección de la señalización de la ratio C:N, lo que podría causar esta mayor sensibilidad de la estirpe EB2770FurC (Robles-Rengel *et al.* 2019). Por otra parte, se ha descrito que los tres parálogos FUR están relacionados directa o indirectamente con la regulación de las superóxido dismutasas presentes en la cianobacteria (González *et al.*, 2010; Sein-Echaluce *et al.*, 2015 y trabajo del grupo pendiente de publicación). En *Anabaena* sp. PCC 7120 se han identificado dos superóxido dismutasas, una de ellas dependiente de manganeso (*sodA*) y otra dependiente de hierro (*sodB*). (Li *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2007). La Mn-SOD, cuya regulación se ve afectada en las cepas de sobreexpresión de FUR, podría ejercer un papel importante en condiciones de deficiencia de nitrógeno, pues está implicada en el mantenimiento de la actividad nitrogenasa (Zhao *et al.*, 2007, Calvo *et al.*, 2016).

Respecto al estrés salino, como ya se ha mencionado, éste afectó a la tasa de crecimiento de todas las cepas evaluadas, las estirpes de sobreexpresión de FurC y FurA presentaron una susceptibilidad similar a la mostrada en deficiencia de nitrógeno, con una disminución en el crecimiento del 80% a las 24 horas y del 70% a las 48 horas, seguido de la estirpe de sobreexpresión de FurB (disminución en torno al 60% durante todo el experimento). La estirpe silvestre fue la menos susceptible al estrés provocado por la deficiencia por el NaCl, con una pérdida en el crecimiento de apenas el 50% durante todo el experimento. En microorganismos como *Anabaena* spp, la salinidad induce estrés osmótico en las células al disminuir su potencial hídrico, causando la consecuente acumulación de iones intracelulares, afectando de esta manera la homeostasis iónica y alterando la permeabilidad de la membrana, ocasionando deficiencia de nutrientes (Swapnil *et al.*, 2015). El estrés hídrico se

hace patente en nuestros resultados. El tratamiento de los cultivos con NaCl 300 mM produjo alteraciones visibles en la morfología y ultraestructura de las células. El efecto de altas concentraciones de sal en las células de *Anabaena* sp. PCC7120 se evidenció como un cambio gradual en la turgencia. Usando el microscopio electrónico de barrido se detectaron además cristales de NaCl formándose en la superficie de las células y se observó cómo se afectaron la membrana celular, el espacio periplasmático y el citoplasma, produciendo células con formas irregulares.

Trabajos similares llevados a cabo en *Anabaena fertilissima* expuesta a diferentes concentraciones de NaCl (250 mM–500 mM) para evaluar su respuesta fisiológica, han demostrado que 500 mM es una concentración letal (Swapnil & Rai 2018). Por otra parte, el exceso de sal genera especies reactivas de oxígeno (ROS), produciendo como consecuencia daño oxidativo a la célula, conduciéndola a procesos de apoptosis (Swapnil *et al.*, 2017). El hecho de que la estirpe de sobreexpresión de FurB, que muestra mas tolerancia al estrés oxidativo que las cepas que sobreexpresan FurA o FurC, sea la que menos afectada se vea en presencia de sal estaría en concordancia con esta observación. Además, en cianobacterias fijadoras de nitrógeno, el estrés producido por altos niveles de salinidad afecta también la actividad de la enzima nitrogenasa (Moisander *et al.* 2001).

Por otra parte, se ha reportado que concentraciones de 200 mM de NaCl incrementan los niveles de cAMP en cultivos de *Anabaena* sp. PCC7120. Ese metabolito podría estar actuando en una cascada de señalización con la consecuente expresión de algunos genes responsables de la diferenciación a heterocistos (Imashimizu *et al.* 2005). Uno de los procesos más eficientes en términos de gasto energético para adaptarse a la sal es el transporte de Na⁺. La presencia de altas concentraciones de NaCl en el medio reduce el tamaño de las células debido a la pérdida de agua, esta pérdida de tamaño se revierte por el rápido influjo de sales desde el exterior como Na⁺ y Cl⁻ que permiten la recuperación de agua al interior celular. En cianobacterias de agua dulce como *Synechocystis* sp. PCC6803 se ha descrito la acumulación de azúcares como trehalosa y sacarosa y otras moléculas como glucosilglicerol y glicinia betaína actuando como solutos compatibles para resistir condiciones similares a las

presentadas en ambientes marinos (600 mM NaCl). Estas moléculas parecen estar involucradas también en la resistencia a estrés por deshidratación (Potts 1999, Singh *et al.*, 2013). Una variedad de oligosacáridos y aminoácidos como la prolina desempeñan el papel de solutos compatibles en *Anabaena* spp. y otras cianobacterias del orden Nostocales (Fischer *et al.*, 2006, Singh *et al.*, 2013). Otra estrategia utilizada por las cianobacterias para resistir las condiciones adversas que representa un entorno salino es la síntesis de exopolisacáridos y la formación de *biofilms*.

La participación de Fur en la respuesta a altas concentraciones de sal se ha estudiado en otros microorganismos: *Desulfovibrio vulgaris* (Bender *et al.*, 2007, He *et al.*, 2010, Mukhopadhyay *et al.*, 2006), *Chromohalobacter salexigens* (Argandona *et al.*, 2010), *Bacillus subtilis* (Hahne *et al.*, 2010, Hoffmann *et al.*, 2002, Steil *et al.*, 2003) y *B. cereus* (den Besten *et al.*, 2009) *Helicobacter pylori* (Gancz & Merrell 2011). Muchos de los genes que muestran cambios marcados en la transcripción después de la exposición a la sal pertenecen al regulón de Fur. En *B. subtilis* se identificaron cuatro proteínas inducidas por alta salinidad (DhbA, DhbB, DhbC y DhbE) enzimas que participan en la síntesis de 2,3-dihidroxibenzoato (DHB). Estas proteínas están codificadas por el operón *dhbACEBF*, que está reprimido por la proteína Fur y la activación de este gen depende de la limitación del hierro (Hoffmann *et al.*, 2002). En *Jeotgalibacillus malaysiensis*, la exposición a altas concentraciones de sal da como resultado un aumento en la expresión del factor de transcripción de la familia Fur aumentando también la expresión de todas las proteínas de sideróforos iónicos y las permeasas transportadora de tipo ABC de hierro. Asimismo, la expresión de los genes *znuABC*, que codifican un transportador de Zn, se incrementa en respuesta al estrés de NaCl, esto sugiere que los iones inorgánicos, en particular el hierro, juegan un papel en la adaptación osmótica en situaciones de estrés salino en *J. malaysiensis*. (Gancz & Merrell 2021; Yaakop *et al.* 2016). Por lo tanto, además de actuar como un regulador transcripcional global que responde a una variedad de señales ambientales (Bijlsma *et al.* 2002; Carpenter *et al.* 2010), hay un vínculo entre la respuesta a estrés salino y la homeostasis del hierro que corresponde a diferentes taxones bacterianos (Gancz & Merrell 2011). Estas observaciones están en concordancia con nuestros resultados que

demuestran que la desregulación de FurA (ortólogo de Fur de heterótrofos) afecta notablemente a la tolerancia de la cianobacteria al estrés salino. Por otra parte, la vinculación existente entre el metabolismo del hierro y la generación de especies reactivas de oxígeno, de cuya homeostasis se encargan mayoritariamente FurA y FurC también justificaría la mayor sensibilidad al NaCl de las variantes que sobreexpresan estos reguladores con respecto a la observada en la estirpe silvestre.

5.1.2. Efecto de la deficiencia de nitrógeno y la alta salinidad sobre la agregación y el contenido en pigmentos fotosintéticos y proteína total.

La deficiencia de nitrógeno produce la proteólisis y degradación de ficobiliproteínas y de la cianoficina en los heterocistos para obtener el nitrógeno necesario para la síntesis de nuevas proteínas (Wood & Haselkorn, 1980). El efecto de los estreses en las cepas de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC tanto en cultivos líquidos en tubos cónicos o Erlenmeyer, como en cultivos crecidos en placas de microtitulación de 12 pocillos pudo apreciarse como un cambio en la pigmentación y en el grado de agregación de las células. Es de destacar que el NaCl indujo una mayor clorosis que la deficiencia de nitrógeno.

Tras el crecimiento en condiciones estándar se pudo apreciar una diferencia en la pigmentación de la estirpe silvestre con respecto a las tres variantes, presentando una mayor Abs 750 nm las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA y EB2770FurC, seguidas por la estirpe silvestre. La estirpe de sobreexpresión VCS2770FurB presentó una coloración más tenue, indicativa de una menor concentración de ficobiliproteínas, en concordancia con los estudios previos del grupo (González *et al*, 2010., Gonzalez *et al*, 2013., Sein-Echaluce *et al*, 2014., González *et al*, 2016., Sevilla *et al*, 2019). Este comportamiento fué similar en deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado. Sin embargo, este estrés disminuyó la intensidad en la pigmentación de las cuatro estirpes, siendo la estirpe de sobreexpresión AG2770FurA la que mostró un aspecto y coloración similares a los que se observan en condiciones estándar de crecimiento. Con estos datos se podría deducir que la estirpe de sobreexpresión de FurA podría estar mejor adaptada a la deficiencia de nitrógeno. Sin embargo, estudios previos

(González *et al.*, 2013) demuestran que la desregulación de FurA inhibe parcialmente los procesos de diferenciación y desarrollo del heterocisto a través de la modulación de *ntcA* y otros actores clave en este proceso. Es posible que en los primeros estadios de deficiencia de nitrógeno, aunque el proceso de diferenciación del heterocisto esté ralentizado, la cantidad de pigmentos fotosintéticos y de proteína total de la cianobacteria no se vea todavía afectado por la desregulación de FurA y sean necesarios tiempos más largos de estrés para apreciar el desmantelamiento del ficobilisoma y la subsecuente degradación de clorofila y ficobiliproteínas, que son las proteínas mayoritarias en la cianobacteria.

El estrés salino induce cambios en la biosíntesis de pigmentos fotosintéticos (Jeanjean & Matthijs., 1993, Hasegawa *et al.*, 2000, Allakhverdiev *et al.* 2008, Rai *et al.*, 2014, Swapnil *et al.*, 2017). En nuestro caso, la salinidad produjo una evidente clorosis en todas las estirpes evaluadas. Un comportamiento similar pudo apreciarse en los pocillos de las placas de microtitulación. Se ha observado que el nivel de expresión de cada uno de los parálogos FUR tiene una clara influencia en procesos relacionados con la producción de pigmentos fotosintéticos y el metabolismo de la cianobacteria en general, tal y como se discutirá en los siguientes apartados.

Otros datos de caracterización de las estirpes como los pigmentos implicados en el proceso fotosintético: clorofila, carotenoides, ficobiliproteínas y proteínas totales fueron tomados al final del experimento. En este caso, la cantidad de pigmentos fotosintéticos y proteínas totales solubles fue mayor para la estirpe AG2770FurA, seguida de VCS2770FurB, de la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC7120. La estirpe EB2770FurC fue la que presentó menor cantidad de pigmentos fotosintéticos y proteínas totales solubles.

El efecto de la deficiencia de nitrógeno sobre la abundancia de moléculas de pigmento en varias cianobacterias ha sido bien documentado en *Anacystis nidulans* (Allen & Smith.1969), *Synechococcus* sp. (Yamanaka *et al.*, 1980), *Anabaena* sp. (Wood & Haselkorn. 1980), *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Stevens *et al.*, 1981) y *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Elmorjani *et al.*, 1987). Los ficobilisomas (PBS) son los principales complejos captadores de luz del aparato

fotosintético de las cianobacterias (MacColl R. 1998). Estos pigmentos se asocian con las membranas tilacoides y recolectan luz principalmente mediante el fotosistema II. Los PBS consisten de conjuntos ordenados de ficobiliproteínas pigmentadas (PBP) y otras proteínas de enlace. Las cianobacterias se adaptan a las condiciones ambientales cambiantes modulando la cantidad de PBS, en respuesta al agotamiento de nutrientes (Kiyota *et al.*, 2014, Nagarajan 2019).

En condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado (Baier *et al.*, 2004), azufre, fósforo (Richaud *et al.*, 2001) y hierro (Schwarz & Forchhammer. 2005), los ficobilisomas se degradan. El PBS se degrada de manera progresiva, rápida y casi por completo; el contenido de clorofila también disminuye, esto conduce a un cambio dramático en el color celular del normal azul verdoso a un amarillo verdoso, que se conoce como clorosis. (Richaud *et al.*, 2001). Una disminución en la fotosíntesis y la pérdida de pigmentos son cruciales para la supervivencia celular en situación de deficiencia de nitrógeno, azufre o fósforo (Sauer *et al.*, 2001). La degradación de los ficobilisomas proporciona aminoácidos que son esenciales para el mantenimiento de las actividades metabólicas centrales (Adir *et al.*, 2006).

Una de las características del heterocisto es una autofluorescencia significativamente menor en comparación con las células vegetativas que poseen pigmentos fotosintéticos (Bradley & Carr 1976). Las ficobiliproteínas continúan degradándose por una proteasa específica para este fin, hasta que se forman heterocistos y se establece la fijación de nitrógeno (Magnuson & Cardona 2016). Un polipéptido de 59 aminoácidos denominado NblA que se induce tras la deficiencia de nitrógeno, es esencial en el proceso de degradación de los ficobilisomas (Collier *et al.* 1994; Kiyota *et al.* 2014; Nguyen *et al.* 2017). NblA está regulado diferencialmente por la disponibilidad de hierro en *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Singh *et al.*, 2000) y se ha determinado que FurA se une específicamente a la región promotora de la proteína NblA (Asr4517). (Bienert *et al.*, 2006, Gonzalez *et al.* 2016).

5.1.4. Actividades fotosintética y respiratoria

A medida que el metabolismo celular se ralentiza durante el agotamiento de los nutrientes, la cantidad de energía luminosa recolectada debe disminuir para

evitar que se creen especies reactivas de oxígeno. En consecuencia, la degradación del PBS desempeña una función importante en la fotoprotección, el mantenimiento, el crecimiento y el desarrollo celular (Nagarajan 2019). Muchas de las proteínas que componen la maquinaria fotosintética contienen hierro, el hierro también participa en la síntesis de clorofila. El nivel de clorofila se ve afectado por la disponibilidad de hierro por lo que muy posiblemente FurA tiene una importante participación la regulación de este proceso.

Nuestros resultados mostraron que, en condiciones estándar de crecimiento, y en concordancia con estudios previos (González *et al*, 2010., Sein-Echaluce *et al*, 2015., y Sevilla *et al*, 2019), el desprendimiento de oxígeno durante la fotosíntesis fue mayor para la estirpe silvestre ($10,4 \text{ mol O}_2 \text{ s}^{-1} \times 10^6$ células), seguida de la estirpe de sobreexpresión de FurB ($5,9 \text{ mol O}_2 \text{ s}^{-1} \times 10^6$ células) y de la estirpe de sobreexpresión de FurA ($3,8 \text{ mol O}_2 \text{ s}^{-1} \times 10^6$ células). La cepa que presentó menor desprendimiento de oxígeno fué la estirpe de sobreexpresión de FurC ($0,6 \text{ mol O}_2 \text{ s}^{-1} \times 10^6$ células). La condición de deficiencia de nitrógeno incrementó el desprendimiento de oxígeno por parte de las cuatro estirpes, siendo de 2 a 14 veces mayor que en condiciones estándar y con diferencias significativas en todos los casos (*Anabaena* sp. PCC7120= $2,2 \text{ mol O}_2 \text{ s}^{-1} \times 10^6$ células., AG2770FurA= $5,1 \text{ mol O}_2 \text{ s}^{-1} \times 10^6$ células., VCS2770FurB= $1,7 \text{ mol O}_2 \text{ s}^{-1} \times 10^6$ células., EB2770FurC= $14 \text{ mol O}_2 \text{ s}^{-1} \times 10^6$ células). El estrés salino por su parte disminuyó el desprendimiento de oxígeno durante la actividad fotosintética de todas las estirpes respecto a las condiciones estándar. En cuanto a la respiración, en condiciones estándar la estirpe VCS2770FurB mostró un consumo de oxígeno similar al de la cepa silvestre, mientras que éste disminuyó en las variantes AG2770FurA y EB2770FurC.

Las condiciones de estrés incrementaron la respiración en las cuatro cepas, especialmente la deficiencia de nitrógeno, que presentó diferencias significativas para todas las estirpes, siendo de 3 a 6 veces mayor que en condiciones estándar de crecimiento (*Anabaena* sp. PCC7120= $3,4 \text{ mol O}_2 \text{ s}^{-1} \times 10^6$ células, AG2770FurA= $6,1 \text{ mol O}_2 \text{ s}^{-1} \times 10^6$ células., VCS2770FurB= $4 \text{ mol O}_2 \text{ s}^{-1} \times 10^6$ células., EB2770FurC= $3,3 \text{ mol O}_2 \text{ s}^{-1} \times 10^6$ células). El estrés salino por su parte aumentó la respiración de todas las estirpes respecto a las condiciones estándar.

El aumento de la actividad respiratoria en condiciones de deficiencia de nitrógeno podría deberse a la necesidad de la cianobacteria de disminuir la presión de oxígeno intracelular como paso previo a la diferenciación de los heterocistos, cuyo entorno es microaeróbico. La disponibilidad de nitrógeno modula la expresión de FurA y NtcA (López-Gomollón *et al.* 2007; Botello *et al.*, 2013). *et al.* Ambos factores de transcripción, junto con FurC comparten un importante número de dianas principalmente relacionadas con la fotosíntesis y la respiración, captación e incorporación de hierro, respuesta al estrés oxidativo y metabolismo del nitrógeno (López Gomollon *et al.*, 2007; Sevilla *et al.*, 2019).

Estudios previos demuestran que la alta concentración de sal en el citoplasma inhibe el metabolismo celular, disminuyendo así la fotosíntesis, la transcripción y la traducción (Marin *et al.*, 2004). El exceso de sal afecta al crecimiento, así como a las cadenas transportadoras de electrones implicadas en fotosíntesis y respiración (Swapnil & Rai 2018). Los resultados obtenidos en este trabajo utilizando NaCl 300 mM muestran que en el caso de *Anabaena* sp. PCC7120 la actividad respiratoria no se ve afectada en dichas condiciones, a pesar de los cambios claramente observados en la turgencia y en la pigmentación de la célula.

Las alteraciones inducidas por la salinidad en cianobacterias, conducen a una serie de desórdenes metabólicos tales como cambios en la actividad de los fotosistemas I y II, en la fotosíntesis neta y la respiración (Jeanjean & Matthijs., 1993, Hasegawa *et al.*, 2000, Allakhverdiev *et al.* 2008, Rai *et al.*, 2014, Swapnil *et al.*, 2017). La salinidad inhibe la fotosíntesis bruta y la cadena transportadora de electrones e incrementa la tasa respiratoria. Para otras especies del género *Anabaena*, en estrés salino las células presentan una mayor tasa respiratoria para cumplir con la alta demanda energética requerida para restringir el influjo de iones Na⁺ y para permitir su eflujo. La baja tasa de crecimiento en presencia de altas concentraciones de NaCl, puede ser consecuencia del incremento en la respiración debido a la disponibilidad limitada de energía para otros procesos fisiológicos esenciales (Jeanjean *et al.* 1993; Moisander *et al.* 2002; Allakhverdiev *et al.* 2005; Rai *et al.* 2014; Swapnil & Rai 2018). El NaCl disminuye el contenido de clorofila, y reduce la actividad del fotosistema II. Sin embargo, el estrés salino incrementa la actividad del fotosistema I (Swapnil *et al.*, 2017).

Además, el estrés producido por altas concentraciones de sal disminuye la expresión de muchos genes implicados en la biosíntesis de proteínas y el metabolismo energético. Solo algunos genes muestran un incremento, por ejemplo, genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos y proteínas relacionadas con la adquisición de CO₂ (Swapnil *et al.*, 2017).

Los estudios de nuestro grupo llevados a cabo con estirpes de sobreexpresión de FurC de *Anabaena* (EB2770FurC) demostraron que en esta cianobacteria hay una conexión mediada por *furC* entre la respuesta a estrés oxidativo y el metabolismo fotosintético. La sobreexpresión de *furC* disminuye la tasa de fotosíntesis y aumenta la actividad respiratoria de la célula. Así mismo, la estirpe de sobreexpresión presenta alteraciones en la composición y eficiencia de los dos fotosistemas. Además de ser un regulador de la respuesta a peróxido, FurC controla de forma directa genes como *ftsH* (proteasa de la membrana del tilacoide) que está relacionada con el metabolismo del PSII. Hay diferentes genes controlados directamente por FurC que no se habían descrito previamente como dianas de PerR, como el gen *ftsZ* relacionado con la división celular y la proteasa de membrana tilacoidal FtsH. La elevada transcripción de *ftsH* en la estirpe de sobreexpresión de FurC está relacionada con la reducción en los niveles de transcripción de la proteína D1 que tiene un papel importante en la reparación del fotosistema II. Estos resultados muestran la conexión entre FurC, la división celular y la fotosíntesis en cianobacterias filamentosas (Sevilla *et al.*, 2019).

Dado el papel central que juegan las proteínas FUR en la regulación de la homeostasis de metales y el estatus redox de la célula, es lógico que su desregulación afecte a procesos como la fotosíntesis. FurA y FurC controlan genes cruciales en la fotosíntesis y la respuesta a estrés oxidativo, como *isiA*, *isiB* (flavodoxina) y varias tiorredoxina-reductasas y peroxiredoxinas (Kunert *et al.* 2003; González *et al.*, 2014, González *et al.*, 2016 y Sevilla *et al.*, 2019). Por su parte, FurB modula la homeostasis de zinc (Napolitano *et al.*, 2012), muy importante para mantener la estabilidad del PSII, así como diversos genes implicados en la respuesta a estrés oxidativo (Sein-Echaluce *et al.*, 2015). Por lo tanto, la correcta regulación de estas proteínas es extraordinariamente importante para la supervivencia de la cianobacteria en condiciones adversas.

5.2. Síntesis de exopolisacáridos

5.2.1 Consecuencias del déficit de nitrógeno y el estrés salino en la síntesis de EPSs en *Anabaena* sp. PCC7120.

Tanto la deficiencia de nitrógeno como el estrés salino produjeron cambios importantes en la cantidad de exopolisacáridos y en los niveles de formación de *biofilms* producidos por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120. Respecto a las condiciones estándar de crecimiento, la deficiencia de nitrógeno combinado incrementó la producción de exopolisacáridos en 3 y 4 veces pasadas 24 y 48 horas de experimento respectivamente. Este incremento en la producción de exopolisacárido en condiciones de estrés es aún mayor en presencia de 300 mM de NaCl en el medio de cultivo, presentándose incrementos de hasta 7 y 9 veces en 24 y 48 horas. En cuanto a la formación de *biofilm*, se observó que a partir de los primeros 5 días de déficit de nitrógeno combinado se presentó un incremento significativo, aumentando 1,45 veces tras 10 días de deficiencia y manteniéndose a los 15 días para reducirse ligeramente tras 20 días de deficiencia de nitrógeno. El tratamiento con NaCl 300 mM presentó un resultado opuesto, produciendo una disminución en la formación del *biofilm* en torno al 50% a los 5 días del tratamiento, y que se mantuvo en el tiempo.

Estos resultados nos permiten inferir que la sal induce una mayor producción de exopolisacáridos en *Anabaena* sp. PCC7120, lo que podría significar que la sal es una condición de estrés más agresiva que la deficiencia de nitrógeno, probablemente debido a la acumulación de ROS (Swapnil *et al.*, 2017) y a la consecuente activación de procesos apoptóticos en las células enfrentadas a 300 mM de NaCl. *Anabaena* sp. PCC7120 recurre a la diferenciación a heterocistos para adaptarse a la deficiencia de nitrógeno y paliar la carencia de este nutriente. Además de incrementarse la cantidad de exopolisacáridos excretados, la diferenciación del heterocisto va asociada a la producción de tres paredes celulares adicionales, incluyendo una de glucolípido que forma una barrera hidrofóbica para el oxígeno (Herrero *et al.*, 2016). Por otra parte nuestros resultados también sugieren que el aumento del nivel de polisacáridos excretados al medio ayuda a la célula a disminuir las consecuencias de las altas concentraciones de NaCl. Así, la mayor producción

de exopolisacárido en condiciones de estrés indica que los EPSs son una herramienta eficaz de adaptación para incrementar la capacidad de colonización de las cianobacterias en entornos hostiles. Por otra parte, hay que tener en cuenta que la cuantificación del EPSs es exclusivamente el excretado al medio de cultivo, es decir que los EPS capsulares no están incluidos en estas determinaciones. En general, cualquier condición ambiental adversa que represente estrés para la célula activa los mecanismos de síntesis y de movimiento al exterior celular de exopolisacáridos, pues los EPSs representan una barrera física que protege a las células (Rossi & De Philippis, 2016). Otros factores que inducen la producción de exopolisacáridos en cianobacterias son el pH variable (se han evaluado rangos de 5 a 10, siendo 8,5 el pH óptimo para la producción de EPSs de *Anabaena* sp. BTA992), la tasa de dilución, la fase de crecimiento, la presencia o ausencia de magnesio, calcio, potasio y metales pesados, entre otros (Di Pippo *et al*, 2013., Rossi & De Philippis, 2015., Romi *et al*. 2015).

En la naturaleza, las cianobacterias contribuyen principalmente a la síntesis de estos EPSs que forman parte de *biofilms* mixtos, lo que permite a estos microorganismos ser los primeros colonizadores de ambientes intervenidos, como suelos desérticos y sustratos en estado de descomposición o contaminados con agroquímicos, lo que resulta de gran interés en el estudio de la recuperación de suelos erosionados por procesos agrícolas (Nisha *et al.*, 2007, Li *et al*, 2013).

5.2.2. Efecto de la desregulación de FurA, FurB y FurC en la síntesis de exopolisacáridos.

En condiciones estándar de crecimiento la mayor la producción de exopolisacáridos se observó en la estirpe de sobreexpresión de FurC (EB2770FurC), con un incremento de 2,4 veces a las 24 horas y de 3,7 veces a las 48 horas del experimento, con respecto a la producción en la cepa silvestre. La variante AG2770FurA también mostró una mayor producción de exopolisacáridos que *Anabaena* sp. PCC7120, en torno a 1,2 veces y a 3,1 veces a las 24 y 48 horas respectivamente. Sin embargo, la cepa de sobreexpresión de FurB (VCS2770FurB) presentó una menor producción de exopolisacáridos,

en torno al 70% de la cantidad registrada en el sobrenadante de los cultivos de *Anabaena* sp. PCC7120, tanto a las 24 como a las 48 horas del experimento.

La disponibilidad de nitrógeno, fosfato, sulfato y carbono pueden influir en la producción de EPSs. Particularmente, la relación C/N es un parámetro importante (Otero & Vincenzini *et al.* 2004). Una mayor cantidad de carbono en comparación con los niveles de nitrógeno impulsa la producción de EPSs para almacenar el exceso de carbono. No obstante, una disminución en el carbono disponible también puede conducir a la síntesis de EPSs debido al mecanismo de concentración de carbono (CCM), que puede permitir la acumulación de carbono del medio ambiente, como se observa en la microalga *Chlorella* (Izumo *et al.*, 2007). La privación de nutrientes como fósforo y nitrógeno aumenta la síntesis de EPSs hasta en 63% del peso seco de las células según lo reportado en *Spirulina platensis* y *S. máxima* (Sohm *et al.*, 2011, Austin *et al.*, 2004, Moreno *et al.*, 1998; Rossi & De Philippis. 2015). Nuestro trabajo previo demuestra que existe una estrecha relación entre la actividad reguladora de FurA y FurC en rutas metabólicas implicadas en el metabolismo central y en el metabolismo nitrogenado (López-Gomollón *et al.*, 2006., Gonzalez *et al.*, 2013 y González *et al.*, 2014). Sin embargo, las dianas descritas para FurB están más relacionadas con el transporte de zinc y la neutralización de los radicales libres (Napolitano *et al.*, 2012 y Sein-Echaluce *et al.*, 2015). Estos datos están en concordancia con lo observado en este trabajo, y justifican el menor efecto de la desregulación de FurB en la excreción de EPSs en cultivos en condiciones estándar con respecto a las variantes que sobreexpresan los otros parálogos.

5.2.3. Efecto de la desregulación de FurA, FurB y FurC en la síntesis de exopolisacáridos en cultivos en deficiencia de nitrógeno.

Tras retirar el nitrógeno combinado del medio se apreció un notable incremento en la producción de exopolisacáridos por parte de todas las estirpes estudiadas, tanto del tipo silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 como de las cepas de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC. De las tres variantes que presentan desregulado algún parálogo FUR, las estirpes que produjeron una cantidad mayor de exopolisacáridos fueron las cepas de sobreexpresión de AG2770FurA y EB2770FurC. La producción de exopolisacáridos se vió más afectada por la

deficiencia de nitrógeno en la variante VCS2770FurB, cuyo aumento fue de 5 veces con respecto al registrado en condiciones estándar de crecimiento, frente a los cuantificados en las cepas AG2770FurA y EB2770FurC (4.7 y 4,3 veces), respectivamente.

Como ya se ha mencionado, además de intervenir en el proceso de captación y almacenamiento de hierro, FurA participa en la regulación de diferentes rutas metabólicas, relacionadas con la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis entre otras (González *et al.*, 2010., Gonzalez *et al.*, 2013, González *et al.*, 2016). Por otro lado, en *Anabaena* sp. PCC7120 FurB es un factor clave en la respuesta a estrés oxidativo, aumentando la resistencia de la cepa a peróxido de hidrógeno cuando FurB se encuentra sobreexpresada (Sein-Echaluze *et al.*, 2015). La estirpe de sobreexpresión de FurB, en principio, al no tener afectada la regulación de genes implicados en la fijación de nitrógeno, sufriría un estrés menor que las otras variantes en las mismas condiciones. Por otra parte, esta cepa estaría más capacitada para neutralizar los posibles radicales libres generados por condiciones de estrés como la deficiencia de nitrógeno o NaCl 300 mM, lo que explicaría además la menor cantidad de EPSs sintetizados por la variante VCS2770FurB.

5.2.2. Efecto de la desregulación de FurA, FurB y FurC en la síntesis de exopolisacáridos en exposición a altas concentraciones de sal.

Con respecto al efecto del estrés producido por la presencia de altas concentraciones de sal en el medio (300 mM de NaCl), se apreció un notable incremento en la producción de exopolisacáridos por parte de todas las estirpes estudiadas, tanto del tipo silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 como de las cepas de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC. Cabe destacar que la cantidad relativa de exopolisacáridos producidos en condiciones de estrés salino cuando se comparan las distintas cepas entre sí fue similar a la presentada en condiciones estándar de crecimiento, siendo mayor la producción en EB2770FurC, seguido de AG2770FurA y la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120. La estirpe que presentó la menor producción de exopolisacáridos es VCS2770FurB. Si se asume que la síntesis de EPSs ocurre, entre otros factores, como una respuesta al estrés salino, nuestros resultados sugieren que el tratamiento con alta

salinidad causaría un menor estrés en la variante que sobreexpresa FurB que en las cepas que presentan desregulación de FurA y FurB. La salinidad induce la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). La cianobacteria recurre entonces a estrategias defensivas como un incremento en la expresión de superóxido dismutasas, catalasas y otras proteínas de su batería antioxidante (Srivastava *et al.* 2005). Es de destacar que en la variante que sobreexpresa FurB, los niveles de transcripción de superóxido-dismutasa de hierro *sodB*, así como de las peroxiredoxinas Gct1 y Gct3 y la proteína All4145 (probable DNA-binding stress protein) son significativamente mayores que en la estirpe silvestre (Sein-Echaluze, 2015), lo que está en buena concordancia con los resultados observados en este trabajo.

Por otra parte, cabe destacar que el incremento en la producción de exopolisacárido debido a la presencia de sal para la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y para las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC, fue aproximadamente el doble que el registrado en condiciones de deficiencia de nitrógeno, lo que sugiere que en estas condiciones la cianobacteria está experimentando un mayor estrés que el que tiene en condiciones de déficit de nitrógeno, y que es solventado gracias a su capacidad de fijación de este nutriente.

5.3. Formación de *biofilms* en condiciones de estrés

El crecimiento de una colonia como parte del *biofilm* implica que su comportamiento metabólico respecto a una colonia creciendo en condiciones estándar sufre cambios que son regulados por un conjunto de genes diferenciados. La identificación de estos genes constituye el principal objeto de interés de diferentes estudios relacionados actualmente con una gran variedad de microorganismos. Los mecanismos de regulación génica responsables del fenotipo las cianobacterias formando parte de *biofilms* están siendo dilucidados. Este trabajo explora el posible papel de los reguladores transcripcionales de la familia FUR en la síntesis de exopolisacáridos, por su gran relevancia en la formación del *biofilm* dado su papel estructural, de adhesión y de protección contra diferentes tipos de estrés. (Lembre *et al.*, 2012).

En cuanto al *biofilm* producido por la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 en condición de deficiencia de nitrógeno, se observó un comportamiento similar al de la producción de exopolisacáridos. A partir de los primeros 5 días de déficit nitrógeno combinado se incrementó significativamente la formación de *biofilm*, este aumento se mantuvo durante todo el experimento para reducirse ligeramente tras 20 días de deficiencia de nitrógeno. En contraste, el tratamiento con NaCl 300 mM afectó notablemente la capacidad de formación de *biofilm*, produciendo una disminución en torno al 50% a los 5 días del tratamiento, que se mantuvo en el tiempo hasta alcanzar 20 días de exposición al estrés. La comparación de estos resultados con los obtenidos al cuantificar la producción de EPS, proceso que se incrementa notablemente tanto en condiciones de deficiencia de nitrógeno como en cultivos sometidos a estrés salino, indica que una mayor concentración de EPSs excretados al medio no siempre conlleva una mayor producción de *biofilms*.

El *biofilm* se produce como una respuesta directa a la presión selectiva del medio ambiente (Steenackers *et al.*, 2016). La síntesis de *biofilms* en procariotas se activa como respuesta a diferentes factores, como señales nutricionales, el reconocimiento de sitios de unión a superficies o sustratos específicos, o factores adversos como la desecación, una alta intensidad lumínica o la disponibilidad de nitrógeno combinado. (An & Parsek, 2007). Nuestros resultados corroboran que tanto la disponibilidad de nitrógeno en el medio, como la salinidad influyen en la formación de *biofilms*.

El establecimiento de *biofilms* se ha señalado como una estrategia que las bacterias han desarrollado para colonizar nichos específicos, como por ejemplo la rizosfera de las plantas (Ramey *et al.*, 2004). Además de las cianobacterias, otras bacterias fijadoras de nitrógeno como la rizobacteria *Pseudomonas stutzeri* A1501 forma *biofilms* en deficiencia de nitrógeno desde que se disponga de una fuente de carbono suficiente (Wang *et al.*, 2017). En condiciones de deficiencia, las bacterias recurren a la fijación de nitrógeno para poder crecer (Desnoues *et al.*, 2003). Sin embargo, *Anabaena* solo fija nitrógeno en condiciones microaeróbicas porque su nitrogenasa se inactiva rápidamente después de una exposición breve al oxígeno (Murry *et al.* 2011). La correcta actividad de la nitrogenasa depende en este caso de la formación de *biofilms*,

pues los EPSs que forman el *biofilm* puede proporcionar un entorno microaeróbico adecuado compatible con la síntesis de esta enzima (Wang *et al.*, 2017).

5.3.1. Efecto de la desregulación de FurA, FurB y FurC en la formación de *biofilm*. Consecuencias de la deficiencia de nitrógeno.

Al igual que ocurrió con la síntesis de exopolisacáridos, la desregulación de los parálogos FUR afectó a la formación de *biofilm* en las diferentes condiciones estudiadas. En condiciones estándar de crecimiento, la estirpe de sobreexpresión de FurA presentó la mayor cantidad de *biofilm* desde el principio del experimento y este comportamiento se mantuvo a lo largo del tiempo. Le siguió la estirpe de sobreexpresión de FurC. La estirpe que presentó una menor cantidad de *biofilm* respecto a la estirpe silvestre, fue la cepa de sobreexpresión de FurB. La menor capacidad de la variante de sobreexpresión de FurB para formar *biofilm* en medio BG11 completo está en concordancia con la menor producción de EPSs por esta cepa.

Con respecto al efecto de la deficiencia de nitrógeno en las diferentes cepas de *Anabaena*, se aprecia un notable incremento en la formación de *biofilm* por parte de todas las estirpes estudiadas, tanto del tipo silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 como de las cepas de sobreexpresión de FurA, FurB y FurC. En todos los casos, la formación de *biofilm* se incrementó en condiciones de déficit de nitrógeno. Este incremento con respecto al *biofilm* observado en condiciones estándar fue similar en las cuatro cepas, siendo ligeramente superior para la estirpe EB2770FurC, al igual que ocurre con la formación de EPSs al retirar el nitrógeno combinado del medio.

5.3.2. Efecto de la desregulación de FurA, FurB y FurC en la formación de *biofilm* en exposición a altas concentraciones de sal

Con respecto al efecto del estrés producido por la presencia de altas concentraciones de sal en el medio (300 mM de NaCl) y al contrario del efecto evidenciado en deficiencia de nitrógeno, se aprecia una notable disminución en la formación de *biofilm* por parte de todas las estirpes estudiadas.

En todos los casos, la formación de *biofilm* disminuyó en condiciones de altas concentraciones de sal. Esta disminución con respecto al *biofilm* observado en condiciones estándar fue similar en las cuatro cepas, siendo ligeramente mayor para las estirpes EB2770FurC y VCS2770FurB (60% y 70% respectivamente, frente a una reducción del 50% en AG2770FurA y en *Anabaena* sp. PCC7120). Estos resultados sugieren que el estrés salino podría afectar algo más a genes incluidos en los regulones de FurB y FurC, aunque la pequeña diferencia en la cantidad de *biofilm* cuantificado también podría deberse a la aproximación experimental u otros factores.

A diferencia del experimento de cuantificación de exopolisacáridos en el que el estrés por deficiencia de nitrógeno o por la exposición a altas concentraciones de sal aumentó la producción del exopolisacárido para la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 y para las estirpes de sobreexpresión AG2770FurA, VCS2770FurB y EB2770FurC, en el experimento de formación de *biofilm* solo la deficiencia de nitrógeno produjo un incremento en las cuatro estirpes evaluadas. Aunque las condiciones de estrés incrementen la producción de exopolisacáridos y la formación de *biofilm* para protegerse de condiciones adversas, como ya se ha mencionado en la discusión sobre el efecto del estrés salino en la síntesis de exopolisacáridos, 300 mM de NaCl puede ser una condición más agresiva que la deficiencia de nitrógeno. La disminución en el crecimiento celular frente a NaCl puede apreciarse en los datos de conteo celular. La mayor cuantificación de exopolisacáridos respecto a una pobre cantidad de *biofilm* en sal puede deberse a la presencia de algunos polisacáridos en el sobrenadante que se liberaron al medio después de producirse la lisis de las células.

5.4. Análisis filogenético de las glicosiltransferasas presentes en el genoma de *Anabaena* sp. PCC7120

En este trabajo se clasificaron las secuencias de 131 proteínas anotadas como glicosiltransferasas o probables glicosiltransferasas presentes en el genoma de *Anabaena* sp. PCC7120. De estas secuencias, 50 pertenecen a la superfamilia estructural GT-A (que se caracteriza por presentar un dominio con plegamiento de tipo Rossmann sencillo, 63 secuencias a la superfamilia estructural GT-B (que

se caracteriza por presentar un dominio con plegamiento de tipo Rossmann doble), 4 secuencias pertenecen a la superfamilia estructural GT-C (que son proteínas integrales de membrana con múltiples dominios transmembrana) y 14 de estas secuencias no tienen asignada una familia de acuerdo a su estructura tridimensional. Cabe destacar que hay una gran cantidad de genes relacionados con la biosíntesis de polisacáridos que se encuentran clasificados en la Base de Datos de Enzimas Activas de Carbohidratos (<http://www.cazy.org/>), como consecuencia de la secuenciación de numerosos genomas. La mayoría de estas secuencias codifican GTs con función y especificidad desconocidas. Asimismo, la caracterización bioquímica de las GTs es difícil debido a su amplia diversidad en las categorías de donantes, aceptores y productos, lo que da como resultado una baja proporción de GTs caracterizadas. (Wang *et al.* 2014; Tegl & Nidetzky. 2020). Además de la organización en las mencionadas superfamilias, la base de datos Cazy establece una clasificación por subfamilias (ver Tabla 16), con una serie de actividades y rutas metabólicas con las que estas glicosiltransferasas están relacionadas. Dichas subfamilias comparten un ancestro más reciente, y por lo tanto se espera que tengan mecanismos moleculares más parecidos.

En esta tesis se muestra que las secuencias de las glicosiltransferasas de *Anabaena* sp. PCC7120 que corresponden a la superfamilia GT-A es la más homogénea, pues pertenecen todas a la subfamilia GT2, mientras que las glicosiltransferasas que comprenden la superfamilia estructural GT-B están distribuidas en las subfamilias GT1, GT4, GT5, GT9, GT19, GT28, GT35 y GT41 y por último las glicosiltransferasas de la superfamilia estructural GT-C están distribuidas en las subfamilias GT39 y GT83. Debido a su gran tamaño (3042 pb), el gen *alr0558* codifica una proteína con motivos estructurales presentes en las superfamilias estructurales GT-A y GT-B y en las subfamilias 2 y 41, sin embargo, en este trabajo este gen se encuentra formando parte del clado 1, compartiendo ramas con las secuencias de All2770 y All4126 que pertenecen a la superfamilia estructural GT-A, por lo que se consideró esta secuencia como parte de la superfamilia GT-A. Además, 14 proteínas clasificadas como probables glicosiltransferasas (representados en las ramas verdes del filograma) no se encuentran asignadas a una superfamilia, y pertenecen a las subfamilias

GT14, GT26, y GT51 o no están clasificadas como parte de ninguna subfamilia (GTnc).

Los alineamientos correspondientes a las secuencias de glicosiltransferasas de *Anabaena* sp. PCC7120, se hicieron mediante MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation). Las secuencias se curaron posteriormente con Gblocks, sin embargo, la gran heterogeneidad de las secuencias para la superfamilia estructural GT-B hizo necesario disminuir la astringencia durante el curado de los alineamientos con Gblocks, es decir, se permitieron bloques finales más pequeños, se permitieron gaps, y posiciones en los extremos menos estrictas.

Cabe destacar que los ocho clados en los que se distribuyeron las 131 secuencias de aminoácidos de glicosiltransferasas de *Anabaena* sp. PCC7120 contienen secuencias pertenecientes a la superfamilia estructural GT-B, mientras que todas las secuencias de la familia GT-A se organizan en el clado 1. En el árbol queda representada la gran heterogeneidad de estas secuencias, especialmente en la superfamilia estructural GT-B, que la componen las subfamilias GT1, GT4, GT5, GT9, GT19, GT28, GT35 y GT41 mientras que la superfamilia estructural GT-A solo está representada por la subfamilia GT2. Por otro lado, la distribución de las secuencias de la superfamilia estructural GT-C también está relacionada con las subfamilias a las que pertenecen estas glicosiltransferasas, pues las secuencias (Alr4347, Alr2076 y All2870) que se agruparon dentro del clado número 8, están todas clasificadas como parte de la subfamilia GT83 mientras que la secuencia Alr3150 que se encuentra dentro del clado 4 corresponde a la subfamilia GT39. Además, Alr4347 y Alr2076 tienen una alta similitud, presentándose las dos como parte de la misma rama, por lo que podría tratarse de glicosiltransferasas con funciones parecidas. Sin embargo, estas secuencias aparecen anotadas en la base de datos como proteínas hipotéticas, por lo que su función no está todavía clara. Al igual que las glicosiltransferasas de la superfamilia estructural GT-B, las 14 secuencias que se encuentran sin asignación a una familia (S.A.F.), se encuentran repartidas por casi todos los clados del árbol filogenético (1, 3, 4 y 6). De estas secuencias, 11 se encuentran formando parte del clado 1 aunque hay que destacar que el clado 1 está formado en su mayoría por las secuencias de la familia estructural GT-A.

De estas secuencias sin clasificación destacan Alr5326, All2981 y Alr5324 que se encuentran formando parte de la misma rama, las tres están clasificadas en Cazy como parte de la subfamilia GT51 y están anotadas como proteínas de unión a penicilina.

El clado 1 parece estar formado en su mayoría por las glicosiltransferasas de la superfamilia estructural GT-A, mientras que las secuencias de la superfamilia estructural GT-B están distribuidas entre los clados restantes, esta superfamilia está representada especialmente por la subfamilia GT4, que es la subfamilia más abundante de la superfamilia GT-B y que se encuentra presente en todos los clados excepto en el clado número 1, en el que solamente la secuencia All4440 corresponde a una glicosiltransferasa de la subfamilia GT4. Con respecto a la superfamilia GT-C, se observa que no hay suficientes secuencias representando a esta superfamilia para formar un clado aparte, aunque la mayoría de secuencias de esta familia se agruparon en el clado 8. Finalmente, las glicosiltransferasas sin asignación a una familia podrían pertenecer a las superfamilias GT-A y GT-B de acuerdo a los clados a los que pertenecen.

La base de datos Cazy es un recurso valioso para generar nuevas hipótesis funcionales al clasificar las GTs en familias individuales en función de la similitud de secuencia (Lombard *et al.*, 2014). Sin embargo, una comprensión más amplia de cómo estas enzimas evolucionaron para reconocer diversos sustratos donantes y aceptores requiere una comparación global. Estas comparaciones son actualmente un desafío debido a la similitud de secuencia limitada entre familias y la falta de un marco filogenético para detectar eventos evolutivos asociados con la especialización funcional de GTs. Los esfuerzos para investigar la evolución de la GTs se han centrado en gran medida en familias o rutas metabólicas específicas (Taujale *et al.* 2016; Lombard, 2016) y no se ha abordado explícitamente el desafío de mapear la evolución de la diversidad funcional entre familias (Taujale *et al.*, 2020). Finalmente, cabe destacar que este es el primer estudio que clasifica las GTs de una cianobacteria en arboles filogenéticos, como una primera aproximación en la búsqueda de GTs responsables de la síntesis de EPSs y formación de *biofilms* en *Anabaena* sp. PCC7120.

5.5. Presencia de cajas FUR en los promotores de las glicosiltransferasas potencialmente reguladas por FurA y FurC y ensayos de retardo en gel (Electrophoretic Mobility Shift Assay: EMSA).

Los datos sobre la influencia de la desregulación de algunos parálogos FUR en la formación de *biofilms*, sugieren que las proteínas FurA y FurC podrían estar implicadas en la regulación de algunas glicosiltransferasas. Por este motivo se buscaron cajas FurA y FurC en las secuencias de los promotores de todas las GTs descritas en el genoma de *Anabaena* sp. PCC7120. Cabe resaltar que, de estos 131 genes, más del 40 % se encuentra formando operones lo que redujo la búsqueda de cajas FurA y FurC a 80 secuencias de promotores.

Se identificaron un total de 35 cajas FurA y 3 cajas FurC para las 80 secuencias de promotores de glicosiltransferasas analizadas. Los resultados de la búsqueda bioinformática de cajas FUR realizadas en este apartado se validaron experimentalmente con un conjunto de genes seleccionados mediante ensayos de retardos en gel (EMSA).

Se seleccionaron cinco glicosiltransferasas *alr3057*, *all4424*, *all4431*, *alr5223*, *alr5237* y un gen responsable de la síntesis de polisacáridos extracelulares (*all4432*), estos genes se escogieron en base a la presencia de cajas FUR en los promotores, junto con la información publicada por otros autores (Mitschke *et al.*, 2011 y Yoshimura *et al.*, 2007 y 2012) donde identificaron glicosiltransferasas cuyo nivel de transcripción cambia significativamente en condiciones de estrés salino, deshidratación y deficiencia de nitrógeno. Los seis genes evaluados presentaron retardo en presencia de FurA, mientras que solo el gen *all4432* responsable de la síntesis de polisacáridos extracelulares, presentó retardo al ser enfrentado a FurC, confirmando así que el regulador transcripcional FurC, pero especialmente FurA estarían implicados en la regulación de glicosil transferasas y por lo tanto en la producción de exopolisacáridos y la formación de *biofilms*.

5.6. Efecto de la presencia de exopolisacáridos y otros metabolitos en el sobrenadante de *Anabaena* sp. PCC7120 sobre la germinación de *Oryza sativa* de la variedad Ariete.

La salinidad es una de las mayores problemáticas en cultivos de arroz en el mundo y su efecto en la germinación ha sido ampliamente estudiado (Cristo *et al.*, 2001, Sam 2007, Reddy *et al.*, 2017). Estudios previos han caracterizado el efecto de exopolisacáridos y el *biofilm* producido por cepas de *Halomonas variabilis* y *Planococcus rifietensis* en el crecimiento de garbanzo (*Cicer arietinum*) bajo condiciones de estrés salino y se ha concluido que no solo protegen a la planta contra las altas concentraciones salinas, sino que además promueven su crecimiento y mejoran la estructura del suelo (Qurashi & Sabri 2012). Además de las cianobacterias, gran variedad de microorganismos ha demostrado promover la germinación de arroz y otros cultivos, como *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas* sp. (Hofte *et al.* 1991; Loredó-Ostí *et al.* 2004), *Nitrosomonas europea*, *Rhodoseudomonas palustris*, *Acinetobacter* sp. (Supari *et al.*, 2014), entre otros (Lu *et al.* 2017).

En el presente trabajo, el análisis del efecto los exopolisacáridos y otros metabolitos de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 sobre la germinación de semillas de arroz en condiciones estándar, así como bajo condiciones de salinidad (NaCl 100 mM) evidenció la actividad de las células como promotoras de crecimiento, incrementando el porcentaje de germinación, el crecimiento de la raíz pivotante, y la longitud del tallo. También se evidenció que la susceptibilidad de las semillas de arroz al estrés salino, fue menor en presencia de las células y el sobrenadante de esta estirpe.

En Asia, desde hace varias décadas se ha descrito la simbiosis de *Azolla* con *Nostoc* spp. para mejorar la fertilidad en campos de arroz. Actualmente, diferentes especies de cianobacterias están siendo utilizadas como un recurso en la mejora de la fertilidad del suelo y de la calidad del medio ambiente, entre ellas: *A. variabilis*, *Nostoc muscorum*, *Aulosira fertissima*, y *Tolypothrix tenuis* que han demostrado ser bastante eficientes en cultivos de arroz en China, Vietnam, Filipinas, Japón e India (Singh *et al.* 2016; Shweta & Kritika. 2018; Maçik *et al.* 2020).

Además de ser un potencial biofertilizante, las cianobacterias también cumplen un papel fundamental en la recuperación de los suelos. Sumado a la baja fertilidad, los suelos erosionados por la explotación agrícola excesiva se caracterizan por presentar alta compactación, deficiencia hídrica y problemas relacionados con la salinidad. Consecuentemente, la baja aireación e infiltración del agua en el suelo disminuyen la diversidad microbiana, lo que produce un impacto adverso en el crecimiento de las plantas y en la productividad de los cultivos. Las cianobacterias desarrollan una red superficial de filamentos en el que unen las partículas de suelo y reparan además sus características fisicoquímicas, debido a su capacidad para retener agua y al aporte de minerales y nutrientes a suelos degradados, mejorando entre otras cosas su pH y su conductividad.

Conclusiones **6**

6. Conclusiones:

- La síntesis de exopolisacáridos en *Anabaena* sp. PCC7120 se incrementa frente a factores ambientales como la deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado y las altas concentraciones de sal, este incremento es mayor frente al estrés salino. Al igual que con los exopolisacáridos, la formación de *biofilms* se incrementa al enfrentar a la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 a deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado. Sin embargo, las altas concentraciones de sal produjeron el efecto contrario.
- La desregulación de las proteínas FUR afecta la síntesis de exopolisacáridos y la formación de *biofilm* en *Anabaena* sp. PCC7120. Además, FurC, y FurA estarían implicados en la regulación de glicosiltransferasas responsables de la producción de exopolisacáridos y la formación de *biofilms*.
- La base de datos CAZy es un recurso valioso para clasificar las GTs en familias individuales y generar nuevas hipótesis acerca de su función de acuerdo a la similitud de secuencia y a su estructura tridimensional, sin embargo, la variedad de subfamilias y la gran heterogeneidad en las secuencias dificultan su organización sistemática. La organización filogenética en este trabajo es una primera aproximación en la búsqueda de GTs responsables de la síntesis de EPSs y formación de *biofilms* en *Anabaena* sp. PCC7120.
- La búsqueda de cajas Fur en las 80 secuencias de glicosiltransferasas identificadas en el genoma de *Anabaena* sp. PCC7120 permitieron definir un total de 35 posibles cajas FurA y 3 cajas FurC potencialmente reguladas por FurA y FurC. Los posteriores ensayos de retardo en gel confirmaron este resultado para seis promotores cuyo nivel de transcripción cambia significativamente en condiciones de estrés salino,

deshidratación y deficiencia de nitrógeno (*alr3057*, *all4424*, *all4431*, *all4432*, *alr5223* y *alr5237*). Estos resultados sugieren que FurA y FurC están relacionados con el control de la expresión de genes implicados en la formación de *biofilms* en *Anabaena*.

- Tanto los exopolisacáridos presentes en el sobrenadante, como las células de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC7120 demostraron tener potencial biofertilizante, pues produjeron un incremento en el porcentaje de germinación, el crecimiento de la raíz pivotante, y la longitud del tallo y disminuyeron la susceptibilidad de las semillas de arroz al estrés salino.

Bibliografía

- Abinandan S, Subashchandrabose SR, Venkateswarlu K, Megharaj M. Soil microalgae and cyanobacteria: the biotechnological potential in the maintenance of soil fertility and health. *Crit Rev Biotechnol*. 2019 Dec;39(8):981-998.
- Adams DG (2000) Symbiotic interactions. In: Whitton BA, Potts M (eds) *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 523–561, 668 pp
- Adir N., Dines M., Klartag M., McGregor A., Melamed-Frank M. (2006) Assembly and Disassembly of Phycobilisomes. In: Shively J.M. (eds) *Complex Intracellular Structures in Prokaryotes*. Microbiology Monographs, vol 2. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Albuquerque-Wendt A, Hütte HJ, Buettner FFR, Routier FH, Bakker H. Membrane Topological Model of Glycosyltransferases of the GT-C Superfamily. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep 29;20(19):4842.
- Allakhverdiev SI, Klimov VV, Hagemann M. Cellular energization protects the photosynthetic machinery against salt-induced inactivation in *Synechococcus*. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jun 30;1708(2):201-8.
- Allakhverdiev SI, Murata N. Salt stress inhibits photosystems II and I in cyanobacteria. *Photosynth Res*. 2008 Oct-Dec;98(1-3):529-39.
- Allen MM, Smith AJ. Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Arch Mikrobiol*. 1969;69(2):114-20.
- An D, Parsek MR. The promise and peril of transcriptional profiling in *biofilm* communities. *Curr Opin Microbiol*. 2007 Jun;10(3):292-6.
- Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quñones F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev*. 2003 Jun;27(2-3):215-37.
- Arase, S., Parada, R.Y., Kihara, J. Elicitor(s) production is involved in red-light-induced resistance during spore germination of *Bipolaris oryzae* in the presence of host tissues. *J Gen Plant Pathol* 83, 337–343 (2017).
- Ardèvol A, Iglesias-Fernández J, Rojas-Cervellera V, Rovira C. The reaction mechanism of retaining glycosyltransferases. *Biochem Soc Trans*. 2016 Feb;44(1):51-60.

- Argandoña M, Nieto JJ, Iglesias-Guerra F, Calderón MI, García-Esteva R, Vargas C. Interplay between iron homeostasis and the osmotic stress response in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Appl Environ Microbiol*. 2010 Jun;76(11):3575-89.
- Årstøl E, Hohmann-Marriott MF. Cyanobacterial Siderophores-Physiology, Structure, Biosynthesis, and Applications. *Mar Drugs*. 2019 May 10;17(5):281.
- Asthana, Ravi & Chatterjee, S. & Singh, S.P.. (1995). Investigations on Nickel Biosorption and its Remobilization. *Process Biochemistry*. 30. 729-734.
- Ates O. Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015 Dec 18;3:200.
- Austin AT, Yahdjian L, Stark JM, Belnap J, Porporato A, Norton U, Ravetta DA, Schaeffer SM. Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia*. 2004 Oct;141(2):221-35.
- Baier K, Lehmann H, Stephan DP, Lockau W. NblA is essential for phycobilisome degradation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 but not for development of functional heterocysts. *Microbiology (Reading)*. 2004 Aug;150(Pt 8):2739-2749.
- Bank, World. (2007). World Development Report 2008. [http://lst-iiep.iiep-unesco.org/cgi-bin/wwwi32.exe/\[in=epidoc1.in\]/?t2000=025534/\(100\).10.1596/978-0-8213-6807-7](http://lst-iiep.iiep-unesco.org/cgi-bin/wwwi32.exe/[in=epidoc1.in]/?t2000=025534/(100).10.1596/978-0-8213-6807-7).
- Bender KS, Yen HC, Hemme CL, Yang Z, He Z, He Q, Zhou J, Huang KH, Alm EJ, Hazen TC, Arkin AP, Wall JD. Analysis of a ferric uptake regulator (Fur) mutant of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Sep;73(17):5389-400.
- Berman-Frank I, Lundgren P, Falkowski P. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Res Microbiol*. 2003 Apr;154(3):157-64.
- Bertani G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J Bacteriol*. 2004 Feb;186(3):595-600.
- Bhunia B, Prasad Uday US, Oinam G, Mondal A, Bandyopadhyay TK, Tiwari ON. Characterization, genetic regulation and production of

- cyanobacterial exopolysaccharides and its applicability for heavy metal removal. *Carbohydr Polym.* 2018 Jan 1;179:228-243.
- Bienert R, Baier K, Volkmer R, Lockau W, Heinemann U. Crystal structure of NblA from *Anabaena* sp. PCC 7120, a small protein playing a key role in phycobilisome degradation. *J Biol Chem.* 2006 Feb 24;281(8):5216-23.
 - Bijlsma JJ, Waidner B, Vliet AH, Hughes NJ, Hög S, Bereswill S, Kelly DJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Kist M, Kusters JG. The *Helicobacter pylori* homologue of the ferric uptake regulator is involved in acid resistance. *Infect Immun.* 2002 Feb;70(2):606-11.
 - Bixler, Harris & Porse, Hans. (2011). A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *Journal of Applied Phycology.* 23. 321-335.
 - Bloch JS, Pesciullesi G, Boilevin J, Nosol K, Irobalieva RN, Darbre T, Aebi M, Kossiakov AA, Reymond JL, Locher KP. Structure and mechanism of the ER-based glucosyltransferase ALG6. *Nature.* 2020 Mar;579(7799):443-447.
 - Böhm GA, Pfeleiderer W, Böger P, Scherer S. Structure of a novel oligosaccharide-mycosporine-amino acid ultraviolet A/B sunscreen pigment from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J Biol Chem.* 1995 Apr 14;270(15):8536-9.
 - Botello-Morte, Laura & Fillat, María. (2014). Thiol-based redox regulators in prokaryotes: The relevance of the CXXC motifs. *Open Access Biochemistry.* 2. 1.
 - Botello-Morte, Laura & González Rodríguez, Andrés & Bes, Teresa & Peleato, María & Fillat, María. (2013). Functional Genomics of Metalloregulators in Cyanobacteria. 10.1016/B978-0-12-394313-2.00004-4.
 - Bothe H, Schmitz O, Yates MG, Newton WE. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010 Dec;74(4):529-51.
 - Bradley S, Carr NG. Heterocyst and nitrogenase development in *Anabaena cylindrica*. *J Gen Microbiol.* 1976 Sep;96(1):175-84.
 - Brahmsha B, Haselkorn R. Isolation and characterization of the gene encoding the principal sigma factor of the vegetative cell RNA polymerase

- from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol.* 1991 Apr;173(8):2442-50.
- Breton C, Fournel-Gigleux S, Palcic MM. Recent structures, evolution and mechanisms of glycosyltransferases. *Curr Opin Struct Biol.* 2012 Oct;22(5):540-9.
 - Breton C, Snajdrová L, Jeanneau C, Koca J, Imberty A. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology.* 2006 Feb;16(2):29R-37R.
 - Breton C, Snajdrová L, Jeanneau C, Koca J, Imberty A. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology.* 2006 Feb;16(2):29R-37R.
 - Cai YP, Wolk CP. Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *J Bacteriol.* 1990 Jun;172(6):3138-45.
 - Campbell EL, Meeks JC. Characteristics of Hormogonia Formation by Symbiotic *Nostoc* spp. in Response to the Presence of *Anthoceros punctatus* or Its Extracellular Products. *Appl Environ Microbiol.* 1989 Jan;55(1):125-31.
 - Canter-Lund, Hilda [Photographer] (2016) *Anabaena* [image] Freshwater Biological Association [publisher] Permalink: <http://www.environmentdata.org/archive/fbaia:2963>
 - Carpenter BM, Gancz H, Benoit SL, Evans S, Olsen CH, Michel SL, Maier RJ, Merrell DS. Mutagenesis of conserved amino acids of *Helicobacter pylori fur* reveals residues important for function. *J Bacteriol.* 2010 Oct;192(19):5037-52.
 - Castellanos, R.Z.J.; Cueto W.J.A.; Macías C.J.; Salinas G.J. R.; Tapia V.L.J.; Cortés J.J.M.; González A.I.J.; Mata V.H.; Mora G.M.; Vásquez H.A.; Valenzuela S.C. y Enríquez R. S.A. 2005. La fertilización en los cultivos de maíz, sorgo y trigo en México. SAGARPA-INIFAP. Folleto Técnico Num.1, Septiembre de 2005. Campo Experimental Bajío, Celaya, Guanajuato, México. 44 p.
 - Caux-Thang C, Parent A, Sethu R, Maïga A, Blondin G, Latour JM, Duarte V. Single asparagine to arginine mutation allows PerR to switch from PerR box to fur box. *ACS Chem Biol.* 2015 Mar 20;10(3):682-6.

- Chang A, Singh S, Phillips GN Jr, Thorson JS. Glycosyltransferase structural biology and its role in the design of catalysts for glycosylation. *Curr Opin Biotechnol.* 2011 Dec;22(6):800-8.
- Chang ACG, Chen T, Li N, Duan J. Perspectives on Endosymbiosis in Coralloid Roots: Association of Cycads and Cyanobacteria. *Front Microbiol.* 2019 Aug 14;10:1888
- Chen Q, Crosa JH. Antisense RNA, fur, iron, and the regulation of iron transport genes in *Vibrio anguillarum*. *J Biol Chem.* 1996 Aug 2;271(31):18885-91.
- Chen YT, Yuan Q, Shan LT, Lin MA, Cheng DQ, Li CY. Antitumor activity of bacterial exopolysaccharides from the endophyte *Bacillus amyloliquefaciens* sp. isolated from *Ophiopogon japonicus*. *Oncol Lett.* 2013 Jun;5(6):1787-1792.
- Christmas NA, Barker G, Anesio AM, Sánchez-Baracaldo P. Genomic mechanisms for cold tolerance and production of exopolysaccharides in the Arctic cyanobacterium *Phormidesmis priestleyi* BC1401. *BMC Genomics.* 2016 Aug 2;17:533.
- Chun-lei, Zhang. Li Jia-Qi., Guo Hai-Tao., Wang Jie and Xu Ri-hua. (2014). Selection of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria isolates from Inner Mongolian traditional yoghurt. *Mljekarstvo.* 64. 254-260.
- Chunleuchanon, S., Sooksawang, A., Teaumroong, N. et al. Diversity of nitrogen-fixing cyanobacteria under various ecosystems of Thailand: population dynamics as affected by environmental factors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19, 167–173 (2003).
- Cohan FM, Perry EB. A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity. *Curr Biol.* 2007 May 15;17(10):R373-86.
- Collier JL, Grossman AR. A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria. *EMBO J.* 1994 Mar 1;13(5):1039-47.
- Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ, Henrissat B. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol.* 2003 Apr 25;328(2):307-17.

- Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ, Henrissat B. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol.* 2003 Apr 25;328(2):307-17.
- Cristo, E.; González, M. C.; Cárdenas, R. M. y Pérez, N. Evaluación de la tolerancia a la salinidad en el estado juvenil de tres nuevas líneas de arroz (*Oryza sativa* L.) utilizando marcadores morfoagronómicos. *Cultivos Tropicales*, 2001, vol. 22, no. 2, p. 43-45.
- Cuevas, Julián & Daliakopoulos, Ioannis & del Moral Torres, Fernando & Hueso, J. & Tsanis, Ioannis. (2019). A Review of Soil-Improving Cropping Systems for Soil Salinization. *Agronomy*. 9. 295.
- Cuthbertson L, Kos V, Whitfield C. ABC transporters involved in export of cell surface glycoconjugates. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010 Sep;74(3):341-62.
- Dam, Thi & Amjath Babu, Ts & Zander, Peter & Müller, Klaus. (2019). Paddy in saline water: Analysing variety-specific effects of saline water intrusion on the technical efficiency of rice production in Vietnam. *Outlook on Agriculture*.
- De Lorenzo V, Herrero M, Giovannini F, Neilands JB. Fur (ferric uptake regulation) protein and CAP (catabolite-activator protein) modulate transcription of fur gene in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.* 1988 May 2;173(3):537-46.
- De Philippis R, Colica G, Micheletti E. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011 Nov;92(4):697-708.
- De Philippis, R., Sili, C., Paperi, R. et al. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: A review. *Journal of Applied Phycology* 13, 293–299 (2001).
- De Philippis, Roberto & Ena, Alba & Paperi, Raffaella & Sili, Claudio & Vincenzini, Massimo. (2000). Assessment of the potential of **Nostoc** strains from Pasteur Culture Collection for the production of polysaccharides of applied interest. *Journal of Applied Phycology*. 12. 401-407.

- De Philippis, Roberto & Sili, Claudio & Paperi, Raffaella & Vincenzini, Massimo. (2001). Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: A review. *Journal of Applied Phycology*. 13. 293-299.
- De Vuyst L, Degeest B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 1999 Apr;23(2):153-77.
- Delany I, Pacheco AB, Spohn G, Rappuoli R, Scarlato V. Iron-dependent transcription of the *frpB* gene of *Helicobacter pylori* is controlled by the Fur repressor protein. *J Bacteriol*. 2001 Aug;183(16):4932-7.
- Delany I, Rappuoli R, Scarlato V. Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol*. 2004 May;52(4):1081-90.
- Delattre C, Pierre G, Laroche C, Michaud P. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnol Adv*. 2016 Nov 15;34(7):1159-1179.
- Delattre C, Pierre G, Laroche C, Michaud P. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnol Adv*. 2016 Nov 15;34(7):1159-1179.
- Delgado, Martha & Ulloa Ramos, Cristian. (2015). LA ECONOMÍA DEL DEPARTAMENTO DEL TOLIMA: DIAGNÓSTICO Y PERSPECTIVAS DE MEDIANO PLAZO.
- den Besten HM, Mols M, Moezelaar R, Zwietering MH, Abee T. Phenotypic and transcriptomic analyses of mildly and severely salt-stressed *Bacillus cereus* ATCC 14579 cells. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Jun;75(12):4111-9.
- Deng Z, Meng X, Su S, Liu Z, Ji X, Zhang Y, Zhao X, Wang X, Yang R, Han Y. Two sRNA RyhB homologs from *Yersinia pestis* biovar microtus expressed in vivo have differential Hfq-dependent stability. *Res Microbiol*. 2012 Jul;163(6-7):413-8.
- Desnoues N, Lin M, Guo X, Ma L, Carreño-Lopez R, Elmerich C. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. *Microbiology (Reading)*. 2003 Aug;149(Pt 8):2251-2262.
- Di Pippo, Francesca & Ellwood, Neil & Gismondi, Alessandra & Bruno, Laura & Rossi, Federico & Magni, Paolo & De Philippis, Roberto. (2013).

- Characterization of exopolysaccharides produced by seven *biofilm*-forming cyanobacterial strains for biotechnological applications. *Journal of Applied Phycology*.
- Dian C, Vitale S, Leonard GA, Bahlawane C, Fauquant C, Leduc D, Muller C, de Reuse H, Michaud-Soret I, Terradot L. The structure of the *Helicobacter pylori* ferric uptake regulator Fur reveals three functional metal binding sites. *Mol Microbiol*. 2011 Mar;79(5):1260-75.
 - Ducey TF, Jackson L, Orvis J, Dyer DW. Transcript analysis of *nrrF*, a Fur repressed sRNA of *Neisseria gonorrhoeae*. *Microb Pathog*. 2009 Mar;46(3):166-70.
 - Dühning U, Axmann IM, Hess WR, Wilde A. An internal antisense RNA regulates expression of the photosynthesis gene *isiA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 2;103(18):7054-8.
 - Dvořák P., Casamatta D.A., Hašler P., Jahodářová E., Norwich A.R., Poulíčková A. (2017) Diversity of the Cyanobacteria. In: Hallenbeck P. (eds) *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes*. Springer, Cham.
 - Ehling-Schulz M, Bilger W, Scherer S. UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J Bacteriol*. 1997 Mar;179(6):1940-5.
 - Elanskaya IV, Karandashova IV, Bogachev AV, Hagemann M. Functional analysis of the Na⁺/H⁺ antiporter encoding genes of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Biochemistry (Mosc)*. 2002 Apr;67(4):432-40.
 - El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy SR, Luciani A, Potter SC, Qureshi M, Richardson LJ, Salazar GA, Smart A, Sonnhammer ELL, Hirsh L, Paladin L, Piovesan D, Tosatto SCE, Finn RD. The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1):D427-D432
 - Elmorjani K, Herdman M. Metabolic control of phycocyanin degradation in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: a glucose effect. *J Gen Microbiol*. 1987;133:1685–1694.
 - F. Méndez Delgado, Julio González (2009). Evaluación de la calidad del agua de riego usada en los cultivos de arroz de la zona alta de la meseta de la ciudad de Ibagué (Tolima, Colombia) [Universidad Del Tolima] Tumbaga, ISSN-e 1909-4841, Vol. 1, N°. 4, 2009, págs. 73-84

- FAO & ITPS. 2015. Status of the World's Soil Resources (SWSR) – Main Report. Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils, Rome, Italy
- FAO 2015. AQUASTAT Perfil de País - Colombia. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma, Italia.
- Fernández-Valiente, Eduardo & Ucha, A. & Quesada, Ana & Leganes, Francisco & Carreres, Ramon. (2000). Contribution of N₂-fixing cyanobacteria to rice production: Availability of nitrogen from ¹⁵N-labeled cyanobacteria and ammonium sulphate to rice. *Plant and Soil - PLANT SOIL*. 221. 107-112.
- Fillat MF. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Mar 15;546:41-52.
- Fischer D, Geyer A, Loos E. Occurrence of glucosylsucrose [α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fructofuranoside] and glucosylated homologues in cyanobacteria. Structural properties, cellular contents and possible function as thermoprotectants. *FEBS J*. 2006 Jan;273(1):137-49.
- Flaherty BL, Van Nieuwerburgh F, Head SR, Golden JW. Directional RNA deep sequencing sheds new light on the transcriptional response of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to combined-nitrogen deprivation. *BMC Genomics*. 2011 Jun 28;12:332.
- Flores E, Herrero A. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jan;8(1):39-50. doi: 10.1038/nrmicro2242. PMID: 19966815.
- Fomenko DE, Gladyshev VN. Identity and functions of CxxC-derived motifs. *Biochemistry*. 2003 Sep 30;42(38):11214-25.
- Fujisawa T, Narikawa R, Maeda SI, Watanabe S, Kanesaki Y, Kobayashi K, Nomata J, Hanaoka M, Watanabe M, Ehira S, Suzuki E, Awai K, Nakamura Y. CyanoBase: a large-scale update on its 20th anniversary. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jan 4;45(D1):D551-D554.
- Gabriel SE, Miyagi F, Gaballa A, Helmann JD. Regulation of the *Bacillus subtilis yciC* gene and insights into the DNA-binding specificity of the zinc-sensing metalloregulator Zur. *J Bacteriol*. 2008 May;190(10):3482-8.

- Gancz H, Merrell DS. The *Helicobacter pylori* Ferric Uptake Regulator (Fur) is essential for growth under sodium chloride stress. J Microbiol. 2011 Apr;49(2):294-8.
- Gancz H, Merrell DS. The Helicobacter pylori Ferric Uptake Regulator (Fur) is essential for growth under sodium chloride stress. J Microbiol. 2011 Apr;49(2):294-8.
- Gerdtsen ZP, Salgado JC, Osses A, Asenjo JA, Rapaport I, Andrews BA. Modeling heterocyst pattern formation in cyanobacteria. BMC Bioinformatics. 2009 Jun 16;10 Suppl 6(Suppl 6):S16.
- González A, Angarica VE, Sancho J, Fillat MF. The FurA regulon in *Anabaena* sp. PCC 7120: in silico prediction and experimental validation of novel target genes. Nucleic Acids Res. 2014 Apr;42(8):4833-46.
- González A, Bes MT, Barja F, Peleato ML, Fillat MF. Overexpression of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 reveals new targets for this regulator involved in photosynthesis, iron uptake and cellular morphology. Plant Cell Physiol. 2010 Nov;51(11):1900-14.
- González A, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF. Expanding the Role of FurA as Essential Global Regulator in Cyanobacteria. PLoS One. 2016 Mar 11;11(3):e0151384.
- González A, Bes MT, Valladares A, Peleato ML, Fillat MF. FurA is the master regulator of iron homeostasis and modulates the expression of tetrapyrrole biosynthesis genes in *Anabaena* sp. PCC 7120. Environ Microbiol. 2012 Dec;14(12):3175-87.
- González A, Valladares A, Peleato ML, Fillat MF. FurA influences heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. PCC 7120. FEBS Lett. 2013 Aug 19;587(16):2682-90.
- Grieve, CM & Grattan, Steve. (1999). Mineral Nutrient Acquisition and Response by Plants Grown in Saline Environments.
- Guío J, Sarasa-Buisan C, Velázquez-Campoy A, Bes MT, Fillat MF, Peleato ML, Sevilla E. 2-oxoglutarate modulates the affinity of FurA for the ntcA promoter in *Anabaena* sp. PCC 7120. FEBS Lett. 2020 Jan;594(2):278-289.
- Guntiñas, M.E. & Leirós, M.C. & Trasar-Cepeda, C. & Gil-Sotres, F. (2012). Effects of Moisture and Temperature on Net Soil Nitrogen

- Mineralization: A Laboratory Study. European Journal of Soil Biology - EUR J SOIL BIOL.
- Hahne H, Mäder U, Otto A, Bonn F, Steil L, Bremer E, Hecker M, Becher D. A comprehensive proteomics and transcriptomics analysis of *Bacillus subtilis* salt stress adaptation. J Bacteriol. 2010 Feb;192(3):870-82.
 - Hall HK, Foster JW. The role of fur in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. J Bacteriol. 1996 Oct;178(19):5683-91.
 - Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ. PLANT CELLULAR AND MOLECULAR RESPONSES TO HIGH SALINITY. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 2000 Jun;51:463-499.
 - Hasler, Kathrin & Bröring, Stefanie & Omta, Onno & Olf, Hans-Werner. (2015). Life cycle assessment (LCA) of different fertilizer product types. European Journal of Agronomy. 69. 41-51.
 - He Z, Zhou A, Baidoo E, He Q, Joachimiak MP, Benke P, Phan R, Mukhopadhyay A, Hemme CL, Huang K, Alm EJ, Fields MW, Wall J, Stahl D, Hazen TC, Keasling JD, Arkin AP, Zhou J. Global transcriptional, physiological, and metabolite analyses of the responses of *Desulfovibrio vulgaris* hildenborough to salt adaptation. Appl Environ Microbiol. 2010 Mar;76(5):1574-86.
 - Helm RF, Huang Z, Edwards D, Leeson H, Peery W, Potts M. Structural characterization of the released polysaccharide of desiccation-tolerant *Nostoc commune* DRH-1. J Bacteriol. 2000 Feb;182(4):974-82.
 - Hernández JA, Bes MT, Fillat MF, Neira JL, Peleato ML. Biochemical analysis of the recombinant Fur (ferric uptake regulator) protein from *Anabaena* PCC 7119: factors affecting its oligomerization state. Biochem J. 2002 Aug 15;366(Pt 1):315-22.
 - Hernández JA, López-Gomollón S, Bes MT, Fillat MF, Peleato ML. Three fur homologues from *Anabaena* sp. PCC7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition. FEMS Microbiol Lett. 2004 Jul 15;236(2):275-82.
 - Hernández JA, López-Gomollón S, Muro-Pastor A, Valladares A, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF. Interaction of FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120 with DNA: a reducing environment and the presence of Mn(2+) are positive

- effectors in the binding to *isiB* and *furA* promoters. *Biometals*. 2006 Jun;19(3):259-68.
- Hernández JA, Muro-Pastor AM, Flores E, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF. Identification of a *furA* cis antisense RNA in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *J Mol Biol*. 2006 Jan 20;355(3):325-34.
 - Herrero A, Flores E. Genetic responses to carbon and nitrogen availability in *Anabaena*. *Environ Microbiol*. 2019 Jan;21(1):1-17.
 - Herrero A, Muro-Pastor AM, Flores E. Nitrogen control in cyanobacteria. *J Bacteriol*. 2001 Jan;183(2):411-25.
 - Herrero A, Stavans J, Flores E. The multicellular nature of filamentous heterocyst-forming cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2016 Nov 1;40(6):831-854.
 - Herrero, A., and Flores, E. (2008). *The cyanobacteria: Molecular biology, genomics, and evolution*. Wymondham, UK: Caister Academic Press.
 - Higo Isu A, A, Fukaya Y, Hisabori T. Efficient Gene Induction and Endogenous Gene Repression Systems for the Filamentous Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Plant Cell Physiol*. 2016 Feb;57(2):387-96.
 - Hirose E, Hirose M, Neilan BA. Localization of symbiotic cyanobacteria in the colonial ascidian *Trididemnum miniatum* (*Didemnidae*, *Asciacea*). *Zool Sci*. 2006 May;23(5):435-42.
 - Hoffmann T, Schütz A, Brosius M, Völker A, Völker U, Bremer E. High-salinity-induced iron limitation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 2002 Feb;184(3):718-27.
 - Höfte, M., Seong, K.Y., Jurkevitch, E. et al. Pyoverdinin production by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strain 7NSK2: Ecological significance in soil. *Plant Soil* (1991). 130, 249–257.
 - Hoiczky E, Hansel A. Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *J Bacteriol*. 2000 Mar;182(5):1191-9.
 - Huang TC, Lin RF, Chu MK, Chen HM. Organization and expression of nitrogen-fixation genes in the aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain RF-1. *Microbiology (Reading)*. 1999 Mar;145 (Pt 3):743-753.

- Huang X, Dong Y, Zhao J. HetR homodimer is a DNA-binding protein required for heterocyst differentiation, and the DNA-binding activity is inhibited by PatS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 6;101(14):4848-53.
- Huertas MJ, López-Maury L, Giner-Lamia J, Sánchez-Riego AM, Florencio FJ. Metals in cyanobacteria: analysis of the copper, nickel, cobalt and arsenic homeostasis mechanisms. *Life (Basel)*. 2014 Dec 9;4(4):865-86.
- Hussain, Sajid & Khaskheli, Dr-Maqsood. (2018). Sodium chloride stress during early growth stages altered physiological and growth characteristics of rice. *Chilean journal of agricultural research*. 78. 183-197.
- Imashimizu M, Yoshimura H, Katoh H, Ehira S, Ohmori M. NaCl enhances cellular cAMP and upregulates genes related to heterocyst development in the cyanobacterium, *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Nov 1;252(1):97-103.
- Inja Naga Bheema Lingewara Reddy, Beom-Ki Kim, In-Sun Yoon, Kyung-Hwan Kim, Taek-Ryoun Kwon, Salt Tolerance in Rice: Focus on Mechanisms and Approaches, *Rice Science*, Volume 24, Issue 3, 2017, Pages 123-144, ISSN 1672-6308.
- Irakoze, Willy & Prodjimoto, Hermann & Nijimbere, Séverin & Rufyikiri, Gervais. (2020). NaCl and Na₂SO₄ Salinities Have Different Impact on Photosynthesis and Yield-Related Parameters in Rice (*Oryza sativa* L.). *Agronomy*.
- Islam ST, Lam JS. Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway. *Can J Microbiol*. 2014 Nov;60(11):697-716.
- Issa, Ahmed & Abd-Alla, Mohamed & Ohyama, Takuji. (2014). Nitrogen Fixing Cyanobacteria: Future Prospect.
- Izquierdo Lázaro L, Biosíntesis del lipopolisacárido de *Klebsiella pneumoniae*. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, Facultad de Biología. 21 de marzo de 2003
- Izumo, Asako & Fujiwara, Shoko & Oyama, Yasunori & Satoh, Aya & Fujita, Naoko & Nakamura, Yasunori & Tsuzuki, Mikio. (2007). Physicochemical properties of starch in *Chlorella* change depending on

- the CO₂ concentration during growth: Comparison of structure and properties of pyrenoid and stroma starch. *Plant Science*. 172. 1138-1147.
- Jeanjean, Robert & Matthijs, Hans & Onana, Boyomo & Havaux, Michel & Joset, Françoise. (1993). Exposure of the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 to Salt Stress Induces Concerted Changes in Respiration and Photosynthesis. *Plant and Cell Physiology*. 34. 1073-1079.
 - Jensen PE, Leister D. Chloroplast evolution, structure and functions. *F1000Prime Rep*. 2014 Jun 2;6:40.
 - Jensen, Poul & Leister, Dario. (2014). Cyanobacteria as an Experimental Platform for Modifying Bacterial and Plant Photosynthesis. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*.
 - Jha, M., Prasad, A., Sharma, S. et al. Effects of fertilization rate and crop rotation on diazotrophic cyanobacteria in paddy field. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (2001). 17, 463–468.
 - Jittawuttipoka T, Planchon M, Spalla O, Benzerara K, Guyot F, Cassier-Chauvat C, Chauvat F. 2013. Multidisciplinary evidences that *Synechocystis* PCC6803 exopolysaccharides operate in cell sedimentation and protection against salt and metal stresses. *PLoS One*.
 - Jolly, Laure & Stinglele, Francesca. (2001). Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 11. 733-745.
 - Jung YS, Kwon YM. Small RNA ArrF regulates the expression of *sodB* and *feSII* genes in *Azotobacter vinelandii*. *Curr Microbiol*. 2008 Dec;57(6):593-7.
 - Kaneko T, Nakamura Y, Wolk CP, Kuritz T, Sasamoto S, Watanabe A, Iriguchi M, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takazawa M, Yamada M, Yasuda M, Tabata S. Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res*. 2001 Oct 31;8(5):205-13; 227-53.
 - Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S. Sequence

- analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. DNA Res. 1996 Jun 30;3(3):109-36.
- Kaushik MS, Srivastava M, Singh A, Mishra AK. Impairment of *ntcA* gene revealed its role in regulating iron homeostasis, ROS production and cellular phenotype under iron deficiency in cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. World J Microbiol Biotechnol. 2017 Aug;33(8):158.
 - Khangembam, Romi & Tiwari, Onkar & Kalita, Mohan. (2016). Production of exopolysaccharides by the cyanobacterium *Anabaena* sp. BTA992 and application as bioflocculants. Journal of Applied Biology and Biotechnology. 008-011.
 - Kiyota H, Hirai MY, Ikeuchi M. NblA1/A2-Dependent Homeostasis of Amino Acid Pools during Nitrogen Starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Metabolites. 2014 Jun 30;4(3):517-31.
 - Komárek, J. & Anagnostidis, K. (1998). Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. - In Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1 (Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, H. & Mollenhauer D. editors), 1- 548.
 - Komarek, Jiri & Kaštovský, Jan & Mares, Jan & Johansen, Jeffrey. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. Preslia -Praha-. 86. 295-335.
 - Krauspe V, Fahrner M, Spät P, Steglich C, Frankenberg-Dinkel N, Maček B, Schilling O, Hess WR. Discovery of a small protein factor involved in the coordinated degradation of phycobilisomes in cyanobacteria. Proc Natl Acad Sci USA. 2021 Feb 2;118(5):e2012277118.
 - Kumar K, Mella-Herrera RA, Golden JW. Cyanobacterial heterocysts. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010 Apr;2(4):a000315.
 - Kumar, Dhanesh & Kastanek, Petr & Adhikary, S.P.. (2018). Exopolysaccharides from Cyanobacteria and Microalgae and Their Commercial Application. Current Science. 115. 234-241.
 - Kunert A, Vinnemeier J, Erdmann N, Hagemann M. Repression by Fur is not the main mechanism controlling the iron-inducible *isiAB* operon in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. FEMS Microbiol Lett. 2003 Oct 24;227(2):255-62.

- Latifi A, Ruiz M, Zhang CC. Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2009 Mar;33(2):258-78.
- Lee JW, Helmann JD. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals.* 2007 Jun;20(3-4):485-99.
- Lembré, Pierre & Cecile, Lorentz & Di Martino, Patrick. (2012). Exopolysaccharides of the *Biofilm* Matrix: A Complex Biophysical World.
- Li P, Harding SE, Liu Z. Cyanobacterial exopolysaccharides: their nature and potential biotechnological applications. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2001; 18:375-404.
- Li Q, Reeves PR. Genetic variation of dTDP-L-rhamnose pathway genes in *Salmonella enterica*. *Microbiology (Reading).* 2000 Sep;146 (Pt 9):2291-2307.
- Li T, Huang X, Zhou R, Liu Y, Li B, Nomura C, Zhao J. Differential expression and localization of Mn and Fe superoxide dismutases in the heterocystous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol.* 2002 Sep;184(18):5096-103.
- Li, Lin & ZHU, Wei & Wang, Ting-ting & Luo, Yong-gang & Chen, Feng-lan & Tan, Xiao. (2013). Effect of fluid motion on colony formation in *Microcystis aeruginosa*. *Water Science and Engineering.* 6. 106-116.
- Likens G. E. (2010) *Biogeochemistry of Inland Waters.* Elsevier Science, London
- Linz AM, He S, Stevens SLR, Anantharaman K, Rohwer RR, Malmstrom RR, Bertilsson S, McMahon KD. Freshwater carbon and nutrient cycles revealed through reconstructed population genomes. *PeerJ.* 2018 Dec 10;6:e6075.
- Liu J, Mushegian A. Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases. *Protein Sci.* 2003 Jul;12(7):1418-31.
- Liu, Lizhen & Huang, Qi & Qin, Bo-Qiang. (2018). Characteristics and roles of *Microcystis* extracellular polymeric substances (EPS) in cyanobacterial blooms: A short review. *Journal of Freshwater Ecology.* 33. 183-193.
- Lombard J. The multiple evolutionary origins of the eukaryotic N-glycosylation pathway. *Biol Direct.* 2016 Aug 4;11:36.

- López-Gomollón S, Hernández JA, Pellicer S, Angarica VE, Peleato ML, Fillat MF. Cross-talk between iron and nitrogen regulatory networks in *anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC 7120: identification of overlapping genes in FurA and NtcA regulons. *J Mol Biol.* 2007 Nov 16;374(1):267-81.
- López-Gomollón S, Hernández JA, Wolk CP, Peleato ML, Fillat MF. Expression of furA is modulated by NtcA and strongly enhanced in heterocysts of *Anabaena* sp. PCC 7120. *Microbiology (Reading).* 2007 Jan;153(Pt 1):42-50.
- López-Gomollón S, Sevilla E, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF. New insights into the role of Fur proteins: FurB (AlI2473) from *Anabaena* protects DNA and increases cell survival under oxidative stress. *Biochem J.* 2009 Feb 15;418(1):201-7.
- Loredó-Osti, Catarina & López-Reyes, Lucía & Victoria, D.. (2004). Plant Growth-Promoting Bacteria in Association with Graminaceous Species: A Review. *Terra Latinoamericana.* 22. 225-239.
- Lu H, Liu J, Kerr PG, Shao H, Wu Y. The effect of periphyton on seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa*) in paddy area. *Sci Total Environ.* 2017 Feb 1;578:74-80.
- Lucarelli D, Vasil ML, Meyer-Klaucke W, Pohl E. The Metal-Dependent Regulators FurA and FurB from *Mycobacterium Tuberculosis*. *Int J Mol Sci.* 2008 Aug;9(8):1548-60.
- M.A, Aziz & M.A, Hashem. (2003). Role of Cyanobacteria in Improving Fertility of Saline Soil. *Pakistan Journal of Biological Sciences.*
- MacColl R. Cyanobacterial phycobilisomes. *J Struct Biol.* 1998 Dec 15;124(2-3):311-34.
- Macedo, M.O. & Resende, A.S. & Garcia, P.C. & Boddey, Robert & Jantalia, Cláudia & Urquiaga, Segundo & Campello, Eduardo & Franco, A.A.. (2008). Changes in soil C and N stocks and nutrient dynamics 13 years after recovery of degraded land using leguminous nitrogen-fixing trees. *Forest Ecology and Management.* 255. 1516-1524.
- Maćik, Mateusz & Gryta, Agata & Frac, M.. (2020). Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms.

- Maeda Y, Watanabe R, Harris CL, Hong Y, Ohishi K, Kinoshita K, Kinoshita T. PIG-M transfers the first mannose to glycosylphosphatidylinositol on the luminal side of the ER. *EMBO J.* 2001 Jan 15;20(1-2):250-61.
- Magnuson A, Cardona T. Thylakoid membrane function in heterocysts. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Mar;1857(3):309-19.
- Malik, Jitendra & Rahal, Anu & Kumar, Dinesh. (2020). Cyanobacterial (blue-green algae) toxins (Chapter 31). In *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (Third Edition)*. Ed. Ramesh C. Gupta. 27 April 2020, Pages 467-478.
- Marin K, Kanesaki Y, Los DA, Murata N, Suzuki I, Hagemann M. Gene expression profiling reflects physiological processes in salt acclimation of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiol.* 2004 Oct;136(2):3290-300.
- Massé E, Gottesman S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 2;99(7):4620-5.
- Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura S, Lee YC. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Anal Biochem.* 2005 Apr 1;339(1):69-72.
- Mauch-Mani B, Baccelli I, Luna E, Flors V. Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annu Rev Plant Biol.* 2017 Apr 28;68:485-512.
- Mazard SL, Fuller NJ, Orcutt KM, Bridle O, Scanlan DJ. PCR analysis of the distribution of unicellular cyanobacterial diazotrophs in the Arabian Sea. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Dec;70(12):7355-64.
- Meeks JC, Elhai J. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002 Mar;66(1):94-121.
- Mellin JR, Goswami S, Grogan S, Tjaden B, Genco CA. A novel fur- and iron-regulated small RNA, NrrF, is required for indirect fur-mediated regulation of the *sdhA* and *sdhC* genes in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol.* 2007 May;189(10):3686-94.

- Michel DuBois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and Fred Smith. Colorimetric method for the determination of sugars. *Analytical Chemistry* 1956 28 (3), 350-356.
- Michihiko Nakagawa, Yoshichika Takamura & Osami Yagi (1987) Isolation and Characterization of the Slime from a Cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* K-3A, *Agricultural and Biological Chemistry*, 51:2, 329-337.
- Miller, Christopher & Rose, Andrew & Waite, T.. (2016). Importance of Iron Complexation for Fenton-Mediated Hydroxyl Radical Production at Circumneutral pH. *Frontiers in Marine Science*.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2016. Anuario estadístico del sector agropecuario. Grupo De Informacion y Estadísticas Sectoriales Oficina Asesora De Planeacion Y Prospectiva. Bogota, D.C-Colombia. ISSN: 2346-4089
- Mitschke J, Vioque A, Haas F, Hess WR, Muro-Pastor AM. Dynamics of transcriptional start site selection during nitrogen stress-induced cell differentiation in *Anabaena* sp. PCC7120. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Dec 13;108(50):20130-5.
- Moisander PH, McClinton E 3rd, Paerl HW. Salinity effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria. *Microb Ecol*. 2002 May;43(4):432-442.
- Moisander PH, McClinton E 3rd, Paerl HW. Salinity effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria. *Microb Ecol*. 2002 May;43(4):432-442.
- Moore MT, Kröger R. Effect of three insecticides and two herbicides on rice (*Oryza sativa*) seedling germination and growth. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2010 Nov;59(4):574-81.
- Moreno Fernández, José & Vargas, M. Angeles & Olivares, Héctor & Rivas, Joaquín & Guerrero, Miguel. (1998). Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. *Journal of Biotechnology*. 60. 175-182.
- Morita, M., Xing, XH. & Unno, H. Synchronized shoot regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) calli on solid medium by adjustment of intracellular 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration. *Plant Cell Reports* (1999). 18, 633–639.

- Mozzi F, Savoy de Giori G, Font de Valdez G. UDP-galactose 4-epimerase: a key enzyme in exopolysaccharide formation by *Lactobacillus casei* CRL 87 in controlled pH batch cultures. *J Appl Microbiol.* 2003;94(2):175-83. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01821.x. PMID: 12534808.
- Mukhopadhyay A, He Z, Alm EJ, Arkin AP, Baidoo EE, Borglin SC, Chen W, Hazen TC, He Q, Holman HY, Huang K, Huang R, Joyner DC, Katz N, Keller M, Oeller P, Redding A, Sun J, Wall J, Wei J, Yang Z, Yen HC, Zhou J, Keasling JD. Salt stress in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: an integrated genomics approach. *J Bacteriol.* 2006 Jun;188(11):4068-78.
- Müller V, Oren A. Metabolism of chloride in halophilic prokaryotes. *Extremophiles.* 2003 Aug;7(4):261-6.
- Murphy ER, Payne SM. RyhB, an iron-responsive small RNA molecule, regulates *Shigella dysenteriae* virulence. *Infect Immun.* 2007 Jul;75(7):3470-7.
- Murry, Marcia & Hallenbeck, Patrick & Esteva, Diane & Benemann, John. (2011). Nitrogenase inactivation by oxygen and enzyme turnover in *Anabaena cylindrica*. *Canadian Journal of Microbiology.* 29. 1286-1294.
- Nagarajan A, Zhou M, Nguyen AY, Liberton M, Kedia K, Shi T, Piehowski P, Shukla A, Fillmore TL, Nicora C, Smith RD, Koppelaar DW, Jacobs JM, Pakrasi HB. Proteomic Insights into Phycobilisome Degradation, A Selective and Tightly Controlled Process in The Fast-Growing Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *Biomolecules.* 2019 Aug 16;9(8):374.
- Nakao M, Okamoto S, Kohara M, Fujishiro T, Fujisawa T, Sato S, Tabata S, Kaneko T, Nakamura Y. CyanoBase: the cyanobacteria genome database update 2010. *Nucleic Acids Res.* 2010 Jan;38(Database issue):D379-81.
- Napolitano M, Rubio MÁ, Santamaría-Gómez J, Olmedo-Verd E, Robinson NJ, Luque I. Characterization of the response to zinc deficiency in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol.* 2012 May;194(10):2426-36.

- Newton RJ, Jones SE, Eiler A, McMahon KD, Bertilsson S. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011 Mar;75(1):14-49.
- Nguyen AY, Bricker WP, Zhang H, Weisz DA, Gross ML, Pakrasi HB. The proteolysis adaptor, NblA, binds to the N-terminus of β -phycocyanin: Implications for the mechanism of phycobilisome degradation. *Photosynth Res.* 2017 Apr;132(1):95-106.
- Nriagu JO (1978) Production and uses of sulfur. In: Nriagu JO (ed) *Sulfur in the environment, part 1: the atmospheric cycle.* Wiley, New York, pp 1–21
- Oborník M. Endosymbiotic Evolution of Algae, Secondary Heterotrophy and Parasitism. *Biomolecules.* 2019 Jul 8;9(7):266.
- Oglesby AG, Farrow JM 3rd, Lee JH, Tomaras AP, Greenberg EP, Pesci EC, Vasil ML. The influence of iron on *Pseudomonas aeruginosa* physiology: a regulatory link between iron and quorum sensing. *J Biol Chem.* 2008 Jun 6;283(23):15558-67.
- Oglesby-Sherrouse AG, Murphy ER. Iron-responsive bacterial small RNAs: variations on a theme. *Metallomics.* 2013 Apr;5(4):276-86.
- Okajima MK, Sornkamnerd S, Kaneko T. Development of Functional Bionanocomposites Using Cyanobacterial Polysaccharides. *Chem Rec.* 2018 Jul;18(7-8):1167-1177.
- Oren A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Syst.* 2008 Apr 15;4:2.
- Oren, Aharon. (2013). *Life in Magnesium- and Calcium-Rich Hypersaline Environments: Salt Stress by Chaotropic Ions.*
- Otero, Ana & Vincenzini, Massimo. (2004). *Nostoc (Cyanophyceae) goes nude: Extracellular polysaccharides serve as a sink for reducing power under unbalanced C/N metabolism.* *Journal of Phycology.* 40. 74 - 81.
- O'Toole GA. Microtiter dish *biofilm* formation assay. *J Vis Exp.* 2011 Jan 30;(47):2437.
- Padalon-Brauch G, Hershberg R, Elgrably-Weiss M, Baruch K, Rosenshine I, Margalit H, Altuvia S. Small RNAs encoded within genetic islands of *Salmonella typhimurium* show host-induced expression and role in virulence. *Nucleic Acids Res.* 2008 Apr;36(6):1913-27.

- Padalon-Brauch G, Hershberg R, Elgrably-Weiss M, Baruch K, Rosenshine I, Margalit H, Altuvia S. Small RNAs encoded within genetic islands of *Salmonella typhimurium* show host-induced expression and role in virulence. *Nucleic Acids Res.* 2008 Apr;36(6):1913-27.
- Pade N, Hagemann M. Salt acclimation of cyanobacteria and their application in biotechnology. *Life (Basel).* 2014 Dec 29;5(1):25-49.
- Paerl H. The cyanobacterial nitrogen fixation paradox in natural waters. *F1000Res.* 2017 Mar 9;6:244.
- Paul S, Aggarwal C, Thakur JK, Bandappa GS, Khan MA, Pearson LM, Babnigg G, Giometti CS, Joachimiak A. Induction of osmoadaptive mechanisms and modulation of cellular physiology help *Bacillus licheniformis* strain SSA 61 adapt to salt stress. *Curr Microbiol.* 2015 Apr;70(4):610-7.
- Paul Szpak, Jean-François Millaire, Christine D. White, Fred J. Longstaffe, Influence of seabird guano and camelid dung fertilization on the nitrogen isotopic composition of field-grown maize (*Zea mays*), *Journal of Archaeological Science*, Volume 39, Issue 12, 2012, Pages 3721-3740.
- Peca L, Kós PB, Máté Z, Farsang A, Vass I. Construction of bioluminescent cyanobacterial reporter strains for detection of nickel, cobalt and zinc. *FEMS Microbiol Lett.* 2008 Dec;289(2):258-64.
- Pecqueur L, D'Autréaux B, Dupuy J, Nicolet Y, Jacquamet L, Brutscher B, Michaud-Soret I, Bersch B. Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *J Biol Chem.* 2006 Jul 28;281(30):21286-95.
- Pereira S, Zille A, Micheletti E, Moradas-Ferreira P, De Philippis R, Tamagnini P. Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiol Rev.* 2009 Sep;33(5):917-41.
- Perez R, Wörmer L, Sass P, Maldener I. A highly asynchronous developmental program triggered during germination of dormant akinetes of filamentous diazotrophic cyanobacteria. *FEMS Microbiol Ecol.* 2018 Jan 1;94(1).

- Perez R, Wörmer L, Sass P, Maldener I. A highly asynchronous developmental program triggered during germination of dormant akinetes of filamentous diazotrophic cyanobacteria. *FEMS Microbiol Ecol.* 2018 Jan 1;94(1).
- Pérez Vélez. JP. 2014. Uso de los fertilizantes y su impacto en la producción agrícola. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Biociencias. Medellín, Colombia.
- Peters, G.A. *Azolla* and other plant-cyanobacteria symbioses: Aspects of form and function. *Plant Soil* (1991). 137, 25–36.
- Pinilla V., Willebald H. (2018) Agricultural Development in the World Periphery: A General Overview. In: Pinilla V., Willebald H. (eds) *Agricultural Development in the World Periphery*. Palgrave Studies in Economic History. Palgrave Macmillan, Cham.
- Pohl E, Haller JC, Mijovilovich A, Meyer-Klaucke W, Garman E, Vasil ML. Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol.* 2003 Feb;47(4):903-15.
- Poolman B, Glaasker E. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol Microbiol.* 1998 Jul;29(2):397-407.
- Potts M. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev.* 1994 Dec;58(4):755-805.
- Potts M. Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *European Journal of Phycology.* 1999;34:319–328
- Prasanna R, Kumar R, Sood A, Prasanna BM, Singh PK. Morphological, physiochemical and molecular characterization of *Anabaena* strains. *Microbiol Res.* 2006;161(3):187-202.
- Prasanna, R., Nayak, S. Influence of diverse rice soil ecologies on cyanobacterial diversity and abundance. *Wetlands Ecol Manage* (2007). 15, 127–134
- Pugh N, Ross SA, EISohly HN, EISohly MA, Pasco DS. Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Planta Med.* 2001 Nov;67(8):737-42.

- Qasba PK, Ramakrishnan B, Boeggeman E. Substrate-induced conformational changes in glycosyltransferases. *Trends Biochem Sci.* 2005 Jan;30(1):53-62.
- Quesada A, Valiente EF. Relationship Between Abundance of N₂-fixing Cyanobacteria and Environmental Features of Spanish Rice Fields. *Microb Ecol.* 1996 Jul;32(1):59-71.
- Qurashi AW, Sabri AN. Bacterial exopolysaccharide and *biofilm* formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Braz J Microbiol.* 2012 Jul;43(3):1183-91.
- Rai S, Agrawal C, Shrivastava AK, Singh PK, Rai LC. Comparative proteomics unveils cross species variations in *Anabaena* under salt stress. *J Proteomics.* 2014 Feb 26;98:254-70.
- Ramey BE, Koutsoudis M, von Bodman SB, Fuqua C. *Biofilm* formation in plant-microbe associations. *Curr Opin Microbiol.* 2004 Dec;7(6):602-9.
- Rani, Nisha & Kaushik, Anubha & Kaushik, Chandra. (2007). Effect of indigenous cyanobacterial application on structural stability and productivity of an organically poor semi-arid soil. *Geoderma.* 138. 49-56.
- Rastogi, Rajesh & Madamwar, Datta & Incharoensakdi, Aran. (2015). Multiple defense systems in cyanobacteria in response to solar UV radiation.
- Reeves PR, Hobbs M, Valvano MA, Skurnik M, Whitfield C, Coplin D, Kido N, Klena J, Maskell D, Raetz CR, Rick PD. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol.* 1996 Dec;4(12):495-503.
- Rhee, G-Yull & Lederman, Timothy. (2004). Effects of nitrogen sources on P-limited growth of *Anabaena flos-aquae*. *Journal of Phycology.* 19. 179 - 185.
- Richaud C, Zabulon G, Joder A, Thomas JC. Nitrogen or sulfur starvation differentially affects phycobilisome degradation and expression of the *nblA* gene in *Synechocystis* strain PCC 6803. *J Bacteriol.* 2001 May;183(10):2989-94.
- Rincón, A; C Prósperi & E Fernández Valiente. 2003. Fijación de nitrógeno en la cianobacteria *Chroococcus limneticus* y su relación con la actividad superóxido dismutasa. *Revista de Ciencia y Tecnología* (8): 115-123.

- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., and Stainer, R.Y. (1979). Generic assignments. Strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiology*. 111:1-61.
- Robles-Rengel R, Florencio FJ, Muro-Pastor MI. Redox interference in nitrogen status via oxidative stress is mediated by 2-oxoglutarate in cyanobacteria. *New Phytol*. 2019 Oct;224(1):216-228.
- Rodrigo A., S. Recous, C. Neel y B. Mary. 1997. Modelling temperature and moisture effects on C-N transformations in soils: comparison of nine models. *Ecol. Model*. 102: 325-339
- Romi K, Angom TD, Chungkham S, Aribam S, Sh Ojit SK, Avijeet SO, Gunapati O, Thingujam I, Wangkhem ID, Kangjam SD, Longjam M, Onkar NT, Girdhari LT, Mohan Ch K (2015). Studies on biofloculant exopolysaccharides production by *Lyngbya* sp. BTA166 and *Anabaena* sp. BTA35. *Annals of Biological Research*, 6 (11):47-54.
- Rossi F, De Philippis R. Role of cyanobacterial exopolysaccharides in phototrophic *biofilms* and in complex microbial mats. *Life (Basel)*. 2015 Apr 1;5(2):1218-38.
- Rossi F., De Philippis R. (2016) Exocellular Polysaccharides in Microalgae and Cyanobacteria: Chemical Features, Role and Enzymes and Genes Involved in Their Biosynthesis. In: Borowitzka M., Beardall J., Raven J. (eds) *The Physiology of Microalgae*. Developments in Applied Phycology, vol 6. Springer, Cham.
- Rowell, D.L. 1994. *Soil Science: methods and applications*. London. Longman. 350 p
- Rudolf M, Kranzler C, Lis H, Margulis K, Stevanovic M, Keren N, Schleiff E. Multiple modes of iron uptake by the filamentous, siderophore-producing cyanobacterium, *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol Microbiol*. 2015 Aug;97(3):577-88.
- Salinas SR, Bianco MI, Barreras M, Ielpi L. Expression, purification and biochemical characterization of GumI, a monotopic membrane GDP-mannose:glycolipid 4- β -D-mannosyltransferase from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Glycobiology*. 2011 Jul;21(7):903-13.

- Salinas, Silvina R. (2013). Caracterización bioquímica y estructural de glicosiltransferasas bacterianas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Sam, Ofelia. "Influencia de la salinidad en las radículas de plantulas de arroz (*Oryza sativa*)." *Cultivos Tropicales*, vol. 28, no. 1, 2007, p. 25+
- Sampedro M.A., Blanco A., Llama M.J. and Serra J.L. 1995. Sorption of heavy metals to *Phormidium laminosum* biomass. *Biotechnol. appl. Biochem.* 22: 355-366
- Sanchez, Cecilia & Benintende, S.M. & Benintende, María. (2011). Cianobacterias en diferentes estadios fenológicos del cultivo de arroz en Entre Ríos (Argentina). *Ciencia del suelo.* 29. 181-189.
- Sánchez-Baracaldo, P., Hayes, PK., & Blank, CE. (2005). Morphological and habitat evolution in the Cyanobacteria using a compartmentalization approach. *Geobiology*, 3 (3), 145 - 165.
- Sao, Shweta & Samuel, Kritika. (2018). STUDY OF CYANOBACTERIA AS BIOFERTILIZER FROM THE RICE FIELD. *World Journal of Pharmaceutical Research*.
- Saqrane S, El Ghazali I, Oudra B, Bouarab L, Vasconcelos V. Effects of cyanobacteria producing microcystins on seed germination and seedling growth of several agricultural plants. *J Environ Sci Health B.* 2008 Jun;43(5):443-51.
- Sauer J, Schreiber U, Schmid R, Völker U, Forchhammer K. Nitrogen starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942. Low-level photosynthesis as a mechanism of long-term survival. *Plant Physiol.* 2001 May;126(1):233-43.
- Savita Singh, Chapter 10 - Cyanobacteria and Their Role Under Elevated CO₂ Conditions, Editor(s): Krishna Kumar Choudhary, Ajay Kumar, Amit Kishore Singh, *Climate Change and Agricultural Ecosystems*, Woodhead Publishing, 2019, Pages 249-263.
- Schwarz R, Forchhammer K. Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a complex network of cellular responses. *Microbiology (Reading).* 2005 Aug;151(Pt 8):2503-2514.
- Scotese, Christopher. (2015). PALEOMAP Project Paleoglobe Gores.

- Sein-Echaluce VC, González A, Napolitano M, Luque I, Barja F, Peleato ML, Fillat MF. Zur (FurB) is a key factor in the control of the oxidative stress response in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Environ Microbiol.* 2015 Jun;17(6):2006-17.
- Sein-Echaluce VC. (2016). Estudio funcional de la proteína furb (zur) de *anabaena* sp. PCC7120: caracterización bioquímica e implicación en la respuesta a estrés oxidativo. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Sendersky E, Kozer N, Levi M, Moizik M, Garini Y, Shav-Tal Y, Schwarz R. The proteolysis adaptor, NbIA, is essential for degradation of the core pigment of the cyanobacterial light-harvesting complex. *Plant J.* 2015 Sep;83(5):845-52.
- Sevilla E, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF. Fur-like proteins: Beyond the ferric uptake regulator (Fur) paralog. *Arch Biochem Biophys.* 2021 Jan
- Sevilla E, Martín-Luna B, González A, Gonzalo-Asensio JA, Peleato ML, Fillat MF. Identification of three novel antisense RNAs in the fur locus from unicellular cyanobacteria. *Microbiology (Reading).* 2011 Dec;157(Pt 12):3398-3404.
- Sevilla E, Sarasa-Buisan C, González A, Cases R, Kufryk G, Peleato ML, Fillat MF. Regulation by FurC in *Anabaena* Links the Oxidative Stress Response to Photosynthetic Metabolism. *Plant Cell Physiol.* 2019 Aug 1;60(8):1778-1789.
- Silalertruksa, Thapat & Gheewala, Shabbir & Mungkung, Rattanawan & Nilsalab, Pariyapat & Lecksiwilai, Naruetep & Sawaengsak, Wanchat. (2017). Implications of Water Use and Water Scarcity Footprint for Sustainable Rice Cultivation. *Sustainability.*
- Singh AK, Sherman LA. Identification of iron-responsive, differential gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 with a customized amplification library. *J Bacteriol.* 2000 Jun;182(12):3536-43.
- Singh JS, Kumar A, Rai AN, Singh DP. Cyanobacteria: A Precious Bio-resource in Agriculture, Ecosystem, and Environmental Sustainability. *Front Microbiol.* 2016 Apr 21;7:529. doi: 10.3389/fmicb.2016.00529. PMID: 27148218; PMCID: PMC4838734.
- Singh M, Sharma NK, Prasad SB, Yadav SS, Narayan G, Rai AK. The freshwater cyanobacterium *Anabaena doliolum* transformed with

- ApGSMT-DMT exhibited enhanced salt tolerance and protection to nitrogenase activity, but became halophilic. *Microbiology (Reading)*. 2013 Mar;159(Pt 3):641-648.
- Singh, Nirbhay & Dhar, Dolly. (1970). Cyanobacterial Reclamation of Salt-Affected Soil.
 - Singh, P., Fatma, A. & Mishra, A.K. Molecular phylogeny and evogenomics of heterocystous cyanobacteria using *rbcl* gene sequence data. *Ann Microbiol* (2015). 65, 799–807.
 - Smaldone GT, Antelmann H, Gaballa A, Helmann JD. The FsrA sRNA and FbpB protein mediate the iron-dependent induction of the *Bacillus subtilis* lutABC iron-sulfur-containing oxidases. *J Bacteriol*. 2012 May;194(10):2586-93.
 - Sohm JA, Edwards BR, Wilson BG, Webb EA. Constitutive Extracellular Polysaccharide (EPS) Production by Specific Isolates of *Crocospaera watsonii*. *Front Microbiol*. 2011 Nov 15;2:229.
 - Song W, Zhao C, Zhang D, Mu S, Pan X. Different Resistance to UV-B Radiation of Extracellular Polymeric Substances of Two Cyanobacteria from Contrasting Habitats. *Front Microbiol*. 2016 Aug 22;7:1208.
 - Srivastava, A.K., Bhargava, P. & Rai, L.C. Salinity and Copper-Induced Oxidative Damage and Changes in the Antioxidative Defence Systems of *Anabaena doliolum*. *World J Microbiol Biotechnol* 21, 1291–1298 (2005).
 - Stal LJ. The effect of oxygen concentration and temperature on nitrogenase activity in the heterocystous cyanobacterium *Fischerella* sp. *Sci Rep*. 2017 Jul 14;7(1):5402.
 - Stebegg R, Wurzinger B, Mikulic M, Schmetterer G. Chemoheterotrophic growth of the Cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 dependent on a functional cytochrome c oxidase. *J Bacteriol*. 2012 Sep;194(17):4601-7.
 - Steenackers HP, Parijs I, Dubey A, Foster KR, Vanderleyden J. Experimental evolution in *biofilm* populations. *FEMS Microbiol Rev*. 2016 May;40(3):373-97.
 - Steil L, Hoffmann T, Budde I, Völker U, Bremer E. Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *J Bacteriol*. 2003 Nov;185(21):6358-70.

- Stevens, S.E., Balkwill, D.L. & Paone, D.A.M. The effects of nitrogen limitation on the ultrastructure of the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. Arch. Microbiol. (1981). 130, 204–212.
- Strahl-Bolsinger S, Immervoll T, Deutzmann R, Tanner W. PMT1, the gene for a key enzyme of protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA. 1993 Sep 1;90(17):8164-8.
- Sukenik, Assaf & Rücker, Jacqueline & Maldener, Iris. (2019). Dormant Cells (Akinetes) of Filamentous Cyanobacteria Demonstrate a Great Variability in Morphology, Physiology, and Ecological Function.
- Supari, Nurhaziqah & Hanapi, Siti Zulaiha & Alam, Siti & Javed, M A & Mohd Din, Abd Rahman Jabir & Lee, Chew Tin & Abd Rashid, Siti & Annuar, Nur & Sarmidi, Mohamad. (2014). Microbial Effects on Seed Germination in Malaysian rice (*Oryza sativa* L.). Proceedings of the Asia-Pacific Advanced Network.
- Sutherland I. *Biofilm* exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology (Reading). 2001 Jan;147(Pt 1):3-9.
- Sutherland, I. (1990). Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides (Cambridge Studies in Biotechnology). Cambridge: Cambridge University Press.
- Swapnil P, Rai AK. Physiological responses to salt stress of salt-adapted and directly salt (NaCl and NaCl+Na₂SO₄ mixture)-stressed cyanobacterium *Anabaena fertilissima*. Protoplasma. 2018 May;255(3):963-976.
- Swapnil, Prashant & Singh, Meenakshi & S, Singh & Sharma, Naveen & Rai, Ak. (2015). Recombinant glycinebetaine improves metabolic activities, ionic balance and salt tolerance in diazotrophic freshwater cyanobacteria. Algal Research. 11. 195-203.
- Swapnil, Prashant & Yadav, Amarish & Shrivastav, Saurabh & Sharma, Naveen & Shrikrishna, S & Rai, Ak. (2017). Biphasic ROS accumulation and programmed cell death in a cyanobacterium exposed to salinity (NaCl and Na₂SO₄). Algal Research. 23. 88-95.
- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. STRING v10: protein-protein interaction

- networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan;43(Database issue):D447-52.
- Takahashi M, Inoue N, Ohishi K, Maeda Y, Nakamura N, Endo Y, Fujita T, Takeda J, Kinoshita T. PIG-B, a membrane protein of the endoplasmic reticulum with a large lumenal domain, is involved in transferring the third mannose of the GPI anchor. *EMBO J.* 1996 Aug 15;15(16):4254-61.
 - Talyshinsky MM, Souprun YY, Huleihel MM. Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses. *Cancer Cell Int.* 2002 Jul 5;2(1):8.
 - Tamary E, Kiss V, Nevo R, Adam Z, Bernát G, Rexroth S, Rögner M, Reich Z. Structural and functional alterations of cyanobacterial phycobilisomes induced by high-light stress. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Feb;1817(2):319-27.
 - Taniguchi, N. & Honke, Koichi & Fukuda, M. & Narimatsu, H. & Yamaguchi, Y. & Angata, T.. (2014). *Handbook of glycosyltransferases and related genes*, second edition.
 - Taujale R, Venkat A, Huang LC, Zhou Z, Yeung W, Rasheed KM, Li S, Edison AS, Moremen KW, Kannan N. Deep evolutionary analysis reveals the design principles of fold A glycosyltransferases. *Elife.* 2020 Apr 1;9:e54532.
 - Teasdale, Serena & Wu, Xuxu & Ye, Leiping & Hackney, Christopher. (2018). The identification and extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from sediments.
 - Tease BE Walker RW (1987) Comparative composition of the sheath of the cyanobacterium *Gloeothoece* ATCC 27152 cultured with and without combined nitrogen. *J Gen Microbiol*133: 3331–3339.
 - Tegl G, Nidetzky B. Leloir glycosyltransferases of natural product C-glycosylation: structure, mechanism and specificity. *Biochem Soc Trans.* 2020 Aug 28;48(4):1583-1598.
 - Terrapon, Nicolas & Lombard, Vincent & Drula, Elodie & Coutinho, Pedro & Henrissat, Bernard. (2017). *The CAZy Database/the Carbohydrate-Active Enzyme (CAZy) Database: Principles and Usage Guidelines.*

- Thiel T, Pratte BS. Regulation of Three Nitrogenase Gene Clusters in the Cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Life* (Basel). 2014 Dec 11;4(4):944-67.
- Tischer RG Davis EB (1971) The effect of various nitrogen sources upon the production of extracellular polysaccharide by blue-green alga *Anabaena flos-aquae* A 37. *J Exp Bot*22: 546–551
- Tiwari ON, Khangembam R, Shamjetshabam M, Sharma AS, Oinam G, Brand JJ. Characterization and Optimization of Biofloculant Exopolysaccharide Production by Cyanobacteria *Nostoc* sp. BTA97 and *Anabaena* sp. BTA990 in Culture Conditions. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015 Aug;176(7):1950-63.
- Turner, S. & Huang, T.-C & Chaw, S.-M. (2001). Molecular phylogeny of nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 42. 181-186.
- Underwood, G. J. C. Paterson, D. M. Parkes, R. J., (1995), The measurement of microbial carbohydrate exopolymers from intertidal sediments, *Limnology and Oceanography*.
- UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan;43(Database issue):D204-12.
- van de Meene AM, Hohmann-Marriott MF, Vermaas WF, Roberson RW. The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch Microbiol*. 2006 Jan;184(5):259-70.
- Wang B, Eckert C, Maness PC, Yu J. A Genetic Toolbox for Modulating the Expression of Heterologous Genes in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *ACS Synth Biol*. 2018 Jan 19;7(1):276-286. doi: 10.1021/acssynbio.7b00297. Epub 2017 Dec 22. PMID: 29232504.
- Wang D, Xu A, Elmerich C, Ma LZ. *Biofilm* formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions. *ISME J*. 2017 Jul;11(7):1602-1613.
- Wang SD, Guo GS, Li L, Cao LC, Tong L, Ren GH, Liu YH. Identification and characterization of an unusual glycosyltransferase-like enzyme with β -galactosidase activity from a soil metagenomic library. *Enzyme Microb Technol*. 2014 Apr 10;57:26-35.

- Ward MH. Too much of a good thing? Nitrate from nitrogen fertilizers and cancer. *Rev Environ Health*. 2009 Oct-Dec;24(4):357-63.
- Waggoner PE, Ausubel JH. Nitrogen fertilizer: retrospect and prospect. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Feb 16;96(4):1175-80.
- Whitfield C, Williams DM, Kelly SD. Lipopolysaccharide O-antigen-bacterial glycans made to measure. *J Biol Chem*. 2020 Jul 31;295(31):10593-10609.
- Whitfield C. Bacterial extracellular polysaccharides. *Can J Microbiol*. 1988 Apr;34(4):415-20.
- Whitfield C. Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol*. 1995 May;3(5):178-85.
- Wilderman PJ, Sowa NA, FitzGerald DJ, FitzGerald PC, Gottesman S, Ochsner UA, Vasil ML. Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Jun 29;101(26):9792-7.
- Wilk L, Strauss M, Rudolf M, Nicolaisen K, Flores E, Kühlbrandt W, Schleiff E. Outer membrane continuity and septosome formation between vegetative cells in the filaments of *Anabaena* sp. PCC 7120. *Cell Microbiol*. 2011 Nov;13(11):1744-54.
- Willis LM, Whitfield C. Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydr Res*. 2013 Aug 30;378:35-44.
- Woelfle MA, Johnson CH. No promoter left behind: global circadian gene expression in cyanobacteria. *J Biol Rhythms*. 2006 Dec;21(6):419-31.
- Wolk CP. Heterocyst formation. *Annu Rev Genet*. 1996;30:59-78.
- Wong FCY, Meeks JC. Establishment of a functional symbiosis between the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* and the bryophyte *Anthoceros punctatus* requires genes involved in nitrogen control and initiation of heterocyst differentiation. *Microbiology (Reading)*. 2002 Jan;148(Pt 1):315-323.
- Wood NB, Haselkorn R. Control of phycobiliprotein proteolysis and heterocyst differentiation in *Anabaena*. *J Bacteriol*. 1980 Mar;141(3):1375-85.

- Xiong, J. and C. E. Bauer (2002). "Complex evolution of photosynthesis." *Annual Review of Plant Biology* 53(1): 503-521.
- Yaakop AS, Chan KG, Ee R, Lim YL, Lee SK, Manan FA, Goh KM. Characterization of the mechanism of prolonged adaptation to osmotic stress of *Jeotgalibacillus malaysiensis* via genome and transcriptome sequencing analyses. *Sci Rep.* 2016 Sep 19;6:33660.
- Yamanaka, G., Glazer, A.N. Dynamic aspects of phycobilisome structure. *Arch. Microbiol.* 124, 39–47 (1980). <https://doi.org/10.1007/BF00407026>
- Yingping F, Lemeille S, Talla E, Janicki A, Denis Y, Zhang CC, Latifi A. Unravelling the cross-talk between iron starvation and oxidative stress responses highlights the key role of PerR (alr0957) in peroxide signalling in the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7120. *Environ Microbiol Rep.* 2014 Oct;6(5):468-75.
- Yoshimura H, Okamoto S, Tsumuraya Y, Ohmori M. Group 3 sigma factor gene, sigJ, a key regulator of desiccation tolerance, regulates the synthesis of extracellular polysaccharide in cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res.* 2007 Feb 28;14(1):13-24.
- Yoshimura, H., Kotake, T., Aohara, T. et al. The role of extracellular polysaccharides produced by the terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. strain HK-01 in NaCl tolerance. *J Appl Phycol* 24, 237–243 (2012).
- Zhang T, Zhang C, Li S, Zhang Y, Yang Z. Growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST1 in skim milk. *Braz J Microbiol.* 2011 Oct;42(4):1470-8.
- Zhao W, Guo Q, Zhao J. A membrane-associated Mn-superoxide dismutase protects the photosynthetic apparatus and nitrogenase from oxidative damage in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Plant Cell Physiol.* 2007 Apr;48(4):563-72.
- Zhaxybayeva O, Gogarten JP, Charlebois RL, Doolittle WF, Papke RT. Phylogenetic analyses of cyanobacterial genomes: quantification of horizontal gene transfer events. *Genome Res.* 2006 Sep;16(9):1099-108.
- Zhou R, Wolk CP. Identification of an akinete marker gene in *Anabaena variabilis*. *J Bacteriol.* 2002 May;184(9):2529-32.