

PAULUCCI, NATALIA SO  
Participacion de lip

2012

71256

71256

MFN:
Clasif:
T-786

71256



Universidad Nacional de Río Cuarto  
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales  
Departamento de Biología Molecular

**Participación de lípidos y ácidos grasos de cepas nativas de rizobios y *Rhizobium* TAL 1000, nodulantes de maní, en la respuesta al estrés por temperatura y salinidad. Implicancia de posibles desaturasas**

**TESIS DOCTORAL**

Paulucci Natalia Soledad  
Marzo de 2012

**Participación de lípidos y ácidos grasos de cepas nativas de rizobios y *Rhizobium*  
TAL 1000, nodulantes de maní, en la respuesta al estrés por temperatura y  
salinidad. Implicancia de posibles desaturasas**

Tesis doctoral que presenta la Licenciada en Ciencias Biológicas, Paulucci Natalia  
Soledad, para aspirar al título de Doctora en Ciencias Biológicas

Autor

Lic. Paulucci Natalia Soledad

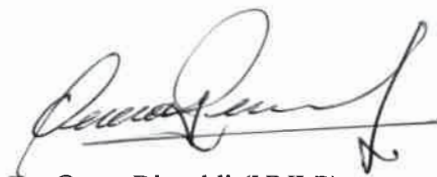
Director

Dra. García Mirta Beatriz

**JURADO**

Dra. Alicia Godeas (UBA)

  
Dra. Gloria Lucchesi (UNRC)

  
Dr. Omar Rimoldi (UNLP)

*A mis padres y a mi hijo con mucho amor*

## Agradecimientos

Simplemente a todos los que depositaron su confianza en mí.....

## Resumen

Los ácidos grasos monoinsaturados tienen un profundo efecto sobre las propiedades físicas de las membranas citoplasmáticas, entre ellas la fluidez. En este trabajo de tesis se estudió por primera vez la composición de ácidos grasos y la biosíntesis de fosfolípidos y ácido grasos de dos cepas nodulantes de maní: *Rhizobium* TAL 1000 (cepa de colección) y L115 (cepa aislada de rizosfera de plantas de maní, de la zona manisera de la provincia de Córdoba). Además, se evaluó el efecto de la hipersalinidad y de la hipertermia sobre la composición y la biosíntesis de ácidos grasos y fosfolípidos de dichas cepas de rizobios. En ambas cepas tanto la composición como la biosíntesis de AG fueron modificadas principalmente por efecto de la hipertermia. El cambio más importante, referido a la composición de ácidos grasos, fue una disminución del grado de insaturación de los ácidos grasos y en cuanto a la biosíntesis, una disminución de la biosíntesis de ácidos grasos monoinsaturados. En *Rhizobium* TAL 1000, estos cambios podrían ser considerados como la respuesta al aumento en la fluidez de la membrana que ocurre a los pocos minutos de ocurrido el aumento de temperatura. Además, la hipertermia ocasionó también cambios a nivel de la biosíntesis de fosfolípidos en ambas cepas rizobiales, afectando principalmente la biosíntesis de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

La manera en que los microorganismos modifican sus ácidos grasos componentes frente a un cambio en la condiciones del medio, está relacionada con el mecanismo de síntesis. En este trabajo, describimos por medio de técnicas moleculares y bioquímicas la presencia de una enzima  $\Delta^9$  desaturasa en *Rhizobium* TAL 1000, que utiliza los ácidos grasos 16:0 y 18:0 como sustratos y que su actividad es regulada por la temperatura de crecimiento. Estudios de shock térmico, determinaron que a las 2 h del cambio de temperatura, las células de *Rhizobium* TAL 1000, modifican la biosíntesis de ácidos grasos monoinsaturados. La expresión del gen desaturasa no fue modificada por efecto del shock térmico, pero sí por el crecimiento a 37°C, lo que indica diferentes mecanismos de regulación en función del tiempo de exposición de *Rhizobium* TAL 1000 a 37°C.

## Índice de contenidos

	Abreviaturas empleadas	12
<b>1.</b>	<b>Introducción</b>	<b>14</b>
1.1	Las leguminosas	15
1.1.a	<i>Arachis hypogaea</i> (maní): una leguminosa de mucha importancia en Argentina	15
1.2	Los rizobios	17
1.2.a	La simbiosis	18
1.2.b	La fijación biológica del nitrógeno	18
1.3	Respuesta al estrés	19
1.3.a	¿Qué es la respuesta al estrés?	19
1.3.b	La salinidad y los rizobios	20
1.3.c	La temperatura y los rizobios	22
1.4	La envoltura celular de las bacterias	23
1.5	La membrana interna bacteriana	24
1.5.a	Estructura y composición	24
1.5.b	Funciones de la membrana interna	27
1.6	Síntesis de lípidos de membrana en bacterias	28
1.6.a	Síntesis de fosfolípidos en bacterias	28
1.6.b	Síntesis de ácidos grasos en bacterias	33
1.7	Enzimas desaturasas	38
1.7.a	Enzimas desaturasas en bacterias	40
1.8	Efecto del estrés sobre los componentes de membrana	41
1.8.a	Papel de las desaturasas bacterianas en la adaptación a cambios de temperatura	45
1.9	Topología de membrana y métodos de estudio	46
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	<b>49</b>
<b>3</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>51</b>
3.1	Material biológico	52
3.1.a	Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	52
3.2	Medios de cultivo utilizados en este estudio	54
3.2.a	Medio TY	54
3.2.b	Medio YEM	54
3.2.c	Medio B	54
3.2.d	Medio LB	55
3.3	Incorporación de acetato radioactivo en las células de <i>R. TAL</i> 1000 y L115	55
3.4	Extracción de lípidos	55
3.4.a	Separación y análisis de PL de <i>R. TAL</i> 1000 y L115 marcados radioactivamente	55
3.4.b	Análisis de los ácidos grasos de <i>R. TAL</i> 1000 y L115 marcados radioactivamente	56
3.5	Análisis de ácidos grasos de <i>R. TAL</i> 1000 y L115 sin marca radioactiva	56
3.6	Determinación de la actividad desaturasa en <i>R. TAL</i> 1000 y L115	56
3.7	Extracción de ADN genómico de <i>E. meliloti</i> 1021, <i>R. TAL</i> 1000	57

	y L115	
3.7.a	Diseño de oligonucleótidos	57
3.7.b	Amplificación por PCR y secuenciamiento parcial del gen desaturasa putativo de <i>R. TAL 1000</i> y L115 homólogo al de <i>E. meliloti</i> 1021	57
3.7.c	Manipulación del ADN	59
3.7.d	Clonado del gen desaturasa putativo de <i>R. TAL 1000</i> y <i>E. meliloti</i> 1021	59
3.7.e	Sobreexpresión del gen desaturasa putativo de <i>R. TAL 1000</i> y <i>E. meliloti</i> 1021	60
3.7.f	Condiciones de cultivo para las cepas de <i>E. coli</i> BL21 transformadas	60
3.7.g	Electroforesis en gel de la proteína recombinante de <i>R. TAL1000</i> y <i>E. meliloti</i> 1021	60
3.7.h	Identificación de los ácidos grasos producidos por esta enzima	61
3.7.i	Estudio de la actividad desaturasa en <i>E. coli</i> BL21 transformadas	61
3.8	Determinación del efecto de la temperatura sobre la fluidez de la membrana de <i>R. TAL 1000</i>	61
3.9	Determinación del efecto del shock térmico sobre la composición de AG, la actividad y la expresión de la enzima desaturasa de <i>R. TAL 1000</i>	62
3.9.a	Determinación del efecto del shock térmico sobre la composición de AG	62
3.9.b	Determinación del efecto del shock térmico sobre la actividad desaturasa	62
3.10	Determinación del efecto del shock térmico sobre la expresión de la enzima desaturasa	63
3.10.a	Western blot	63
3.10.b	RT-PCR	63
3.11	Análisis estadístico	63
<b>4</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>64</b>
4.I	<b>CAPITULO I:</b> Efecto de la hipersalinidad y de la hipertermia sobre la viabilidad, composición de ácidos grasos y biosíntesis de ácidos grasos y fosfolípidos de <i>R. TAL 1000</i> y L115	65
4.I.1	Efecto de la hipersalinidad y de la hipertermia sobre la viabilidad de <i>R. TAL 1000</i> y L115	65
4.I.2	Composición de AG de <i>R. TAL 1000</i> y L115 y su rol bajo condiciones de hipersalinidad y de hipertermia	67
4.I.3	Efecto de la hipersalinidad y de la hipertermia sobre la incorporación de acetato de sodio [ $1-^{14}\text{C}$ ] en los AG de <i>R. TAL 1000</i> y L115	71
4.I.4	Efecto de la hipersalinidad y de la hipertermia en la incorporación de acetato de sodio [ $1-^{14}\text{C}$ ] en los PL de <i>R. TAL 1000</i> y L115	75
4.II	<b>CAPITULO II:</b> Efecto de la temperatura sobre la fluidez de la membrana de <i>R. TAL 1000</i>	78



4.II.1	Estudio del efecto de la temperatura sobre la fluidez de la membrana de <i>R. TAL 1000</i>	78
4.III	<b>CAPITULO III:</b> Estudio del mecanismo de síntesis de ácidos grasos insaturados en <i>R. TAL 1000</i> y L115: presencia de un gen desaturasa putativo y actividad desaturasa	80
4.III.1	Detección y Amplificación por PCR de un gen desaturasa putativo en <i>R. TAL 1000</i> y L115	81
4.III.2	Secuenciamiento parcial del producto de PCR de <i>R. TAL 1000</i> , L115 y uso de BLASTn	82
4.III.3	Medición de la actividad de la enzima desaturasa en <i>R. TAL1000</i> y L115, utilizando como sustratos 16:0 [1- <sup>14</sup> C] y 18:0 [1- <sup>14</sup> C]	83
4.IV	<b>CAPÍTULO IV:</b> Desaturación en <i>R. TAL 1000</i> y L115 y su papel en la adaptación a condiciones de hipertermia	86
4.IV.1	Efecto de la temperatura de crecimiento sobre la desaturación de los AG 16:0 [1- <sup>14</sup> C] y 18:0 [1- <sup>14</sup> C] en <i>R. TAL 1000</i> y L115	86
	<b>CAPITULO V:</b> Secuenciación completa del gen desaturasa putativo de <i>R. TAL1000</i> y sobreexpresión del mismo en <i>E. coli</i> . Caracterización bioquímica y funcional	90
4.V.1	Clonado y secuenciación completa del gen desaturasa putativa de <i>R. TAL 1000</i>	90
4.V.2	Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de la posible enzima desaturasa de <i>R. TAL 1000</i> con las secuencias disponibles en las bases de datos	92
4.V.3	Sobreexpresión del gen desaturasa putativo de <i>R. TAL 1000</i> homólogo al gen desaturasa putativo de <i>E. meliloti</i> 1021 en <i>E. coli</i>	93
4.V.4	Estudio de la composición de AG de las cepas de <i>E. coli</i> transformadas	94
4.V.5	Determinación de la actividad desaturasa en las cepas de <i>E. coli</i> transformadas	96
4.VI	<b>CAPITULO VI:</b> Efecto del shock térmico sobre la composición de ácidos grasos, la actividad desaturasa y la expresión del gen desaturasa de <i>R. TAL 1000</i>	98
4.VI.1	Efecto del shock térmico sobre la composición de AG de <i>R. TAL 1000</i>	98
4.VI.2	Efecto del shock térmico sobre la síntesis de AG en <i>R. TAL 1000</i> , utilizando diferentes sustratos radioactivos	100
4.VI.3	Efecto del shock térmico sobre la expresión de la enzima desaturasa de AG de <i>R. TAL 1000</i>	101
5	<b>Conclusiones</b>	104
6	<b>Consideraciones finales y perspectivas</b>	107
7	<b>Bibliografía</b>	109

## Índice de tablas y figuras

<b>Tabla 1.</b>	Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este estudio	53
<b>Tabla 2.</b>	Componentes de la de la reacción de PCR	58
<b>Tabla 3.</b>	Condiciones de la reacción de PCR	58
<b>Tabla 4.</b>	Efecto de la hipersalinidad y de la hipertermia sobre la composición de ácidos grasos de los lípidos de <i>R. TAL 1000</i> y L115	70
<b>Tabla 5.</b>	Comparación de la secuencia de nucleótidos del gen desaturasa putativo de <i>R. TAL 1000</i> y L115 con las secuencias de la base de datos no redundante del GenBank	83
<b>Tabla 6.</b>	Composición de AG de las diferentes cepas de <i>E. coli</i> transformadas	95
<b>Tabla 7.</b>	Composición de AG de las diferentes cepas de <i>E. coli</i> transformadas	96
<b>Tabla 8.</b>	Distribución de la marca radioactiva en los diferentes AG de las cepas de <i>E. coli</i> transformadas, utilizando el precursor radioactivo 16:0 [1- <sup>14</sup> C]	97
<b>Tabla 9.</b>	Distribución de la marca radioactiva en los diferentes AG de las cepas de <i>E. coli</i> transformadas, utilizando el precursor radioactivo 18:0 [1- <sup>14</sup> C]	98
<b>Tabla 10.</b>	Efecto del shock térmico sobre la composición de AG de <i>R. TAL 1000</i>	99
<b>Tabla 11.</b>	Efecto del shock térmico sobre la síntesis de AG en <i>R. TAL 1000</i> , utilizando diferentes sustratos radioactivos	101
<b>Figura 1.</b>	Esquema de la envoltura celular de bacterias Gram negativas	24
<b>Figura 2.</b>	Representación de membrana interna de una bacteria Gram negativa	25
<b>Figura 3.</b>	Estructura de los principales ácidos grasos presentes en los rizobios	27
<b>Figura 4.</b>	Síntesis de fosfolípidos en bacterias	31
<b>Figura 5.</b>	Esquema de las dos vías de biosíntesis de fosfatidilcolina descritas en bacterias	32
<b>Figura 6.</b>	Esquema de la síntesis de ácidos grasos en bacterias	35
<b>Figura 7.</b>	Esquema de la síntesis de los principales ácidos grasos insaturados en bacterias, mediante la vía anaeróbica	37
<b>Figura 8.</b>	Esquema de una desaturación de AG	38
<b>Figura 9.</b>	Esquema de una desaturasa de ácidos grasos integral de membrana	40
<b>Figura 10.</b>	Representación esquemática de los cambios en la estructura de la membrana	44
<b>Figura 11.</b>	Esquema del control de la fluidez de la membrana en <i>Bacillus subtilis</i> expuesto a un cambio de temperatura por medio de un sistema de dos componentes	46
<b>Figura 12.</b>	Efecto de la hipersalinidad y de la hipertermia sobre la viabilidad de A) <i>R. TAL 1000</i> y B) L115	66

<b>Figura 13.</b>	Efecto del NaCl y la temperatura sobre la incorporación de acetato[1- <sup>14</sup> C] de sodio en los AG de los lípidos de <i>R. TAL</i> 1000 (A) y L115 (B)	74
<b>Figura 14.</b>	Efecto de la hipersalinidad y de la hipertermia sobre la distribución de la radioactividad en fosfolípidos de A) <i>R. TAL</i> 1000 y B) L115	78
<b>Figura 15.</b>	Relación entre la polarización de fluorescencia y la temperatura en membranas citoplasmática de <i>R. TAL</i> 1000	80
<b>Figura 16.</b>	Electroforesis en gel de agarosa, impregnado con BrEd, de los productos de amplificación por PCR	82
<b>Figura 17.</b>	Distribución de la marca radioactiva en los diferentes AG de <i>R. TAL</i> 1000 (A) y L115 (B), utilizando los precursores radioactivos 16:0 [1- <sup>14</sup> C] y 18:0 [1- <sup>14</sup> C]	85
<b>Figura 18.</b>	Efecto de la temperatura sobre la distribución de la marca radioactiva en los diferentes AG de <i>R. TAL</i> 1000 (A) y L115 (B) utilizando los precursores radioactivos 16:0 (i) y 18:0 (ii)	89
<b>Figura 19.</b>	Secuencia completa del gen desaturasa putativo de <i>Rhizobium TAL</i> 1000 homólogo al de <i>Ensifer meliloti</i> 1021	91
<b>Figura 20.</b>	Comparación de las secuencias deducidas de proteínas homólogas a desaturasas de diferentes cepas de rizobios	92
<b>Figura 21.</b>	Sobreexpresión de la posible enzima desaturasa de <i>R. TAL</i> 1000 y <i>E. meliloti</i> 1021 en <i>E. coli</i> , examinada por SDS-PAGE	93
<b>Figura 22.</b>	Efecto del shock térmico (1) y la temperatura de crecimiento (2) sobre la expresión de la enzima desaturasa de <i>R. TAL</i> 1000 analizado por medio de RT-PCR (A) o por western blot (B)	103

### **Abreviaturas empleadas**

**ACP:** proteína transportadora de acilos  
**ADN:** ácido desoxirribonucleico  
**ADNg:** ADN genómico bacteriano  
**AG:** ácido graso  
**Amp:** ampicilina  
**Amp<sup>R</sup>:** resistencia a ampicilina  
**ANOVA:** análisis de la varianza  
**ARN:** ácido ribonucleico  
**bp:** pares de base  
**<sup>14</sup>C:** Isótopo radioactivo carbono 14  
**°C:** grados Celsius  
**CL:** cardiolipina  
**CoA :**Coenzima A  
**c.s.p.:** cantidad suficiente para  
**DMPE:** dimetil fosfatidiletanolamina  
**DO:** densidad óptica  
**DNasa :** Desoxirribonucleasa  
**dNTPs:** Desoxi-nucleótidos-trifosfato  
**FAME:** ésteres metílicos de ácidos grasos  
**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación  
**FAasa:** Sintetaza de ácidos grasos  
**FBN:** Fijación biológica de nitrógeno  
**g:** gramo  
**GC:** cromatografía gaseosa  
**h:** hora  
**HSPs:** proteínas del choque por calor (heat shock proteins)  
**IPTG:** Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido  
**kb:** kilobase  
**KDa:** Kilodalton  
**l:** litro  
**LB:** medio de cultivo Luria-Bertani  
**LN:** lípidos neutros  
**LPS:** lipopolisacárido  
**μl:** microlitro  
**μg:** microgramo  
**μM:** micromolar  
**M:** molar  
**min:** minuto  
**mg:** miligramo  
**mM:** milimolar  
**ml:** mililitro  
**μCi:** microCurie  
**μg:** microgramo  
**nm:** nanometro  
**PC:** fosfatidilcolina  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PE:** fosfatidiletanolamina  
**PG:** fosfatidilglicerol  
**pH:** potencial de hidrógeno  
**PMSF:** Fenilmetilsulfonil fluoruro  
**PL:** fosfolípidos  
**rpm:** revoluciones por minuto  
**RT-PCR:** Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa  
**s:** segundo  
**SAGPyA:** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos  
**SDS:** dodecil sulfato sódico  
**S.E.M.:** desviación estándar de la media  
**TLC:** cromatografía en capa fina  
**UFC:** unidades formadoras de colonias  
**UV:** Ultra violeta  
**Xgal:** 5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactósido  
**YEM:** medio manitol-extracto de levadura  
**YEMA:** medio manitol-extracto de levadura-agar

## **1-Introducción**

## **1.1. LAS LEGUMINOSAS**

Con aproximadamente 20000 especies y 750 géneros, las leguminosas constituyen la tercera familia de plantas superiores en número de especies y la segunda después de las gramíneas en importancia agronómica (Gepts et al, 2005), aunque solo una pequeña fracción del número total de especies de este grupo botánico es explotado agronómicamente por el hombre. A pesar de esto, es un hecho ampliamente aceptado la importancia económica, social, ecológica y agrícola de las leguminosas. Este hecho, se basa en aspectos tales como: a) la potencialidad en la producción de proteínas vegetales para el consumo humano y fabricación de alimento para animales (Graham y Vance, 2003); b) su utilización como pasto y forraje para el consumo animal como es el caso de las forrajeras alfalfa, lotus y trébol (Doyle y Luckow, 2003); c) el efecto beneficioso para el medio ambiente, al poder utilizar el nitrógeno atmosférico como alternativa a los fertilizantes químicos (Broughton et al, 2003); d) la capacidad para colonizar ecosistemas naturales mejorando la fertilidad del suelo, participando en la recuperación de suelos marginales y permitiendo el asentamiento de otras especies vegetales al quedar incorporado a la materia orgánica del suelo el nitrógeno fijado (Vance, 1998). Algunos de estos aspectos, conducen a considerar a las leguminosas como cultivos potencialmente importantes como sustituyentes de la proteína animal y en la lucha contra la desertización (FAO 1995).

Entonces, y teniendo en cuenta el significativo incremento de la población mundial sobre todo en países subdesarrollados, se torna importante el desarrollo de una agricultura sostenible que permita satisfacer la demanda creciente de alimentos pero que a la vez sea amigable con el medio ambiente. Las leguminosas adquieren así una importancia especial en los países en vías de desarrollo, donde la mitad de las proteínas consumidas provienen de su ingesta y la producción ganadera depende casi exclusivamente de las leguminosas forrajeras y los pastos.

### **1.1.a. *Arachis hypogaea* (maní): una leguminosa de mucha importancia en Argentina**

El maní, (*Arachis hypogaea* L.) es una leguminosa que provee alimentos para el consumo humano directo y materia prima para otros productos alimenticios (Nkot et al,

2008). Esta planta pertenece a la familia de las leguminosas y es originaria de la región andina del noroeste de Argentina y Bolivia.

El maní se produce y se comercializa como materia prima de la industria aceitera, maní industria (producción de aceite y pellets de esta oleaginosa) y para consumo humano directo como maní confitería. El producto más valioso de la industrialización del maní es el aceite, tanto por el contenido de materia grasa de la semilla (alrededor del 40%), como por la calidad del mismo. Entre todos los aceites comestibles, resulta ser el que mejor se cotiza luego del aceite de oliva.

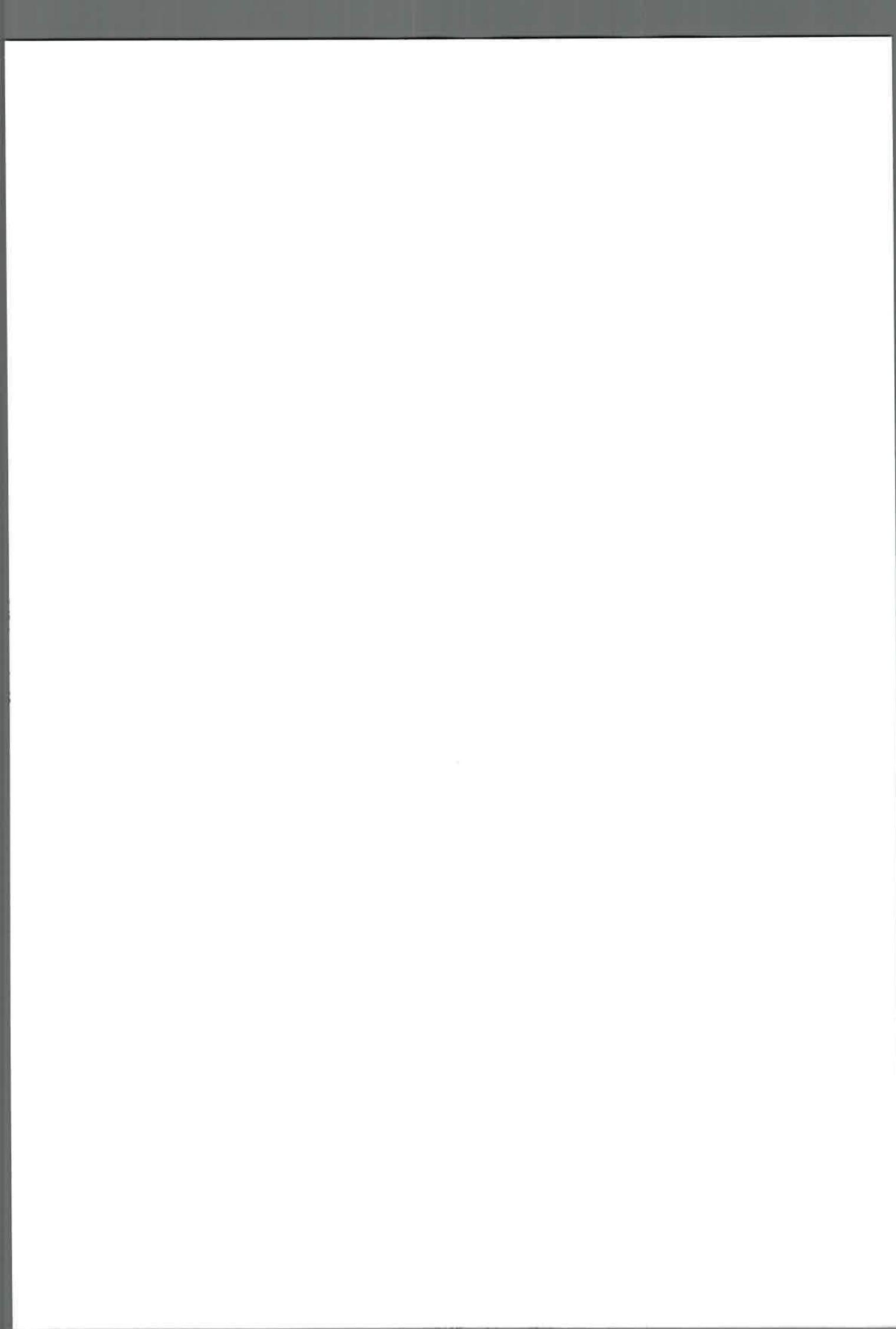
La superficie sembrada y el volumen cosechado de maní muestran una significativa variación anual, debido a la inestable rentabilidad del cultivo frente a otros cultivos alternativos y a la elevada incidencia del clima en el rendimiento. Los rendimientos y la calidad del maní cosechado han aumentado, hecho que ha favorecido su posicionamiento en el mercado internacional, ya que las exportaciones con destino al consumo humano directo requieren un producto de alta calidad.

Las exportaciones de maní tipo confitería han logrado posicionar a la Argentina como el segundo exportador mundial detrás de China y antes de los Estados Unidos. El 98% de la producción argentina de maní se obtiene en la zona central de la provincia de Córdoba, donde se concentra el cultivo, comercialización, selección del maní confitería e industrialización.

La Argentina es un importante referente en el mercado externo, en términos de formador de precios, por los altos volúmenes exportables y por la reconocida calidad comercial del producto. Como resultado de este comercio mundial, ingresa al país una gran cantidad de divisas y su producción ejerce una gran influencia en el desarrollo de la microregión del centro sur cordobés.

El cultivo de maní es importante no sólo por la calidad de su grano para exportar y por la obtención de productos derivados de él, sino también por su aporte en nitrógeno para otros cultivos. En este sentido el nitrógeno atmosférico fijado simbióticamente por la asociación entre maní-rizobios representa una fuente renovable de nitrógeno para la agricultura.



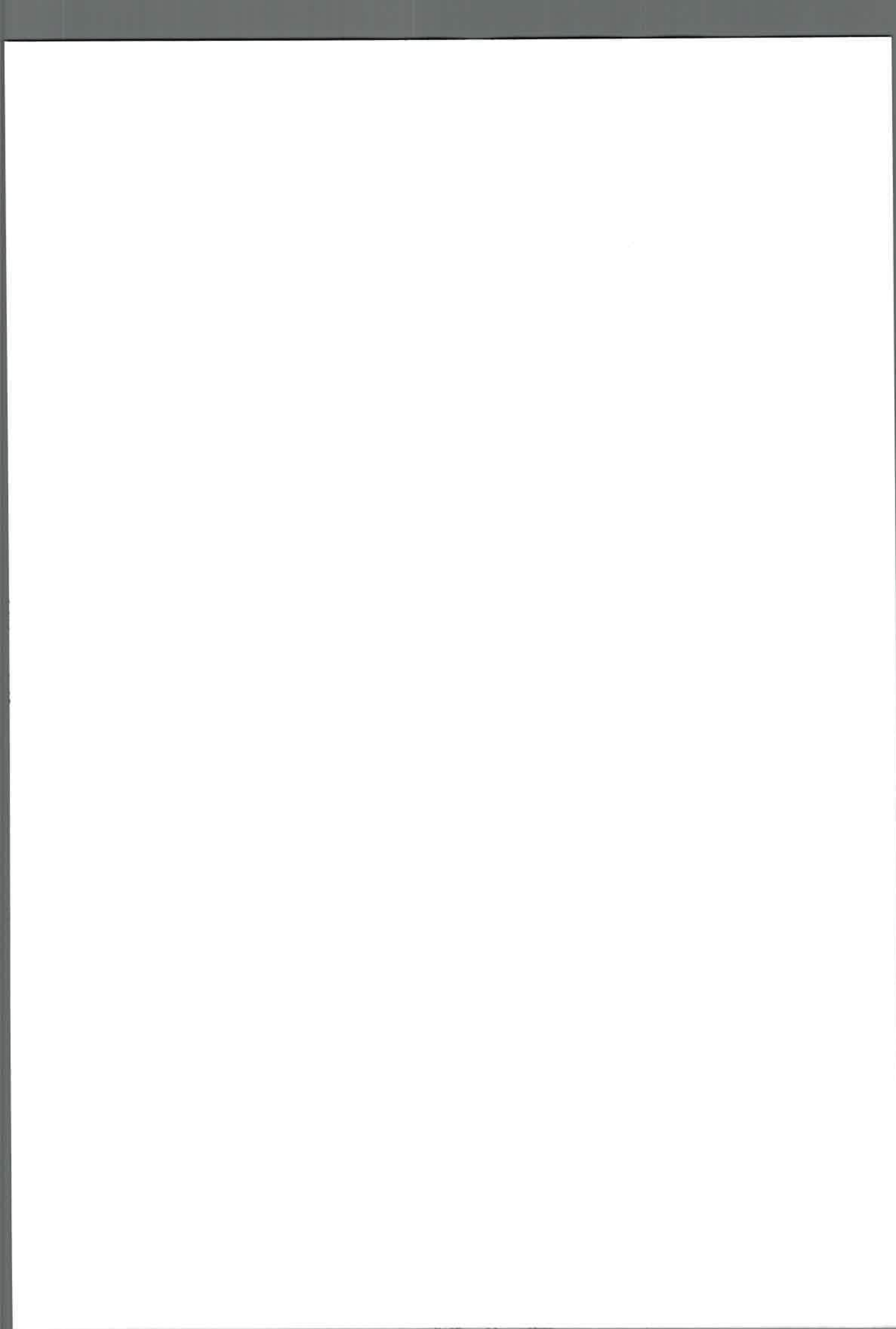


## 1.2. LOS RIZOBIOS

Bajo el término general de rizobios se agrupan bacterias Gram negativas del suelo pertenecientes a los géneros: *Rhizobium*, *Ensifer* (ex *Sinorhizobium*), *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Herbaspirillum*, *Shinella*, *Cupriavidus* y *Burkholderia*, (<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>). La mayoría de estos géneros se afilian a la clase  $\alpha$ -Proteobacteria excepto los géneros *Herbaspirillum*, *Cupriavidus* y *Burkholderia*, que lo hacen a las  $\beta$ -Proteobacterias.

Una característica común de este grupo de microorganismos es inducir la formación de un nuevo órgano en las raíces de las plantas leguminosas. Estas estructuras, denominadas nódulos, son colonizadas intracelularmente por los rizobios, y allí, estos microorganismos fijan nitrógeno atmosférico bajo un estadio de diferenciación particular denominado bacteroide.

La mayoría de rizobios pertenecen al subgrupo de las  $\alpha$  Proteobacterias, las cuales en general se caracterizan por establecer asociaciones íntimas con organismos eucariotas, ya sea como patógenos o como endosimbiontes. En los últimos años se secuenció completamente el genoma de 13  $\alpha$ -Proteobacterias con diferentes estilos de vida intracelular, comprendiendo desde parásitos pericelulares de plantas (*Agrobacterium tumefaciens*) hasta patógenos intracelulares de mamíferos (*Brucella* sp.) y simbioses de plantas (*Ensifer meliloti*, *Mesorhizobium loti*, *Bradyrhizobium japonicum*). Estudios de genómica comparativa entre estos géneros puso en evidencia que el proceso evolutivo de las bacterias intracelulares que se asocian con invertebrados, animales y humanos fue la pérdida de genes. Contrariamente, las bacterias que se asocian con plantas evolucionaron expandiendo su genoma principalmente debido a la transferencia horizontal de ADN, así como también a una alta tasa de duplicación génica. El incremento en el número de genes condujo a una gran diversidad en el contenido y organización de los mismos dentro del genoma de los rizobios. Por ello la taxonomía de los rizobios debe ser revisada en forma periódica ya que continuamente se describen nuevos géneros y se reordenan otros.



### 1.2.a. La simbiosis

Como mencionamos anteriormente los rizobios son un grupo diverso de microorganismos que pueden alternar entre dos estados: uno saprofito de vida libre en el suelo y otro en relación simbiótica con plantas leguminosas. La interacción simbiótica comienza con un intercambio de señales moleculares entre la leguminosa y los rizobios de vida libre.

Las plantas secretan una gran variedad de compuestos orgánicos, algunos de los cuales utilizan los microorganismos para crecer. Pueden incluir carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas y compuestos fenólicos derivados (flavonoides). En términos de simbiosis, los flavonoides son los compuestos más importantes sintetizados por las raíces de las leguminosas ya que inducen en los rizobios la expresión de los genes de nodulación. Se desencadena así el proceso de infección que culmina en la formación del nódulo radicular dentro del cual se produce la fijación biológica del nitrógeno (FBN).

### 1.2.b. La fijación biológica del nitrógeno

Los rizobios comparten la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico en sustancias químicas que pueden ser utilizadas por la planta leguminosa huésped. Esta reacción se lleva a cabo en los rizobios diferenciados a bacteroides dentro de los nódulos gracias a la baja presión de oxígeno presente allí. Este último es un requisito imprescindible para que la enzima nitrogenasa pueda catalizar dicha reacción.

La nitrogenasa es un complejo enzimático de dos componentes responsable del proceso de FBN y es estructuralmente muy conservada entre las bacterias capaces de fijar nitrógeno. Esta enzima es capaz de reducir el nitrógeno gaseoso a  $\text{NH}_3$  como se muestra en la siguiente reacción.



Este es un proceso que requiere mucha energía, debido a que el nitrógeno es un gas inerte a temperatura y presión atmosférica. Aproximadamente 16 moléculas de ATP son requeridas y se estima que bajo algunas circunstancias especiales los bacteroides podrían necesitar hasta 42 moléculas de ATP para transformar una molécula de nitrógeno en amonio. Para conseguir estas grandes cantidades de ATP la planta huésped le proporciona a los bacteroides carbohidratos y los bacteroides

1910  
1911  
1912  
1913  
1914  
1915  
1916  
1917  
1918  
1919  
1920  
1921  
1922  
1923  
1924  
1925  
1926  
1927  
1928  
1929  
1930  
1931  
1932  
1933  
1934  
1935  
1936  
1937  
1938  
1939  
1940  
1941  
1942  
1943  
1944  
1945  
1946  
1947  
1948  
1949  
1950  
1951  
1952  
1953  
1954  
1955  
1956  
1957  
1958  
1959  
1960  
1961  
1962  
1963  
1964  
1965  
1966  
1967  
1968  
1969  
1970  
1971  
1972  
1973  
1974  
1975  
1976  
1977  
1978  
1979  
1980  
1981  
1982  
1983  
1984  
1985  
1986  
1987  
1988  
1989  
1990  
1991  
1992  
1993  
1994  
1995  
1996  
1997  
1998  
1999  
2000  
2001  
2002  
2003  
2004  
2005  
2006  
2007  
2008  
2009  
2010  
2011  
2012  
2013  
2014  
2015  
2016  
2017  
2018  
2019  
2020  
2021  
2022  
2023  
2024  
2025  
2026  
2027  
2028  
2029  
2030  
2031  
2032  
2033  
2034  
2035  
2036  
2037  
2038  
2039  
2040  
2041  
2042  
2043  
2044  
2045  
2046  
2047  
2048  
2049  
2050  
2051  
2052  
2053  
2054  
2055  
2056  
2057  
2058  
2059  
2060  
2061  
2062  
2063  
2064  
2065  
2066  
2067  
2068  
2069  
2070  
2071  
2072  
2073  
2074  
2075  
2076  
2077  
2078  
2079  
2080  
2081  
2082  
2083  
2084  
2085  
2086  
2087  
2088  
2089  
2090  
2091  
2092  
2093  
2094  
2095  
2096  
2097  
2098  
2099  
2100

devuelven a la planta, en esta estrecha simbiosis, nitrógeno en forma de amonio. Este proceso continúa hasta la muerte de la planta huésped y la liberación del nitrógeno total acumulado en la biomasa vegetal contribuye al ciclo del nitrógeno en el suelo.

La simbiosis rizobio-leguminosa es la principal fuente de nitrógeno en la tierra basado en sistemas biológicos y aporta más del 50% del total de la FBN en el planeta (Zaharan, 1999).

### **1.3. RESPUESTA AL ESTRÉS**

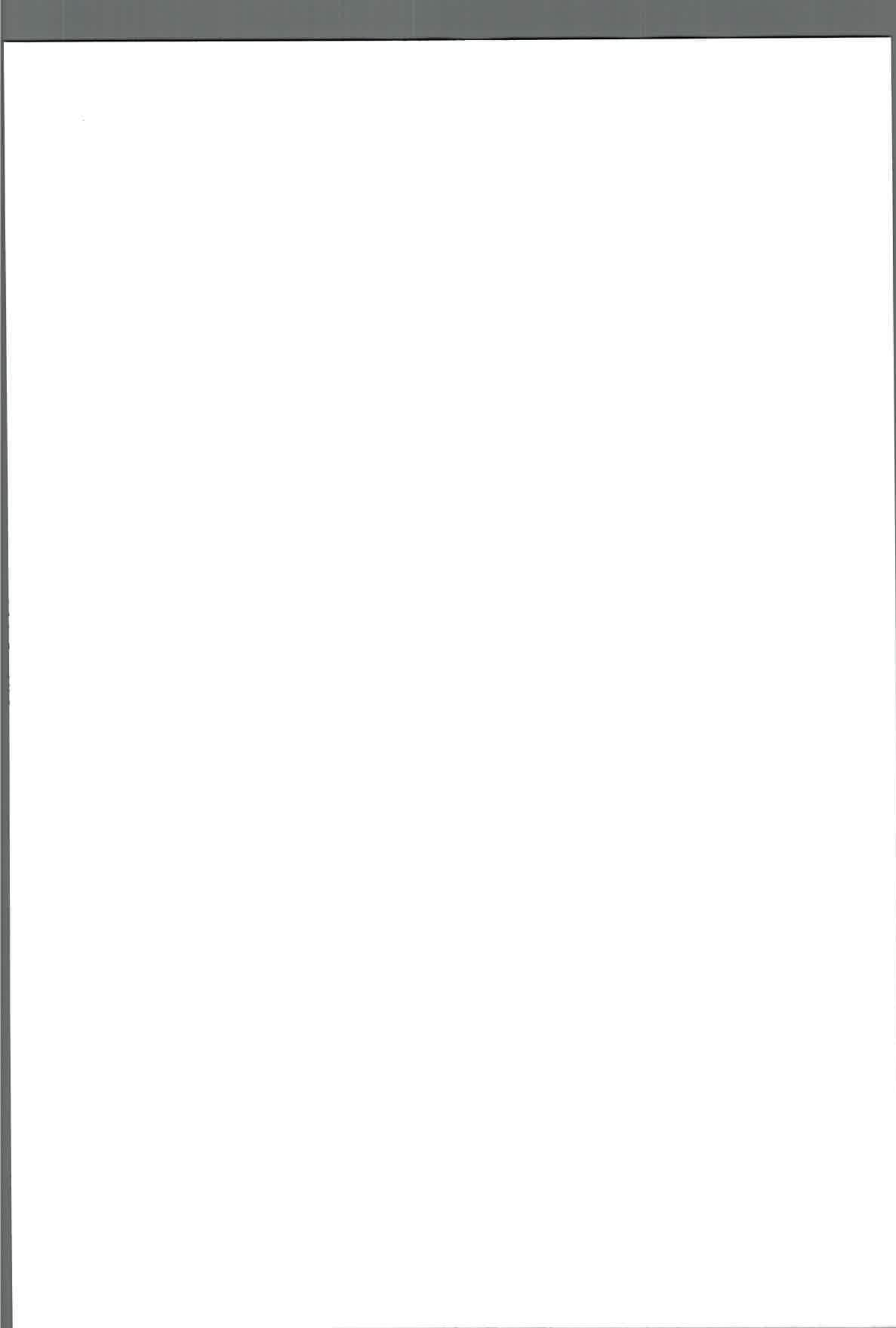
#### **1.3.a. ¿Qué es la respuesta al estrés?**

Al estudiar cualquier microorganismo vivo, es importante saber cómo cada especie crece y responde a ciertas condiciones presentes en su hábitat natural.

Determinar cómo las bacterias responden a señales del medio ambiente o condiciones de estrés es concluyente para comprender cómo viven, crecen y prosperan. Cada bacteria posee las condiciones para que este proceso sea fácil de realizar, sin embargo con el fin de sobrevivir a una condición estresante, la bacteria debe ser capaz de adaptarse. Esta adaptación es una respuesta al estrés.

En los microorganismos están presentes dos tipos de respuestas al estrés: una respuesta de carácter general y otra de carácter específico. La respuesta generalizada al estrés es normalmente controlada por un solo tipo de regulador (Bremer y Krämer, 2000) y proporciona protección contra una amplia variedad de señales ambientales, independientemente del estímulo inicial (Hecker et al, 1996; Hecker y Völker, 1998). Esta respuesta es eficaz para permitir a la célula sobrevivir, pero puede no ser suficiente para que las células crezcan en las condiciones estresantes (Bremer y Krämer, 2000).

Bajo condiciones de estrés prolongado las células emplean respuestas específicas, que utilizan mecanismos de adaptación genéticos y fisiológicos (Bremer y Krämer, 2000). Por lo general, existe también una relación compleja entre los sistemas de respuesta celular y los reguladores globales, agregando otro nivel de control a la respuesta celular rápida y a reacciones de supervivencia a largo plazo (Hengge-Aronis, 1999). Aunque la descripción anterior es en líneas generales lo que sucede, no todas las respuestas se producen inmediatamente después de los estímulos estresantes. Asimismo,



algunas respuestas a determinados estreses son inducidas tan pronto como se detecta el estrés.

Existen diferentes condiciones ambientales que pueden ser consideradas estreses. Dentro de estas, en el suelo hay dos grandes problemas uno es la salinidad y otro es la temperatura.

### 1.3.b La salinidad y los rizobios

La mayor parte de las cepas de rizobios que nodulan leguminosas importantes en la agricultura son susceptibles a los efectos deletéreos de la sal y la desecación, las cuales son, a menudo, estreses asociados (Smith 1992).

Estudios previos referidos a la capacidad de cepas de rizobios de crecer en presencia de sales han mostrado una marcada variación en su tolerancia salina. Algunas cepas utilizadas en la industria de inoculantes, como *Bradyrhizobium japonicum*, son inhibidas por concentraciones menores a 100 mM de NaCl (Elsheikh y Wood, 1990), hecho que limita su uso en las prácticas agrícolas. Por este motivo resultan de interés los estudios tendientes a investigar y aumentar la tolerancia a la sal de estas especies muy sensibles, tanto en los inoculantes como en el suelo. Por el contrario, el crecimiento de varias cepas de *Ensifer meliloti* puede ocurrir a concentraciones mayores que 300 mM NaCl (Bernard et al, 1986) y cepas de *Rhizobium* spp. aisladas de nódulos de plantas de *Hedysarum*, *Acacia*, *Prosopis*, y *Leucaena* pueden tolerar hasta 500 mM NaCl (Zhang et al, 1991).

La salinidad del suelo es el factor limitante más relevante para la productividad agrícola (Greenway y Munns, 1980). El crecimiento de plantas importantes en la agricultura es inhibido a una salinidad de 50 mM NaCl (Downton, 1984), lo que resulta en una reducción de la producción. Bhardwaj (1975) reportó que los límites de tolerancia a la salinidad y a la alcalinidad de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* spp. fueron superiores a los de sus leguminosas hospedadoras, lo cual sugiere que la tolerancia de la planta determina la posibilidad de una simbiosis exitosa.

En este sentido, Rai y Rai (2003) observaron una reducción en la actividad nitrogenasa en la asociación simbiótica fijadora de nitrógeno *Azolla pinnata*-*Anabaena azollae* cuando fue expuesta a concentraciones crecientes de NaCl (10, 20 y 40 mM). Se



ha reportado que el NaCl inhibe la actividad nitrogenasa debido a que perturba el transporte de electrones, entre otras razones (Rai et al, 2001).

Durante el crecimiento en medios hiperosmóticos que contienen elevadas concentraciones de solutos orgánicos o inorgánicos las bacterias desarrollan diversas estrategias, incluyendo cambios en la regulación de vías metabólicas y en la morfología celular (Koch, 1998) y la activación de transportes, para mantener su viabilidad frente a las condiciones adversas que representan el estrés salino y osmótico (Wood, 1999; Poolman et al, 2002).

Un mecanismo de adaptación a cambios en la osmolaridad del medio, extensamente estudiado en bacterias, es el que involucra la acumulación de solutos compatibles, los cuales le confieren protección frente a los efectos deletéreos de la baja actividad de agua, manteniendo el volumen celular apropiado y protegiendo las macromoléculas intracelulares (Le Rudulier, 1984; Csonka y Epstein, 1996). Las bacterias son capaces de utilizar una variedad de compuestos orgánicos como osmoprotectores. Glicina-betaína, por ejemplo, es un soluto compatible muy común usado por bacterias (Boch, 1994; Csonka y Epstein, 1996). Además, muchas bacterias sintetizan glicina-betaína por oxidación de colina, la cual es un constituyente común de las membranas eucariotas formando parte del fosfolípido (PL) fosfatidilcolina (PC) el que está ampliamente distribuido en diferentes ambientes.

Boncompagni et al (1999) reportaron que los mecanismos para el transporte de glicina-betaína y colina están ampliamente distribuidos entre varias especies de referencia de Rhizobiaceae, las cuales muestran una gran variación en su tolerancia a la sal. De hecho, solamente *B. japonicum*, una de las especies de interés agronómico más sensibles a la sal, no posee un sistema de asimilación de alta afinidad para el transporte de estas sustancias. Además estos autores demostraron que todas las especies de rizobios utilizadas en su estudio, excepto *B. japonicum*, son capaces de utilizar glicina-betaína y colina como única fuente de carbono y N para el crecimiento.

Chang et al (2007) caracterizaron la respuesta al estrés osmótico de *B. japonicum*. Para ello analizaron el transcriptoma de esta bacteria luego de su exposición a 50 mM de NaCl. Entre 441 genes expresados diferencialmente, 269 fueron inducidos y 172 fueron reprimidos por el tratamiento con NaCl, lo que indica la notable respuesta



a nivel genético que desencadena el crecimiento bacteriano en un medio con una concentración sub-letal de sal.

A pesar de la gran cantidad de estudios que indican la participación de diversos componentes de la bacteria en respuesta a las condiciones hostiles que enfrenta en el ambiente circundante, aún existen muchos aspectos por esclarecer.

### **1.3.c. La temperatura y los rizobios**

La temperatura elevada del suelo es un problema común que limita la FBN en muchos cultivos de leguminosas. Por ejemplo afecta de manera pronunciada la infección bacteriana en soja (Munevar y Wollum, 1982), trébol (Possingham et al, 1965), arveja (Frings, 1976), poroto (Michiels et al, 1994) y maní (Kishinevsky et al, 1992). La temperatura crítica para la FBN para el maní varía entre 35°C a 40°C, en tanto que la máxima temperatura de viabilidad reportada para rizobios relacionados con leguminosas como *Bradyrhizobium japonicum* varía entre 33,7°C a 48,7°C (Kulkarni et al, 2000). Kishinevsky et al (1992) encontraron que una temperatura constante de 37°C en las raíces de plantas de maní reduce el funcionamiento del nódulo, la FBN y el crecimiento de la planta. Las temperaturas elevadas también pueden influir sobre la viabilidad de los rizobios durante el almacenamiento de los inoculantes y durante la aplicación en el suelo. Los resultados pueden variar dependiendo de la cepa utilizada, la severidad del estrés y el período por el cual la bacteria está expuesta (Graham 1992).

En lo que respecta a este tipo de estrés, también se ha informado que la incubación de cultivos de *E. meliloti* y *Rhizobium trifolii* a altas temperaturas resulta en pérdida de la capacidad de nodulación y de la FBN (Vargas y Graham, 1988; Zurkowski, 1982). Estudios realizados con nódulos de judía mostraron que la actividad nitrogenasa no fue afectada con un incremento de la temperatura de 15°C a 35°C, pero disminuyó abruptamente por encima de los 38°C (Rainbird et al, 1983)

La temperatura está involucrada en la sobrevivencia de los organismos durante la desecación a través del cambio de fase de las membranas biológicas durante las etapas de desecación y rehidratación. llevando a la pérdida de integridad de las mismas.

Además del factor físico existe la respuesta fisiológica como es la producción de proteínas del choque por calor (HSPs, del inglés *heat shock proteins*) y chaperonas, o la



acumulación de compuestos como el disacárido trehalosa, que disminuyen la temperatura media de transición de la membrana (Leslie et al, 1995).

Entonces, la respuesta al choque por calor (del inglés *heat shock*) consiste en la adaptación de la célula al incremento en la temperatura del medio, y está caracterizada por la sobreproducción de un conjunto de HSPs que cumplen funciones importantes durante la sobrevivencia en condiciones de estrés (Münchbach et al, 1999a; Münchbach et al, 1999b; Narberhaus et al, 1996; Nocker et al, 2001). Entre estas proteínas se encuentran las chaperonas que cumplen un papel esencial en el plegamiento de las proteínas (Frydman, 2001).

Rehman y Nautiyal (2002) identificaron una cepa mutante Tn5 de *Rhizobium sesbania* sensible a la desecación y a la temperatura lo que revela una base genética para esta respuesta. En el mismo sentido, Dominguez-Ferreras et al (2006) identificaron diversos loci de respuesta a un incremento en el estrés osmótico y salino que también están asociados con la respuesta a la temperatura. Los genes *groESL1* y *groESL2* fueron reprimidos por el estrés osmótico y salino, lo que puede ser explicado por una reducción en la síntesis de proteínas durante estas condiciones.

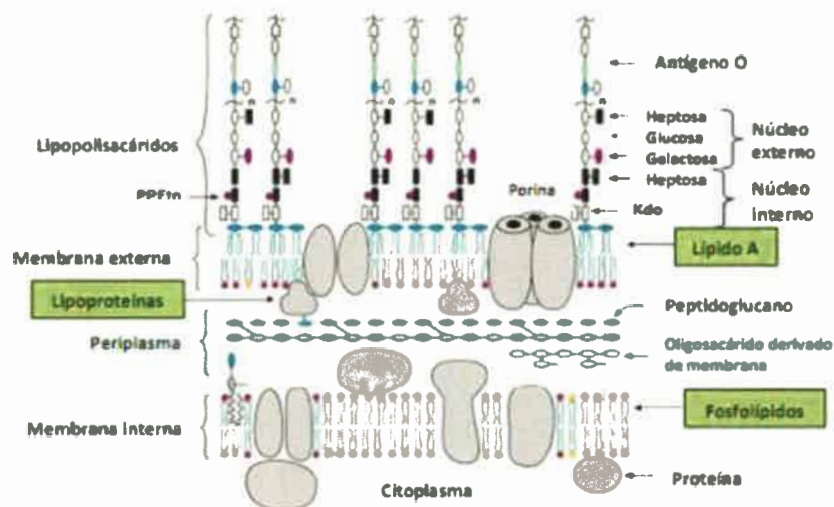
La resistencia a la desecación es un resultado indirecto que surge como consecuencia de tolerar estreses tales como el estrés osmótico, por temperatura y tensión de oxígeno (Vriezen et al, 2007).

Las envolturas celulares, entre ellas la membrana citoplasmática, son las primeras barreras que protegen a la célula contra diferentes estreses ambientales, y cambios en su composición pueden representar mecanismos adaptativos para compensar el estrés producido por la sal y la temperatura (Correa et al, 1999).

#### **1.4. LA ENVOLTURA CELULAR DE LAS BACTERIAS**

La envoltura celular que rodea al citoplasma de las células bacterianas está formada por la membrana interna o citoplasmática y la pared celular. La membrana interna es una membrana simétrica constituida por una bicapa fosfolipídica en la que las regiones polares de los PL se sitúan en las superficies externas de la bicapa, mientras que las cadenas hidrofóbicas de los ácidos grasos (AG) se dirigen hacia el centro de la membrana.

En las bacterias Gram negativas la pared celular está compuesta por una membrana externa que rodea a una monocapa de peptidoglucano. La membrana externa de las bacterias Gram negativas es una membrana asimétrica que contiene PL en su monocapa interna y lipopolisacáridos en su monocapa externa. Entre la membrana interna y externa se encuentra un espacio llamado periplasma en el que se localiza la monocapa de peptidoglucano, un polímero que mantiene la rigidez y la morfología de la bacteria (Fig.1).



**Figura 1.** Esquema de la envoltura celular de bacterias Gram negativas. Kdo: ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico. PPEtn: fosfoetanolamina (Raetz y Whitfield, 2002).

## 1.5. LA MEMBRANA INTERNA BACTERIANA

### 1.5.a. Estructura y composición

La membrana interna de las bacterias Gram negativas es similar a la membrana citoplasmática de las células eucariotas, está formada por una bicapa lamelar de PL y por diferentes tipos de proteínas que se intercalan en ella. En esta estructura las cadenas de AG se sitúan hacia el interior de la bicapa y los grupos cabeza de los PL hacia el exterior hidrofílico, accesibles para la hidratación (Fig.2).

La bicapa lipídica forma una barrera que previene el movimiento descontrolado de moléculas polares y permite la acumulación de metabolitos y proteínas en el interior celular. Los lípidos además forman una matriz adecuada para el funcionamiento

...the most important of the new ...

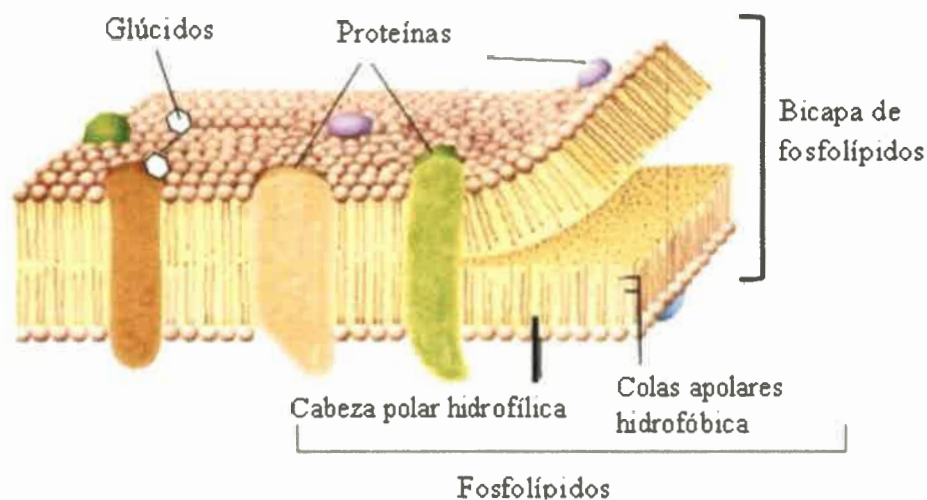
...the most important of the new ...

...the most important of the new ...

...the most important of the new ...

...the most important of the new ...

correcto de las proteínas de membrana asociadas a funciones bioenergéticas y de biosíntesis. La composición de lípidos de la membrana determina la permeabilidad y las propiedades de barrera, lo que influye en la topología de la misma.



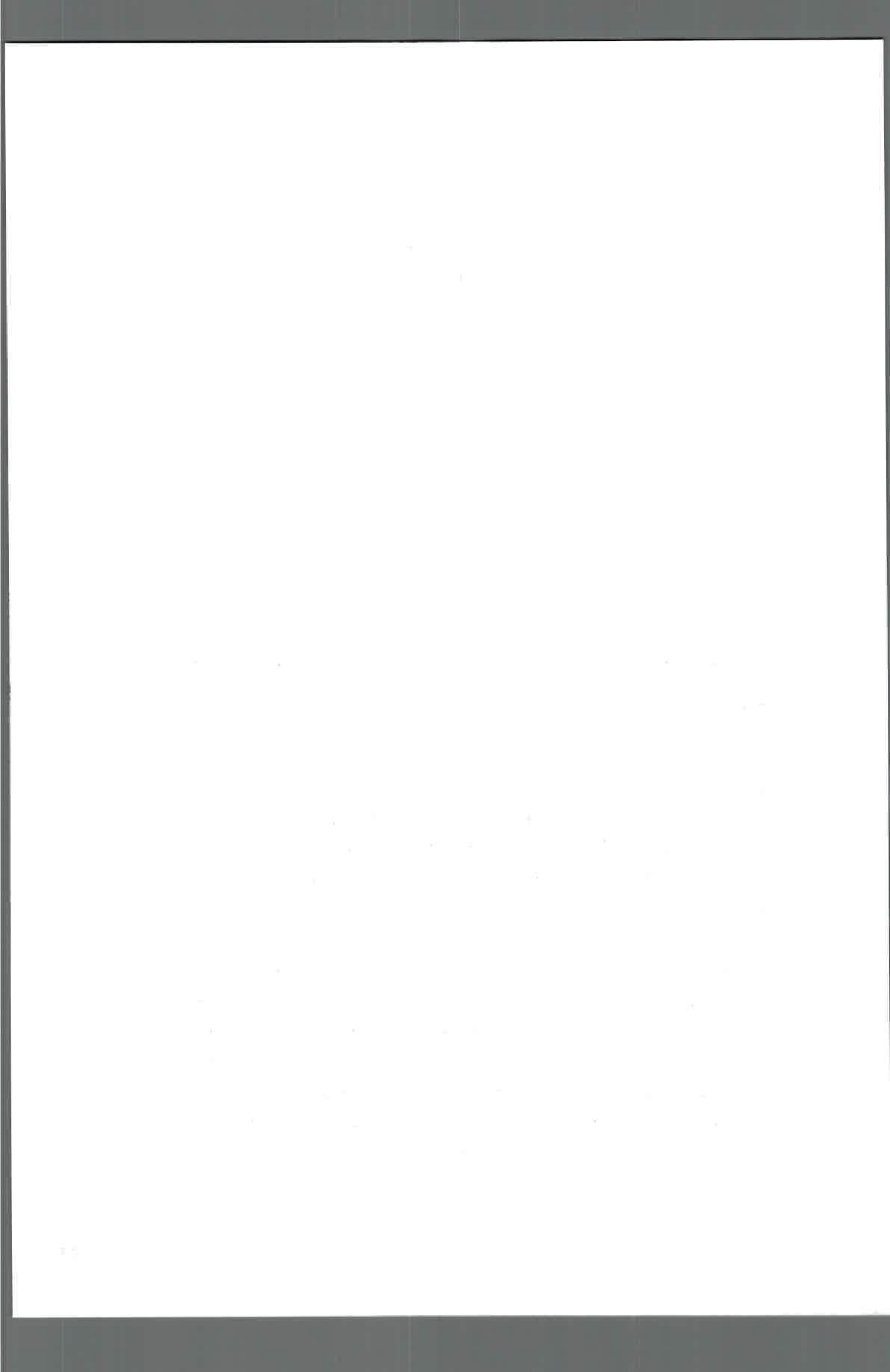
**Figura 2.** Representación esquemática de la membrana interna de una bacteria Gram negativa.

### Proteínas

El modelo de membrana de mosaico fluido representa a las proteínas de membrana flotando libremente en la bicapa lipídica. El contenido proteico de la mayoría de las membranas contiene moléculas de proteína separadas una de otras por 3 o 4 moléculas de PL.

Dependiendo de su localización en la membrana interna, se pueden distinguir tres tipos de proteínas de membrana: a) proteínas integrales de membrana, con uno o más segmentos transmembrana; b) proteínas que se anclan a la membrana a través de un dominio transmembrana y presentan dominios que se expanden por el periplasma de la célula y c) proteínas que se asocian sólo transitoriamente a la membrana interna (periféricas). Las proteínas de membrana se asocian formando estructuras de forma que sus dominios hidrofóbicos se encuentran en contacto con la membrana y los dominios hidrofílicos hacia el interior de la proteína.



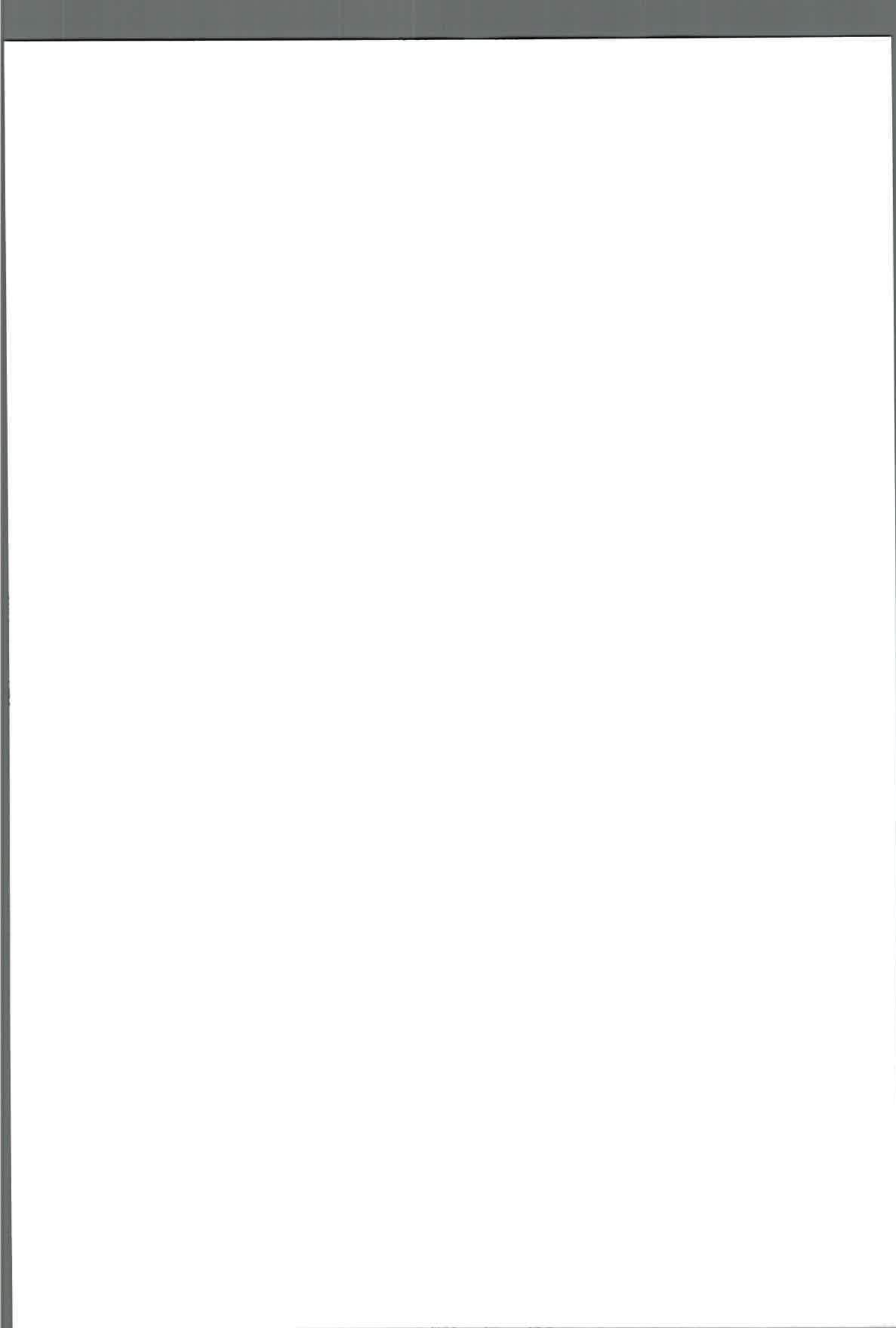


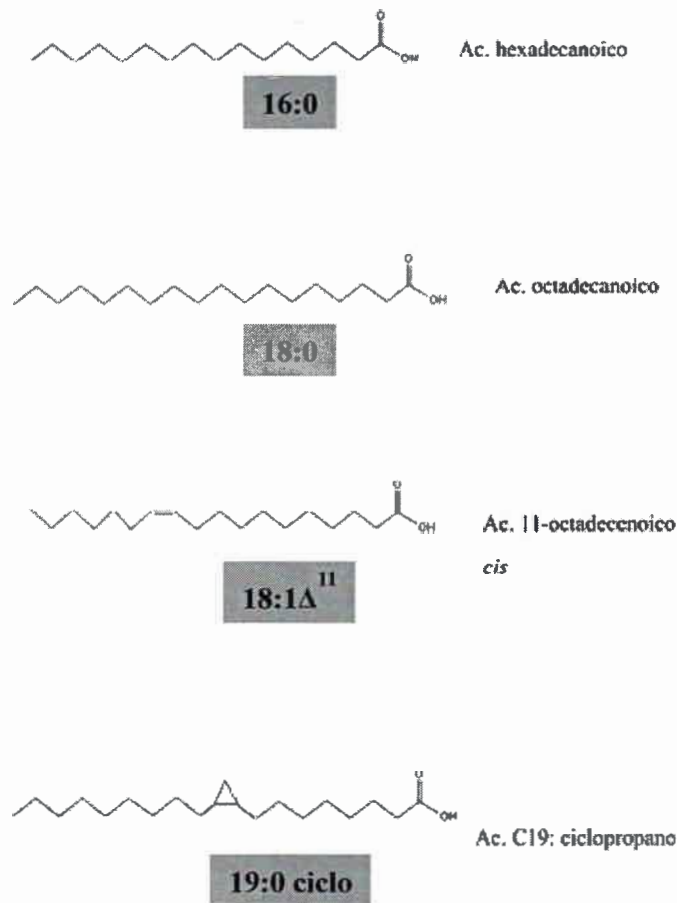
## Fosfolípidos

Los glicerofosfolípidos (PL) son lípidos que están formados por un esqueleto de glicerol, esterificado en el carbono 1 y 2 con dos cadenas de AG y unido a un grupo polar por enlace fosfodiéster en el carbono 3. Todos los PL son derivados del ácido fosfatídico y se nombran según sus grupos cabeza polares. Todos tienen una carga negativa sobre el grupo fosfato a pH 7, el grupo cabeza también puede aportar una o más cargas a pH próximo a 7. Los PL de la membrana externa se localizan sólo en su monocapa interna y representan aproximadamente un tercio de los PL totales de la envoltura celular. Los PL mayoritarios presentes en la membrana interna de bacterias Gram negativas como por ejemplo *Escherichia coli* son fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL). Los rizobios a diferencia de *E. coli*, pueden sintetizar cantidades importantes de fosfatidilcolina (PC) (López Lara y Geiger, 2001) al igual que *Pseudomonas aeruginosa* (Albelo y Domenech, 1997).

Dependiendo del tamaño del grupo cabeza polar, los PL tienden a formar membranas del tipo bicapa o no bicapa. Generalmente PE forma membranas con estructuras de no bicapa, mientras que PC forma membranas con estructuras de bicapa. Cambios en las relaciones entre estos tipos de lípidos pueden alterar la forma total de la membrana (Dowhan, 1997).

Los AG componentes de los PL pueden ser saturados e insaturados. En las membranas de rizobios los AG saturados más importantes son ácido hexadecanoico o palmítico (16:0) y ácido octadecanoico o esteárico (18:0) y dentro de los insaturados el más importante es el ácido *cis* 11-ocadecenoico o *cis*-vaccénico (18:1 $\Delta^{11}$ ) (Boumahdi et al, 1999; Tigue et al, 2000; Drouin et al, 2000), (Fig.3). En algunos géneros como *Rhizobium* los AG insaturados en conformación *cis* sufren modificaciones post-sintéticas dando lugar a la formación de AG muy particulares denominados ciclos. En los rizobios el AG cíclico más encontrado es el 19:0 ciclopropano, formado a partir del AG 18:1 $\Delta^{11}$ . La presencia de estos AG es dependiente de la fase de crecimiento, siendo más abundantes en fase estacionaria.

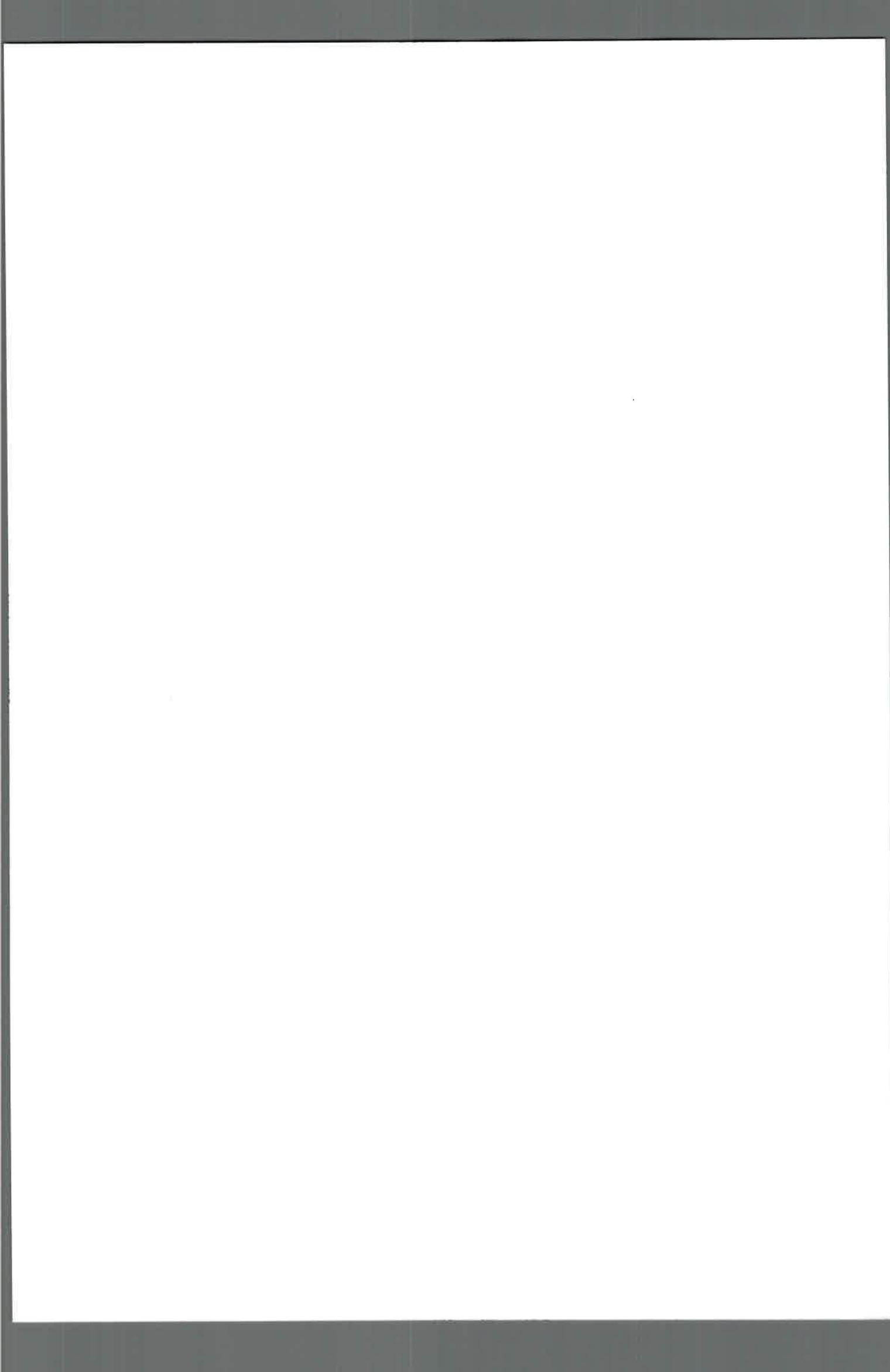




**Figura 3.** Estructura de los principales ácidos grasos presentes en los rizobios.

### 1.5.b. Funciones de la membrana interna

La membrana tiene múltiples funciones celulares importantes: contiene centenares de proteínas diferentes, diversos transportadores de nutrientes y productos metabólicos, así como muchas enzimas que intervienen en el metabolismo energético, en el tráfico de proteínas, la translocación de macromoléculas de la pared celular, la señalización transmembrana, la homeostasis y la división celular entre otras. Por último una de las funciones más importantes que lleva a cabo la membrana interna es la síntesis de lípidos.



## 1.6. SINTESIS DE LIPIDOS DE MEMBRANA EN BACTERIAS

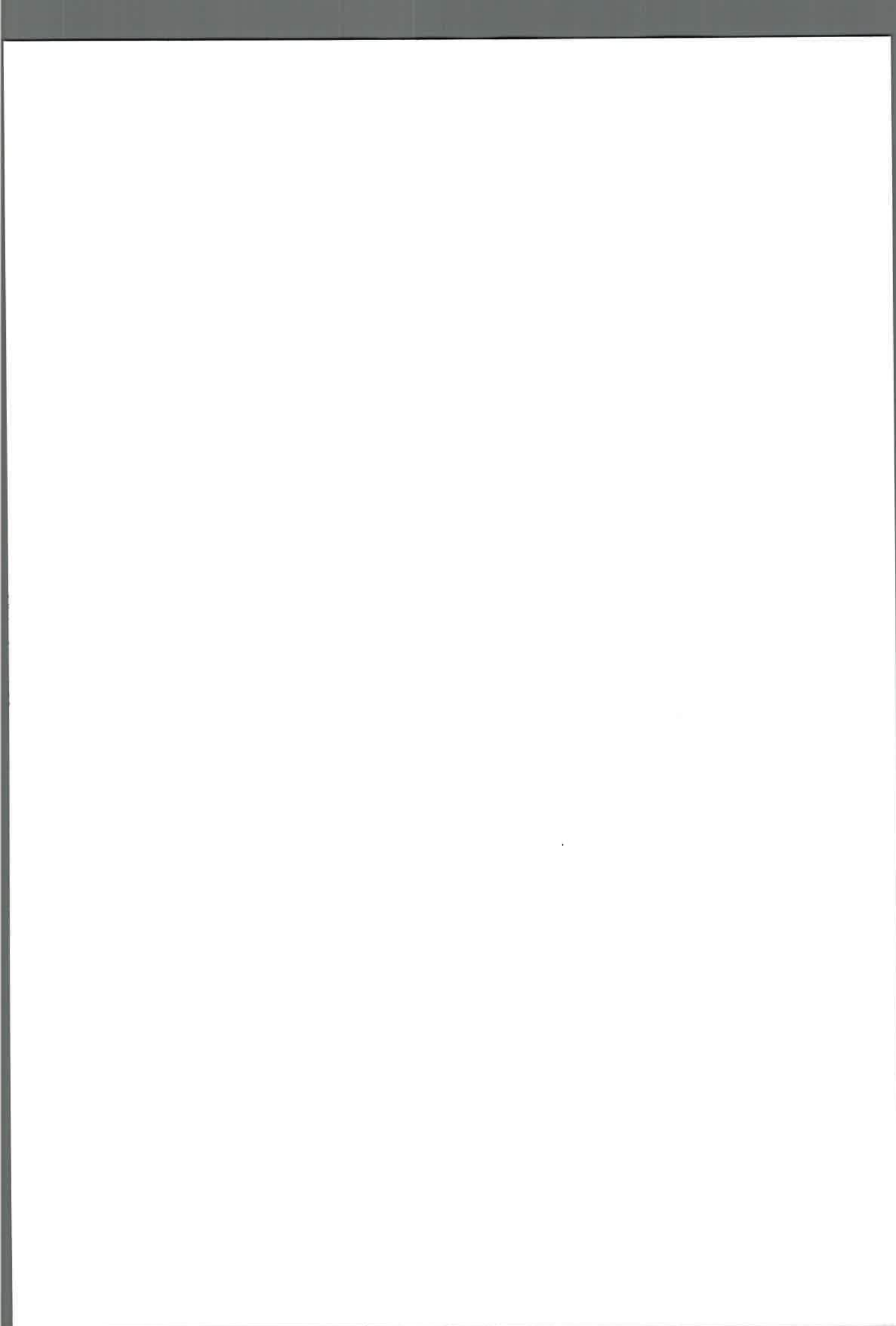
Las enzimas responsables de la síntesis de lípidos se encuentran distribuidas entre el citosol y la membrana interna. Las enzimas de la síntesis de AG y la glicerol-3-fosfato (G3P) sintasa son citosólicas, mientras que las que se encargan de la síntesis de PL se localizan en la membrana interna. Por lo tanto, la síntesis de lípidos se puede dividir en dos partes: a) la síntesis de AG (FAS: del inglés Fatty Acid Synthesis) y b) la unión de los AG completos a la molécula de G3P seguido de la adición de los grupos cabeza polares para producir los PL celulares mayoritarios.

### 1.6.a Síntesis de fosfolípidos en bacterias

Los PL de la membrana interna son sintetizados mayoritariamente por proteínas integrales de la membrana, que presentan sus dominios catalíticos en el citoplasma, o bien mediante proteínas asociadas a membrana (Cronan Jr. y Rock, 1996), utilizando como molécula precursora el ácido fosfatídico (Huijbregts et al, 2000). Los PL son esenciales para la integridad y las funciones de las membranas bacterianas y modificaciones de los PL están involucradas en la adaptación de las bacterias.

Aunque la mayoría de las especies de rizobios contienen los PL encontrados en *E. coli*, como fosfatidiletanolamina, tienen además la capacidad de sintetizar algunos otros PL. Por ejemplo, *Bradyrhizobium* SEMIA 6144 y *Rhizobium* TAL 1000 contienen fosfatidilcolina como uno de los principales PL componentes de sus membranas (Medeot et al, 2007; Paulucci et al, 2011).

Los PL están compuestos de una molécula de glicerol-3-fosfato (G3P), cuyo esqueleto de glicerol se esterifica con dos AG. Los AG sustratos son los acil-ACPs productos de la ruta biosintética de éstos. Los AG se transfieren al G3P en dos reacciones sucesivas. La primera enzima (G3P aciltransferasa) transfiere los AG a la posición 1 del esqueleto de glicerol y la segunda enzima (1-acil-glicerofosfato aciltransferasa) esterifica la posición 2 con un segundo AG. La distribución asimétrica de los AG entre las posiciones 1 y 2 está controlada en parte por la especificidad de la cadena acilo de las acil transferasas. La molécula resultante de la doble acilación de G3P es el ácido fosfatídico. El ácido fosfatídico se convierte a CDP-diacilglicerol por la CDP-diacilglicerol sintasa y éste sirve como un intermediario en la biosíntesis de todos los PL de membrana.



### **Biosíntesis de fosfatidiletanolamina (PE)**

El primer paso en la síntesis de PE es la condensación de CDP-diacilglicerol con serina para formar fosfatidilserina (PS), una reacción catalizada por la PS sintasa (codificada por el gen *pssA*) (Kanfer y Kennedy, 1964) (Fig.4). Esta enzima se encuentra en la fracción de membrana interna como el resto de las enzimas de la síntesis de PL. La PS es un componente minoritario en la membrana de *E. coli* ya que es rápidamente transformada a PE por la PS descarboxilasa (codificada por el gen *psd*).

### **Biosíntesis de fosfatidilglicerol (PG)**

El primer paso en la síntesis de PG es la condensación de CDP-diacilglicerol con glicerol-3-fosfato (G3P) para formar fosfatidilglicerol fosfato (PGP) reacción llevada a cabo por la PGP sintasa (codificada por *pgsA*). La reacción es análoga a la síntesis de PS y se libera CMP (Fig.4) (Chang y Kennedy, 1967). El segundo paso en la síntesis de PG es la desfosforilación de PGP catalizada por la PGP fosfatasa (Fig.4). Ichio y Raetz, (1983) aislaron dos genes independientes en *E. coli*, *pgpA* y *pgpB*, que codifican PGP fosfatasa.

### **Biosíntesis de cardiolipina (CL)**

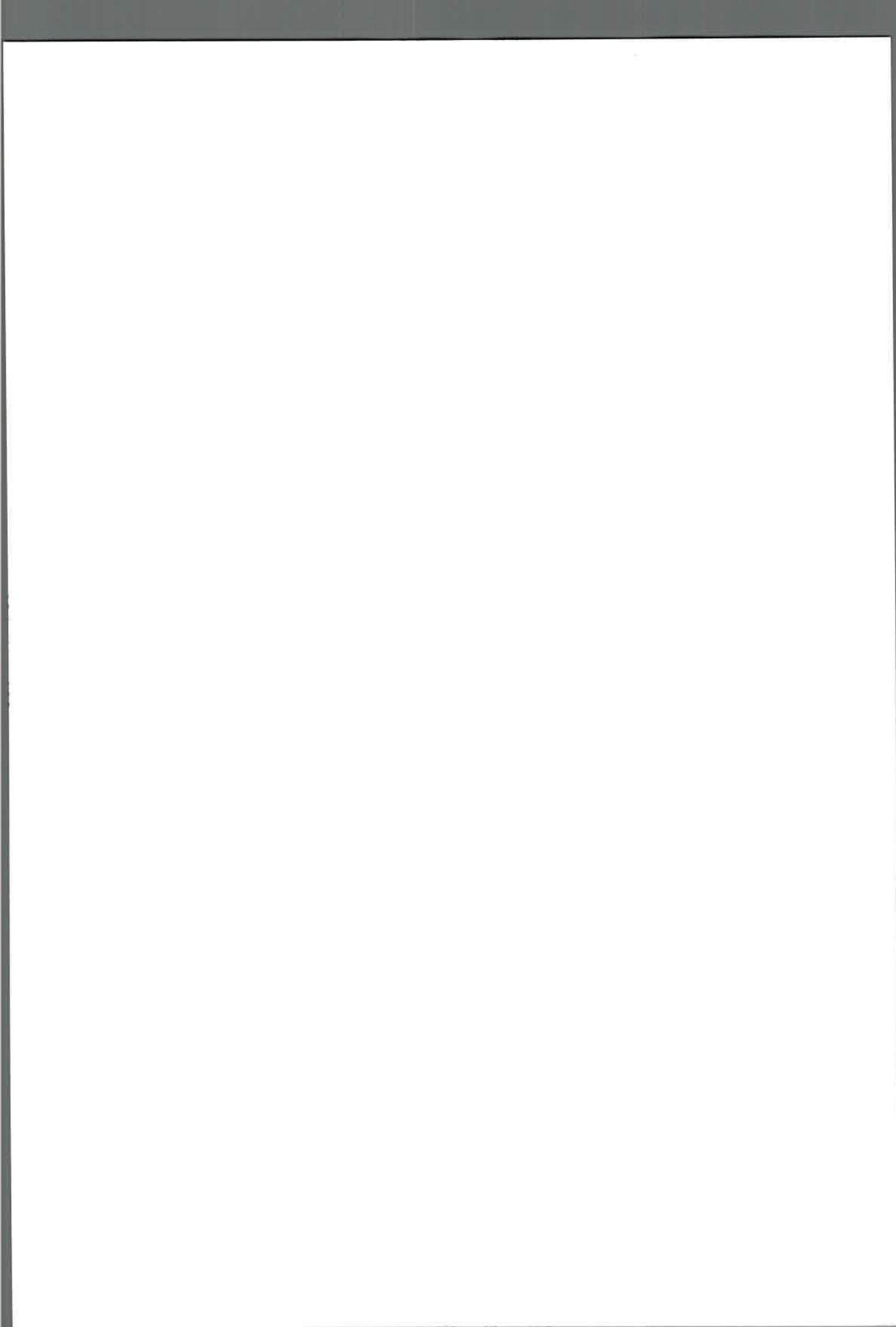
La CL se produce por la condensación de dos moléculas de PG, por lo que también se conoce como difosfatidilglicerol (Fig.4). Su estructura es única entre los PL de membrana ya que posee cuatro cadenas acilo y dos grupos fosfato.

### **Biosíntesis de fosfatidilcolina (PC)**

PC, PL más abundante en las membranas de los eucariotas, también ha sido encontrado en rizobios como se mencionó anteriormente (López Lara y Geiger, 2001). Durante mucho tiempo se pensó que las bacterias que poseen PC son aquellas que se encuentran en asociación con algún organismo eucariótico (Goldfine, 1982). Este PL ha sido encontrado en miembros de la familia Bradyrhizobiaceae, tales como *Bradyrhizobium japonicum* (Minder et al, 2001) y *Bradyrhizobium* SEMIA 6144 (Medeot et al, 2007).

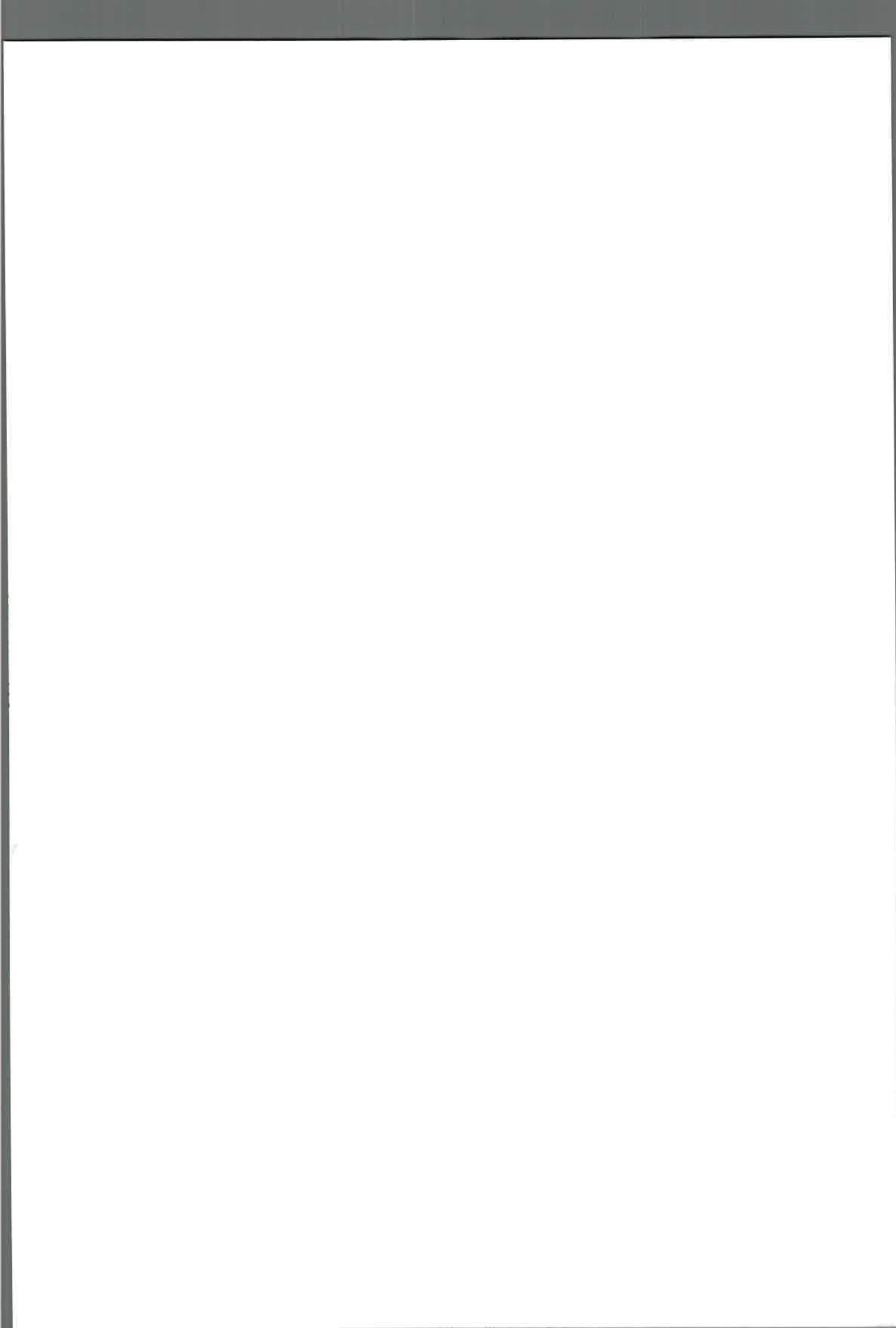
En organismos eucariotas PC puede ser sintetizada por dos vías alternativas: la vía CDP-colina o la vía de metilación (Kent, 1995). En la vía CDP-colina, también conocida como *vía de Kennedy*, la colina libre es convertida en PC vía los intermediarios colina fosfato y CDP-colina a través de acciones secuenciales de las enzimas colina quinasa, CTP (fosfocolina citidililtransferasa) y CDP-colina (1,2-





diacilglicerol colinafosfotransferasa). En la ruta de metilación, PC se forma por tres metilaciones sucesivas de PE a través de los intermediarios MMPE y DMPE, usando el dador de metilos S-adenosilmetionina y la enzima fosfolípido N-metiltransferasa (Pmt).

En procariotas se creía que la vía de metilación (Fig.5), era la única responsable de la síntesis de PC (Rock et al, 1996). Sin embargo existe una segunda vía de biosíntesis de para este PL: la de la fosfatidilcolina sintasa (Pcs) (Fig. 5), que parece ser exclusiva de bacterias (de Rudder et al, 1997, 1999; Sohlenkamp et al, 2000). En esta última, colina se condensa directamente con CDP-diacilglicerol para formar PC y CMP en una reacción catalizada por Pcs. La existencia de esta vía ha sido propuesta para un importante número de bacterias (Sohlenkamp et al, 2000; López-Lara y Geiger, 2001; López-Lara et al, 2003) y existen evidencias que la misma se encuentra en *Pseudomonas aeruginosa* (Wilderman et al, 2002) y en *Agrobacterium* (Karnezis et al, 2002).



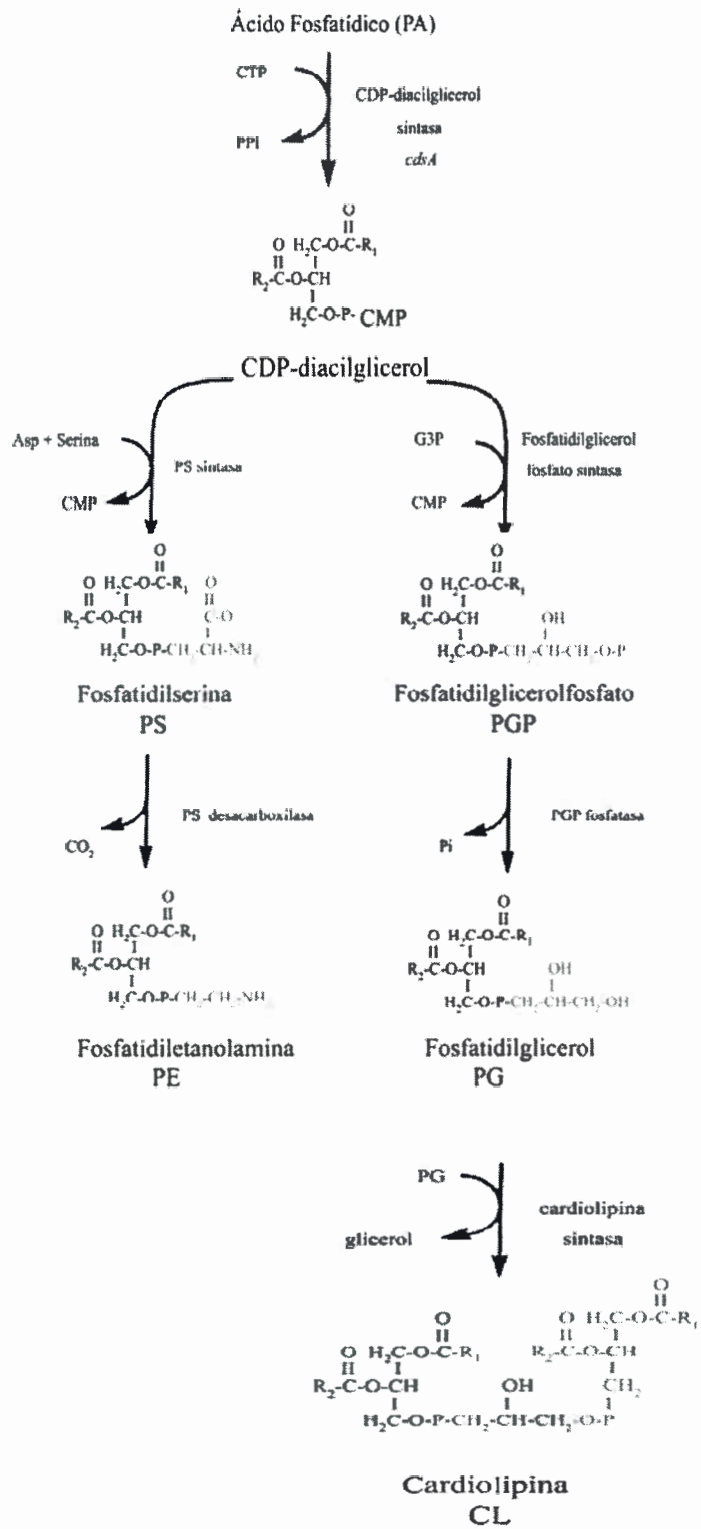
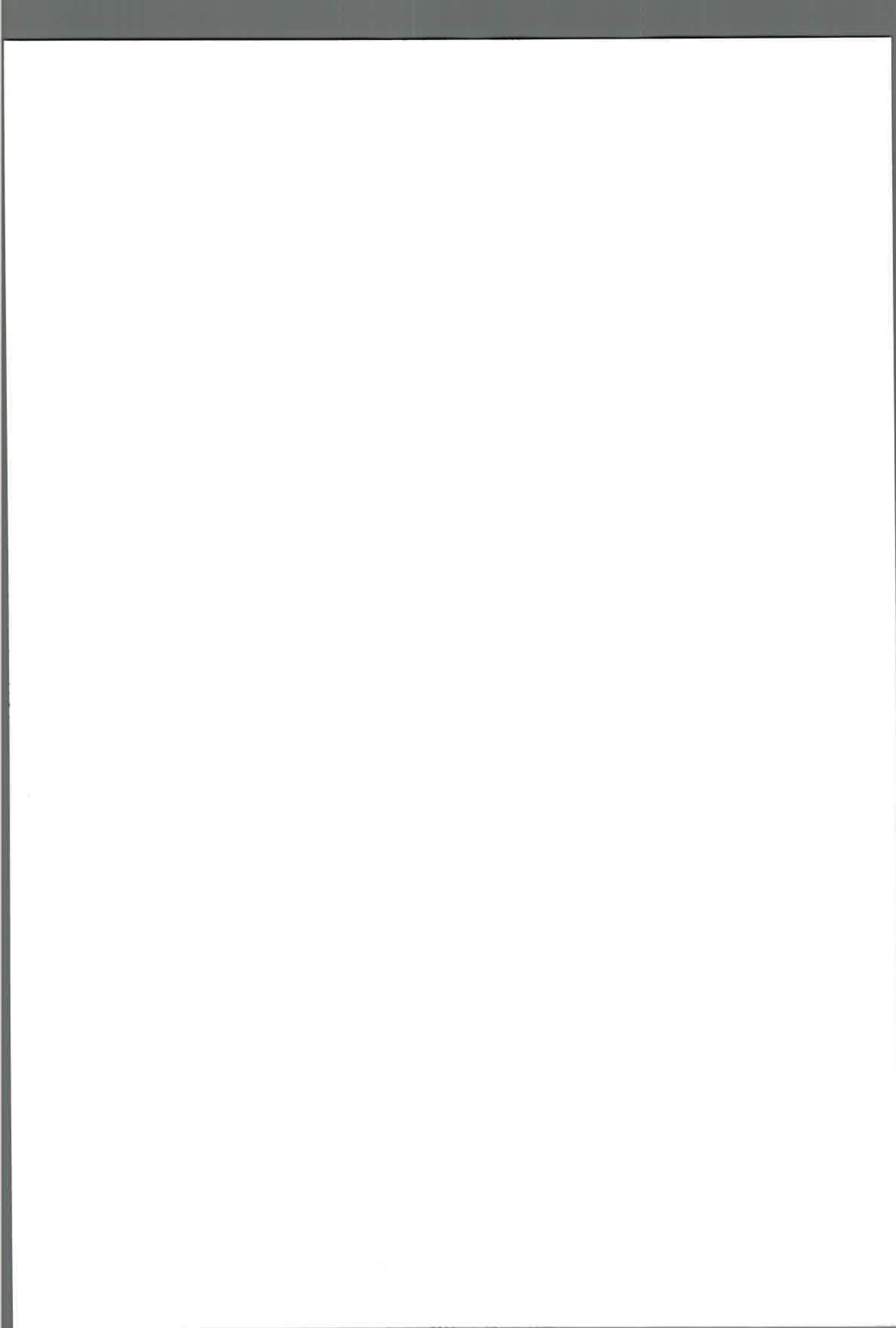
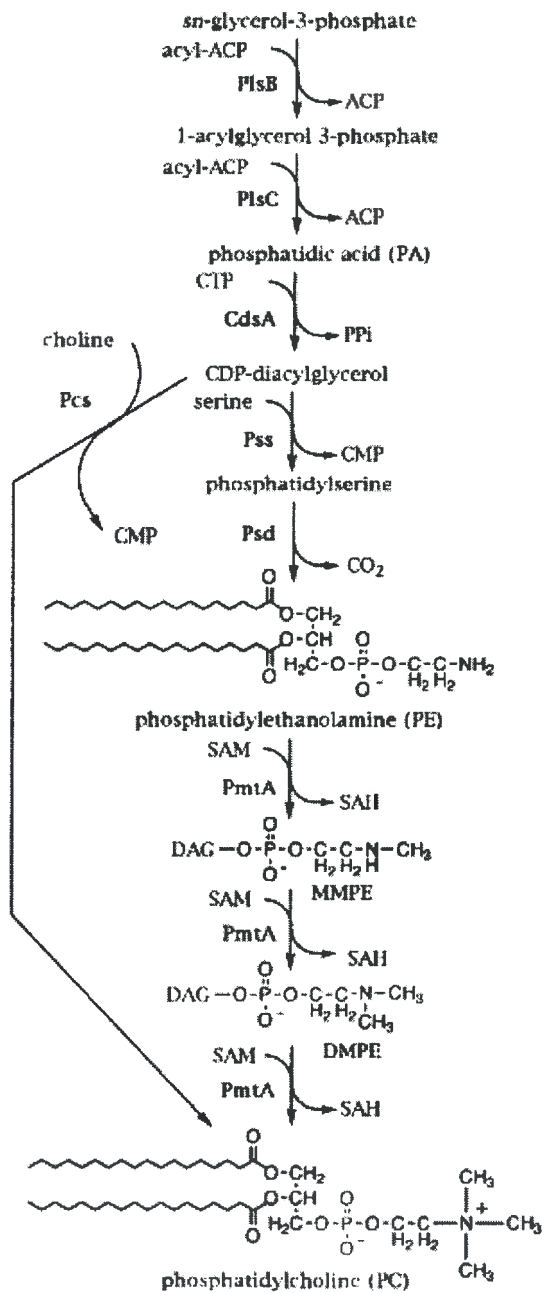
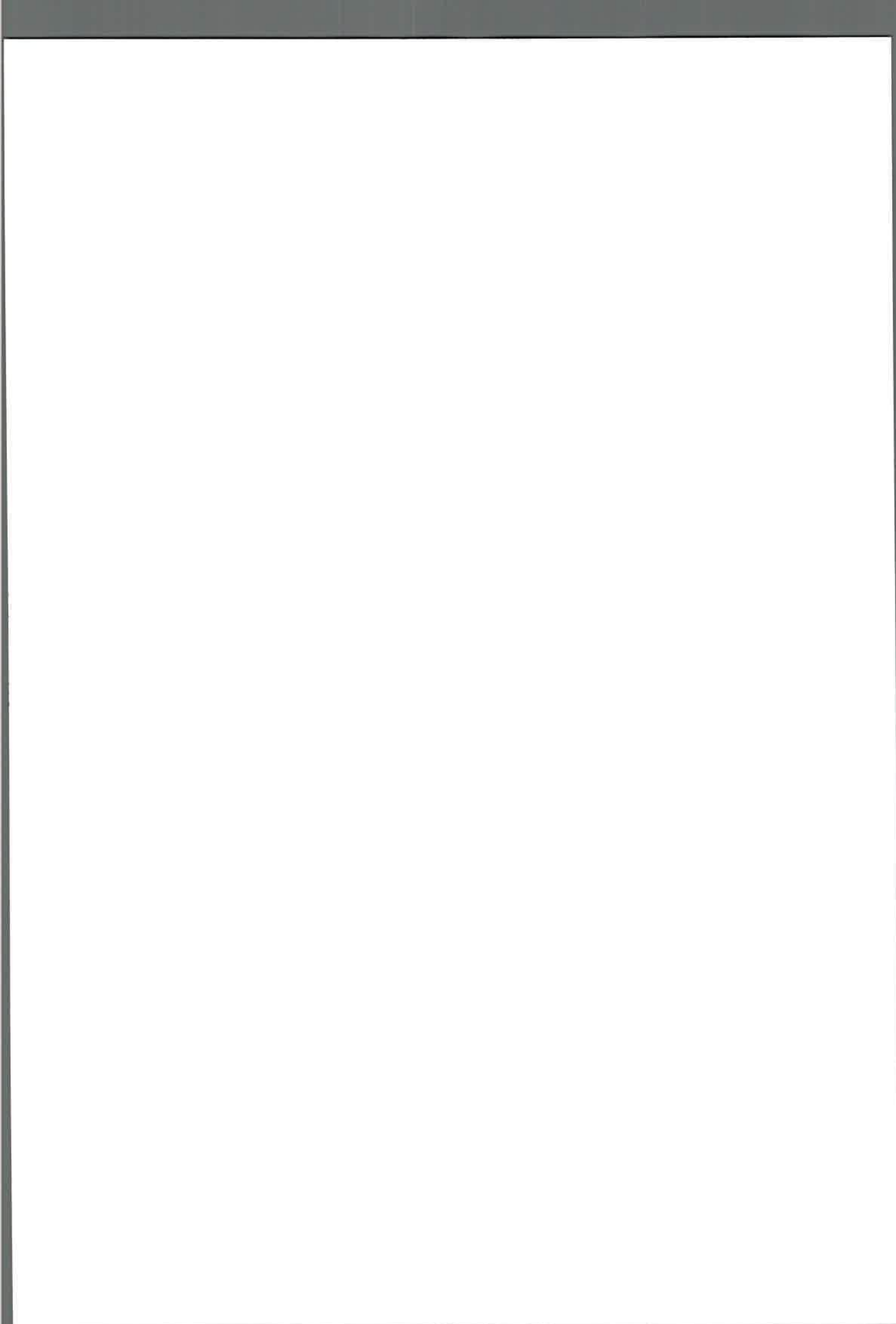


Figura 4. Síntesis de fosfolípidos en bacterias.





**Figura 5.** Esquema de las dos vías de biosíntesis de fosfatidilcolina descritas en bacterias (Martínez-Morales et al, 2003).

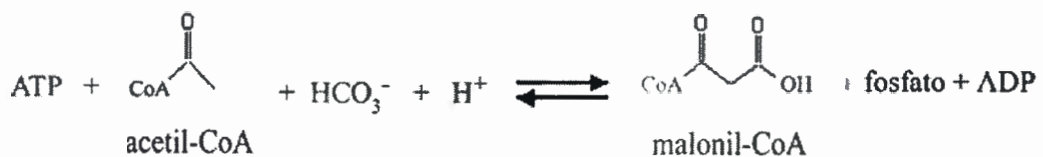


### 1.6.b. Síntesis de ácidos grasos en bacterias

Para la síntesis de novo de AG los organismos utilizan enzimas denominadas sintetasas de AG (FASasa). Hay dos tipos de FASasa: I y II. La FASasa tipo I está constituida por complejos proteicos multifuncionales que catalizan distintas reacciones usando diferentes dominios o distintas cadenas polipeptídicas. Por el contrario, al tipo II, lo constituye un sistema de enzimas no agregadas, cada una de las cuales cataliza cada paso de la síntesis (Campbell y Cronan Jr, 2001). La FASasa tipo I es típica de aves, mamíferos y levaduras, mientras que la tipo II es común de bacterias y plantas.

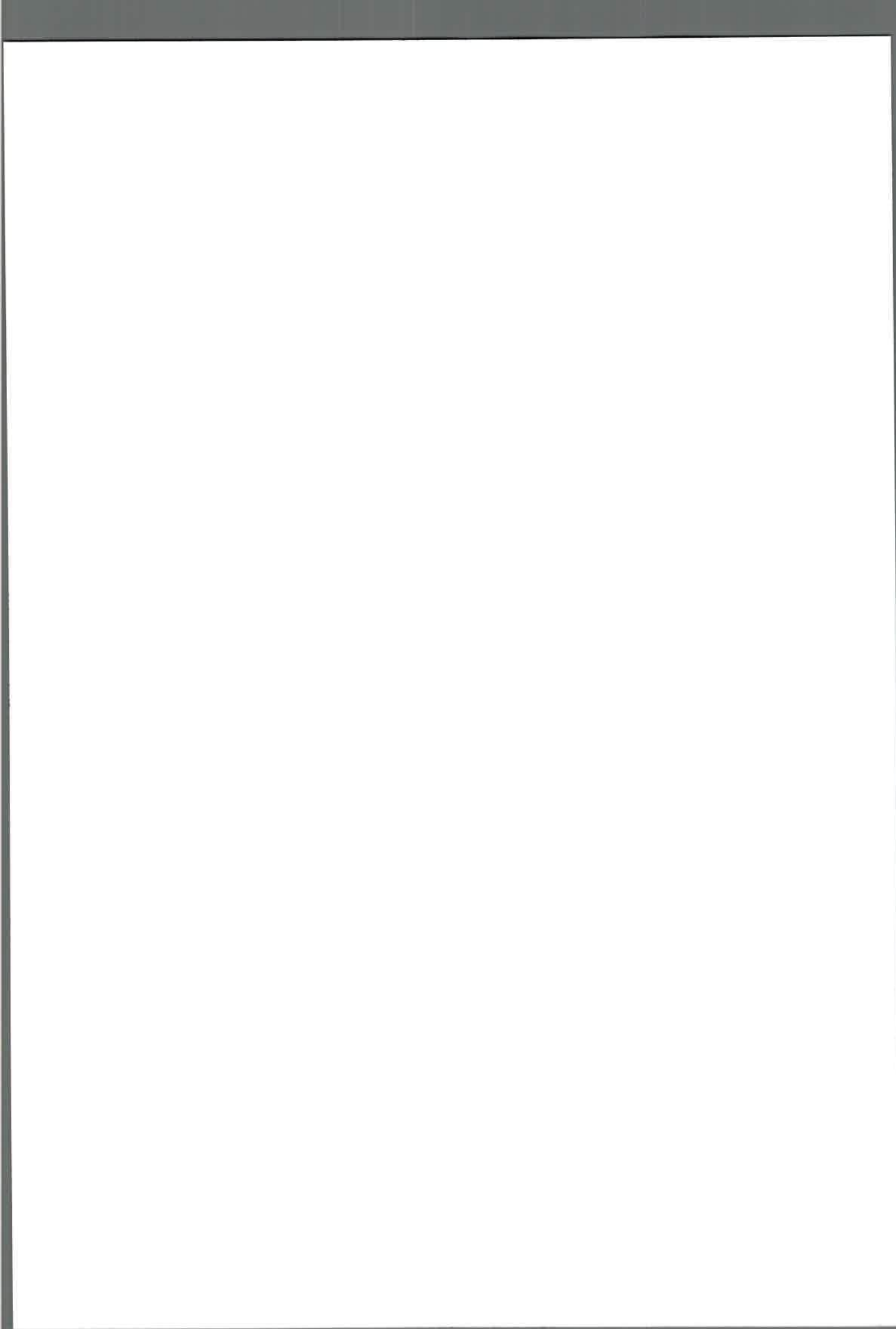
El mecanismo de síntesis de AG en bacterias está dividido en dos etapas: i) iniciación y ii) elongación. En los pasos iniciales de la biosíntesis de AG se sintetiza, a partir de su precursor acetil-CoA, el primer intermediario importante, acetoacetil-ACP. Hay varios caminos alternativos por los que se puede formar este intermediario a partir de acetil-CoA, los cuales implican algunas combinaciones de los intermediarios malonil-CoA, malonil-ACP y acetil-ACP. Estas primeras reacciones de la síntesis de AG pueden utilizar tanto una proteína pequeña y soluble a la que los intermediarios acilos se unen a través de un enlace tioéster con el grupo prostético, ACP (del inglés: Acyl Carrier Protein) como la coenzima A (CoA) para activar a los intermediarios de la biosíntesis.

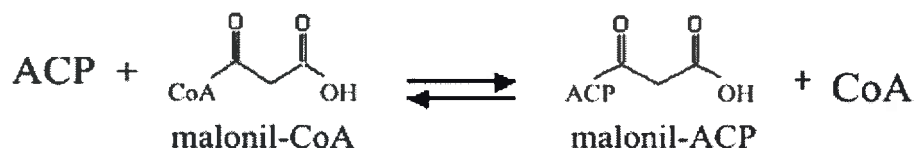
En la fase de iniciación, el acetil-CoA se transforma en malonil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa (ACC dependiente de ATP).



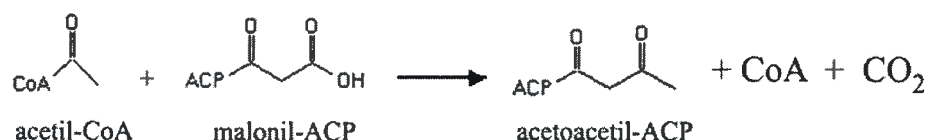
El malonil-CoA pasa a malonil-ACP gracias a la malonil-CoA:ACP transacilasa (MTA), codificada por *fabD*.



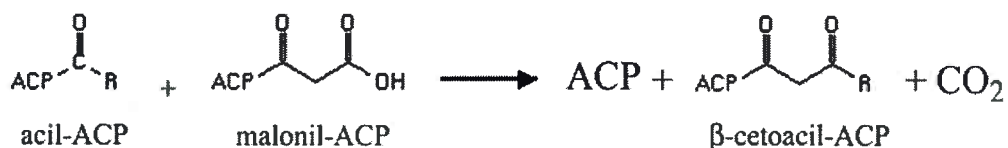




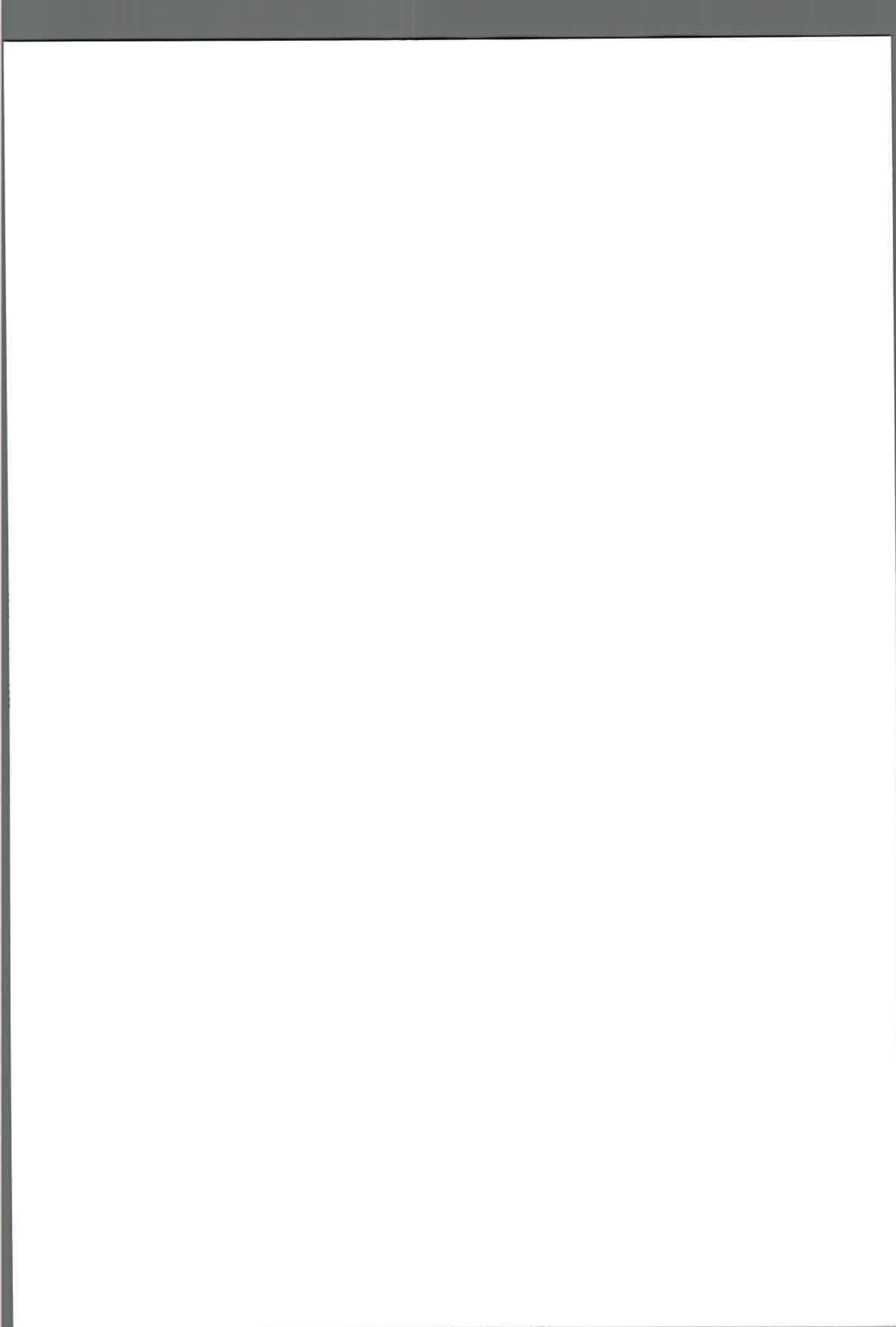
Durante la fase de elongación, la  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa III o KAS III (codificada por *fabH*) cataliza la condensación de malonil-ACP con acetil-CoA en la primera ronda de elongación, dando lugar a acetoacetyl-ACP.

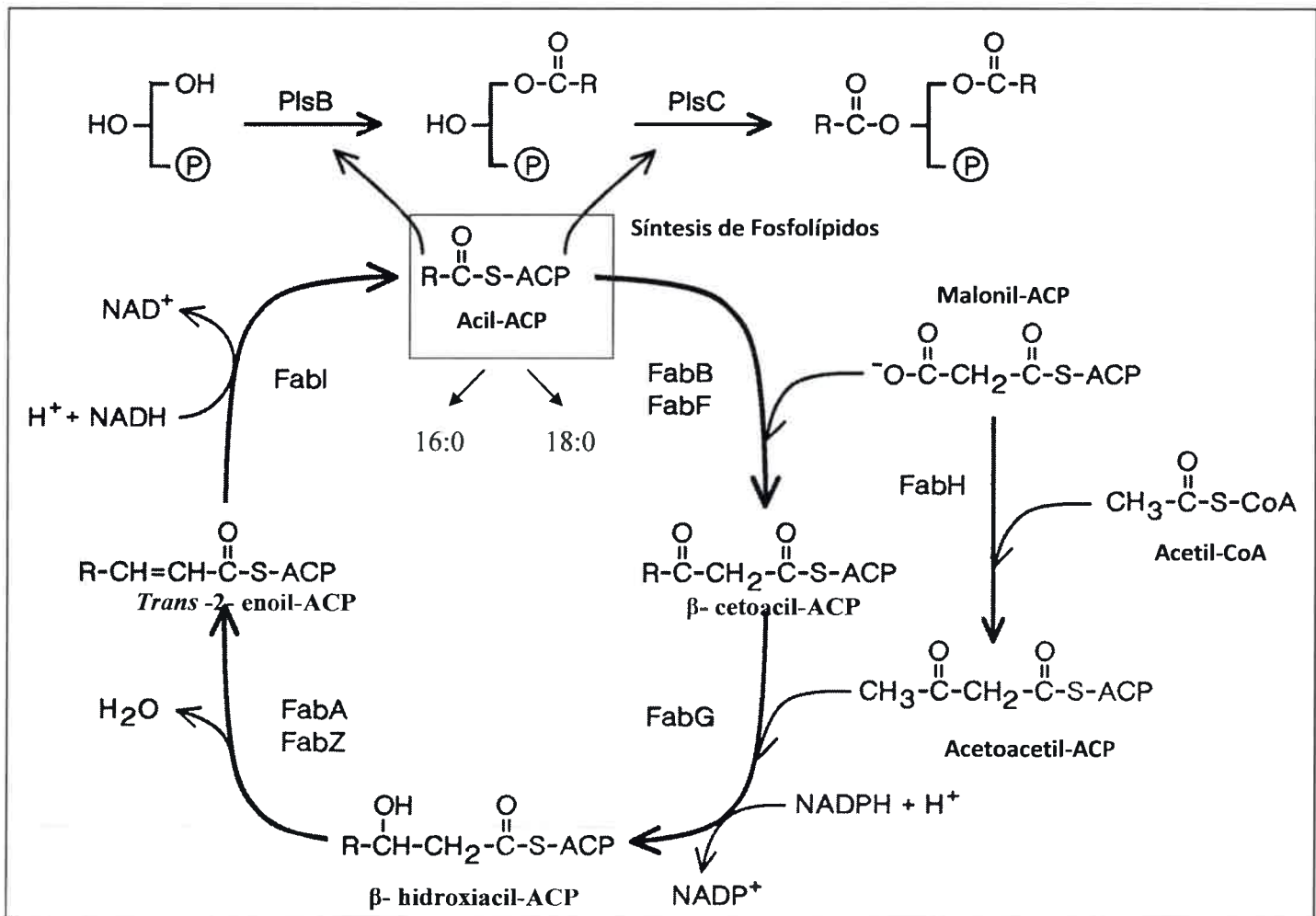


En sucesivas rondas de elongación el producto en formación (acil-ACP) se condensa con malonil-ACP para formar  $\beta$ -cetoacil-ACP. Esta reacción está catalizada bien por la  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa I o KAS I (codificada por *fabB*) o bien por la  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa II o KAS II (codificada por *fabF*).

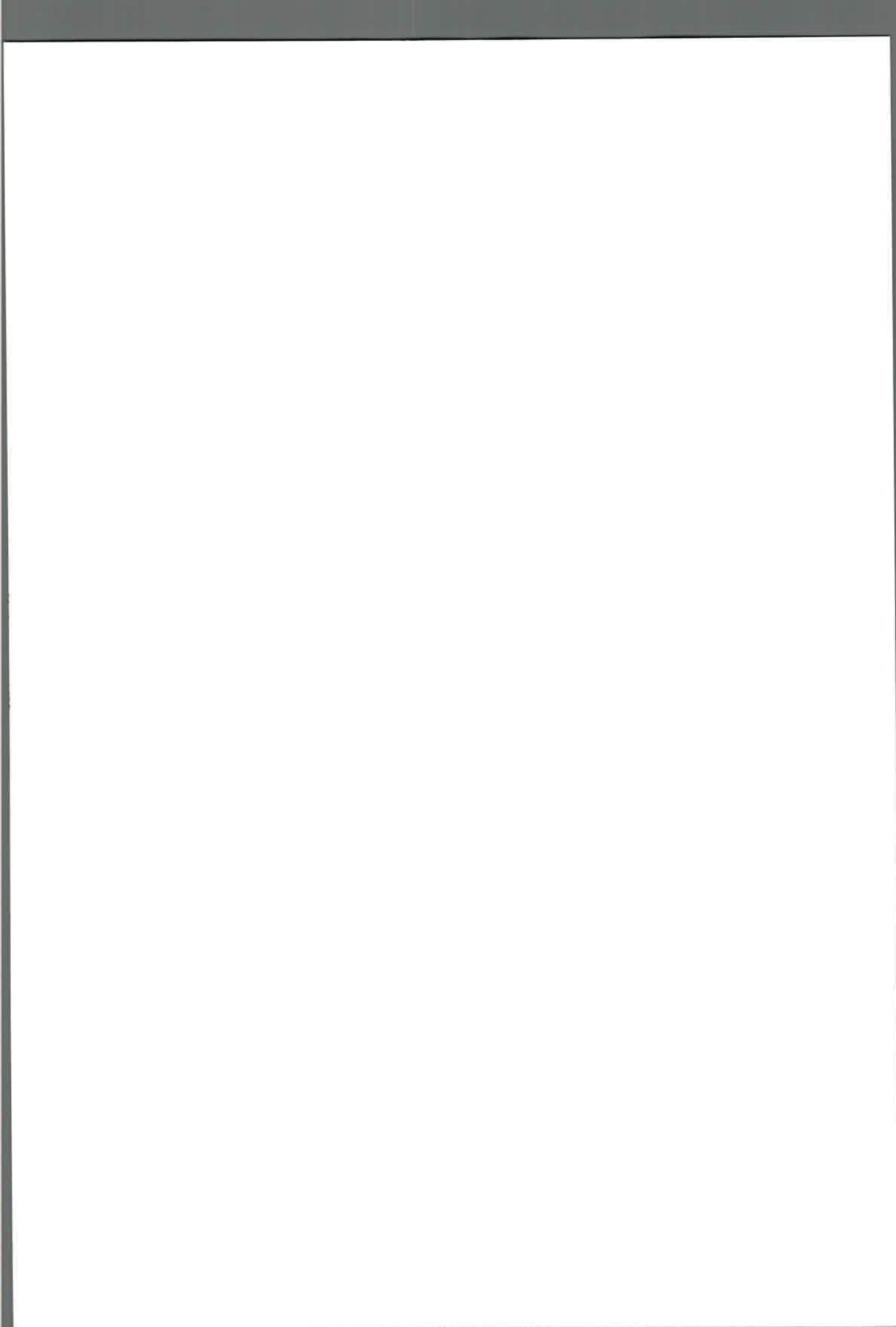


El  $\beta$ -cetoacil-ACP sufre de forma consecutiva reducción (FabG o  $\beta$ -cetoacil-ACP reductasa), deshidratación (FabZ o  $\beta$ -hidroxiacil-ACP deshidratasa y FabA o  $\beta$ -hidroxidecanoil-ACP deshidratasa), y de nuevo reducción (FabI o enoil-ACP reductasa) para completar una ronda de la cadena de elongación, dando lugar a acil-ACPs saturados. Un esquema detallado de la síntesis de ácidos grasos se muestra en la figura 6. Finalmente se forman así los principales AG saturados de bacterias, 16:0 y 18:0 que luego serán utilizados en la biosíntesis de PL.



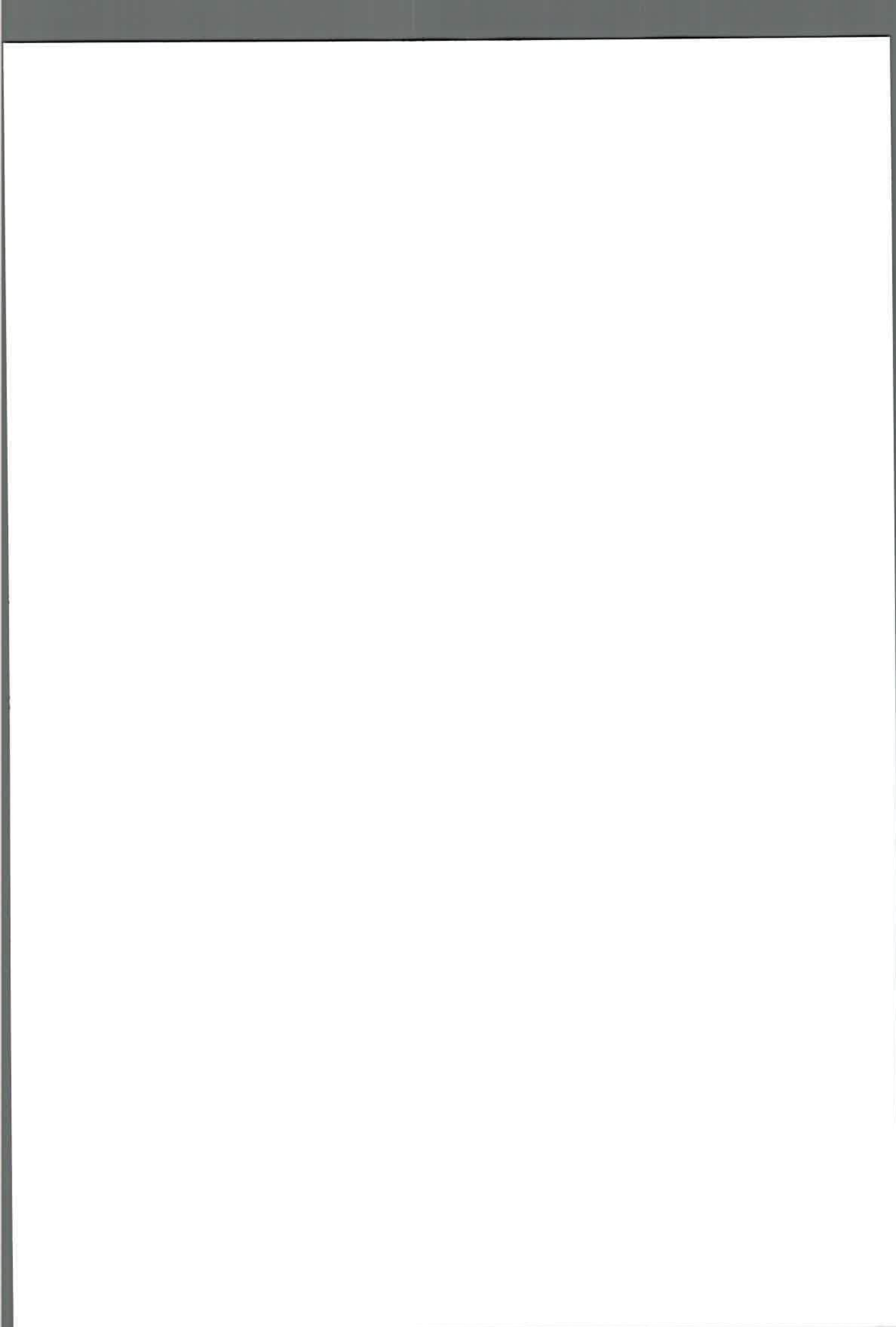


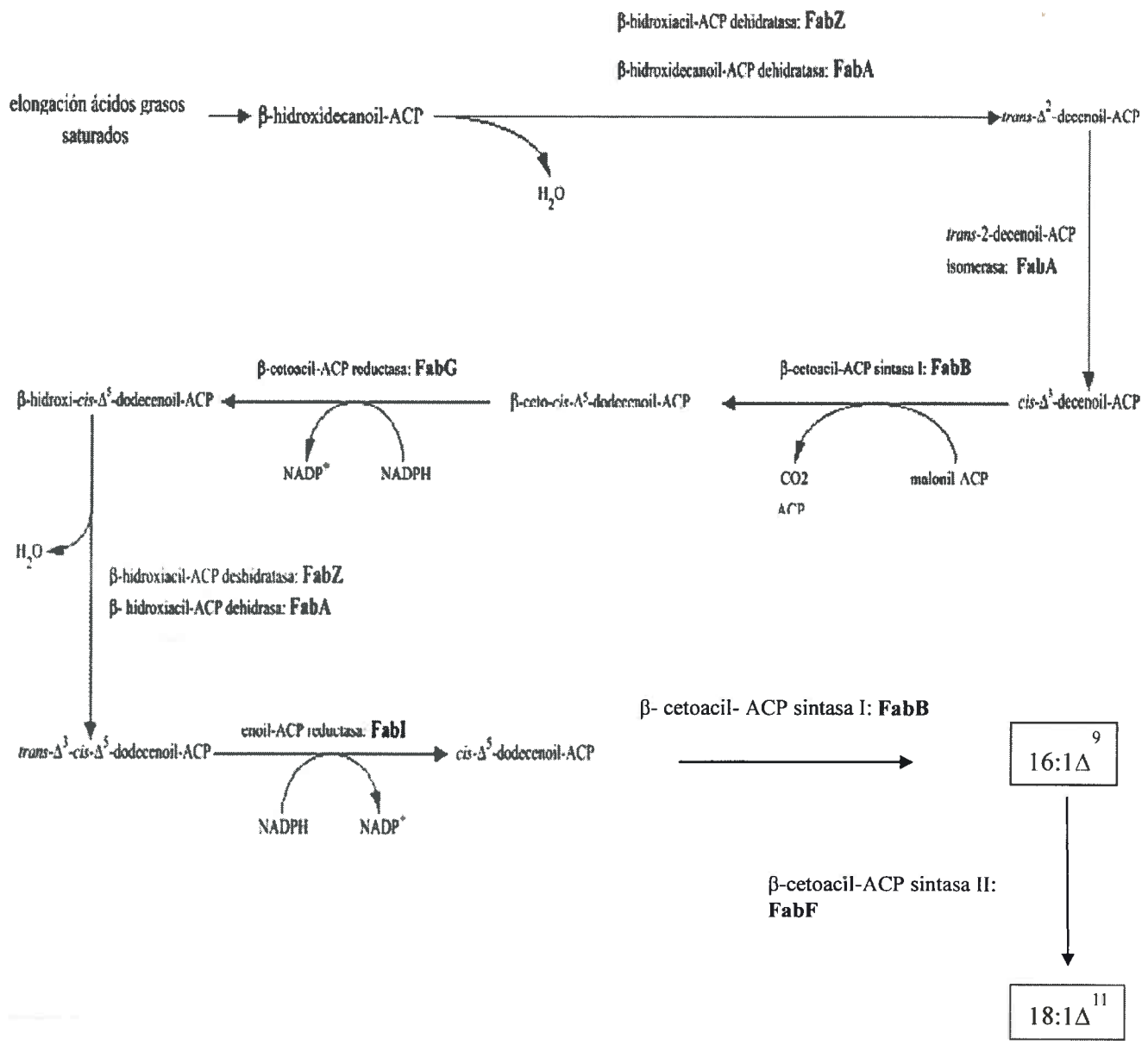
**Figura 6.** Esquema de la síntesis de ácidos grasos en bacterias. Con un recuadro rojo se indica el producto final del ciclo de síntesis.



En  $\alpha$  y  $\gamma$  Proteobacterias, la síntesis de AG saturados e insaturados está conectada por la ruta biosintética de AG insaturados anaeróbica (Fig.7). Los AG insaturados se producen por una isomerización del doble enlace trans-2 a un doble enlace cis-3 en la etapa de 10 carbonos de la síntesis. Esta isomerización es catalizada por la enzima FabA con su función trans-2-decenoil-ACP isomerasa. El producto cis-3 se condensa con malonil-ACP (mediante KAS I) para formar  $\beta$ -cetoacil-ACP, básicamente saltándose el paso de la enoil-ACP reductasa (FabI) y manteniendo así el doble enlace.

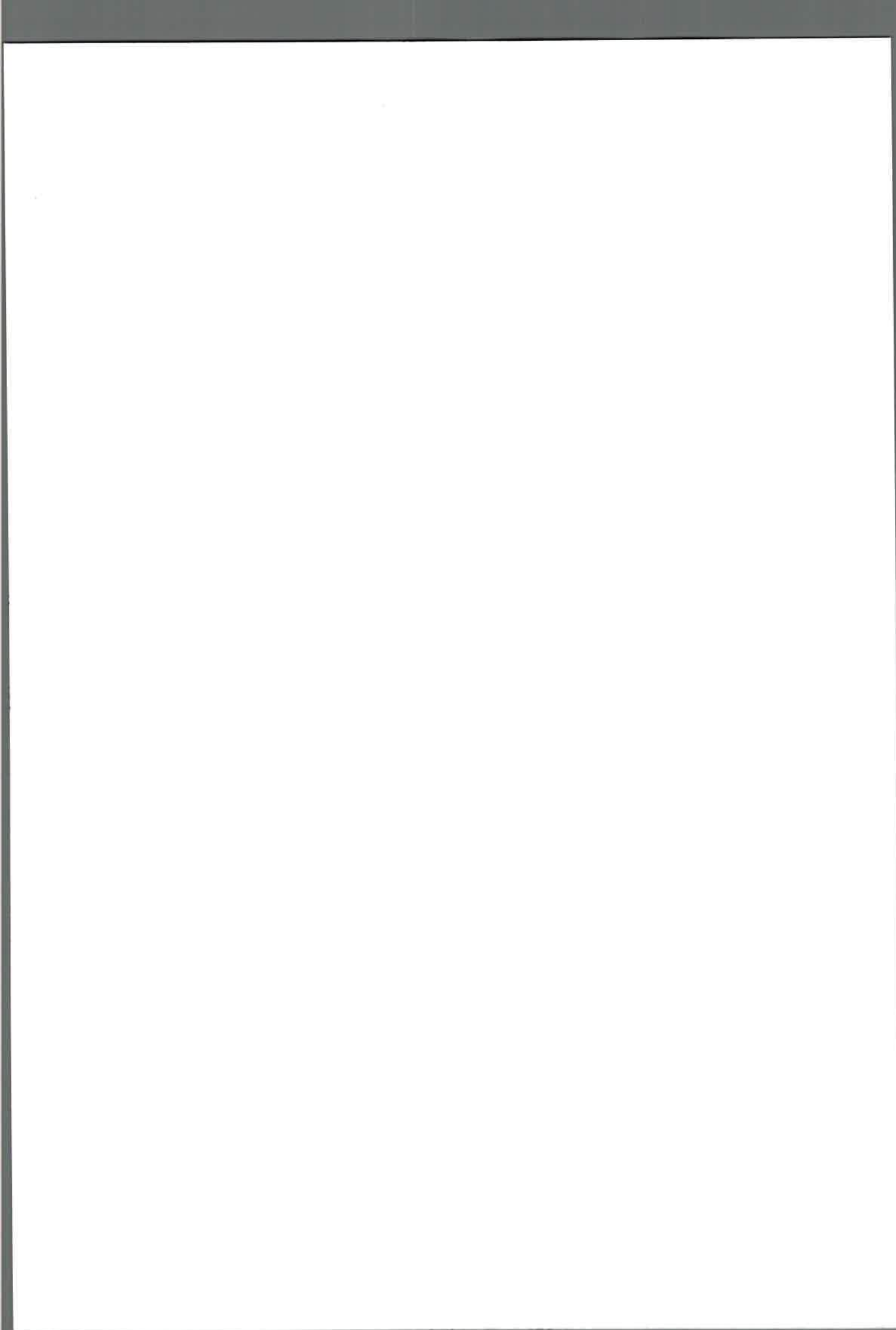
En subsecuentes rondas de elongación, la cadena acilo se extiende hasta el producto de longitud total, generalmente 16:1 $\Delta^9$  y 18:1 $\Delta^{11}$  (Fig.7).





**Figura 7.** Esquema de la síntesis de los principales ácidos grasos insaturados en bacterias, mediante la vía anaeróbica.

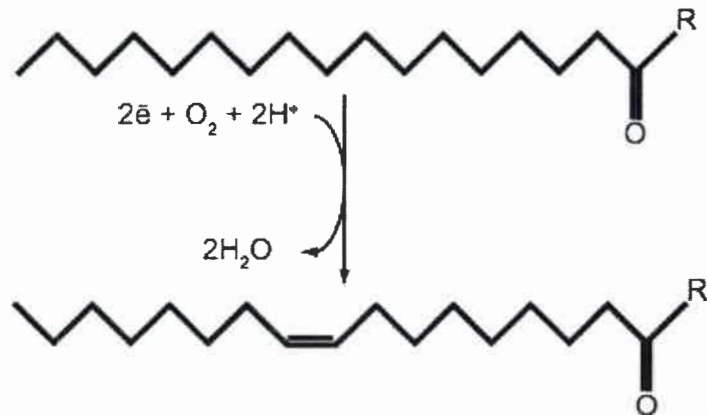




Además de esta ruta de síntesis algunos microorganismos poseen otra vía para sintetizar sus AG insaturados, la cual es comúnmente denominada aeróbica. La misma utiliza enzimas denominadas desaturasas para introducir dobles ligaduras en AG preformados.

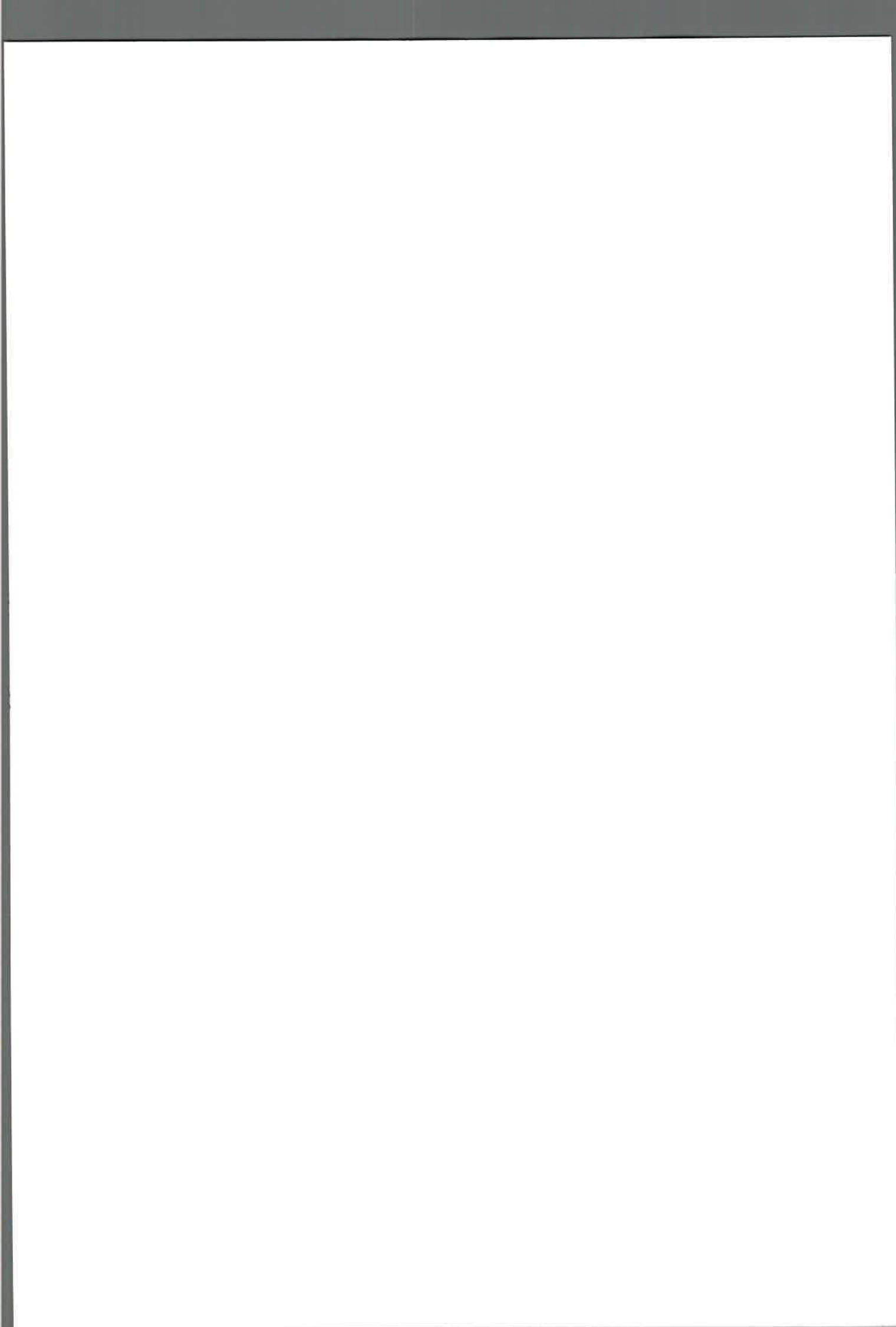
### 1.7. ENZIMAS DESATURASAS

Las enzimas desaturasas catalizan reacciones de deshidrogenación dentro de la cadena carbonada de los AG, lo que resulta en la formación de una doble ligadura (Fig.8). Para llevar a cabo la reacción las enzimas desaturasas reclutan y activan el oxígeno molecular en el sitio activo asociado a átomos de hierro. En la reacción, se introducen dobles enlaces dentro del AG, removiendo hidrógenos, a la vez que una molécula de  $O_2$  se reduce completamente a  $H_2O$ , (Fox et al, 1993). Este paso demanda gran cantidad de energía, un donador específico de electrones y una cadena transportadora de electrones.



**Figura 8.** Esquema de una desaturación de AG. En el caso de una acil-CoA desaturasa, R será una molécula de CoA, mientras que para una acil-lípido desaturasa, R será un lípido.

Existen dos clases de desaturasas, las que han evolucionado de forma independiente (Shanklin y Somerville, 1991): las de carácter soluble y las asociadas a membranas. Las desaturasas solubles son acil-ACP desaturasas y se encuentran principalmente en los cloroplastos de las plantas superiores. Las desaturasas integrales de membrana son las que están más ampliamente distribuidas entre los organismos, encontrándose tanto en procariotas como eucariotas (Shanklin y Cahoon, 1998). Las



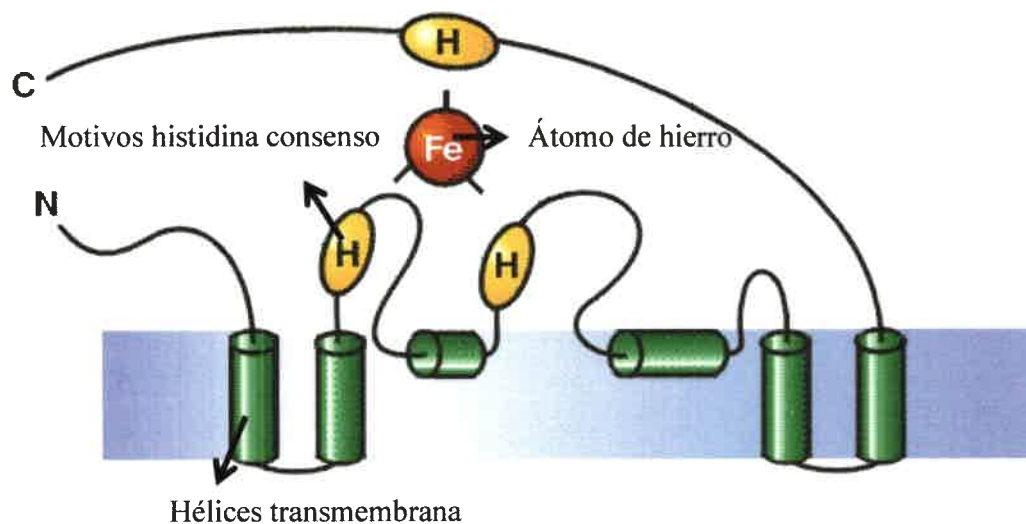
desaturasas de membrana pueden a su vez ser clasificadas en dos grupos dependiendo del sustrato que utilicen. Las acil-CoA desaturasas: utilizan como sustrato el AG unido a la CoA, mientras que las acil-lípido desaturasas: utilizan como sustrato un AG que forman parte de la molécula de un lípido.

Las desaturasas muestran diferentes motivos consenso, la clase soluble tiene un motivo consenso formado por ligandos de carboxilato e histidina que coordinan un sitio activo unido a dos átomos de hierro (Lindquist et al, 1996). La clase integral de membrana contiene un motivo consenso (Fig.9) para el sitio activo formado por tres regiones ricas en histidinas que están involucradas en la unión a un átomo de hierro (Shanklin et al, 1994). Este grupo de 8 de histidinas conservadas, comprende un motivo tripartito, HxxxxH, HxxHH, y HxxHH, el cual ha sido identificado en todas las desaturasas de membranas.

Lamentablemente, la información acerca de las especificidades de sustrato, regio-selectividades y la estructura de las desaturasas de membrana es escasa, debido a las limitaciones técnicas en la obtención de grandes cantidades de formas activas de estas enzimas.

Hasta el momento sólo se han obtenido las estructuras cristalinas de dos enzimas desaturasas solubles, pertenecientes a las plantas *Ricinus communis* y *Hedera hélix* (Whittle et al, 2005; Guy et al, 2007).





**Figura 9.** Esquema de una desaturasa de ácidos grasos integral de membrana, con sus tres dominios histidina característicos, unidos al átomo de hierro formando el sitio catalítico.

La regio-selectividad de las enzimas desaturasas es un término que hace referencia a la posición de la doble ligadura que es introducida por la enzima dentro de la cadena de AG. De esta forma las desaturasa son comúnmente nombradas en base a su regio-selectividad, por ejemplo el nombre delta ( $\Delta$ ) 9 desaturasa, indica que la doble ligadura que introduce esta enzima se localiza en el carbono nueve contando desde el grupo carboxilo de la cadena del AG que utilice como sustrato.

### 1.7.a. Enzimas desaturasas en bacterias

El sistema de desaturación más conocido y estudiado en bacterias es el que pertenece a la bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis* y que fue descrito por Aguilar et al (1998). Este microorganismo posee un único gen desaturasa, el cual codifica para una acil-lípido desaturasa (Altabe et al, 2003), capaz de introducir una doble ligadura en la posición  $\Delta^5$  del AG 16:0, unido a glicerolípidos. La enzima desaturasa de *B. subtilis* es una proteína de membrana, con seis hélices transmembrana, un dominio asociado a membrana el cual parece estar fuertemente relacionado al sitio de unión del sustrato y el clásico motivo consenso de tres regiones ricas en histidina.

La cianobacteria, *Synechocystis* sp. PCC contiene cuatro acil-lípido desaturasas (Los y Murata, 2004). DesA introduce la doble ligadura en la posición  $\Delta^{12}$ , DesB en la posición  $\Delta^{15}$  y DesC en la posición  $\Delta^9$ . Este sistema de desaturasas de *Synechocystis*. sp es capaz de formar AG poliinsaturados ya que el AG formado por una enzima es utilizado por otra desaturasa obteniéndose finalmente AG con más de una doble

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data.

**2. The second part of the document outlines the procedures for handling discrepancies.**

In the event of a discrepancy, it is crucial to identify the source of the error as soon as possible. This involves a thorough review of the relevant records and a comparison with the original source documents. Once the error is identified, the appropriate corrective action should be taken to ensure that the records are accurate and up-to-date.

Finally, the document stresses the importance of regular audits and reviews. These checks help to ensure that the records are consistent and reliable over time. By following these guidelines, you can maintain a high level of accuracy and integrity in your financial reporting.

ligadura. A diferencia de *Synechocystis* sp. PCC, la bacteria *Synechococcus* sp. contiene solo una  $\Delta^9$  desaturasa, que produce AG emonoinsaturados exclusivamente.

En *Pseudomonas aeruginosa*, se han descrito hasta el momento, dos rutas aeróbicas de síntesis de AG insaturados, que se complementan con la vía anaeróbica (dependiente de la FASasa tipo II) y que incluyen dos desaturasas de AG (Zhu et al, 2006). Estas dos rutas aeróbicas proporcionan un mecanismo que modifica los AG de los PL ya existentes. La primera de las rutas incluye a DesA que introduce una doble ligadura en la posición  $\Delta^9$  de las cadenas acilo ubicadas en el carbono 2 de la molécula de glicerol de los PL (acil-lípido desaturasa), generando principalmente PE y PG insaturados. La actividad de DesA es controlada por las propiedades biofísicas de la membrana plasmática. La segunda vía aeróbica implica la acción de DesB que puede desaturar 18:0 y 16:0 exógeno (acil-CoA desaturasa) generando sus productos 18:1 $\Delta^9$  y 16:1 $\Delta^9$  respectivamente. El análisis de la secuencia de aminoácidos de ambas enzimas desaturasas, reveló el típico motivo consenso de histidinas.

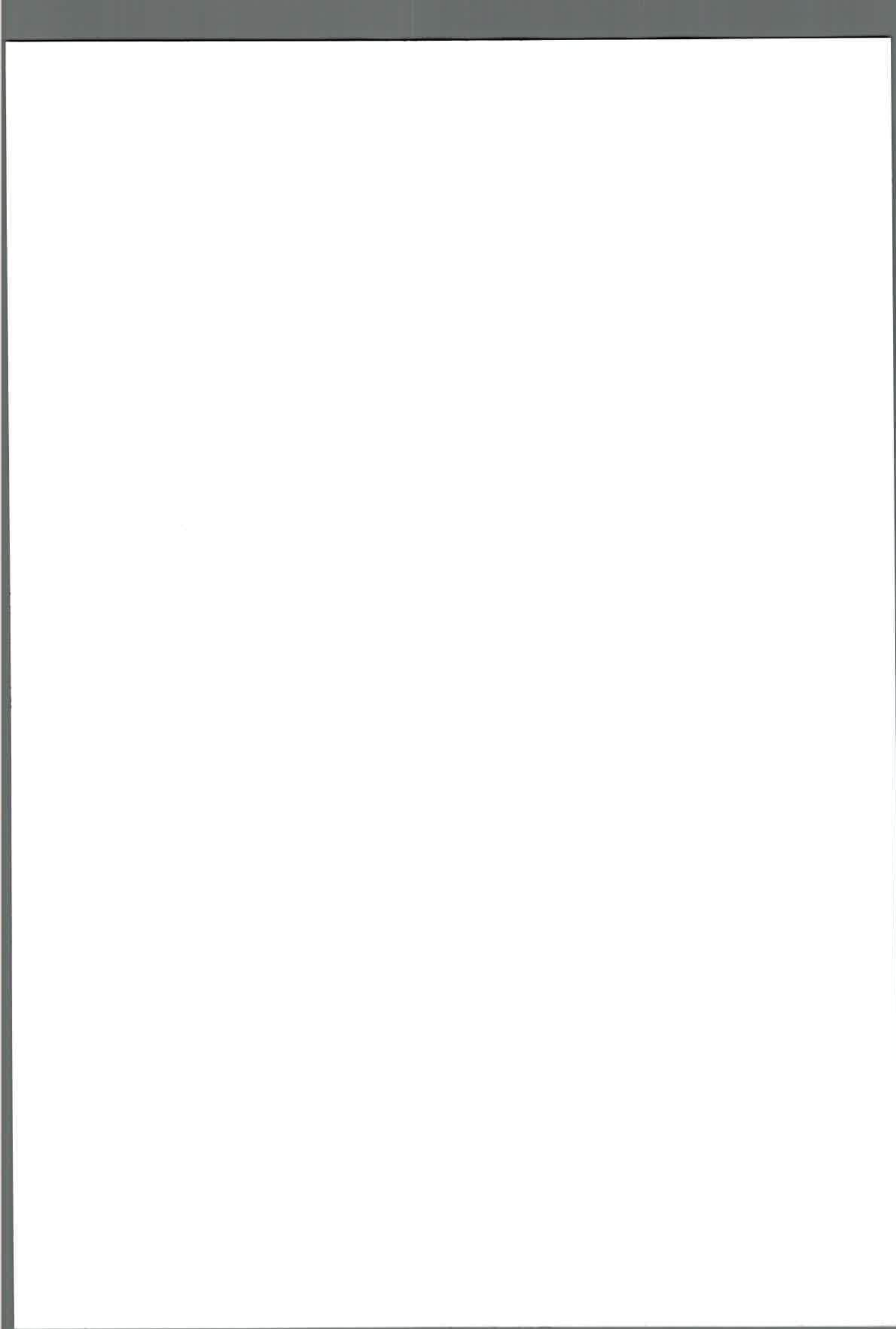
Recientemente se ha comprobado la función de la enzima  $\Delta^9$  desaturasa en las bacterias Gram negativas, *Psychrobacter urativorans* y *Pseudoalteromonas* sp. MLY15 por expresión heteróloga en *E. coli*. Ambas enzimas fueron capaces de desaturar tanto 18:0 como 16:0 a 18:1 $\Delta^9$  y 16:1 $\Delta^9$ , respectivamente (Li et al, 2008, 2009) y mostraron además el clásico motivo de tres regiones ricas en histidina típico de las desaturasas de membrana.

## 1.8. EFECTOS DEL ESTRÉS SOBRE LOS COMPONENTES DE MEMBRANA

La fluidez de la membrana es un parámetro muy importante en la homeostasis global de la célula. Las células se adaptan a los estímulos externos alterando la composición de los lípidos de forma que la fluidez de la bicapa permanezca relativamente constante mediante un proceso denominado “adaptación homeoviscosa” (Sinesky, 1974).

Si tenemos en cuenta que la membrana bacteriana es la primera diana de muchos de los estreses naturales (por ejemplo desecación, cambios de temperatura, presencia de tóxicos orgánicos, etc) comprenderemos que el estudio de las alteraciones que se producen en los distintos componentes de la misma, en respuesta a estreses ambientales, es fundamental para el entendimiento de la fisiología bacteriana. Los mecanismos de





adaptación estudiados hasta el momento y que implican la modificación de los componentes de los PL pueden incluir: I) cambios en el grado de insaturación de los AG, II) formación de AG ciclopropanos, III) isomerización de *cis* a *trans* de los AG insaturados y IV) modificación de los grupos cabeza de los PL (Hartig et al, 2005).

Por ejemplo bajas temperaturas provocan una disminución en la fluidez de las membranas (Fig.10), las células responden por lo general con un incremento en la proporción de AG insaturados, una disminución de la longitud de las cadenas acilo y un incremento en la ramificación de los AG, todos estos cambios pueden ocurrir por separado o en forma combinada para contrarrestar el cambio en la fluidez de la membrana (Russell, 1984). Lo contrario a esto último ocurre cuando las células se exponen a elevadas temperaturas.

El efecto de la temperatura de crecimiento en la composición de AG de *Dictyostelium* ha sido analizado por Saito et al, (2005), quienes reportaron que las cantidades del AG 16:2 $\Delta^{5,9}$  y 18:2 $\Delta^{5,11}$ , disminuyen con el incremento de la temperatura. Además, un estudio realizado en *Lactobacillus helveticus* demostró que elevadas temperaturas de crecimiento resultan en una disminución del grado de insaturación de los AG (Guerzoni et al, 2001).

Elevadas concentraciones de sal en el medio también inducen cambios en los AG componentes de las bacterias, esta condición provoca lo que se conoce como rigidización de la membrana plasmática o disminución en la fluidez de la misma (Fig.10). La respuesta adaptativa más conocida en relación a esto es un marcado decrecimiento de la relación AG insaturados y saturados (U/S), debido a una disminución de los AG insaturados (Chihib et al, 2005).

Aumento de isómeros *trans* en respuesta a calor, disolventes orgánicos y otros estreses ha sido informado para diferentes especies de *Pseudomonas* como uno de los principales mecanismos de adaptación (Ramos et al, 1997; Junker y Ramos, 1999; Heipieper et al, 2003).

El perfil de AG ha sido utilizado con fines quimiotaxonómicos, en diferentes familias de rizobios (Tighe et al, 2000) y poco se conoce de su participación en la respuesta al estrés. Además de los efectos sobre la composición de AG debidos a la fase de crecimiento (Boumahdi et al 1999-2001) y bajas temperaturas (Théberge et al,



1996; Drouin et al, 2000), no existe información de la respuesta de los rizobios a elevadas temperaturas de crecimiento y salinidad.

Drouin et al (2000), informaron cambios en el patrón de AG cuando *Rhizobium leguminosarum* fue sometido a bajas temperaturas de crecimiento. La respuesta del microorganismo fue un marcado incremento en las cantidades del AG insaturado 18:1 $\Delta^{11}$  y como consecuencia un incremento en la relación U/S.

Los cambios en la composición de AG frente a estreses ambientales han sido muy bien descritos para varios organismos (Suutari y Laakso, 1994). Sin embargo la regulación de las rutas biosintéticas de AG ha sido mucho menos estudiada. Si hablamos particularmente de los cambios producidos en la composición de AG por la temperatura de crecimiento, esto parece depender del mecanismo de síntesis de AG monoinsaturados que el organismo utilice (Keweloh y Heipieper, 1996).

Al contrario del papel bien definido de los AG componentes de los PL para varios organismos, en la respuesta a estímulos ambientales, existe muy poca información sobre la función fisiológica de los grupos cabeza, tanto en condiciones normales como de estrés. Cambios en los PL han sido reportados en respuesta a estreses ambientales tales como el producido por la temperatura en microorganismos psychrophilicos y thermophilicos, (Russell, 1992) y por la sal en el halófito moderado, *Vibrio costicola* (Russell et al, 2002) y en la levadura marina, *Debaryomyces hansenii* (Turk et al, 2007).

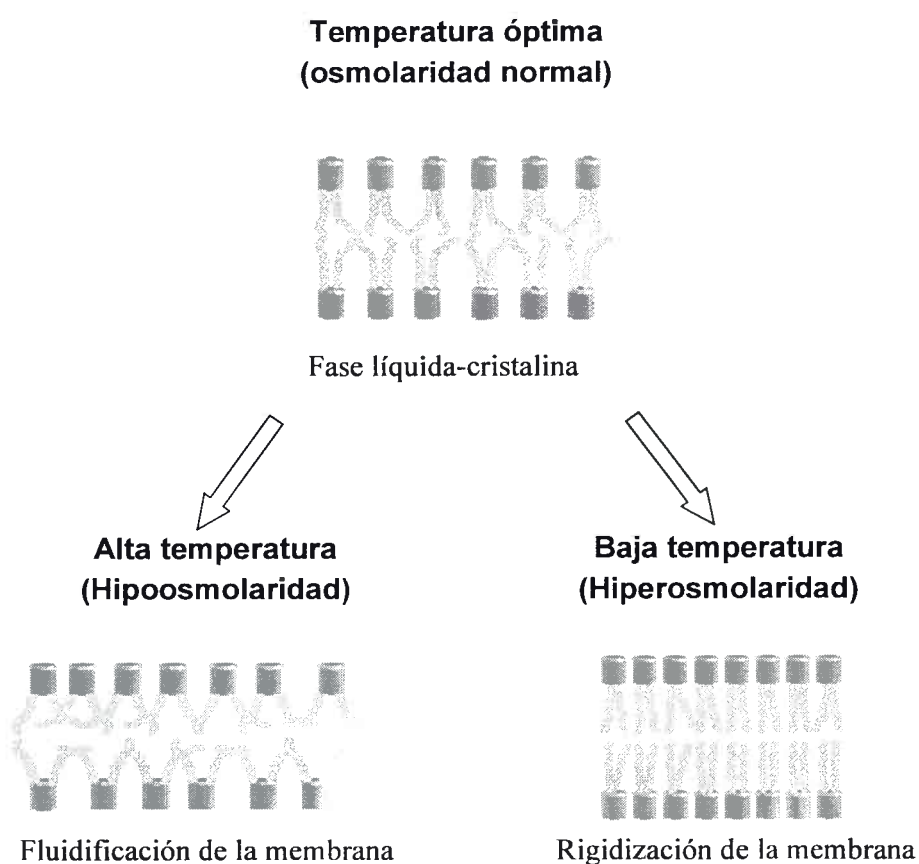
Se ha demostrado que el crecimiento en presencia de altas concentraciones de NaCl resulta en la alteración de la composición de la cabeza polar de los PL y en la composición de AG tanto de bacterias Gram negativas como Gram positivas (Kancmasa et al, 1972; Hanna et al, 1984). Tales cambios en la composición lipídica bacteriana en respuesta a altas concentraciones de NaCl pueden resultar entonces en membranas con sus características físicas alteradas (Miller, 1986).

Se ha informado que en condiciones de baja presión de oxígeno, se produce un incremento en las cantidades de PE y PG y también una disminución en la cantidad de PC en *Bradyrhizobium japonicum* (Tang y Hollingsworth, 1998).

A concentraciones limitantes de fosfato, algunas bacterias del suelo reemplazan cuantitativamente los PL por lípidos de membrana que no contienen fósforo. Tal es el caso de *Ensifer meliloti*, capaz de formar nódulos fijadores de nitrógeno en alfalfa,

donde se ha demostrado que produce sulfolípidos, lípidos que contienen ornitina y trimetilhomoserina diglicérido cuando crece en medios con limitación de fosfatos (Geiger et al, 1999).

Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo (Medeot et al, 2007), revelaron significativos cambios en las cantidades de PC en *Bradyrhizobium* SEMIA 6144 (nodulante de maní), por efecto de la temperatura de crecimiento y la salinidad, indicando un importante rol de este PL en la adaptación al estrés.



**Figura 10.** Representación esquemática de los cambios en la estructura de la membrana y en el comportamiento de la bicapa lipídica bajo condiciones de estrés por temperatura y salinidad. Las bajas temperaturas ocasionan la rigidización de las membranas mientras que las altas temperaturas causan su fluidificación (Los y Murata, 2004).



### 1.8.a. Papel de las desaturasas bacterianas en la adaptación a cambios de temperatura

La biosíntesis de novo de AG es modificada por las señales ambientales para producir cadenas acilo con diferentes propiedades que son requeridas para optimizar las funciones de la membrana. Sin embargo, las bacterias están expuestas a cambios abruptos de temperatura, que requieren la modificación inmediata de las cadenas acilo de los PL para optimizar el crecimiento en esas nuevas condiciones.

Las desaturasas que son enzimas claves en el metabolismo de AG requeridas para regular las propiedades físicas y químicas de las membranas, modifican su actividad en respuesta a cambios en las condiciones ambientales. Un sistema bien estudiado donde estas enzimas participan, es el sistema de regulación de la fluidez de la membrana descrito en *B. subtilis* expuesto a bajas temperaturas (Aguilar et al, 2001).

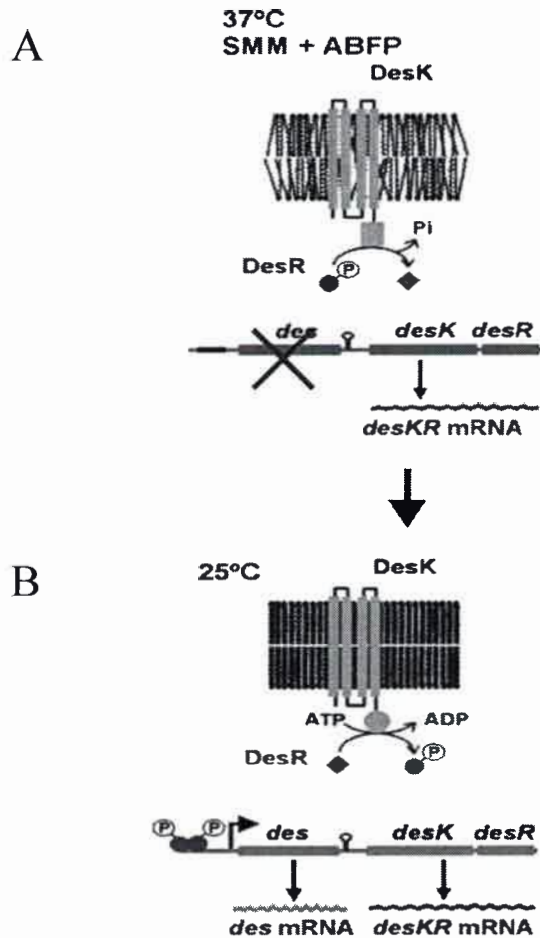
Un detallado análisis transcripcional realizado por este autor, demostró que la expresión del gen *Des* de *B. subtilis* es fuertemente regulada por frío (cold-shock). Mientras que la transcripción del gen *Des* apenas se detecta a 37°C, la producción del ARNm es fuertemente aumentada por el cambio de temperatura de 37°C a 25°C. El aumento en los niveles de expresión del gen *Des* en *B. subtilis* a bajas temperaturas, se traduce en un aumento del AG insaturado producido (16:1 $\Delta^5$ ), lo que provoca un aumento en la fluidez de la membrana para contrarrestar el cambio provocado por la disminución de la temperatura.

En *B. subtilis* la regulación de la expresión del gen *Des* está controlada por un sistema de dos componentes (Fig.11). DesK es una proteína de membrana que actúa como un sensor de temperatura con un dominio histidina kinasa el cual es capaz de autofosforilarse y transferir luego el grupo fosfato al regulador de respuesta presente en el citoplasma, DesR. Una vez que el regulador de respuesta se encuentra fosforilado puede unirse al sitio promotor del gen *Des* para permitir la expresión del mismo. En *B. subtilis* creciendo a 37°C (Fig. 11A), DesK se encuentra conformacionalmente inactivo y el dominio histina kinasa es incapaz de autofosforilarse, por lo tanto el regulador de respuesta DesR no podrá ser fosforilado para unirse al promotor del gen *Des* para permitir su expresión. Todo lo contrario ocurre cuando las células son transferidas a 20°C (Fig. 11B), permitiéndose así la expresión del gen *Des*. Este es un ejemplo claro





de transducción de señales, en donde la membrana y sus componentes cumplen un papel fundamental en la adaptación bacteriana al estrés.



**Figura 11.** Esquema del control de la fluidez de la membrana en *Bacillus subtilis* expuesto a un cambio de temperatura por medio de un sistema de dos componentes. A: a 37°C no hay expresión del gen *Des*, una disminución en la temperatura hasta 20°C (B) provoca la expresión del gen y un aumento del transcripto primario (Mansilla et al, 2004).

### 1.9. TOPOLOGÍA DE MEMBRANA Y MÉTODOS DE ESTUDIO

Una aproximación que se utiliza para abordar estudios a nivel de membranas es el empleo de sondas fluorescentes que no se unen de forma específica a un PL concreto pero que mimetizan a los lípidos de forma que se insertan en las membranas sin variar su estructura y nos dan información muy valiosa sobre la topología global de las mismas. Estas sondas emiten fluorescencia cuando están inmersas en el ambiente



hidrofóbico de la membrana y no cuando se encuentran en ambientes acuosos; tienen la capacidad de emitir luz polarizada con una determinada longitud de onda diferente a la longitud de onda con que fueron excitadas. El movimiento rotacional de la sonda que depende del estado de la membrana, puede ser medido determinando la despolarización de la luz de excitación. La inserción de estas sondas en la membrana de una bacteria no requiere ningún pretratamiento de las células y esto es una enorme ventaja durante el análisis.

La mayoría de las investigaciones sobre membranas citoplasmáticas bacterianas han sido desarrolladas utilizando la sonda DPH (1,6-diphenyl-1, 3, 5-hexatrieno) para determinar la fluidez de la membrana. Esta sonda se inserta en el corazón de la bicapa y se alinea con las cadenas acilo de los PL (Trevors, 2003).

La relación entre el nivel de polarización de la sonda y la fluidez de la membrana es inversa. En una membrana en estado de gel la sonda no puede rotar libremente debido a que existen muchas interacciones entre las cadenas acilo. En la membrana líquido-cristalina las interacciones son reducidas, permitiendo mayor movimiento de las cadenas acilo y con ello mayor rotación de la sonda insertada allí. Cuando la luz polarizada excita una sonda insertada en una membrana fluida, la luz se emite en todas las direcciones ya que la sonda es capaz de rotar libremente. En una membrana en estado de gel, la luz excitada que llega a la sonda retiene su polarización ya que la sonda no puede rotar y por lo tanto esta luz retenida puede ser remitida y medida.

Este tipo de metodología puede ser utilizada para monitorear los cambios de la fluidez de la membrana plasmática frente a diferentes condiciones ambientales, (Mykytczuk et al, 2007). Esta técnica ha sido utilizada en muchos trabajos para determinar el efecto de una condición ambiental sobre la fluidez de la membrana citoplasmática. Por ejemplo en diferentes variedades fenotípicas del patógeno *Streptococcus pneumoniae* (Aricha et al, 2004) o en función de la temperatura de crecimiento en otro patógeno presente en alimentos, *Listeria monocytogenes* (Najjar et al, 2007).

Teniendo en cuenta los antecedentes citados y debido a que aún es escaso el conocimiento sobre las bases bioquímicas y fisiológicas de la tolerancia al estrés por la



temperatura y por la salinidad en los rizobios que nodulan las raíces de maní, trabajamos sobre la siguiente hipótesis:

**La biosíntesis de fosfolípidos y ácidos grasos componentes de membrana tanto de la cepa de colección *Rhizobium* TAL 1000 como de la cepa aislada de nuestra zona manisera, es modificada por efecto de las condiciones ambientales variables. En estos microorganismos, ambas vías de biosíntesis de ácidos grasos insaturados están presentes.**



## **2-Objetivos**





### **Objetivos generales**

Conocer las respuestas adaptativas de los rizobios frente a distintas condiciones ambientales, mediante el estudio de la arquitectura molecular de la superficie bacteriana. El objetivo final que se persigue es el de incrementar el rendimiento del cultivo de maní y así contribuir a la agricultura sustentable.

### **Objetivos específicos**

1.- Conocer el patrón de lípidos y de ácidos grasos de cepas nativas de rizobios de la zona manisera de Río Cuarto y de *Rhizobium* TAL 1000 crecidas en condiciones basales y bajo estrés por temperatura y por sal.

2.- Estudiar la biosíntesis de lípidos y ácidos grasos en las cepas mencionadas y bajo las condiciones de cultivo detalladas en el punto 1.

3.- Conocer el mecanismo a partir del cual se generan ácidos grasos insaturados de la membrana de las cepas detalladas anteriormente.

4.- identificar y caracterizar, las posibles actividades desaturadas involucradas en el proceso.

5.- Identificar posibles genes de desaturadas involucrados en la biosíntesis de AG insaturados.

### **3-Materiales y métodos**



### 3.1. Material biológico

#### 3.1.a. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

La tabla 1 muestra las cepas, los plásmidos y los oligonucleótidos utilizados en este estudio y sus características más relevantes. *Rhizobium* TAL 1000 (NifTAL Microbiological Resource Center, Paia, HI (USA), recomendada como nodulante de maní y L115 aislada de rizosfera de maní fueron mantenidas en medio manitol-extracto de levadura-agar (YEMA) con rojo congo a una concentración final de 25 mg/l (Vincent, 1970; Somasegaran y Hoben, 1994) a 28°C. El pH del medio fue ajustado a 7 antes de esterilizar. Para la determinación de la viabilidad y de los parámetros bioquímicos, las cepas se cultivaron en medio mínimo B<sup>-</sup> modificado (van Brussel et al, 1977), en un baño de agua con agitación horizontal Allied Fisher Scientific a 28°C y a 37°C para el tratamiento de hipertermia. El medio fue suplementado con 300 mM de NaCl para el tratamiento de hipersalinidad. El crecimiento bacteriano fue seguido midiendo la densidad óptica (DO) a 620 nm, por triplicado.

El recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) se llevó a cabo removiendo alícuotas y realizando diluciones seriadas por triplicado de cada muestra.

Las diluciones fueron sembradas en placas de medio YEMA e incubadas a 28°C. El recuento de colonias se realizó después de 24 h de crecimiento (da Silva, 1996).

Para la obtención de ADN genómico las cepas *Ensifer meliloti* 1021, *R. TAL* 1000 y L115, fueron cultivadas en medio TY (Somasegaran y Hoben, 1994) a 28°C. Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas fueron cultivadas siempre en medio Luria-Bertani (LB) (Maniatis et al, 1982) a 37°C, el antibiótico ampicilina (Amp) 50 µg/ml, fue agregado al medio, cuando correspondía.



**Tabla 1.** Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepa, plásmido u oligonucleótido	Característica(s) relevante(s)	Fuente o referencia
<b>Cepas</b>		
<i>E. meliloti</i> 1021	Rizobio simbionte de <i>Medicago sativa</i> , derivada de la cepa salvaje SU47	Meade et al, 1982
<i>R. TAL</i> 1000	Rizobio simbionte de <i>Arachis hypogaeae</i>	NifTal, Hawai
L115	Cepa aislada de rizosfera de maní	Este estudio
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3) pLysS(cm <sup>R</sup> )	Davanloo et al, 1984
<i>E. coli</i> XL10Gold	Cepa utilizada para clonación (endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet <sup>R</sup> F'[proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10(Tet <sup>R</sup> Amy Cm <sup>R</sup> )]	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21pET	Cepa que acarrea el vector de expresión pET 17b vacío	Este estudio
<i>E. coli</i> BL21pET-des TAL	Cepa que acarrea el vector de expresión pET 17b con el gen desaturasa putativa de <i>R. TAL</i> 1000	Este estudio
<i>E. coli</i> BL21pET-des Em	Cepa que acarrea el vector de expresión pET 17b con el gen desaturasa putativa de <i>E. meliloti</i> 1021	Este estudio
<b>Plásmido</b>		
pET 17b	Vector de expresión. Amp <sup>R</sup>	EMD Biosciences
pBluescript II SK(+)	Vector de clonado. Amp <sup>R</sup>	Stratagene
<b>Oligonucleótidos</b>		
DES1 Forward	ATGAGCGCACATGTCTATCCA	Este estudio
DES1 Reverse	TTACTTCGTCTTTCGTCCACC	Este estudio
DES2 Forward	GCGGCCGCATGAGCGCACA NotI	Este estudio
DES2 Reverse	CTCGCGTTACTTCGTCTTTCGT XhoI	Este estudio



### **3.2. Medios de cultivo utilizados en este estudio**

#### **3.2.a. Medio TY (Somasegaran y Hoben, 1994)**

Triptona 5 g

Extracto de levadura 3 g

CaCl<sub>2</sub> 1 g

H<sub>2</sub>O csp 1000 ml

pH 6.8

#### **3.2.b. Medio YEM (Somasegaran y Hoben, 1994)**

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g

MgSO<sub>4</sub> .7 H<sub>2</sub>O 0.3 g

NaCl 0.1 g

Extracto de levadura 8.5 g

Manitol 10 g

H<sub>2</sub>O csp 1000 ml

pH 6.8

Para el medio YEMA se agregó 18 g/l de agar.

#### **3.2.c. Medio B (van Brussel et al, 1977)**

MgSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O 0.55 g

KNO<sub>3</sub> 0.55 g

Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1.3 g

FeNa EDTA 0.033 g

Elementos trazas 2.5 ml

Extracto de levadura 0.3 g

Triptona 0.3 g

H<sub>2</sub>O csp 1000 ml

pH 7

Luego del autoclavado (120°C 20 min) se agregó 1ml de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M estéril

Solución de elementos trazas

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1.269 g

MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0.462 g

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.398 g





ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.0974 g  
CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0.0354 g  
H<sub>2</sub>O csp 1000 ml

### **3.2.d. Medio Luria-Bertani (LB) (Maniatis et al, 1982)**

Triptona 10 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl 10 g

H<sub>2</sub>O csp 1000 ml

pH 7.5

### **3.3. Incorporación de acetato radioactivo en las células de *R. TAL 1000* y *L115***

37 kBq/ ml, de acetato de sodio [<sup>14</sup>C] (2.26 GBq mmol<sup>-1</sup>, New England Nuclear), previamente esterilizado, fue agregado al tiempo cero de cultivo, bajo condiciones: control, hipersalina, hipertermia y estas dos últimas condiciones combinadas. Las células fueron cosechadas en fase exponencial tardía (24 h) mediante centrifugación a 6000xg durante 10 min, en una centrífuga refrigerada Beckman Allegra 64R. Los pellets resultantes fueron lavados dos veces con una solución 0.9% de NaCl y usados para estudios posteriores. Los mismos procedimientos y condiciones fueron utilizados para las muestras no marcadas obviando el agregado de acetato radioactivo.

### **3.4. Extracción de lípidos**

Los lípidos fueron extraídos de las células lavadas con una mezcla de cloroformo/metanol/agua según lo descrito por Bligh y Dyer (1959); luego se agregó una solución 0.1M KCl en 50% de metanol para obtener una fase inferior clorofórmica y una fase superior acuosa. La fase inferior, que contiene los lípidos, fue lavada dos veces con la misma solución de KCl, secada bajo flujo de nitrógeno y resuspendida en un volumen apropiado de cloroformo/metanol 2:1 (v/v).

#### **3.4.a. Separación y análisis de PL de *R. TAL 1000* y *L115* marcados radioactivamente**

Alícuotas de los extractos lipídicos totales fueron analizadas por cromatografía en capa fina (TLC) usando como mezcla de solventes cloroformo/acetona/metanol/ácido acético/agua 40:15:14:12:7 (v/v/v/v/v) para la separación de PL. Todos los solventes fueron de calidad analítica y provistos por



Merck, las placas de TLC de sílica gel HLF (250 micrones) fueron provistas por Analtech. Los lípidos fueron detectados con vapores de yodo o con ninhidrina para revelar grupos aminos, y fueron identificados por comparación con estándares purificados provistos por Sigma. Las placas de TLC fueron raspadas y las fracciones fueron cuantificadas por la radioactividad medida en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 60001 C).

#### **3.4.b. Análisis de los AG de *R. TAL 1000* y *L115* marcados radioactivamente**

Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) fueron preparados desde los extractos lipídicos totales con 10% de trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>) en metanol, sometidos a 100 °C durante dos horas y extraídos con tres volúmenes de hexano (Morrison y Smith, 1964). Los FAME marcados fueron separados de acuerdo al número de dobles enlaces en placas de TLC de sílica gel G impregnadas con AgNO<sub>3</sub> en acetonitrilo (10% p/v) usando hexano/éter etílico/ácido acético 94:4:2 (v/v/v) como mezcla de solventes. Las bandas de FAME fueron localizadas bajo luz UV después de rociar las placas con una solución de diclorofluoresceína, eluidas (Henderson y Tocher, 1992) y llevadas a sequedad en viales de vidrio. La radioactividad fue medida en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 60001 C).

#### **3.5. Análisis de AG de *R. TAL 1000* y *L115* sin marca radioactiva**

Los FAME no radioactivos fueron obtenidos a partir de los extractos lipídicos obtenidos de células no marcadas crecidas bajo condiciones de hipersalinidad, hipertermia y ambas condiciones combinadas, según se describió en la sección 3.4.b.

Los mismos se analizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890, serie II equipado con una columna de metil-silicona (50m x 0,2 mm x 0,33 μm), acoplado a un detector de ionización de llama. La temperatura de la columna se programó a 180 °C durante 25 min y luego una rampa de 3 °C/minuto hasta alcanzar 250 °C. Temperatura del detector: 300 °C. Temperatura del inyector: 250 °C. Los picos correspondientes a cada AG se identificaron usando una mezcla de testigos provista por Sigma-Aldrich Chemical Co (Kates, 1973).

#### **3.6. Determinación de la actividad desaturasa en *R. TAL 1000* y *L115***

La actividad desaturasa se determinó utilizando los siguientes sustratos: ácido palmítico (16:0) [1-<sup>14</sup>C] y ácido esteárico (18:0) [1-<sup>14</sup>C], (0,5 μCi), los cuales fueron



añadidos a 25 ml de medio de cultivo al momento de la inoculación. Luego de 24 h de crecimiento (fase exponencial tardía) a 28°C o a 37°C, las células fueron cosechadas y los lípidos se extrajeron de acuerdo a Bligh y Dyer (1959).

Los FAME fueron preparados desde los extractos lipídicos totales (Morrison y Smith, 1964) y fueron separados e identificados de acuerdo a lo detallado en el punto 3.4.b. La radioactividad fue medida en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 60001 C).

### **3.7. Extracción de ADN genómico de *E. meliloti* 1021, *R. TAL* 1000 y L115**

Para la obtención del ADN genómico se utilizaron las cepas *E. meliloti*, *R. TAL* 1000, 1021 y L115, siguiendo el protocolo provisto por el fabricante (JETFLEX). El ADN extraído se cuantificó utilizando el método espectrofotométrico según Sambrook et al (2001), en el cual se especifica que una DO de 1, a 260nm, corresponde a 50 µg/ml de ADN doble cadena.

#### **3.7.a. Diseño de oligonucleótidos**

Se llevó a cabo utilizando las secuencias de nucleótidos para diferentes desaturasas de rizobios, encontradas en la base de datos: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Las mismas se alinearon utilizando el programa CLUSTALW y los sitios de mayor homología fueron empleados para la confección de los oligonucleótidos, los cuales fueron sintetizados por el servicio RURALEX (tabla 1).

#### **3.7.b. Amplificación por PCR y secuenciamiento parcial del gen desaturasa putativo de *R. TAL* 1000 y L115 homólogo al de *E. meliloti* 1021**

La PCR, cuyos componentes se muestran en la tabla 2, fue llevada a cabo en un termociclador a un volumen final de reacción de 25 µl, usando el programa descrito en la tabla 3.



**Tabla 2.** Componentes de la de la reacción de PCR.

5µl	DES1 Forward Primer (Tabla 1)
5µl	DES1 Reverse Primer (Tabla 1)
2 µl	dNTP's (10µM c/u) (Promega)
2,5 µl	10 x Taq-Buffer (Promega)
7 µl	ddH2O
1 µl	Templado
1 µl	Taq-Polimerasa (Promega)
1,5 µl	Cl <sub>2</sub> Mg (50 Mm)

**Tabla 3.** Condiciones de la reacción de PCR.

Temperatura	Tiempo	
95°C desnaturalización inicial	5 min	
95°C desnaturalización	30 seg	} 30 ciclos
60°C Annealing	40 seg	
72°C Elongación	1 min	
72°C Final	10 min	
4°C	20 min	

Los productos de PCR fueron resueltos en gel de agarosa 1% p/v, teñido con BrEd y visualizados en un transiluminador con luz UV.

Los productos de PCR correspondientes a *R. TAL 1000* y *L115* fueron purificados y enviados a secuenciar al servicio ofrecido por MacroGen Corea.





### 3.7.c. Manipulación del ADN

Las técnicas de ADN recombinante, preparación de plásmidos, análisis con enzimas de restricción, clonado, preparación de células competentes con cloruro de rubidio y transformación de *E. coli*, se llevaron a cabo de acuerdo a protocolos estándares (Sambrook et al, 2001).

Los plásmidos se aislaron de las cepas de *E. coli* portadoras con el kit “High Pure Plasmid Isolation Kit” provisto por Roche, se digirieron con enzimas de restricción y se purificaron. Alternativamente los plásmidos se aislaron por el método de lisis alcalina (Sambrook et al, 2001).

### 3.7.d. Clonado del gen desaturasa putativo de *R. TAL 1000* y *E. meliloti 1021*

Para llevar a cabo la clonación de los genes desaturasa putativos de *R. TAL 1000* y *E. meliloti 1021*, los mismos fueron amplificados por PCR, utilizando oligonucleótidos específicos (DES2, tabla 1) diseñados a partir de la secuencia del gen desaturasa putativo de *Ensifer meliloti 1021* (AAK64726). Los componentes de la PCR fueron: 1 µl of templado de ADN genómico, 0.2 µl de *Pfu* polymerase (3 U/µl Promega), 2.5 µl de *Pfu* ADN polymerasa 10X buffer, 0.5 µl de dNTP (10 mM de cada uno) and 2.5 µl de oligonucleótidos (5 µM). El procedimiento utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguido por 30 ciclos de 95°C por 1 min, 62°C por 30 s, 72°C por 4 min y una extensión final a 72°C por 5 min.

Los sitios de restricción NotI – XhoI fueron añadidos a los oligonucleótidos para luego poder insertar cada producto de PCR en el plásmido de clonado p-Bluescript, el cual porta un gen de resistencia a Amp (Tabla 1) y las construcciones fueron luego utilizadas para transformar la cepa de *E. coli* XL 10 Gold (Tabla 1).

Las colonias portadoras de las construcciones se seleccionaron por su resistencia a Amp y por su incapacidad para utilizar el sustrato X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactosido) a través de la coloración blanca de las mismas.

Una vez seleccionadas las colonias candidatas, la presencia del constructo fue confirmada por minipreparación de plásmidos (Sambrook et al, 2001) y esto resuelto en gel de agarosa 1% y comparado con el marcador de peso molecular. Las colonias que presentaron una banda de peso molecular correspondiente al peso del plásmido más el



fragmento clonado fueron conservadas en glicerol y utilizada para los ensayos siguientes.

### **3.7.e. Sobreexpresión del gen desaturasa putativo de *R. TAL 1000* y *E. meliloti 1021***

Por medio de técnicas de subclonado el fragmento de aproximadamente 1Kb correspondiente a los genes desaturasa putativos de *R. TAL 1000* y de *E. meliloti 1021* fueron trasladados del plásmido p-Bluescript al vector de expresión pET 17b, (que porta resistencia para Amp) (Tabla 1). Las construcciones se utilizó para transformar la cepa *E. coli* BL21. Colonias portadoras de la construcción pET-des TAL y pET-des Em fueron seleccionadas y la presencia del gen fue confirmada por PCR y por secuenciación. Las colonias seleccionadas (*E. coli* BL21pET-des TAL y *E. coli* BL21pET-des Em) fueron conservadas en glicerol a -80°C y utilizada para los ensayos siguientes. Una cepa de *E. coli* BL21 transformada con el plásmido pET17b vacío fue nombrada como *E. coli* BL21pET y utilizada como control.

### **3.7.f. Condiciones de cultivo para las cepas de *E. coli* BL21 transformadas**

Tanto la cepa de *E. coli* BL21 pET como las cepas *E. coli* BL21 (pET-des TAL y pET-des Em) fueron cultivadas en medio LB suplementado con Amp (50 µg/µl) a 37°C hasta una DO<sub>600nm</sub> de 0,5. Posteriormente la inducción se llevó a cabo por 1 h a 37°C, añadiendo a los cultivos IPTG a una concentración final de 0,1 mM. Cuando fue necesario la inducción con IPTG se realizó por 12 h a la misma concentración.

Luego de transcurrido el tiempo de inducción las biomásas correspondientes fueron cosechadas por centrifugación y utilizadas para los experimentos posteriores.

### **3.7.g. Electroforesis en gel de la proteína recombinante de *R. TAL1000* y *E. meliloti 1021***

Las cepas de *E. coli* recombinantes albergando diferentes construcciones de expresión, fueron cultivadas como se explicó anteriormente. El pellet de células de cultivos de 50 ml se resuspendió en 15 ml de buffer de lisis que contenía: Tris-HCl, 20 mM (pH 8); NaCl, 300 mM; imidazol, 20 mM; tween, 0,1%, glicerol, 10% y β-mercaptoetanol, 20 mM. La suspensión fue complementada con DNAasa, 1 µg/ml y PMSF, 0,5%. Las células se rompieron por ultrasonificación. El homogeneizado se centrifugó a 29000xg durante 30 minutos a 4°C. Las proteínas contenidas en el sobrenadante se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS 10%.



Bandas de proteína fueron visualizadas por tinción con coomassie brillant blue R-250.

### **3.7.h. Identificación de los ácidos grasos producidos por esta enzima**

#### **Extracción de lípidos totales**

Los lípidos totales pertenecientes a *E.coli* BL21 pET, *E.coli* BL21 pET-des TAL y *E.coli* BL21 pET-des Em, fueron extraídos a partir de las biomásas húmedas de acuerdo al método de Bligh y Dyer (1959) y de acuerdo a lo detallado en 3.4.a.

**Preparación de FAME y análisis por GC:** los FAME se prepararon a partir de los lípidos totales según Morrison y Smith (1964) y el análisis se realizó de acuerdo a lo detallado en el párrafo 3.5. Se utilizó el cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890, serie II, y para lograr una mayor resolución se equipó con una columna de metil-silicona (60 m, 0,25 mm, 0,2  $\mu$ m) y un detector de ionización de llama (FID). La temperatura fue programada a 175°C durante 5 min, para luego aumentar 3°C/min hasta 220°C y mantenerse durante 5 min a 220°C. Temperatura del detector: 300°C. Temperatura del inyector: 250°C. Los picos correspondientes a cada AG se identificaron usando una mezcla de testigos provista por Sigma-Aldrich Chemical Co (Kates, 1973).

#### **3.7.i. Estudio de la actividad desaturasa en *E. coli* BL21 transformadas**

La actividad desaturasa se determinó utilizando 0,5  $\mu$ Ci de 16:0 o 18:0 [ $^{14}$ C] como precursores. Los mismos fueron añadidos a 25 ml de medio de cultivo LB al momento de la inoculación. La inducción se realizó una vez que la DO<sub>600</sub> llegó a 0,5 con 0,1 mM de IPTG por 1 h. Luego las células fueron cosechadas y los lípidos se extrajeron de acuerdo a Bligh y Dyer (1959). Los FAME fueron preparados desde los extractos lipídicos totales (Morrison y Smith, 1964) y fueron separados y cuantificados como se detalló en la sección 3.4.b para muestras radioactivas.

### **3.8. Determinación del efecto de la temperatura sobre la fluidez de la membrana de *R. TAL 1000***

Se realizó de acuerdo a la medición de la polarización de fluorescencia de la membrana celular. Para estos ensayos *R. TAL 1000* fue cultivada en medio YEM en condiciones control (28°C) hasta fase exponencial. Las células se cosecharon por centrifugación a 10000 rpm por 1 min, se lavaron con buffer Tris/HCl 15 mM (pH 7) estéril y fueron re suspendidas en el mismo buffer hasta lograr una DO<sub>600</sub> 0,2-0,4.



Una cantidad de 1  $\mu$ l de una solución stock 12 mM de 1,6-diphenyl-1, 3, 5-hexatrieno (DPH, Molecular Probes) en tetrahydrofurano, fue agregada a 3 ml de muestra (para obtener una concentración final de 4 mM). La mezcla fue incubada 10 min en oscuridad a temperatura ambiente, en una cubeta de cuarzo con agitación, para permitir que la sonda se incorpore a la membrana citoplasmática. La polarización de fluorescencia se midió utilizando un espectrofluorómetro Fluoromax TM-3, equipado con un termostatizador que permitió automatizar el barrido de temperatura desde 18°C hasta 40°C incrementado la misma 2°C/min (Vincent et al, 2004).

### **3.9. Determinación del efecto del shock térmico sobre la composición de AG, la actividad y la expresión de la enzima desaturasa de *R. TAL 1000***

#### **3.9.a. Determinación del efecto del shock térmico sobre la composición de AG**

Para evaluar el efecto de cortos períodos de exposición de las células de *R. TAL 1000* a elevada temperatura sobre la composición de AG, las mismas fueron cultivadas por 16 h (fase exponencial) a 28°C con agitación. Luego los cultivos fueron sometidos a un cambio de temperatura (37°C) y las biomásas cosechadas a diferentes intervalos de tiempo para la posterior extracción de lípidos totales, preparación de FAMEs y resolución de los mismos por GC.

#### **3.9.b. Determinación del efecto del shock térmico sobre la actividad desaturasa**

0,5  $\mu$ Ci de acetato [ $1-^{14}\text{C}$ ] o de los AG 16:0 [ $1-^{14}\text{C}$ ] o 18:0 [ $1-^{14}\text{C}$ ] previamente esterilizados fueron agregados a 25 ml medio de cultivo al momento de la inoculación.

Los cultivos fueron crecidos a 28°C por 16 h (fase exponencial) y luego la temperatura fue cambiada a 37°C. Las células se cosecharon a diferentes intervalos de tiempo mediante centrifugación y los pellets se usaron para extraer los lípidos totales, preparar los FAME y resolverlos mediante TLC en base al número de dobles ligaduras como se explicó anteriormente en la sección 3.4.b.





### **3.10. Determinación del efecto del shock térmico sobre la expresión de la enzima desaturasa**

#### **3.10.a. Western blot**

Por medio de la técnica descrita por Mizuno y Kageyama (1978) se obtuvo la fracción celular correspondiente a membrana interna desde cultivos de *R. TAL 1000* crecidos a 28°C por 16 h y luego transferidos a 37°C por 2 h y desde cultivos crecidos a 37°C por 24 h. Las proteínas contenidas en dicha fracción (30 µg) fueron resueltas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS 10%. Las proteínas fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Biosciences) de acuerdo al protocolo Mini-PROTEAN Tetra Cell BIO RAD y luego utilizadas para análisis de western blot empleando el anticuerpo contra la desaturasa ( $\Delta^9$ ) de rata, cedido gentilmente por el Dr. Omar Rimoldi. El revelado de las membranas se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia, utilizando el sistema de análisis y reactivos de detección Immun blot assay kit de BIO RAD.

#### **3.10.b. RT-PCR**

El ARN total (1 mg) de cultivos de células de *R. TAL 1000* crecidas a 28°C por 16 h y transferidas luego por 2 h a 37°C y de cultivos crecidos a 37°C durante 24 h fue obtenido con Nucleospin ARN kit (Promega). Posteriormente fue utilizado como molde en una reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa de un solo paso (RT-PCR) de acuerdo con el fabricante (Protocolo de Acceso RT-PCR System kit de Promega). Las condiciones fueron: 45°C durante 45 min seguido de un ciclo a 94°C durante 2 min, 40 ciclos a 94°C durante 30 s, 60°C durante 1 min y 68°C durante 2 min, y un ciclo final a 68°C durante 7 min.

Los cebadores específicos para el gen desaturasa de *R. TAL 1000* utilizados fueron CTGGCAATATCGGCATCCATC y TTA CTTCGTCTTTCGTCCACC. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa 2% y visualizados con bromuro de etidio.

### **3.11. Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el test ANOVA de una vía.



## **4- Resultados y discusión**



Las cepas utilizadas en este estudio fueron: *Rhizobium* TAL 1000, cepa de colección, recomendada como nodulante de maní, (Somasegaran y Hoben 1994) y la cepa L115, aislada de rizosfera de plantas de maní de nuestra zona manisera (Río Cuarto). Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo con la cepa L115 revelaron resultados positivos en cuanto a su capacidad de nodular raíces de plantas de maní. Nos pareció de suma importancia poder evaluar la capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales, tanto de una cepa de colección como de una propiamente aislada de suelo.

De acuerdo a la secuencia del gen rADN 16S, la cepa aislada de rizosfera de nuestra zona manisera, tendría un elevado porcentaje de identidad con cepas del género *Achromobacter*, perteneciente al orden *Burkholderiales*. Cepas de este género han sido aisladas por otros investigadores de muestras de suelo agrícola por ejemplo asociadas a rizosfera de *Solanum tuberosum* L, (Dandie et al, 2006) y de *Triticum aestivum* (Rodriguez-Sala et al, 2008)

## CAPITULO I

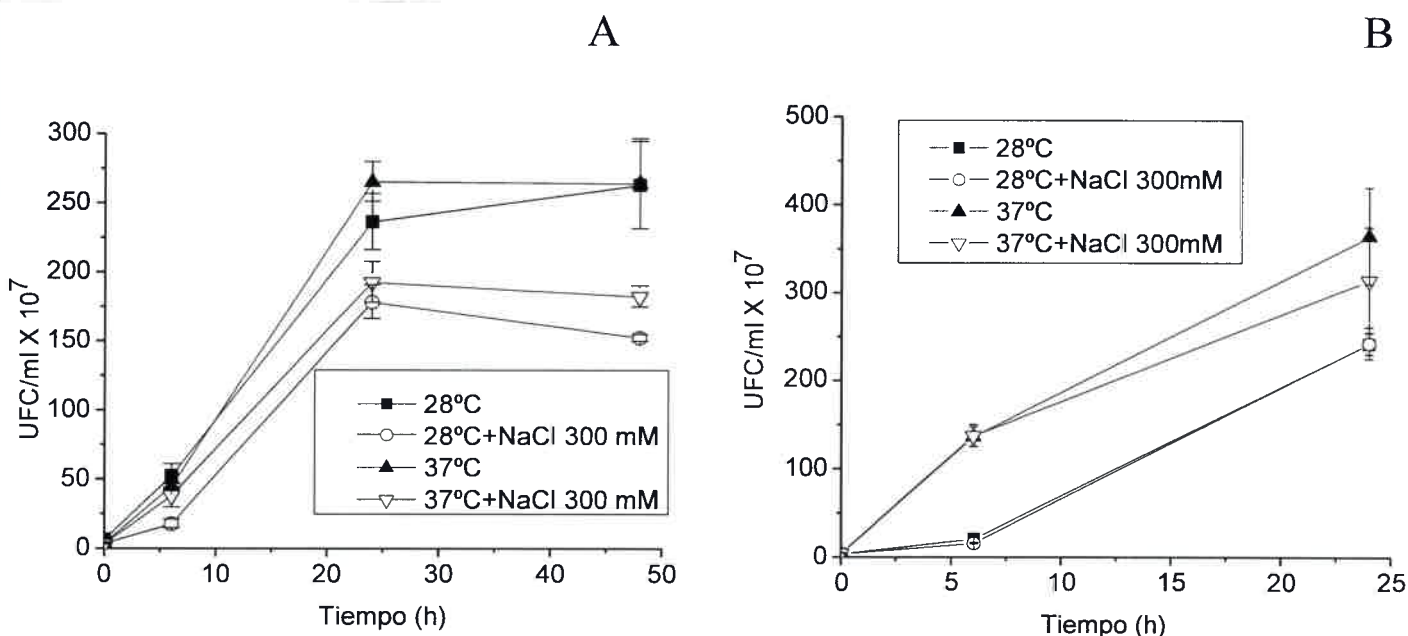
### **Efecto de la hipersalinidad y de la hipertermia sobre la viabilidad, composición de ácidos grasos y biosíntesis de ácidos grasos y fosfolípidos de *R. TAL 1000* y *L115***

#### **4.1.1. Efecto de la hipersalinidad y de la hipertermia sobre la viabilidad de *R. TAL 1000* y *L115***

La salinidad y la elevada temperatura del suelo son los factores ambientales que limitan en mayor medida la distribución y productividad de los principales cultivos. Se calcula que aproximadamente la salinidad afecta al 20% de la tierra cultivable en el mundo (Sahi et al, 2006). Este es un problema característico de regiones clasificadas como áridas y semiáridas, que comprenden el 25% de la tierra total del planeta (Yamaguchi y Blumwald, 2005). El incremento de la salinidad y la temperatura externa, conlleva efectos adversos sobre las poblaciones de rizobios en el suelo. Se conoce que el estrés salino y por elevada temperatura influyen en la supervivencia de las bacterias en el suelo y limitan la nodulación y la fijación biológica del nitrógeno (Kulkarni y Nautiyal, 2000; Abdelmounmen et al, 1999).



La Figura 12A muestra el crecimiento de *R. TAL 1000* en condiciones control (28°C), de hipersalinidad, de hipertermia y ambas condiciones combinadas.



**Figura 12.** Efecto de la hipersalinidad y de la hipertermia sobre la viabilidad de A) *R. TAL 1000* y B) *L115*.

Los resultados están expresados como UFC/ml. Los valores representan la media  $\pm$  S.E.M. de tres experimentos independientes.

La cepa *R. TAL 1000* fue capaz de crecer en presencia de las condiciones aplicadas, aunque el ensayo de viabilidad indicó que la misma disminuyó en presencia de hipersalinidad y con la combinación de hipersalinidad e hipertermia, debido a una disminución en las UFC/ml en esas condiciones a lo largo de la curva de crecimiento, haciéndose más notable el efecto de los estreses luego de las 6 h de crecimiento. La condición de hipertermia no provocó cambios significativos en la viabilidad con respecto al control.

La curva de crecimiento para la cepa *L115* se muestra en la Figura 12B, esta cepa aislada de rizosfera de maní demostró un comportamiento diferente frente a las condiciones aplicadas comparado con *R. TAL 1000*, sin embargo las curvas bajo condiciones controles fueron muy similares entre ellas en cuanto al número de UFC/ml y a la duración de cada fase de crecimiento. Las diferencias más importantes se pueden





observar cuando la cepa L115 creció en condición de hipertermia y con la combinación de hipersalinidad e hipertermia, condiciones en las cuales se obtuvieron los mayores valores de UFC/ml. Quizá estas sean las condiciones óptimas para el crecimiento de esta bacteria aislada de nuestra zona manisera. Así mismo y a diferencia de lo que ocurrió con *R. TAL 1000* la concentración de NaCl no produjo ningún cambio en la viabilidad de L115 con respecto al control.

Estudios previos referidos a la capacidad de cepas de rizobios de crecer en presencia de sales han mostrado una marcada variación en su tolerancia. Algunas cepas como *Bradyrhizobium japonicum* son inhibidas por concentraciones menores a 100 mM (Elsheikh y Wood, 1990). Por el contrario, el crecimiento de varias cepas de *Ensifer meliloti* puede ocurrir a concentraciones mayores que 300 mM de NaCl (Bernard et al, 1986), y cepas de *Rhizobium* spp aisladas de nódulos de plantas de *Hedysarum*, *Acaciacon*, *Prosopis*, y *Leucaena* pueden tolerar hasta 500 mM de NaCl (Zhang et al, 1991).

En ciertos géneros de rizobios, la tolerancia a la salinidad ha sido relacionada con la tolerancia a elevadas temperaturas, en estudios previos se ha demostrado que cepas de *E. meliloti*, sal-tolerante puede crecer bien a elevadas temperaturas (Zhang et al, 1991) mientras que *Rhizobium leguminosarum*, sal-sensible es mucho menos tolerante a temperaturas de crecimiento más altas (Lindstron y Lehtomaki, 1988). En este trabajo *R. TAL 1000* sal-tolerante (ya que fue capaz de crecer a una concentración salina de 300 mM) pudo también de crecer a 37°C a niveles similares al control, exactamente lo mismo ocurrió para la cepa L115, la cual incluso fue capaz de crecer mejor a elevada temperatura.

#### **4.1.2. Composición de AG de *R. TAL 1000* y L115 y su rol bajo condiciones de hipersalinidad y de hipertermia**

La envoltura celular de las bacterias Gram negativas es la frontera que mantiene el interior del microorganismo independiente del medio externo. Este contorno permite la comunicación y a la vez el aislamiento de la célula, imprescindibles ambos para el correcto funcionamiento celular. Las funciones asignadas a las membranas han ido cambiando a medida que aumenta el conocimiento sobre las mismas. De ser consideradas únicamente las barreras físicas que mantienen la morfología celular,



pasaron a ser consideradas como parte importante en la entrada de nutrientes y también en la comunicación con el medio externo. Actualmente se sabe que participan de forma activa en procesos tan importantes como la división celular, la generación de energía, la resistencia a drogas, etc (Kadner, 1996; Schweizer, 2004). En estos cambios ha sido fundamental el reconocimiento de los lípidos de membrana no sólo como meros “soportes” de proteínas, sino como componentes esenciales para el perfecto funcionamiento de las funciones celulares.

El avance de las técnicas moleculares del estudio de lípidos ha evidenciado que la membrana es un mosaico compuesto por multitud de dominios lipídicos específicamente situados y con funciones determinadas (Matsumoto et al, 2006).

Una de las funciones generales de la membrana más interesante y quizás menos conocida es la de censar cambios del medio externo. Las membranas tienen la capacidad de reaccionar a estos cambios modificando su composición, optimizándola de forma que pueda superar la alteración lo más eficientemente posible desde el punto de vista de la supervivencia. Ya que los lípidos, como componentes de las membranas, tienen amplia participación en la adaptación a condiciones ambientales, los estudios realizados en esta tesis se centraron en la bioquímica de los lípidos, especialmente los AG constituyentes de los PL.

La composición de AG para *R. TAL 1000* y *L115* (Tabla 4), descrita por primera vez en esta tesis, fue: un 63% y 41% de AG *cis*-vaccénico+oleico (18:1 ( $\Delta^{11}+\Delta^9$ )) respectivamente, un 11,3% y 20,5% de AG esteárico (18:0) respectivamente, un 8,9% y 7,5% de AG palmítico (16:0) respectivamente, un 5,5% y 5,1% de AG eicosatrienoico (20:3) respectivamente y un 3,4% y 5,6% de AG 19:0 ciclopropano respectivamente. La composición de AG encontrada, tanto para *R. TAL 1000* como para *L115* coincide con la descrita por bibliografía para otros rizobios (Boumahdi et al, 1999; Tighe et al, 2000; Drouin et al, 2000).

Los efectos de salinidad e hipertermia sobre la composición de AG de *R. TAL 1000* se muestran en la Tabla 4. A 37°C, se observó una disminución del 86% del AG monoinsaturado 18:1 ( $\Delta^{11}+\Delta^9$ ) y un aumento del 122% y del 90% de los AG saturados 16:0 y 18:0, respectivamente. El efecto combinado de hipersalinidad e hipertermia produjo una disminución del 94% de 18:1 ( $\Delta^{11}+\Delta^9$ ) y un aumento del 84% y del 154% de los AG saturados 16:0 y 18:0, respectivamente. Además de estos cambios,



encontramos un importante aumento en la cantidad del AG 19:0 ciclopropano, bajo hipertermia (194%) y la combinación de salinidad e hipertermia (326%).

Cuando los AG de la cepa L115 fueron analizados (Tabla 4), se observó una disminución del 84% del AG 18:1( $\Delta^{11}+\Delta^9$ ) bajo hipertermia y de un 89% bajo hipersalinidad e hipertermia combinados. Concomitantemente se observó un aumento del 108% del AG 16:0 bajo hipertermia y del 73% para la combinación de hipersalinidad e hipertermia. Al igual que en *R. TAL 1000*, cuando L115 fue cultivada bajo condiciones de hipertermia y bajo la combinación de hipersalinidad e hipertermia, se observó un aumento del AG 19:0 ciclopropano del 221% y del 114% respectivamente.

Cuando ambas cepas crecieron a una concentración de 300 mM de NaCl, el cambio más significativo fue, un aumento del 36% del AG 18:0 para *R. TAL 1000* y un aumento del 78% del AG 16:0 en L115.

Todos estos cambios provocaron una disminución bien marcada de la relación U/S en ambas cepas para la condición de hipertermia y para la combinación de hipersalinidad e hipertermia.



**Tabla 4.** Efecto de la hipersalinidad y de la hipertermia sobre la composición de ácidos grasos de los lípidos de *R. TAL 1000* y *L115*.

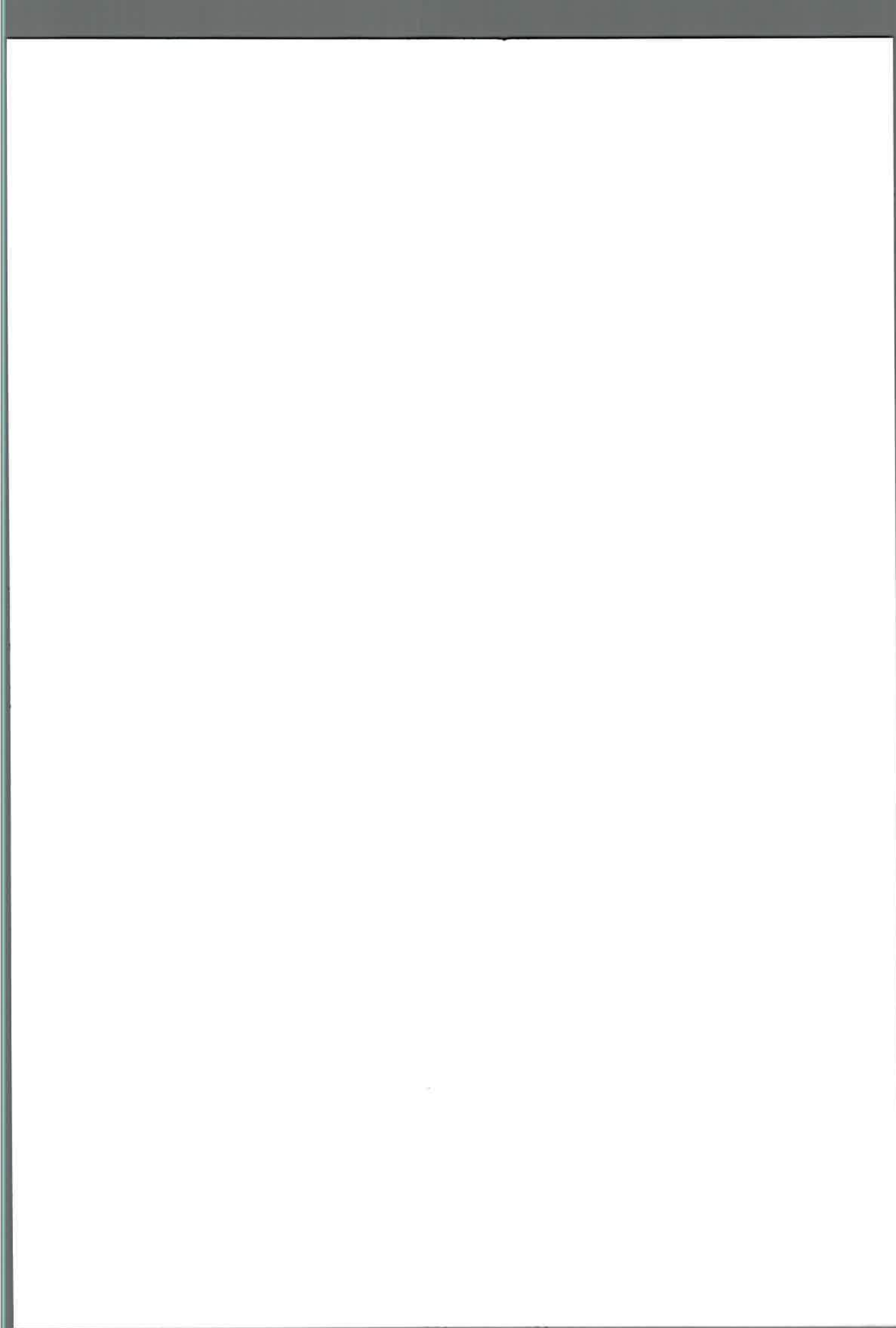
Tipo ácido graso (%)	Cepa	Condiciones de cultivo			
		28°C	28°C+NaCl 300 mM	37°C	37°C+ NaCl 300 mM
<i>Saturados</i>					
Ac. esteárico (18:0)	TAL 1000	11,3±1,0	15,0±1,6*	22,3±2,6*	30,7±2,6*
	L115	20,5±3,3	25,0±3,8	31,8±7,0*	27,0±2,0*
Ac. palmítico (16:0)	TAL 1000	8,90±2,0	9,80±1,8	20,4±2,4*	17,5±3,2*
	L115	7,50±0,8	13,4±1,4*	15,6±1,8*	13,0±0,5*
<i>Insaturados</i>					
(18:1 $\Delta^{11}$ +18:1 $\Delta^9$ )	TAL 1000	63,1±5,0	60,9±2,3	8,30±0,05*	3,70±0,2*
	L115	41,3±5,5	41,5±2,5	6,60±2,30*	4,3,±0,3*
Ac. (20:3)	TAL 1000	5,50±2,0	7,80±2,4	16,0±1,60*	20,2±5,0*
	L115	5,10±2,0	6,40±3,2	6,0±0,40*	17,6±4,0*
<i>Ciclopropanos</i>					
19:0 ciclo	TAL 1000	3,40±0,7	3,85±0,3	10,0±1,5*	14,5±1,7*
	L115	5,60±1,0	5,80±1,3	18,0±3,0*	12,0±3,3*
NI	TAL 1000	6,70±2,0	7,30±3,4	23,2±1,4	17,1±3,2
	L115	19,7±2,8	7,20±2,0	27,6±1,6	25,5±3,5
U/S	TAL 1000	3,4	2,7	0,6	0,5
	L115	1,6	1,2	0,3	0,5

Los FAME del extracto lipídico total fueron resueltos mediante GC. Los resultados están expresados como porcentaje del área total de los picos cromatográficos. Los valores representan la media  $\pm$  S.E.M. de tres experimentos independientes. NI.: compuestos no identificados, U/S: relación AG insaturados/AG saturados.

\*: Estadísticamente diferente al control (28°C) con un valor de  $P < 0,05$ .

Cambios en el grado de insaturación de los AG como respuesta a cambios en la temperatura de crecimiento han sido informados por muchos autores para diversos microorganismos (Russell y Fukunaga, 1990) y pueden ser considerados como una respuesta adaptativa universal (Suutari y Laakso, 1994).





Los efectos de la temperatura de crecimiento y la salinidad en la composición de AG de diferentes cepas de *Aeromonas* han sido estudiados por Chihib et al (2005), quienes encontraron, principalmente, cambios a nivel del grado de insaturación con un importante decrecimiento de la cantidad del AG 18:1 $\Delta^{11}$  cuando la temperatura aumentó de 15°C a 25°C. Para *Dictyostelium* cambios en la temperatura de crecimiento también resultaron en cambios a nivel de la composición de AG. Se observó disminución de los AG insaturados 16:2 y 18:2 con el incremento de la temperatura (Saito et al, 2005).

Los efectos de altas temperaturas de crecimiento sobre las propiedades biofísicas de la membrana plasmática han sido estudiados extensamente en diferentes organismos. Elevadas temperaturas causan lo que se conoce como fluidificación de la membrana y lo contrario ocurre cuando las membranas son expuestas a temperaturas más bajas o a condiciones hiperosmóticas. La respuesta inmediata de los organismos sometidos a elevadas temperaturas consiste en aumentar el nivel de AG saturados. Una respuesta contraria se observa para la disminución de la temperatura de crecimiento. Esto ocurre para mantener las funciones de la membrana plasmática inalteradas y la homeostasis global de la célula, manteniendo la fluidez de la membrana en niveles óptimos (Ramos et al, 2001). Si bien el efecto de la temperatura ha sido bien estudiado, el efecto del estrés osmótico no ha sido considerado con la misma profundidad (Los y Murata, 2004).

Los resultados obtenidos en cuanto a la composición de AG en *R. TAL 1000* y *L115* bajo hipersalinidad e hipertermia, indicarían que ambas cepas utilizan como mecanismo adaptativo para soportar este tipo de situaciones, un cambio en el grado de insaturación de los AG componentes de los PL para mantener la membrana en óptimas condiciones y garantizar así la viabilidad celular.

#### **4.I.3. Efecto de la hipersalinidad y de la hipertermia sobre la incorporación de acetato de sodio [1-<sup>14</sup>C] en los AG de *R. TAL 1000* y *L115***

El efecto de diferentes condiciones ambientales sobre la composición de AG de diversos organismos ha sido muy estudiado y es por ello que ha llegado a considerarse como una respuesta adaptativa universal en el mundo viviente. Sin embargo, la regulación de las diferentes rutas biosintética de AG bajo diferentes condiciones ambientales no ha recibido la misma atención. Para analizar la biosíntesis de novo de AG en *R. TAL 1000* y *L115* creciendo en diferentes condiciones, se utilizó el precursor



radioactivo acetato de sodio [ $1-^{14}$  C] (Fig. 13). En *R. TAL* 1000, el precursor radioactivo fue incorporado principalmente en la fracción AG monoinsaturados (79,6%), seguido de los AG poliinsaturados (12,4%) y AG saturados (8%). Resultados similares fueron obtenidos para la cepa L115, en la cual la fracción de AG que incorporó el mayor porcentaje del precursor radioactivo fue la de los AG monoinsaturados (82,7%), seguido de los AG poliinsaturados (12,7%), y AG saturados (5%).

En el caso de *R. TAL* 1000 (Fig. 13A), las condiciones que más afectaron la biosíntesis fueron la hipertermia y la combinación de hipersalinidad e hipertermia en las cuales se detectó una disminución de la incorporación de la radioactividad del 28% en la fracción AG monoinsaturados a 37°C y del 45% para las condiciones combinadas. Al mismo tiempo se observó un aumento en la incorporación del 250% del radioactivo en la fracción saturados a 37°C y del 425% para las condiciones combinadas. La elevada salinidad en el medio de cultivo también provocó cambios de la distribución de radioactividad en las diferentes fracciones de AG. Esta condición ocasionó los mismos efectos, observándose una disminución de la incorporación del radioactivo del 17% en la fracción de AG monoinsaturados y un aumento del 175% de la incorporación de la radioactividad en la fracción de AG saturados. La combinación de hipersalinidad e hipertermia, provocó modificaciones más marcadas, indicando que los cambios ocasionados por los estreses individuales son aditivos.

La biosíntesis de AG en L115 se vio afectada por la mayoría de las condiciones de crecimientos probadas (Fig. 13B). La hipertermia produjo una disminución de la incorporación de la radioactividad del 13% en la fracción de AG monoinsaturados y del 33% para la combinación de hipersalinidad e hipertermia. Al mismo tiempo se observó un aumento en la incorporación del radioactivo del 84% en la fracción de AG saturados a 37°C y del 400% para la combinación de ambas condiciones. La elevada salinidad en el medio de cultivo, no provocó cambios estadísticamente significativos en la biosíntesis de los AG a diferencia de lo que ocurrió con *R. TAL* 1000. En L115, al igual que en *R. TAL* 1000, la combinación de condiciones provocó las modificaciones más marcadas.

La relación U/S disminuyó bajo todas las condiciones ensayadas para *R. TAL* 1000 mientras que no fue afectada por la hipersalinidad en L115. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en los ensayos de composición de AG, en los cuales la

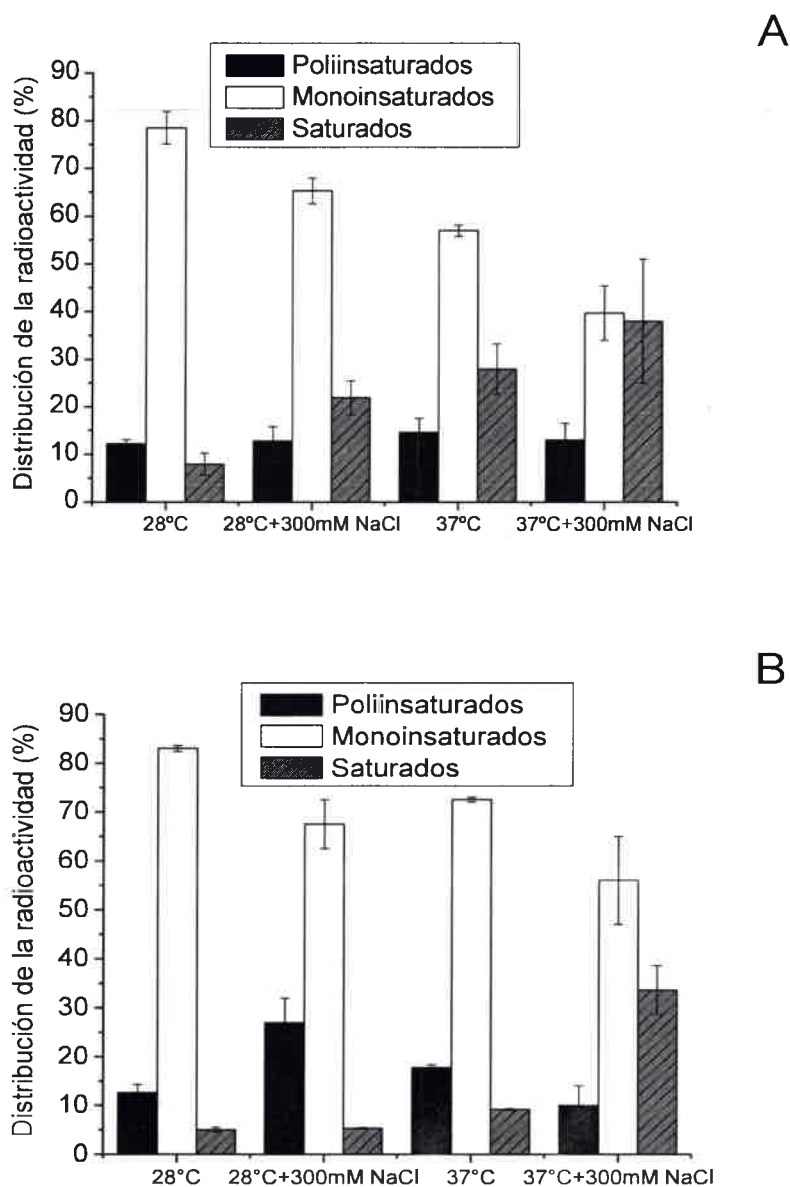


relación U/S decreció marcadamente en las condiciones de hipertermia y con la combinación de hipersalinidad e hipertermia, siendo esta última modificación la más importante.

Estos resultados indicarían que el principal mecanismo utilizado por estas bacterias nodulantes de maní para mantener las propiedades físicas de la membrana plasmática y asegurar el funcionamiento normal de la célula bacteriana, sería la modificación en el grado de insaturación.

Mecanismos como éste ya han sido informados por otros autores para otros microorganismos sometidos a diferentes condiciones ambientales (Suutari y Laakso, 1994; Ramos et al, 2001, Nichols y Russell, 1996). En el caso de *Bacillus subtilis*, altas temperaturas de crecimiento (37°C), provocaron un aumento de la síntesis de AG saturados a partir de acetato de sodio [ $1-^{14}C$ ] y la síntesis de AG monoinsaturados se vio reducida a cantidades trazas. Esta respuesta fue revertida cuando la temperatura de crecimiento decreció a 20°C (Aguilar et al, 1998).

Además, estos resultados indicarían un cambio a nivel de biosíntesis de AG que probablemente esté relacionado con la regulación a nivel de las vías por medio de las cuales se sintetizan los AG. Ello provocaría una composición final de AG tal como la que encontramos para estas cepas bajo diferentes condiciones, la cual sería apropiada para mantener la fluidez de la membrana en valores óptimos.



**Figura 13.** Efecto del NaCl y la temperatura sobre la incorporación de acetato de sodio [ $1-^{14}\text{C}$ ] en los AG de los lípidos de *R. TAL 1000* (A) y *L115* (B).

Los FAME fueron separados de acuerdo al grado de insaturación usando placas de TLC impregnadas con 10%  $\text{AgNO}_3$ . Los resultados están expresados como porcentaje de la radioactividad total incorporada en cada fracción de AG del total de lípidos. Los valores representan la media  $\pm$  S.E.M. de tres experimentos independientes.





#### 4.I.4. Efecto de la hipersalinidad y de la hipertermia en la incorporación de [acetato 1-<sup>14</sup>C] de sodio en los PL de *R. TAL 1000* y *L115*

El patrón de PL encontrado fue el mismo para ambas cepas (Fig. 14). Tanto *R. TAL 1000* como *L115*, sintetizan principalmente fosfatidilcolina (PC) (44,6% y 21,4% respectivamente), fosfatidiletanolamina (PE) (13,7% y 34,8% respectivamente), fosfatidilglicerol (PG) (17,5% y 17% respectivamente), dimetilfosfatidiletanolamina (DMPE) (9,9% y 9,2% respectivamente), cardiolipina (CL) (4,2% y 7,4% respectivamente) y Lisofosfatidiletanolamina (LPE) (0,88% y 2% respectivamente).

Los PL componentes de ambas cepas rizobiales, coinciden con los reportados por otros autores para especies de rizobios (Correa et al, 1999; Komanieka y Choma, 2001; Hubac et al, 1992; Medeot et al, 2007).

La diferencia más significativa entre ambas cepas fue que en *R. TAL1000* PC, fue el PL más activamente sintetizado mientras que en *L115* fue PE (Fig. 14).

Los cambios más notables en la biosíntesis de PL a partir de acetato de sodio [1-<sup>14</sup>C], por efecto de la hipersalinidad y de la hipertermia se muestran en la figura 14.

Para *R. TAL 1000* (Fig. 14A), la concentración de NaCl utilizada en este trabajo, no produjo ningún efecto significativo en el marcado de los PL, sin embargo se observó una tendencia a la disminución en el marcado de PG (22%).

A 37°C las modificaciones más importante en la biosíntesis de los PL fue un aumento de LPE (310%) y de PC (11%) y una disminución de la incorporación del radioactivo en los PL PE (43%) y CL (29%). La combinación de hipersalinidad e hipertermia produjo al igual que la hipertermia, un aumento de LPE (184%) y de PC (21%) y una disminución de PE (41%). Además se observó una disminución del PL aniónico PG (29%).

En la cepa *L115* (Fig. 14B), la concentración de NaCl no produjo ningún efecto significativo en el marcado de los PL. Los cambios más relevantes producidos por la hipertermia, ocurrieron a nivel de los PL zwitteriónicos, encontrándose un aumento de la marca en PC (50%) y DMPE (59%), y una disminución del marcado de PE (57%). La combinación de ambos estreses provocó los mismos cambios a nivel de los PL zwitteriónicos, aumento de PC (105%) y de DMPE (22%) y disminución del marcado de PE (63%). Aunque en esta cepa la radioactividad correspondiente a PG no se modificó



significativamente con los estreses aplicados, se observó una tendencia a disminuir en todas las condiciones con respecto al control.

El incremento de PC y la disminución de PE en ambas cepas a 37°C y con la combinación de hipersalinidad e hipertermia, indicarían que estos PL podrían estar involucrados en la respuesta al estrés, jugando algún rol importante en la modificación del estado físico de la membrana frente a estos cambios. Respuestas similares han sido informadas para la cepa nodulante de maní *Bradyrhizobium* SEMIA 6144, crecida bajo condiciones de elevada temperatura y salinidad (Medeot et al, 2007). También la participación de PE en respuesta a diferentes factores ambientales como pH ha sido informada para *Mesorhizobium loti* (Correa et al, 1999). El efecto de la temperatura de crecimiento en la cepa termofílica *Bacillus megaterium*, también fue estudiado y se comprobó la participación de PE, PL que disminuyó con el aumento de la temperatura de crecimiento (Eisenberg y Corner, 1978).

Observando las modificaciones contrarias en los niveles de ambos PL zwitteriónicos, PC y PE, podríamos suponer alguna relación a nivel de síntesis de PC a partir de PE en las dos cepas en estudio. La disminución de PE a 37°C y con la combinación de ambos estreses fue a la vez acompañada de un aumento en las cantidades de PC como ya mencionamos anteriormente. Debido a que PE puede ser precursor para la síntesis de PC, parte de la disminución de PE puede verse reflejada en el aumento del producto PC.

Para *R. TAL 1000* se podría pensar, además, que la disminución en los niveles de PE, en hipertermia y en salinidad más hipertermia, podría justificarse por el aumento de LPE, PL que deriva de la acción de una fosfolipasa sobre PE.

En la cepa aislada L115, la disminución de PE estuvo también relacionada con un incremento en el marcado de DMPE, el cual es precursor de PC e interviene en la vía de síntesis de PC, a través de metilaciones sucesivas de PE.

Por lo tanto podemos sugerir que bajo condiciones de hipertermia y la combinación de hipersalinidad e hipertermia, habría un remodelamiento de los lípidos de membrana como respuesta adaptativa para soportar tales condiciones y permitir así que la membrana citoplasmática de ambas cepas, se mantenga en óptimas condiciones.

A diferencia de lo informado por otros autores bajo condiciones de elevada salinidad, en ninguna de las dos cepas en estudio se produjeron aumentos en los PL



aniónicos, PG y CL, probablemente, la concentración de NaCl utilizada no fue suficiente para disparar tal respuesta.

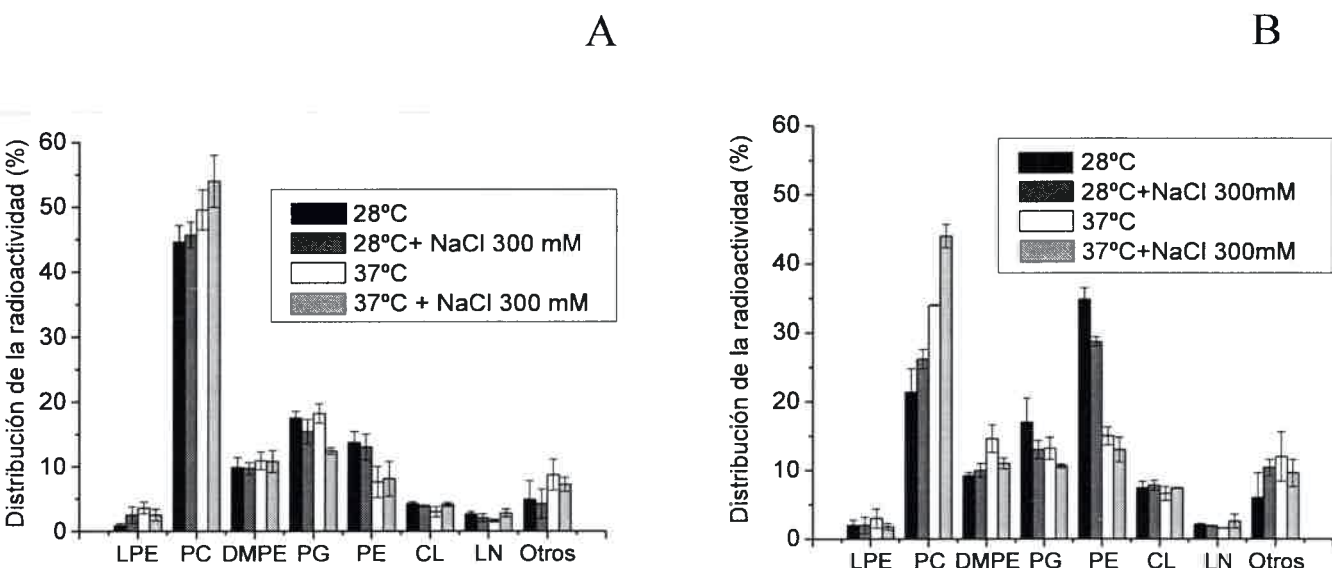
Estudios de alteración en la cabeza polar de los PL en respuesta a la temperatura de crecimiento han revelado marcadas diferencias entre cepas bacterianas, siendo dificultoso describir los efectos en términos generales (Miller et al, 1986).

Las modificaciones en los niveles de los PL como respuesta adaptativa, se traducen en un cambio de la relación entre PL zwitteriónicos (Z) (PE, DMPE, PC, LPE) y aniónicos (A) (PG, CL) (Z/A) por lo que resulta un parámetro de mucha importancia.

En las dos cepas en estudio, la relación Z/A, aumentó en todas las condiciones con respecto al control. Cambios en los porcentajes relativos de cada PL y en la relación Z/A con la temperatura de crecimiento fueron observados por Bakholdina et al (2004) para *Yersinia pseudotuberculosis*. Los cambios que ocurren en *R. TAL 1000* y *L115* reflejan una posible alteración en la forma de la membrana, por efecto de los estreses, basada en el aumento de PC, PL formador de bicapa, y disminución de PE, fosfolípido formador de no-bicapa (Denich et al, 2003).

Todos estos resultados tomados en conjunto, indican además de cambios en el marcado de los PL individuales, cambios en las relaciones metabólicas entre ellos, las cuales serían reguladas para mantener la estructura y las funciones de la membrana inalteradas bajo condiciones de hipertermia para ambas cepas.





**Figura 14.** Efecto de la hipersalinidad y de la hipertermia sobre la distribución de la radioactividad en fosfolípidos de A) *R. TAL 1000* y B) *L115*.

Las células fueron cultivadas en medio B para todas las condiciones ensayadas, con acetato de sodio [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] (37 KBq /ml) y se cosecharon en fase exponencial tardía. Los valores representan la media  $\pm$  S.E.M. de tres experimentos independientes.

## CAPITULO II

### Efecto de la temperatura sobre la fluidez de la membrana de *R. TAL 1000*

#### 4.II.1. Estudio del efecto de la temperatura sobre la fluidez de la membrana de *R. TAL 1000*

Los organismos poiquiloterms están expuestos a frecuentes cambios en las condiciones ambientales y su supervivencia depende de su capacidad para adaptarse a estos cambios. Modificaciones en la temperatura ambiente y las fluctuaciones de osmolaridad provocan cambios en la fluidez de las membranas celulares. Estos cambios son considerados críticos para la iniciación de las reacciones reguladoras que finalmente conducen a la aclimatación. El término "fluidez" (recíproco de viscosidad) se utiliza libremente para describir el grado de desorden molecular y el movimiento dentro de una bicapa lipídica (Cossins, 1994).





Las células de *R. TAL 1000*, respondieron en el orden de minutos al incremento de temperatura, disminuyendo los valores de polarización de fluorescencia, lo que se interpreta como un aumento en la fluidez de la membrana citoplasmática (Fig.15).

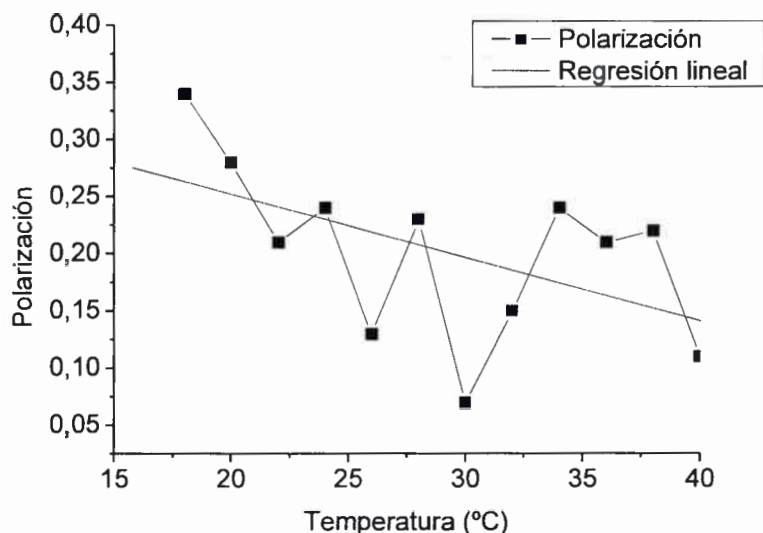
Hasta el momento se conocen dos tipos de mecanismos para ajustar este parámetro. Uno es un ajuste rápido que se produce a los pocos segundos de ocurrido el cambio de temperatura y el segundo es un reajuste más lento y que podría implicar cambios en los AG componentes de la membrana (Najjar et al, 2007). La composición de AG es el resultado de una suma de fenómenos complejos tendientes a mantener la viabilidad óptima de la célula bajo diversas condiciones. Por lo tanto, es difícil entender los mecanismos de ajuste que enlazan la composición de AG a la temperatura de crecimiento u otros factores de estrés.

El grado de insaturación de los AG de membrana es el factor más importante que influye en la fluidez de los lípidos de membrana (Cossins, 1994). Una disminución de la temperatura conduce a una disminución de la fluidez de la membrana, que resulta por ejemplo en una mayor expresión de genes desaturasas (Los y Murata, 1998). Estas enzimas introducen dobles enlaces en las cadenas de AG de los lípidos de membrana, compensando la disminución de la fluidez de la membrana (Murata y Wada, 1995). Como resultado, las propiedades físicas de la membrana se restauran a su estado original, con el mantenimiento de los gradientes iónicos apropiados y la restauración de las funciones de las enzimas asociadas a ella.

Los resultados encontrados en *R. TAL 1000* referidos al efecto de la hipertermia sobre la composición y síntesis de AG, nos indican un papel destacado de los AG para tolerar este tipo de condiciones. La modificación de los AG podría corresponder a un mecanismo de respuesta tardío, siendo la más importante una disminución en el grado de insaturación de los AG. Este cambio lograría contrarrestar el aumento de la fluidez de la membrana ocasionado inmediatamente la células son expuestas al cambio de temperatura.

En este sentido, Mykytczuk et al (2010), encontraron una correlación entre la modificación en la fluidez de la membrana y la composición de AG en *Acidithiobacillus ferrooxidans* bajo condiciones de estrés por frío. En *Acidithiobacillus ferrooxidans*, la disminución de la temperatura de crecimiento hasta 15°C, provocó una disminución de la fluidez de la membrana y un aumento en el grado de insaturación de los AG.



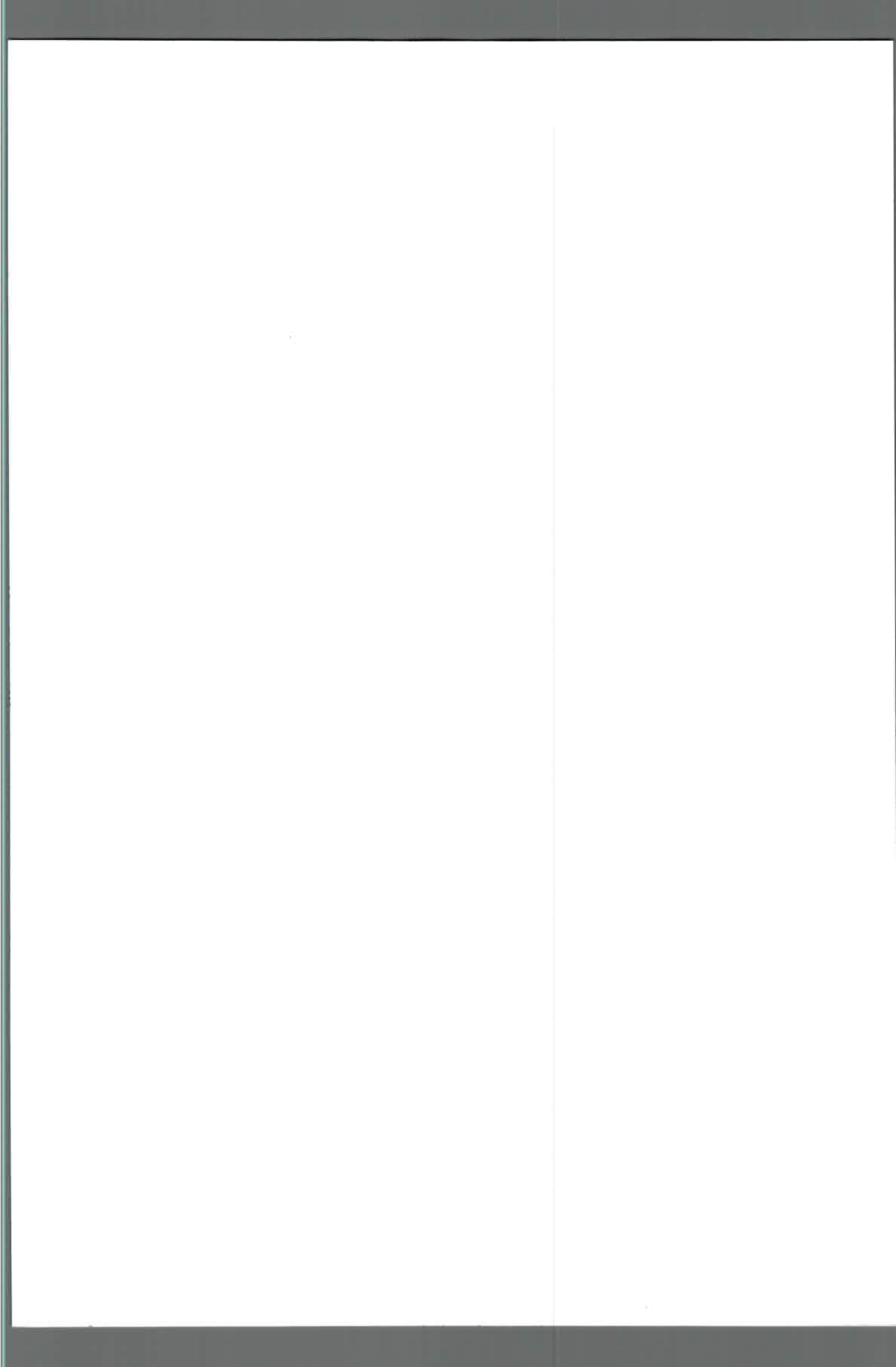


**Figura 15.** Relación entre la polarización de fluorescencia y la temperatura en membranas citoplasmáticas de *R. TAL 1000*. Las células cultivadas a 28°C fueron expuestas a incrementos de temperatura desde 18°C hasta 40°C, (2°C/min), utilizando DPH como sonda molecular. La línea continua muestra la regresión lineal de los datos, los cuales son representativos de tres experimentos independientes.

### CAPITULO III

#### **Estudio del mecanismo de síntesis de ácidos grasos insaturados en *R. TAL 1000* y L115: presencia de un gen desaturasa putativo y actividad desaturasa**

La manera en la que la composición de los lípidos de membrana son alterados en respuesta a la temperatura parece depender del mecanismo de síntesis de AG insaturados utilizado por la bacteria (Keweloh y Heipieper, 1996). En la mayoría de las bacterias la síntesis de AG es llevada a cabo mediante un grupo de enzimas cada una con una función específica, el conjunto de todas esas enzimas constituyen la FASasa tipo II. Por medio de la vía catalizada por ese complejo enzimático, las bacterias sintetizan AG de número par de carbono hasta 18 átomos de carbono principalmente saturados (ácido esteárico y ácido palmítico).



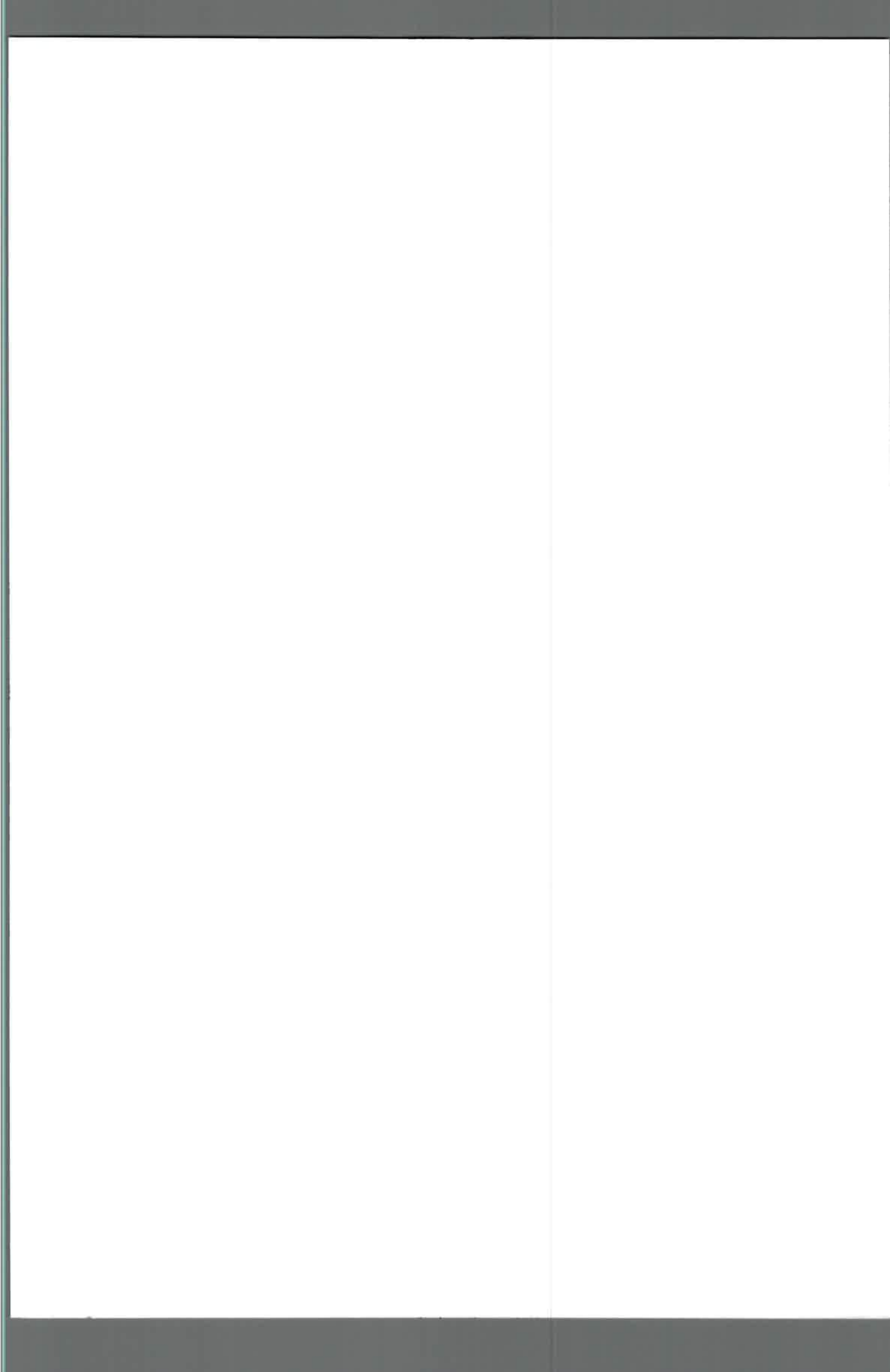
La biosíntesis de AG insaturados mayoritariamente *cis*-vaccénico (18:1 $\Delta^{11}$ ) y palmitoleico (16:1 $\Delta^9$ ) ocurre por la acción del producto del gen *fabA* cuya actividad enzimática corresponde a una *trans*-2-decenoil-ACP isomerasa, que actúa cuando se han sintetizado 10 unidades de carbono. Esta enzima actúa transformando el doble enlace de *trans* 2 a *cis* 3. La molécula conserva así la doble ligadura, restando solamente elongar el AG insaturado hasta la longitud determinada, lo que ocurre por sucesivos ciclos de condensación (Campbell y Cronan Jr, 2001). Además de esta ruta de síntesis de AG insaturados algunos microorganismos poseen otra vía denominada aeróbica, la cual utiliza enzimas denominadas desaturasas para introducir dobles ligaduras en AG preformados.

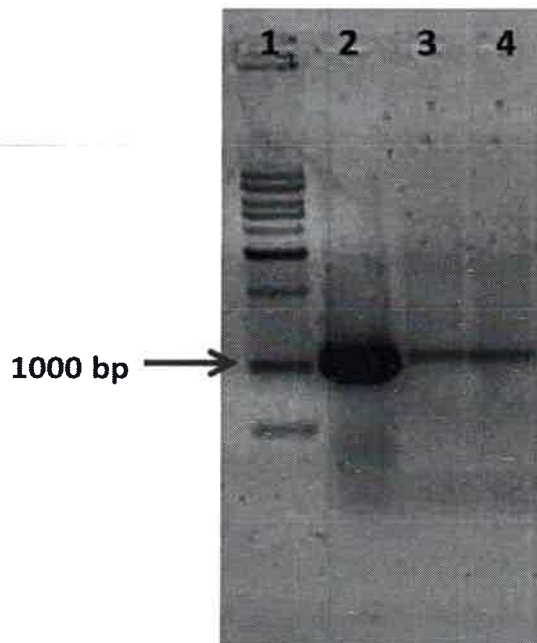
#### **4.III.1. Detección y Amplificación por PCR de un gen desaturasa putativo en *R. TAL 1000* y *L115***

El análisis del genoma de *E. meliloti* 1021, revela la presencia de un gen *fabA* que codifica para una enzima *trans*-2-decenoil -ACP isomerasa. Esta enzima podría ser la responsable de la síntesis del principal AG, 18:1 $\Delta^{11}$ , sin embargo en su genoma se encuentra también un gen que podría codificar para una enzima desaturasa.

Refiriéndonos a los rizobios, la vía aeróbica de AG no ha sido descrita, sin embargo en las bases de datos en las que se encuentran disponibles los genomas de muchos de ellos, secuencias de genes desaturasas putativos, están presentes.

La Figura 16 muestra el gel de agarosa de los productos de PCR, utilizando como molde ADNg de *E. meliloti* 1021, *R. TAL 1000* y *L115* y oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias consenso de diferentes posibles desaturasas de rizobios presentes en la base de datos del NCBI. A partir del ADNg de *R.TAL 1000* y *L115* se logró amplificar un segmento de aproximadamente 1000 bp.





**Figura 16.** Electroforesis en gel de agarosa, impregnado con BrEd, de los productos de amplificación por PCR.

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados a partir del alineamiento de las secuencias de varios genes desaturasas putativos de cepas de rizobios. 1) Marcador de peso molecular, del 2 al 4, productos de PCR de *E. meliloti* 1021 (control positivo), *R. TAL* 1000 y L115, respectivamente.

#### 4.III.2. Secuenciamiento parcial del producto de PCR de *R. TAL* 1000, L115 y uso de BLASTn

El producto de PCR correspondiente a *R. TAL* 1000 y L115 fue enviado a secuenciar y una vez obtenida la secuencia parcial y mediante el uso de BLASTn se obtuvo el alineamiento de la secuencia del fragmento de 1000 bp con las secuencias de la base de datos no redundante del GenBank. Dicho alineamiento indicó que ambos fragmentos poseen 98% de identidad con el gen fatty acid desaturase (desaturasa de AG), presente en el plásmido pSymA de *E. meliloti* 1021. Además las secuencias obtenidas resultaron ser idénticas entre ellas y poseen un elevado porcentaje de identidad con otras enzimas desaturasas de bacterias diferentes, como se muestra en la Tabla 5.





**Tabla 5.** Comparación de la secuencia de nucleótidos del gen desaturasa putativo de *R. TAL 1000* y *L115* con las secuencias de la base de datos no redundante del GenBank.

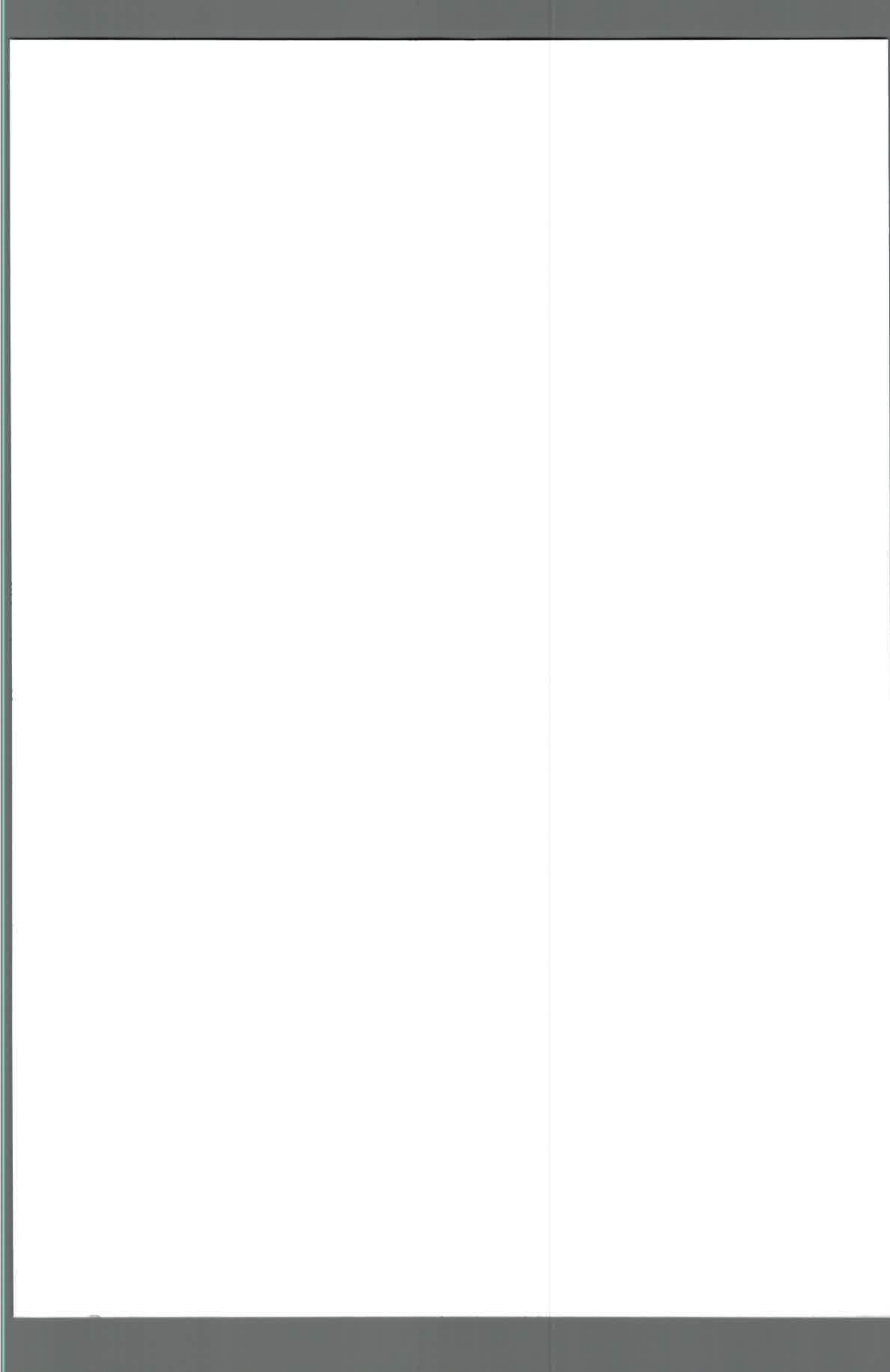
Microorganismo	% Identidad	Nº acceso NCBI
<i>Ensifer meliloti</i> 1021	98	AAK64726
<i>Ensifer medicae</i>	87	ABR63937
<i>Mesorhizobium loti</i>	64	BAB50163
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	58	ABJ05573

#### 4.III.3. Medición de la actividad de la enzima desaturasa en *R. TAL1000* y *L115*, utilizando como sustratos 16:0 [1-<sup>14</sup>C] y 18:0 [1-<sup>14</sup>C]

La capacidad de desaturación de un organismo puede ser comprobada utilizando AG radioactivos y midiendo la producción de AG de mayor grado de insaturación. Esta es una técnica que ha sido utilizada desde hace varios años. Así la desaturación in vivo de los AG 16:0 y 18:0 radioactivos fue detectada para las bacterias Gram negativas, *Alcaligenes faecalis* (Ghanekar y Nair, 1973) y *Pseudomonas* sp. cepa E-3 (Wada et al, 1989).

En este trabajo de tesis hemos utilizado AG radioactivos agregados al medio de cultivo de *R. TAL 1000* y *L115*. En la figura 17 se puede observar la distribución de la radioactividad en los diferentes tipos de AG de ambas cepas cuando la actividad desaturasa fue medida mediante el uso de los precursores 16:0 y 18:0 radioactivos.

Cuando se utilizó 16:0 [1-<sup>14</sup>C] un 65% para *R. TAL 1000* y un 55% para *L115* de la radioactividad fue incorporada en la fracción AG monoinsaturados, mientras que cuando se usó 18:0 [1-<sup>14</sup>C], un 45% para *R. TAL 1000* y un 65% para *L115* de la marca fue recuperada en la fracción monoinsaturados. Estos resultados sugieren fuertemente que ambas cepas rizobiales son capaces de utilizar los AG 16:0 y 18:0 exógenos y

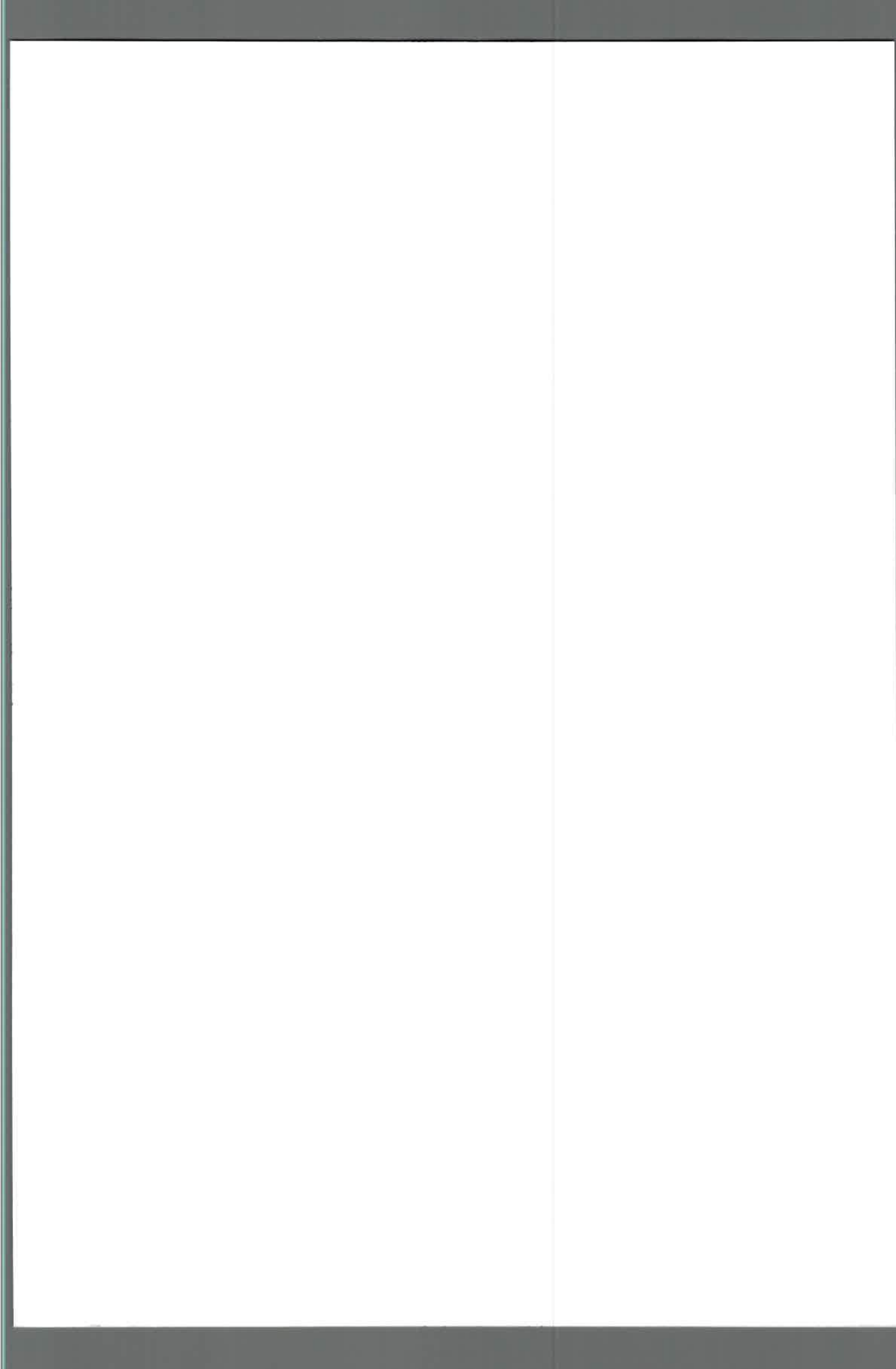


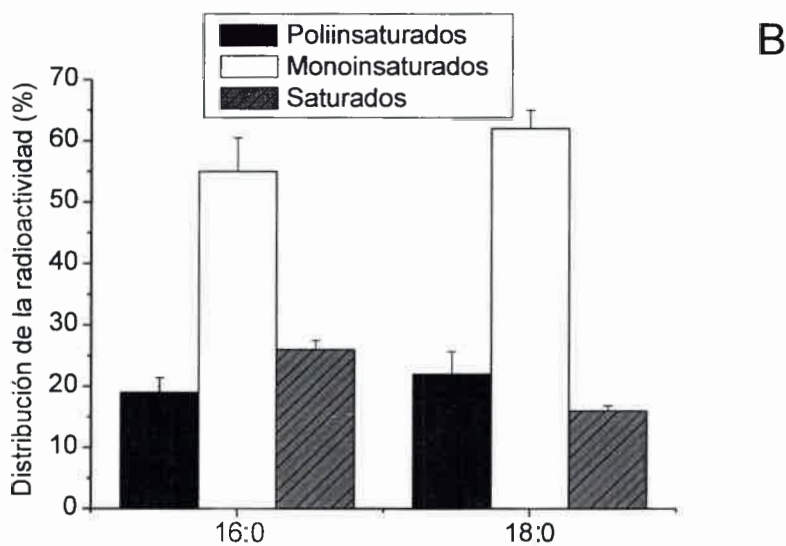
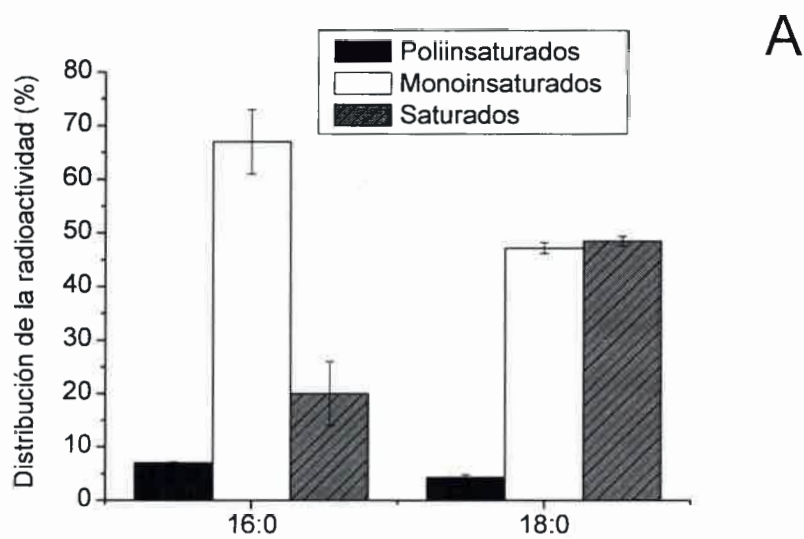
desaturarlos hasta AG monoinsaturados mediante un mecanismo aeróbico mediado por enzimas desaturasa.

En los últimos años resultados publicados en revistas internacionales han sentado bases significativas sobre la existencia de la actividad desaturasa en bacterias Gram negativas (Zhu et al, 2006; Li et al, 2008 y 2009). Dichos resultados fortalecen a los hallados años atrás y justifican la idea de que este tipo de enzimas se encuentran más ampliamente distribuidas en el mundo bacteriano, de lo que se pensaba en un primer momento.

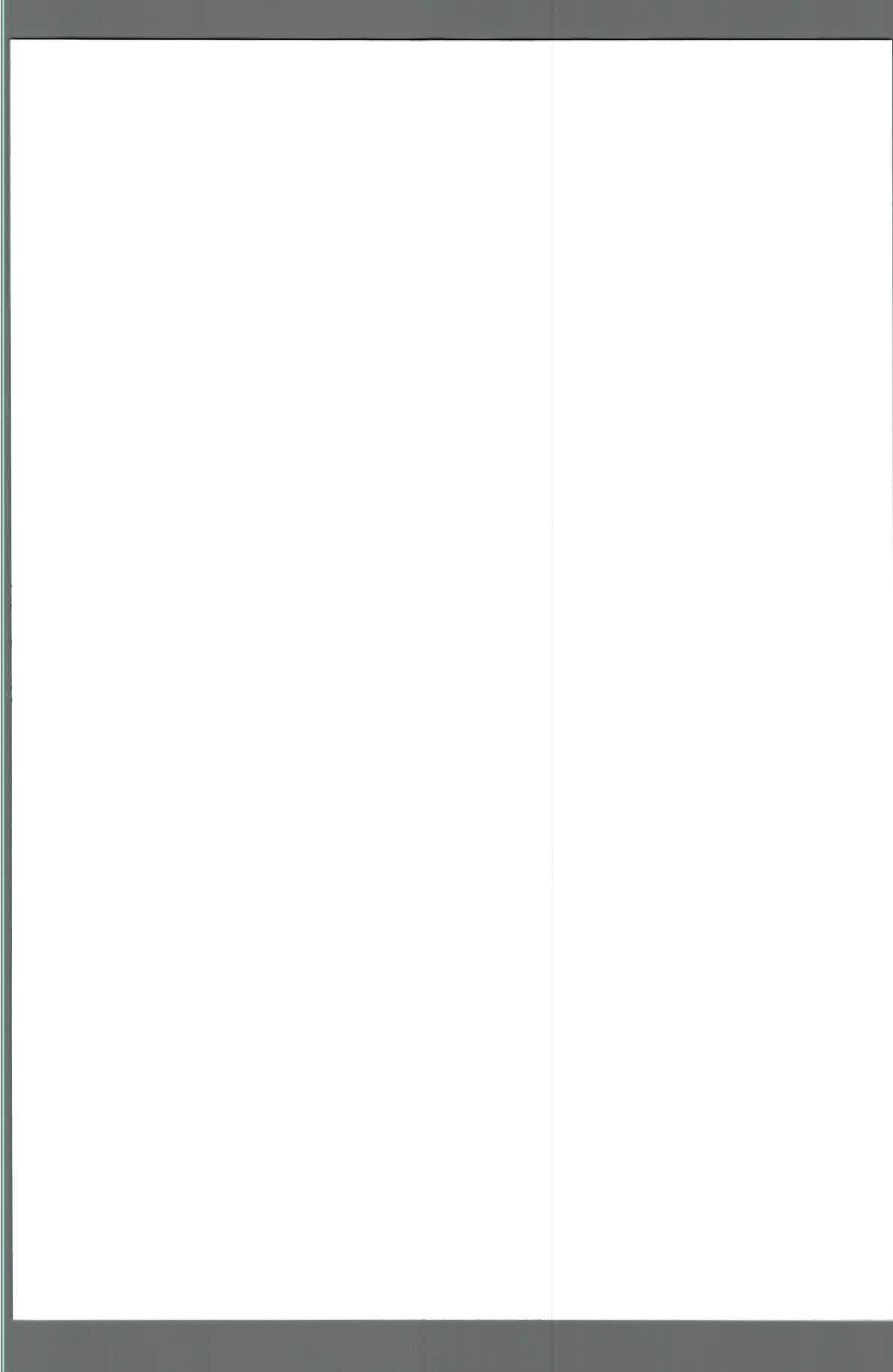
Los resultados obtenidos en esta tesis, brindan los primeros datos certeros sobre la presencia de un mecanismo aeróbico de síntesis de AG monoinsaturados en rizobios nodulantes de maní.

Otro resultado para destacar es que a diferencia de *R. TAL 1000*, en la cepa L115 un importante porcentaje de radioactividad, 19%, fue recuperado en la fracción AG poliinsaturados, cuando se utilizó el sustrato radioactivo 16:0 y 22% cuando se utilizó el sustrato radioactivo 18:0. Estos resultados podrían indicar que esta cepa posee enzimas responsables de la síntesis de AG con más de una doble ligadura.





**Figura 17.** Distribución de la marca radioactiva en los diferentes AG de *R.TAL 1000* (A) y *L115* (B), utilizando los precursores radioactivos 16:0 [ $1-^{14}\text{C}$ ] y 18:0 [ $1-^{14}\text{C}$ ]. Los FAME fueron separados de acuerdo al grado de insaturación usando placas de TLC impregnadas con 10%  $\text{AgNO}_3$ . Los resultados están expresados como porcentaje de la radioactividad total incorporada en cada fracción de AG. Los valores representan la media  $\pm$  S.E.M. de tres experimentos independientes.



## CAPÍTULO IV

### Desaturación en *R. TAL 1000* y *L115* y su papel en la adaptación a condiciones de hipertermia

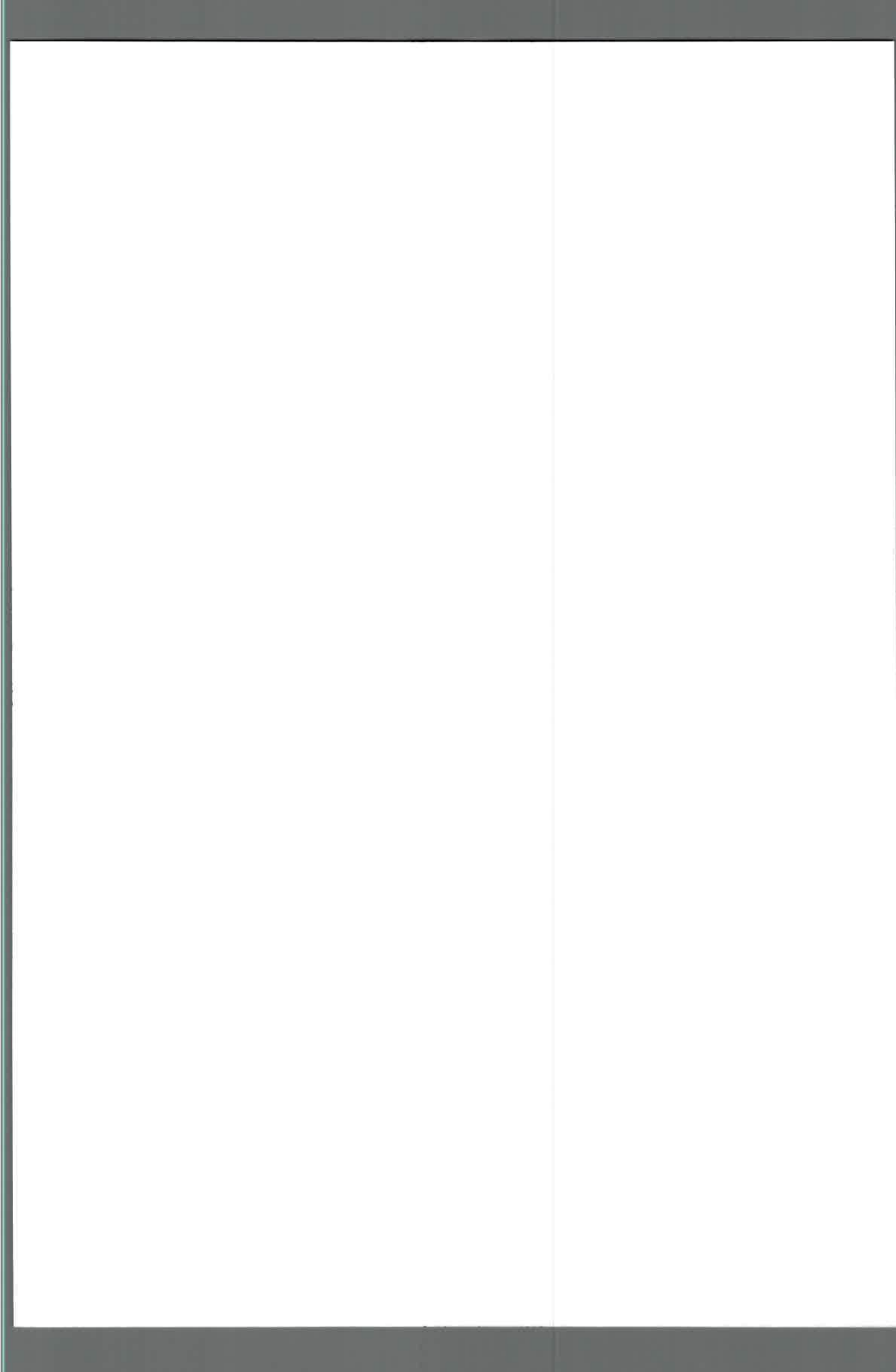
#### 4.IV.1. Efecto de la temperatura de crecimiento sobre la desaturación de los AG 16:0 [ $1-^{14}\text{C}$ ] y 18:0 [ $1-^{14}\text{C}$ ] en *R. TAL 1000* y *L115*

La composición de AG de un microorganismo está determinada por las actividades de las enzimas implicadas en su biosíntesis (Wallis y Browse, 2002). Como mencionamos anteriormente, muchos informes indican que condiciones de estrés ambiental, como frío, calor, sequía y salinidad inducen cambios en la composición de AG, alterando principalmente el grado de insaturación de los mismos. Las enzimas desaturasas son capaces de modificar el número de dobles ligaduras presentes en los AG, por lo que su actividad es a menudo regulada por un gran número de condiciones ambientales (Saito et al, 2005).

El aumento de la temperatura de crecimiento produjo cambios importantes a nivel de los AG monoinsaturados en las cepas *R. TAL 1000* (Fig. 18A) y *L115* (Fig. 18B). Cuando se utilizó el precursor 16:0 radioactivo (Fig. 20Ai), el cambio más significativo evidenciado en *R. TAL 1000*, fue una disminución de 53% de la incorporación de la marca radioactiva en la fracción de AG monoinsaturados y un aumento de 175% en la fracción de AG saturados, por efecto de la hipertermia.

Sorpresivamente para *L115* creciendo con el sustrato radioactivo 16:0, la temperatura de crecimiento no modificó la incorporación de la marca radioactiva en las diferentes fracciones de AG (Fig. 18Bi).

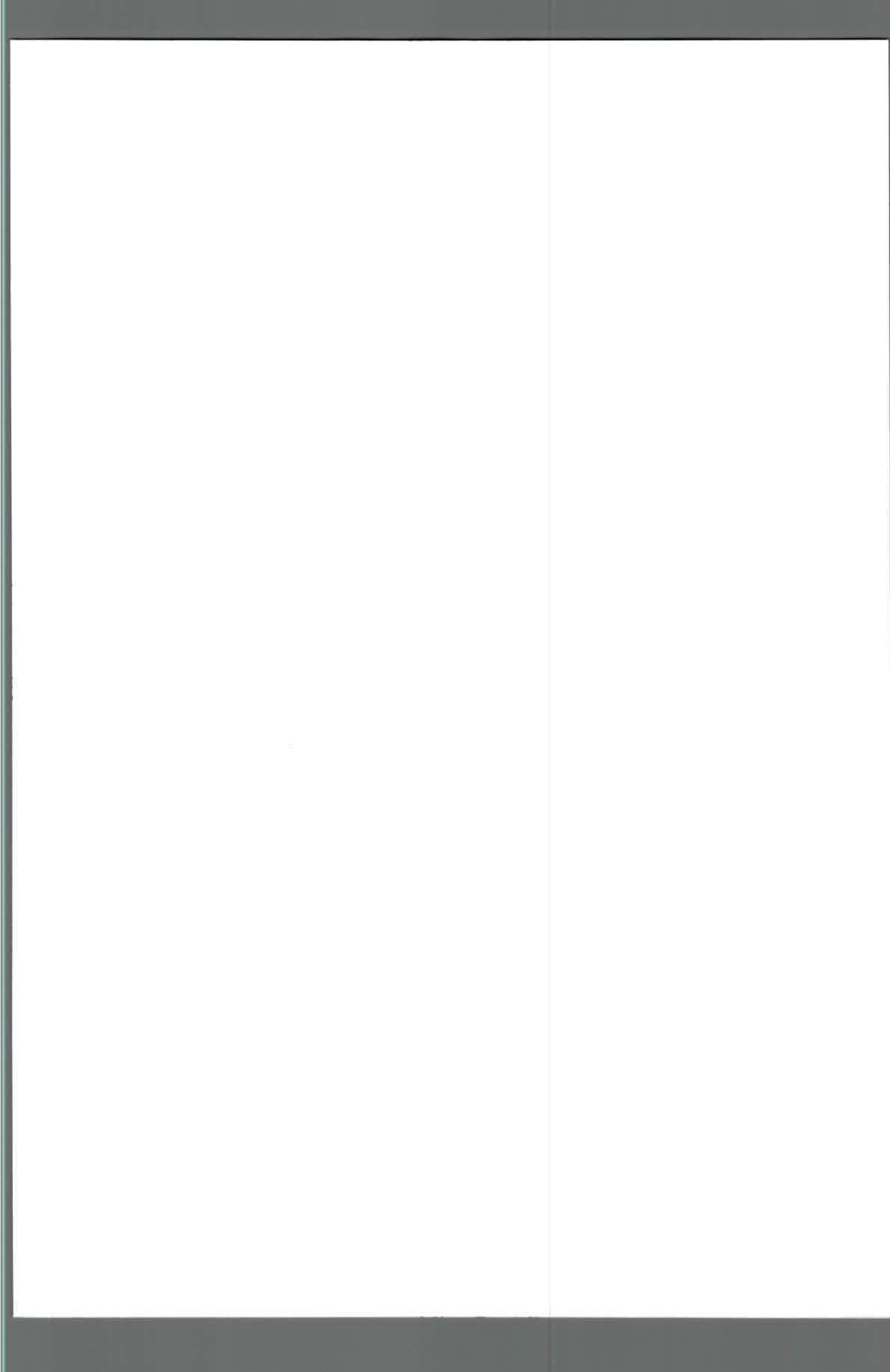
Resultados similares a los hallados con 16:0 fueron observados para *R. TAL 1000* cuando el sustrato radioactivo utilizado fue 18:0 (Fig. 18Aii). Se observó una disminución de 21% de la incorporación de la marca radioactiva en la fracción de AG monoinsaturados y un aumento de 13% en la fracción de AG saturados, por efecto de la hipertermia. En la cepa *L115*, la temperatura de crecimiento sí provocó cambios en la desaturación del AG radioactivo 18:0 (Fig. 18Bii), observándose una disminución de 15% de la incorporación de la marca radioactiva en la fracción de AG monoinsaturados y un aumento de 100% en la fracción de AG saturados, por efecto de la hipertermia.



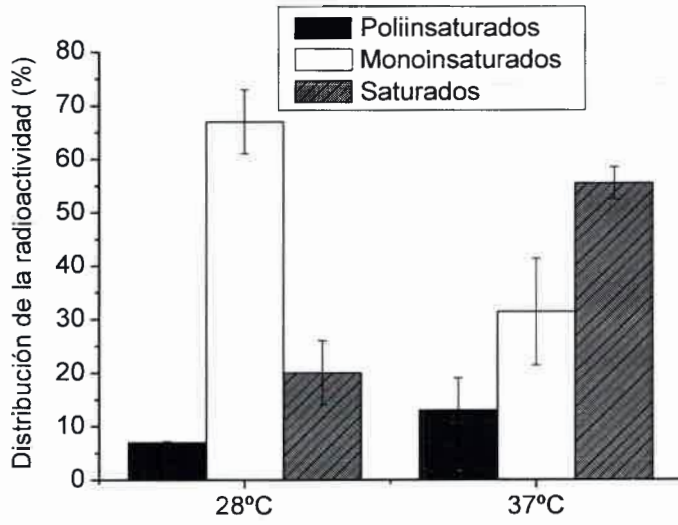


Los AG monoinsaturados tienen profundos efectos sobre la fluidez y la función de las membranas biológicas. Microorganismos, plantas y animales pueden regular la síntesis de AG monoinsaturados durante el cambio en las condiciones del medio ambiente (Aguilar y de Mendoza, 2006). El mecanismo de control térmico de la biosíntesis de AG insaturados ha sido extensamente caracterizado en *E. coli*. En este microorganismo, que no posee enzimas desaturasas, la síntesis del AG insaturado (18:1 $\Delta^{11}$ ) está verdaderamente aumentada por efecto de bajas temperaturas de crecimiento. Esta respuesta regulatoria es una de las propiedades de una proteína específica para la síntesis de AG:  $\beta$ -ketoacil-acil carrier protein (ACP) que forma parte del sistema sintetasa II (mecanismo anaeróbico), responsable de convertir palmitoleico (16:1 $\Delta^9$ ) en 18:1 $\Delta^{11}$ . Esta enzima está presente a todas las temperaturas pero es más activa a bajas temperaturas que a elevadas temperaturas. *Bacillus*, que si posee un sistema de desaturación aeróbico, tiene un mecanismo diferente para regular la síntesis de AG insaturados en respuesta a bajas temperaturas. Esta respuesta adaptativa fue caracterizada in vivo en *Bacillus subtilis*, bacteria que sintetiza 16:1 $\Delta^5$  por medio de una enzima desaturasa, sólo a bajas temperaturas de crecimiento (Aguilar et al, 1998). *Dictyostelium*, es capaz de modificar la proporción del AG 18:2 por efecto de la temperatura de crecimiento, modificando la actividad de la  $\Delta^5$  desaturasa (Saito et al, 2005).

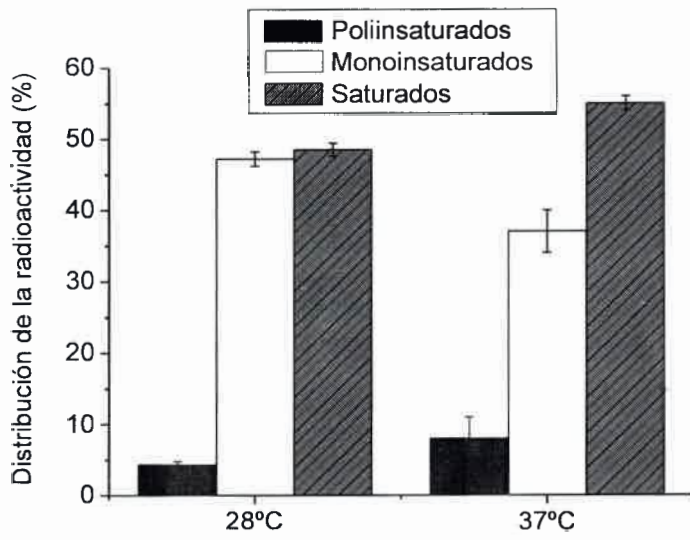
En esta tesis doctoral encontramos que para ambas cepas rizobiales la actividad desaturasa medida in vivo con diferentes precursores radioactivos estuvo controlada por la temperatura de crecimiento. A 37°C, tanto *R. TAL 1000* como *L115* (sólo para 18:0 como precursor) presentan menor actividad desaturasa, sintetizando menor cantidad de AG monoinsaturados. Estos resultados podrían explicar en parte por qué a 37°C encontramos una composición de AG con menor cantidad de AG monoinsaturados y menor grado de insaturación.

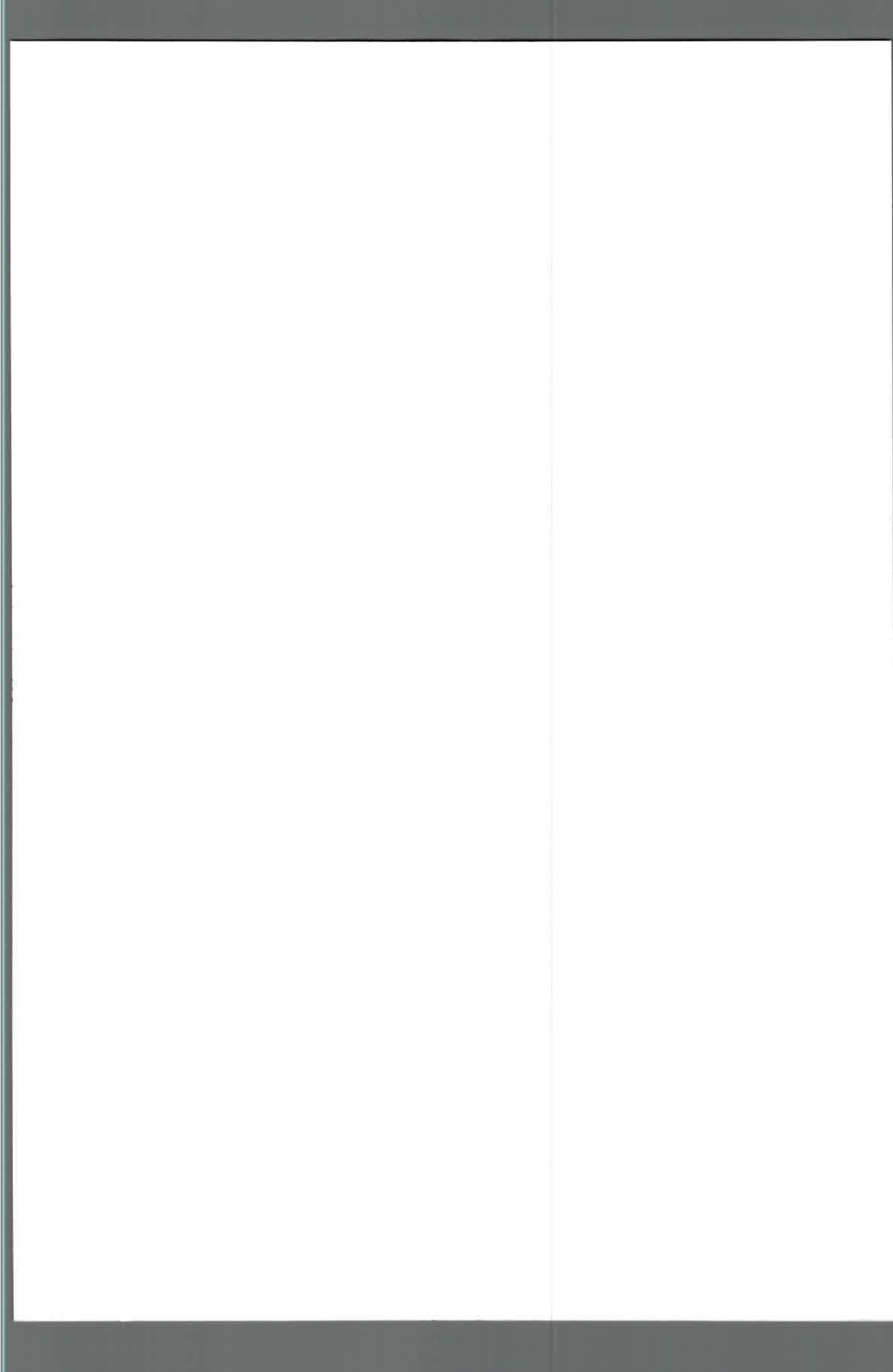


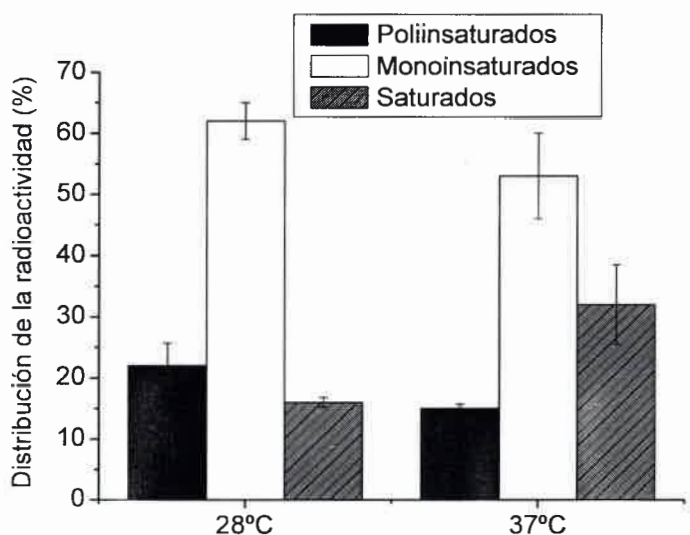
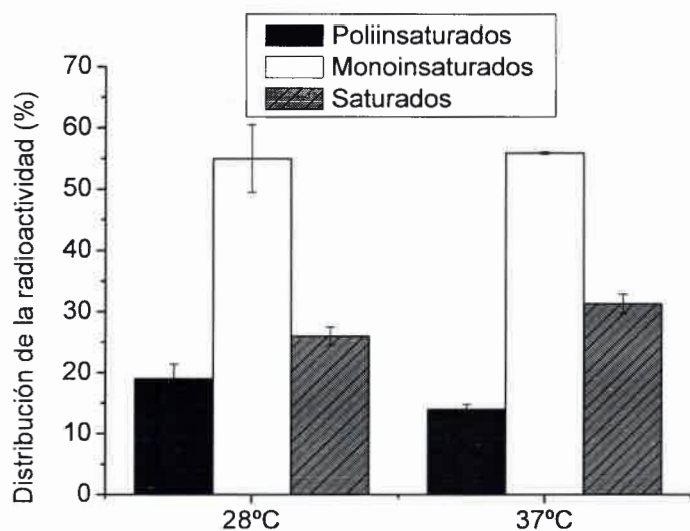
A i



A ii

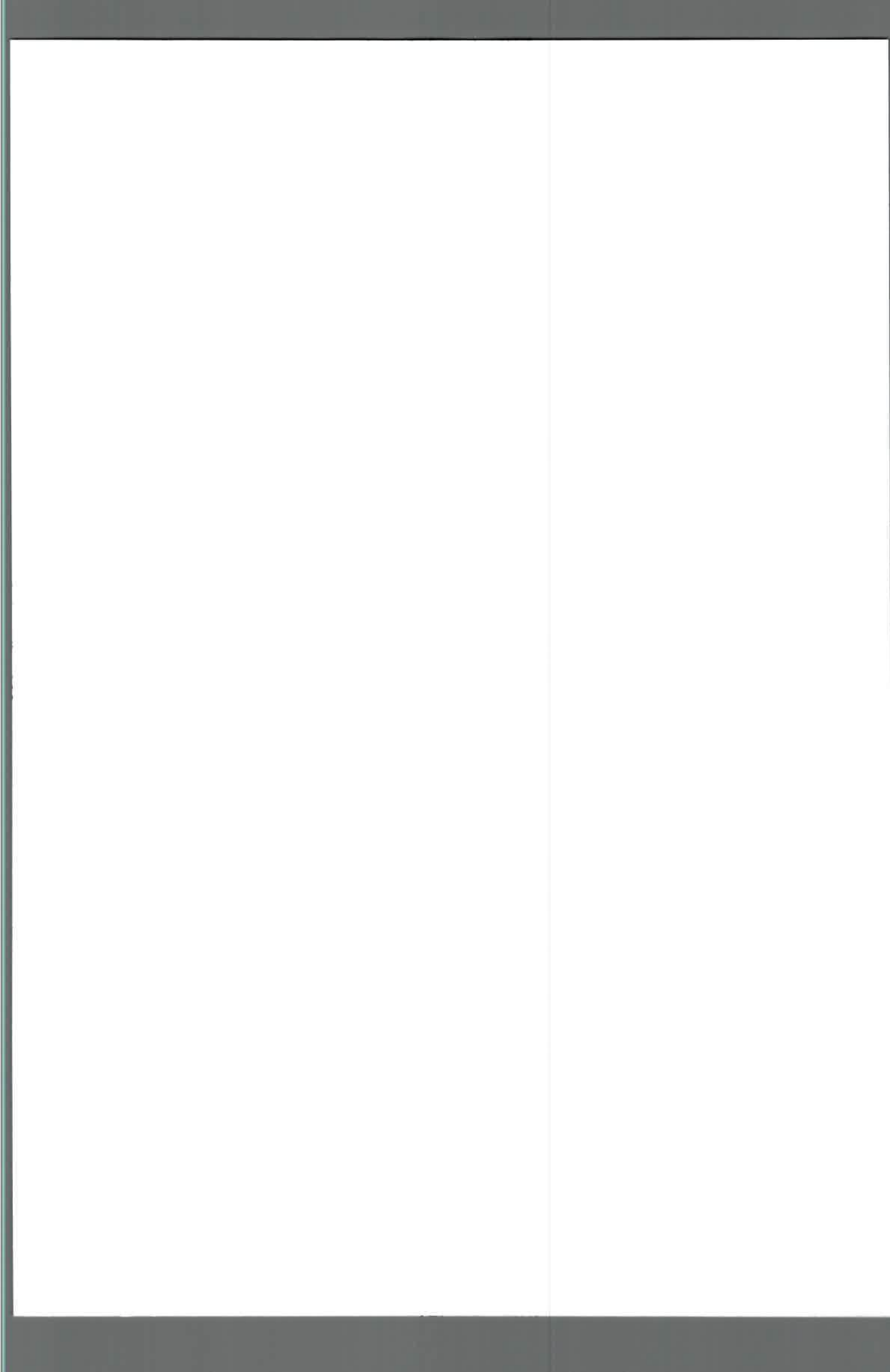






**Figura 18.** Efecto de la temperatura sobre la distribución de la marca radioactiva en los diferentes AG de *R. TAL 1000* (A) y *L115* (B) utilizando los precursores radioactivos 16:0 (i) y 18:0 (ii).

Los AG radioactivos fueron agregados al medio de cultivo al momento de la inoculación. Los FAME fueron separados de acuerdo al grado de insaturación usando placas de TLC impregnadas con 10%  $\text{AgNO}_3$ . Los resultados están expresados como porcentaje de la radioactividad total incorporada en cada fracción de AG. Los valores representan la media  $\pm$  S.E.M. de tres experimentos independientes.



## CAPITULO V

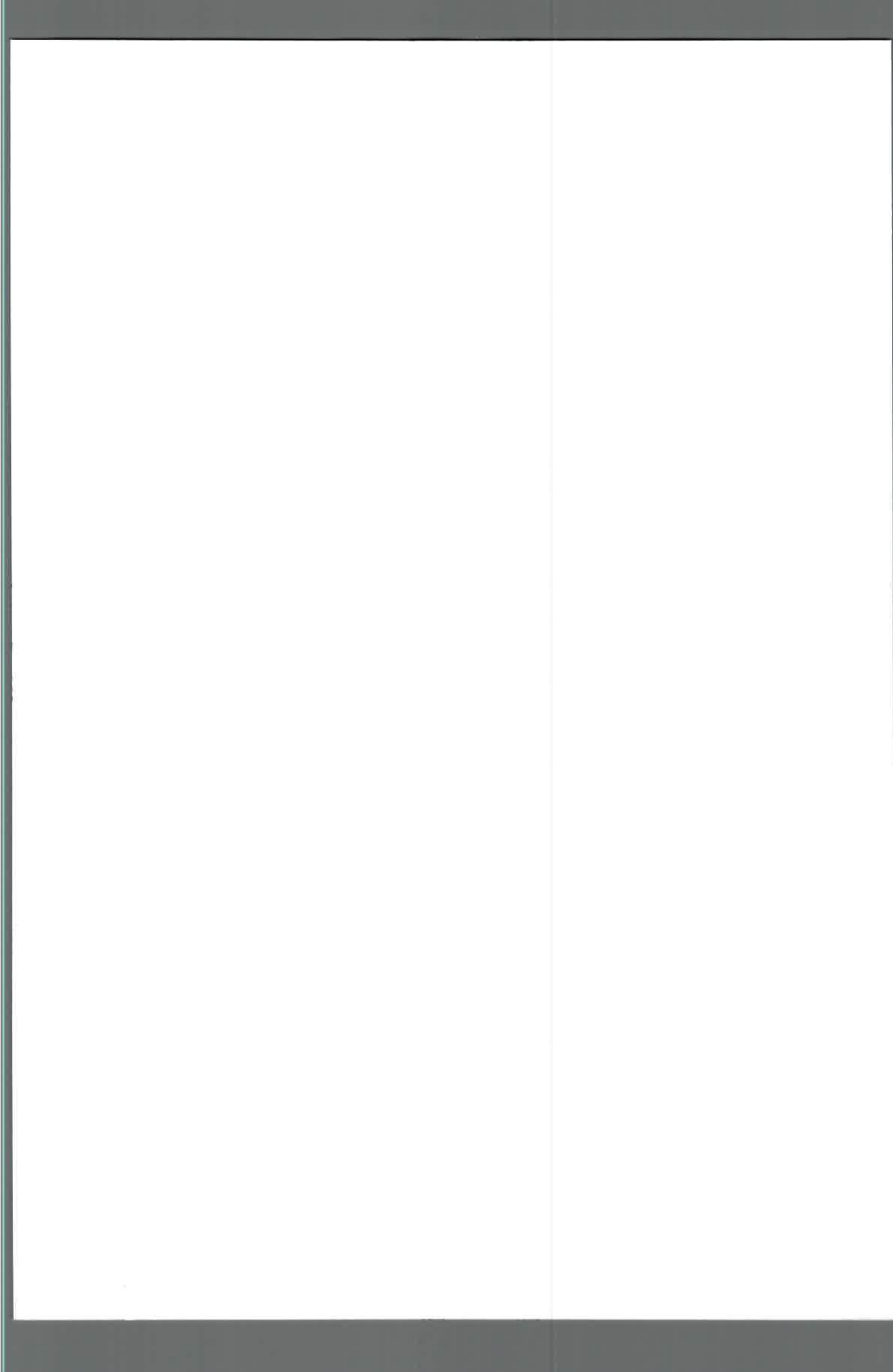
### **Secuenciación completa del gen desaturasa putativo de *R. TAL1000* y sobreexpresión del mismo en *E. coli*. Caracterización bioquímica y funcional**

La creciente cantidad de secuencias de diferentes genes pertenecientes a un sin número de organismos, cargadas en diferentes bases de datos, hace necesario el estudio de las vías metabólicas en las que están involucrados con el fin de poder asignarles una función verdadera basada en pruebas bioquímicas. Es por ello que en los últimos años este tipo de metodologías ha empezado a tener más expansión. En el año 2009, el rol de la posible enzima desaturasa de la cepa *Pseudoalteromonas* sp. MLY15, fue confirmado mediante la combinación de ensayos de biología molecular y bioquímicos (Li et al, 2009)

Es por ello que en esta tesis y para comprobar la función del gen desaturasa putativo de *R. TAL 1000*, se abordó el estudio bioquímico y molecular.

#### **4.V.1. Clonado y secuenciación completa del gen desaturasa putativa de *R. TAL 1000***

El gen desaturasa putativo perteneciente a *R. TAL 1000* fue amplificado por PCR y clonado por medio de técnicas básicas de biología molecular dentro del vector de expresión pET17b. Esta construcción fue utilizada para transformar a la cepa *E. coli* BL21. Una colonia portadora de dicha construcción fue nombrada como *E. coli* BL21 pET-des TAL y utilizada para los ensayos de sobreexpresión. De esta misma colonia se purificó por medio de un kit comercial el plásmido conteniendo el gen desaturasa y esta muestra fue enviada a secuenciar usando los oligonucleótidos universales para obtener la secuencia completa del gen de *R. TAL 1000*. Exactamente la misma metodología fue utilizada para clonar el gen desaturasa putativo de *E. meliloti* 1021. La cepa de *E. coli* transformada con este gen fue nombrada como *E. coli* BL21 pET-des Em y también fue utilizada en los ensayos de sobreexpresión.





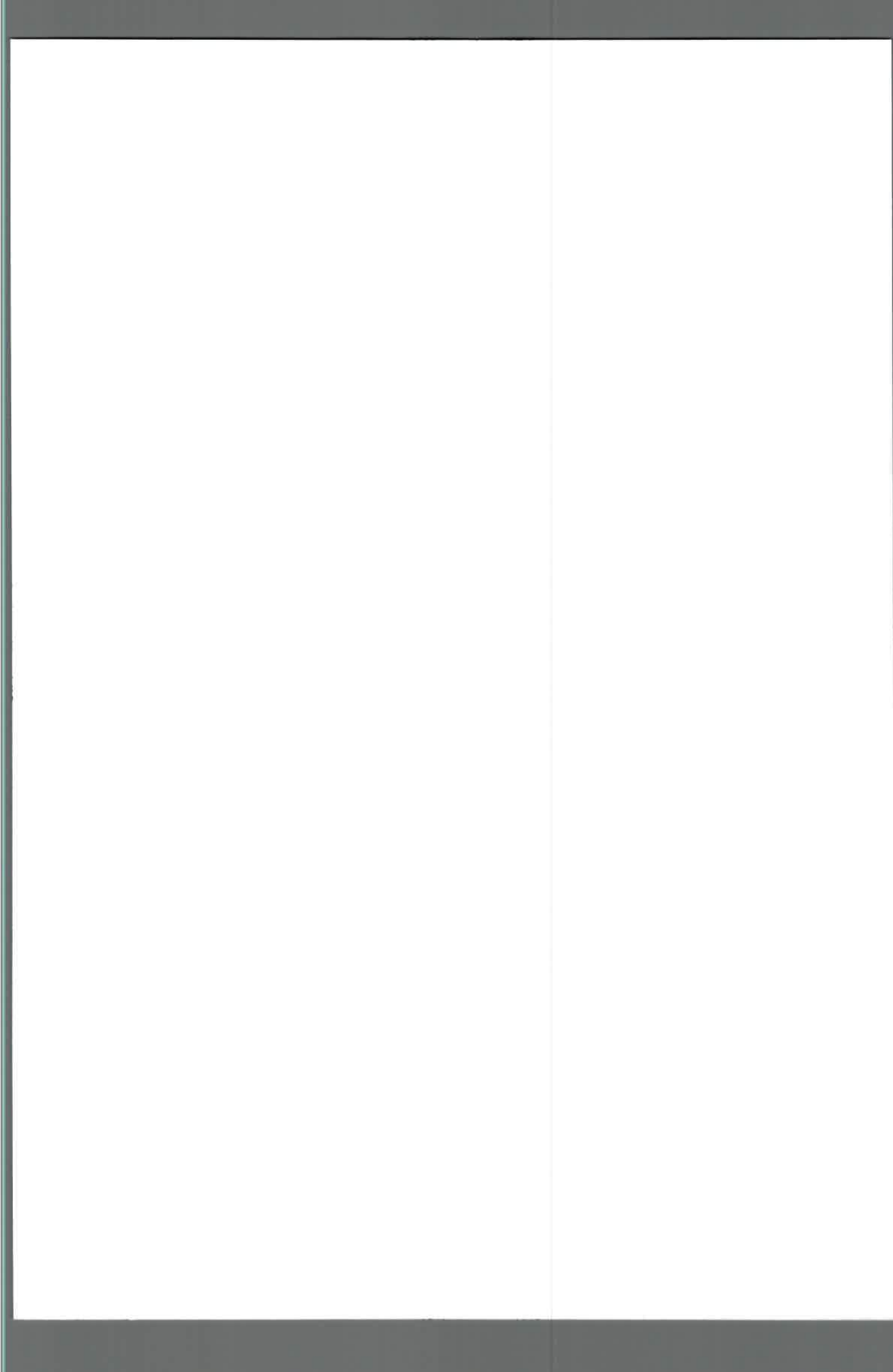
```

ATGAGCGCACATGTCTATCCACCCGCTTCACTCGTTGAAGACAATGCTGGAGCGTGG
TTGAAGACGCTGGCTAAATACCGGCAGCCCCGCTGGGGCGTAGCGCCTTCGAACTG
TTCGTCACTCTCGTCCCTTTTCGCCATCTTCTGGGCAGCGGCCTGCTTTTCGCTGGCC
AACGGCTTCTGGCCCCGGGCTGATTGCAATCCTTCCCTGCCAGCGCCTTTCTGCTCCGA
TTGTTTCATGATCCAGCACGATTGCGGCCACGGCTCGTTTTTTCTCCCGTCGTGGGCTC
GATGACTGGACCGGCCGCTGCTCGGGGTCCTGACCCTGACCCCTTACGATTATTGG
AGGCGTGCGCATGCCGCCATCATGCGACTGCAGGTAATCTCGACGAACGCGGGGTT
GGTGACATCACCACGCTGACGATTACCGAATACTGTGCCCTTTTCGCCGATCAAACGC
CTCGGCTACCGGCTGTACCGGCACCCGCTTGTTCATGTTTCGGGATCGGGCCGGCCTGG
CTCTTTCTGTTCAAGCAGCGCCTGCCGTTTCGGAATGATGAACTCGGGTGCTCTGCCA
TGGATTTTCGACCATGGCGACGAATTTTTCGATCGTCACGCTGGCCGCTTGATGGTT
TGGGCCGTTCGGTTTGGGAACGTTTCTCCTGATCCATCTTCCGGTCGTGCTGCTCGCA
GGTGCAGCCGGCGTTTGGCTCTTTTATGTGCAGCACCAGTTTCGAGGAGACCCACTGG
TCGGCGGGCGAGGATTGGCGGTTTCCCCAGGCGGGCGCTGCATGGCGCCTCGCATTAC
GATCTTCCGCCGGTGCTGCGGTGGCTCACTGGCAATATCGGCATCCATCACGTGCAC
CACCTGTCCAGCCGGATTCCGTACTACCGTCTGCCGGAAGTACTGCGTGACCATCCG
CAACTTGCCGGCATCGGTTCGGATCACCTGTGGGACAGCCTCAAATGCGTCAGGCTC
GTGCTCTGGGACGACCGGGCGCCGGAGGCTAGTTTCATTCCACGACGCCGCTGGGTCG
CTGCGCCGCTCCCTTACTGAAGATGGACGAAAGACGAAGTAA

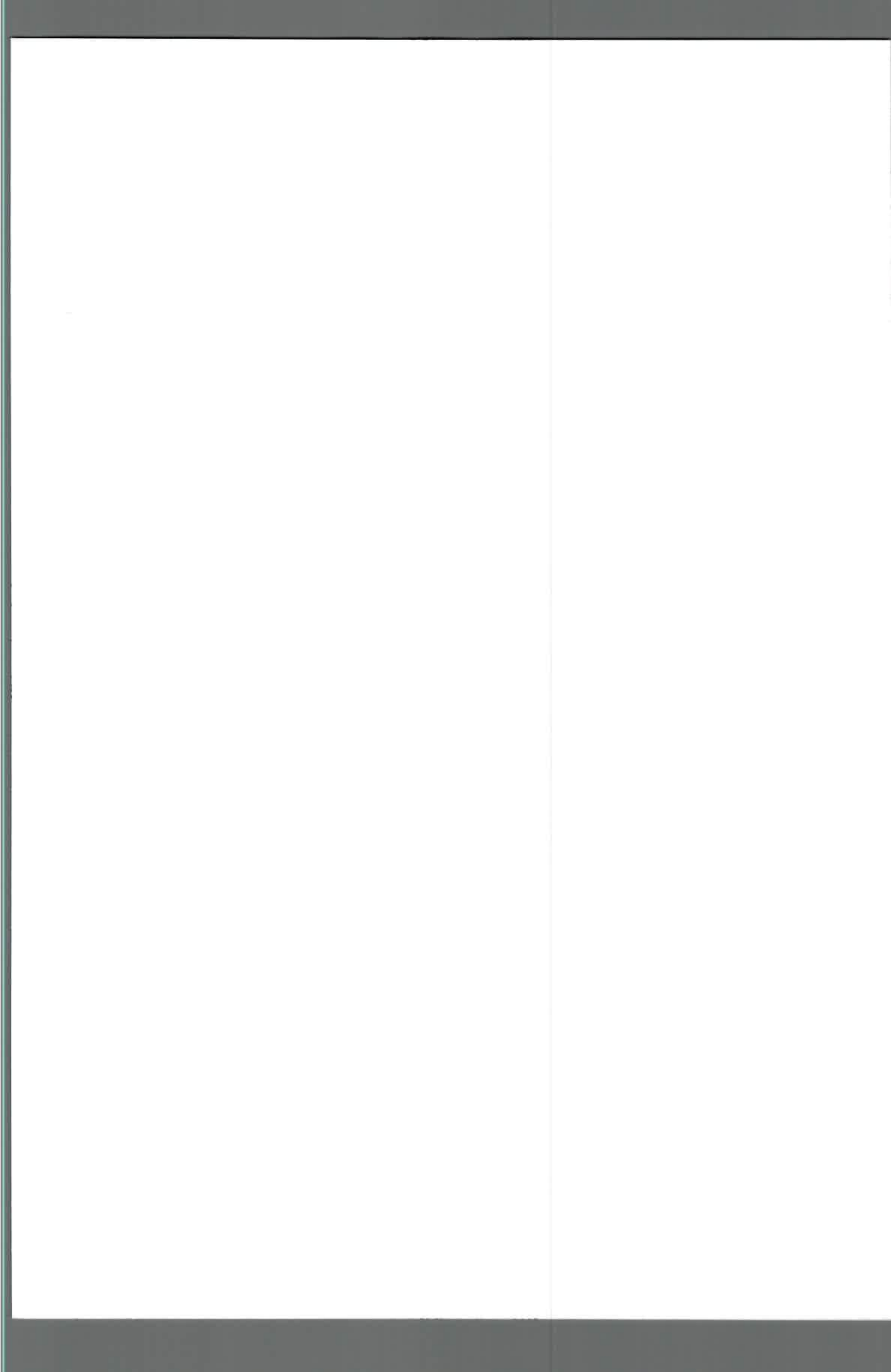
```

**Figura 19.** Secuencia completa del gen desaturasa putativo de *Rhizobium* TAL 1000 homólogo al de *Ensifer meliloti* 1021.

La figura 19 muestra la secuencia completa de nucleótidos del gen desaturasa putativo de *R. TAL* 1000. Esta secuencia ha sido depositada en la base de datos del GenBank con el número de acceso (AEQ32060.1). Mediante el uso de BLASTn se obtuvo el alineamiento de la secuencia del fragmento clonado con las secuencias de otras desaturasas que se encuentran en la base de datos no redundante del GenBank. Dicho alineamiento indica que el fragmento clonado posee 100% de identidad con el gen desaturasa putativa de *E. meliloti* 1021, cuya secuencia está también presente en la base de datos Gen Bank.

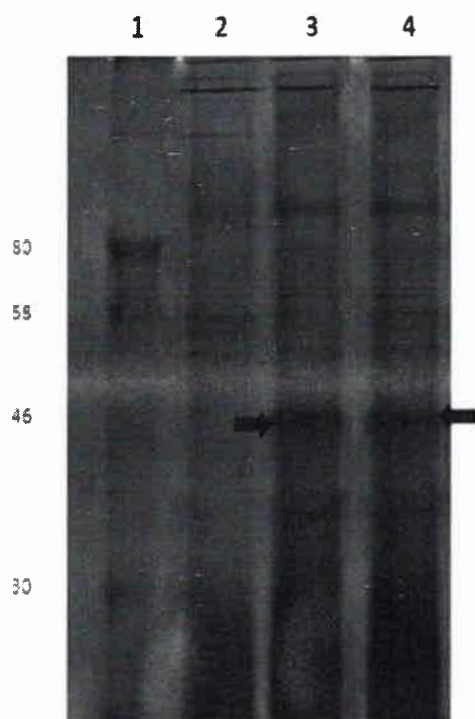






#### 4.V.3. Sobreexpresión del gen desaturasa putativo de *R. TAL 1000* homólogo al gen desaturasa putativo de *E. meliloti 1021* en *E. coli*

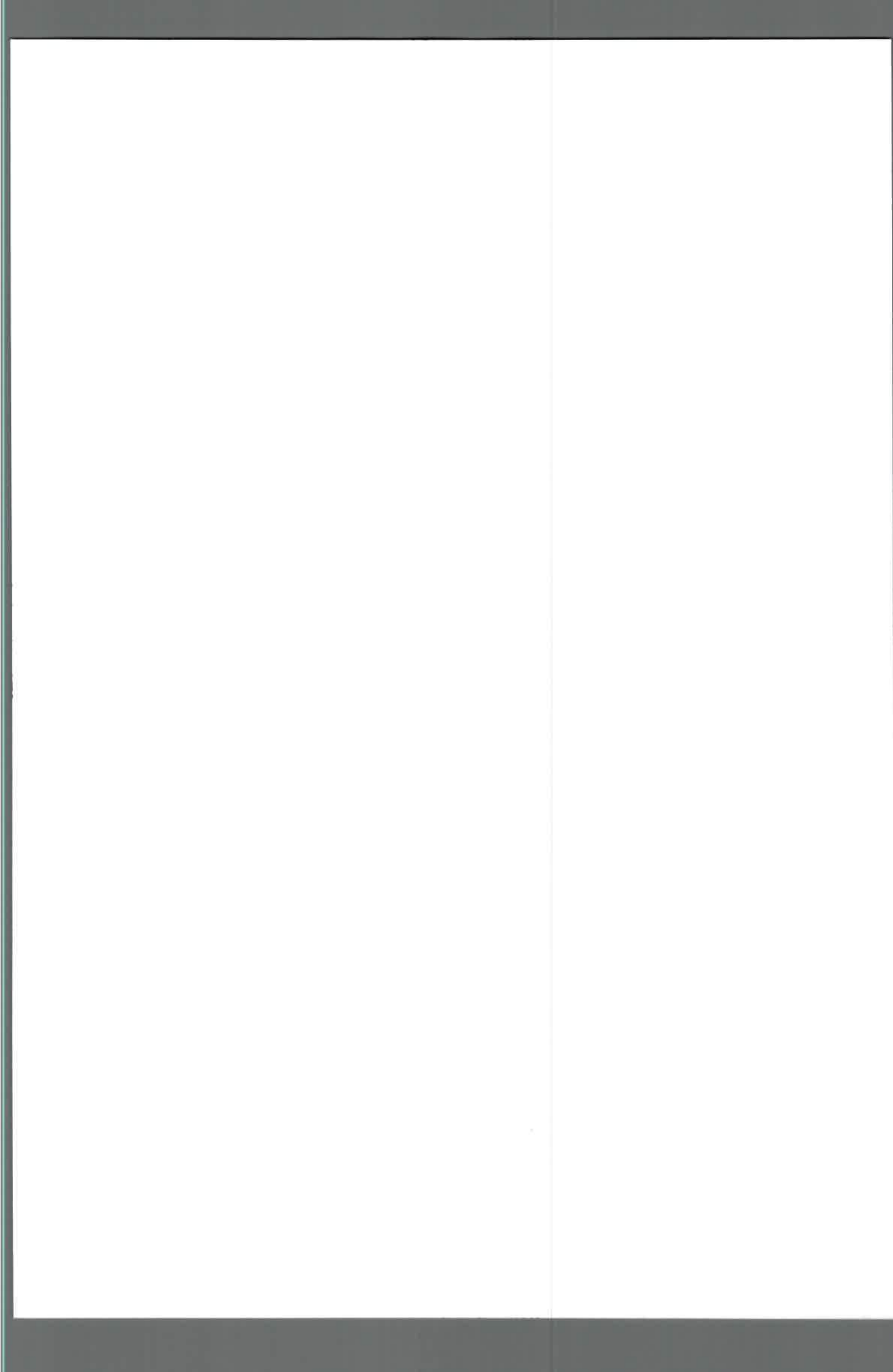
Con el propósito de asignar a este gen una verdadera función en el metabolismo de lípidos y confirmar los datos ya obtenidos en la cepa portadora del mismo, enfocamos el estudio tanto a nivel molecular como a nivel bioquímico. Para ello los genes desaturasa putativos de *R. TAL 1000* y *E. meliloti 1021* fueron sobreexpresados en la cepa hospedadora *E. coli* BL21. Para confirmar el resultado de la sobreexpresión se realizaron geles de SDS-PAGE con extractos proteicos totales (Fig.21), encontrando una banda de sobreexpresión de aproximadamente 46 kDa.



**Figura 21.** Sobreexpresión de la posible enzima desaturasa de *R. TAL 1000* y *E. meliloti 1021* en *E. coli*, examinada por SDS-PAGE.

*E. coli* BL21 pET, *E. coli* BL21 pET-des TAL y *E. coli* BL21 pET-des Em fueron inducidas con 0,1mM de IPTG por 1 hora, luego el extracto proteico total fue obtenido y 30  $\mu$ g del mismo utilizado para ser resuelto por SDS-PAGE 10%.

Línea 1: marcador de peso molecular, línea 2-4: extractos proteicos totales de: *E. coli* BL21 pET (línea 2), *E. coli* BL21 pET-des TAL (línea 3) y *E. coli* BL21 pET-des Em (línea 4). Las flechas indican las bandas de sobreexpresión.

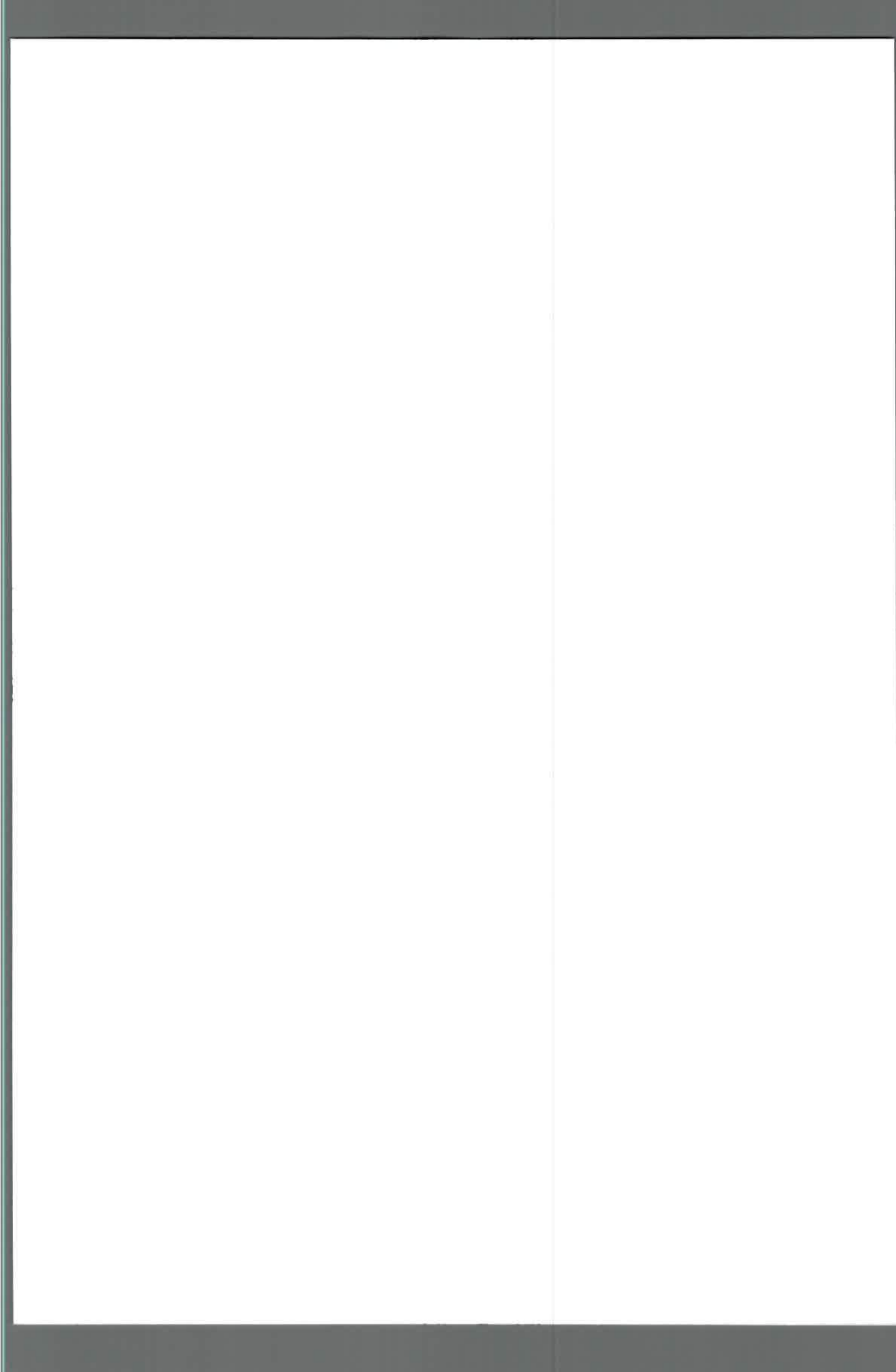


#### 4.V.4. Estudio de la composición de AG de las cepas de *E. coli* transformadas

La composición de AG de las cepas *E. coli* BL21 pET, *E. coli* BL21 pET-des TAL y *E. coli* BL21 pET-des Em fue examinada por cromatografía gaseosa y se puede observar en la tabla 6. La cepa *E. coli* BL21 pET contiene como principales AG monoinsaturados 16:1, 18:1 y como principal AG saturado 16:0 y pequeñas cantidades de 18:0.

En cuanto a las cepas *E. coli* BL21 pET-des TAL y *E. coli* BL21 pET-des Em, se encontraron diferencias significativas con respecto a la cepa control pET principalmente a nivel de los AG monoinsaturados: 16:1 y 18:1. La cepa de *E. coli* portadora del gen desaturasa de *R. TAL* 1000 presentó cantidades incrementadas de sus dos AG monoinsaturados, así 16:1 aumentó 46%, mientras que 18:1 aumentó 38%. Resultados similares fueron obtenidos para la cepa de *E. coli* portadora del gen desaturasa de *E. meliloti* 1021, observándose un aumento de 35% del AG 16:1 y de 34% del AG 18:1. Otro resultado significativo fue que ambas cepas de *E. coli* transformadas con los respectivos genes desaturasa, presentaron menores proporciones de los AG saturados. Así 16:0 disminuyó 29% para *E. coli* BL21 pET-des TAL y 25% para *E. coli* BL21 pET-des Em, mientras que el AG 18:0 disminuyó 56% para *E. coli* BL21 pET-des TAL y no pudo ser detectado para *E. coli* BL21 pET-des Em.

Estos datos nos indican que los dos AG saturados están siendo utilizados como sustratos por las cepas para transformarlos en AG monoinsaturados y nos indican que la enzima de *R. TAL* 1000 y *E. meliloti* 1021, heterológicamente expresada estaría relacionada con la síntesis de AG monoinsaturados. Resultados similares fueron reportados por Li et al, 2009 quienes clonaron y sobreexpresaron un gen desaturasa putativo de la bacteria Gram negativa *Pseudoalteromonas* sp. La composición de AG de la cepa de *E. coli* transformada con el gen de esta bacteria, resultó tener cantidades elevadas del AG 16:1, asignándole a este gen la función de desaturasa de AG.





**Tabla 6.** Composición de AG de las diferentes cepas de *E. coli* transformadas.

Cepa de <i>E. coli</i>	AG (%)			
	16:0	16:1 $\Delta^9$	18:0	18:1( $\Delta^{11} + \Delta^9$ )
pET	44.7 $\pm$ 0.6	17.0 $\pm$ 2.0	7.50 $\pm$ 0.5	32.0 $\pm$ 3.0
pET-des TAL	31.5 $\pm$ 0.7*	26.0 $\pm$ 2.5*	3.30 $\pm$ 0.1*	39.1 $\pm$ 1.0*
pET-des Em	33.6 $\pm$ 1.6*	23.0 $\pm$ 4.0*	ND $^{\S}$	43.2 $\pm$ 4.5*

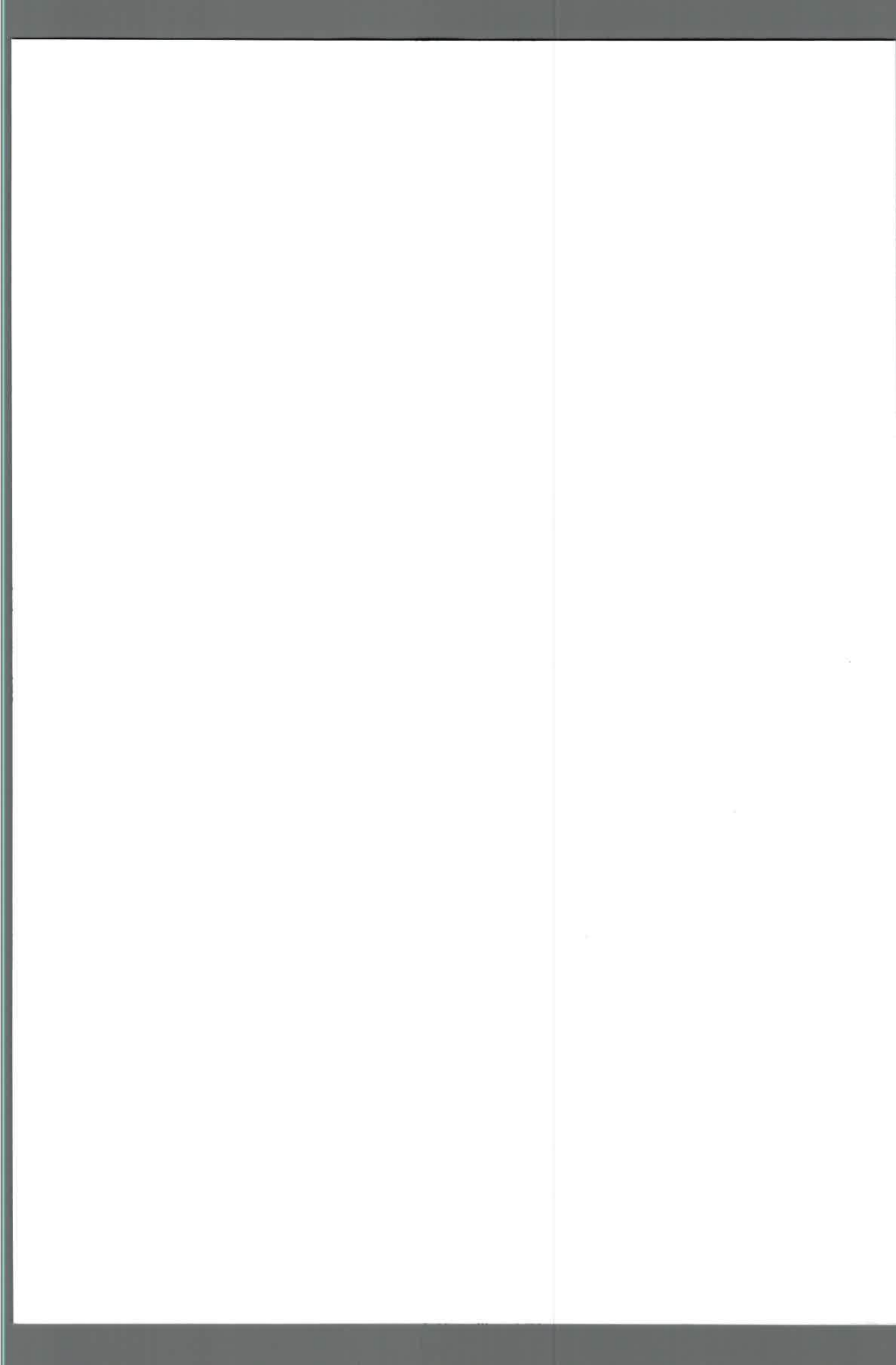
Células de *E. coli* BL21 pET, *E. coli* BL21 pET-des TAL y *E. coli* BL21 pET-des Em fueron cultivadas a 37°C, inducidas con 0,1mM de IPTG por 1 h. Luego las biomásas se cosecharon y se utilizaron para extraer los lípidos totales. A partir de los mismos se obtuvieron los FAME los cuales fueron separados e identificados por GC. Los valores representan la media  $\pm$  S.E.M. de tres experimentos independientes.

\*: Estadísticamente diferente al control (pET) con un valor de  $P < 0,05$ .

$\S$ : No detectado.

Las enzimas desaturasas capaces de sintetizar 16:1  $\Delta^9$  y 18:1  $\Delta^9$  se denominan en la literatura como  $\Delta^9$  desaturasas, ya que son capaces de colocar la doble ligadura entre el carbono 9 y 10 de la cadena acilo. En este trabajo de tesis encontramos que cuando el gen desaturasa putativo de *R. TAL 1000* fue expresado en *E. coli*, se observaron cantidades elevadas de 16:1  $\Delta^9$  respecto al control. La columna cromatográfica con la que contábamos nos impedía separar los isómeros del AG 18:1 ( $\Delta^9$  y  $\Delta^{11}$ ) para poder comprobar si el AG 18:1  $\Delta^9$  estaba presente o no en las cepas de *E. coli* transformadas.

Por este motivo realizamos una nueva experiencia para evaluar la composición de AG en las cepas de *E. coli* control y transformadas, utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a una columna con mayor resolución. Estos resultados se pueden observar en la Tabla 7.



**Tabla 7.** Composición de AG de las diferentes cepas de *E. coli* transformadas.

Cepa de <i>E. coli</i>	AG (%)					
	14:0	16:0	16:1 $\Delta^9$	18:0	18:1 $\Delta^{11}$	18:1 $\Delta^9$
Pet	10,3±0,8	57,0±0,6	5,50±0,8	14,8±1,5	12,3±1,0	ND <sup>§</sup>
pET-des TAL	6,20±0,7	51,3±1,7*	9,20±1,5*	5,30±0,6*	18,0±1,0*	10,0±0,9*
pET-des Em	3,50±0,5	44,5±1,6*	17,0±2,0*	4,00±0,7	26,0±2,5*	5,0±0,6*

Células de *E. coli* BL21 pET, *E. coli* BL21 pET-des TAL y *E. coli* BL21 pET-des Em fueron cultivadas a 37°C, inducidas con 0,1mM de IPTG por 12 h. Luego las biomásas se cosecharon y se utilizaron para extraer los lípidos totales. A partir de los mismos se obtuvieron los FAME los cuales fueron separados e identificados por GC. Los valores representan la media ± S.E.M. de tres experimentos independientes.

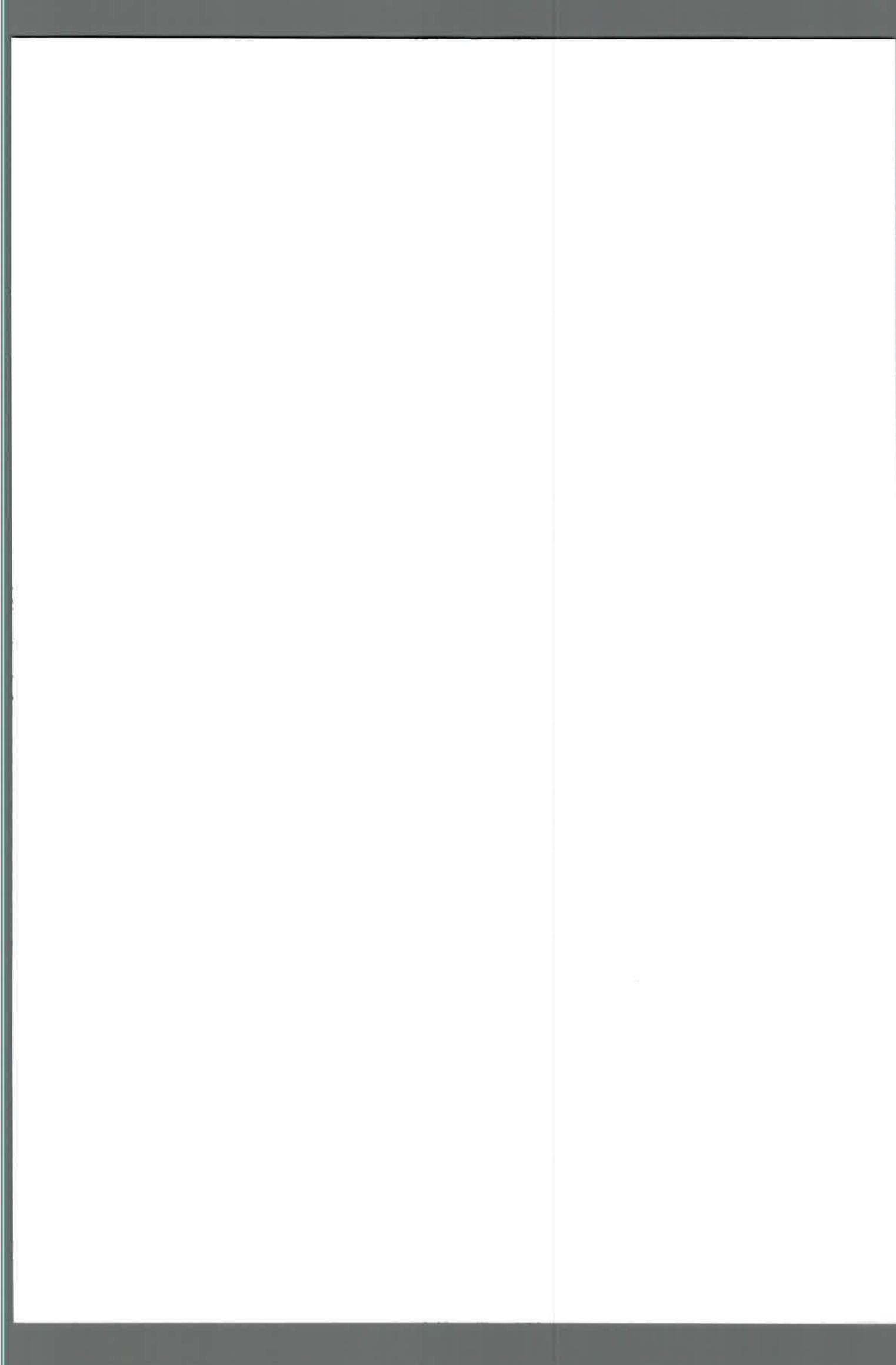
\*: Estadísticamente diferente al control (pET) con un valor de  $P < 0,05$ .

§: No detectado.

Cabe aclarar que en esta nueva experiencia los porcentajes de los diferentes AG presentes en las cepas, varían con respecto a los obtenidos anteriormente. Esto podría deberse a que las células fueron cosechadas en fase estacionaria para permitir a las mismas alcanzar un porcentaje importante de 18:0 (según datos bibliográficos), el cual es el sustrato que la enzima desaturasa puede convertir en 18:1 $\Delta^9$ . De esta experiencia se desprende que las células de *E. coli* transformadas con los genes desaturasa de *R. TAL* 1000 y *E. meliloti* 1021, a diferencia de la cepa control, presentan un nuevo pico cromatográfico, que se corresponde con el tiempo de retención para el AG 18:1  $\Delta^9$ . Este nuevo AG formado por *E. coli* BL21 pET-des TAL y *E. coli* BL21 pET-des Em, fortalece los resultados anteriores e indica fuertemente que la función de este gen es el de una  $\Delta^9$  desaturasa, capaz de desaturar tanto 16:0 como 18:0 hasta los AG monoinsaturados 16:1  $\Delta^9$  y 18:1  $\Delta^9$  respectivamente.

#### 4.V.5. Determinación de la actividad desaturasa en las cepas de *E. coli* transformadas

Para confirmar la actividad desaturasa de las enzimas recombinantes, AG 16:0 [ $1-^{14}\text{C}$ ] y 18:0 [ $1-^{14}\text{C}$ ] fueron utilizados como precursores. Cuando 16:0 fue agregado al medio (Tabla 8), las cepas transformadas incorporaron una importante cantidad de radioactividad en la fracción de AG monoinsaturados comparado con la cepa control, (17,5% para *E. coli* BL21 pET-des TAL y 19% *E. coli* BL21 para pET-des Em).



Cuando el sustrato empleado fue 18:0 radioactivo (Tabla 9), *E. coli* BL21 pET-des TAL incorporó un 12,7% de radioactividad en la fracción de AG monoinsaturados y *E. coli* BL21 pET-des Em un 12%.

A diferencia de las cepas *E. coli* BL21 pET-des TAL y *E. coli* BL21 pET-des Em, la cepa *E. coli* BL21 pET, no fue capaz de desaturar los AG radioactivos utilizados como sustratos, ya que la mayor cantidad de la radioactividad permaneció en la fracción de AG saturados. Este resultado es muy importante ya que permite el uso de la bacteria *E. coli* como buen hospedador para expresar este tipo de genes y proporciona confiabilidad a los resultados obtenidos.

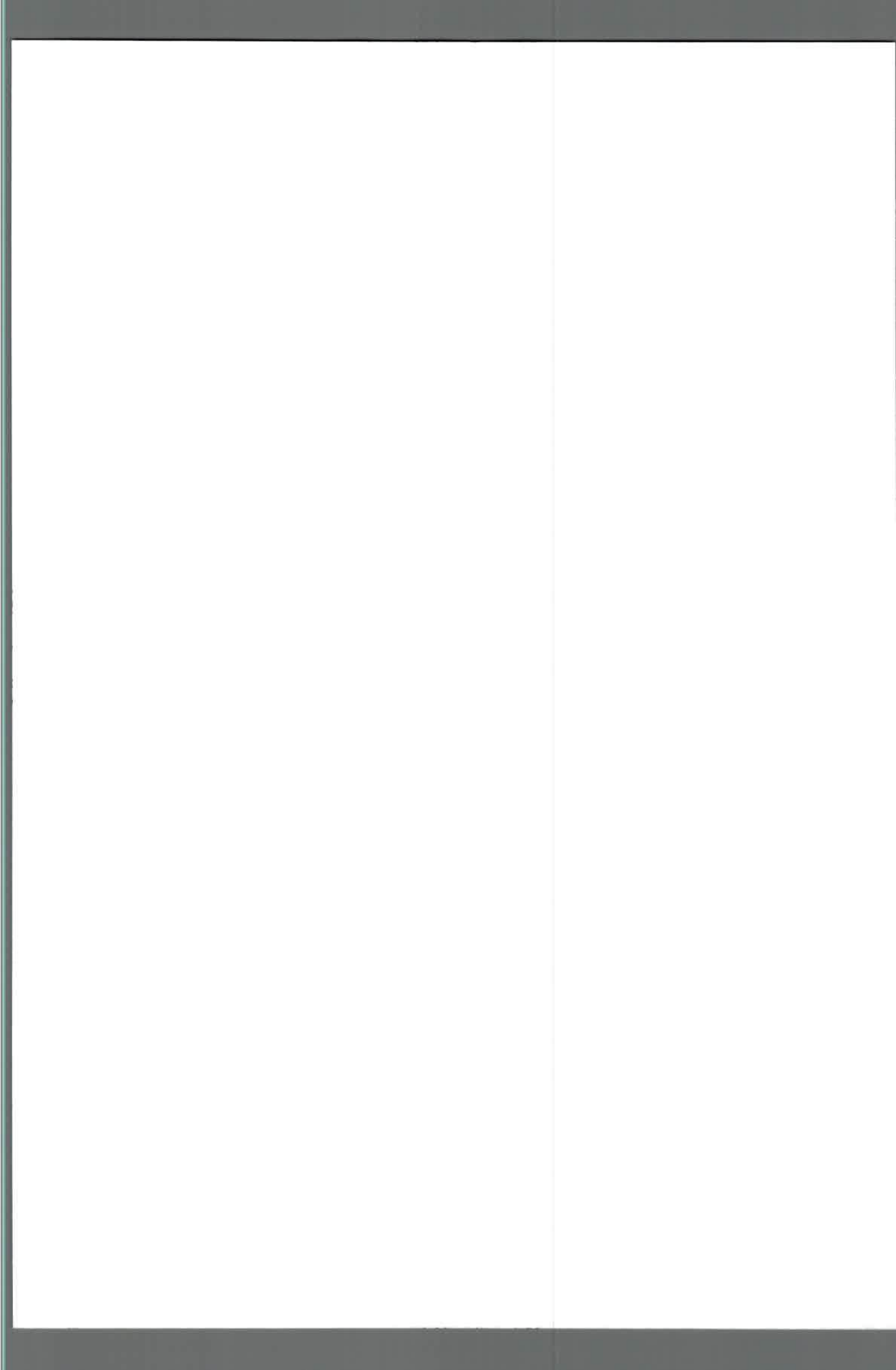
Estos resultados conjuntamente con los obtenidos para la cepa nativa de *R. TAL* 1000, confirman la presencia de un sistema de desaturación mediado por enzimas desaturasas en este tipo de microorganismo nodulante de maní. Además fortalece la asignación correcta de la función del gen desaturasa putativo de *E. meliloti* 1021 cuya secuencia se encuentra en la base de datos.

**Tabla 8.** Distribución de la marca radioactiva en los diferentes AG de las cepas de *E. coli* transformadas, utilizando el precursor radioactivo 16:0 [ $1-^{14}\text{C}$ ].

Acidos Grasos (%)	<i>E. coli</i> BL21-pET	<i>E. coli</i> BL21-pET des Em	<i>E. coli</i> BL21-pET des TAL
<b>Poliinsaturados</b>	3,5 ± 0,2	5,40 ± 0,1	4,60 ± 0,1
<b>Monoinsaturados</b>	1,3 ± 0,1	19,0 ± 0,4*	17,5 ± 0,5*
<b>Saturados</b>	95,2 ± 0,5	75,5 ± 0,5*	77,7 ± 0,7*

Células de *E. coli* BL21 pET, *E. coli* BL21 pET-des TAL y *E. coli* BL21 pET-des Em, fueron cultivadas a 37°C, inducidas con 0,1mM de IPTG por 1 h. Luego las biomásas se cosecharon y se utilizaron para extraer los lípidos totales. A partir de los mismos se obtuvieron los FAME, los que fueron separados de acuerdo al grado de insaturación usando placas de TLC impregnadas con 10% AgNO<sub>3</sub>. Los resultados están expresados como porcentaje de la radioactividad total incorporada en cada fracción de AG. Los valores representan la media ± S.E.M. de tres experimentos independientes.

\*: Estadísticamente diferente al control (pET) con un valor de  $P < 0,05$ .



**Tabla 9.** Distribución de la marca radioactiva en los diferentes AG de las cepas de *E. coli* transformadas, utilizando el precursor radioactivo 18:0 [ $1-^{14}\text{C}$ ].

Acidos Grasos (%)	<i>E. coli</i> BL21-pET	<i>E. coli</i> BL21-pET des Em	<i>E. coli</i> BL21-pET des TAL
Poliinsaturados	5,4 ± 0,60	5,20 ± 0,2	5,80 ± 0,4
Monoinsaturados	1,5 ± 0,05	12,0 ± 1,0*	12,7 ± 0,2*
Saturados	92,6 ± 0,4	82,8 ± 0,8*	81,3 ± 0,3*

Células de *E. coli* BL21 pET, *E. coli* BL21 pET-des TAL y *E. coli* BL21 pET-des Em, fueron cultivadas a 37°C, inducidas con 0,1mM de IPTG por 1 h. Luego las biomazas se cosecharon y se utilizaron para extraer los lípidos totales. A partir de los mismos se obtuvieron los FAME, los que fueron separados de acuerdo al grado de insaturación usando placas de TLC impregnadas con 10% AgNO<sub>3</sub>. Los resultados están expresados como porcentaje de la radioactividad total incorporada en cada fracción de AG. Los valores representan la media ± S.E.M. de tres experimentos independientes.

\*: Estadísticamente diferente al control (pET) con un valor de  $P < 0,05$ .

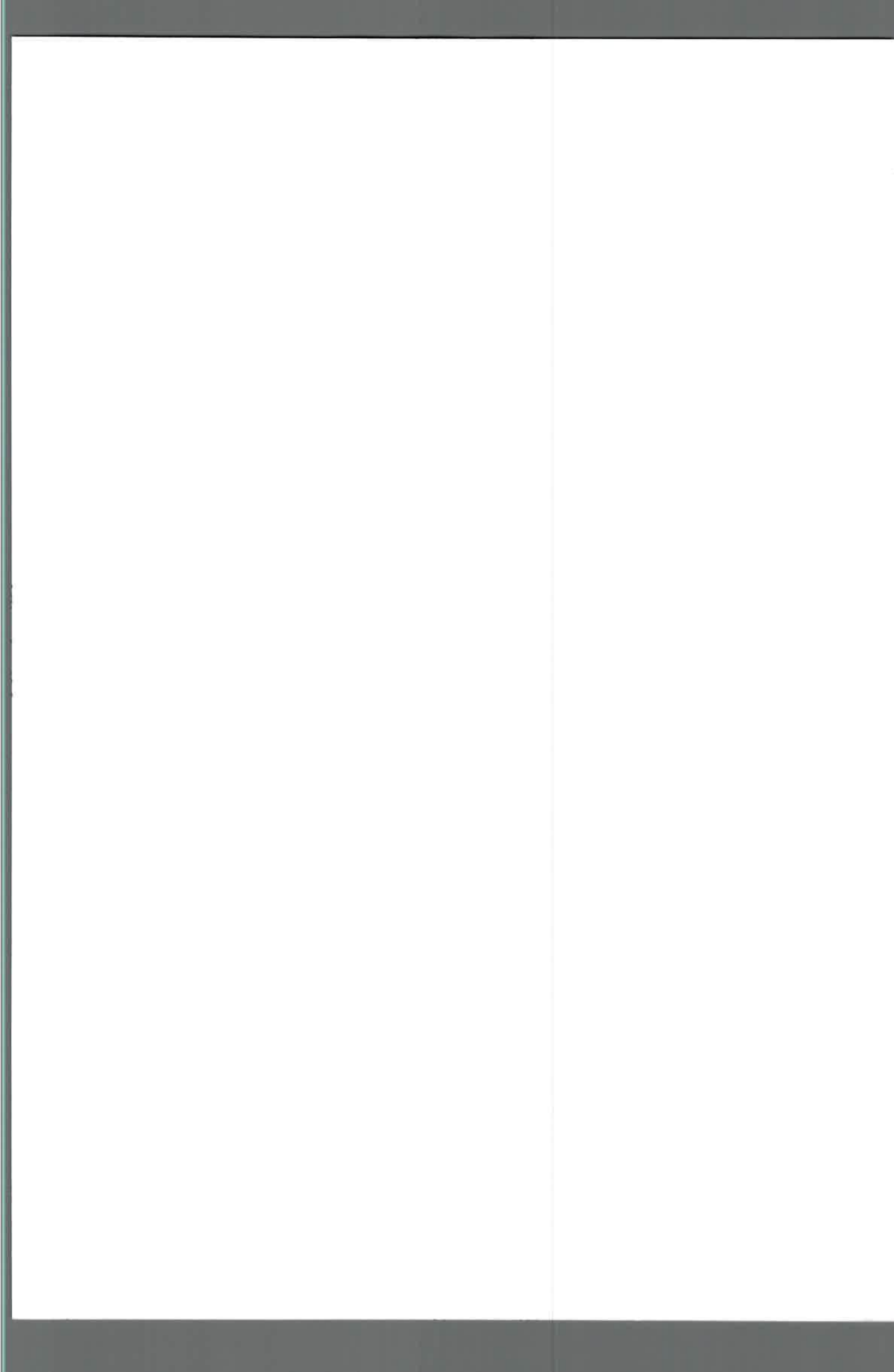
## CAPITULO VI

### Efecto del shock térmico sobre la composición de ácidos grasos, la actividad desaturasa y la expresión del gen desaturasa de *R. TAL 1000*

#### 4.VI.1 Efecto del shock térmico sobre la composición de AG de *R. TAL 1000*

Debido a que encontramos que la fluidez de la membrana de *R. TAL 1000* aumentó por el incremento de la temperatura (Fig. 15) y que este efecto se evidenció en tiempos muy cortos, enfocamos el estudio del efecto del shock térmico para conocer el tiempo que tardan las células en cambiar y adaptar su composición de AG. Encontramos que a las dos horas luego de producido el shock térmico, las células fueron capaces de modificar sus AG constitutivos (Tabla 10).

Al igual que en los experimentos de crecimiento a 37°C, se encontró un cambio a nivel del AG 18:1( $\Delta^{11} + \Delta^9$ ), el cual disminuyó desde 69% a 42%, mientras que el AG





18:0 aumentó desde 19% a 30.8%. Otras modificaciones fueron: el aumento del AG 19:0 ciclopropano desde 4.5% a 15.7% y del AG 20:3 desde 11.5% a 28.3%. Estas modificaciones afectaron principalmente el grado de insaturación lo que produjo un cambio en la relación U/S que decreció desde 2.6 a 0.82. Esto representa un 83% del cambio que ocurre cuando las células crecen a 37°C durante 24 h. Hallazgos similares fueron informados para *E. coli* expuesta a shock térmico por 1 h (Mejía et al, 1999).

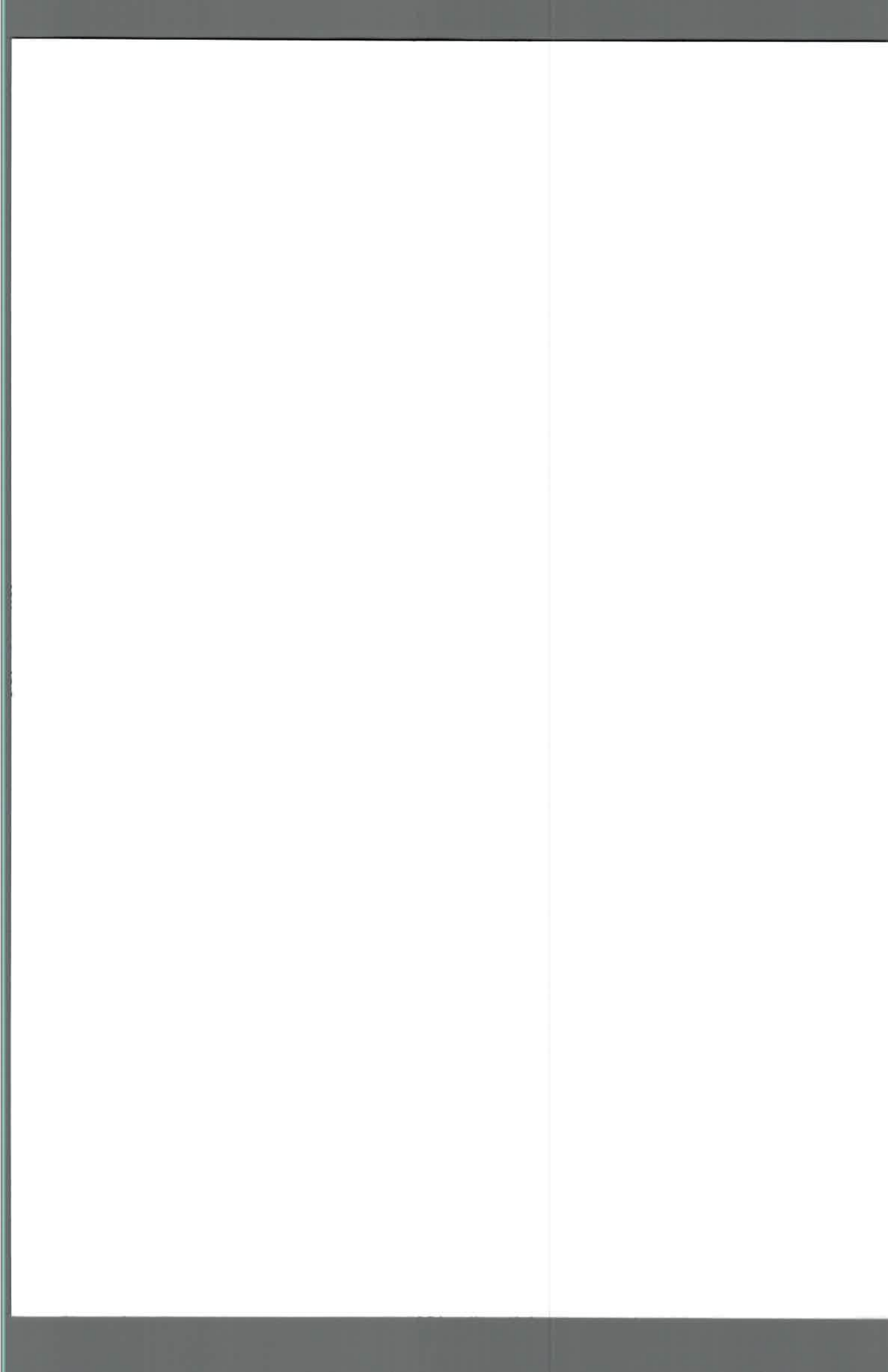
Los resultados expuestos arriba, nos indican que las células de *R. TAL 1000* tardan 2 h en cambiar la composición de AG luego de producido el shock térmico. Este sería uno de los posibles mecanismos adaptativos que utiliza esta bacteria para contrarrestar el cambio en la fluidez de la membrana.

**Tabla 10.** Efecto del shock térmico sobre la composición de AG de *R. TAL 1000*.

Tiempo de shock térmico (h)	AG (%)					U/S
	16:0	18:0	18:1( $\Delta^{11} + \Delta^9$ )	19:0 <sub>ciclo</sub>	20:3	
0	6.9±0.4	19.0±0.7	69.0±4.0	4.50±0.1	11.5±1.5	2.6
2	11.2±0.8	30.8±4.7*	42.1±7.5*	15.7±1.2*	28.3±0.3*	0.82

Células de *R. TAL 1000* fueron cultivadas 16 h a 28°C, luego los cultivos fueron transferidos 2 h a 37°C para aplicar el shock térmico. Las biomásas se cosecharon y se utilizaron para extraer los lípidos totales. A partir de los mismos se obtuvieron los FAME los cuales fueron separados e identificados por GC. Los valores representan la media ± S.E.M. de tres experimentos independientes.

\*: Estadísticamente diferente al control (0h) con un valor de  $P < 0,05$ .



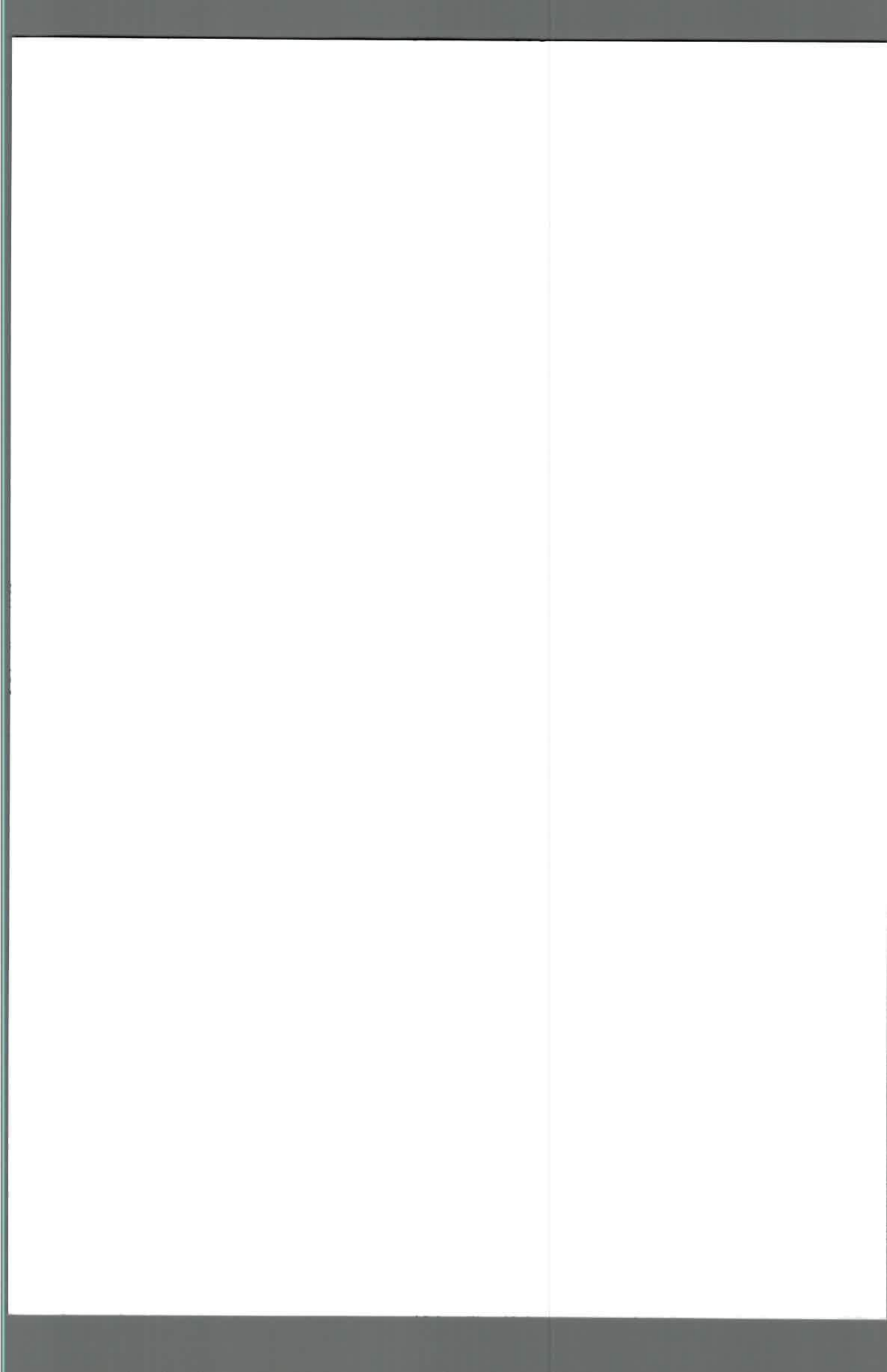
#### **4.VI.2. Efecto del shock térmico sobre la síntesis de AG en *R. TAL 1000*, utilizando diferentes sustratos radioactivos**

El grado de insaturación de los AG de diversos organismos, es un parámetro que es modificado en función de la temperatura de crecimiento. Las enzimas desaturasas pueden tener un papel importante en la regulación de este parámetro frente a cambios en la temperatura del medio, determinando así la capacidad del microorganismo de adaptarse.

En el caso de *R. TAL 1000* el efecto del shock térmico (37°C) durante 2 h provocó cambios en la desaturación de los AG radioactivos 16:0 y 18:0 (Tabla 11). Se evidenció una disminución del 32% de la recuperación de la radioactividad en la fracción AG monoinsaturados por efecto del shock térmico cuando el sustrato utilizado fue 18:0 [ $1-^{14}\text{C}$ ] y de un 15% cuando el sustrato utilizado fue 16:0 [ $1-^{14}\text{C}$ ]. Cuando acetato de sodio radioactivo fue utilizado como sustrato, encontramos también una disminución del 30.5% de la incorporación de la radioactividad en la fracción AG monoinsaturados, por efecto del shock térmico.

Fatiha et al (1998) observaron el mismo efecto del shock térmico sobre la biosíntesis de AG en *Brassica napus*, postulando una inhibición de la esteroil-ACP desaturasa.

Estos resultados sugieren que la vía aeróbica de síntesis de AG insaturados mediada por desaturasas en *R. TAL 1000*, estaría siendo regulada por efecto del choque térmico, coincidente con los resultados obtenidos en los ensayos de crecimiento a 37°C. Esta regulación se produciría aproximadamente a las dos horas de provocado el cambio de la temperatura y de esta forma se reduciría la síntesis de AG monoinsaturados como mecanismo compensatorio del aumento en la fluidez de la membrana de *R. TAL 1000*.



**Tabla 11.** Efecto del shock térmico sobre la síntesis de AG en *R. TAL 1000*, utilizando diferentes sustratos radioactivos.

Fracción de AG (%)	Poliinsaturados		Monoinsaturados		Saturados	
	0	2	0	2	0	2
Tiempo de shock (h)						
Sustrato Radioactivo						
Acetato de sodio	16.5±1.05	17.6±0.90	73.0±1.10	50.7±0.30*	9.50±0.5	29.0±2.0*
16:0	11.2±0.65	7.40±0.33	23.6±0.90	20.0±0.25*	65.0±0.8	72.5±0.5*
18:0	8.20±0.30	9.40±0.70	18.5±0.50	12.6±0.60*	73.0±0.1	78.0±1.0*

Acetato de sodio [ $^{14}\text{C}$ ] y los AG 16:0 [ $^{14}\text{C}$ ] y 18:0 [ $^{14}\text{C}$ ] fueron agregados al medio de cultivo al momento de la inoculación, luego de 16 h de crecimiento a 28°C, los cultivos fueron transferidos 2 h a 37°C para aplicar el shock térmico.

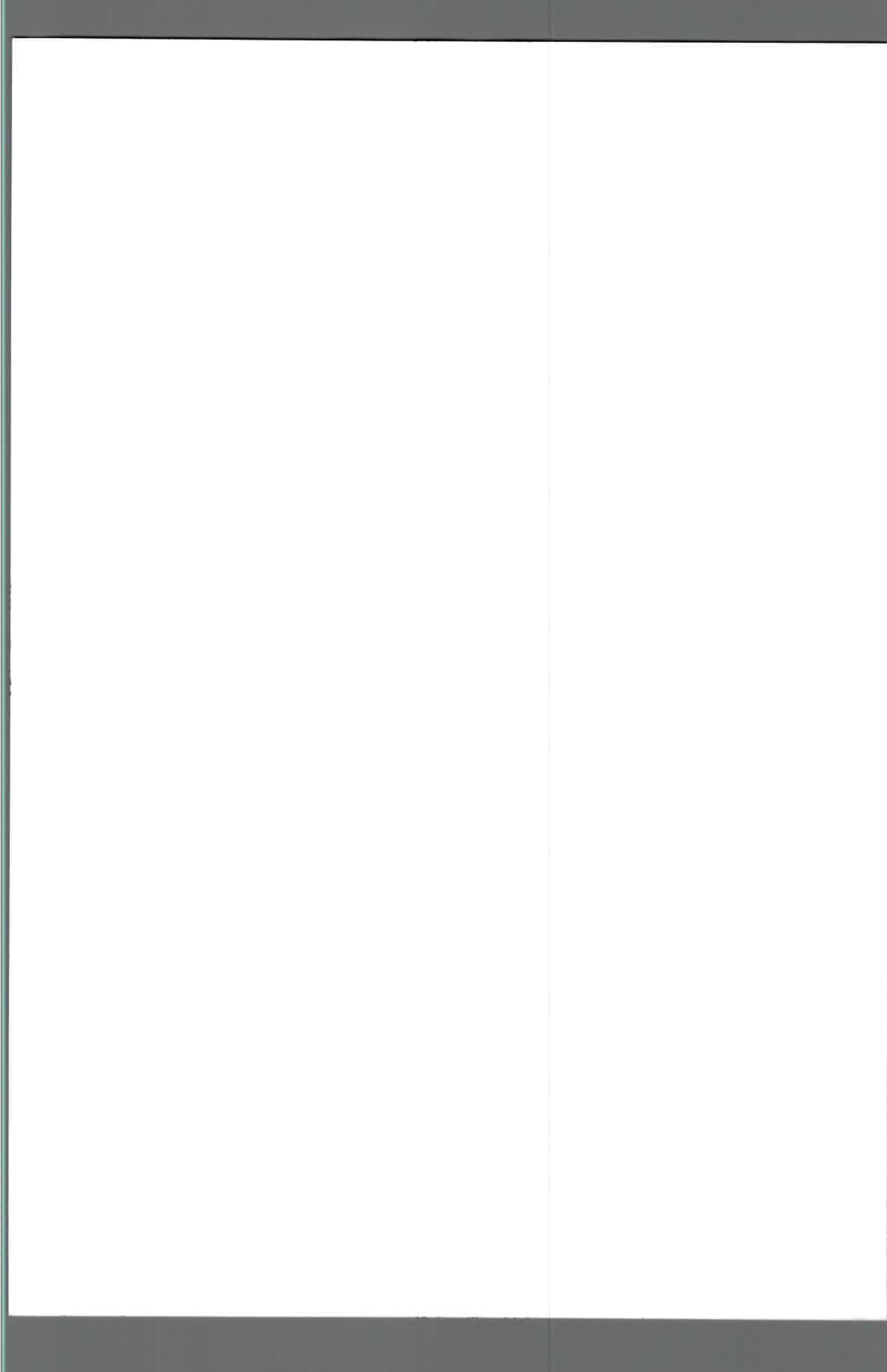
Los FAME fueron separados de acuerdo al grado de insaturación usando placas de TLC impregnadas con 10%  $\text{AgNO}_3$ . Los resultados están expresados como porcentaje de la radioactividad total incorporada en cada fracción de AG. Los valores representan la media  $\pm$  S.E.M. de tres experimentos independientes.

\*: Estadísticamente diferente al control (0h) con un valor de  $P < 0,05$ .

#### 4.VI.3. Efecto del shock térmico sobre la expresión de la enzima desaturasa de AG de *R. TAL 1000*

Las enzimas desaturasas de AG están sometidas a diferentes tipos de regulación. La temperatura es uno de los principales factores ambientales que regulan la actividad de estas enzimas, contribuyendo a mantener la fluidez de las membranas biológicas (Los y Murata, 1998; Hernández et al, 2011).

En *R. TAL 1000*, se evaluó el efecto del shock térmico sobre la expresión de la enzima desaturasa utilizando RT-PCR y western blot, empleando el anticuerpo contra la  $\Delta^9$  desaturasa de rata (Fig.22). El shock térmico aplicado durante 2 h (Fig. 22(1)) no provocó modificaciones ni en la expresión del gen desaturasa de *R. TAL 1000*, ni en la cantidad de la proteína desaturasa. Sin embargo, un cambio en la intensidad de la banda tanto de RT-PCR como de western, fue observado a las 24 h de crecimiento a 37°C (Fig.



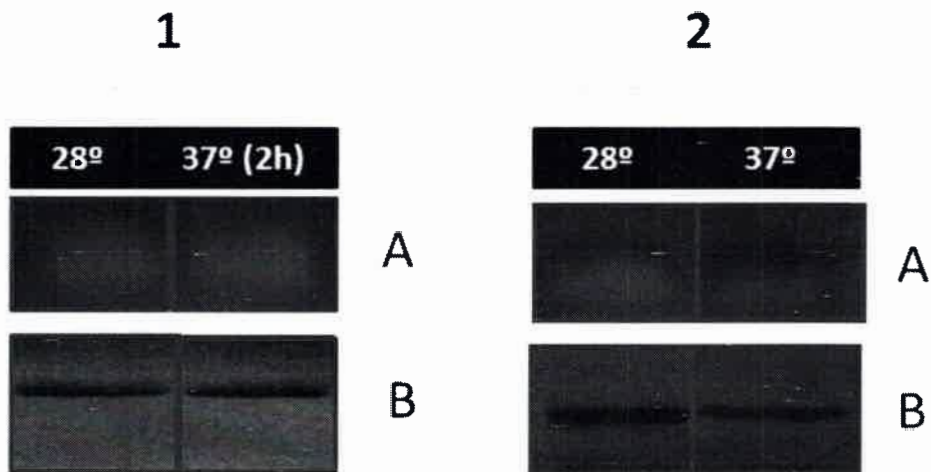
22(2)). Ello indica que se necesitan más de 2h a 37°C para evidenciar un cambio en la expresión y la cantidad de la enzima desaturasa de *R. TAL 1000*.

Se conoce que bajas temperaturas provocan la inducción de la expresión de genes desaturasa (Aguilar et al, 1999), mientras que elevadas temperaturas tienen el efecto contrario (Hernández et al, 2011). Aunque el mecanismo molecular por el cual la temperatura regula la desaturación de los AG no es muy conocido, existen hipótesis diferentes: una de ellas es que la temperatura podría regular las desaturasas a nivel de la expresión de los genes y como consecuencia la cantidad de dicha proteína. Este efecto se ha observado para diferentes desaturasas de plantas (Madi et al, 2003; Vega et al, 2004; Kargiotidou et al, 2008; Teixeira et al, 2009; Teixeira et al., 2010). Por otro lado, otra manera de regular la actividad desaturasa por la temperatura es usando mecanismos post-transcripcionales, como ha sido descrito para FAD3 en las raíces de trigo (Horiguchi et al, 2000), para FAD8 en hojas de *Arabidopsis* (Matsuda et al, 2005), y para FAD2-1 en semillas de soja (Tang et al, 2005). Finalmente, la temperatura podría regular la actividad desaturasa mediante la variación de la disponibilidad de sustrato.

En el caso de *R. TAL 1000*, la regulación de la actividad de la enzima desaturasa a las dos horas de shock térmico no implicaría cambios en la expresión génica. Este tipo de regulación está descrito como un mecanismo a largo plazo que sería lo que ocurre en *R. TAL 1000* a las 24 h de crecimiento a 37°C. Debido a que a las dos horas de shock térmico la actividad de la enzima desaturasa medida in vivo (Tabla 11), fue modificada, es probable que otro mecanismo de regulación más rápido, por ejemplo modificaciones post-transduccionales o disponibilidad de sustrato, pueda estar presente en *R. TAL 1000*.







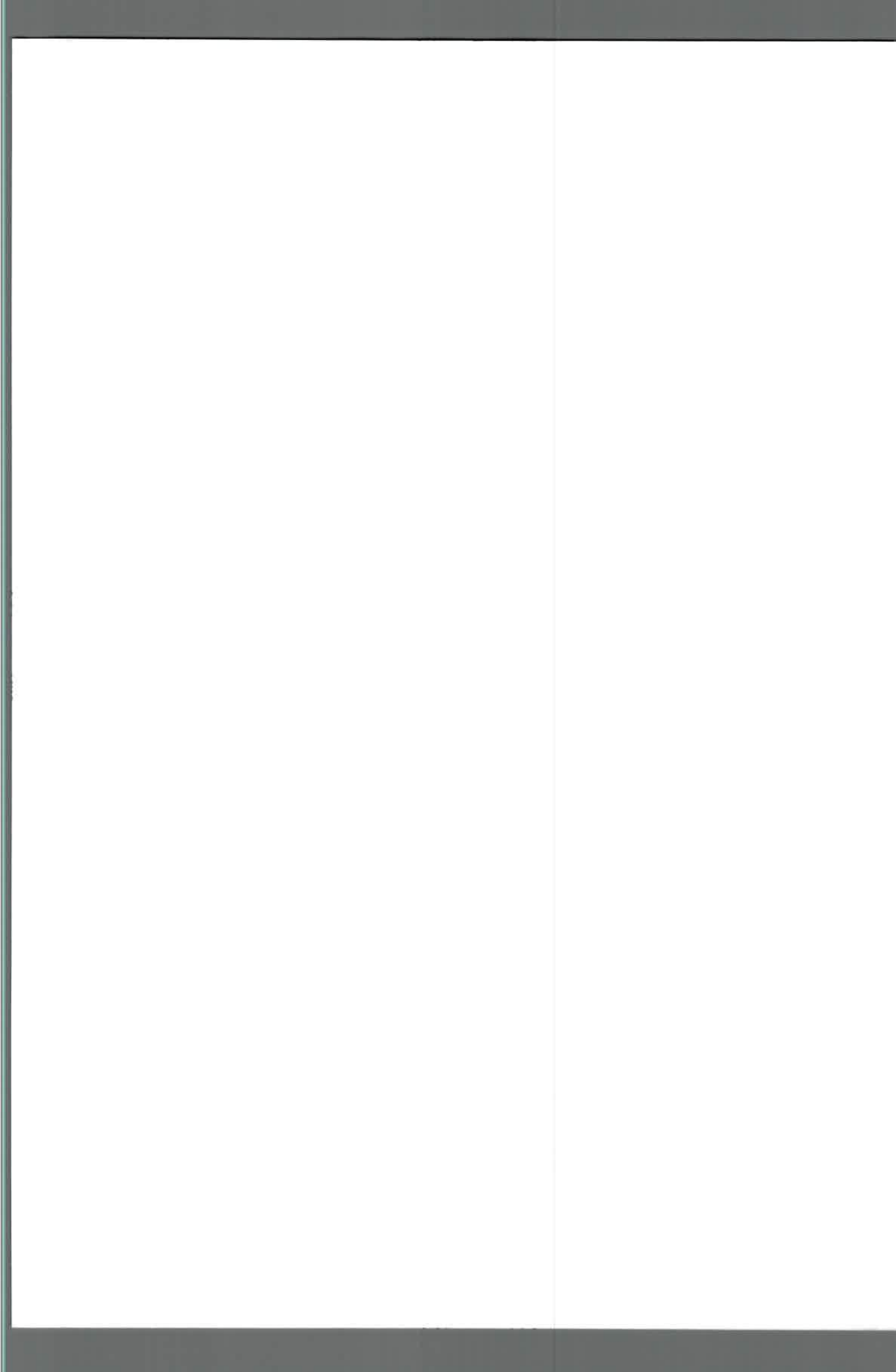
**Figura 22.** Efecto del shock térmico (1) y la temperatura de crecimiento (2) sobre la expresión de la enzima desaturasa de *R. TAL 1000* analizado por medio de RT-PCR (A) o por western blot (B).

Células de *R. TAL 1000* fueron cultivadas 24 h a 28°C y 37°C (para evaluar el efecto de la temperatura de crecimiento). Para los estudios de shock térmico las células crecieron 16 h a 28°C, luego los cultivos fueron transferidos 2 h a 37°C para aplicar el shock térmico, las biomásas se cosecharon y se obtuvo el ARN y la fracción de membrana interna. Las proteínas contenidas en dichas fracciones fueron resueltas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS 10%, transferidas a membrana de nitrocelulosa y utilizadas para análisis por western blot empleando el anticuerpo contra la  $\Delta^9$  desaturasa de rata.

El ARN total fue extraído mediante el uso de kit Nucleospin (MN). Luego el mismo fue cuantificado espectrofotométricamente y 2.5  $\mu\text{g}$  utilizados como molde para la reacción de RT-PCR (promega) empleando oligonucleótidos específicos para el gen desaturasa.



## **5-Conclusiones**



**En este trabajo de tesis doctoral señalamos que:**

✚ El crecimiento de *R. TAL 1000*, es afectado negativamente por el estrés salino, mientras que el crecimiento de *L115* no es afectado por ninguna de las condiciones probadas.

✚ La cepa *L115* tiene un elevado porcentaje de similitud (por comparación de la secuencia del gen *rDNA 16S*), con cepas del género *Achromobacter*.

✚ Los principales AG componentes de *R. TAL 1000* y *L115* son: cis-vaccénico+oleico, esteárico, palmitato, eicosatrienoico y 19:0 ciclopropano.

✚ La composición de AG de ambas cepas fue modificada principalmente por efecto de la temperatura de crecimiento, mientras que la hipersalinidad no produjo modificaciones significativas.

✚ Ambas cepas incorporaron el precursor radioactivo, [ $1-^{14}\text{C}$ ] acetato de sodio en sus lípidos.

✚ Los principales PL componentes de *R. TAL 1000* y *L115* fueron: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, dimetilfosfatidiletanolamina, lisofosfatidiletanolamina y cardiolipina.

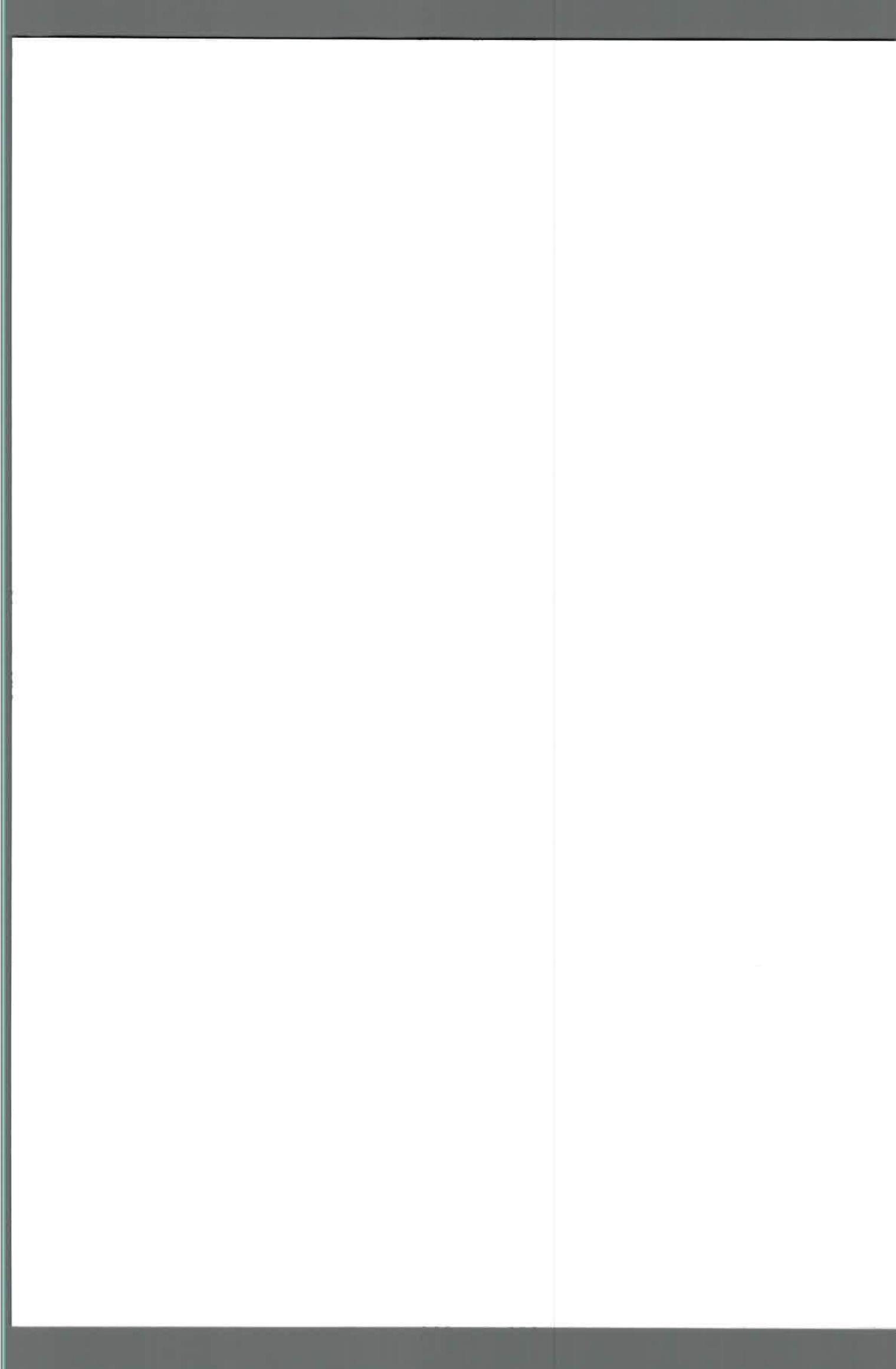
✚ La variación de temperatura y de la concentración salina, indujeron modificaciones en la biosíntesis de AG y de PL, sugiriendo que estos cambios pueden ser respuestas metabólicas al estrés.

✚ La respuesta a este tipo de condiciones ambientales, para las dos cepas es una modificación del grado de insaturación de los AG componentes de los PL, respuesta universal en el mundo viviente para mantener la fluidez de la membrana y la viabilidad celular.

✚ El incremento de la temperatura en células de *R. TAL 1000* aumentó la fluidez de la bicapa lipídica.

✚ El cambio en el grado de insaturación de los AG sería un mecanismo tardío para contrarrestar el cambio en la fluidez de la membrana.

✚ *R. TAL 1000* y *L115* tienen en su genoma un gen desaturasa putativo, el cual posee elevado porcentaje de identidad con el homólogo de *E. meliloti* 1021 y con desaturasas de otros microorganismos.



✚ La desaturación de los AG 16:0 [ $1-^{14}\text{C}$ ] y 18:0 [ $1-^{14}\text{C}$ ], agregados al medio de cultivo, hasta un AG monoinsaturado, dan indicio de una actividad desaturasa de AG en ambas cepas nodulantes de maní.

✚ En ambas cepas rizobiales, el crecimiento a 37°C provocó cambios en la desaturación de los AG 16:0 [ $1-^{14}\text{C}$ ] y 18:0 [ $1-^{14}\text{C}$ ], por lo que se sugiere que el mecanismo aeróbico de síntesis de AG monoinsaturados sería regulado por efecto de la temperatura de crecimiento.

✚ Los estudios moleculares realizados en la cepa *E. coli* indican que los productos de los genes desaturasa putativos de *R. TAL 1000* y de *E. meliloti 1021* corresponden a una  $\Delta^9$  desaturasa capaz de utilizar 16:0 y 18:0 como sustratos.

✚ En *R. TAL 1000*, el shock térmico (37°) por 2 h provocó al igual que el crecimiento a 37°C:

a) una modificación de la composición de AG, afectando principalmente el grado de insaturación de los mismos.

b) una disminución en la síntesis de AG monoinsaturados cuando acetato de sodio, 16:0 y 18:0 radioactivos fueron utilizado como sustratos.

✚ El shock térmico (37°) por 2 h no modificó la expresión de la proteína desaturasa de AG de *R. TAL1000*, sin embargo tanto los niveles del transcritpo primario como la cantidad de la enzima desaturasa fueron modificados por el crecimiento durante 24h a 37°C. Probablemente a las 2 h de shock térmico otros mecanismos de regulación actúen a nivel de la enzima desaturasa para permitir una disminución de su actividad a elevadas temperaturas.





## **6-Consideraciones finales y perspectivas**



Una de las funciones generales de membrana más interesantes y quizás menos conocida es la de censar cambios del medio externo. *Bacillus subtilis*, puede censar los cambios en la temperatura del medio y regular la fluidez de la membrana citoplasmática por medio de un sistema de dos componentes (DesK/DesR). Este mecanismo que involucra a un sensor de membrana y a un regulador de respuesta, mantiene la fluidez de la membrana por medio de la regulación de la expresión del gen desaturasa que posee esta bacteria.

El genoma de *E. meliloti* 1021 se encuentra completamente secuenciado y disponible en las bases de datos, lo que puede utilizarse como una herramienta para realizar estudios moleculares. Una búsqueda detallada, nos permitió encontrar un sistema de dos componentes (FeuP/FeuQ), el cual está implicado en la respuesta de *E. meliloti* 1021 al estrés hídrico. La escasez de agua se perfila como uno de los problemas más severos que deberá afrontar la humanidad este siglo. *E. meliloti* 1021 es tolerante a la desecación, genes con funciones regulatorias y un gen reparador del DNA, estarían involucrados en dicha tolerancia. Sin embargo aún falta investigar la regulación de genes involucrados en el metabolismo lipídico, por ejemplo el gen desaturasa, para tolerar la desecación.

Este sistema presente en *E. meliloti* 1021 es atractivo para su estudio y el modelo puede ser utilizado para aportar datos más específicos referidos al metabolismo lipídico.

El estudio de los mecanismos que regulan la expresión de diferentes genes bajo condiciones ambientales adversas es importante debido a que su inactivación afectaría la capacidad de supervivencia del microorganismo y como consecuencia causaría la incapacidad para establecer una adecuada simbiosis fijadora de nitrógeno.

Esta tesis doctoral brinda entre otras cosas, las primeras evidencias bioquímicas y moleculares de la presencia y del papel en la tolerancia a hipertermia, de una enzima desaturasa de ácidos grasos en dos cepas simbiotes de leguminosas (*Rhizobium* TAL 1000 y *Ensifer meliloti* 1021). Por lo tanto sienta una importantísima base para continuar profundizando con estudios referidos a los mecanismos involucrados en la adaptación bacteriana a los diferentes estreses ambientales.

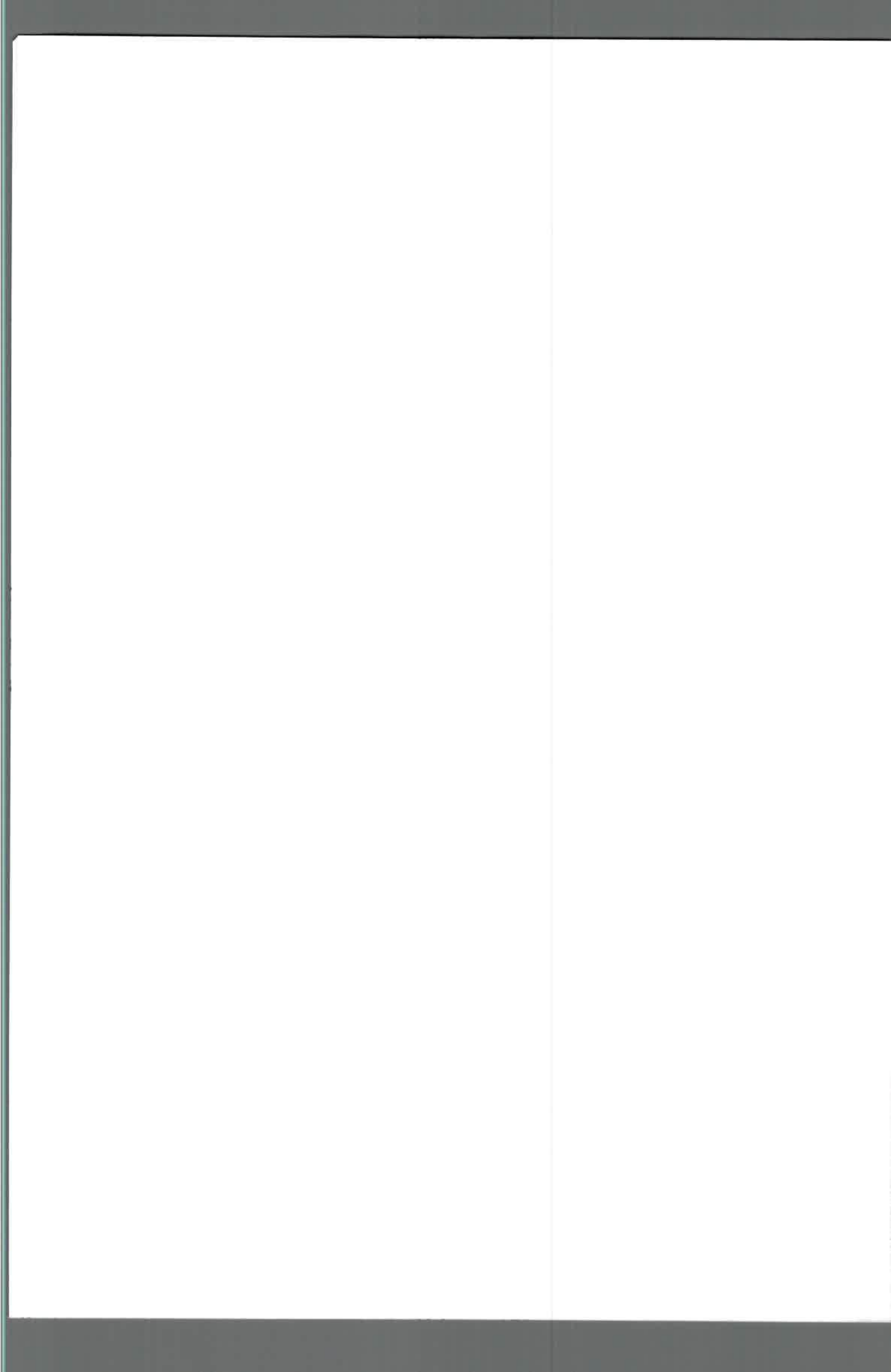




## **7-Bibliografía**



- **Abdelmounmen H, Filali-Maltouf A, Neyra M** (1999) Effect of high salts concentrations on the growth of rhizobia and responses to added osmotica. *J Appl Microbiol* 86:889-898.
- **Aguilar P y de Mendoza D** (2006) Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans. *Mol Microbiol* 62:1507–1514.
- **Aguilar P, Cronan J, de Mendoza D** (1998) A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J Bacteriol* 180:2194-2200.
- **Aguilar P, Hernandez-Arriaga A, Cybulski L, Erazo A, De Mendoza D** (2001) Molecular basis of thermosensing: a two component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *EMBO J* 20:1681-1691.
- **Albelo S y Domenech C** (1997) Carbons from choline present in the phospholipids of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 156:271–274.
- **Altabe S, Aguilar P, Caballero G, de Mendoza D** (2003) The *Bacillus subtilis* Acyl Lipid Desaturase Is a delta 5 Desaturase. *J Bacteriol* 185:3228–3231.
- **Aricha B, Fishov I, Cohen Z, Sikron N, Pesakhov S, Khozin-Goldberg I, Ron Dagan R, Porat N** (2004) Differences in membrane fluidity and fatty acid composition between phenotypic variants of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 186:4638–4644.
- **Bakholdina S, Sanina N, Krasikova I, Popova O, Solov'eva T** (2004) The impact of abiotic factors (temperatura and glucose) on physicochemical properties of lipids from *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochimie* 86:875-881.
- **Bernard T, Pocard JA, Perroud B, Le Rudulier D** (1986) Variations in the response of salt-stressed *Rhizobium* strains to betaines. *Arch Microbiol* 143:359–364.
- **Bhardwaj K** (1975) Survival and symbiotic characteristics of *Rhizobium* in saline-alkali soils. *Plant Soil* 43:377-385.
- **Bligh E, Dyer W** (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J. Biochem Physiol* 37:911-918.
- **Boch J, Kempf B, Bremer E** (1994) Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J Bacteriol* 176:5364–5371.
- **Boncompagni E, Osteras M, Poggi M, Le Rudulier D** (1999) Occurrence of choline and glycine betaine uptake and metabolism in the family *Rhizobiaceae* and their roles in osmoprotection. *Appl Environ Microbiol* 65:2072-2077.





- **Boumahdi M, Mary P, Hornez J** (1999) Influence of growth phases and desiccation on the degrees of unsaturation of fatty acids and the survival rates of rhizobia. *J Appl Microbiol* 87:611-619.
- **Boumahdi M, Mary P, Hornez J** (2001) Changes in fatty acid composition and degree of unsaturation of (brady)rhizobia as a response to phases of growth, reduced water activities and mild desiccation. *Antonie van Leeuwenhoek* 79:73-79.
- **Bremer E y Krämer R** (2000) Coping with Osmotic Challenges: Osmoregulation through Accumulation and Release of Compatible Solutes in Bacteria. En: *Bacterial Stress Response*. Storz G y Hengge-Aronis R (eds).
- **Broughton W, Zhang F, Perret X, Staehelin P** (2003) Signal exchanged between legumes and *Rhizobium*: agricultural uses and perspectives. *Plant Soil* 252:129-137.
- **Campbell J y Cronan J Jr** (2001) Bacteria fatty acid biosynthesis: target for antibacterial drugs discovery. *Annu Rev Microbiol* 55:305-322.
- **Chang W, Franck WL, Cytryn E, Jeong S, Joshi T, Emerich DW, Sadowsky MJ, Xu D, Stacey G** (2007) An oligonucleotide microarray resource for transcriptional profiling of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 20:1298-1307.
- **Chang YY y Kennedy EP** (1967) Biosynthesis of phosphatidyl glycerophosphate in *Escherichia coli*. *J Lipid Res* 8:447-55.
- **Chihib N, Tierny Y, Mary P, Hornez J** (2005) Adaptational changes in cellular fatty acid branching and unsaturation of *Aeromonas* species as a response to growth temperature and salinity. *Food Microbiol* 102:113-119.
- **Correa O, Rivas E, Barneix A** (1999) Cellular envelopes and tolerance to acid pH in *Mesorhizobium loti*. *Curr Microbiol* 38:329-334.
- **Cossins A** (1994) *Temperature Adaptation of Biological Membranes*. London: Portland Press.
- **Cronan J Jr** (1975) Thermal regulation of the membrane lipid composition of *Escherichia coli*. Evidence for the direct control of fatty acid synthesis. *Biol Chem* 250:7074-7077.
- **Cronan J Jr y Rock CO** (1996) Biosynthesis of Membrane Lipids. En: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt F, Curtis R III, Ingraham J, Link E, Low K, Magasanik W, Reznikoff W, Riley M, Schaechter M, Umberger H (eds).



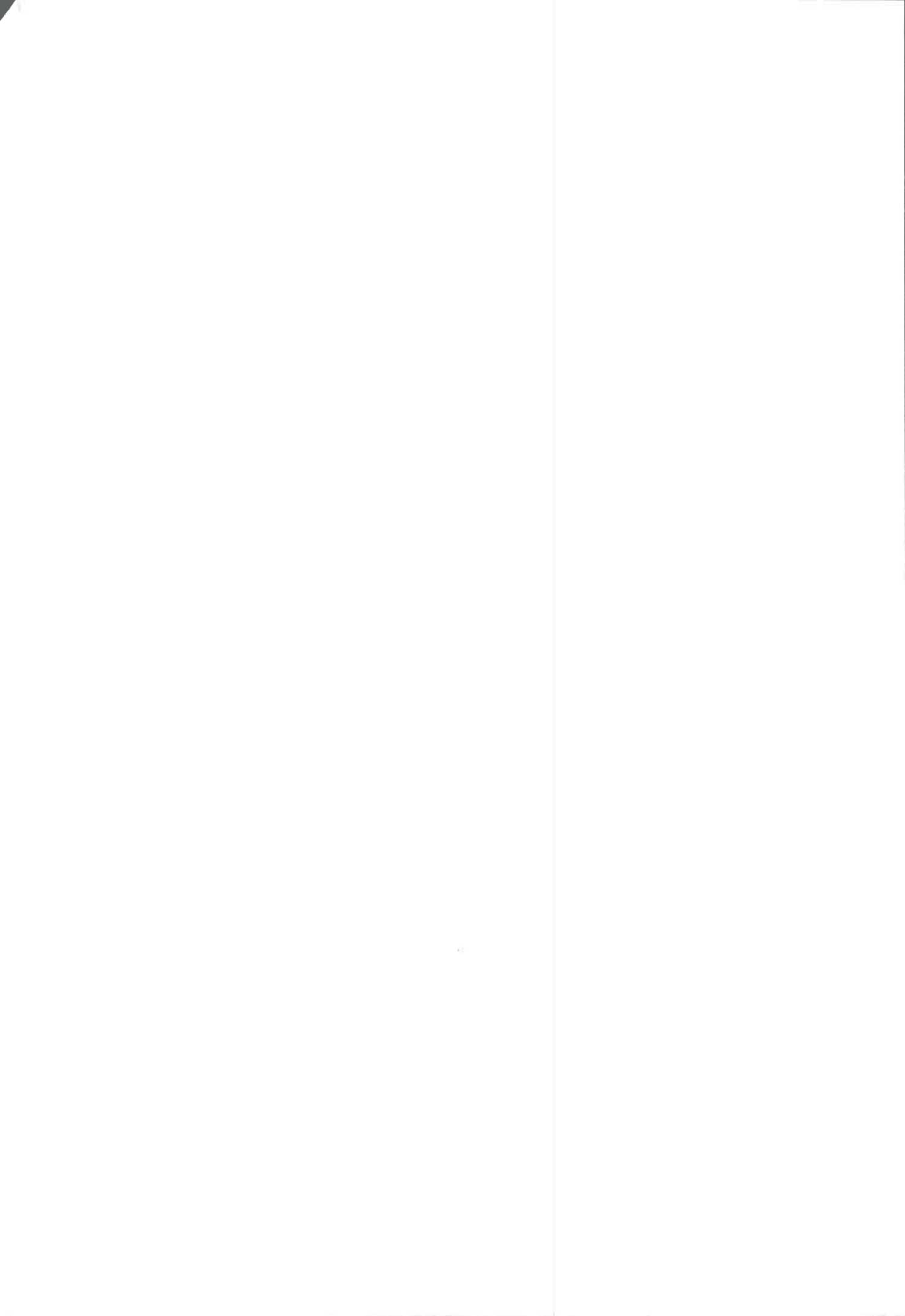
- **Csonka L y Epstein W** (1996) Osmoregulation. En: *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Curtiss R III, Ingraham J, Lin E, Low K, Magasanik B, Reznikoff W, Riley M, Schaechter M, Umberger H (eds).
- **da Silva R** (1996) Técnica de Microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão, 1-7. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
- **Dandie C, Burton D, Zebarth B, Trevors J, Goyer C** (2007) Analysis of denitrification genes and comparison of nosZ, cnorB and 16S rDNA from culturable denitrifying bacteria in potato cropping systems. Systematic and Applied Microbiol 30:128–138.
- **Davanloo P, Rosenberg A, Dunn J, Studier F** (1984) Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA 81: 2035-2039.
- **de Rudder K, Thomas-Oates J, Geiger O** (1997) *Rhizobium meliloti* mutants deficient in phospholipid N-methyltransferase still contain phosphatidylcholine. J Bacteriol 179:6921-6928.
- **Denich T, Beaudette L, Lee H, Trevors J** (2003) Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. J Microbiological Methods 52: 149– 182.
- **Dominguez-Ferreras A, Perez-Arnedo R, Becker A, Olivares J, Soto MJ, Sanjuan J** (2006) Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymB for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. J Bacteriol 188:7617-7625.
- **Dowhan W** (1997) Molecular basis for membrane phospholipids diversity: Why are there so many lipids? Annu Rev Biochem 66:199-232.
- **Downton W** (1984) Salt tolerance of food crops: perspectives for improvements. Crit Rev Plant Sci 1:183-201.
- **Doyle JJ y Doyle JL** (1997) Phylogenetic perspectives on the origins and evolution of nodulation in the legumes and allies. En: Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture. Legocki A y Puhler H (eds).
- **Drouin P, Prevost D, Antoun H** (2000) Physiological adaptation to low temperatures of strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae associated with *Lathyrus* spp. FEMS Microbiol Ecol 32:111-120.



- **Eisenberg A y Corner T** (1978) Effects of growth temperature on protoplast membrane properties in *Bacillus megaterium*. Can J Microbiol 24:386-396.
- **Elsheikh E y Wood M** (1990) Rhizobia and Bradyrhizobia under salt stress: possible role of trehalose in osmoregulation. Lett Appl Microbiol 10:127-129.
- **Fatiha A, Ghouziel B, Demandre C, Mazliak P** (1998) Modification of the biosynthesis of rape lipid molecular species by heat shock. Phytochemistry 47:1195-1200.
- **Fox B, Shanklin J, Somerville C, Munck E** (1993) Stearoyl Acid Carrier Protein  $\Delta 9$  Desaturase from *Ricinus communis* is a Diiron-oxo Protein. Proc Natl Acad Sci 90:2486-2490.
- **Frings J** (1976) The *Rhizobium*-pea symbiosis as affected by high temperatures. Meded Landbouwhogeschool Wageningen 76:1-76.
- **Frydman J** (2001) Folding of newly translated proteins in vivo: The role of molecular chaperones. Annu Rev Biochem 70:603-647.
- **Geiger O, Röhrs V, Weissenmayer B, Finan T, Thomas-Oates J** (1999) the regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. Mol Microbiol 32:63-73.
- **Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND** (2005) Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. Plant Physiol 137:1228-1235.
- **Ghanekar A y Nair P** (1973) Evidence for the Existence of an Aerobic Pathway for Synthesis of Monounsaturated Fatty Acids by *Alcaligenes faecalis*. J Bacteriol 114:618-624.
- **Goldfine H** (1982) En: Currents topics in membranes and transport. Razin S y Rotten S (eds).
- **Graham PH** (1992) Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil-conditions. Can J Microbiol 38:475-484.
- **Graham PH y Vance CP** (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. Plant Physiol 131: 872-877.

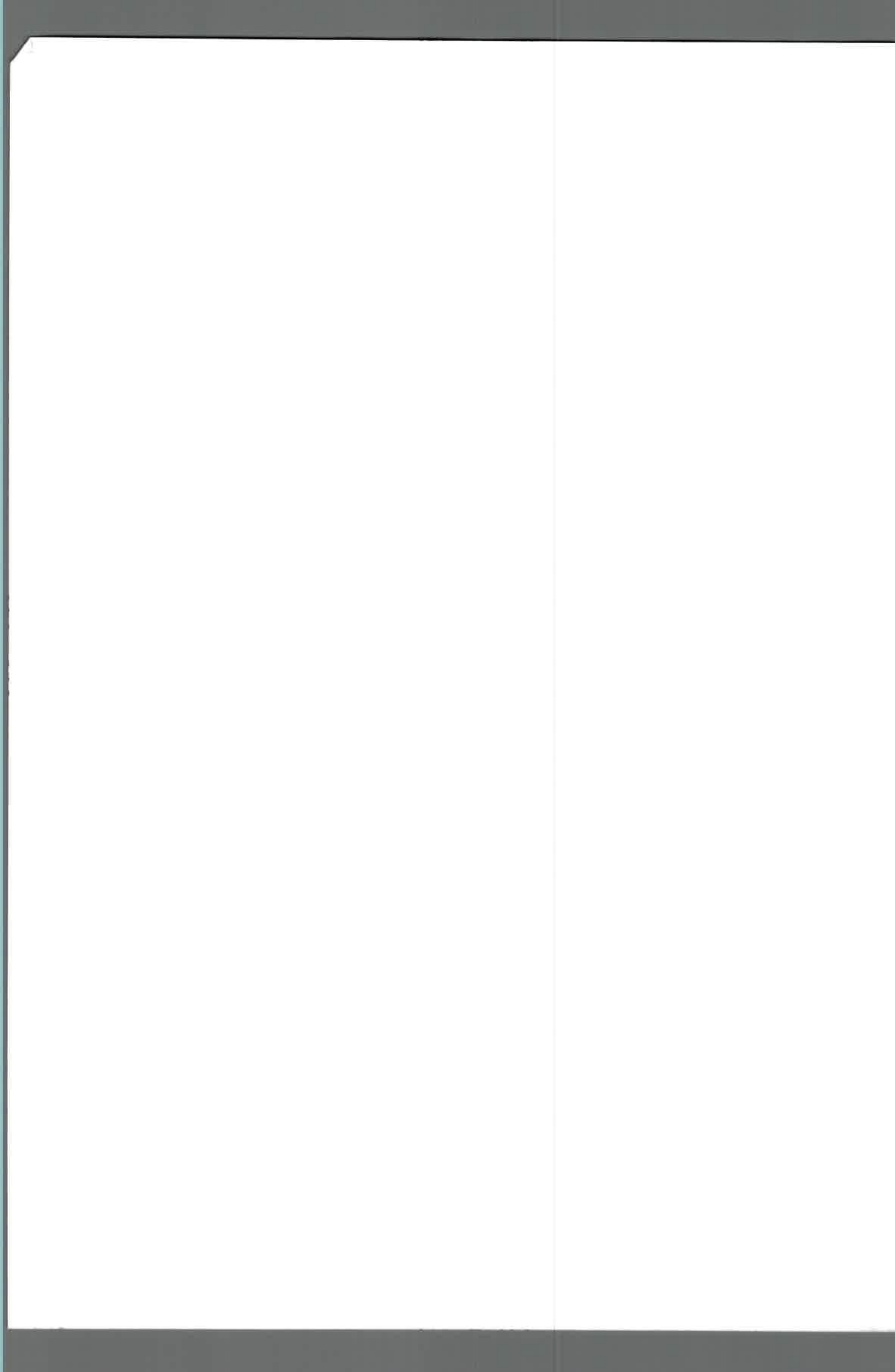


- **Greenway H y Munns R** (1980) Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu Rev Plant Physiol* 31:149-190.
- **Guerzoni E, Lanciotti R, Cocconcelli S** (2001) Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology* 147:2255-2264.
- **Guy J, Whittle E, Kumaran E, Lindqvist D, Shanklin, J** (2007) The crystal structure of the ivy Delta4-16:0-ACP desaturase reveals structural details of the oxidized active site and potential determinants of regioselectivity. *J Biol Chem* 282:19863–19871.
- **Hanna K, Bengis-Garber C, Kushner DJ, Kogut M, Kates M** (1984) The effect of salt concentration on the phospholipid and fatty acid composition of the moderate halophile *Vibrio costicola*. *Can J Microbiol* 30:669-675.
- **Hartig C, Loffhagen N, Harms H** (2005) Formation of trans fatty acids is not involved in growth –linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* 71: 1915-1922.
- **Hecker M y Völker U** (1998) Non-Specific, General and Multiple Stress Resistance of Growth Restricted *Bacillus subtilis* Cells by the Expression of the  $\sigma^B$  Regulon. *Mol Microbiol* 29:1129 – 1136.
- **Hecker M, Schumann W y Völker U** (1996) Heat-Shock and General Stress Response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 19:417 – 428.
- **Heipieper HJ, Meinhardt F, Segura A** (2003) The cis-trans isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiol Lett* 229:1-7.
- **Henderson RJ y Tocher DR** (1992) Thin layer chromatography. En: *Lipid Analyses: A practical approach*. Hamilton JR y Hamilton S (eds),
- **Hengge-Aronis R** (1999) Interplay of Global Regulators and Cell Physiology in the General Stress Response of *Escherichia coli*. *Current Opinions in Microbiology* 2:148 – 152.
- **Hernández M, Padilla M, Sicardo M, Mancha M, Martínez-Rivas J** (2010) Effect of different environmental stresses on the expression of oleate desaturase genes and fatty acid composition in olive fruit. *Phytochemistry* 72: 178-187.

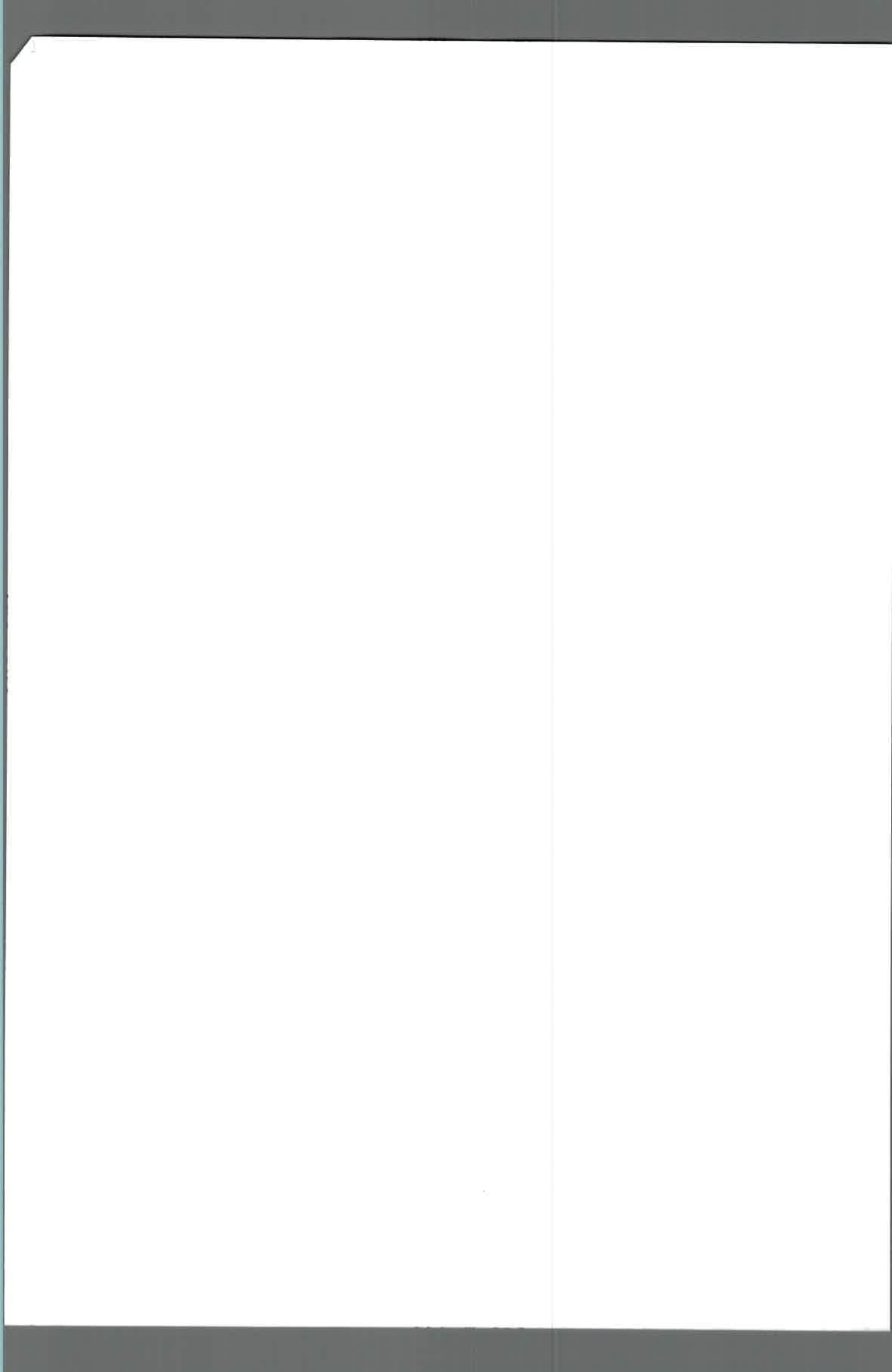




- **Horiguchi G, Fuse T, Kawakami N, Kodama H, Iba K** (2000) Temperature-dependent translational regulation of the ER  $\alpha$ -3 fatty-acid desaturase gene in wheat root tips. *Plant J* 24:805–813.
- **Hubac C, Guerrier D, Ferran J, Trèmolieres A, Kondorosi A** (1992) Lipid and protein composition of outer and inner membranes in wild-type strains and nod mutants of *Rhizobium meliloti*. *J Gen Microbiol* 138:1973-1983.
- **Junker F y Ramos JL** (1999) Involvement of the cis/trans isomerase Cti in solvent resistance of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol* 181:5693-700.
- **Kadner R** (1996) Cytoplasmic Membrane. En: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Neidhardt F, Curtis R III, Ingraham J, Link E, Low K, Magasanik W, Reznikoff W, Riley M, Schaechter M, Umberger H (eds).
- **Kanemasa Y, Yoshioka T, Hayashi H** (1972) Alteration of the phospholipid composition of *Staphylococcus aureus* cultured in medium containing NaCl. *Biochim Biophys Acta* 280:4444-4450.
- **Kanfer J y Kennedy EP** (1964) Metabolism and function of bacterial lipids. II. Biosynthesis of phospholipids in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 239:1720-6.
- **Kargiotidou A, Deli D, Galanopoulou D, Tsaftaris A, Farmaki T** (2008) Low temperature and light regulate delta 12 fatty acid desaturases (FAD2) at a transcriptional level in cotton (*Gossypium hirsutum*). *J Exp Bot* 59:2043–2056.
- **Karnezis T, Fisher H, Neumann G, Stone B, Stanisich V** (2002) Cloning and characterization of the phosphatidylserine synthase gene of *Agrobacterium* sp. strain ATCC 31749 and effect of its inactivation on production of high-molecular-mass (1→3)- $\beta$ -D-glucan (curdlan). *J Bacteriol* 184:4114-4123.
- **Kates M** (1973) En: Techniques of lipidology. Work T y Work E (eds)
- **Kent C** (1995) Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 64:315–343
- **Keweloh H y Heipieper H** (1996) *Trans* unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids* 31:129-136.
- **Kishinevsky BD, Sen D, Weaver RW** (1992) Effect of high root temperature on *Bradyrhizobium*-peanut symbiosis. *Plant Soil* 143:275-282.
- **Koch A** (1998) The biophysics of the Gram negative periplasmic space. *Crit Rev in Microbiol* 24:23-59.



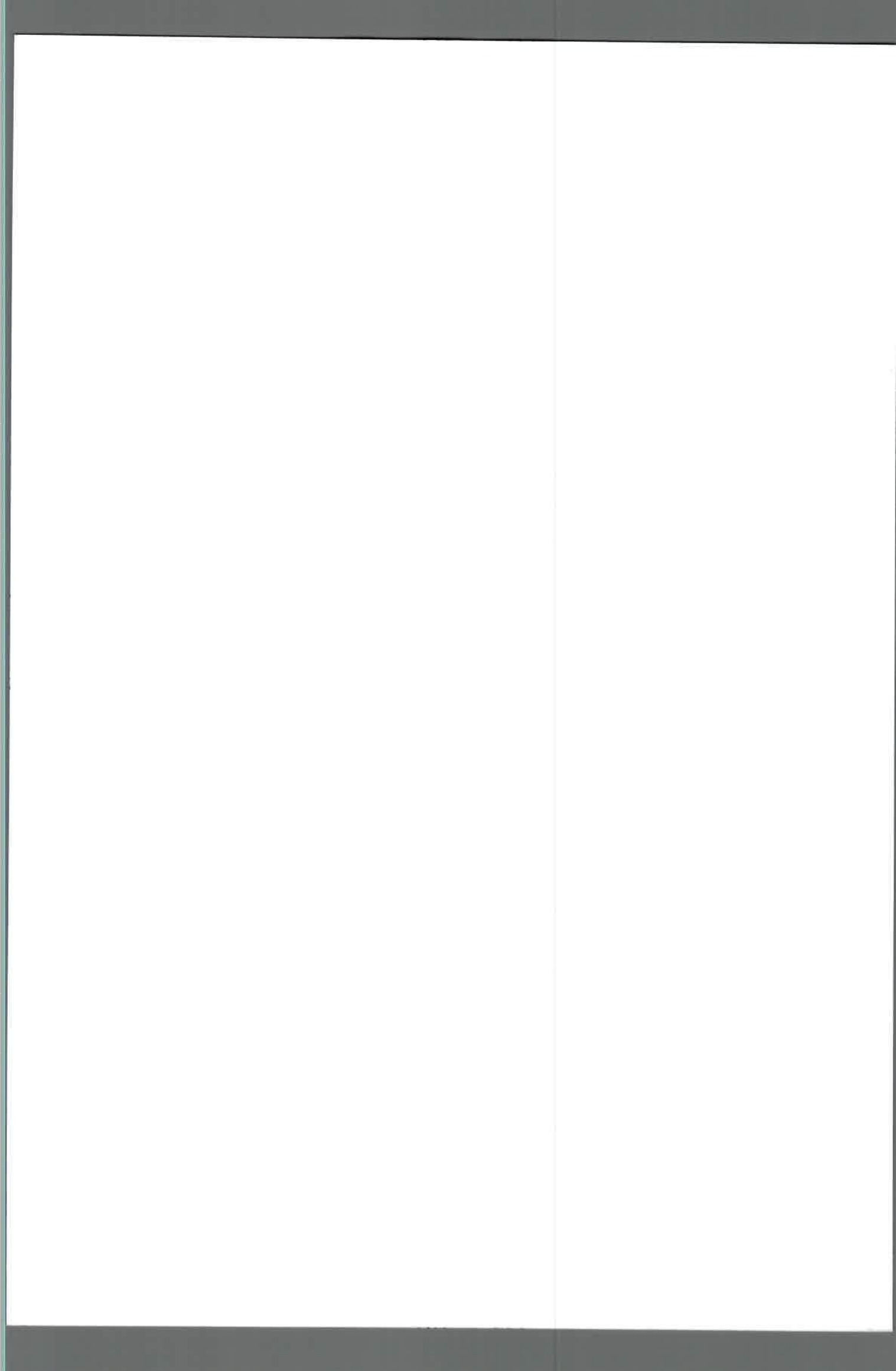
- **Komanieka I y Choma A** (2001) Skladniki lipidowe Rhizobiaceae. Post Mikrobiol 40:7-30.
- **Kulkarni S y Nautiyal CS** (2000) Effects of salt and pH stress on temperature-tolerant *Rhizobium* sp. NBRI330 nodulating *Prosopis juliflora*. Curr Microbiol 40:221-226.
- **Le Rudulier D, Strøm AR, Dandekar AM, Smith LT, Valentine RC** (1984) Molecular biology of osmoregulation. Science 224:1064–1068.
- **Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM** (1995) Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. Appl Environ Microbiol 61:3592-3597.
- **Li Y, Dietrich M, He B, Ouyang P, Urlacher VB** (2008) Identification and functional expression of a Delta9-fatty acid desaturase from *Psychrobacter urativorans* in *Escherichia coli*. Lipids 43:207-213.
- **Li Y, Xu X, Dietrich M, Urlacher V, Schmid R, Ouyang P, He B** (2009) Identification and functional expression of a delta 9 fatty acid desaturase from the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. MLY15. J Mol Catal B: Enzymatic 56:96-101.
- **Lindquist Y, Huang W, Schneider G, Shanklin J** (1996) Crystal structure of delta9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. EMBO J 15:4081–4092.
- **Lindstrom K y Lehtomaki S** (1988) Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (Galea) compared with other fast growing rhizobia. FEMS Microbiol Lett 50:277-287.
- **López-Lara I y Geiger O** (2001) Novel pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria associated with eukaryotes. J Biotechnol 91:211-221.
- **López-Lara I, Sohlenkamp C, Geiger O** (2003) Membrane lipids in plant-associated bacteria: their biosyntheses and possible functions. Mol Plant–Microbe Interact 16: 567-579.
- **Los D y Murata N** (1998) Structure and expression of fatty acid desaturases. Biochim Biophys Acta 1394:3–15.
- **Los D y Murata N** (2004) Membrane fluidity and its role in the perception of environmental signals. Biochim Biophys Acta 1666:142-157.



- **Madi, L, Wang X, Kobiler I, Lichter A, Prusky D** (2003) Stress on avocado fruits regulates D9-stearoyl ACP desaturase expression, fatty acid composition, antifungal diene level and resistance to *Colletotrichum gloeosporoides* attack. *Physiol Mol Plant Pathol* 62:277–283.
- **Mandimba G** (1995) Contribution of nodulated legumes on the growth of *Zea mays* L. under various cropping systems. *Symbiosis* 19:213-222.
- **Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J** (1982) Molecular cloning, a laboratory manual (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory).
- **Mansilla M, Cybulski L, Albanesi D, de Mendoza D** (2004) Control of Membrane Lipid Fluidity by Molecular Thermosensors. *J Bacteriol* 186:6681–6688.
- **Martens M, Delaere M, Coopman R, de Vos P, Gillis M, Willems A** (2007) Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:489–503.
- **Martínez-Morales F, Schobert M, López-Lara I, Geiger O** (2003) Pathways for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria. *Microbiology* 149: 3461-3471.
- **Matsuda O, Sakamoto H, Hashimoto T, Iba K** (2005) A temperature-sensitive mechanism that regulates post-translational stability of a plastidial  $\omega$ 3 fatty acid desaturase (FAD8) in *Arabidopsis* leaf tissues. *J Biol Chem* 280:3597–3604.
- **Matsumoto K** (2001) Dispensable nature of phosphatidylglycerol in *Escherichia coli*: dual roles of anionic phospholipids. *Mol Microbiol* 39:1427-33.
- **Meade H, Long S, Ruvkun G, Brown S, Ausubel F** (1982) Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* 149:114-122.
- **Medeot D, Bueno M, Dardanelli M, García de Lema M** (2007) Adaptational changes in lipids of *Bradyrhizobium* SEMIA 6144 nodulating peanut as a response to growth temperature and salinity. *Curr Microbiol* 54: 31-35.
- **Mejía, M. Gómez-Eichelmann C, Fernández M** (1999) *Escherichia coli* membrane fluidity as detected by excimerization of dipyranylpropane: sensitivity to the bacterial fatty acid profile. *Arch Biochem Biophys* 368:156-160.
- **Michiels J, Verreth C, Vanderleyden J** (1994) Effects of Temperature Stress on Bean-Nodulating *Rhizobium* Strains. *Appl Environ Microbiol* 60:1206-1212.



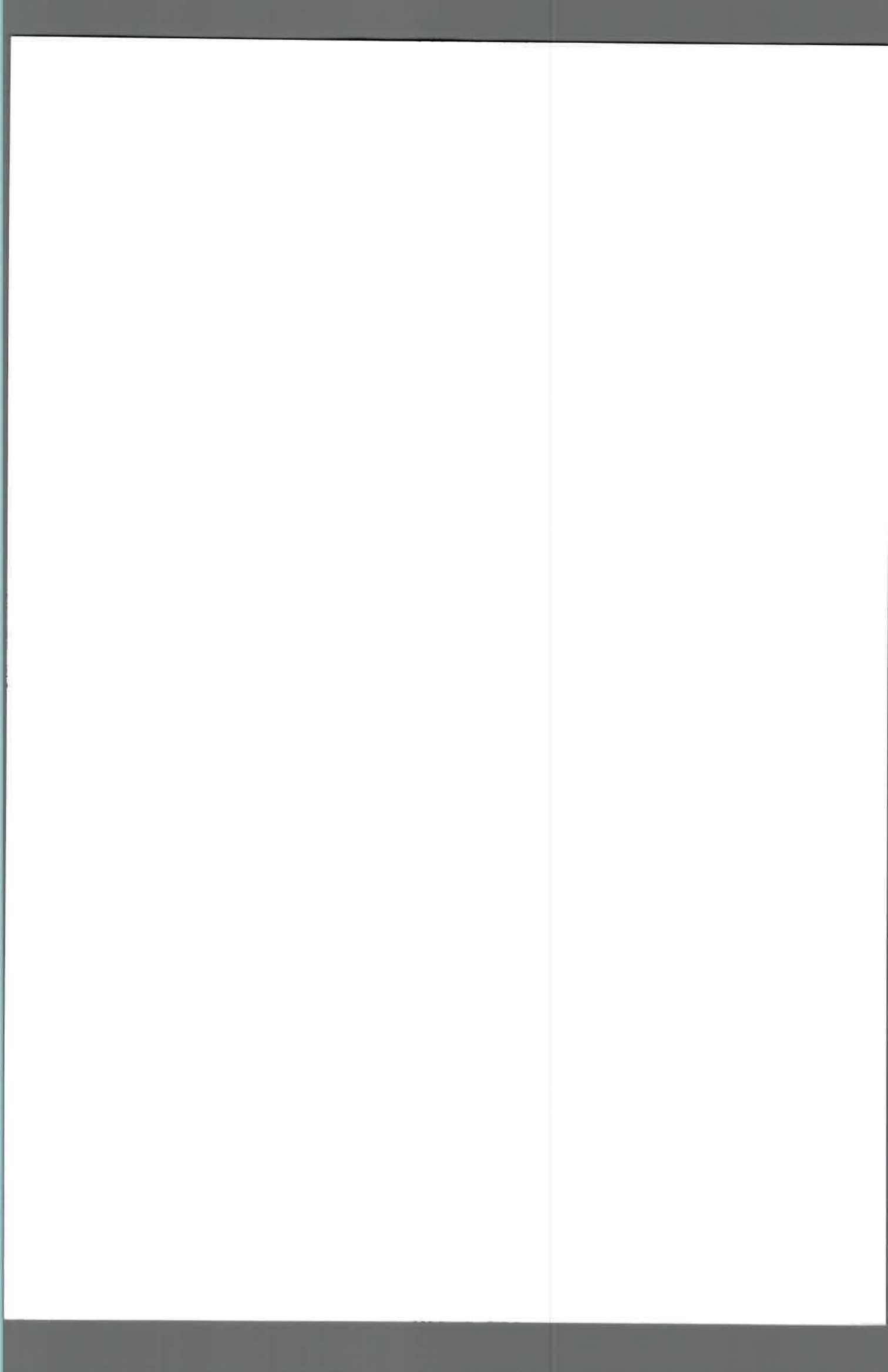
- **Miller K** (1986) Effects of monovalent and divalent salts on the phospholipids and fatty acid compositions of a halotolerant *Planococcus* sp. Appl Environ Microbiol 52:580-582.
- **Minder A, de Rudder K, Narberhaus F, Fischer H, Hennecke H, Geiger O** (2001) Phosphatidylcholine levels in *Bradyrhizobium japonicum* are critical for an efficient symbiosis with the soybean host plant. Mol Microbiol 39:1186-1198.
- **Mizuno T y Kageyama M** (1979) Isolation and characterization of major outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA0 with special reference to peptidoglycan-associated protein. J Biochem 06:979-989.
- **Morrison WR y Smith LM** (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride. J Lipid Res 5:600-608.
- **Münchbach M, Dainese P, Staudenmann W, Narberhaus F, James P** (1999a) Proteome analysis of heat shock protein expression in *Bradyrhizobium japonicum*. Eur J Biochem 264:39-48.
- **Münchbach M, Nocker A, Narberhaus F** (1999b) Multiple small heat shock proteins in rhizobia. J Bacteriol 181:83-90.
- **Munevar F y Wollum A** (1982) Response of soybean plants to high root temperature as affected by plant cultivar and *Rhizobium* strain. Agron J 74:138-142.
- **Murata N y Wada H** (1995) Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. Biochem J 308:1-8.
- **Mykytczuk N, Trevors J, Leduc L, Ferroni G** (2007) Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. Pogress Biophysics and Molecular Biology 95:60-82.
- **Mykytczuk N, Trevors J, Ferroni G, Leduc L** (2010) Cytoplasmic membrane fluidity and fatty acid composition of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in response to pH stress. Extremophiles 14:427-441.
- **Najjar M, Chikindas M, and Montville T** (2007) Changes in *Listeria monocytogenes* membrane fluidity in response to temperature stress. App environ microbio 173:6429-6435.
- **Narberhaus F, Weiglhofer W, Fischer HM, Hennecke H** (1996) The *Bradyrhizobium japonicum* rpoH1 gene encoding a sigma 32-like protein is part of a



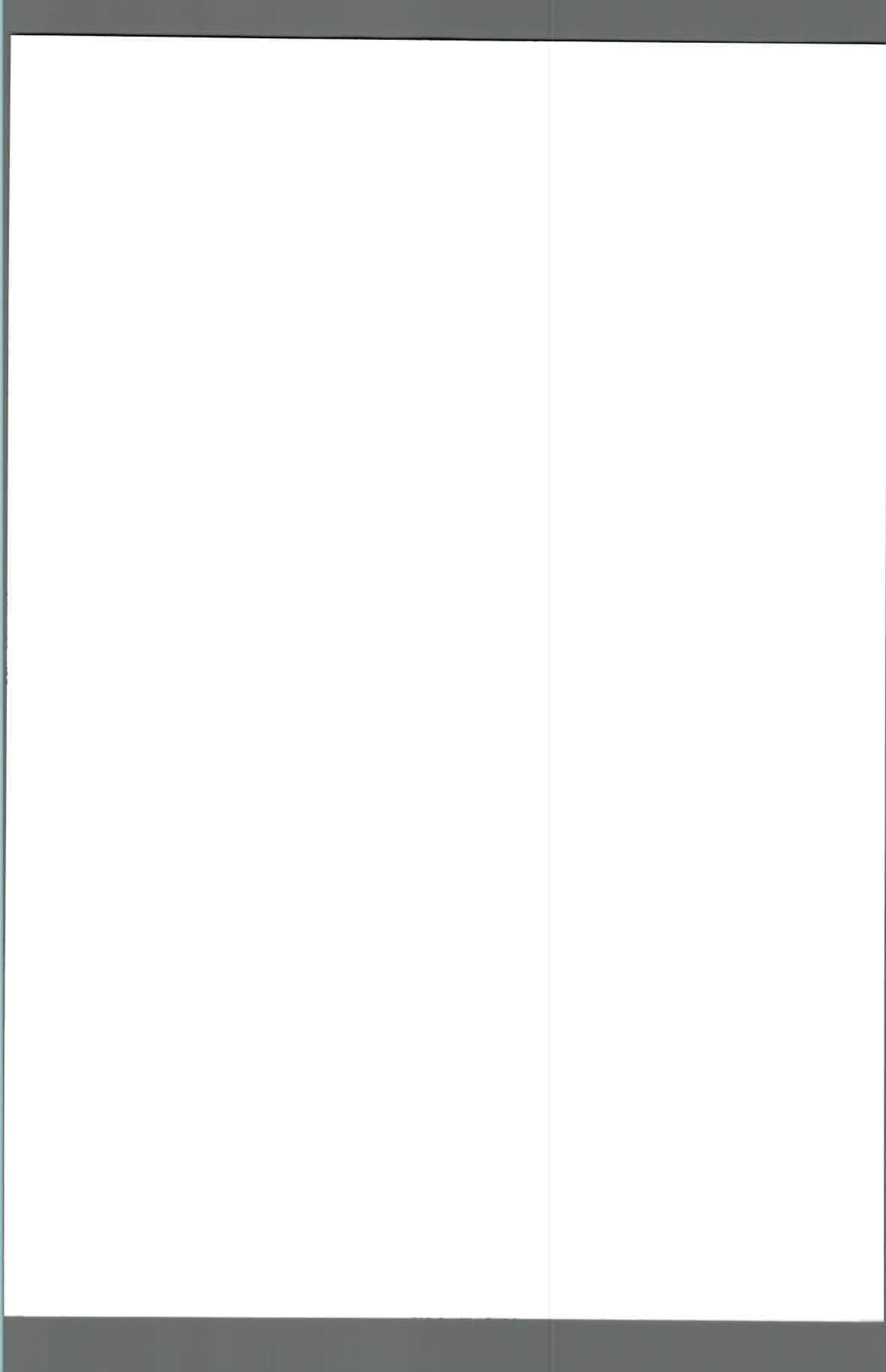


unique heat shock gene cluster together with groESL1 and three small heat shock genes. J Bacteriol 178:5337-5346.

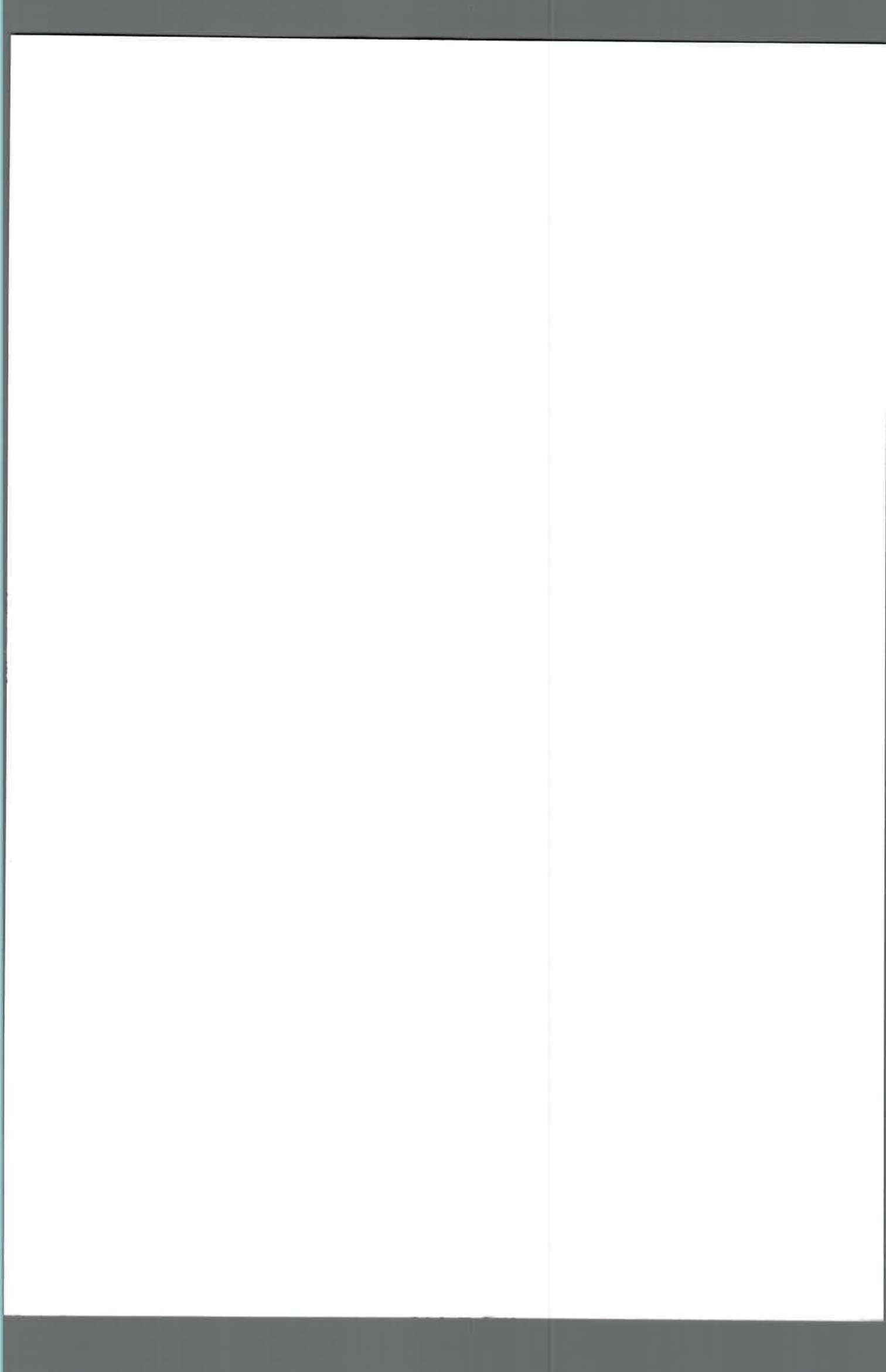
- **Nichols D y Russell N** (1996) Fatty acid adaptation in an Antarctic bacterium - changes in primer utilization. Microbiology 142: 747-754.
- **Nkot N , Krasova-Wade T , Etoa F , Sylla N , Nwaga D** (2008) Genetic diversity of rhizobia nodulating *Arachis hypogaea* L. in diverse land use systems of humid forest zone in Cameroon. Appl soil ecol 40:411–416.
- **Nocker A, Hausherr T, Balsiger S, Krstulovic N-P, Hennecke H, Narberhaus F** (2001) A mRNA-based thermosensor controls expression of rhizobial heat shock genes. Nucl Acids Res 29:4800-4807.
- **Paulucci N, Medeot D, Dardanelli M, García de Lema M** (2011) Growth Temperature and Salinity Impact Fatty Acid Composition and Degree of Unsaturation in Peanut-Nodulating Rhizobia. Lipids 46: 435-441
- **Poolman B, Blount P, Folgering JHA, Friesen RHE, Moe, PC, van der Heide T** (2002) How do membrane proteins sense stress? Mol Microbiol 44:889-902.
- **Possingham JV, Moyne DV, Anderson AJ** (1965) Influence of elevated shoot and root temperature on nitrogen fixation. Plant Physiol (Bethesda) 39:561-563.
- **Raetz CR y Whitfield C** (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. Annu Rev Biochem 71:635-700.
- **Rai A y Rai V** (2003) Effect of NaCl on growth, nitrate uptake and reduction and nitrogenase activity of *Azolla pinnata*-*Anabaena azollae*. Plant Science 164:61-69.
- **Rai V, Tiwari S, Rai A** (2001) Effect of NaCl on nitrogen fixation of unadapted and NaCl-adapted *Azolla pinnata* -*Anabaena azollae*. Aquat Bot 71:100-117.
- **Rainbird RM, Atkins CA, Pate JS** (1983) Effect of temperature on nitrogenase functioning in cowpea nodules. Plant Physiol 73:392-394.
- **Ramos J, Gallegos M , Marquéz S , Ramos-Gonzales M , Espinosa-Urgel M, Segura A** (2001) Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. Curr Opin Microbiol 4:166-171.
- **Ramos JL, Duque E, Rodríguez-Herva JJ, Godoy P, Haidour A, Reyes F, Fernandez-Barrero A** (1997) Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. J Biol Chem 272:3887-90.



- **Rehman A y Nautiyal CS** (2002) Effect of drought on the growth and survival of the stress-tolerant bacterium *Rhizobium* sp NBR12505 sesbania and its drought-sensitive transposon Tn5 mutant. *Curr Microbiol* 45:368-377.
- **Rock C, Jackowski S, Cronan J** (1996) Lipid metabolism in prokaryotes. En *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Vance D y Vance J (eds).
- **Rodrigues Sala V, Nogueira Cardoso E, Fantinatti Garboggini F, de Lima Nogueira N, Parada Dias da Silveira A** (2008) *Achromobacter insolitus* and *Zoogloea ramigera* associated with wheat plants (*Triticum aestivum*). *Biol Fertil Soils* 44:1107–1112.
- **Russell N** (1984) Mechanisms of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival. *Trends Biochem. Sci* 9:108–112.
- **Russell N** (1992) Physiology and molecular biology of psychrophilic microorganisms. En: *Molecular biology and biotechnology of extremophiles*. Herbert RA y Sharp RJ (eds).
- **Russell N and Fukunaga N** (1990) A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 75:171–182.
- **Russell NJ** (2002). Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing-an overview. *Int J Food Microbiol* 79:27–34.
- **Sahi C, Singh A, Blumwald E, Grover A** (2006) Beyond osmolytes and transporters: novel plant salt-stress tolerance-related genes from transcriptional profiling data. *Physiol Plant* 127: 1-9.
- **Saito T, Kato A, Ochiai H, Morita N** (2005) Temperature adaptation in *Dictyostelium*: role of  $\Delta 5$  fatty acid desaturase. *Microbiology* 151:113–119.
- **Sambrook J** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- **Schweizer HP** (2004) Fatty acid biosynthesis and biologically significant acyl transfer reactions in *Pseudomonas*. En: *Pseudomonas: Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism*. Ramos J (ed).
- **Shanklin J y Somerville C** (1991) Stearoyl-acyl-carrier protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2510-2514



- **Shanklin J y Cahoon B** (1998) Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:611-641.
- **Shanklin J, Whittle E, Fox B** (1994) Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* 33:12787-12794.
- **Sinensky M** (1974) Homeoviscous adaptation a homeostatic process that regulates viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci USA* 71:522-525.
- **Smith R** (1992) Legume inoculant formulation and application. *Can J Microbiol* 38: 485-492.
- **Sohlenkamp C, de Rudder K, Röhrs V, López Lara I, Geiger O** (2000) Cloning and characterization of the gene for phosphatidylcholine synthase. *J Biol Chem* 275(25) 18919-18925.
- **Somasegaran P y Hoben H** (1994) Handbook for Rhizobia: methods in legume-*Rhizobium* technology.
- **Suutari M y Laakso S** (1994) Microbial fatty acid and thermal adaptation. *Crit Rev Microbiol* 20:285-328.
- **Tang G, Novitzky W, Griffin H, Huber S, Dewey R** (2005) Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation. *Plant J* 44:433-446.
- **Tang Y y Hollingsworth R** (1998) Regulation of lipid synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: low oxygen concentrations trigger phosphatidylinositol biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 64: 1963-1966.
- **Teixeira M, Carvalho I, Brodelius M** (2010)  $\omega$ 3 fatty acid desaturase genes isolated from purslane (*Portulaca oleracea* L.): expression in different tissues and response to cold and wound stress. *J Agric Food Chem* 58:1870-1877.
- **Teixeira M, Coelho N, Olsson M, Brodelius P, Carvalho I, Brodelius M** (2009) Molecular cloning and expression analysis of three omega-6 desaturase genes from purslane (*Portulaca oleracea* L.). *Biotechnol Lett* 31:1089-1101.
- **Théberge M, Prévost D, Chalifour P** (1996) The effect of different temperatures on the fatty acids composition of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in the faba bean symbiosis. *New Phytologist* 134: 657-664.



- **Tighe SW, de Lajudie P, Dipietro K, Lindström K, Nick G, Jarvis BDW (2000)** Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock Microbial Identification System. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:787–801.
- **Trevors JT (2003)** Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *J Biochem Biophys Methods* 57:87-103.
- **Turk M, Montiel V, Zigon D, Plemenitas A, Ramos J (2007)** Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. *Microbiology* 153:3586–3592.
- **van Brussel A, Planque K, Quispel (1977)** The wall of *Rhizobium leguminosarum* in bacteroid and free-living forms. *J Gen Microbiol* 101:51-56.
- **Vance CP (1998)** Legumes Symbiotic Nitrogen Fixation: Agronomic Aspects. En: *The rhizobiaceae*. Spink H, Kondorosi A, Hooykaas P (eds).
- **Vargas A, Graham PH (1988)** *Phaseolus vulgaris* cultivar and *Rhizobium* strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. *Field Crop Res* 19:91-101.
- **Vega S, del Rio A, Bamberg, J, Palta J (2004)** Evidence for the up-regulation of stearoyl-ACP (D9) desaturase gene expression during cold acclimation. *Am J Potato Res* 81:125–135.
- **Vincent JM (1970)** A manual for the practical study of root nodule bacteria. *Internat Biol Progr. Handbook N° 15*. Blackwell Scientific Publications Ltd Oxford, UK.
- **Vriezen J, de Bruijn F, Nüsslein K (2007)** Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Appl Environ Microbiol* 73:3451-3459.
- **Wada M, Fukunaga N, Sasaki S (1989)** Mechanism of biosynthesis of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* sp. Strain E-3, a psychrotrophic bacterium. *J Bacteriol* 171:4267-4271.
- **Wallis JG y Browse J (2002)** Mutants of *Arabidopsis* reveal many roles for membrane lipids. *Prog Lipid Res* 41:254-78.
- **Whittle E, Cahoon E, Subrahmanyam S, Shanklin J (2005)** A multifunctional acyl-acyl carrier protein desaturase from *Hedera helix* L. can synthesize 16 - and 18-carbon monoene and diene products. *J Biol Chem* 280:28169–28176.





- **Wilderman P, Vasil A, Martin W, Murphy R, Vasil M** (2002) *Pseudomonas aeruginosa* synthesizes phosphatidylcholine by use of the phosphatidylcholine synthase pathway. *J Bacteriol* 184:4792–4799.
- **Wood JM** (1999) Osmosensing by bacteria: signals and membrane based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:230-262.
- **Yamaguchi T y Blumwald E** (2005) Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends Plant Sci* 12: 615-620.
- **Zahran H** (1999) *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:968–989.
- **Zhang X, Harper R, Karsisto M, Lindstrom K** (1991) Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. *Int J Syst Bacteriol* 41:104-113.
- **Zhu K, Choi KH, Schweizer HP, Rock CO, Zhang YM** (2006) Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 60:260-273.
- **Zurkowski W** (1982) Molecular mechanism for loss of nodulation properties of *Rhizobium trifolii*. *J Bacteriol* 150:999-1007.





U.N.R.C.  
Biblioteca Central



71256

71256