

GODINO, AGUSTINA

Profesora y asesora de Inclusiones en programas Especiales (PEP)

75118

2016

75118



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAS DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y
NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctora en Ciencias Biológicas

PRODUCCIÓN Y REGULACIÓN DE BACTERIOCINAS
EN *Pseudomonas fluorescens* SF39a

Mic. Agustina Godino

DIRECTORA: Dra. Sonia Elizabeth Fischer

Río Cuarto, Mayo 2016

2016

75118

MFN:
Classif:
T-1036

COMISIÓN ASESORA Y JURADO

Nombre y Apellido..... N. J. Pettinari Lugar de Trabajo..... FEEN, UBA
Firma..... [Signature] Aclaración..... N. J. Pettinari

Nombre y Apellido..... Natalia Gottig Lugar de Trabajo..... IBC- CONICET
Firma..... [Signature] Aclaración..... Natalia Gottig

Nombre y Apellido..... Leiana Odurno Lugar de Trabajo..... UNRC
Firma..... [Signature] Aclaración..... Odurno leiana

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha..... Río Cuarto, 2 de mayo de 2016
Calificación..... sobresaliente (10)

Agradecimientos

Agradezco inmensamente a todas las personas que de una u otra forma colaboraron en este proyecto de tesis. Un agradecimiento especial a mi directora de tesis Sonia Fischer, quien con su experiencia me orientó en el desarrollo de este trabajo de investigación, y a mis compañeros, con quienes codo a codo compartimos esta experiencia.

ÍNDICE GENERAL

Índice de tablas	VII
Índice de figuras	VIII
Abreviaturas	XI
Resumen en español	XII
Resumen en inglés	XIV
CAPITULO I- Introducción general	1
<hr/>	
I.1. INTRODUCCIÓN	1
I.1.1. El rizo-microbioma	1
I.1.2. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	3
I.1.3. Las bacteriocinas	4
I.1.3.1. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas	5
I.1.3.2. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas	7
I.1.4. Rol ecológico y aplicación de las bacteriocinas	8
I.1.4.1. Aplicaciones de las bacteriocinas en la industria alimenticia	9
I.1.4.2. Aplicaciones de las bacteriocinas en medicina	10
I.1.4.3. Aplicaciones de las bacteriocinas en el área agronómica	12
I.1.5. Antecedentes en nuestro laboratorio	14
I.2. HIPÓTESIS	16
I.3. OBJETIVOS	17
I.4. BIBLIOGRAFÍA	18
CAPITULO II- Caracterización de la bacteriocina producida por <i>P. fluorescens</i> SF39a	26
<hr/>	
II.1. INTRODUCCIÓN	26
II.1.1. Caracterización de bacteriocinas en el género <i>Pseudomonas</i>	26
II.1.1.1. Tailocinas: piocinas tipo R y tipo F	26
II.1.1.2. Piocinas tipo S	29
II.1.1.3. Producción de piocinas	31
II.1.2. Caracterización de bacteriocinas en bacterias asociadas a plantas	33
II.2. MATERIALES Y MÉTODOS	35
II.2.1. Cepas bacterianas y plásmidos	35
II.2.2. Condiciones generales de cultivo	36
II.2.3. Técnicas generales de biología molecular	36
II.2.3.1. Extracción de ADN genómico	36
II.2.3.2. Extracción de ADN plasmídico	37
II.2.3.3. Electroforesis en geles de agarosa	38

II.2.3.4. Digestión y ligación	38
8II.2.3.5. Preparación de células competentes químicas y transformación de <i>E. coli</i>	38
II.2.3.6. Preparación de células electrocompetentes y electroporación de <i>P. fluorescens</i>	39
II.2.3.7. Southern-Blot:	39
II.2.4. Ensayo de producción de bacteriocinas	40
II.2.5. Purificación parcial de bacteriocinas	41
II.2.6. Sensibilidad de las bacteriocinas a proteinasa K y temperaturas	43
II.2.7. Predicción de genes de bacteriocinas	43
II.2.8. Construcción de un mutante en el gen <i>pys</i>	44
II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
II.3.1. Producción de bacteriocinas en <i>P. fluorescens</i> SF39a	49
II.3.2. Purificación parcial de bacteriocinas en <i>P. fluorescens</i> SF39a	51
II.3.3. Sensibilidad de las bacteriocinas a proteinasa K y temperatura	53
II.3.4. Predicción de genes de bacteriocinas en el draft del genoma de <i>P. fluorescens</i> SF39a	54
II.3.5. Caracterización funcional de la piocina tipo S	58
II-4. CONCLUSIONES	61
II-5. BIBLIOGRAFÍA	62
CAPITULO III- Identificación de genes implicados en la regulación de bacteriocinas	71
III.1. INTRODUCCIÓN	71
III.1.1. Regulación de la síntesis de bacteriocinas	71
III.2. MATERIALES Y MÉTODOS	75
III.2.1. Cepas bacterianas y plásmidos	75
III.2.2. Condiciones de cultivo y técnicas generales de biología molecular	76
III.2.3. Mutagénesis al azar por inserción del transposón mini-Tn5Km1	76
III.2.4. Caracterización de mutantes	77
III.2.4.1. Amplificación del gen de resistencia a Km	77
III.2.4.2. Amplificación de la secuencia IS50	77
III.2.4.3. Perfiles genéticos	78
III.2.4.4. Curvas de crecimiento	79
III.2.4.5. Estudio de hibridación (Southern-blot)	79
III.2.5. Clonado y secuenciación del fragmento de ADN interrumpido por el transposón	80
III.2.5.1. Clonado de la región adyacente al transposón	80
III.2.5.2. Secuenciación de la región interrumpida por el transposón	81
III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
III.3.1. Obtención de mutantes afectados en la producción de bacteriocinas	83
III.3.2. Caracterización de los mutantes mini-Tn5Km1	83

III.3.2.1. Amplificación del gen de resistencia a Km	83
III.3.2.2. Amplificación de la secuencia IS50	84
III.3.2.3. Perfiles genéticos	84
III.3.2.4. Curvas de crecimiento	85
III.3.2.5. Estudio de hibridación	85
III.3.3. Clonado y secuenciación del fragmento de ADN interrumpido por el transposón	86
III.4. CONCLUSIONES	89
III-5. BIBLIOGRAFÍA	90
CAPITULO IV-Rol del gen <i>ptsP</i> en la producción de bacteriocinas y en la competitividad bacteriana	93
<hr/>	
IV.1. INTRODUCCIÓN	93
IV.1.1. Sistemas fosfotransferasas	93
IV.1.2. Rol del PTSN ^{tr}	94
IV.2. MATERIALES Y MÉTODOS	96
IV.2.1. Cepas bacterianas y plásmidos	96
IV.2.2. Condiciones de cultivo y técnicas generales de biología molecular	96
IV.2.3. Complementación del mutantes SF39a-451	97
IV.2.3.1. Clonado del gen <i>ptsP</i> en el plásmido pBBR1MCS-5	97
IV.2.3.2. Incorporación del plásmido pPtsP en el mutante SF39a-451 y análisis de la producción de bacteriocina	98
IV.2.4. Secuenciación del gen <i>ptsP</i> de <i>P. fluorescens</i> SF39a	98
IV.2.5. Caracterización fenotípica del mutante SF39a-451	99
IV.2.5.1. Producción de proteasas	99
IV.2.5.2. Producción de pioverdina	99
IV.2.5.3. Formación de biofilm	99
IV.2.5.4. Movilidad	100
IV.2.5.5. Microscopía electrónica de transmisión	100
IV.2.6. Colonización de la cepa SF39a y el mutante SF39a-451 en la rizósfera de trigo	100
IV.2.6.1. Recolección y análisis del suelo	100
IV.2.6.2. Obtención de cepas resistentes a rifampicina	101
IV.2.6.3. Preparación del inóculo	101
IV.2.6.4. Esterilización y germinación de semillas de trigo	101
IV.2.6.5. Ensayo de competencia	102
IV.2.7. Análisis estadístico	102
IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	103
IV.3.1. Complementación del mutante SF39a-451	103
IV.3.2. Obtención de la secuencia completa del gen <i>ptsP</i> de <i>P. fluorescens</i> SF39a	104

IV.3.3. Caracterización fenotípica del mutante SF39a-451	105
IV.3.3.1. Producción de pioverdina	105
IV.3.3.2. Formación de biofilm	106
IV.3.3.3. Producción de Proteasas	107
IV.3.3.4. Movilidad	108
IV.3.4. Competitividad de la cepa SF39a y el mutante SF39a-451 en la rizósfera de trigo	111
IV.4. CONCLUSIONES	115
IV.5. BIBLIOGRAFÍA	116
CAPITULO V-Rol del sistema CbrA/Crc en la regulación de bacteriocinas	120
<hr/>	
V.1. INTRODUCCIÓN	120
V.1.1. Sistema de dos componentes CbrAB	120
V.2. MATERIALES Y MÉTODOS	123
V.2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y cebadores	123
V.2.2. Condiciones de cultivo y técnicas generales de biología molecular	125
V.2.3. Complementación del mutantes SF39a-375	126
V.2.3.1. Clonado del gen <i>cbrA</i> en el plásmido pBBR1MCS-5	126
V.2.3.2. Incorporación del plásmido pCbrA en el mutante SF39a-375 y análisis de la producción de bacteriocina	127
V.2.4. Identificación de los genes que codifican para la cascada CbrA/Crc en el draft del genoma de <i>P. fluorescens</i> SF39a y análisis bioinformático de las secuencias	127
V.2.5. Construcción de mutantes en los genes <i>cbrB</i> , <i>crcZ</i> y <i>crc</i>	127
V.2.6. Producción de bacteriocinas	129
V.2.7. Ensayo de competencia	129
V.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	131
V.3.1. Complementación del mutante SF39a-375	131
V.3.2. Identificación de los genes que codifican para la cascada CbrA/Crc en el draft del genoma de <i>P. fluorescens</i> SF39a	132
V.3.3. Rol del sistema CbrA/Crc en la producción de bacteriocinas	135
V.3.6. Colonización de la cepa SF39a y los mutantes SF39a-375, SF39a-cbrB, SF39a-crcZ y SF39a-crc en la rizósfera de trigo	140
V.4. CONCLUSIONES	144
V.5. BIBLIOGRAFÍA	145
CAPITULO VI-Conclusiones finales	150
<hr/>	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I-1: Diferencias principales entre las bacteriocinas y los antibióticos	5
Tabla II-1: Cepas bacterianas y plásmidos utilizados	35
Tabla II-2: Espectro antimicrobiano de <i>P. fluorescens</i> SF39a contra diferentes cepas de los géneros <i>Pseudomonas</i> y <i>Xanthomonas</i>	50
Tabla III-1: Cepas bacterianas y plásmidos utilizados	75
Tabla IV-1: Cepas bacterianas y plásmidos utilizados	96
Tabla IV-2: Características del suelo utilizado para el ensayo de competencia	112
Tabla IV-3: Viabilidad de los mutantes espontáneos resistentes a rifampicina y sus correspondientes cepas salvajes	112
Tabla V-1: Cepas bacterianas y plásmidos utilizados	123
Tabla V-2: Cebadores utilizados	125
Tabla V-3: Características del suelo utilizado para el ensayo de competencia	141
Tabla V-4: Viabilidad de los mutantes espontáneos resistentes a rifampicina y sus correspondientes cepas salvajes	141

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I-1: La rizósfera	2
Figura I-2: Composición de la comunidad bacteriana en la rizósfera	3
Figura I-3: Espectro de acción estrecho de las bacteriocinas	12
Figura II-1: Estructura de las tailocinas	28
Figura II-2: Organización genética de las tailocinas de <i>P. aeruginosa</i>	29
Figura II-3: Organización genética y estructura modular de las piocinas S	31
Figura II-4: Modelo de la regulación de piocinas en <i>P. aeruginosa</i>	32
Figura II-5: Sistema lítico de liberación de piocinas	33
Figura II-6: Dibujo ilustrativo de la selección de dobles recombinantes empleando el plásmido pKNG101	47
Figura II-7: Actividad antimicrobiana de <i>P. fluorescens</i> SF39a	50
Figura II-8: Extracto de bacteriocinas de la cepa <i>P. fluorescens</i> SF39a	52
Figura II-9: Tolerancia de las bacteriocinas producidas por <i>P. fluorescens</i> SF39a a temperaturas y proteinasa K	53
Figura II-10: Representación esquemática de los genes de bacteriocinas predichos en el genoma de <i>P. fluorescens</i> SF39a	55
Figura II-11: Alineamiento de la secuencia de la piocina S de la cepa SF39a con otras piocinas S de diferentes especies de <i>Pseudomonas</i>	57
Figura II-12: Confirmación del evento de doble recombinación homóloga mediante PCR	58
Figura II-13: Confirmación del evento de doble recombinación homóloga mediante Southern-blot	59
Figura II-14: Efecto de la mutación <i>pys</i> ^r en la producción de bacteriocina	60
Figura III-1: Regulación de colicinas	72
Figura III-2: Regulación del lantibiótico nisina	73
Figura III-3: Representación esquemática del transposón mini-Tn5 Km1.	81
Figura III-4: Producción de bacteriocinas analizada por el método de la gota	83

Figura III-5: Caracterización genética de los mutantes mini-Tn5 Km1	84
Figura III-6: Curvas de crecimiento de la cepa salvaje <i>P. fluorescens</i> SF39a y de los mutantes seleccionados	85
Figura III-7: Análisis por Southern-blot de los mutantes seleccionados	86
Figura III-8: Digestión de los plásmidos recombinantes con la enzima de restricción PstI	87
Figura IV-1: Sistemas fosfotransferasas en bacterias	94
Figura IV-2: Producción de bacteriocinas analizada mediante el método de la gota	104
Figura IV-3: Efecto de la inactivación del gen <i>ptsP</i> sobre la producción de pioverdina	106
Figura IV-4: Efecto de la inactivación del gen <i>ptsP</i> sobre la formación de biofilm	107
Figura IV-5: Efecto de la inactivación del gen <i>ptsP</i> sobre la producción de proteasas	108
Figura IV-6: Movilidad por swimming y observación de las células mediante microscopía electrónica de transmisión	109
Figura IV-7: Movilidad sobre superficie y observación de las células mediante microscopía electrónica de transmisión	110
Figura IV-8: Colonización de la rizósfera de trigo por <i>P. fluorescens</i> SF39a y el mutante SF39a-451	113
Figura V-1: Modelo de represión catabólica mediada por el sistema CbrA/Crc en <i>P. aeruginosa</i>	122
Figura V-2: Producción de bacteriocinas analizada mediante el método de la gota	131
Figura V-3: Organización genética de los genes <i>cbrA</i> , <i>cbrB</i> , <i>crcZ</i> y <i>crc</i> de <i>P. fluorescens</i> SF39a y de otras cepas del género <i>Pseudomonas</i>	133
Figura V-4: Secuencia y contexto genómico del gen <i>crcZ</i> de <i>P. fluorescens</i> SF39a	133
Figura V-5: Predicción de la estructura secundaria del pequeño ARN CrcZ de <i>P. fluorescens</i> SF39a	134

Figura V-6: Modelo de regulación propuesto para la vía de transducción de señales CbrA/Crc en <i>P. aeruginosa</i> .	135
Figura V-7: Confirmación del evento de doble recombinación homóloga en el mutante SF39a-crc.	136
Figura V-8: Confirmación del evento de doble recombinación homóloga en el mutante SF39a-crcZ.	137
Figura V-9: Confirmación del evento de doble recombinación homóloga en el mutante SF39a-cbrB.	137
Figura V-10: Producción de bacteriocinas analizada mediante el método de la gota	139
Figura V-11: Colonización de la rizósfera de trigo por <i>P. fluorescens</i> SF39a y los mutantes en el sistema CbrA/Crc	142
Figura V-12: Hongos aislados del suelo rizosférico	143

ABREVIATURAS

ACC: 1-aminociclopropano-1-carboxilato

AU: unidades arbitrarias

CCR: represión catabólica por carbono

CDAD: diarrea asociada a *Clostridium difficile*

El^{Ntr}: Enzima I fosfotransferasa-fosfoenolpiruvato del PTS^{Ntr}

HMA: hongos micorrízico-arbusculares

ISR: resistencia sistémica inducida

MMBL: lectina de unión a manosa de plantas monocotiledóneas

ORF: marco abierto de lectura

PEP: fosfoenolpiruvato

PGPR: rizobacteria promotora del crecimiento vegetal

PTS: sistema fosfotransferasa

PTS^{azúcar}: sistema fosfotrasferasa de azúcares

PTS^{Ntr}: sistema fosfotransferasa específico para nitrógeno

Sac: sacarosa

T3SS: sistema de secreción tipo tres

Resumen

Las bacteriocinas son compuestos antimicrobianos de naturaleza proteica, producidos por bacterias y, capaces de matar a otras bacterias relacionadas filogenéticamente a la cepa productora. Estos compuestos tienen numerosas propiedades que los hacen interesantes para su aplicación en la industria alimenticia, en medicina y en el área agronómica. El objetivo del presente trabajo es estudiar la producción y regulación de bacteriocinas en la rizobacteria promotora del crecimiento vegetal *Pseudomonas fluorescens* SF39a.

Mediante un análisis *in silico*, se identificaron genes para dos tipos de bacteriocinas en el *draft* del genoma de la cepa SF39a. En el contig 28, se identificó un gen (que denominamos *pys*) que codifica para una bacteriocina homóloga a las piocinas tipo S (compuestos solubles de bajo peso molecular). Además, un *cluster*, de aproximadamente 40 genes, similar a los operones que codifican para las piocinas tipo R y F (bacteriocinas de alto peso molecular similares a colas de fagos) fue identificado en el contig 17.

En ensayos de inhibición en placa, la cepa SF39a fue capaz de inhibir a numerosas bacterias filogenéticamente relacionadas, incluyendo, fitopatógenos que causan importantes pérdidas en la producción fruti-hortícola. En todos los casos, se observaron halos de inhibición de gran diámetro alrededor de la colonia. Además, las bacteriocinas extraídas de sobrenadantes de cultivos mostraron sensibilidad a proteinasa K y temperatura. Todas estas propiedades son características de las piocinas tipo S. Por lo tanto, en esta tesis se construyó un mutante en el gen *pys*, el cual, presentó un fenotipo deficiente en la producción de bacteriocina, indicando que la cepa SF39a produce una piocina tipo S funcional. Esta es la primer piocina S caracterizada en *P. fluorescens*.

El estudio de la regulación de bacteriocinas producida por PGPRs es relevante debido a su potencial aplicación como agentes de control biológico o biofertilizantes. Por lo tanto, se realizó una mutagénesis al azar en la cepa SF39a con el objetivo de identificar posibles genes implicados en la regulación de bacteriocinas. Se obtuvieron 2 mutantes de *P. fluorescens* SF39a en genes regulatorios que presentaron un fenotipo alterado en la producción de bacteriocinas: los mutantes SF39a-451 y SF39a-375.

El mutante SF39a-451 mostró una marcada disminución en la producción de bacteriocinas con respecto a la cepa salvaje. Este fenotipo fue causado por la inactivación del

gen *ptsP*, el cual, codifica para la enzima EI^{Ntr} del sistema fosfotransferasa específico para nitrógeno (PTS^{Ntr}). Además, varios procesos que impactan en el desempeño de la bacteria en el medio ambiente, como movilidad, producción de sideróforos, formación de biofilm y producción de proteasas, se vieron afectados en dicho mutante. Finalmente, mediante un ensayo de colonización en plantas de trigo, se comprobó que el mutantes SF39-451 es menos competitivo e incapaz de colonizar la rizósfera de trigo con el mismo éxito que la cepa salvaje.

El mutante SF39a-375 presentó un aumento en la producción de bacteriocinas con respecto a la cepa salvaje. La secuenciación de la región interrumpida por el transposón reveló que el mismo se insertó en el gen *cbrA*. Este gen codifica para el sensor histidina quinasa del sistema de dos componentes CbrAB. En *P. aeruginosa* y *P. putida*, el sistema CbrAB participa en una vía regulatoria más compleja, el sistema CbrA/Crc: Cuando CbrAB se activa, aumentan los niveles del pequeño ARN CrcZ, el cual, antagoniza la actividad de la proteína Crc (represor traduccional). En este trabajo se construyeron mutantes por delección en cada uno de los genes (*cbrA*, *cbrB*, *crcZ* y *crc*) que codifican para la cascada CbrA/Crc. Los mutantes *cbrB* y *crcZ*, al igual que el mutante *cbrA*⁻ (SF39a-375), mostraron un aumento en la producción de bacteriocina con respecto a la cepa salvaje; mientras que, el mutante *crc*⁻ presentó una disminución en el halo de inhibición. Estos resultados indican que la vía CbrA/Crc controla la expresión de bacteriocinas en la cepa SF39a, probablemente, mediante una modulación indirecta. Además, los mutantes *cbrA*⁻, *cbrB*⁻, *crcZ*⁻ y *crc*⁻ fueron menos competitivos que la cepa salvaje SF39a en la rizósfera de trigo, sugiriendo, la importancia de este sistema en el establecimiento exitoso de la bacteria en el medio ambiente.

Los resultados obtenidos en este trabajo aportan información acerca de nuevos mecanismos regulatorios implicados en la producción de bacteriocinas.

Abstract

Bacteriocins are bacterial proteins or peptides that inhibit the growth of bacteria closely related to the producer strain. Bacteriocins have many properties that make them interesting for application in the food industry, medicine and agronomy. The aim of this work was to study the production and regulation of bacteriocins in the plant growth-promoting rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* SF39a.

In silico analysis of the draft genome of the strain SF39a revealed the presence of genes encoding two types of bacteriocins. A gene encoding putative pyocin type S (low-molecular-mass bacteriocins) was predicted in contig 28 from the draft genome of *P. fluorescens* SF39a. This gene was named *pys*, according to the name of its ortholog in *P. aeruginosa*. Moreover, a cluster with genes encoding putative pyocins type F and R (high-molecular-mass bacteriocins resemble bacteriophage tails) was identified in the contig 17.

Bacteriocin production by *P. fluorescens* SF39a was analyzed by the agar spot test. *P. fluorescens* SF39a showed antimicrobial activity against several reference strains of the genera *Pseudomonas* and *Xanthomonas*, including phytopathogenic strains. In all cases, there was a large inhibition zone surrounding the colonies on lawns of sensitive strains. Moreover, bacteriocins extracted from culture supernatants showed sensitivity to proteinase K and temperatures. These properties are characteristic of pyocins type S. Based on observed results, we decided to construct a *pys* mutant derivative of *P. fluorescens* SF39a. The bacteriocin production was impaired in this mutant indicating that the strain produces a functional pyocin S.

Knowledge of bacteriocin regulation produced by rhizospheric strains is relevant due to their potential application as biocontrol agents or biofertilizers. Therefore, to identify genes involved in regulation of bacteriocins a random transposon mutagenesis was carried out. Two random mutant in regulatory genes derivatives of *P. fluorescens* SF39a were obtained; The mutants SF39a-451 and SF39a-375.

The mutant SF39a-451 showed a strongly reduced bacteriocin production. This phenotype was caused by inactivation of the *ptsP* gene which encodes a phosphoenolpyruvate phosphotransferase (EI^{Ntr}) of the nitrogen-related phosphotransferase system (PTS^{Ntr}). In addition, several processes that impact on bacterial fitness, such as biofilm formation, protease

production, surface motility and pyoverdine production were affected in the *pstP* mutant. We also investigated the ability of the strain SF39a-451 to colonize the wheat rhizosphere under greenhouse conditions. Interestingly, the mutant was less competitive than the wild-type strain in the rhizosphere.

The mutant SF39a-375 showed an increase in bacteriocin production. The phenotype observed in this mutant resulted from inactivation of the gene *cbrA* which encodes the sensor histidine kinase of the two-component system CbrAB. In *P. aeruginosa* and *P. putida*, the CbrAB is part of the CbrA/Crc pathway: When the CbrAB is activated, CbrB activates the transcription of *crcZ* and this sRNA counteracts Crc function. Crc acts as translational repressor. Mutants *cbrA*⁻, *cbrB*⁻, *crcZ*⁻ y *crc*⁻ derived from *P. fluorescens* SF39a were obtained. *cbrB* and *crcZ* mutants, like *cbrA* mutant (SF39a-375), showed an increase in bacteriocin production, while *crc* mutant displayed a decrease in bacteriocin production with respect to the wild-type. These results indicate that CbrA/Crc pathway controls the bacteriocin production in strain SF39a, probably, by indirect modulation. In addition, *cbrA*, *cbrB*, *crcZ* and *crc* mutants were less competitive than the wild-type strain in the wheat rhizosphere suggesting that a successful establishment of the bacteria in a given habitat would require an intact CbrA/Crc system.

The results obtained in this work contribute information about new regulatory mechanisms involved in the bacteriocin production.

CAPITULO I-
Introducción general



I.1. INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se introducen conceptos generales sobre la rizósfera y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Posteriormente, se profundiza en el tópico “**bacteriocinas**”, objetivo de estudio de esta tesis doctoral, y se brinda información actualizada sobre las aplicaciones potenciales de este tipo de compuestos haciendo hincapié en su importancia en el área agronómica. Finalmente, se plantea la hipótesis y los objetivos de este trabajo.

I.1.1. El rizo-microbioma

La rizósfera, zona estrecha de suelo que rodea las raíces de las plantas, es el hábitat de un inmenso número de microorganismos e invertebrados y, es considerada una de las interfaces más dinámicas sobre la tierra [1]. La rizósfera proporciona una fuente inagotable de nutrientes, como aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos, vitaminas, células muertas y mucílago; los cuales, son liberados por las raíces de las plantas y utilizados por los microorganismos como fuentes de energía o carbono. Como resultado de esto, bacterias, hongos, oomicetos y arqueas se establecen en la rizósfera y dan lugar a un sin número de interacciones con las plantas, tanto antagonistas como mutualistas, que tiene profundos efectos sobre el crecimiento, nutrición y salud de las plantas [1,2] (figura I-1).

Las comunidades microbianas asociadas a las raíces de las plantas suelen referirse como el rizo-microbioma [3]; cuya composición, difiere de aquella presente en la comunidad microbiana del suelo circundante como resultado de la competencia bacteriana por los nutrientes liberados en el entorno de la raíz. Además, la estructura del rizo-microbioma varía en consecuencia a la composición de los exudados radicales; los cuales, cambian a lo largo del sistema radical y según la etapa de desarrollo y el genotipo de la planta [4]. Una gran parte del rizo-microbioma está formado por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). El término PGPR (del inglés **Plant Growth-Promoting Rhizobacteria**) fue definido por primera vez por Kloepper y Schroth (1978) para describir las bacterias del suelo que colonizan la rizósfera, creciendo dentro o alrededor de los tejidos vegetales, y que estimulan el crecimiento de las plantas por varios mecanismos.

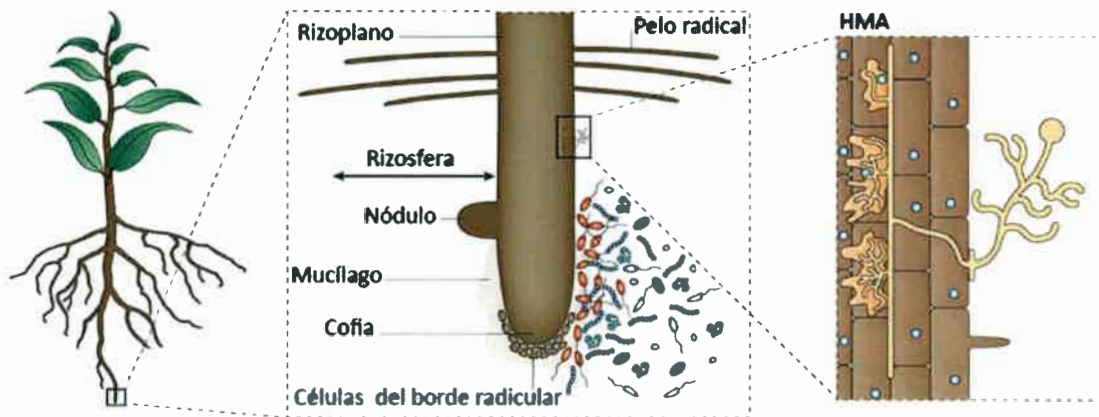


Figura I-1 | **La rizósfera.** Los esquemas representan imágenes magnificadas de la rizósfera conteniendo bacterias y hongos, tanto saprófitos como simbióticos. Dentro de los microorganismos simbióticos se representan los hongos micorrízico-arbusculares (HMA) y bacterias fijadoras de nitrógeno capaces de nodular la raíz. Ambas estructuras favorecen la captación de nutrientes por parte de la planta (figura extraída de Philippot et al. [1]).

Uno de los grupos más estudiados dentro de las PGPRs de vida libre son las bacterias del género *Pseudomonas* [5]. Muchos estudios [6–10] han demostrado que las proteobacterias (por ejemplo, bacterias de la familia *Pseudomonadaceae*) son los miembros dominantes en el microbioma rizósferico (Figura I-2); ya que generalmente son bacterias de rápido crecimiento, R estrategias, y tienen la capacidad de utilizar una amplia gama de fuentes de carbono derivadas de la raíz de la planta [1].

El potencial benéfico del rizo-microbioma puede proporcionar soluciones sostenibles para aumentar la producción de cultivos agrícolas. Durante el último siglo, la industrialización de la agricultura ha provocado un aumento significativo y esencial en la productividad, lo que ha llevado a una mayor cantidad de alimentos disponibles para la población en general. Sin embargo, aparejado a este aumento en la productividad se generan graves problemas ambientales y sociales; los cuales, deben enfrentarse y resolverse en un futuro no muy lejano. Hoy en día, es necesario mantener esta alta productividad; pero, sin alterar el medio ambiente. Claramente debemos dirigirnos hacia una agricultura más sostenible con el medio ambiente, manteniendo los ecosistemas y la biodiversidad. El uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal puede proporcionar soluciones sostenibles para aumentar la producción de los cultivos

agrícolas y disminuir el impacto ambiental negativo que resulta del uso continuado de fertilizantes químicos, herbicidas y pesticidas. Por lo tanto, el estudio de microorganismos PGPRs es cada vez más relevante [11,12].

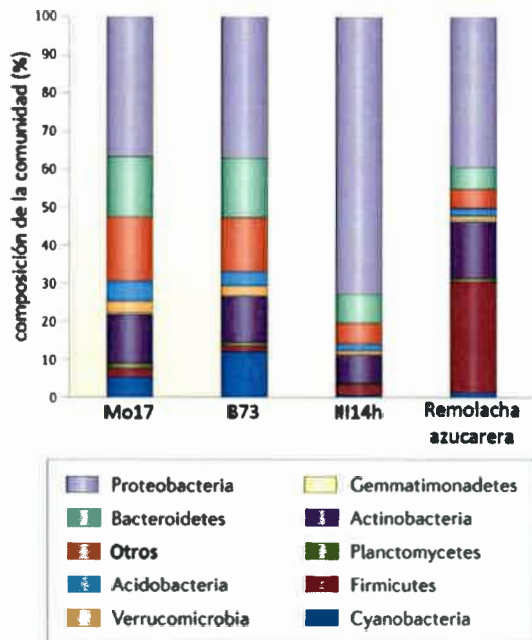


Figura I-2 | **Composición de la comunidad bacteriana en la rizósfera.** La figura muestra la composición bacteriana de la rizósfera de tres genotipos de maíz (Mo17, B73 y III14h) y de remolacha azucarera. La distribución de los diferentes phyla se basa en los datos obtenidos mediante pirosecuenciación para los genotipos de maíz y mediante análisis de PhyloChip G3 para la remolacha azucarera (figura extraída de Philippot et al. [1]).

I.1.2. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las PGPRs son un grupo heterogéneo de microorganismos que incluyen bacterias de diversos géneros, como *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Anabaena*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Frankia*, *Hydrogenophaga*, *Kluyvera*, *Microcoleus*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Vibrio* y *Rhizobium* [13].

Los mecanismos por los cuales las PGPRs promueven el crecimiento de las plantas difieren entre especies y cepas; e incluso, una misma bacteria suele utilizar más de un mecanismo para llevar a cabo la promoción del crecimiento vegetal [14].

Las PGPRs pueden promover el crecimiento de las plantas mediante la **interacción directa** entre la bacteria y su planta huésped o, **indirectamente** por la actividad antagonista de la PGPR contra los fitopatógenos. La **estimulación directa** incluye varios mecanismos, tales

como: (1) aporte de nutrientes a la planta mediante solubilización de fosfato, fijación biológica de nitrógeno y/o producción de sideróforos; (2) secreción de reguladores del crecimiento como auxinas, giberelinas, citoquinas y ciertos volátiles; y (3) reducción de los niveles de etileno, y por consiguiente el estrés, mediante la producción de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa. La **estimulación indirecta** del crecimiento vegetal hace referencia al control biológico de patógenos de plantas; ya sea, por la inducción de la respuesta de resistencia sistémicas de la planta (ISR) o por la inhibición del fitopatógeno mediante antibiosis, interferencia con el Quorum-Sensing o competencia por nutrientes y espacio [11,15].

La antibiosis es uno de los mecanismos de control biológico más estudiado y hace referencia a la producción de compuestos antimicrobianos, como antibióticos, compuestos volátiles y bacteriocinas, los cuales, son perjudiciales para el crecimiento y/o la actividad metabólica de los fitopatógenos. Dentro de las PGPRs, los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* son los más importantes en las prácticas de manejo de enfermedades mediante mecanismos de antibiosis [16].

I.1.3. Las bacteriocinas

Las bacteriocinas constituyen un numeroso y diverso grupo de compuestos antimicrobianos. El término "bacteriocinas" fue establecido por primera vez por Jacob et al. [17] en 1953; sin embargo, dada la gran heterogeneidad de este tipo de antimicrobianos el concepto de bacteriocinas fue cambiando a lo largo del tiempo; e incluso, hoy en día se pueden encontrar diferentes definiciones de este término.

En líneas generales, las bacteriocinas pueden ser definidas como un grupo heterogéneo de compuestos antimicrobianos de naturaleza proteica, producido por bacterias y, capaces de inhibir o matar a otras bacterias, generalmente relacionadas filogenéticamente a la cepa productora. Además, esta familia de compuestos tiene la característica ser producida mediante síntesis ribosomal y presentar mecanismos inmunitarios específicos que protegen a la célula productora del daño de su propia bacteriocina [18,19]. En la tabla I-1 se detallan varios aspectos que diferencian a las bacteriocinas de los antibióticos convencionales [20].

Los científicos han sido conscientes de la actividad inhibitoria de bacterias contra otras bacterias, mucho antes de que las bacteriocinas fueran oficialmente conocidas. Pasteur fue el primero en describir actividad antagónica entre bacterias; pero, recién a mediados de la década

de 1920 la actividad antimicrobiana de péptidos secretados fue reconocida oficialmente. En 1925, Gratia [21] identificó lo que más tarde sería la primera bacteriocina como un compuesto lábil al calor producido por *Escherichia coli* V y tóxico para *E. coli* S. Este compuesto fue llamado colicina V, nombre derivado de la especie productora. Más tarde, Fredericq [22] demostró que las colicinas eran proteínas y que tenían un rango de actividad limitado debido a la presencia o ausencia de receptores específicos en las células sensibles. Desde entonces, las bacteriocinas se han encontrado en casi todas las especies bacterianas examinadas y dentro de una determinada especie, decenas o incluso cientos de tipos diferentes de bacteriocinas pueden ser producidas [23–26]. Además, la identificación de bacteriocinas se ha extendido hasta el dominio Archaea, donde son llamadas específicamente archaeocinas [27].

Por lo tanto, las bacteriocinas se consideran la familia más abundante y diversa de sistemas microbianos de defensa y pueden ser divididas en dos grandes grupos, aquellas producidas por bacterias Gram-positivas y aquellas producidas por bacterias Gram-negativas [28,29].

Tabla I-1 | **Diferencias principales entre las bacteriocinas y los antibióticos**

	Bacteriocinas	Antibióticos
Composición	Proteica	Variable
Síntesis	Ribosomal	No ribosomal (complejos multienzimáticos)
Espectro de actividad Antimicrobiana	Generalmente espectro reducido (especies relacionadas filogenéticamente)	Afectan a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas
Toxicidad/Efectos colaterales	No descriptos	Descriptos
Resistencia/Tolerancia	Generalmente por modificaciones en la composición de la membrana	Genes de resistencia específicos y a múltiples fármacos. transferibles

1.1.3.1. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas

Las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas son tan abundantes como las producidas por Gram-negativas; pero, constituyen un grupo más heterogéneo. En Gram-positivas, los genes que codifican para bacteriocinas se pueden encontrar en plásmidos, en el cromosoma bacteriano o en transposones y la mayoría de éstas, son pequeñas y presentan propiedades anfipáticas; por lo tanto, frecuentemente actúan como péptidos permeabilizantes de la membrana plasmática. La

síntesis de estas bacteriocinas se produce generalmente en el cambio de fase logarítmica a estacionaria y la secreción de las mismas es a través de sistemas de transportes específicos, o bien empleando la vía de exportación sec-dependiente [30–32].

En los últimos 15-20 años, las bacterias ácido-lácticas han sido el foco de las investigaciones sobre bacteriocinas de Gram-positivas. Numerosas bacteriocinas fueron identificadas en este grupo bacteriano y, muchas de ellas se utilizan en productos alimenticios, con el objetivo de prevenir el deterioro de los alimentos. El aumento de la resistencia a antibióticos entre patógenos ha atraído la atención de las bacteriocinas como una alternativa para combatir las infecciones por patógenos [33,34]. Tradicionalmente, las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas son clasificadas en tres grupos: clase I, II y III. La clase I, conocida como lantibióticos, está compuesta por bacteriocinas modificadas postraduccionalmente. Son pequeños péptidos (19-38 aminoácidos) termoresistentes que producen la muerte de la célula sensible dañando la estructura y función de las envolturas celular; por ejemplo, mediante la formación de poros en la membrana plasmática o la inhibición de la síntesis de péptidoglicano. La clase II también incluye bacteriocinas pequeñas (<10 kDa) y estables al calor; pero, a diferencia de los lantibióticos, no están sujetas a extensas modificaciones postraducionales. El mecanismo de acción de la mayoría de los antimicrobianos de este grupo implica la permeabilización de la membrana plasmática y la consecuente pérdida del material intracelular. Por último, la clase III o bacteriolisinas está formada por bacteriocinas grandes y lábiles al calor, que producen la lisis de las células sensibles mediante la hidrólisis de la pared celular [35,36].

El espectro de actividad convencional de las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas se limita solo a otras bacterias Gram-positivas [37]. Este rango de actividad varía significativamente, desde relativamente estrecho como es el caso de las lactococinas A, B y M producidas por *Lactococcus* spp. que matan solo a cepas del mismo género, hasta de muy amplio espectro [38]; por ejemplo, algunos lantibióticos, como la nisina A, que presentan actividad contra cepas de los géneros *Actinomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Gardnerella*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, y *Staphylococcus* [39]. A diferencia del espectro de acción convencional, existen algunas bacteriocinas de bacterias Gram-positivas que también son activas contra bacterias Gram-negativas de importancia clínica [40].

I.1.3.2. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas

Las principales características que diferencian las bacteriocinas de bacterias Gram-negativas de aquellas producidas por Gram-positivas son: (i) su síntesis generalmente es letal para la célula productora, ya que generalmente son liberadas de la célula mediante la lisis de la misma. Mientras que, las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas utilizan sistemas de transporte específicos u, ocasionalmente, la ruta general de secreción (sistema Sec). (ii) generalmente están bajo vías de regulación del huésped, como el sistema SOS, a diferencia de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas que su síntesis está regulada por sistemas de regulación específicos para cada bacteriocina [41].

En bacterias Gram-negativas la producción de bacteriocinas ha sido estudiada principalmente en *E. coli* y en *Pseudomonas aeruginosa* [42,43].

Las bacteriocinas producidas por *E. coli* se dividen en dos grandes grupos, las colicinas y las microcinas. Las colicinas son el modelo típico de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas; mientras que, las microcinas comparten muchas características con las bacteriocinas de Gram-positivas [41].

Las colicinas tienen un peso molecular de 25-80 kDa y se encuentran codificadas en plásmidos. Como principales representantes de bacteriocinas de Gram-negativas, éstas, son reguladas por el sistema SOS; por lo tanto, la producción de colicinas es inducida principalmente en momentos de estrés. Después de la inducción, las moléculas de colicinas son producidas y liberadas, mediante la lisis de la célula productora, en el medio ambiente donde se unen a receptores específicos de las células susceptibles para llevar a cabo su actividad antagónica. El modo de acción de estas toxinas implica tres pasos: unión a receptores específicos, translocación a través de la membrana plasmática (sistema tol o tonB) y, finalmente, expresión de la actividad citotóxica produciendo la muerte de la célula por diferentes mecanismos, como degradación de ADN (colicina E2, E7, E8 y E9), de ARNt (D y E5) o de ARNr 16s (E3, E4 y E6), formación de poros en la membrana plasmática (A, Ia, E1, N, y B) o inhibición de la síntesis de peptidoglicano (colicina M). Las cepas colicinogénicas co-expresan una proteína inmunitaria que la protege de la acción de su propia bacteriocina [43-47].

Las microcinas, a diferencia de las colicinas, son más pequeñas (<10 kDa), pueden estar codificadas en plásmidos o cromosoma y su síntesis no es letal para la cepa productora, ni

dependiente del sistema SOS. Las microcinas se agrupan en dos clases (I y II) según la presencia de aminoácidos modificados postraduccionalmente: las microcinas clase I son péptidos de una masa molecular por debajo de 5 kDa, están sometidos a modificaciones post-traduccionales y ejercen su actividad antimicrobiana sobre dianas intracelulares interfiriendo en el metabolismo de proteínas, ADN o ARN (microcinas B17, C7 y J25); mientras que, la clase II son péptidos de masas moleculares más altas (5-10 kDa), sin extensas modificaciones postraduccionales y cuya diana celular es la membrana celular (microcinas L, CoIV ,24, E492, H47, I47 y M) [45,48].

Las bacteriocinas producidas por *P. aeruginosa* han sido bien caracterizadas y se denominan piocinas, nombre derivado de *Pseudomonas pyocyanea*, antigua nomenclatura de la especie *P. aeruginosa*. Al igual que las colicinas, estas bacteriocinas son reguladas por el sistema SOS y su síntesis es letal para la célula productora; pero, a diferencia de aquellas, se encuentran codificadas en el cromosoma de la bacteria productora. Las piocinas han sido clasificadas en tres tipos en base a su estructura y mecanismo de acción: piocinas tipo R, tipo F y tipo S. Las piocinas tipo R y F son complejos proteicos de alto peso molecular similares a colas de bacteriófagos que ejercen su mecanismo antimicrobiano mediante la formación de poros en la envoltura celular; mientras que, las piocinas tipo S son bacteriocinas solubles y similares a las colicinas tanto en estructura como en mecanismos de acción. Las piocinas S pueden tener actividad DNasa, rRNasa, tRNasa, formadora de poros en la membrana plasmática o bloqueadora de la síntesis de peptidoglicano según el tipo de piocina S que se trate. La capacidad de producir piocinas está ampliamente extendida en *P. aeruginosa*, y cada cepa es capaz de sintetizar más de un tipo de piocina. Más del 90% de las cepas de *P. aeruginosa* producen piocinas tipo R o F, y el 70% de ellas también producen piocinas tipo S [42,49].

I.1.4. Rol ecológico y aplicación de las bacteriocinas

Teniendo en cuenta que la producción de bacteriocinas fue detectada en todos los grupos de procariotas investigados hasta el momento, sin duda, estos compuestos cumplen algún rol en las comunidades microbianas [24].

En el medio ambiente, las bacterias utilizan la actividad antagónica de las bacteriocinas como una herramienta para competir por nutrientes y espacio, y de esta forma, asegurar la persistencia de la población sobre la de sus competidores bacterianos. Las bacteriocinas pueden

permitir la invasión de una cepa bacteriocinogénica en una comunidad microbiana establecida, o bien, jugar un papel defensivo impidiendo la invasión de otras cepas en su nicho ecológico [18,50].

Los seres humanos han sabido explotar, para su propio beneficio, los compuestos antimicrobianos producidos por los microorganismos, claro ejemplo, es la aplicación de los antibióticos convencionales para el tratamiento de enfermedades infecciosas. En el caso de las bacteriocinas, se conoce su alto potencial para ser aplicadas en medicina, en el área agronómica y por supuesto, en la industria alimenticia donde se vienen aplicando con éxito desde 1953 [41,51,52].

1.1.4.1. Aplicaciones de las bacteriocinas en la industria alimenticia

La industria alimenticia se enfrenta a un entorno en donde los consumidores exigen alimentos seguros con una larga vida útil; pero, con preferencia hacia los productos mínimamente procesados sin conservantes químicos [36].

Las bacterias lácticas bacteriocinogénicas y/o sus bacteriocinas representan una salida para esta situación. Las mismas, son utilizadas en la bioconservación de los alimentos para: (1) mejorar la seguridad higiénico-sanitaria de los alimentos y extender su vida útil, mediante la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos y/o alterantes presentes en los alimentos o (2) mejorar la calidad y características organolépticas de diversos alimentos (por ej.: quesos y vinos), mediante el control de la flora láctica que no forma parte del cultivo iniciador o, mediante la lisis de las bacterias lácticas empleadas como cultivos iniciadores provocando la liberación de sus enzimas intracelulares y, por lo tanto, la aceleración de su maduración [20].

Las bacteriocina nisina (bacteriocina de clase I o lantibiótico) producida por *Lactococcus lactis* y la pediocina PA1 (bacteriocina de clase II o no-lantibiótico) producida por *Pediococcus acidilactici* son comercializadas para la bioconservación de alimentos como los productos Nisaplin™ (descripción del producto-PD45003-7EN; Danisco, Copenhague, Dinamarca) y ALTA™ 2431 (Kerry Bioscience, Carrigaline, Co. Cork, Irlanda), respectivamente [52]. La nisina es utilizada en más de 50 países, tiene aprobación de la FAO (Food and Agriculture Organization) y de la FDA (Food and Drug Administration) como aditivo alimentario seguro y se vende como un bioconservante natural para diferentes tipos de alimentos [53]. Este producto

es efectivo en numerosos sistemas alimentarios ya que inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas transmitidas por los alimentos, incluyendo, patógenos como *Listeria monocytogenes*. Se utiliza principalmente en carne enlatada y productos lácteos y, es especialmente eficaz en la producción de quesos donde protege contra la propagación de bacterias formadoras de esporas como *Bacillus* y *Clostridium* [52]. La pediocina PA1 ha recibido mucha atención como biopreservante de alimentos debido a su capacidad para proteger a la carne fresca y fermentada de la contaminación por *L. monocytogenes*. La forma comercial ALTA™ 2431 se basa en fermentos de bacterias ácido-lácticas generados a partir de una cepa de *P. acidilactici* productora de pediocina PA1 y su uso está cubierto por varias patentes estadounidenses y europeas [36,52].

1.1.4.2. Aplicaciones de las bacteriocinas en medicina

Tras el descubrimiento de la penicilina en 1928, una gran cantidad de antibióticos con actividad contra patógenos humanos han sido descubiertos. Hoy en día, se conocen más de 100 tipos diferentes de antibióticos, los cuales, han sido exitosamente aplicados para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Sin embargo, el uso intensivo de estos antimicrobianos ha llevado a la emergencia de patógenos multiresistentes y, la administración de antibióticos de amplio espectro produce la muerte de la microbiota comensal, la cual, tiene funciones clave en la salud del huésped [18,51,54].

Las bacteriocinas tienen muchas propiedades para ser consideradas una alternativa a los antibióticos convencionales. Éstas incluyen, su potencia contra importantes patógenos humanos, su espectro de acción estrecho, su baja toxicidad, la posibilidad de la producción de bacteriocinas in situ por probióticos y su naturaleza proteica que las hacen más maleables mediante bioingeniería [54].

La eficacia de las bacteriocinas contra patógenos humanos ha sido demostrada tanto in vitro como in vivo. Por ejemplo, varios investigadores informaron la capacidad del lantibiótico nisina F de controlar al patógeno *Staphylococcus aureus* in vivo. Kwaadsteniet et al. [55] y Brand et al. [56] observaron que esta bacteriocina suprime el crecimiento de *S. aureus* en las vías respiratorias y en la cavidad intraperitoneal de ratas, respectivamente. La importancia de las piocinas de *P. aeruginosa* para uso terapéutico también fue informada [49]. Por ejemplo, la piocina S2 presenta una potente actividad (significativamente mayor que los antibióticos

convencionales tobramicina o aztreonam) contra diferentes aislados clínicos de *P. aeruginosa*, incluso, cuando éstos crecen en forma de biofilm [57].

Una característica relevante de las bacteriocinas es su espectro de actividad relativamente estrecho, lo cual, permite extender la vida útil del antimicrobiano ya que al emplearse con poca frecuencia y estar dirigidos a un patógeno en particular resulta en una reducción en la selección de patógenos resistentes y, además, menor daño sobre la flora normal humana. El uso de antimicrobianos de espectro de acción estrecho es ideal en ciertas circunstancias. La diarrea asociada a *Clostridium difficile* (CDAD) es un claro ejemplo de tal situación: *C. difficile* se beneficia competitivamente por el desbalance en la microbiota inducido por antibióticos. Por lo tanto, es capaz de prosperar en este ambiente alterado y, posteriormente, desarrollar la enfermedad, la cual, requiere un tratamiento adicional con antibióticos. En el mejor de los casos, el tratamiento puede resolver el problema; pero, muchas veces conduce a un mayor desbalance de la población comensal causando que la enfermedad se repita con frecuencia. La bacteriocina de espectro reducido turicina CD producida por *Bacillus thuringiensis* es capaz de inhibir a *C. difficile* y presenta una actividad antimicrobiana comparable a la de los antibióticos vancomicina y metronidazol que se utilizan convencionalmente para tratar CDAD. Además, la turicina CD no altera significativamente la composición de la microbiota comensal; mientras que, la vancomicina y el metronidazol provocan un aumento dramático en el abundancia de organismos del phylum Proteobacteria a expensas de organismos de otros phyla [54,58–60] (figura I-3).

Por otro lado, no se puede ignorar la existencia de muchas bacteriocinas que exhiben un espectro antimicrobiano amplio. Como en el caso de los antibióticos de amplio espectro, este, es un rasgo interesante para tratamiento de infecciones de etiología desconocida; pero, siempre teniendo conciencia del potencial daño de la microbiota humana que puede ser causado por el uso de estos antimicrobianos [54].

Por lo tanto, el hecho de contar con una gran variedad de bacteriocinas activas contra patógenos humanos, la mayoría de espectro reducido y muchas otras de amplio espectro, permitiría elegir la mejor opción para cada circunstancia en particular.

El desarrollo de productos comerciales a base de bacteriocinas para ser aplicados en el área de la salud humana aún se encuentra en proceso, la falta de inversión ha sido un problema significativo en este aspecto. Sin embargo, hay evidencia que sugieren que esta cuestión se está abordando ya que varias bacteriocinas están siendo desarrolladas para su aplicación en la salud

humana en el futuro [54]. Incluso, la bacteriocina sintética Mu1140-S (derivada del lantibiótico 1140) ya está siendo producida por Oragenics, Inc. para su uso en la prevención de caries dentales.

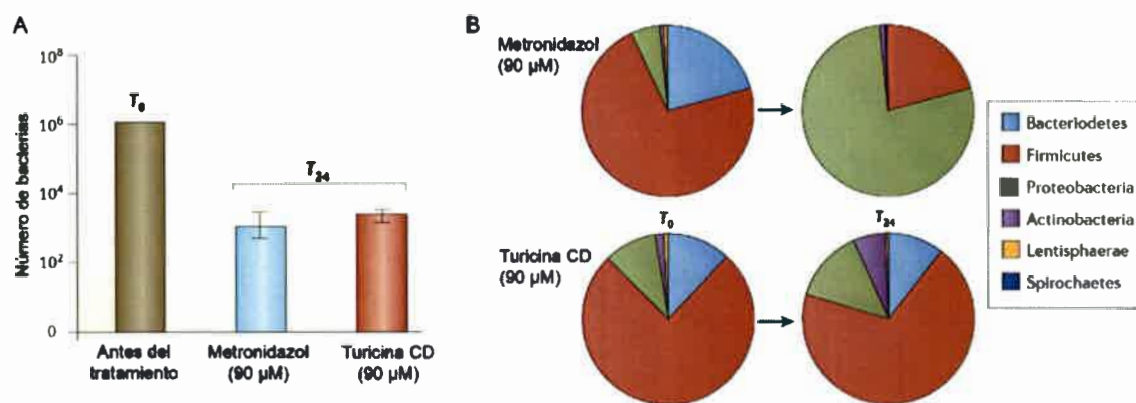


Figura I-3 | **Espectro de acción estrecho de las bacteriocinas.** Efecto de la bacteriocina turicina CD y el antibiótico metronidazol sobre *C. difficile* (A) y la microbiota intestinal (B) a las 24 hs (T₂₄) (figura extraída de Cotter et al.[54])

1.1.4.3. Aplicaciones de las bacteriocinas en el área agronómica

Hay tres aspectos dentro del área agronómica en donde se ha estudiado el potencial de las bacteriocinas:

(1) Biocontrol de cepas fitopatógenas: A pesar que la mayoría de los estudios han sido focalizados en el control biológico de bacterias de interés clínico, varios trabajos han demostrado que las bacteriocinas pueden ser eficaces en el tratamiento de enfermedades bacterianas en plantas. Por ejemplo, *Serratia plymthicum* produce una bacteriocina similar a colas de bacteriófagos llamada serracina P, que presenta actividad antibacteriana contra *Erwina amylovora*, el agente causal de la niebla del peral y del manzano, una costosa enfermedad para la industria frutícola [61]. Por otra parte, Lavermicocca *et al.* [62] informaron el uso de la bacteriocina producida por *Pseudomonas syringae* pv. *ciccarone* en la prevención de la enfermedad del nudo del olivo causada por *P. syringae* pv. *savastanoi*. Estos investigadores observaron una reducción del 60-80% en la formación de nudos y una disminución de

aproximadamente 400 veces en el crecimiento epifítico del patógeno cuando las plantas fueron tratadas con el extracto crudo de bacteriocinas.

En varios países del mundo se utiliza *Agrobacterium radiobacter* K84, productor de la bacteriocina agrocina 84 (Norbac-84-C Galltroll-A), y su derivado *A. radiobacter* K1026 (NoGall), para el control biológico de la agalla de la corona causada por *Agrobacterium tumefaciens* [63]. También, se encuentra bajo investigación el uso de cepas avirulenta de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* productoras de bacteriocinas, para el control de *E. carotovora* subsp. *carotovora* que causa la pudrición blanda en varios cultivos de importancia económica. Por ejemplo, en Japón se ha desarrollado un agente de control biológico para esta enfermedad llamado Biokeeper (Central Glass Co., Japan), que presenta como ingrediente activo una cepa de *E. carotovora* no patógena [64].

Las bacterias son responsables de una proporción significativa de los más de 100 mil millones de libras perdidos por año en el mundo a causa del deterioro de los cultivos por patógenos de plantas. Las estrategias actuales para el control de estos patógenos son de eficacia limitada y en muchos casos, dañinos para la salud humana y el medio ambiente. Por lo tanto, el desarrollo de estrategias alternativas, como la aplicación de bacteriocinas, es importante tanto desde una perspectiva económica como humanitaria [65,66].

(2) Desarrollo de inoculantes competitivos: en inciso I.1.1. se planteó la importancia de utilizar inoculantes basados en bacterias PGPRs para mejorar el rendimiento de los cultivos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que para una óptima promoción del crecimiento vegetal, las PGPRs deben contar con ciertas propiedades: (1) deben ser capaces de colonizar la raíz de la planta, (2) deben sobrevivir en el microhábitat asociado a la superficie radical en competencia con otros microorganismos un tiempo suficiente para expresar sus actividades de promoción, y por último (3), deben promover efectivamente el crecimiento vegetal [67]. Por lo tanto, la competitividad es una característica muy importante en la agricultura y, uno de los factores principales a tener en cuenta a la hora de formular un bioinoculante.

Las cepas bacteriocinogénicas son consideradas más competitivas y capaces de colonizar nuevos nichos. Varios estudios realizados en bacterias PGPRs demuestran tal hipótesis. Por ejemplo, *Bradyrhizobium elkanii* USDA94, cepa productora de la bacteriocina rizobitoxina, tiene una ventaja competitiva 10 veces mayor que mutantes deficientes en la producción de este compuesto, aumentando de esta manera la nodulación en plantas de Siratro [68]. Además,

Validov et al. [69] realizaron ensayos de colonización en raíces de trigo utilizando diferentes cepas de *Pseudomonas* spp. fluorescentes productoras del antibiótico 2,4-diacetilfloroglucinol y observaron que aquellas cepas que eran capaces de producir bacteriocinas provocaban un rápido desplazamiento de su correspondiente cepa sensible.

Por lo tanto, la utilización de cepas bacteriocinogénicas sería de gran importancia para la producción de inoculantes eficientes y competidores.

(3) Bioestimulación del crecimiento vegetal: este es el aspecto menos estudiado en relación a los efectos positivos de las bacteriocinas en el campo de la agronomía. Algunos trabajos han informado que las bacteriocinas, como tal, son capaces de estimular el crecimiento vegetal. Dicha propiedad se ha observado en el género *Bacillus*, en donde se le atribuye a la bacteriocina turicina 17 de la cepa *B. thuringiensis* NEB17 la capacidad de promover el crecimiento de plantas leguminosas y no leguminosas [70]. Lee et al., [71] demostraron que la aplicación de la turicina 17 sobre las hojas o raíces estimula directamente el crecimiento vegetal tanto de una dicotiledónea C3, como la soja, como de una monocotiledónea C4, como el maíz. Estos investigadores indicaron que esta estimulación del crecimiento tiene una naturaleza similar a la observada cuando las plantas son tratadas con factores Nod.

I.1.5. Antecedentes en nuestro laboratorio

En nuestro laboratorio se dispone de una colección de *Pseudomonas* spp. nativas aisladas de la rizósfera de trigo y maíz de campo de la región de Córdoba con capacidad para promover el crecimiento de maíz, trigo y/o tomate en condiciones de invernadero. Estas cepas, son capaces de producir sideróforos, solubilizar fosfato o producir fitohormonas como mecanismos promotores del crecimiento vegetal [72,73]. Además, algunas de las cepas nativas de *Pseudomonas fluorescens* presentan actividad antagonica *in vitro* contra hongos fitopatógenos, como *Sclerotinia minor*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium solani* y *Fusarium proliferatum* [72,74]. La inhibición del crecimiento micelial de *F. proliferatum*, por ejemplo, es mediada por compuestos volátiles [75].

P. fluorescens SF39a es una de las cepas nativas de la colección del laboratorio con capacidad para promover el crecimiento de trigo. Esta cepa, fue aislada de la rizósfera de dicho cultivo y presenta la capacidad de producir sideróforos y solubilizar fosfato como mecanismo PGPR. *P. fluorescens* SF39a es la cepa elegida para el desarrollo de esta tesis doctoral por ser



capaz de inhibir, *in vitro*, a otras cepas bacterianas estrechamente relacionadas mediante la producción de compuestos antimicrobianos tipo bacteriocinas.

I.2. HIPÓTESIS

La cepa nativa *Pseudomonas fluorescens* SF39a es capaz de producir bacteriocinas, las cuales, son reguladas por sistemas regulatorios globales del huésped. La caracterización de bacteriocinas y el entendimiento de sus mecanismos de regulación contribuirán significativamente al desarrollo de productos biotecnológicos a base de bacteriocinas.

I.3. OBJETIVOS

Objetivo general:

Caracterizar a nivel genético moléculas implicadas en la competencia de *Pseudomonas* nativas y en el biocontrol de fitopatógenos. Comprender dichos mecanismos resulta fundamental para entender las bases moleculares de una interacción planta-bacteria efectiva

Objetivos específicos:

1. Caracterizar la bacteriocina sintetizada por la cepa nativa *P. fluorescens* SF39a.
2. Identificar genes implicados en la producción y regulación de bacteriocinas.
3. Estudiar uno de los sistemas regulatorios que afecta la producción de bacteriocinas.
4. Analizar la competitividad de *P. fluorescens* SF39a, y de mutantes afectados en la producción de bacteriocinas, en la rizósfera de plantas de importancia agronómica.

I.4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:789–99. doi:10.1038/nrmicro3109.
- [2] Rudrappa T, Biedrzycki ML, Bais HP. Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiol Ecol* 2008;64:153–66. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00465.x.
- [3] Chaparro JM, Badri D V., Bakker MG, Sugiyama A, Manter DK, Vivanco JM. Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS One* 2013;8:e55731. doi:10.1371/journal.pone.0055731.
- [4] Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud M-L, Touraine B, Moëgne-Loccoz Y, Muller D, et al. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci* 2013;4:1–19. doi:10.3389/fpls.2013.00356.
- [5] Molina L, Ramos C, Duque E, Ronchel MC, García JM, Wyke L, et al. Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biol Biochem* 2000;32:315–21. doi:10.1016/S0038-0717(99)00156-X.
- [6] DeAngelis KM, Brodie EL, DeSantis TZ, Andersen GL, Lindow SE, Firestone MK. Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. *ISME J* 2009;3:168–78. doi:10.1038/ismej.2008.103.
- [7] Gomes NCM, Heuer H, Schönfeld J, Costa R, Smalla K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant Soil* 2001;232:167–80. doi:10.1023/A:1010350406708.
- [8] Peiffer JA, Spor A, Koren O, Jin Z, Tringe SG, Dangl JL, et al. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:6548–53. doi:10.1073/pnas.1302837110.
- [9] Sharma S, Aneja MK, Mayer J, Munch JC, Schloter M. Characterization of bacterial

- community structure in rhizosphere soil of grain legumes. *Microb Ecol* 2005;49:407–15. doi:10.1007/s00248-004-0041-7.
- [10] Uroz S, Buée M, Murat C, Frey-Klett P, Martin F. Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. *Environ Microbiol Rep* 2010;2:281–8. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00117.x.
- [11] Pérez-Montaño F, Alías-Villegas C, Bellogín RA, Del Cerro P, Espuny MR, Jiménez-Guerrero I, et al. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiol Res* 2014;169:325–36. doi:10.1016/j.micres.2013.09.011.
- [12] Lareen A, Burton F, Schäfer P. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant Mol Biol* 2016;1–13. doi:10.1007/s11103-015-0417-8.
- [13] Bashan Y, Puente M E., de-Bashan L E. Environmental uses of plant growth-promoting bacteria. In: Barka EA, Clément C, editors. *Plant-Microbe Interact., Kerala, India: Research Signpost; 2008, p. 69–93.*
- [14] de Souza R, Ambrosini A, Passaglia LMP. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet Mol Biol* 2015;38:401–19. doi:10.1590/S1415-475738420150053.
- [15] Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 2009;63:541–56. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162918.
- [16] Saraf M, Pandya U, Thakkar A. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiol Res* 2014;169:18–29. doi:10.1016/j.micres.2013.08.009.
- [17] Jacob F, Lwoff A, Siminovitch A, Wollman E. Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Ann Inst Pasteur* 1953;84:222–4.
- [18] Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol* 2014;5:1–10. doi:10.3389/fmicb.2014.00241.
- [19] Riley MA. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annu Rev Genet* 1998;32:255–78. doi:10.1146/annurev.genet.32.1.255.

- [20] Basanta Díaz A. Evaluación de la enterocina L50 (L50A y L50B) de *Enterococcus faecium* 150 como bioconservante de la cerveza. Producción y secreción heteróloga de las enterocinas 150A y 150B en *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Madrid: Universidad Complutense De Madrid; 2009.
- [21] Gratia A. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de coilbacille. *Comp Rend Soc Biol* 1925;93:1040–1.
- [22] Fredericq P. Sur la pluralité des récepteurs d'antibiose de *E. coli*. *CR Soc Biol* 1946;140:1189–94.
- [23] Riley MA, Wertz JE. Bacteriocin diversity: Ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* 2002;84:357–64. doi:10.1016/S0300-9084(02)01421-9.
- [24] Riley MA. Bacteriocins, Biology, Ecology, and Evolution. In: Moselio S, editor. *Encycl. Microbiol.*, Oxford: Elsevier; 2009, p. 32–44.
- [25] Parret AHA, Wyns L, De Mot R, Loris R. Overexpression, purification and crystallization of bacteriocin LlpA from *Pseudomonas* sp. BW11M1. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 2004;60:1922–4. doi:10.1107/S0907444904020153.
- [26] Snyder AB, Worobo RW. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: Antimicrobial peptides for food safety. *J Sci Food Agric* 2014;94:28–44. doi:10.1002/jsfa.6293.
- [27] Besse A, Peduzzi J, Rebuffat S, Carré-Mlouka A. Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: Lessons from archaeocins. *Biochimie* 2015:1–12. doi:10.1016/j.biochi.2015.06.004.
- [28] Heng NCK, Wescombe PA, Burton JP, Jack RW, Tagg JR. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In: Riley MA, Chavan M, editors. *Bacteriocins Ecol. Evol.*, Berlin: Springer; 2007, p. 45–92.
- [29] Gordon DM, Oliver E, Littlefield-Wyer J. The diversity of bacteriocins in Gram-negative bacteria. In: Riley MA, Chavan M, editors. *Bacteriocins Ecol. Evol.*, Berlin: Springer; 2007, p. 5–18.
- [30] Maqueda M, Sánchez-Hidalgo M, Fernández M, Montalbán-López M, Valdivia E, Martínez-Bueno M. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive

- bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2008;32:2–22. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00087.x.
- [31] Gillor O, Vriezen JAC, Riley MA. The role of SOS boxes in enteric bacteriocin regulation. *Microbiology* 2008;154:1783–92. doi:10.1099/mic.0.2007/016139-0.
- [32] Drider D, Fimland G, Héchard Y, McMullen LM, Prévost H. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006;70:564–82. doi:10.1128/MMBR.00016-05.
- [33] Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* 2001;71:1–20. doi:10.1016/S0168-1605(01)00560-8.
- [34] Nes IF, Diep DB, Holo H. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Bacteriol* 2007;189:1189–98. doi:10.1128/JB.01254-06.
- [35] Mazzoli R, Bosco F, Mizrahi I, Bayer EA, Pessione E. Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnol Adv* 2014;32:1216–36. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.07.005.
- [36] Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Food Microbiol* 2005;3:777–88. doi:10.1038/nrmicro1240.
- [37] Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol* 2002;56:117–37. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.161024.
- [38] Martínez-Cuesta MC, Requena T, Peláez C. Cell membrane damage induced by lacticin 3147 enhances aldehyde formation in *Lactococcus lactis* IFPL730. *Int J Food Microbiol* 2006;109:198–204. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.028.
- [39] Mota-Meira M, Morency H, Lavoie MC. In vivo activity of mutacin B-Ny266. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:869–71. doi:10.1093/jac/dki295.
- [40] Morency H, Mota-Meira M, LaPointe G, Lacroix C, Lavoie MC. Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Can J Microbiol* 2001;47:322–31. doi:10.1139/cjm-47-4-322.
- [41] Gillor O, Nigro LM, Riley MA. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. *Curr Pharm Des* 2005;11:1067–75. doi:10.2174/1381612053381666.

- [42] Michel-Briand Y, Baysse C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 2002;84:499–510. doi:10.1016/S0300-9084(02)01422-0.
- [43] Cascales E, Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Llobès R, Postle K, et al. Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007;71:158–229. doi:10.1128/MMBR.00036-06.
- [44] Barreteau H, Tiouajni M, Graille M, Josseaume N, Bouhss A, Patin D, et al. Functional and Structural Characterization of PaeM, a Colicin M-like Bacteriocin Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 2012;287:37395–405. doi:10.1074/jbc.M112.406439.
- [45] Budič M, Rijavec M, Petkovšek Ž, Žgur-Bertok D. *Escherichia coli* bacteriocins: Antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia. *PLoS One* 2011;6:e28769. doi:10.1371/journal.pone.0028769.
- [46] Kim YC, Tarr AW, Penfold CN. Colicin import into *E. coli* cells: A model system for insights into the import mechanisms of bacteriocins. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2014;1843:1717–31. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.04.010.
- [47] Kleanthous C. Swimming against the tide: progress and challenges in our understanding of colicin translocation. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:843–8. doi:10.1038/nrmicro2454.
- [48] Karpiński TM, Szkaradkiewicz AK. Characteristic of bacteriocines and their application. *Polish J Microbiol* 2013;62:223–35.
- [49] Ghequire MGK, De Mot R. Ribosomally encoded antibacterial proteins and peptides from *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Rev* 2014;38:523–68. doi:10.1111/1574-6976.12079.
- [50] Majeed H, Gillor O, Kerr B, Riley MA. Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. *ISME J* 2011;5:71–81. doi:10.1038/ismej.2010.90.
- [51] Nigam A, Gupta D, Sharma A. Treatment of infectious disease: Beyond antibiotics. *Microbiol Res* 2014;169:643–51. doi:10.1016/j.micres.2014.02.009.
- [52] Deegan LH, Cotter PD, Hill C, Ross P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int Dairy J* 2006;16:1058–71. doi:10.1016/j.idairyj.2005.10.026.
- [53] Shin JM, Gwak JW, Kamarajan P, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. Biomedical

- applications of nisin. *J Appl Microbiol* 2015;1–17. doi:10.1111/jam.13033.
- [54] Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins: a viable alternative to antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:95–105. doi:10.1038/nrmicro2937.
- [55] De Kwaadsteniet M, Doeschate KT, Dicks LMT. Nisin F in the treatment of respiratory tract infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol* 2009;48:65–70. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02488.x.
- [56] Brand AM, De Kwaadsteniet M, Dicks LMT. The ability of nisin F to control *Staphylococcus aureus* infection in the peritoneal cavity, as studied in mice. *Lett Appl Microbiol* 2010;51:645–9. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02948.x.
- [57] Smith K, Martin L, Rinaldi A, Rajendran R, Ramage G, Walker D. Activity of pyocin S2 against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:1599–601. doi:10.1128/AAC.05714-11.
- [58] Nelson RI, Kelsey P, Leeman H, Meardon N, Patel H, Paul K, et al. Antibiotic treatment for *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;9:CD004610. doi:10.1002/14651858.CD004610.pub4.
- [59] Rea MC, Dobson A, O’Sullivan O, Crispie F, Fouhy F, Cotter PD, et al. Effect of broad- and narrow-spectrum antimicrobials on *Clostridium difficile* and microbial diversity in a model of the distal colon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:4639–44. doi:10.1073/pnas.1001224107.
- [60] Rea MC, Sit CS, Clayton E, O’Connor PM, Whittall RM, Zheng J, et al. Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:9352–7. doi:10.1073/pnas.0913554107.
- [61] Jabrane A, Sabri A, Compère P, Jacques P, Vandenberghe I, Van Beeumen J, et al. Characterization of serracin P, a phage-tail-like bacteriocin, and its activity against *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:5704–10. doi:10.1128/AEM.68.11.5704-5710.2002.
- [62] Lavermicocca P, Lonigro SL, Valerio F, Evidente A, Visconti A. Reduction of olive knot disease by a bacteriocin from *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei*. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:1403–7. doi:10.1128/AEM.68.3.1403-1407.2002.

- [63] Kim J-G, Park BK, Kim S-U, Choi D, Nahm BH, Moon JS, et al. Bases of biocontrol: sequence predicts synthesis and mode of action of agrocin 84, the Trojan horse antibiotic that controls crown gall. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:8846–51. doi:10.1073/pnas.0602965103.
- [64] Chuang DY, Chien YC, Wu HP. Cloning and expression of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* gene encoding the low-molecular-weight bacteriocin carocin S1. *J Bacteriol* 2007;189:620–6. doi:10.1128/JB.01090-06.
- [65] Grinter R, Milner J, Walker D. Bacteriocins active against plant pathogenic bacteria. *Biochem Soc Trans* 2012;40:1498–502. doi:10.1042/BST20120206.
- [66] Montesinos E. Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiol Lett* 2007;270:1–11. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00683.x.
- [67] Barea JM, Pozo MJ, Azcón R, Azcón-Aguilar C. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J Exp Bot* 2005;56:1761–78. doi:10.1093/jxb/eri197.
- [68] Okazaki S, Yuhashi KI, Minamisawa K. Quantitative and time-course evaluation of nodulation competitiveness of rhizobitoxine-producing *Bradyrhizobium elkanii*. *FEMS Microbiol Ecol* 2003;45:155–60. doi:10.1016/S0168-6496(03)00132-6.
- [69] Validov S, Mavrodi O, De La Fuente L, Boronin A, Weller D, Thomashow L, et al. Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol Lett* 2005;242:249–56. doi:10.1016/j.femsle.2004.11.013.
- [70] Subramanian S, Smith DL. Bacteriocins from the rhizosphere microbiome - from an agriculture perspective. *Front Plant Sci* 2015;6:909. doi:10.3389/fpls.2015.00909.
- [71] Lee KD, Gray EJ, Mabood F, Jung WJ, Charles T, Clark SRD, et al. The class IIb bacteriocin thuricin-17 increases plant growth. *Planta* 2009;229:747–55. doi:10.1007/s00425-008-0870-6.
- [72] Cordero P, Cavigliasso A, Príncipe A, Godino A, Jofré E, Mori G, et al. Genetic diversity and antifungal activity of native *Pseudomonas* isolated from maize plants grown in a central region of Argentina. *Syst Appl Microbiol* 2012;35:342–51. doi:10.1016/j.syapm.2012.04.005.

- [73] Fischer SE, Fischer SI, Magris S, Mori GB. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. *World J Microbiol Biotechnol* 2007;23:895–903. doi:10.1007/s11274-006-9312-4.
- [74] Fischer SE, Jofré EC, Cordero P, Gutiérrez Mañero FJ, Mori GB. Survival of native *Pseudomonas* in soil and wheat rhizosphere and antagonist activity against plant pathogenic fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2010;97:241–51. doi:10.1007/s10482-009-9405-9.
- [75] Cordero P, Príncipe A, Jofré E, Mori G, Fischer S. Inhibition of the phytopathogenic fungus *Fusarium proliferatum* by volatile compounds produced by *Pseudomonas*. *Arch Microbiol* 2014;196:803–9. doi:10.1007/s00203-014-1019-6.

CAPITULO II -

Caracterización de la bacteriocina
producida por *P. fluorescens* SF39a

A large, dark brown Roman numeral 'II' is centered on a vertical rectangular background with a textured, light orange or tan color. The background has a subtle, wavy pattern.

II.1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años ha habido un creciente interés en la identificación y caracterización de bacteriocinas debido al potencial de estos compuestos para ser aplicados en la industria alimenticia, en medicina y en el área agronómica.

En esta sección, se aborda el estudio de la producción de bacteriocinas en la PGPR *P. fluorescens* SF39a desde diferentes perspectivas y se logra caracterizar una bacteriocina producida por dicha cepa.

II.1.1. Caracterización de bacteriocinas en el género *Pseudomonas*

Las bacterias del género *Pseudomonas* son capaces de habitar una gran diversidad de nichos, desde ambientes terrestres y acuáticos, hasta tejidos humanos. La especie *P. aeruginosa* recibe mayor atención ya que es uno de los principales patógenos oportunistas humanos y, consecuentemente, capaz de causar graves infecciones intrahospitalarias [1,2]. Los principales trabajos sobre compuestos antimicrobianos son realizados en la especie *P. aeruginosa* y, por lo tanto, dicha especie cuenta con las bacteriocinas mejores caracterizadas del género *Pseudomonas*.

Como se mencionó en el capítulo anterior, las bacteriocinas producidas por *P. aeruginosa* son llamadas piocinas y clasificadas en tres tipos: piocinas tipo S, tipo R y tipo F. Recientemente, fue propuesto agrupar a las piocinas R y F bajo el término tailocinas [2,3].

II.1.1.1. Tailocinas: piocinas tipo R y tipo F

Las tailocinas son partículas multiproteicas morfológicamente similares a colas de bacteriófagos, con una estructura contráctil en el caso de las piocinas R y flexible en las tipo F. A diferencia de los fagos, estos tipos de piocinas carecen de cápside, no contienen ADN, y por lo tanto no replican en las células sensibles. Todas las piocinas R y F son nucleasa y proteasa resistente [4–6].

La estructura de las piocinas tipo R consiste en un doble cilindro compuesto por una vaina externa contráctil y un núcleo central (figura II-1). La vaina está compuesta por subunidades proteicas dispuestas como una hélice simétrica con capacidad para contraerse, exponiendo de esta manera el núcleo central presente en su interior. La partícula de piocina presenta en el

extremo distal una placa base acompañada de seis fibras de la cola. Las fibras consisten en una subunidad proteica y, la composición de su extremo C-terminal le confiere la especificidad de unión a los receptores presentes en las células sensibles [2,7]. La primera piocina R fue descrita por Kageyama en 1964 y se denominó piocina R1. Luego fueron identificadas más variantes de este tipo de bacteriocinas, conociéndose hasta el momento 5 subtipos: R1 [8], R2, R3, R4 [9] y R5 [10].

Las piocinas F están constituidas por una varilla flexible y no contráctil formada por 23 anillos proteicos, uno de sus extremos es cuadrado y el otro se afina hasta terminar en una estructura fibrosa que presenta varios filamentos cuya composición química determina la especificidad de unión a la superficie de las células sensibles [2,7] (figura II-1). La Piocina 28 fue la primera piocina tipo F identificada y se obtuvo por inducción de cultivos de *P. aeruginosa* P28 con mitomicina C [11]. El mismo tipo de partícula (llamada 430f) fue encontrada en *P. aeruginosa* 430, la cual también producía una piocina tipo R [12]. Posteriormente, se describieron las piocinas F1, F2 [13] y F3 [14].

Los distintos subtipos de piocinas, tanto de las tipo R como de las tipo F, son similares en cuanto a su estructura y propiedades serológicas; pero, difieren en la especificidad de unión al receptor, lo que les confiere diferencias en el espectro de acción. Las proteínas de las fibras de la cola han sido propuestas como la principal diferencia entre estos subtipos [15,16].

Estos tipos de bacteriocinas producen la muerte de las células sensibles mediante despolarización de la membrana plasmática [17]. Este mecanismo de acción es bien conocido para las piocinas tipo R e implica, en primer lugar, la unión de la bacteriocina a receptores específicos presentes en la superficie de las células sensibles mediante las fibras de la cola. Inmediatamente después de la adsorción, se produce la contracción de la vaina y el núcleo central penetra a través de la membrana externa. Lo que resulta, en la formación de poros en la membrana citoplasmática causando la despolarización de la misma, detención de la síntesis de macromoléculas, pérdida de material intracelular y, en última instancia, la muerte celular [2,18,19].

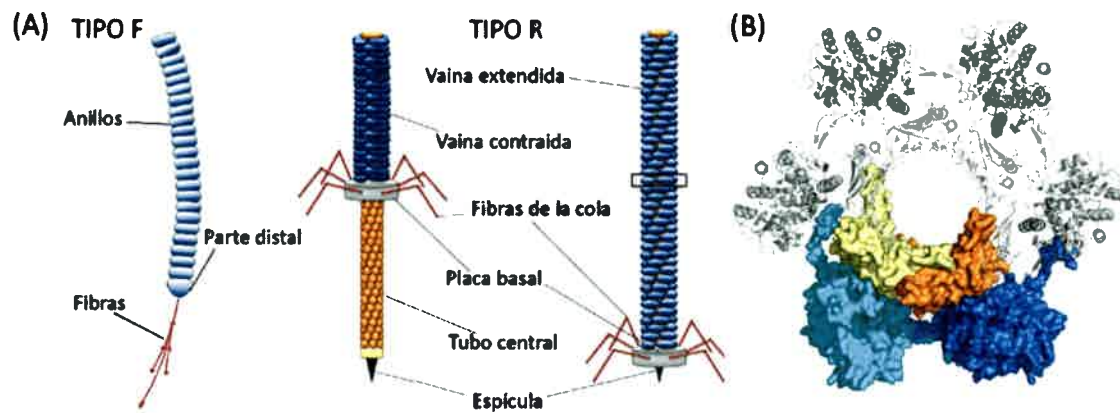


Figura II-1 | **Estructura de las tailocinas.** (A) Representación esquemática de las piocinas tipo F y R. Las piocinas tipo F (lado izquierdo) están compuestas por una varilla flexible (azul) de 106 nm de largo y 10 nm de ancho; la cual, está formada por 23 anillos de una subunidad proteica cada uno. La parte distal se afina terminando en una estructura fibrosa (rojo), compuesta por varios filamentos cortos y largos. Las piocinas tipo R (lado derecho) en su forma nativa se muestran con la vaina extendida (azul), la cual, está formada por 34 anillos de seis subunidades cada uno y tienen un tamaño aproximado de 120 nm de largo por 15 nm de ancho. La placa basal (gris) está localizada en el extremo distal de la partícula y es acompañada por seis fibras de la cola (en rojo). La forma contraída expone el tubo central (en naranja) y la espícula (en negro). (B) vista transversal de la piocina R2 en forma extendida (EMDB-6270, PDB 3J9Q). Se muestra uno de los anillos hexaméricos (marcado con un cuadro en el panel A) en donde se representan los protómeros de la vaina, en color celeste y azul, y del tubo central, en amarillo y naranja (Figura adaptada de Michel-Briand y Baysse, [7] y Ghequire y De Mot [2])

Los genes de biosíntesis de tailocinas se encuentran localizados en el cromosoma de la célula productora y presentan homología con los genes que codifican para colas de bacteriófagos. Ambos tipos de tailocinas (R y F) poseen un ancestro común con los fagos bacterianos y son consideradas colas de bacteriófagos que se han especializado evolutivamente como bacteriocinas, en lugar, de simples fagos defectivos [15].

Los genes que codifican para las tailocinas están organizados en un *cluster* que incluye, genes que regulan la expresión de la bacteriocina (*priN* y *priR*), genes relacionados a la liberación de las piocinas de la célula productora (*hol* y *lys*) y genes estructurales para la formación de la cola específicos para piocinas R y/o F. Una misma cepa puede ser capaz de producir los dos tipos de tailocinas, en estos casos, los genes estructurales para ambas se encuentran codificadas dentro del mismo operón, donde, los genes específicos para las piocinas tipo F se encuentran corriente abajo de los de las tipo R [2,7,17] (figura II-2).

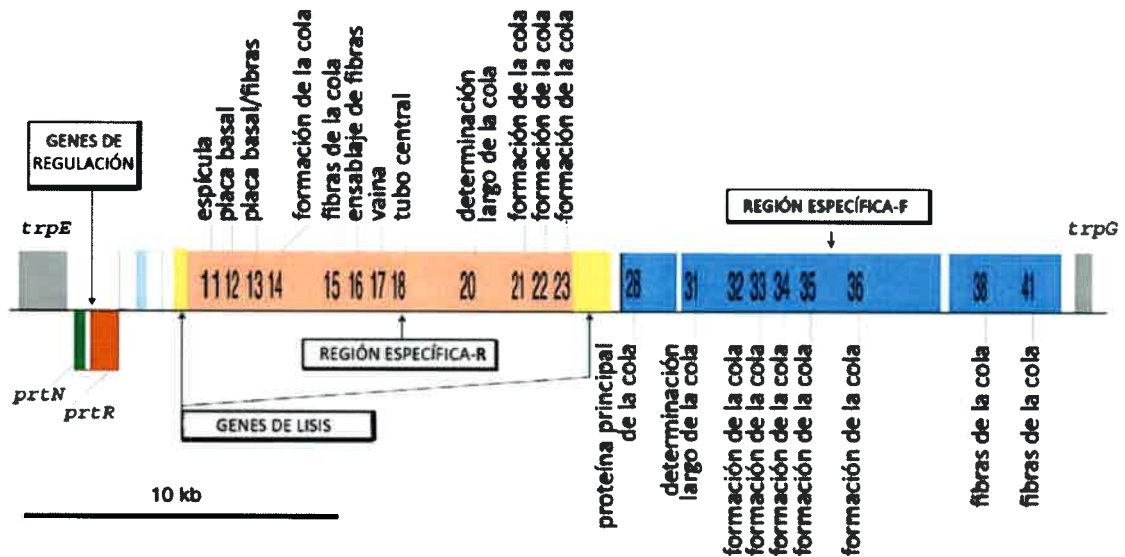


Figura II-2 | **Organización genética de las tailocinas de *P. aeruginosa*.** Esta imagen representa los determinantes genéticos de las piocinas R2/F2 de *P. aeruginosa*. Los ORFs correspondientes a genes regulatorios (*prtN* y *prtR*) son transcritos de derecha a izquierda. El casete de genes de lisis (*hol* y *lys*) se muestra en amarillo; mientras que, los genes estructurales específicos para la piocina tipo R y F se representan de color rosa y celeste, respectivamente. Los determinantes genéticos de las piocinas tipo fago de *P. aeruginosa* se encuentran flanqueados por los genes *trpE* y *trpG* (en gris) (Figura extraída de Michel-Briand y Baysse [7]).

II.1.1.2. Piocinas tipo S

Las piocinas tipo S son bacteriocinas similares a las colicinas constituidas por dos componentes, un componente de mayor tamaño que posee la actividad antibacteriana y un componente menor que funciona como una proteína de inmunidad que protege a la bacteria productora de la actividad del componente mayor. Este tipo de piocina, a diferencia de las R y F, presentan un tamaño mucho menor (32-84 kDa) y son sensibles a proteasas y al calor [2,7].

En la década del 70 se identificó la primera piocina tipo S [9] y fue llamada piocina soluble S1. Unos años después se conocieron la piocina S2 [20], AP41 [21] y S3 [22] y, recién en la última década se lograron caracterizar las piocinas S4 (año 2012) [23], S5 (año 2010) [24], S6 (año 2013) [25] y PaeM (año 2009) [26]. Todas estas piocinas comparten una estructura y

organización genética similar, con excepción de la piocina PaeM, la cual, carece de una proteína inmunitaria [26,27]. Algunos autores proponen clasificar a este tipo de bacteriocina como piocina M por su similitud con la colicina M y, para distinguirla de las piocinas tipo S [2].

Las piocinas tipo S (excepto PaeM) están organizadas en un operón compuesto por dos marcos abiertos de lectura (ORFs) (figura II-3). El primer ORF codifica para el componente mayor (498-777aa) o proteína “killing”; mientras que, el segundo codifica la proteína inmunitaria (77-153aa). La proteína killing lleva la actividad antibacteriana y presenta una organización modular en dominios funcionales. Generalmente, el extremo N-terminal (dominio I) corresponde al dominio de unión al receptor y el extremo C-terminal (dominio IV o citotóxico) presenta la actividad antimicrobiana. La mayoría de las piocinas S (AP41, S1, S2 y S3) tienen actividad endonucleasa en el extremo C-terminal, produciendo la muerte de las células sensibles por degradación del ADN. Mientras que, las piocinas S4, S5, S6 y PaeM presentan actividad tRNasa, actividad formadora de poros, rRNasa e inhibición de la síntesis de peptidoglicano, respectivamente. Aquellas piocinas que tienen blancos de acción citoplasmáticos (actividad DNasa, tRNasa, rRNasa) presentan los dominios de unión al receptor y citotóxico conectados por un dominio (dominio III) involucrado en la translocación de la bacteriocina al interior de la célula susceptible. Un dominio adicional (dominio II) de función desconocida puede encontrarse entre el dominio de unión al receptor y el de translocación. Este dominio está ausente en algunas piocinas, por lo que no sería indispensable para la actividad biológica (figura II-3). En aquellas piocinas (S5 y PaeM) que no requieren ser translocadas al citoplasma de las células sensibles para llevar a cabo su mecanismo de acción el dominio de unión al receptor y translocación están intercambiados de lugar.

La proteína inmunitaria codificada por el segundo ORF protege a la célula productora debido a la interacción entre el extremo N-terminal de esta proteína con el C-terminal de la proteína killing. La co-expresión de la proteína killing e inmunitaria es crucial para inhibir transitoriamente la función letal de la bacteriocina dentro de la célula productora. Por lo tanto, luego de la síntesis, las piocinas S son liberadas de la célula como un complejo equimolar piocina/proteína inmunitaria [2,7,17,28].

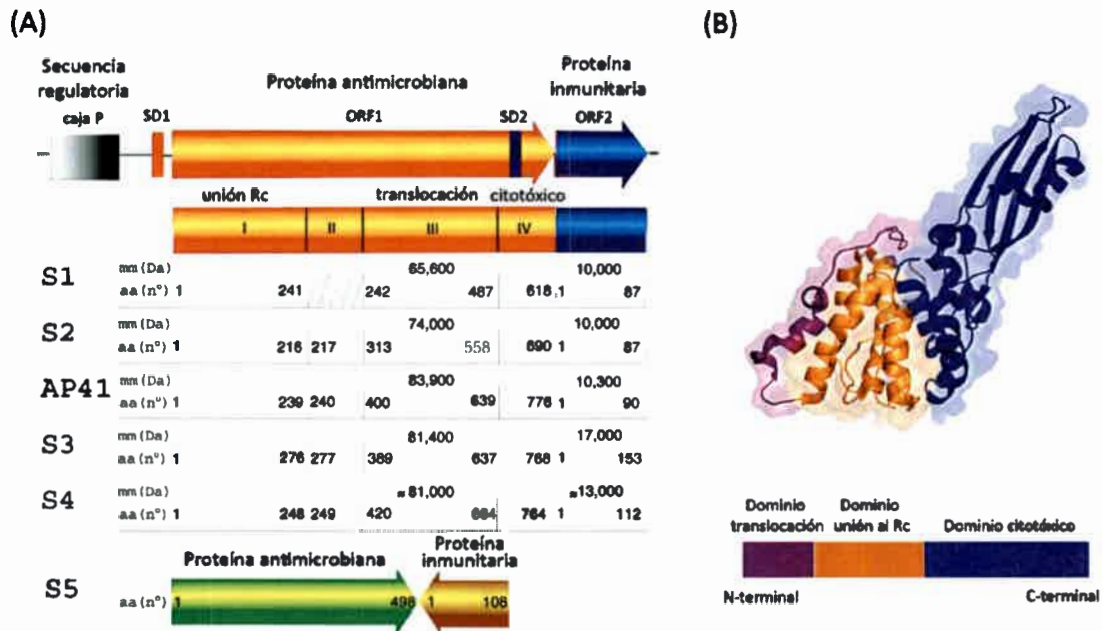


Figura II-3 | **Organización genética y estructura modular de las piocinas S.** (A) En la parte superior se observa la organización genética correspondiente a la mayoría de las piocinas tipo S. El ORF1 codifica para el componente mayor y el ORF2 para la proteína inmunitaria. Además, se representa la estructura en dominios de las diferentes piocina S con sus respectivas masas moleculares (mm) y número de aminoácidos (aa). (B) Estructura de la piocina Paem (PDB 4G75). Los dominios de translocación, unión al receptor y citotóxico se muestran de color púrpura, naranja y azul, respectivamente (figura adaptada de Michel-Briand y Baysse, [7] y Ghequire y De Mot, [2])

II.1.1.3. Producción de piocinas

La producción espontánea de piocinas es baja; pero, en condiciones de estrés su síntesis es inducida. Por ejemplo, se observó que la producción de piocinas aumenta cuando las células productoras se exponen a agentes que dañan el ADN, como luz UV [29] y mitomicina C [30]. Por otro lado, un análisis utilizando chips de ADN (microarray) en *P. aeruginosa* reveló que la transcripción de piocinas es inducida por peróxido de hidrógeno y ciprofloxacina [31,32].

La expresión de piocinas tipo R, F y S es regulada por un mecanismo común en *P. aeruginosa*. En 1993, Matsui et al. [33] propusieron el modelo para la regulación de la síntesis de estas piocinas y, el mismo, se mantiene vigente hoy en día. Los genes *priR* y *priN*, ubicados corriente arriba de los genes de piocinas tipo fagos (figura II-2), junto con el gen *recA* están implicados en este mecanismo de regulación. El gen *priN* codifica para un activador

transcripcional de los genes de piocina y es reprimido por la proteína represora PrtR. En presencia de agentes que dañan el ADN, donde la respuesta SOS es activada, aumenta la expresión del gen *recA*. RecA se activa y estimula el autoclivaje del represor PrtR. Por lo tanto, el gen *prtN* se expresa y se sintetiza el activador transcripcional que se une a secuencias regulatorias, llamadas cajas P, y activa la transcripción de los genes de piocinas (figura II-4).

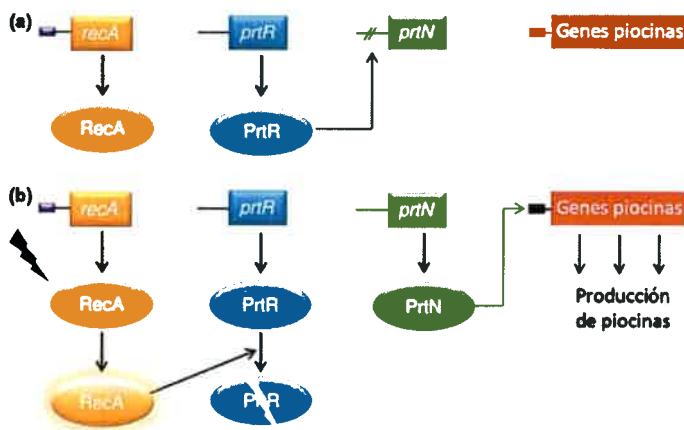


Figura II-4 | **Modelo de la regulación de piocinas en *P. aeruginosa*.** (a) en ausencia de inductor, el represor PrtR inhibe la expresión de *prtN* y, por lo tanto, los genes de piocinas se expresan a un nivel basal (b) En presencia de un agente mutagénico, RecA se activa e induce el autoclivaje de PrtR, liberando la expresión de *prtN*. El activador PrtN induce la síntesis de piocinas. Cajas SOS y P se muestran en violeta y negro, respectivamente (Figura extraída de Ghequire y De Mot [2]).

Luego que la producción de bacteriocinas es inducida, moléculas grandes como las piocinas R y F necesitan de un sistema lítico, similar al de los bacteriófagos, para ser liberadas de la célula productora [15].

El sistema lítico implicado en la liberación de las piocinas tipo fagos está compuesto por dos proteínas, una endolisina que degrada la mureína (codificada por el gen *lys*) y, una proteína holin (codificada por el gen *hol*) implicada en el transporte de la endolisina a través de la membrana citoplasmática, ya que la misma, carece de una secuencia señal secretoria. Múltiples copias de la proteína holin se insertan y agrupan en la membrana plasmática generando poros, a través de los cuales, se transloca la endolisina. De esta manera, la enzima lítica sale hacia el espacio periplásmico e hidroliza la mureína llevando a la lisis de la célula y, por consiguiente, a la liberación de las partículas de piocinas de la célula productora [34] (figura II-5).

Los genes de piocinas tipo S estudiados hasta el momento no están acompañados por genes relacionados con la función lítica; Nakayama et al. [15] sugieren que el sistema lítico descrito en PAO1 para las piocinas R2 y F2 puede ser compartido por las piocinas tipo S.

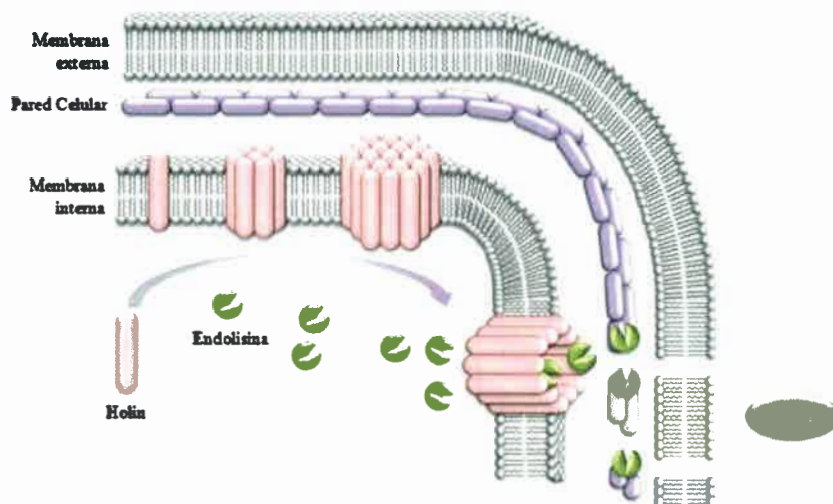


Figura II-5 | **Sistema lítico de liberación de piocinas.** La proteína holin (rosa) se agrupa y forma poros en la membrana plasmática permitiendo el paso de la endolisina (verde), la cual degrada el peptidoglicano (violeta) y provoca la lisis celular (figura adaptada de Young et al. [90]).

II.1.2. Caracterización de bacteriocinas en bacterias asociadas a plantas

Las bacteriocinas identificadas en bacterias asociadas a plantas, tanto fitopatógenas como PGPRs, son muy diversas. Se han descrito desde bacteriocinas muy pequeñas, como por ejemplo, un pequeño péptido modificado postraduccionalmente de 1.335 Da producido por la bacteria PGPR *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 [35]; hasta complejos proteicos de alto peso molecular similares a colas de bacteriófagos, como es el caso de la bacteriocina Serracina P producida por *S. plymthicum*. Dicha bacteriocina es activa contra *E. amylovora*, el agente causal de la niebla del peral y del manzano [36].

La bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* es un claro ejemplo de la variedad de bacteriocinas existentes en bacterias asociadas a plantas. En esta especie se han identificado cinco tipos de bacteriocinas: una de alto peso molecular, que es similar a colas de fagos, y fue denominada carotovoricina Er [37], tres de bajo peso molecular (carocina S1, carocina S2, carocina D) con actividad nucleasa y similares a las bacteriocinas producidas por *E. coli* (colicinas) y *P. aeruginosa* (piocinas) [38–40], y una bacteriocina

llamada pectocina M1, la cual presenta un dominio catalítico C-terminal homólogo al dominio catalítico de la colicina M y un dominio N-terminal, curiosamente, similar a las ferredoxinas de plantas [41].

En *Pseudomonas* spp. PGPRs, han sido identificadas bacteriocinas que presentan similitud con las lectinas de las plantas. La primera bacteriocina de este tipo, llamada LlpA1 o putidacina A, fue aislada de la cepa rizoférica *Pseudomonas putida* BW11M1 como una bacteriocina de bajo peso molecular, similar a las lectinas de unión a manosa de plantas monocotiledóneas (MMBLs), sensible al calor y proteasas, y capaz de matar a otras *Pseudomonas* asociadas a plantas [42]. La estructura de LlpA1 fue resuelta mediante cristalización; sin embargo, el mecanismo de acción de esta bacteriocina aún no ha sido dilucidado [43]. Este tipo de compuesto antimicrobiano también fue identificado en la cepa de biocontrol *P. fluorescens* Pf-5 [44], en la bacteria fitopatógena *P. syringae* pv. *syringae* 642 [45] y en *P. aeruginosa* [46]. Debido a su similitud con las lectinas de plantas estos antimicrobianos se agrupan en la familia de bacteriocinas tipo lectinas. Contrariamente a las piocinas tipo S, las bacteriocinas tipo lectina no contienen un dominio citotóxico conocido, ni requieren de una proteína inmunitaria [2].

En cuanto a bacteriocinas similares a las piocinas de *P. aeruginosa*, solo algunas pocas tailocinas han sido caracterizadas en *Pseudomonas* PGPRs. La primera fue identificada en nuestro laboratorio en la cepa *P. fluorescens* SF4c. Esta tailocina es homóloga a las piocinas tipo R de *P. aeruginosa*, y es capaz de inhibir a cepas fitopatógenas de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas* [47]. Recientemente, Ghequire et al. [48] caracterizaron otras tailocinas en dos cepas de *P. putida*, aisladas de la rizósfera de banana (cepa BW11M1) y arroz (cepa RW10S2), e identificaron los *clusters* de genes correspondientes.

Por último, varios estudios *in silico* revelaron la presencia de genes homólogos a los genes que codifican para las piocinas tipo S en el genoma de varias *Pseudomonas* PGPRs; pero, la caracterización funcional de estas bacteriocinas aún está pendiente [2,49].

II.2. MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en esta sección del trabajo son descriptos en la tabla II-1.

Tabla II-1: cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Cepa o plásmido	Origen y característica relevante	Referencia u origen
Cepa		
<i>P. fluorescens</i> SF39a	PGPR, aislada de rizósfera de trigo (Argentina)	[50]
<i>P. fluorescens</i> SF4c	PGPR, aislada de rizósfera de trigo (Argentina)	[50]
<i>P. putida</i> SF10b	PGPR, aislada de rizósfera de trigo (Argentina)	[50]
<i>P. fluorescens</i> CTR212	Aislado de suelo (Francia)	[51]
<i>P. fluorescens</i> Pf0-1	Aislado de suelo (Estados Unidos)	[52]
<i>P. putida</i> KT2440	Derivado libre de plásmido del aislado natural mt-2	[53]
<i>P. fluorescens</i> WCS365	Aislado de la rizósfera de papa (Holanda)	[54]
<i>P. protegens</i> CHA0	Aislado de la rizósfera de tabaco (Suiza)	[55]
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 61	Aislado de la rizósfera de trigo (Estados Unidos)	[56]
<i>P. corrugata</i> NCPPB 2445	Patógeno, aislado de tomate (Reino Unido)	[57]
<i>P. corrugata</i> PC5	Patógeno, aislado de tomate (Argentina)	[58]
<i>P. viridiflava</i> Pvalb8	Patógeno, aislado de albahaca (Argentina)	[58]
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> Xcc991330	Patógeno de cítricos (naranja, mandarina, etc.)	INTA Bella Vista
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> XcvBv54a	Patógeno de tomate y pimiento	INTA Bella Vista
<i>P. fluorescens</i> SF39a-pys	Mutante no polar <i>pys::Km</i> de <i>P. fluorescens</i> SF39a, Km ^r	Este trabajo
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>endA1 recA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> $\Delta(lacZYA-argF)U169 \phi 80d lacZ \Delta M15$.	[59]
<i>E. coli</i> CC118 λ pir	$\Delta(ara-leu) araD \Delta lacX74 galE galK phoA20$ <i>thi-1 rpsE rpoB argE(Am) recA1</i> λ pir lisogénica.	[60]

Plásmido		
pUC18not	Vector de clonado derivado del plásmido pUC18. Sitio de múltiple clonado flanqueado por sitios <i>NotI</i> , Ap ^r	[60]
pKNG101	Plásmido suicida utilizado para reemplazo de genes, <i>sacB</i> , Sm ^r	[61]
p34S-Km3	Plásmido que contiene un casete de resistencia a Km flanqueado por sitios de restricción duplicados, Km ^r	[62]
pPYS1	pUC18not portando un fragmento <i>PstI/BamHI</i> de 1185 pb que contiene la región 5' del gen <i>pys</i> (fragmento 1), Ap ^r	Este trabajo
pPYS12	pPYS1 portando un fragmento <i>BamHI/KpnI</i> de 1248 pb que contiene la región 3' del gen <i>pys</i> (fragmento 2), Ap ^r	Este trabajo
pPYS12Km	pPYS12 portando un fragmento <i>BamHI</i> que contiene el casete de resistencia a Km del plásmido p34S-Km3, Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pKNGPYS	Fragmento <i>NotI</i> del pPYS12Km clonado en el vector pKNG101, Sm ^r , Km ^r	Este trabajo

Km^r, resistencia a kanamicina; Ap^r, resistencia a ampicilina; Sm^r resistencia a estreptomicina.

II.2.2. Condiciones generales de cultivo

Las cepas de *Pseudomonas* spp. y *E. coli* fueron crecidas en medio Luria-Bertani (LB) a 30°C o 37°C, respectivamente. Todas las cepas fueron conservadas en glicerol al 60% a -20°C.

II.2.3. Técnicas generales de biología molecular

II.2.3.1. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de 1,5 ml de un cultivo de toda la noche en medio LB. Las células fueron colectadas mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 2 minutos y el sobrenadante descartado. Luego, las células se resuspendieron en 567 µl de buffer TE y se le adicionaron 30 µl de SDS 10% y 3 µl de proteinasa K (20 mg · ml⁻¹). Se mezcló por inversión y se incubó a 37°C durante 1 hora hasta observar lisis total de células. Posteriormente, se agregaron 100 µl de NaCl 5M, se mezcló por inversión vigorosamente y, se

agregó CTAB 10% previamente atemperado a 65°C. Los tubos se incubaron a 65°C durante 10 min. Luego, se colocó igual volumen de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) preparado en el momento de usar; se agitó vigorosamente y se centrifugó a 11.000 r.p.m. durante 5 min. La fase superior (aproximadamente 500 µl) se recuperó con pipeta y se le agregó el mismo volumen de una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Luego de mezclar, se centrifugó y se recuperó la fase superior; se incorporó 2 µl de RNasa (10 mg · ml⁻¹) y se incubó 30 min a 37°C. El ADN genómico total fue precipitado con iso-propanol frío y se centrifugó a 11.000 rpm. durante 10 min. El pellet se lavó dos veces con etanol 70% frío y se secó en estufa a 37°C durante 1 hora. Luego, se resuspendió en 30 µl de agua bidestilada estéril [63].

Para los ensayos de Southern blot, el ADN genómico fue extraído empleando el kit comercial Wizard Genomic DNA purification Kit de Promega® siguiendo las especificaciones del fabricante.

II.2.3.2. Extracción de ADN plasmídico

Las extracciones de plásmidos se realizaron mediante el método de lisis alcalina [64]. Para ello, una cantidad abundante de células (cultivadas en medio LB durante toda la noche con los antibióticos apropiados) fue resuspendida en 250 µl de solución PI (Glucosa 50 mM, EDTA•Na 10 mM, Tris-HCl 25 mM, pH:8). Esta suspensión se agitó vigorosamente con vortex hasta homogeneizar la totalidad de la masa bacteriana. Posteriormente, se agregaron 250 µl de solución PII [NaOH 0,2 M, SDS 1% (p/v)], mezclando hasta producirse la lisis. Luego se colocó 300 µl de solución PIII [Acetato de potasio 3 M, ácido acético 11,5% (v/v)], se resuspendió rápidamente y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue colectado y transferido a otro microtubo de 1,5 ml. A este sobrenadante se adicionó igual volumen de isopropanol frío y se incubó la mezcla a -20°C durante 30 min con el objetivo de producir la precipitación del ADN plasmídico. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min y el sobrenadante fue descartado por decantación. El precipitado resultante se lavó dos veces con 1 ml de etanol 70% frío, el pellet fue secado a 37°C y resuspendido en 30 µl de agua bidestilada.

II.2.3.3. Electroforesis en geles de agarosa

Las muestras de ADN fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% utilizando una cuba *Mini-sub CellGT*[®] BIO-RAD conteniendo buffer TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM). Las muestras se separaron a 90 voltios. Antes de sembrar, la muestra fue mezclada con buffer de carga conteniendo Gel Green (Biotium) a una concentración final 1X. Los geles fueron visualizados en un transiluminador de luz azul.

II.2.3.4. Digestión y ligación

Las digestiones se realizaron con enzimas de restricción Fermentas. Las mezclas de reacción fueron preparadas de acuerdo a las especificaciones del fabricante y fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Luego de la incubación, las digestiones fueron inactivadas por calor a 70°C durante 20 min o precipitadas con 0,1 volumen de AcNa (3 M; pH: 5,4) y 1 volumen de isopropanol según el requerimiento de la enzima utilizada.

Las ligaciones se realizaron utilizando la ligasa del fago T4 (Fermentas) según las especificaciones del fabricante y se incubaron a 4°C durante toda la noche para permitir la ligación.

II.2.3.5. Preparación de células competentes químicas y transformación de *E. coli*

Para la obtención de células competentes químicas, las cepas *E. coli* DH5a y *E. coli* cc18λpir fueron crecidas en 10 ml de LB durante toda la noche a 37°C (preinoculo). Posteriormente, 1 ml del preinoculo fue inoculado en 20 ml de medio fresco y se dejó crecer hasta $DO_{600} = 0,6$. El cultivo fue centrifugado a 6.000 rpm durante 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 10 ml de CaCl₂ 100 mM estéril e incubado en hielo durante 30 min. Transcurrido este tiempo de incubación se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 min a 4°C, el sobrenadante fue descartado y al pellet resuspendido suavemente en 1,7 ml de CaCl₂ 100 mM y 0,3 ml de glicerol estéril (87%). Se fraccionaron en alícuotas de 100 µl, las cuales, fueron guardadas inmediatamente a -80°C para su posterior uso [63].

Para la transformación, la mezcla de ligación fue adicionada a las células competentes químicas. Se incubó durante 30 min en hielo y luego se realizó un choque térmico a 42°C durante 3 min. Posteriormente, se adicionó 1 ml de LB y se incubó a 37°C durante 1 hora. Cien µl de las

células transformadas se sembraron en una placa de medio LB sólido suplementado con el antibiótico adecuado según el plásmido utilizado. La presencia del plásmido recombinante en las colonias resistentes al antibiótico se confirmó mediante extracción de plásmidos y análisis de los mismos mediante electroforesis en gel de agarosa. Aquellos plásmidos que presentaron menor movilidad electroforética que el plásmido vacío fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes de manera de liberar el inserto. Como otra prueba de confirmación, el inserto fue amplificado por PCR utilizando como molde el plásmido extraído.

II.2.3.6. Preparación de células electrocompetentes y electroporación de *P. fluorescens*

Para la preparación de células electrocompetentes, seis mililitros de cultivos crecidos durante toda la noche fueron centrifugados a 12.000 rpm durante 2 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet celular lavado dos veces con 1 ml de solución de sacarosa 300 mM. Finalmente, el pellet se resuspendió en un total de 100 μ l de sacarosa 300 mM [65].

Para la electroporación, 100 μ l de las células competentes se mezclaron con 2 μ l de plásmido y se transfirieron a cubetas de electroporación de 2 mm. La electrotransformación fue llevada a cabo usando Gene Pulser (Bio-Rad), bajo las condiciones sugeridas por el fabricante (25 μ F, 200-600 Ω , 2,0 kV). Inmediatamente después de la electroporación se agregó 1ml de medio LB líquido a la cubeta de electroporación. Las células fueron transferidas a un tubo eppendorf e incubadas en agitación durante 1-2 horas a 30°C. Luego de la incubación, 100 μ l de la mezcla fueron sembrados en una placa con medio LB sólido suplementado con el antibiótico correspondiente.

II.2.3.7. Southern-blot

Las muestras de ADN fueron digeridas durante toda la noche con la enzima de restricción correspondiente y las digestiones fueron separadas en un gel de agarosa al 0,8%. Luego de la electroforesis, el gel fue colocado en una solución de depurinización (HCl 1,1%) durante 10 minutos (para facilitar luego la transferencia del ADN a la membrana), posteriormente en una solución de desnaturalización (NaOH 0,4 M, NaCl 3 M) durante 1 hora y, por último, en buffer de transferencia (NaOH 8 mM, NaCl 3 M) 15 minutos. La transferencia a membranas de nylon (HybondTM, Amersham LIFE SCIENCE) fue realizada durante toda la noche según Sambrook [63].

Luego de la transferencia, la membrana se colocó en solución de neutralización (NaH_2PO_4 0,2 M, Na_2HPO_4 0,2 M) durante 10 minutos, se fijó en luz UV durante 5 min de cada lado y se secó en horno a 60°C durante 1 hora. Posteriormente, la membrana se introdujo en un tubo con solución de prehibridación (Formamida 100 % 1,5 ml, SSPE 20X 0,9 ml, Denhardt 50X 0,3 ml, SDS 10 % 0,3 ml) conteniendo ADN esperma de salmón desnaturalizado ($10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) y se incubó a 42°C durante 4 horas. Luego, se reemplazó la solución de prehibridación por la de hibridación (Dextran sulfato 0,3 gr, Formamida 100 % 1,5 ml, SSPE 20X 0,9 ml, Denhardt 50X 0,3 ml, SDS 10 % 0,3 ml) conteniendo ADN esperma de salmón ($10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) y la sonda marcada con biotina previamente desnaturalizados. La membrana fue incubada a 42°C durante toda la noche en agitación.

Al día siguiente, la membrana fue lavada sucesivamente con soluciones de SDS/SSC en tres pasos: (1) dos lavados con SSC 5X / SDS 0,5% a 65°C durante 5 minutos, (2) un lavado con SSC 0,1X / SDS 1% a 50°C durante 30 minutos y (3) un lavado con SSC 2X a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, se realizó el revelado empleando el kit comercial Biotin Chromogenic Detection Kit (Fermentas), el cual, permite la detección cromogénica no radioactiva de sondas marcadas con biotina hibridadas a ácidos nucleicos inmovilizados en membranas de nylon.

II.2.4. Ensayo de producción de bacteriocinas

La producción de bacteriocinas fue analizada mediante el método de la gota. Para ello, se sembró 10 μl de un cultivo de toda la noche de la bacteria productora en placas con medio LB sólido y se incubó a 30°C durante 24 horas. Posteriormente, las placas fueron expuestas a vapor de cloroformo durante 20 min para inactivar las cepas y luego se abrieron 30 min para eliminar los vapores de cloroformo. Las placas se cubrieron con agar semisólido (0,7%) inoculado con la bacteria indicadora y se incubaron durante 24 horas a 30°C. La producción de compuestos antimicrobianos fue determinada mediante la formación de halos de inhibición del crecimiento [42].

Para evaluar el espectro de acción de la bacteriocina de la cepa SF39a se usaron como bacterias indicadoras diferentes cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas*: *P. fluorescens* WCS365, *P. fluorescens* Pf0-1, *Pseudomonas protegens* CHA0, *P. fluorescens* SF4c, *P. fluorescens* CTR212, *P. putida* KT2440, *P. putida* SF10b, *Pseudomonas corrugata*

NCPPB 2445, *P. corrugata* PC5, y *Pseudomonas viridiflava* Pvalb8, *P. syringae* pv *syringae* 61, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* y *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (tabla II-2).

II.2.5. Purificación parcial de bacteriocinas

Las bacteriocinas de la cepa *P. fluorescens* SF39a fueron extraídas a partir de sobrenadantes de cultivos como describe Fischer et al. [47] con algunas modificaciones. Un cultivo de toda la noche de la cepa SF39a fue diluido 1/100 en medio LB líquido y se dejó crecer (150 rpm y 30°C) hasta $DO_{600} = 0,3$, momento en el cual, se agregó mitomicina C a una concentración final de $6 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. La incubación continuó durante toda la noche y al día siguiente, los cultivos fueron centrifugados (14.000 rpm durante 1 h a 4°C) para remover los restos celulares. Posteriormente, el sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de $0,45 \mu\text{m}$ y precipitado con sulfato de amonio (60%, w/v). El precipitado fue recogido mediante centrifugación (14.000 rpm durante 1 h a 4°C), resuspendido en buffer TN50 (ClNa 50 mM, Tris-ClH 10 mM, pH:7,5) y concentrado por ultrafiltración utilizando unidades Amicon Ultra-15, 100K (Millipore). Cultivos sin inducir con mitomicina C fueron utilizados como control.

La actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos, a partir de cultivos inducidos con mitomicina C y no inducidos, fue analizada mediante un ensayo semicuantitativo. Para ello, los extractos fueron serialmente diluidos en buffer TN50 y una alícuota sembrada en placa de LB inoculada con un césped de la cepa indicadora *P. fluorescens* CTR212. Las placas fueron incubadas toda la noche a 30°C. La actividad de la bacteriocina se observó por la formación de un halo de inhibición sobre la pátina bacteriana [66]. La recíproca de la más alta dilución que mostró un halo claro de inhibición frente a la cepa indicadora fue definida como la actividad relativa expresada en unidades arbitrarias (AU). El título de bacteriocina fue expresado como $\text{AU} \cdot \text{ml}^{-1}$ [19].

Por otro lado, los extractos de bacteriocinas inducidos con mitomicina C y sin inducir fueron analizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes y no desnaturizantes:

(1) Electroforesis en condición desnaturizante (SDS-PAGE) [67]: Los extractos de bacteriocinas fueron mezclado con buffer muestra, hervidos durante 5 minutos y sembrados en el gel de poliacrilamida. La composición del gel fue la siguiente:

Gel de Apilamiento (Stacking):

Acril-Bis 30:08 (30% T 2,67% C).....	0,6 ml
Stacking Buffer *	0,625 ml
Agua.....	1,21 ml
TEMED 10%.....	0,05 ml
Persulfato de amonio 10%.....	0,015 ml

*** Stacking buffer**

Tris-HCl.....	500 mM
SDS.....	0,4%

Gel de Resolución (12%):

Acril-Bis 30:08 (30% T 2,67% C).....	3,1 ml
Gel Buffer 4X **.....	1,875 ml
Agua.....	2,6 ml
TEMED 10%.....	0,125 ml
Persulfato de amonio 10%.....	0,05 ml

****Gel Buffer 4X**

Tris-HCl.....	1,5 M
SDS.....	0,4%

La electroforesis se llevó a cabo en buffer de corrida para SDS-PAGE [Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% (p/v)] a 90V hasta que el frente de corrida alcanzó el gel de resolución y luego a 150V. Al finalizar la corrida electroforética, el gel fue teñido durante toda la noche con una solución de azul de Coomassie [Coomassie Brilliant blue R250 0,2% (p/v), etanol 47,5% (v/v), ácido acético 10% (v/v)] previamente filtrada y, luego lavado sucesivamente con una solución decolorante [ácido acético 8% (v/v), metanol 21% (v/v)] hasta visualizar las bandas.

(2) Electroforesis en condición no desnaturizante (Native-PAGE) [68]: A diferencia de la SDS-PAGE, se utilizó un buffer de corrida y un gel sin SDS, un buffer muestra sin SDS y sin β -mercaptoetanol y, la muestra no fue hervida antes de la siembra. La composición del gel fue la siguiente:

Gel de Apilamiento (Stacking):

Acril-Bis 30:08 (30% T 2,67% C)....	0,66 ml
Stacking Buffer *	1 ml
Agua.....	1,824 ml
Glicerol.....	0,4 ml
TEMED.....	0,008 ml
Persulfato de amonio 10%.....	0,08 ml

* Stacking buffer: Tris-HCl 0,22 M pH: 7

Gel de Resolución:

Acril-Bis 30:08 (30% T 2,67% C)....	2,6 ml
Gel Buffer 4X **.....	2 ml
Agua.....	2,292 ml
Glicerol.....	0,8 ml
TEMED.....	0,012 ml
Persulfato de amonio 10%.....	0,120 ml

** Gel Buffer 4X: Tris-HCl 1,3 M pH: 8,2

La electroforesis se llevó a cabo en buffer de corrida para Native-PAGE (Tris 25 mM, glicina 192 mM) a amperaje constante (30 mA) y a 4°C.

Después de la corrida electroforética, la mitad del gel fue teñido con azul de Coomassie en agitación durante toda la noche y luego lavado sucesivamente con la solución de desteñido hasta visualizar las bandas; y la otra mitad (duplicado de la anterior), fue lavada con agua destilada y colocada en placas de LB con un césped de la cepa indicadora CTR212 para observar los halos de inhibición [69].

II.2.6. Sensibilidad de las bacteriocinas a proteinasa K y temperaturas

Para el tratamiento con proteinasa K, alícuotas del extracto de bacteriocinas fueron tratadas con proteinasa K (Fermentas) a una concentración final $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ durante 1 o 3 horas a 37°C. Como control, se utilizaron sobrenadantes incubados a 37°C durante 1 o 3 horas; pero sin el agregado de proteinasa K [70].

Para el tratamiento térmico, alícuotas del extracto fueron incubadas a 37°C durante 1 o 3 horas, y a 50°C, 80°C y 100°C durante 10 o 20 min [70].

Después de cada tratamiento se analizó la actividad antimicrobiana de las muestras sembrando 10 μl de las mismas sobre un un césped de la cepa indicadora *P. fluorescens* CTR212.

II.2.7. Predicción de genes de bacteriocinas

La identificación de posibles genes de piocinas tipo S en el *draft* del genoma de *P. fluorescens* SF39a fue realizada utilizando la herramienta BAGEL3 (BACTERIOCIN GENOME mining tooL) [71]. Por otro lado, la herramienta BLAST [72] fue utilizada para la búsqueda de los genes conservados *hol*, *lys*, *prrR*, *mutS* y *recA-recX* de piocinas tipo fagos y, de esta manera, detectar los posibles *clusters* de tailocinas en el genoma de la cepa SF39a.

Una vez predichos los genes de bacteriocinas, las secuencias de los mismos fueron analizadas con otras herramientas bioinformáticas, como ORFfinder, Pfam y varios recursos de EXPASy, para corroborar dicha predicción.

II.2.8. Construcción de un mutante en el gen *pys*

Un mutante en el gen *pys* fue construido por reemplazo de un fragmento interno de dicho gen por un casete de resistencia a Km mediante doble recombinación homóloga.

La construcción del mutante se llevó a cabo en varios pasos:

1- Dos fragmentos del gen *pys*, llamados fragmento 1 y fragmento 2, fueron amplificados por PCR y clonados secuencialmente en el vector pUC18Not (tabla II-1).

El fragmento 1 (1185 pb), el cual incluye la región 5' del gen, fue amplificado a partir del genoma de *P. fluorescens* SF39a utilizando los cebadores específicos Frag1pysFw (5'-AACTgCAGTACgCCTTCCTCgACCATCAT-3') y Frag1pysRv (5'-CgggATCCA ACTTCCTggCgATCAgggA-3') con sitios de cortes para las enzimas de restricción *Pst*I y *Bam*HI (subrayados), respectivamente.

La mezcla de reacción y las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes:

MEZCLA DE REACCIÓN		CICLO DE TEMPERATURAS	
Agua	18,75 μ l	Desnaturalización inicial	95°C 5 min
Buffer 10X	2,5 μ l	35 ciclos de:	
dNTP (10 mM)	0,75 μ l	Desnaturalización	95°C 40 seg
Cebador Frag1pysFw (20 μ M)	0,5 μ l	Hibridación	55°C 40 seg
Cebador Frag1pysRv (20 μ M)	0,5 μ l	Elongación	72°C 1 min
Cl ₂ Mg (50 mM)	0,75 μ l	Elongación final	72°C 10 min
ADN molde	1 μ l		
Taq ADN polimerasa	0,25 μ l		

El producto de PCR fue purificado usando el Kit QIAquick PCR (QIAGEN), digerido con las enzimas de restricción *Pst*I y *Bam*HI y ligado al vector pUC18Not previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. La mezcla de ligación fue transformada en *E. coli* DH5 α competentes químicas y las células transformadas fueron sembradas en medio LB sólido suplementado con ampicilina (100 μ g \cdot ml⁻¹), resistencia propia del vector pUC18Not. El plásmido recombinante obtenido fue denominado pPYS1 (tabla II-1).

El fragmento 2 (1248 pb), el cual incluye la región 3' del gen, fue amplificado por PCR utilizando los cebadores específicos Frag2pysFw (5'-CgggATCCAAggCgCATgTTgAAATTCA-3') y Frag2pysRv (5'-ggggTACCTACACCCTgACgCATTTgCT -3') con sitios de cortes para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Kpn*I (subrayados), respectivamente. La mezcla de reacción y las condiciones de ciclado utilizadas fueron igual a las descritas anteriormente para el fragmento 1 excepto que se usaron los cebadores Frag2pysFw y Fran2pysRv y una temperatura de hibridación de 57°C.

El producto de PCR fue purificado usando el Kit QIAquick PCR (QIAGEN), digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Kpn*I y ligado al vector pPYS1 obtenido previamente. El producto de ligación fue transformado en *E. coli* DH5 α competentes químicas y las células transformadas fueron sembradas en medio LB sólido suplementado con Ap (100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). El plásmido recombinante obtenido fue denominado pPYS12 (tabla II-1).

2- Un fragmento *Bam*HI, que lleva el casete de resistencia a Km del plásmido p34S-Km3 fue clonado entre los fragmentos 1 y 2. Para ello, el plásmido p34S-Km3 fue digerido con la enzima de restricción *Bam*HI para liberar el casete de resistencia a Km (950 pb). La digestión fue sembrada en un gel de agarosa y la banda correspondiente al casete de Km fue purificada del gel empleando el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). El casete de Km fue ligado al plásmido recombinante pPYS12 previamente digerido con *Bam*HI. La mezcla de ligación fue transformada en *E. coli* DH5 α competentes químicas y las células transformadas fueron sembradas en medio LB sólido suplementado con Ap (100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) y Km (25 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

3- El plásmido recombinante resultante pPYS12Km (tabla II-1) fue digerido con la enzima de restricción *Not*I de manera de liberar el inserto completo. El constructo Frag1-Km-Frag2 fue purificado de un gel de agarosa al 0,8% utilizando el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) y ligado al plásmido pKNG101. La mezcla de ligación fue transformada en *E. coli* CC18 λ pir competentes químicas y las células transformadas fueron sembradas en medio LB sólido suplementado con Sm (100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), resistencia propia del vector y Km (25 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), resistencia aportada por el inserto Frag1-Km-Frag2. De esta manera se obtuvo el plásmido recombinante pKNGPYS.

4- El plásmido pKNGPYS fue incorporado mediante electroporación a *P. fluorescens* SF39a electrocompetentes para permitir la doble recombinación.

El plásmido pKNG101 (figura II-6) es un vector suicida incapaz de replicar en *Pseudomonas* spp. Este plásmido presenta un origen de replicación R6K que requiere para el inicio de la replicación la presencia de la proteína π , codificada por el gen *pirR6K*, el cual se encuentra integrado en el cromosoma de estirpes λ pir en forma de profago [73]. Por este motivo, la transformación fue realizada utilizando *E. coli* CC18 λ pir como huésped cuando se utilizó el plásmido pKNG101 como vector.

Por otro lado, este vector facilita la selección positiva de los eventos de doble recombinación en la bacteria donde ha sido incorporado. El plásmido pKNG101 contiene los genes *strAB* que codifican la enzima estreptomicina fosfotransferasa y, por lo tanto, le confiere resistencia a Sm y el gen *sacB* que codifica la enzima levansacarasa, la cual cataliza la hidrólisis de sacarosa y la síntesis de levanos, compuestos tóxicos para la bacteria cuando la misma crece en presencia de sacarosa al 5% [61]. Por lo tanto, en aquellas colonias donde se haya producido un solo evento de recombinación el plásmido completo se integrará en el genoma bacteriano y las colonias serán resistentes a Sm e incapaces de crecer en sacarosa al 5%. En cambio, en aquellas colonias donde se haya producido un doble evento de recombinación el plásmido será escindido y se perderán los genes *sacB* y *strAB*; por lo tanto, las colonias serán capaces de crecer en sacarosa al 5% pero sensibles a Sm. Como en este caso en particular se ha incorporado un casete de resistencia a Km para reemplazar la región deletada del gen a mutar, las colonias, tanto dobles como simples recombinantes, también serán resistentes a Km (figura II-6).

Por lo tanto, aquellas colonias resistentes a Km, capaces de crecer en sacarosa al 10% y sensibles a Sm fueron elegidas como posibles mutantes dobles recombinantes.

En las colonias seleccionadas, el evento de doble recombinación fue confirmado por PCR y Southern-blot. Para la PCR se utilizaron los cebadores CheFw (5'-AggCATTAACCTTTTCgCCgT-3') y CheRv (5'-TCTgTTgTAAACCCggAATCA-3') que hibridan por fuera del casete de Km; pero dentro del fragmento 1 y 2, respectivamente. Durante el evento de recombinación se deleta un fragmento del gen *pys* y se incorpora un casete de Km. Por lo tanto, se amplificarán productos de diferentes tamaños según la presencia del gen salvaje o mutando en el genoma del clon.

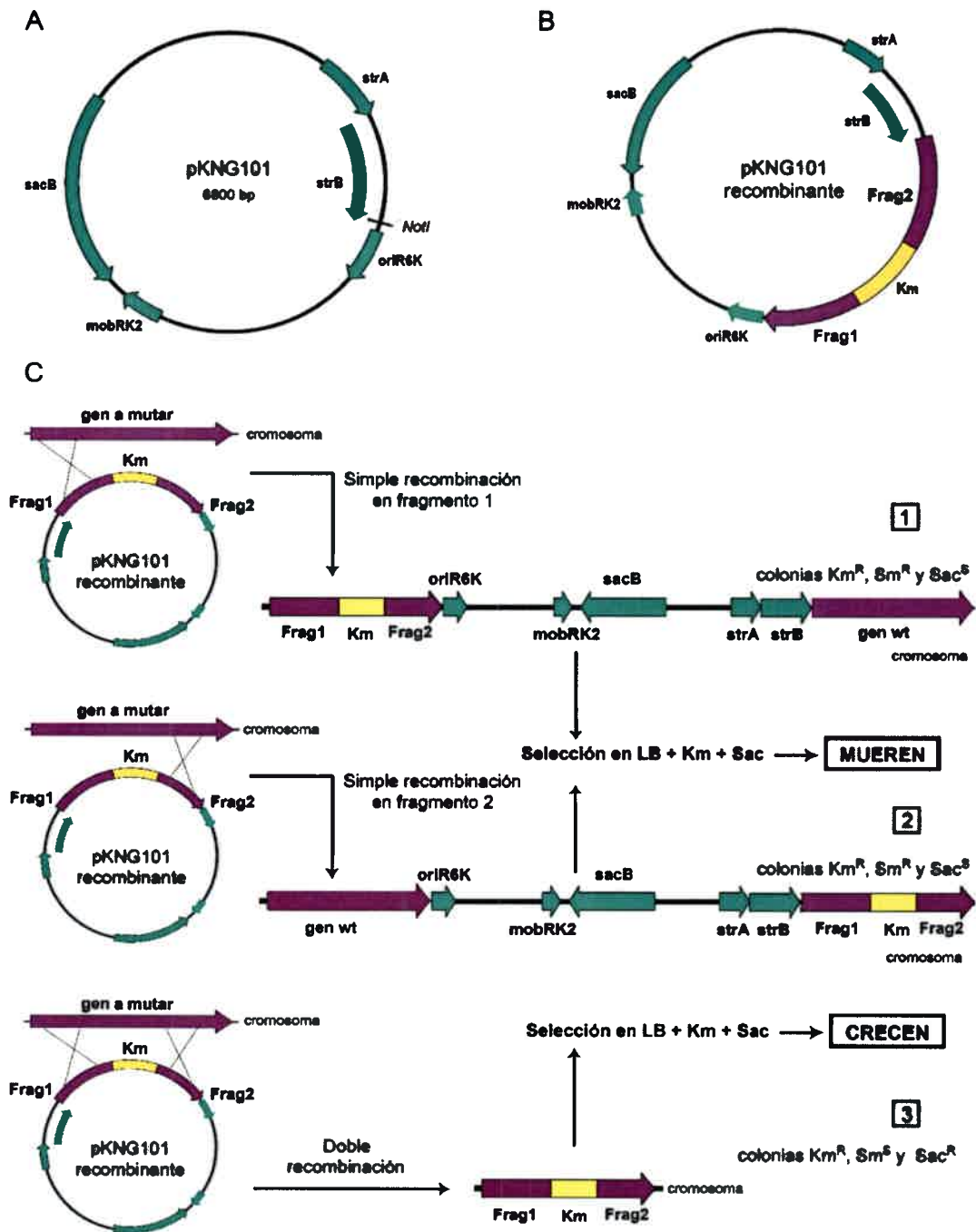


Figura II-6 | Dibujo ilustrativo de la selección de dobles recombinantes empleando el plásmido pKNG101. (A) Mapa del plásmido pKNG101, oriR6K: origen de replicación, *strAB*: resistencia a Sm, *sacB*: levansacarasa y *mobRK2*: región necesaria para la transferencia por conjugación. (B) Representación del plásmido pKNG101 conteniendo el inserto F1-Km-F2 clonado en el sitio *NotI*. (C) ilustración de las tres posibles situaciones que pueden ocurrir en la bacteria receptora del plásmido recombinante. 1) Simple recombinación homóloga en el fragmento 1. 2) simple recombinación homóloga en el fragmento 2. 3) Doble recombinación homóloga.

El Southern-blot se llevó a cabo como se detalla en el punto II.2.3.7 utilizando como sonda el fragmento 2. La sonda fue obtenida mediante amplificación por PCR con los cebadores Frag2pysFw y Frag2pysRv y utilizando una mezcla de deoxinucleótidos trifosfato que contienen uno de los nucleótidos marcado con biotina (kit Biotin DecaLabel™ DNA Labeling de Fermentas) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El ADN de la cepa salvaje y de los mutantes fue digerido con la enzima *Bam*HI. Dicha enzima presenta sitios de corte fuera del fragmento 2 y genera una diferencia en el patrón de restricción entre la cepa salvaje, el mutante doble recombinante y el simple recombinante.

Una vez obtenido el mutante doble recombinante en el gen *pys*, se analizó la producción de bacteriocina por el método de la gota (descrito en sección II.2.4).

II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.3.1. Producción de bacteriocinas en *P. fluorescens* SF39a

La capacidad de la cepa *P. fluorescens* SF39a de producir bacteriocinas fue analizada mediante un ensayo de inhibición en placa (método de la gota) contra varias cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. La cepa nativa SF39a fue capaz de inhibir a 11 de las 13 cepas probadas, incluyendo, varias cepas fitopatógenas aisladas de diferentes cultivos y regiones geográficas, como *P. syringae* pv. *syringae* 61, *P. corrugata* NCPPB 2445, *P. viridiflava* Pvalb8, *X. axonopodis* pv. *citri* Xcc991330 y *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* XcvBv54a (Tabla II-2).

P. corrugata, es agente causal de la necrosis medular del tomate, una enfermedad de gran importancia económica y amplia difusión mundial. Por otro lado, *P. viridiflava* es un patógeno con un amplio rango de huésped que causa severos daños en plantas de tomate, melón, crisantemo, cebolla, berenjena, albahaca, entre otros [74,75]. Allipi et al. [58] demostraron que, en Argentina, *P. corrugata* y *P. viridiflava* son las principales especies causantes de la necrosis medular del tomate y pimiento.

Las bacterias patógenas del género *Xanthomonas* infectan plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas y son responsables de pérdidas significativas en la productividad; por ejemplo, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* es el agente causal de la mancha bacteriana en plantas de tomate y pimiento, y *X. axonopodis* pv. *citri* causa el cancro de los cítricos, una de las enfermedades más importantes que afectan la producción de cítricos en todo el mundo [76,77].

Existen estudios que demuestran que las bacteriocinas son agentes efectivos para prevenir o limitar los efectos de enfermedades en plantas causados por bacterias fitopatógenas (ver sección I.1.4.3). En el futuro, la bacteriocina de la cepa SF39a podría ser considerada como una estrategia para el control biológico de enfermedades de plantas causadas por estas bacterias fitopatógenas, pudiendo reemplazar a los pesticidas químicos, los cuales producen efectos negativos sobre la salud humana y el medio ambiente.

Además, es importante aclarar que la cepa *P. fluorescens* SF39a presentó actividad inhibitoria contra la mayoría de las cepas probadas, las cuales podrían ser potenciales competidores en la rizósfera, por lo tanto, la producción de bacteriocinas podría ser una

herramienta importante para la cepa *P. fluorescens* SF39 a la hora de colonizar y mantenerse en la rizósfera.

Tabla II-2: espectro antimicrobiano de *P. fluorescens* SF39a contra diferentes cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas*.

Cepa indicadora	Inhibición
<i>P. fluorescens</i> CTR212	+
<i>P. fluorescens</i> SF4c	+
<i>P. fluorescens</i> Pf0-1	+
<i>P. fluorescens</i> WCS365	+
<i>P. protegens</i> CHA0	-
<i>P. putida</i> SF10b	+
<i>P. putida</i> KT2440	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 61	+
<i>P. corrugata</i> NCPPB 2445	+
<i>P. corrugata</i> PC5	-
<i>P. viridiflava</i> Pvalb8	+
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> Xcc991330	+
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> XcvBv54a	+

Por otro lado, *P. fluorescens* SF39a mostró halos de inhibición de gran diámetro contra las cepas ensayadas (figura II-7). Esto sugiere, que se trata de una bacteriocina de bajo peso molecular, lo que le permite difundir lejos en el agar. Por ejemplo, las bacteriocinas similares a las piocinas tipo S o colicinas se consideran bacteriocinas de bajo peso molecular (si se las compara con las tailocinas) y son capaces de difundir más lejos de la colonia productora que las bacteriocinas tipo fagos de mayor peso molecular [2,40].

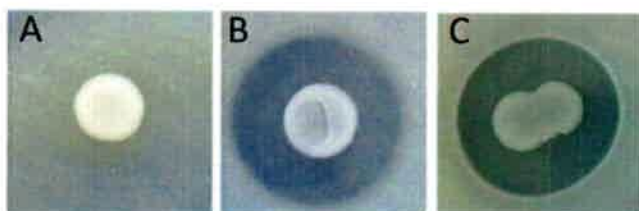


Figura II-7 | Actividad antimicrobiana de *P. fluorescens* SF39a contra *P. protegens* CHA0 (A), *P. corrugata* NCPPB 2445 (B) y *P. viridiflava* Pvalb8 (C).

II.3.2. Purificación parcial de bacteriocinas en *P. fluorescens* SF39a

Con el objetivo de identificar la bacteriocina producida por la cepa SF39a, en una primera instancia, la misma fue extraída de sobrenadantes de cultivos como se describe en la sección II.2.5 de materiales y métodos.

En general, las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas son inducidas por compuestos que disparan la respuesta SOS; como por ejemplo, la mitomicina C, un agente alquilante que actúa produciendo enlaces cruzados en el ADN [78]. Por lo tanto, los compuestos antimicrobianos producidos por la cepa SF39a fueron extraídos de cultivos tratados con mitomicina C y sin tratar. La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas extraídas a partir de ambos tratamientos fue analizada contra la cepa CTR212 y expresada en $\text{AU} \cdot \text{ml}^{-1}$. Nosotros observamos que la producción de bacteriocina se incrementó aproximadamente 100 veces cuando la mitomicina C fue añadida a los cultivos, observándose un título de $10^4 \text{AU} \cdot \text{ml}^{-1}$ para extractos de bacteriocinas obtenidos de cultivo tratado y $10^2 \text{AU} \cdot \text{ml}^{-1}$ para extractos obtenidos de cultivo no tratado (figura II-8A). Estos resultados sugieren que la respuesta SOS participa en la expresión de bacteriocinas en la cepa SF39a.

La inducción de bacteriocinas por la respuesta SOS ha sido muy estudiada en bacterias Gram negativas y se conoce, que tanto las colicinas de *E. coli* como las piocinas de *P. aeruginosa* (figura II-4) son inducidas como parte de esta respuesta [7,79].

Los extractos obtenidos de cultivos inducidos con mitomicina C y no inducidos fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacríamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y no desnaturalizantes (Native-PAGE). La condición desnaturalizante permite analizar el patrón de proteínas extraído y conocer sus pesos moleculares, mientras que la electroforesis nativa mantiene la actividad de las proteínas y, por lo tanto, es posible identificar cual de las bandas del extracto tiene actividad antimicrobiana mediante un ensayo de inhibición sobre el gel.

El análisis mediante SDS-PAGE mostró un complejo patrón de bandas, observándose mayor cantidad de proteínas en la muestra inducida con mitomicina C comparada con la no inducida (figura II-8B). Para la electroforesis en condiciones nativas el gel se realizó por duplicado, uno se tiñó para visualizar las proteínas y, el otro se cubrió con agar semisólido inoculado con cepa indicadora CTR212 para visualizar posibles halos de inhibición. Desafortunadamente, ninguna de las bandas presentes en el gel mostró un halo de inhibición

contra la cepa indicadora; por lo tanto, no se logró identificar ninguna bacteriocina mediante este método.

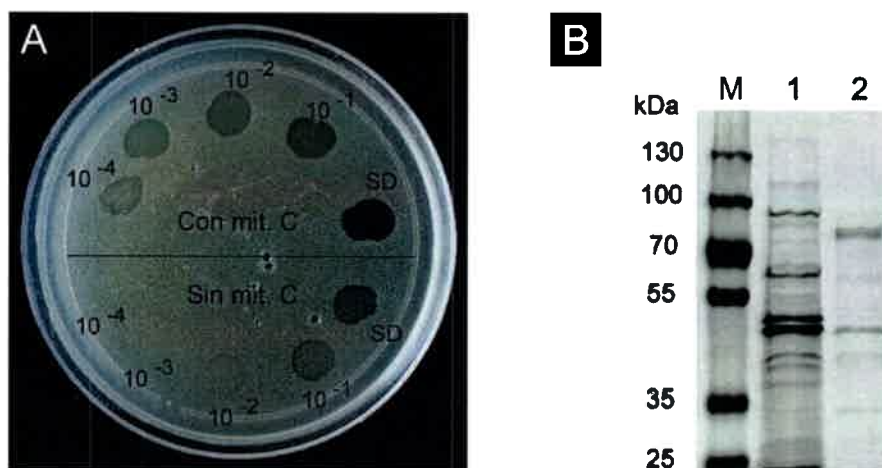


Figura II-8 | **Extracto de bacteriocinas de la cepa *P. fluorescens* SF39a.** (A) Actividad antimicrobiana del extracto crudo, obtenido a partir de cultivos tratados con mitomicina C y no tratados, contra la cepa indicadora *P. fluorescens* CTR212. SD: extracto crudo sin diluir. (B) Análisis del extracto crudo mediante SDS-PAGE. M: marcador de peso molecular; 1: extracto obtenidos a partir de cultivos tratados con mitomicina C; 2: extracto obtenidos a partir de cultivos no tratados.

Varias bacteriocinas han sido identificadas utilizando geles no desnaturizantes, desde la bacteriocina BacGM100 producida por *Brevibacillus brevis* GM100 de 4,37 kDa [80] hasta una bacteriocina de aproximadamente 100 kDa producida por *P. syringae* pv. *ciccaronei* NCPPB2355 [81]. Sin embargo, la identificación de bacteriocinas mediante métodos de laboratorio no se considera una tarea sencilla. Por ejemplo, muchos autores han informado que no siempre se obtiene confirmación en medios líquidos, de la inhibición detectada mediante la prueba de la gota en placa [82]. Por otro lado, Metelev et al. [83] encontraron operones homólogos al operón *mcb* de la microcina B de *E. coli* en el genoma de varios patovares del fitopatógeno *P. syringae* y, aunque los genes *mcb* son transcritos, estos investigadores no lograron detectar la producción de compuestos tipo microcina B en dichos patovares.

II.3.3. Sensibilidad de las bacteriocinas a proteinasa K y temperatura

La estabilidad al calor y enzimas proteolíticas son propiedades importantes de las bacteriocinas, ya que muchas veces se utilizan como características distintivas de los diferentes grupos o tipos de bacteriocinas. Por ejemplo, las piocinas tipo fago (tipo R y F) de *P. aeruginosa* son resistentes a proteasa y al calor, a diferencia de las piocinas tipo S, que son sensibles a ambos tratamientos [7]. Por otro lado, las bacteriocinas de las bacterias del ácido láctico pertenecientes al grupo II, como por ejemplo la pediocina, tienen la propiedad de ser estables al calor; mientras que aquellas pertenecientes al grupo III, como lactacina B, son lábiles a la temperatura [84].

La bacteriocina producida por *P. fluorescens* SF39a fue sensible a proteinasa K (figura II-9A) y lábil a la temperatura (figura II-9B). Como se puede observar en la figura II-9 una temperatura de 50°C produjo la termoinactivación de la bacteriocina y el tratamiento con proteinasa K eliminó completamente la actividad de la misma cuando se incubó durante 3 horas. Estas mismas propiedades son observadas para las piocinas tipo S de *P. aeruginosa* [2] y para las bacteriocinas tipo lectinas de *P. putida* [42].

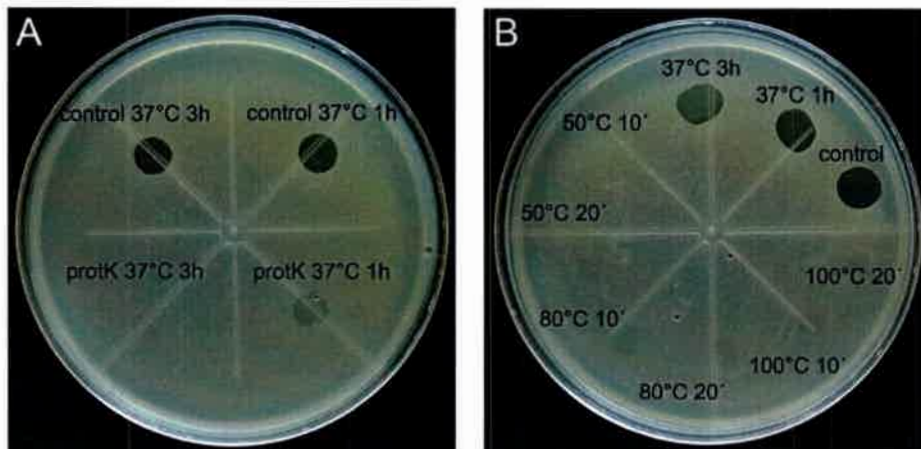


Figura II-9 | Tolerancia de las bacteriocinas producidas por *P. fluorescens* SF39a a temperaturas y proteinasa K. (A) Actividad antimicrobiana del extracto crudo, tratado con proteinasa K 1 y 3 h, contra la cepa indicadora CTR212 (B) Actividad antimicrobiana del extracto crudo, expuesto a 37°C, 50°C, 80°C y 100°C, contra la cepa CTR212.

II.3.4. Predicción de genes de bacteriocinas en el *draft* del genoma de *P. fluorescens* SF39a

Recientemente, el genoma de nuestra cepa de estudio fue secuenciado [85]; por lo tanto, nos propusimos realizar un análisis *in silico* del *draft* del genoma de dicha cepa con el objetivo de identificar posibles genes de bacteriocinas.

Utilizando la herramienta bioinformática BAGEL3 logramos predecir un gen que codifica para una posible piocina tipo S en el contig 28 del *draft* del genoma de la cepa SF39a (figura II-10). Este gen corresponde al locus tag NX10 RS24625 y está anotado en la base de datos como una proteína hipotética. Nosotros decidimos llamarlo *pys*, de acuerdo al nombre de sus ortólogos en *P. aeruginosa*.

La posible piocina S de *P. fluorescens* SF39a, predicha a partir del gen *pys*, contiene 635 aminoácidos, una masa molecular de 68321,3 Da y tiene homología con genes de piocinas tipo S de otras cepas de *Pseudomonas* presentes en la base de datos del NCBI, como por ejemplo, *Pseudomonas* sp. DSM 29165 (63% de similitud), *P. fluorescens* Pf0-1 (63% de similitud), *P. syringae* pv. *spinaceae* (60% de similitud), *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (56% de similitud) y *P. aeruginosa* PAO1 (piocina S2) (53% de similitud) y otras *Pseudomonas* spp.

Como se mencionó en la sección introducción de este capítulo, las piocinas tipo S presentan una estructura modular compuesta por varios dominios. La mayoría de las piocinas S están compuestas por un dominio N-terminal de unión al receptor, un dominio central de translocación y un dominio C-terminal citotóxico [2].

La búsqueda de dominios conservados en la piocina S de la cepa SF39a reveló la presencia de dos dominios Pfam. En el extremo C-terminal se identificó un dominio “**DNasa/tRNasa de bacteriocinas tipo colicinas**” (residuos 504 a 634) que contiene el motivo HNH endonucleasa. La mayoría de las colicinas y piocinas con actividad DNasa contiene en su dominio C-terminal este motivo HNH endonucleasa, el cual, constituye el núcleo del sitio catalítico y, puede quelar un ion metal requerido para la hidrólisis del ADN [2,49,86]. Por otro lado, en la región central de la proteína (residuos 366 a 501) se encontró un dominio “**piocina tipo S**” (PF06958) que está presente en las piocinas S que tienen blancos intracitoplasmáticos (como las piocinas con actividad DNasa) y constituye el dominio de translocación [2].

En cuanto a la región N-terminal, se observó que presenta muy baja similitud con la de las otras piocinas S. En la figura II-11 se muestra un alineamiento entre las piocinas S de

diferentes cepas y especies de *Pseudomonas*, incluida la cepa SF39a. Se puede observar una elevada similitud entre las regiones C- terminal y central de las diferentes piocinas; pero, una gran variabilidad en el N-terminal (figura II-11). El dominio N-terminal sería el responsable de la unión al receptor de las células sensibles. Por lo tanto, esta diferencia en el N-terminal sugiere diferentes especificidades de receptores. La variabilidad en el dominio N-terminal también fue observada por Parret et al. [49] al comparar la bacteriocina Pp1 (predicha in silico en *P. putida* BW11P2) con otras piocinas conocidas.

La mayoría de los operones de piocinas S y colicinas contienen un gen que codifica para su correspondiente proteína inmunitaria (figura II-3A), la cual, protege a la célula productora de la acción de su propia bacteriocina. En la cepa SF39a, corriente abajo del gen *pys* se encontró un gen que codifica para la posible proteína inmunitaria de la bacteriocina y fue denominado *imm* (figura II-10). La proteína predicha a partir de gen *imm* de la cepa SF39a tiene 82 aminoácidos, un peso molecular de 9587,7 Da, presenta una alta similitud con otras proteínas inmunitarias de bacteriocinas y contiene un dominio “proteína inmunitaria de piocinas/colicinas” (residuos 1 a 80).

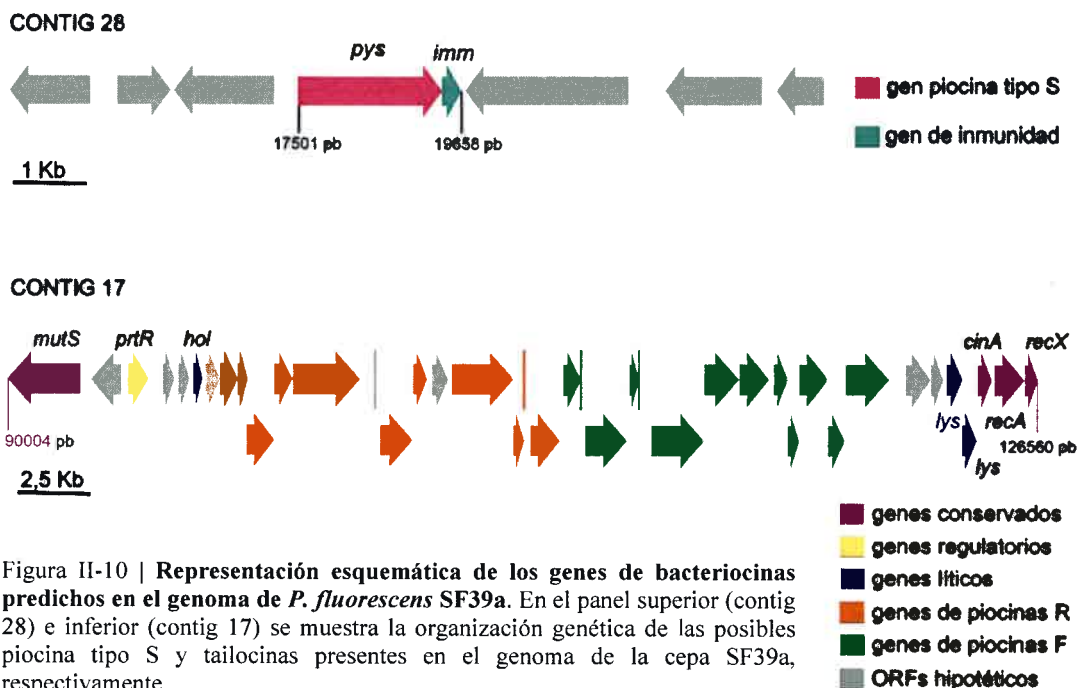


Figura II-10 | Representación esquemática de los genes de bacteriocinas predichos en el genoma de *P. fluorescens* SF39a. En el panel superior (contig 28) e inferior (contig 17) se muestra la organización genética de las posibles piocinas tipo S y tailocinas presentes en el genoma de la cepa SF39a, respectivamente.

BAGEL3 es una herramienta capaz de predecir genes para la mayoría y principales clases de bacteriocinas; sin embargo, no contiene criterios en su base de datos para identificar bacteriocinas tipo tailocinas, como las piocinas tipo F y R producidas por *P. aeruginosa* [87]. Por lo tanto, otra estrategia fue utilizada para la predicción de este tipo de bacteriocinas.

En *P. aeruginosa*, los genes de tailocinas R y F están integrados entre los genes *trpE* y *trpG* (figura II-2), mientras que en *P. fluorescens* los genes de piocinas tipo fago se encuentran entre los genes conservados *mutS* y *cinA-recA-recX* [47,87,88]. Por lo tanto, la identificación de estos genes en el genoma de la cepa SF39a nos indicaría la localización de un posible *cluster* de tailocina.

Utilizando el algoritmo Blastn se lograron identificar los genes conservados *mutS*, *cinA*, *recA* y *recX* en el contig 17 del *draft* del genoma de la cepa SF39a. Luego, con Blastp se analizaron cada uno de los ORFs localizados entre *mutS* y *cinA*. De esta manera, se logró identificar un *cluster* de 36557 pb y 42 genes que corresponden a los genes estructurales para tailocinas tipo R y tipo F, los genes líticos *hol* y *lys*, el gen regulatorio *priR* y otros ORFs de función desconocida (figura II-10).

El gen *priR* codifica para un represor, el cual, junto con el gen *recA* y *priN* (activador) regulan la producción de piocinas mediante la respuesta SOS en *P. aeruginosa* [2] (figura II-5). Como se mencionó anteriormente, los genes *priR* y *recA* fueron identificados en el *cluster* de tailocinas de la cepa SF39a; sin embargo, ningún gen homólogo a *priN* fue identificado (figura II-10). Estos resultados concuerdan con los observados en los otros *cluster* de tailocinas identificados en *P. fluorescens* [48,86],

Muchos genes de piocinas tipo fago y tipo S han sido identificados in silico en *Pseudomonas* spp. asociadas a plantas [2,48,49]. Por ejemplo, Mavrodi *et al.* [88] y Hockett *et al.* [87] identificaron profagos similares a las tailocinas tipo F y R de *P. aeruginosa* en el genoma de las cepas benéficas *P. fluorescens* Pf0-1, *P. protegens* Pf-5, *P. fluorescens* Q8r1-96, *P. fluorescens* SBW25, *P. putida* KT2440, *P. fluorescens* A506, entre otras. Además, Loper *et al.* [89] analizaron 10 genomas de *P. fluorescens* y, en cada cepa, fueron capaces de predecir de dos a siete bacteriocinas. Colectivamente, los genomas incluyeron genes para la mayoría de los grupos de bacteriocinas producidos por *Pseudomonas* spp, como, bacteriocinas tipo S (AP41, S1, S2, S3 y S5), tipo colicina M y tipo lectinas. A pesar de esto, la caracterización funcional de

bacteriocinas se encuentra retrasada en relación a la cantidad de genes de bacteriocinas identificados en los genomas.

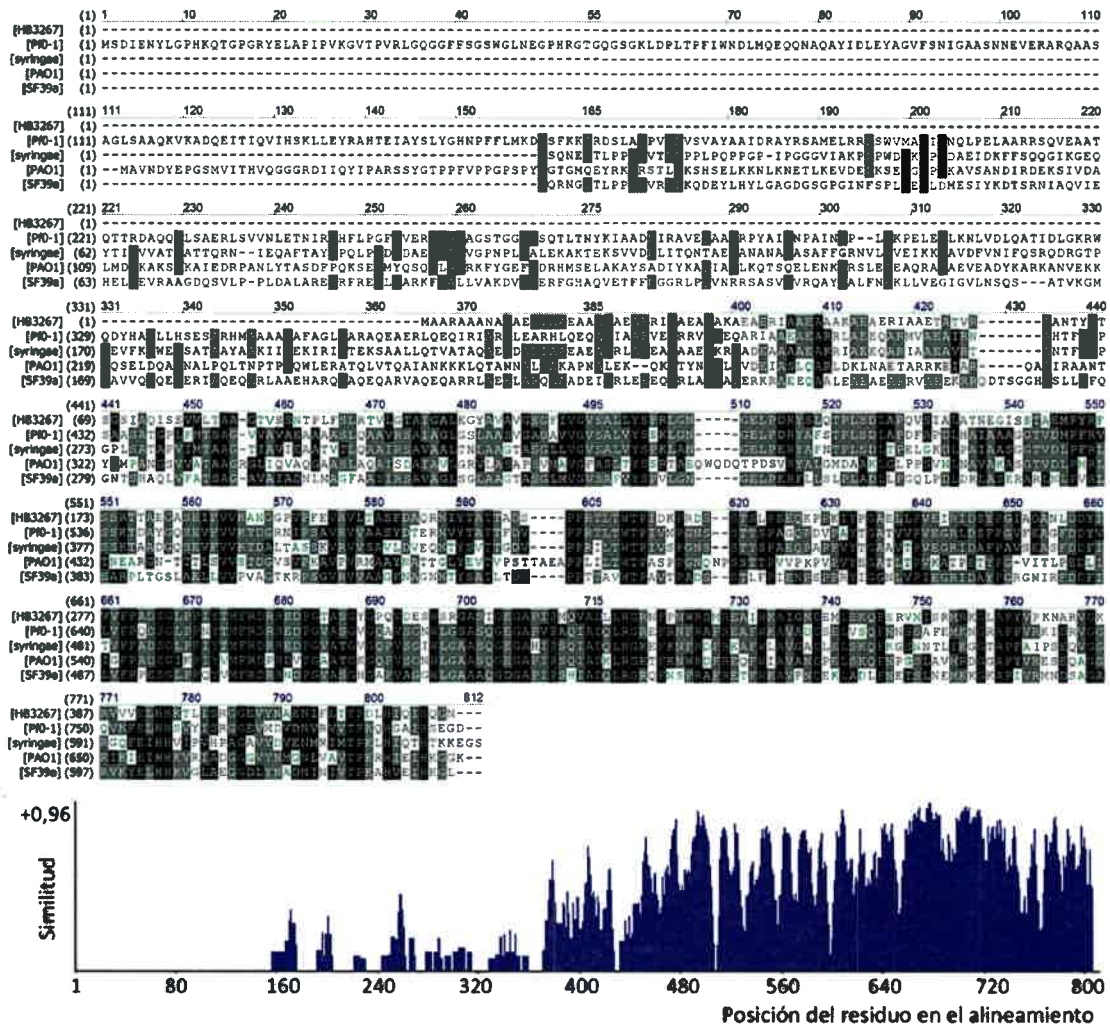


Figura II-11 | Alineamiento de la secuencia de la piocina S de la cepa SF39a con otras piocinas S de diferentes especies de *Pseudomonas*. HB3267: *P. putida* HB3267, Pf0-1: *P. fluorescens* Pf0-1, syringae: *P. syringae* pv. *spinacea*, PAO1: *P. aeruginosa* PAO1, SF39a: *P. fluorescens* SF39a. En la parte inferior de la figura se muestra un gráfico de similitud, donde se asigna un valor específico (en un rango del 0 al 1) a cada residuo en una posición determinada del alineamiento de cada una de las secuencias alineadas dependiendo de cuán similar es dicho residuo al de la secuencia consenso [1 (idénticos), 0,5 (similar), y 0,2 (débilmente similar)]. Los valores para cada residuo en una posición dada se suman y se normalizan de acuerdo al número de secuencias alineadas. De esta forma se obtiene un valor de similitud para cada posición a lo largo de todo el alineamiento.

II.3.5. Caracterización funcional de la piocina tipo S

Las piocinas S son bacteriocinas sensibles al calor y a proteasas y, producen halos de inhibición de gran diámetro ya que difunden lejos de la colonia por su bajo peso molecular (comparado con las piocinas tipo fago) [2]. Todas estas características fueron observadas en la bacteriocina producida por la cepa SF39a; por lo tanto, decidimos construir un mutante en el gen *pys* y analizar la producción de bacteriocina en dicho mutante.

El mutante en el gen *pys* fue construido por reemplazo de un fragmento interno de dicho gen, de aproximadamente 1600 pb, por un casete de resistencia a Km mediante doble recombinación homóloga (ver materiales y métodos sección II.2.8 y figura II-6). El evento de doble recombinación fue confirmado mediante PCR (figura II-12) y Southern-blot (figura II-13). En la figura II-12, se puede observar que en aquella colonia donde ocurrió un evento de doble recombinación se amplificó un producto de 1250 pb (correspondiente al gen interrumpido por el casete de Km); mientras que, en la colonia donde ocurrió una simple recombinación se amplificaron dos productos, uno de 1250 pb, correspondiente al gen mutado, y otro de 1900 pb, correspondiente al gen salvaje. En la cepa salvaje se amplificó un único producto de PCR de 1900 pb correspondiente al gen salvaje. La diferencia de peso entre el producto de amplificación del gen mutado y el salvaje corresponde a la delección de una región de aproximadamente 1600 pb del gen *pys* y el reemplazo de la misma por un casete de Km de 950pb.

En el caso del Southern-blot, se detectó una única banda de hibridación en el mutante doble recombinante y en la cepa salvaje, de aproximadamente 4300 pb y 8100 pb, respectivamente (figura II-13A). Esta diferencia, corresponde al patrón de restricción diferencial obtenido luego de la digestión con *Bam*HI, ya que la incorporación del casete de Km generó sitios *Bam*HI adicionales que no están en el genoma de la cepa salvaje (figura II-13B). Los clones simples recombinantes se diferenciaron por la observación de dos bandas de hibridación, una de ellas, correspondiente al gen mutado (4300 pb aproximadamente) y la otra, al gen salvaje (7000 pb aproximadamente) (figura II-13).

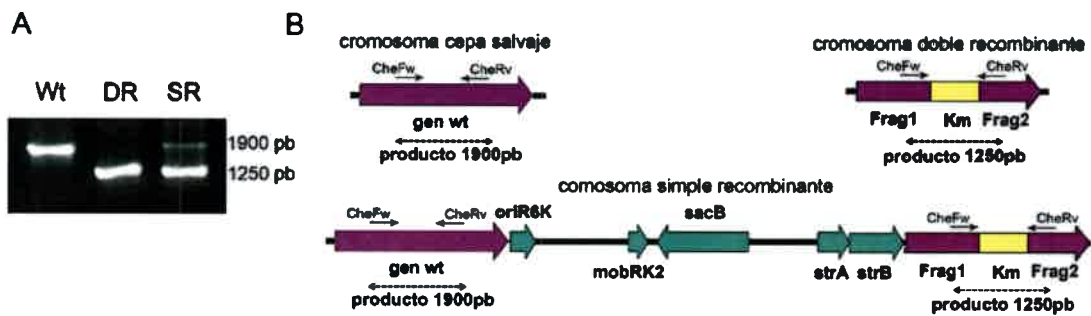


Figura II-12 | Confirmación del evento de doble recombinación homóloga mediante PCR. (A) Productos de PCR amplificados utilizando los cebadores CheFw y CheRv en la cepa salvaje SF39a (calle Wt), en el mutante doble recombinante (calle DR) y en el clon simple recombinante (calle SR). (B) Representación esquemática de los productos de PCR esperados.

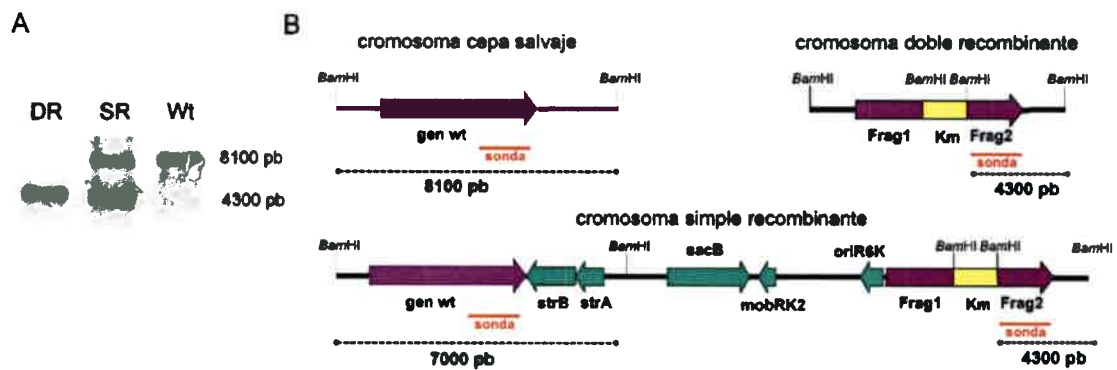


Figura II-13 | Confirmación del evento de doble recombinación homóloga mediante Southern-blot. (A) Bandas de hibridación obtenidas en el clon doble recombinantes (DR), simple recombinante (SR) y en la cepa salvaje (Wt). (B) Representación esquemática de las bandas de hibridación esperadas.

El mutante doble recombinante obtenido fue denominado *P. fluorescens* SF39a-pys. La capacidad de dicho mutante de producir bacteriocinas fue analizada contra diferentes cepas indicadoras y comparada con la cepa salvaje. La actividad antimicrobiana del mutante SF39a-pys se encontró afectada; pero, no completamente abolida (figura II-14). Para la mayoría de las cepas indicadoras ensayadas fue posible observar un halo de inhibición alrededor de la cepa mutante, aunque de menor tamaño que el producido por la cepa salvaje (Figura II-14A y B). En

el caso de la cepa indicadora *P. putida* KT2440, la cepa SF39a produjo dos halos de inhibición, uno fuerte y cerca de la colonia y uno débil alrededor del primero. El mutante SF39a-pys sólo fue capaz de producir el halo débil de inhibición (Figura II-14C).

La capacidad defectiva del mutante SF39a-pys en la producción de bacteriocinas confirma que el gen *pys* codifica para una bacteriocina tipo S funcional, siendo la primer piocina S caracterizada en *P. fluorescens*. Además, el hecho que la mutación *pys*⁻ no suprimió completamente la producción de bacteriocinas sugiere que la cepa SF39a es capaz de sintetizar varias bacteriocinas de bajo peso molecular; pero sólo una pudo ser detectada en silico.

Se conoce que una misma cepa puede ser capaz de producir más de una bacteriocina. Por ejemplo, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* es capaz de producir una tailocina llamada carotovoricina Er [37] y, tres bacteriocinas de bajo peso molecular denominadas carocina S1, carocina S2 y carocina D [38–40]. Chuang et al. [40] observaron que un mutante defectivo en la producción de la bacteriocina de bajo peso molecular carocina S1 presentaba un halo de inhibición más pequeño que la cepa salvaje, posiblemente, correspondiente a alguna de las otras bacteriocinas producidas por la cepa.

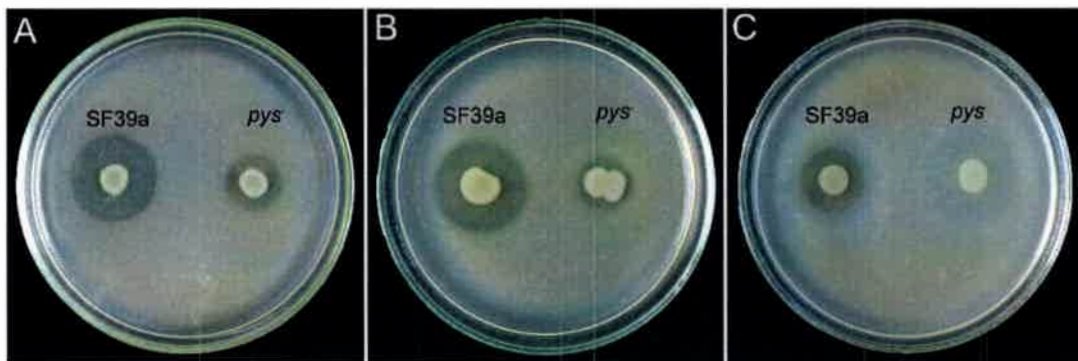


Figura II-14 | Efecto de la mutación *pys*⁻ en la producción de bacteriocina. Actividad antimicrobiana, analizada mediante el método de la gota, de *P. fluorescens* SF39a y *P. fluorescens* SF39a-pys contra *P. fluorescens* CTR212 (A), *P. fluorescens* WCS365 (B) and *P. putida* KT2440 (C).

II-4. CONCLUSIONES

- *P. fluorescens* SF39a inhibe el crecimiento de varias cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, incluyendo, bacterias fitopatógenas que producen severas enfermedades en frutas y hortalizas.
- El genoma de la cepa SF39a posee genes para dos tipos de bacteriocinas, una homóloga a las piocinas tipo S y otra similar a las tailocinas tipo R y F. La posible piocina S está codificada por el gen *pys*, corriente abajo del cual se localiza el gen de la posible proteína inmunitaria de esta bacteriocina. Los genes de tailocinas se localizan en un *cluster* de aproximadamente 40 genes que incluye, genes estructurales, líticos y regulatorios.
- La bacteriocina producida por la cepa SF39a presentó propiedades características de las piocinas tipos S como, sensibilidad a proteasas y a elevadas temperatura; y capacidad de difundir lejos de la colonia produciendo halos de gran diámetro.
- La cepa SF39a produce una piocina tipo S, demostrado por el fenotipo deficiente en la producción de bacteriocina presentado por el mutante *pys*⁻.

II-5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000;406:959–64. doi:10.1038/35023079.
- [2] Ghequire MGK, De Mot R. Ribosomally encoded antibacterial proteins and peptides from *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Rev* 2014;38:523–68. doi:10.1111/1574-6976.12079.
- [3] Gill J, Young RF. Therapeutic applications of phage biology: history, practice and recommendations. In: Miller AA, Miller PF, editors. *Emerg. trends Antibact. Discov. answering call to Arms*, Norfolk, United Kingdom: Caister Academic Press; 2011, p. 367–410.
- [4] Waite RD, Curtis MA. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 pyocin production affects population dynamics within mixed-culture biofilms. *J Bacteriol* 2009;191:1349–54. doi:10.1128/JB.01458-08.
- [5] Köhler T, Donner V, Van Delden C. Lipopolysaccharide as shield and receptor for R-pyocin-mediated killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2010;192:1921–8. doi:10.1128/JB.01459-09.
- [6] Ghequire MGK, De Mot R. The tailocin tale: peeling off phage tails. *Trends Microbiol* 2015;23:587–90. doi:10.1016/j.tim.2015.07.011.
- [7] Michel-Briand Y, Baysse C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 2002;84:499–510. doi:10.1016/S0300-9084(02)01422-0.
- [8] Kageyama M. Studies of a pyocin. I. Physical and chemical properties. *J Biochem* 1964;55:49–53.
- [9] Ito S, Kageyama M, Egami F. Isolation and characterization of pyocins from several strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Appl Microbiol* 1970;6:205–14.
- [10] Takeda Y, Kageyama M. Subunit arrangement in the extended sheath of pyocin R. *J Biochem* 1975;77:679–84.
- [11] Takeya K, Minamishima Y, Amako K, Ohnishi Y. A small rod-shaped pyocin. *Virology* 1967;31:166–8.

- [12] Govan JRW. Studies on the pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*: production of contractile and flexuous pyocins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 1974;80:17–30.
- [13] Kuroda K, Kageyama M. Biochemical properties of a new flexuous bacteriocin, pyocin F1, produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biochem* 1979;85:7–19.
- [14] Kuroda K, Kageyama M. Comparative study on F-type pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biochem* 1981;89:1721–36.
- [15] Nakayama K, Takashima K, Ishihara H, Shinomiya T, Kageyama M, Kanaya S, et al. The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Mol Microbiol* 2000;38:213–31. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02135.x.
- [16] Scholl D, Cooley M, Williams SR, Gebhart D, Martin D, Bates A, et al. An engineered R-type pyocin is a highly specific and sensitive bactericidal agent for the food-borne pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3074–80. doi:10.1128/AAC.01660-08.
- [17] Bakkal S, Robinson SM, Ordonez CL, Waltz DA, Riley MA. Role of bacteriocins in mediating interactions of bacterial isolates taken from cystic fibrosis patients. *Microbiology* 2010;156:2058–67. doi:10.1099/mic.0.036848-0.
- [18] Uratani Y, Hoshino T. Pyocin R1 inhibits active transport in *Pseudomonas aeruginosa* and depolarizes membrane potential 1984;157:1–6.
- [19] Strauch E, Kaspar H, Schaudinn C, Dersch P, Madela K, Gewinner C, et al. Characterization of enterocolicin, a phage tail-like bacteriocin, and its effect on pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:5634–42. doi:10.1128/AEM.67.12.5634-5642.2001.
- [20] Ohkawa I, Kageyama M, Egami F. Purification and properties of pyocin S2. *J Biochem* 1973;73:281–9.
- [21] Holloway BW, Rossiter H, Burgess D, Dodge J. Aeruginocin tolerant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genet Res* 1973;22:239–53.
- [22] Duport C, Baysse C, Michel-Briand Y. Molecular characterization of pyocin S3, a novel S-type pyocin from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 1995;270:8920–7.
- [23] Elfarash A, Wei Q, Cornelis P. The soluble pyocins S2 and S4 from *Pseudomonas aeruginosa* bind to the same FpvAI receptor. *Microbiol Open* 2012;1:268–75.

- doi:10.1002/mbo3.27.
- [24] Ling H, Saeidi N, Rasouliha BH, Chang MW. A predicted S-type pyocin shows a bactericidal activity against clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates through membrane damage. *FEBS Lett* 2010;584:3354–8. doi:10.1016/j.febslet.2010.06.021.
- [25] Dingemans J, Ghequire MGK, Craggs M, De Mot R, Cornelis P. Identification and functional analysis of a bacteriocin, pyocin S6, with ribonuclease activity from a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis clinical isolate. *Microbiol Open* 2016. doi:10.1002/mbo3.339.
- [26] Barreteau H, Bouhss A, Fourgeaud M, Mainardi JL, Touzé T, Gérard F, et al. Human- and plant-pathogenic *Pseudomonas* species produce bacteriocins exhibiting colicin M-like hydrolase activity towards peptidoglycan precursors. *J Bacteriol* 2009;191:3657–64. doi:10.1128/JB.01824-08.
- [27] Barreteau H, Tiouajni M, Graille M, Josseaume N, Bouhss A, Patin D, et al. Functional and structural characterization of Paem, a colicin M-like bacteriocin produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 2012;287:37395–405. doi:10.1074/jbc.M112.406439.
- [28] Rasouliha BH, Ling H, Ho CL, Chang MW. A predicted immunity protein confers resistance to pyocin S5 in a sensitive strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chembiochem* 2013;14:2444–6. doi:10.1002/cbic.201300410.
- [29] Al-Rubiee R, Al-Mudaffar S, Hassan F, Al-Ani F. Purification and characterization of pyocins R from *Pseudomonas aeruginosa*. *Folia Microbiol* 1988;33:520–4.
- [30] Abdi-Ali A, Worobec EA, Deezagi A, Malekzadeh F. Cytotoxic effects of pyocin S2 produced by *Pseudomonas aeruginosa* on the growth of three human cell lines. *Can J Microbiol* 2004;50:375–81. doi:10.1139/w04-019.
- [31] Brazas MD, Brazas MD, Hancock REW, Hancock REW. Ciprofloxacin induction of a susceptibility determinant in *Pseudomonas aeruginosa*. *Society* 2005;49:3222–7. doi:10.1128/AAC.49.8.3222.
- [32] Chang W, Small DA, Toghrol F, Bentley WE. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* reveals induction of pyocin genes in response to hydrogen peroxide. *BMC Genomics* 2005;6:115. doi:10.1186/1471-2164-6-115.
- [33] Matsui H, Sano Y, Ishihara H, Shinomiya T. Regulation of pyocin genes in *Pseudomonas aeruginosa* by positive (prtN) and negative (prtR) regulatory genes. *J Bacteriol* 1993;175:1257–63.

- [34] Žiedaite G, Daugelavičius R, Bamford JKH, Bamford DH. The holin protein of bacteriophage PRD1 forms a pore for small-molecule and endolysin translocation. *J Bacteriol* 2005;187:5397–405. doi:10.1128/JB.187.15.5397-5405.2005.
- [35] Scholz R, Molohon KJ, Nachtigall J, Vater J, Markley AL, Süßmuth RD, et al. Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J Bacteriol* 2011;193:215–24. doi:10.1128/JB.00784-10.
- [36] Jabrane A, Sabri A, Compère P, Jacques P, Vandenberghe I, Van Beeumen J, et al. Characterization of serracin P, a phage-tail-like bacteriocin, and its activity against *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:5704–10. doi:10.1128/AEM.68.11.5704-5710.2002.
- [37] Nguyen AH, Tomita T, Hirota M, Sato T, Kamio Y. A simple purification method and morphology and component analyses for carotovoricin Er, a phage-tail-like bacteriocin from the plant pathogen *Erwinia carotovora* Er. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;63:1360–9. doi:10.1271/bbb.63.1360.
- [38] Roh E, Park TH, Kim M II, Lee S, Ryu S, Oh CS, et al. Characterization of a new bacteriocin, carocin D, from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:7541–9. doi:10.1128/AEM.03103-09.
- [39] Chan YC, Wu JL, Wu HP, Tzeng KC, Chuang DY. Cloning, purification, and functional characterization of Carocin S2, a ribonuclease bacteriocin produced by *Pectobacterium carotovorum*. *BMC Microbiol* 2011;11:99. doi:10.1186/1471-2180-11-99.
- [40] Chuang DY, Chien YC, Wu HP. Cloning and expression of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* gene encoding the low-molecular-weight bacteriocin carocin S1. *J Bacteriol* 2007;189:620–6. doi:10.1128/JB.01090-06.
- [41] Grinter R, Milner J, Walker D. Ferredoxin containing bacteriocins suggest a novel mechanism of iron uptake in *Pectobacterium* spp. *PLoS One* 2012;7:e33033. doi:10.1371/journal.pone.0033033.
- [42] Parret AHA, Schoofs G, Proost P, De Mot R. Plant lectin-like bacteriocin from a rhizosphere-colonizing *Pseudomonas* isolate. *J Bacteriol* 2003;185:897–908. doi:DOI: 10.1128/JB.185.3.897–908.2003.
- [43] Ghequire MGK, Garcia-Pino A, Lebbe EKM, Spaepen S, Loris R, De Mot R. Structural determinants for activity and specificity of the bacterial toxin LlpA. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003199. doi:10.1371/journal.ppat.1003199.
- [44] Parret AHA, Temmerman K, De Mot R. Novel lectin-like bacteriocins of biocontrol

- strain *Pseudomonas* novel lectin-like bacteriocins of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:5197–207. doi:10.1128/AEM.71.9.5197.
- [45] Ghequire MGK, Li W, Proost P, Loris R, De Mot R. Plant lectin-like antibacterial proteins from phytopathogens *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas citri*. *Environ Microbiol Rep* 2012;4:373–80. doi:10.1111/j.1758-2229.2012.00331.x.
- [46] McCaughey LC, Grinter R, Josts I, Roszak AW, Waløen KI, Cogdell RJ, et al. Lectin-like bacteriocins from *Pseudomonas* spp. utilise D-Rhamnose containing lipopolysaccharide as a cellular receptor. *PLoS Pathog* 2014;10:e1003898. doi:10.1371/journal.ppat.1003898.
- [47] Fischer S, Godino A, Quesada JM, Cordero P, Jofré E, Mori G, et al. Characterization of a phage-like pyocin from the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* SF4c. *Microbiology* 2012;158:1493–503. doi:10.1099/mic.0.056002-0.
- [48] Ghequire MGK, Dillen Y, Lambrichts I, Proost P, Wattiez R, De Mot R. Different ancestries of R tailocins in rhizospheric *Pseudomonas* isolates. *Genome Biol Evol* 2015;7:2810–28. doi:10.1093/gbe/evv184.
- [49] Parret AHA, De Mot R. Bacteria killing their own kind: Novel bacteriocins of *Pseudomonas* and other γ -proteobacteria. *Trends Microbiol* 2002;10:107–12. doi:10.1016/S0966-842X(02)02307-7.
- [50] Fischer SE, Fischer SI, Magris S, Mori GB. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. *World J Microbiol Biotechnol* 2007;23:895–903. doi:10.1007/s11274-006-9312-4.
- [51] Latour X, Corberand T, Laguerre G, Allard F, Lemanceau P. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:2449–56.
- [52] Compeau G, Al-Achi BJ, Platsouka E, Levy SB. Survival of rifampin-resistant mutants of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in soil systems. *Appl Environ Microbiol* 1988;54:2432–8.
- [53] Franklin FC, Bagdasarian M, Bagdasarian MM, Timmis KN. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:7458–62. doi:10.1073/pnas.78.12.7458.
- [54] Geels FP, Schippers B. Selection of antagonistic Fluorescent *Pseudomonas* spp. and their

- root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *J Phytopathol* 1983;108:193–206. doi:10.1111/j.1439-0434.1983.tb00579.x.
- [55] Stutz EW, Défago G, Kern H. Naturally Occurring Fluorescent *Pseudomonads* Involved in Suppression of Black Root Rot of Tobacco. *Phytopathology* 1986;76:181. doi:10.1094/Phyto-76-181.
- [56] Huang HC, Schuurink R, Denny TP, Atkinson MM, Baker CJ, Yucel I, et al. Molecular cloning of a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* gene cluster that enables *Pseudomonas fluorescens* to elicit the hypersensitive response in tobacco plants. *J Bacteriol* 1988;170:4748–56.
- [57] Scarlett CM, Fletcher JT, Roberts P, Lelliott RA. Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas corrugata* n. sp. *Ann Appl Biol* 1978;88:105–14. doi:10.1111/j.1744-7348.1978.tb00684.x.
- [58] Alippi AM, Dal Bo E, Ronco LB, López M V, López AC, Aguilar OM. *Pseudomonas* populations causing pith necrosis of tomato and pepper in Argentina are highly diverse. *Plant Pathol* 2003;52:287–302. doi:10.1046/j.1365-3059.2003.00850.x.
- [59] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983;166:557–80. doi:10.1016/S0022-2836(83)80284-8.
- [60] Herrero M, De Lorenzo V, Timmis KN. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1990;172:6557–67.
- [61] Kaniga K, Delor I, Cornelis GR. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 1991;109:137–41. doi:10.1016/0378-1119(91)90599-7.
- [62] Dennis JJ, Zylstra GJ. Improved antibiotic-resistance cassettes through restriction site elimination using Pfu DNA polymerase PCR. *Biotechniques* 1998;25:772–4. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [63] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. second ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
- [64] Le Gouill C, Parent J, Pleszczynski M, Stankova J. Minipreps for recombinant plasmids. *Anal Biochem* 1994;219:154.
- [65] Choi KH, Kumar A, Schweizer HP. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer

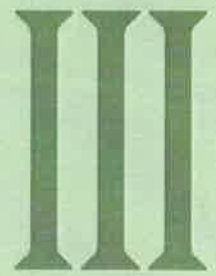
- between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods* 2006;64:391–7. doi:10.1016/j.mimet.2005.06.001.
- [66] Scholl D, Martin DW. Antibacterial efficacy of R-type pyocins towards *Pseudomonas aeruginosa* in a murine peritonitis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1647–52. doi:10.1128/AAC.01479-07.
- [67] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;277:680–5. doi:10.1038/227680a0.
- [68] Davis BJ. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum protein. *Ann N Y Acad Sci* 1964;121:404–27. doi:10.1111/j.1749-6632.1964.tb14213.x.
- [69] Grinter R, Roszak AW, Cogdell RJ, Milner JJ, Walker D. The crystal structure of the lipid II-degrading bacteriocin syringacin M suggests unexpected evolutionary relationships between colicin M-like bacteriocins. *J Biol Chem* 2012;287:38876–88. doi:10.1074/jbc.M112.400150.
- [70] Papagianni M, Papamichael EM. Purification, amino acid sequence and characterization of the class IIa bacteriocin weissellin A, produced by *Weissella paramesenteroides* DX. *Bioresour Technol* 2011;102:6730–4. doi:10.1016/j.biortech.2011.03.106.
- [71] van Heel AJ, de Jong A, Montalban-Lopez M, Kok J, Kuipers OP. BAGEL3: automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-)bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic Acids Res* 2013;41:W448–53. doi:10.1093/nar/gkt391.
- [72] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389–402. doi:10.1093/nar/25.17.3389.
- [73] Kolter R, Inuzuka M, Helinski DR. Trans-complementation-dependent replication of a low molecular weight origin fragment from plasmid R6K. *Cell* 1978;15:199–208.
- [74] Sarris PF, Trantas EA, Mpalantinaki E, Ververidis F, Goumas DE. *Pseudomonas viridiflava*, a multi host plant pathogen with significant genetic variation at the molecular level. *PLoS One* 2012;7:e36090. doi:10.1371/journal.pone.0036090.
- [75] Nico AI, Alippi AM, Dal Bo ED, Ronco LB. Interacción de *Pseudomonas corrugata* y *Pseudomonas viridiflava* y diferentes genotipos de tomate. *Rev La Fac Agron La Plata* 2006;106:37–45.
- [76] Kirchberg J, Büttner D, Thiemer B, Sawers RG. Aconitase B is required for optimal growth of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper plants. *PLoS One*

- 2012;7:e34941. doi:10.1371/journal.pone.0034941.
- [77] Garavaglia BS, Thomas L, Gottig N, Dunger G, Garofalo CG, Daurelio LD, et al. A eukaryotic-acquired gene by a biotrophic phytopathogen allows prolonged survival on the host by counteracting the shut-down of plant photosynthesis. *PLoS One* 2010;5:e8950. doi:10.1371/journal.pone.0008950.
- [78] Yingqing M, Varoglu M, Sherman DH. Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564. *Chem Biol* 1999;6:251–63. doi:10.1016/S1074-5521(99)80040-4.
- [79] Cascales E, Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Llobès R, Postle K, et al. Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007;71:158–229. doi:10.1128/MMBR.00036-06.
- [80] Ghadbane M, Harzallah D, Laribi AI, Jaouadi B, Belhadj H. Purification and biochemical characterization of a highly thermostable bacteriocin isolated from *Brevibacillus brevis* strain GM100. *Biosci Biotechnol Biochem* 2013;77:151–60. doi:10.1271/bbb.120681.
- [81] Lavermicocca P, Lonigro SL, Evidente A, Andolfi A. Bacteriocin production by *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei* NCPPB2355. Isolation and partial characterization of the antimicrobial compound 1999;86:257–65.
- [82] Alegría A, Delgado S, Roces C, López B, Mayo B. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *Int J Food Microbiol* 2010;143:61–6. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.029.
- [83] Metelev M, Serebryakov M, Ghilarov D, Zhao Y, Severinov K. Structure of microcin B-like compounds produced by *Pseudomonas syringae* and species specificity of their antibacterial action. *J Bacteriol* 2013;195:4129–37. doi:10.1128/JB.00665-13.
- [84] Fujita K, Ichimasa S, Zendo T, Koga S, Yoneyama F, Nakayama J, et al. Structural analysis and characterization of lacticin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:2871–7. doi:10.1128/AEM.02286-06.
- [85] Ly LK, Underwood GE, McCully LM, Bitzer AS, Godino A, Bucci V, et al. Draft genome sequences of *Pseudomonas fluorescens* strains SF39a and SF4c, potential plant growth promotion and biocontrol agents. *Genome Announc* 2015;3:4–5. doi:10.1128/genomeA.00219-15.
- [86] Papadakos G, Wojdyla JA, Kleanthous C. Nuclease colicins and their immunity proteins. *Q Rev Biophys* 2012;45:57–103. doi:10.1017/S0033583511000114.

- [87] Hockett KL, Renner T, Baltrus DA. Independent co-option of a tailed bacteriophage into a killing complex in *Pseudomonas*. *MBio* 2015;6:1–11. doi:10.1128/mBio.00452-15.
- [88] Mavrodi D V, Loper JE, Paulsen IT, Thomashow LS. Mobile genetic elements in the genome of the beneficial rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *BMC Microbiol* 2009;9:1–18. doi:10.1186/1471-2180-9-8.
- [89] Loper JE, Hassan KA, Mavrodi D V., Davis EW, Lim CK, Shaffer BT, et al. Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: Insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genet* 2012;8:e1002784. doi:10.1371/journal.pgen.1002784.
- [90] Young R, Wang IN, Roof WD. Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends in Microbiol* 2000;8:120–8. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01705-4.

C A P I T U L O III-

Identificación de genes implicados en
la regulación de bacteriocinas

A large, dark green Roman numeral 'III' is centered on a light green rectangular background. The numeral is composed of three vertical bars with decorative top and bottom flares.

III.1. INTRODUCCIÓN

A pesar de que una gran cantidad de bacteriocinas han sido caracterizadas, la regulación de muchas de éstas aún es desconocida y, la de muchas otras requiere validación experimental. Incluso, con frecuencia no se logra la expresión de genes de bacteriocinas, y por consiguiente la producción de las mismas, en condiciones de laboratorio. Por lo tanto, la identificación de los factores que inducen la producción de bacteriocinas es un punto relevante de investigación, ya sea para el desarrollo de productos biotecnológicos a base de bacteriocinas, como, para comprender su impacto en las comunidades microbianas.

Teniendo en cuenta esto, planteamos realizar una mutagénesis al azar en la cepa *P. fluorescens* SF39a con el objetivo de identificar posibles genes implicados en la regulación de bacteriocinas.

III.1.1. Regulación de la síntesis de bacteriocinas

Generalmente, la expresión de las bacteriocinas en ambientes nativos se produce a un bajo nivel hasta que alguna condición del medio, como falta de nutrientes, daño celular o interacción con otras bacterias, aumenta significativamente su producción [1].

En bacterias Gram-negativas, las colicinas y piocinas son inducidas por agentes mutagénicos que dañan el ADN. En presencia de luz UV, mitomicina C o especies reactivas del oxígeno, el sistema SOS es activado y la síntesis de bacteriocinas se induce.

En el mecanismo regulatorio de las colicinas participa la proteína de reparación RecA y la proteína represora LexA. En condiciones normales, la síntesis de colicinas se encuentra apagada en la mayoría de las células colicinogénicas, ya que LexA reprime directamente la expresión de los genes de bacteriocinas mediante su unión a las cajas SOS que se encuentran corriente arriba de los promotores de colicinas. En presencia de agentes que dañan el ADN, la proteína RecA se activa y estimula el autoclivaje de LexA y, en consecuencia, la ARN polimerasa transcribe los genes que codifican colicinas [2,3] (figura III-1).

La regulación de las piocinas es muy similar; pero, un poco más compleja. Además de estar involucrada la proteína de reparación RecA y un represor (PrtR), también está implicada una proteína activadora (PrtN) [4]. Este mecanismo regulatorio se explica en detalle en el capítulo anterior (ver sección II.1.1.3.).

Es importante mencionar que la respuesta SOS es activada solo en las células dañadas; por lo tanto, las bacteriocinas se inducen y sintetizan en gran cantidad solo en una fracción de la población, la cual, se lisa durante el proceso de liberación de las bacteriocinas sacrificándose por el resto de la población (altruismo) [1,5].

Además de agentes que dañan el ADN, otras condiciones del medio ambiente son capaces de regular la producción de piocinas en *P. aeruginosa*. Por ejemplo, mediante un análisis transcripcional y fenotípico, Waite y Curtis [6] demostraron que la producción de piocinas aumenta cuando *P. aeruginosa* crece formando biofilm. Además, observaron que la producción de bacteriocina afecta la dinámica de la población de un biofilm formado por un co-cultivo de la cepa salvaje y una cepa sensible a la bacteriocina. Por otro lado, Alvarez-Ortega y Harwood [7] demostraron que la expresión de la piocina S2 de *P. aeruginosa* es inducida a bajas concentraciones de oxígeno, lo que imita las condiciones de crecimiento de la bacteria en un pulmón con fibrosis quística.

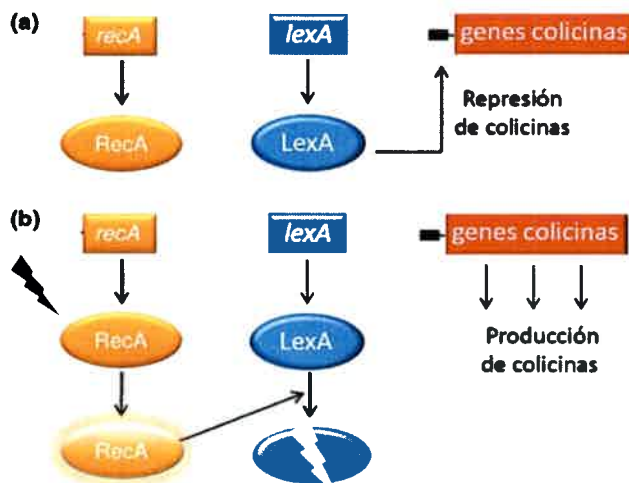


Figura III-1 | **Regulación de colicinas** (a) en ausencia de inductor, el represor LexA se une a las cajas SOS y reprime los genes de colicinas (b) En presencia de un agente mutagénico, RecA se activa e induce el autoclivaje de LexA, liberando la expresión de los genes de colicinas. Cajas SOS son representadas con rectángulos negros.

En bacterias Gram-positivas, la mayoría de las bacteriocinas son reguladas mediante Quorum-Sensing. Cuando la población alcanza una cierta densidad celular la misma bacteriocina o un péptido estrechamente relacionado actúan como inductor de una vía de transducción de señales que culmina en la inducción de los genes de la bacteriocina [1].

La regulación de las bacteriocinas clase I y II de las bacterias ácido-lácticas ha sido bien caracterizada. Ambos mecanismos de regulación se basan en sistemas de transducción de señales; pero difieren en función de su péptido inductor. Las bacteriocinas de clase I están bajo la regulación de un sistema de dos componentes y el inductor es la propia bacteriocina (autoregulación); mientras que, en la regulación de las bacteriocinas de clase II el inductor, por lo general, es una sustancia similar a la bacteriocina que se sintetiza como un pre-péptido, que se somete a procesamientos proteolíticos similares a la bacteriocina, y que se secreta a través del mismo transportador que la bacteriocina [1].

La nisina producida por *L. lactis* es un ejemplo de bacteriocinas de clase I. Cuando la densidad celular de *L. lactis* alcanza un umbral de concentración, la nisina actúa como un auto-inductor en el exterior de la célula y es detectada por el sensor NisK, el cual, se autofosforila para activarse. NisK fosforilado transfiere el fosfato al regulador de respuesta NisR, quien posteriormente activa la expresión de los genes de nisina. Esta regulación está sujeta a retroalimentación positiva una vez que se inicia la expresión [8](figura III-2).

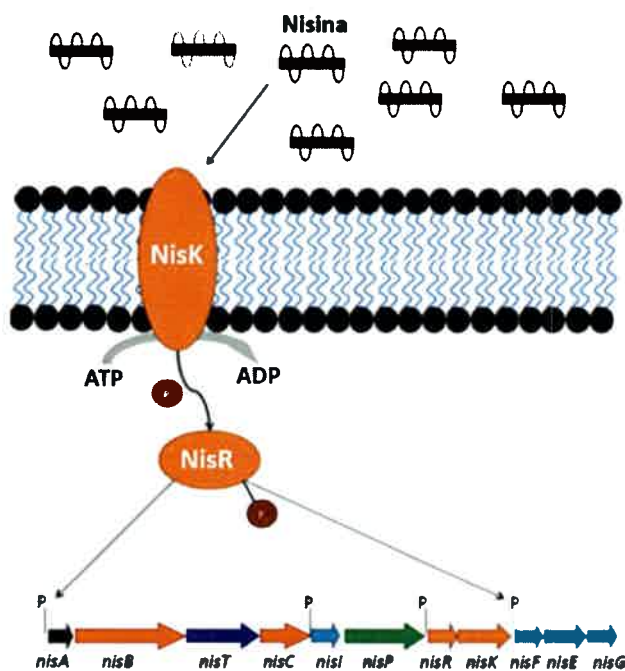


Figura III-2 | **Regulación del antibiótico nisina.** La nisina está regulada por un sistema de dos componentes específico, que consiste, en el sensor histidina quinasa NisK y el regulador de la respuesta NisR. Cuando la nisina alcanza una concentración umbral actúa como un auto-inductor de su propia expresión (figura adaptada de una imagen de la universidad de Düesseldorf).

Independientemente de los mecanismos de regulación utilizados por bacteria Gram-negativas o Gram-positivas, las células regulan la producción de bacteriocinas en respuesta a su medio ambiente y siguiendo un cierto “comportamiento social” (Quórum-Sensing para Gram-positivas o altruismo para Gram-negativas) que le permite a la comunidad poder sobrevivir.

III.2. MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este capítulo son descriptos en la tabla III-1.

Tabla III-1: cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Cepa o plásmido	Origen y característica relevante	Referencia u origen
Cepa		
<i>P. fluorescens</i> SF39a	PGPR, aislada de rizósfera de trigo (Argentina)	[9]
<i>P. fluorescens</i> CTR212	Aislado de suelo (Francia)	[10]
<i>P. fluorescens</i> SF39a-495	Mutante de <i>fluorescens</i> SF39a por inserción del mini-Tn5 Km1 en el gen que codifica una proteína de exporte, Km ^r	Este trabajo
<i>P. fluorescens</i> SF39a-451	Mutante <i>pstP::</i> mini-Tn5 Km1 de <i>P. fluorescens</i> SF39a, Km ^r	Este trabajo
<i>P. fluorescens</i> SF39a-375	Mutante <i>cbrA::</i> mini-Tn5 Km1 de <i>P. fluorescens</i> SF39a, Km ^r	Este trabajo
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>endA1 recA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 ϕ80d lacZ ΔM15.</i>	[11]
<i>E. coli</i> CC118 λ pir	<i>Δ(ara-leu) araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE(Am) recA1 λ pir</i> lisogénica.	[12]
<i>E. coli</i> HB101	<i>Pro leu thi lacY endoI⁻ RecA⁻</i>	[13]
Plásmido		
pBluescript SK	Vector de clonado, Amp ^r	Stratagene
pUT mini-Tn5 Km1	Plásmido suicida que porta el mini-Tn5 Km1, Ap ^r , Km ^r (mini-Tn5 Km1)	[14]
pRK600	Ori ColE1, RK2-Mob ⁺ , RK2-Tra ⁺ , Cm ^r	[15]
pBSK495	pBluescript SK portando un fragmento <i>PstI</i> de 8 kb conteniendo el fragmento de ADN adyacente al transposón de <i>P. fluorescens</i> SF39a-495, Km ^r , Ap ^r	Este trabajo
pBSK451	pBluescript SK portando un fragmento <i>PstI</i> de 6 kb conteniendo el fragmento de ADN adyacente al transposón de <i>P. fluorescens</i> SF39a-451, Km ^r , Ap ^r	Este trabajo

pBSK375	pBluescript SK portando un fragmento <i>Pst</i> I de 2,7 kb conteniendo el fragmento de ADN adyacente al transposón de <i>P. fluorescens</i> SF39a-375, Km ^r , Ap ^r	Este trabajo
---------	---	--------------

Km^r, resistencia a kanamicina; Ap^r, resistencia a ampicilina; Cm^r resistencia a cloranfenicol.

III.2.2. Condiciones de cultivo y técnicas generales de biología molecular

Las condiciones de cultivo y las técnicas generales de biología molecular son especificadas en la sección II.2.2 y II.2.3, respectivamente.

III.2.3. Mutagénesis al azar por inserción del transposón mini-Tn5 Km1

Una conjugación triparental entre la cepa dadora *E. coli* CC118 λ pir (conteniendo el plásmido pUT::mini-Tn5 Km1), la receptora *P. fluorescens* SF39a, y la helper *E. coli* HB101 (portadora del plásmido RK600 que permite la conjugación) fue realizada para obtener mutantes por inserción del transposón mini-Tn5 Km1. Las tres cepas fueron crecidas en medio LB con los antibióticos apropiados (dadora: ampicilina 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, helper: cloranfenicol 30 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) durante toda la noche en agitación a 37°C para *E. coli* y 30°C para *P. fluorescens* SF39a. Luego de la incubación, el cultivo de la cepa receptora se calentó a 42°C durante 15 minutos para inactivar temporalmente su sistema de restricción y 400 μl del mismo se mezcló con 200 μl de la cepa dadora y 100 μl de la cepa helper. Las células se recogieron por centrifugación (6000 rpm, 1 min), se resuspendieron cuidadosamente en 50 μl de LB y sembraron en una placa con medio LB. Luego de una incubación de toda la noche a 30°C, el crecimiento bacteriano fue recogido en 1 ml de LB y se realizaron diluciones seriadas. Las muestras fueron sembradas en placas con medio MMG (K₂HPO₄ 9,6 mM, KH₂PO₄ 6,4 mM, MgSO₄•7H₂O 0,2 mM, CaCl₂ 0,36 mM, FeCl₃ 0,025 mM, NaMoO₄•2H₂O 0,023 mM, Glucosa 22,2 mM, NH₄Cl 18,7 mM) suplementado con kanamicina (25 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) y se incubaron durante toda la noche a la temperatura óptima de la receptora. Colonias resistentes a kanamicina fueron seleccionadas y sucesivamente repicadas en medio MMG suplementado con el antibiótico [16]. Se seleccionaron aquellos clones que mostraron un fenotipo alterado en la producción de bacteriocina mediante el método de la gota (inciso II.2.4).

III.2.4. Caracterización de mutantes

III.2.4.1. Amplificación del gen de resistencia a Km

El gen que codifica la resistencia a kanamicina fue amplificado mediante PCR a partir del ADN genómico de los mutantes. Como control negativo, se empleó ADN genómico de la cepa salvaje y como control positivo el plásmido pUT mini-Tn5 Km1 extraído de la cepa *E. coli* CC118 λ pir. Se utilizaron los cebadores específicos Mini-Tn5-Km-F (5'-TACAAggggTgTTATgAgCCA-3') y Mini-Tn5-Km-R (5'-CgATTTATTCAACAAAgCCgC-3'). La mezcla de reacción y las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes:

MEZCLA DE REACCIÓN		CICLO DE TEMPERATURAS	
Agua	18,75 μ l	Desnaturalización inicial	95°C 2 min
Buffer 10X	2,5 μ l	35 ciclos de:	
dNTP (10 mM)	0,75 μ l	Desnaturalización	95°C 1min
Mini-Tn5-Km-F (20 μ M)	0,5 μ l	Hibridación	54°C 1min
Mini-Tn5-Km-R (20 μ M)	0,5 μ l	Elongación	72°C 1min
Cl ₂ Mg (50 mM)	0,75 μ l	Elongación final	72°C 5 min
ADN molde	1 μ l		
Taq ADN polimerasa	0,25 μ l		

Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa.

III.2.4.2. Amplificación de la secuencia IS50

La secuencia IS50 fue amplificada mediante PCR a partir del ADN genómico de los mutantes. Como control negativo, se empleó ADN genómico de la cepa salvaje y como control positivo el plásmido pUT mini-Tn5 Km1 extraído de la cepa *E. coli* CC118 λ pir. Se utilizaron los cebadores específicos IS1 (5'-gCTCgATCTAg AACgTTCATgATAACTTCTgC-3') e IS2 (5'-TCTgCggACTggCTTTCTAC-3'). La mezcla de reacción y las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes:

MEZCLA DE REACCIÓN	
Agua	18 μ l
Buffer 10X	2,5 μ l
dNTP (10 mM)	0,5 μ l
Cebador IS1 (20 μ M)	1 μ l
Cebador IS2 (20 μ M)	1 μ l
Cl ₂ Mg (50 mM)	0,75 μ l
ADN molde	1 μ l
Taq ADN polimerasa	0,25 μ l

CICLO DE TEMPERATURAS	
Desnaturalización inicial	94°C 2 min
35 ciclos de:	
Desnaturalización	94°C 30 seg
Hibridación	52°C 30 seg
Elongación	72°C 50 seg
Elongación final	72°C 3 min

Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa.

III.2.4.3. Perfiles genéticos

El análisis de los perfiles genéticos de los mutantes, la cepa salvaje (receptora) y la cepa dadora se realizó mediante la amplificación de regiones repetidas presentes en el genoma bacteriano, utilizando los cebadores BOX y ERIC. La mezcla de reacción se realizó de acuerdo a De Bruijn [17]:

BOX-PCR	
Agua	17,225 μ l
Buffer 10X	2,5 μ l
dNTP (10 mM)	0,5 μ l
Cebador BOX A1 (10 μ M)	2,5 μ l
Cl ₂ Mg (50 mM)	1,5 μ l
ADN molde	1 μ l
Taq ADN polimerasa	0,275 μ l

ERIC-PCR	
Agua	18,125 μ l
Buffer 10X	2,5 μ l
dNTP (10 mM)	0,5 μ l
Cebador ERIC (10 μ M)	1,6 μ l
Cl ₂ Mg (50 mM)	1,5 μ l
ADN molde	1 μ l
Taq ADN polimerasa	0,275 μ l

Las condiciones de ciclado se realizaron de acuerdo a Cubero y Graham [18]:

Desnaturalización inicial	94°C 5 min
35 ciclos de:	
Desnaturalización	94°C 30 seg
Hibridación	48°C 30 seg
Elongación	72°C 1 min
Elongación final	72°C 10 min

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,6%.

III.2.4.4. Curvas de crecimiento

La cepa nativa SF39a y los mutantes fueron cultivados en medio MMG líquido hasta $DO_{600} = 0,3$ (pre-inoculo). Posteriormente, se inocularon 0,8 ml del pre-inóculo en 20 ml de medio MMG y se incubaron a 30°C en agitación. El crecimiento bacteriano fue seguido espectrofotométricamente a DO_{600} .

III.2.4.5. Estudio de hibridación (Southern-blot)

El Southern-blot se llevó a cabo como se detalla en la sección II.2.3.7. Como sonda se utilizó el casete de resistencia a kanamicina propio del transposón.

El ADN total de las cepas mutantes, de la cepa salvaje *P. fluorescens* SF39a (control negativo) y el plásmido pUT mini-Tn5 Km1 (control positivo) fue digerido con la enzima de restricción *Pst*I que tiene un sitio de reconocimiento en el extremo O del transposón; pero, fuera del gen de resistencia a kanamicina (figura III-3).

La sonda fue obtenida mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores mini-Tn5-Km-F y mini-Tn5-Km-R (especificados en el inciso III.2.4.1.) y deoxinucleótidos trifosfato, uno de los cuales está marcado con biotina (kit Biotin DecaLabel™ DNA Labeling de Fermentas). La mezcla de reacción y las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes:

MEZCLA DE REACCIÓN	
Agua	34 μ l
Buffer 10X	5 μ l
dNTP (dGTP 1mM, dATP 1mM, dCTP 1mM, dTTP 0,65 mM, Biotin-11-dUTP 0.35mM)	5 μ l
Mini-Tn5-Km-F (20 μ M)	1 μ l
Mini-Tn5-Km-R (20 μ M)	1 μ l
Cl ₂ Mg (50 mM)	1,5 μ l
ADN molde	2 μ l
Taq ADN polimerasa	0,5 μ l

CICLO DE TEMPERATURAS	
Desnaturalización inicial	95°C 2 min
35 ciclos de:	
Desnaturalización	95°C 1min
Hibridación	54°C 1min
Elongación	72°C 1min
Elongación final	72°C 5 min

III.2.5. Clonado y secuenciación del fragmento de ADN interrumpido por el transposón

III.2.5.1. Clonado de la región adyacente al transposón

Para cada uno de los mutantes se realizó el clonado del ADN interrumpido por el transposón en el vector pBluescript (pBSK). El ADN genómico de los mutantes fue extraído y digerido toda la noche con la enzima de restricción *Pst*I. Como se mencionó anteriormente, el transposón mini-Tn5 Km1 presenta un único sitio de corte para *Pst*I en el extremo 3' que no afecta la resistencia a kanamicina (figura III-3), permitiendo de esta manera clonar uno de los fragmentos adyacentes al transposón. Por otro lado, el plásmido pBSK fue extraído y digerido con la misma enzima de restricción. Las digestiones de ADN genómico y plasmídico fueron precipitadas con 0,1 volumen de AcNa (3 M; pH: 5,4) y 1 volumen de isopropanol. Luego, 20 μ l de plásmido fueron desfosforilados (para evitar la recircularización) utilizando la enzima fosfatasa alcalina (SAP) durante 15 minutos a 37°C y posteriormente inactivada a 65°C por 15 minutos. El ADN genómico fue ligado al plásmido pBluescript utilizando la ligasa del fago T4. Posteriormente, la ligación fue precipitada y resuspendida en un volumen final de 10 μ l de H₂O bidestilada estéril. La mezcla de ligación fue utilizada para transformar células de *E. coli* DH5 α electrocompetentes.

Para la preparación de células electrocompetentes, se inoculó 1 ml de un cultivo de *E. coli* DH5 α de toda una noche en 100 ml de medio LB. Posteriormente, se incubó a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ = 0,6. Inmediatamente, fue enfriado en hielo

durante 30 min. Luego, las células fueron centrifugadas a 7000 rpm durante 15 min a 4°C, el pellet celular fue lavado dos veces con 50 ml de glicerol 10% frío y resuspendido en un volumen final de 0,2 ml de medio GYT frío [Glicerol 10% (v/v), extracto de levadura 0,125% (p/v), tripteína 0,25% (p/v)] y conservadas a -80°C, hasta su utilización [19].

Para la transformación, la mezcla de ligación fue mezclada con 0,2 ml de células electrocompetentes en frío y colocadas en cubetas de electroporación pre-enfriadas. La electroporación fue llevada a cabo utilizando Gene Pulser (Bio-Rad) bajo las siguientes condiciones: 25 μ F, 200-600 Ω , 2.0 kV. Luego de la electroporación, las células fueron resuspendidas en 1 ml de medio LB e incubadas en agitación a 37°C durante 2 hora. Posteriormente, se centrifugó a 6000 rpm durante 5 min. El pellet fue resuspendido en 100 μ l de medio LB y sembrado en medio LB suplementado con ampicilina (100 μ g \cdot ml⁻¹), resistencia del plásmido, y kanamicina (25 μ g \cdot ml⁻¹), resistencia del transposón. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las colonias resistentes a los antibióticos fueron seleccionadas. La presencia de un único inserto del mini-Tn5 Km1 en los clones resistentes a kanamicina fue confirmada mediante la extracción de plásmidos, digestión de los mismos con la enzima *Pst*I y análisis de la digestión en geles de agarosa.

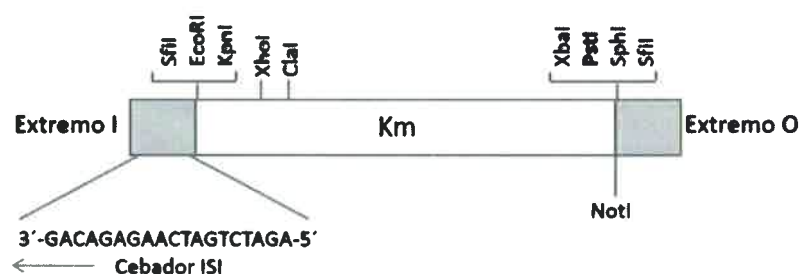


Figura III-3 | Representación esquemática del transposón mini-Tn5 Km1. En negrita se muestra el sitio de corte para la enzima *Pst*I. El cebador ISI hibrida en el extremo I y se utilizó para secuenciar el fragmento adyacente al transposón.

III.2.5.2. Secuenciación de la región interrumpida por el transposón

Los plásmidos recombinantes que presentaron un solo inserto fueron extraídos utilizando el kit comercial QIAprep®Spin Miniprep Kit (Qiagen) y enviados a secuenciar a Macrogen Inc.

(Korea) utilizando el cebador ISI (5'-AgATCTgATCAAgAgACAg-3') como describe Canals et al. [20] (figura III-3). La secuencia de nucleótidos fue analizada en la base de datos GenBank utilizando la herramienta Blast [21].

III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.3.1. Obtención de mutantes afectados en la producción de bacteriocinas

Con el fin de identificar genes implicados en la regulación de bacteriocinas en *P. fluorescens* SF39a, se realizó una mutagénesis al azar utilizando el transposón mini-Tn5 Km1. Se obtuvo una colección de 1200 mutantes y, se seleccionaron aquellos que presentaron un fenotipo alterado en la producción de bacteriocina. Los mutantes seleccionados fueron denominados *P. fluorescens* SF39a-375, *P. fluorescens* SF39a-451 y *P. fluorescens* SF39a-495. El mutante SF39a-375, mostró un halo de inhibición de mayor diámetro que la cepa salvaje; mientras que, los mutantes SF39a-495 y SF39a-451 presentaron halos de inhibición de menor tamaño que el producido por la cepa salvaje *P. fluorescens* SF39a (figura III-4).

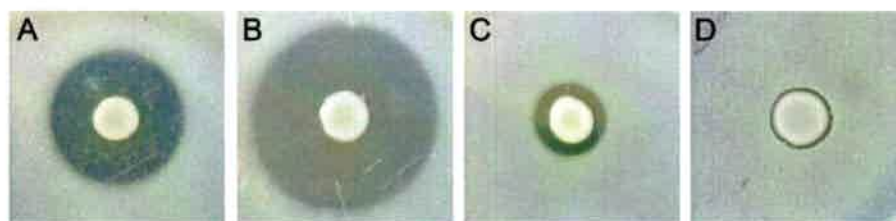


Figura III-4 | Producción de bacteriocinas analizada por el método de la gota. (A) cepa salvaje *P. fluorescens* SF39a, (B) mutante SF39a-375, (C) mutante SF39a-495, (D) mutante SF39a-451.

III.3.2. Caracterización de los mutantes mini-Tn5 Km1

III.3.2.1. Amplificación del gen de resistencia a Km

La presencia del transposón mini-Tn5 Km1 en el genoma de los mutantes obtenidos se confirmó mediante la amplificación por PCR del gen de resistencia a kanamicina propio del transposón. En la figura III-5A se puede observar la presencia de un producto de PCR de aproximadamente 900 pb correspondiente a dicho gen en todos los mutantes y en el control positivo (plásmido pUT mini-Tn5 Km1). Como era de esperar, no hubo amplificación en la cepa salvaje.

III.3.2.2. Amplificación de la secuencia IS50

La secuencia IS50 se encuentra en el plásmido pUTmini-Tn5 Km1; pero, fuera del elemento transponible. Por lo tanto, la amplificación de dicha secuencia nos permite determinar si el plásmido completo se ha integrado en el genoma de los mutantes.

No se observó amplificación de la secuencia IS50 en los mutantes obtenidos confirmando que solo se ha incorporado el transposón en el genoma de dichos mutantes y no se ha integrado el plásmido completo. Como control positivo se utilizó el plásmido pUTmini-Tn5 Km1, donde se puede observar la amplificación de un fragmento de 1200 pb que corresponde a la IS50 (figura III-5B).

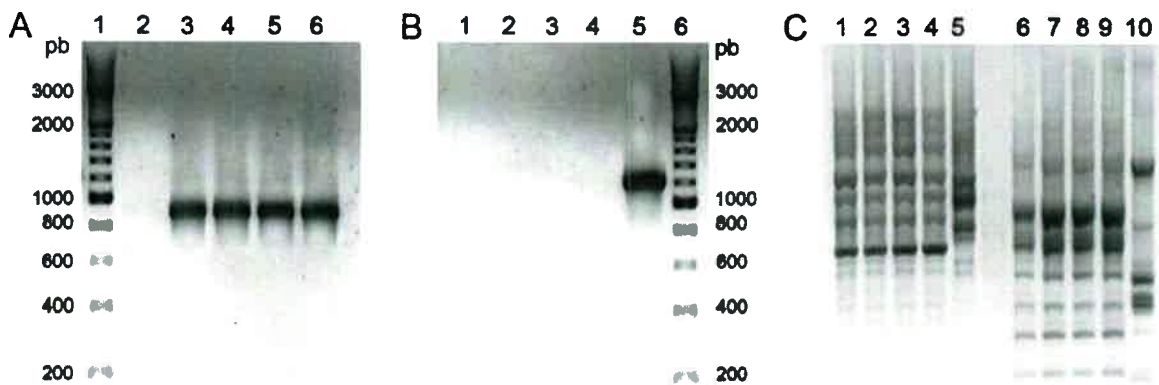


Figura III-5 | **Caracterización genética de los mutantes mini-Tn5 Km1.** (A) Amplificación del gen de resistencia a Km por PCR. Calle 1: marcador de peso molecular O'RangeRuler™ 200 bp DNA Ladder (Fermentas), calle 2: cepa salvaje *P. fluorescens* SF39a, calle 3: mutante SF39a-495, calle 4: mutante SF39a-375, calle 5: mutante SF39a-451, calle 6: plásmido pUT mini-Tn5 Km1. (B) Amplificación mediante PCR de la secuencia IS50. Calle 1: cepa salvaje *P. fluorescens* SF39a, calle 2: mutante SF39a-495, calle 3: mutante SF39a-375, calle 4: mutante SF39a-451, calle 5: plásmido pUT mini-Tn5 Km1, calle 6: marcador de peso molecular O'RangeRuler™ 200 bp DNA Ladder (Fermentas). (C) Perfiles genéticos obtenidos mediante BOX-PCR (calle 1-5) y ERIC-PCR (calle 6-10). Calles 1 y 6: cepa salvaje *P. fluorescens* SF39a, calles 2 y 7: mutante SF39a-495, calles 3 y 8: mutante SF39a-375, calles 4 y 9: mutante SF39a-451. calles 5 y 10: cepa dadora *E. coli* CC118 λpir.

III.3.2.3. Perfiles genéticos

Los perfiles genéticos de los mutantes seleccionados fueron analizados con la finalidad de confirmar que estas cepas son clones de *P. fluorescens* SF39a. Para ello, se realizaron amplificaciones usando los cebadores BOX ó ERIC (correspondientes a elementos de ADN repetitivos presentes en localizaciones características en el genoma de procariontas) tanto en los

mutantes, como en la cepa salvaje y la cepa dadora *E. coli* CC118 λ pir. Como se puede observar en la figura III-5C, las tres cepas mutantes seleccionadas presentaron el mismo perfil genético que la cepa *P. fluorescens* SF39a y diferente al de *E. coli* CC118 λ pir. Por lo tanto, todos los mutantes son clones de la cepa *P. fluorescens* SF39a.

III.3.2.4. Curvas de crecimiento

Con el objetivo de corroborar que el crecimiento de los mutantes seleccionados no está afectado, se realizaron curvas de crecimiento de la cepa salvaje *P. fluorescens* SF39a y de las cepas mutantes SF39a-375, SF39a-495 y SF39a-451. Las bacterias fueron cultivadas en medio MMG y el crecimiento bacteriano seguido espectrofotométricamente a DO 600 nm. En la figura III-6, se puede observar que el crecimiento de las cepas mutantes fue similar al de la cepa salvaje *P. fluorescens* SF39a.

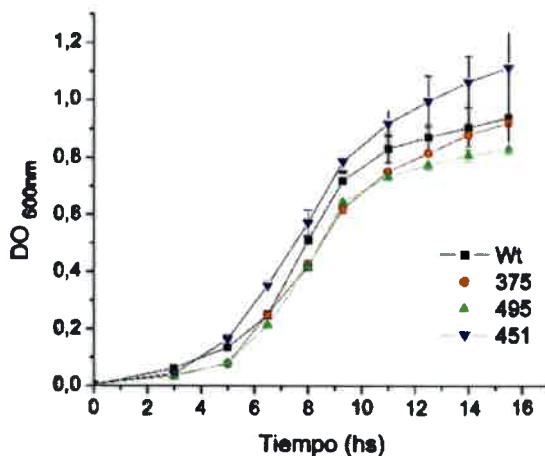


Figura III-6 | **Curvas de crecimiento de la cepa salvaje *P. fluorescens* SF39a y de los mutantes seleccionados.** Wt: *P. fluorescens* SF39a. 375: *P. fluorescens* SF39a-375. 495: *P. fluorescens* SF39a-495. 451: *P. fluorescens* SF39a-451.

III.3.2.5. Estudio de hibridación

Un Southern-blot fue realizado para confirmar la existencia una única inserción del transposón en el genoma de los mutantes. En la figura III-7 se observa la presencia de una banda de hibridación de aproximadamente 2700 pb, 6000 pb y 8000pb en los mutantes SF39a-375, SF39a-451 y SF39a-495, respectivamente, indicando que los mismos presentan una única inserción del transposón mini-Tn5 Km1 en su genoma. Por otro lado, no se observó ninguna banda de hibridación en el ADN genómico de la cepa salvaje utilizada como control negativo.

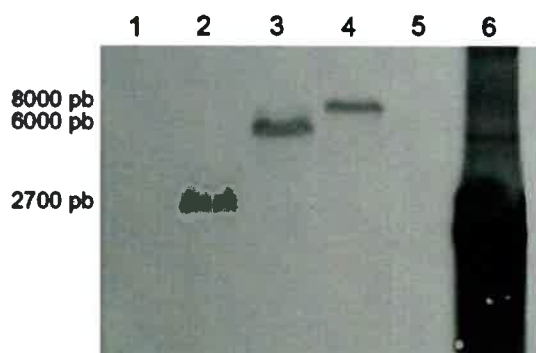


Figura III-7 | Análisis por Southern-blot de los mutantes seleccionados. Calle 1: cepa salvaje *P. fluorescens* SF39a, calle 2: mutante SF39a-375, calle 3: mutante SF39a-451, calle 4: mutante SF39a-495, calle 5: marcador de peso molecular MassRuler™ DNA Ladder Mix (fermentas), calle 6: plásmido pUT mini-Tn5 Km1 digerido.

III.3.3. Clonado y secuenciación del fragmento de ADN interrumpido por el transposón

La región adyacente al transposón de cada cepa mutante fue clonada en el vector pBluescript. De esta manera, se obtuvieron los plásmidos recombinantes pBSK495, pBSK451 y pBSK375 para los mutantes SF39a-495, SF39a-451 y SF39a-375, respectivamente. Los plásmidos recombinantes fueron digeridos con la enzima *PstI* para corroborar la presencia del inserto (figura III-8). En el caso del mutante 495 el fragmento *PstI* clonado en el plásmido pBSK fue de aproximadamente 8000 pb. Mientras que, para las cepas mutantes 451 y 375 el fragmento *PstI* fue de aproximadamente 6000 y 2700 pb, respectivamente (figura III-8). Lo que confirma los resultados obtenidos previamente por Southern-blot (figura III-7).

Los plásmidos recombinantes pBSK495, pBSK451 y pBSK375 fueron enviados a secuenciar y, con las secuencias obtenidas se realizó la búsqueda de homología utilizando el algoritmo Blast y la base de datos del GenBank.

En el mutante SF39a-451, el análisis de la secuencia adyacente al transposón reveló que el mini-Tn5 km1 se insertó en un ORF homólogo a un gen que codifica para una posible proteína de exportación de membrana en varias cepas de *Pseudomonas* spp.; por ejemplo, *P. fluorescens* Pf0-1 (83% de identidad), *Pseudomonas mandelii* JR-1 (80% de identidad), *P. fluorescens* F113 (79% de identidad) y *P. putida* W6192 (75% de identidad).

En el caso del mutante SF39a-451, la secuencia del fragmento interrumpido por el transposón mostró un alto porcentaje de identidad con el gen *ptsP* de *P. fluorescens* Pf0-1 (95%), *P. fluorescens* F113 (94%), *P. brassicacearum* subsp. *brassicacearum* NFM421 (93%), *P. fluorescens* Pf-5 (93%), entre otras. El gen *ptsP* codifica para una proteína fosfotransferasa-

fosfoenolpiruvato (EI^{Ntr}) que forma parte del sistema de transporte fosfotransferasa específico para nitrógeno (PTS^{Ntr}), un sistema regulatorio global implicado en el metabolismo del nitrógeno y carbono, y esencial para la virulencia en algunas bacterias [22].

Por último, en el mutante SF39a-375 el fragmento interrumpido por transposón presentó una elevada identidad con el gen *cbrA* de *P. fluorescens* Pf0-1 (90%), *P. fluorescens* F113 (87%), *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *brassicacearum* NFM421 (87%), *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (86%) y otras cepas de *Pseudomonas* spp.. El gen *cbrA* codifica para el sensor histidina quinasa del sistema de dos componentes CbrAB. Este sistema regulatorio controla, principalmente, vías catabólicas involucradas en la utilización de una gran cantidad de fuentes de carbono y nitrógeno [23].

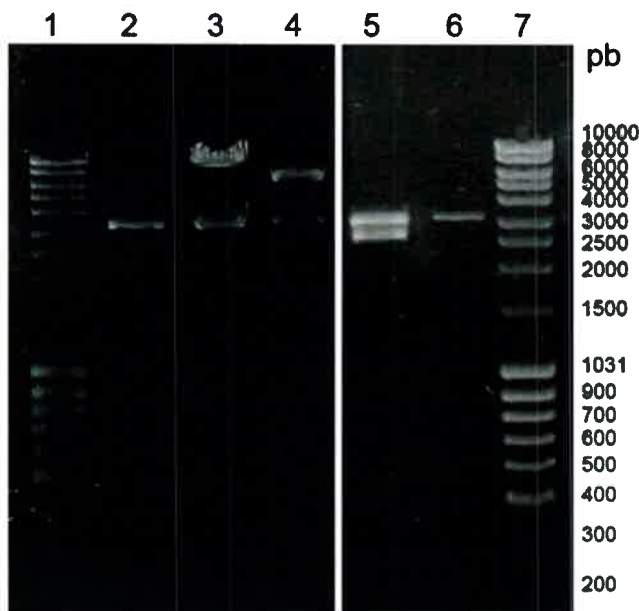


Figura III-8 | Digestión de los plásmidos recombinantes con la enzima de restricción *Pst*I. Calles 1 y 7: marcador de peso molecular MassRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas), calles 2 y 6: plásmido pBSK, calle 3: plásmido pBSK495, calle 4: plásmido pBSK451, calle 5: plásmido pBSK375.

El hecho de que mutaciones en los genes *ptsP* y *cbrA* afecten la producción de bacteriocinas sugiere que los sistemas regulatorios PTS^{Ntr} y CbrAB están implicados en la expresión de bacteriocinas en la cepa SF39a. De manera similar, De los Santos et al [24] infirieron que varias vías de respuesta a estrés controlan la expresión de la bacteriocina LlpA producida por *P. putida* BW11M. Estos investigadores obtuvieron mutantes *TnMod* de la cepa *P. putida* BW11M que presentaban tres fenotipos distintos: ausencia de halo de inhibición, halos

de mayor diámetro y halos de menor diámetro que la cepa salvaje. Mediante secuenciación de la región interrumpida por el trasposón lograron identificar varios genes implicados en vías de respuesta a estrés ambiental, tales como *recA*, *recJ*, *spoT*, *oprL*, como los responsables de estos fenotipos alterados.

Los mutantes SF39a-451 y SF39a-375 fueron seleccionados para estudios posteriores debido a nuestro interés en la regulación de bacteriocinas.

III.4. CONCLUSIONES

- La producción de bacteriocina se vio alterada en los mutantes regulatorios SF39a-451 y SF39a-375 obtenidos a partir de la cepa *P. fluorescens* SF39a.
- La mutación en el gen *ptsP*, el cual codifica para la proteína EI^{Ntr} del sistema fosfotransferasa PTS^{Ntr}, provocó una marcada disminución en la producción de bacteriocinas en la cepa mutante SF39a-451 con relación a la cepa salvaje.
- La mutación en el gen *cbrA*, el cual codifica para el sensor histidina quinasa del sistema de dos componentes CbrAB, provocó un aumento en la producción de bacteriocinas en la cepa mutante SF39a-375 comparado con la cepa salvaje.

III-5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Snyder AB, Worobo RW. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: Antimicrobial peptides for food safety. *J Sci Food Agric* 2014;94:28–44. doi:10.1002/jsfa.6293.
- [2] Ghazaryan L, Tonoyan L, Al Ashhab A, Soares MIM, Gillor O. The role of stress in colicin regulation. *Arch Microbiol* 2014;196:753–64. doi:10.1007/s00203-014-1017-8.
- [3] Spriewald S, Glaser J, Beutler M, Koeppl MB, Stecher B. Reporters for single-cell analysis of colicin Ib expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *PLoS One* 2015;10:e0144647. doi:10.1371/journal.pone.0144647.
- [4] Penterman J, Singh PK, Walker GC. Biological cost of pyocin production during the SOS response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2014;196:3351–9. doi:10.1128/JB.01889-14.
- [5] Williams SR, Gebhart D, Martin DW, Scholl D. Retargeting R-type pyocins to generate novel bactericidal protein complexes. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:3868–76. doi:10.1128/AEM.00141-08.
- [6] Waite RD, Curtis MA. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 pyocin production affects population dynamics within mixed-culture biofilms. *J Bacteriol* 2009;191:1349–54. doi:10.1128/JB.01458-08.
- [7] Alvarez-Ortega C, Harwood CS. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration. *Mol Microbiol* 2007;65:153–65. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05772.x.
- [8] Hakovirta J, Reunanen J, Saris PEJ. Bioassay for nisin in milk, processed cheese, salad dressings, canned tomatoes, and liquid egg products. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:1001–5. doi:10.1128/AEM.72.2.1001-1005.2006.
- [9] Fischer SE, Fischer SI, Magris S, Mori GB. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. *World J Microbiol Biotechnol* 2007;23:895–903. doi:10.1007/s11274-006-9312-4.
- [10] Latour X, Corberand T, Laguerre G, Allard F, Lemanceau P. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:2449–56.
- [11] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*

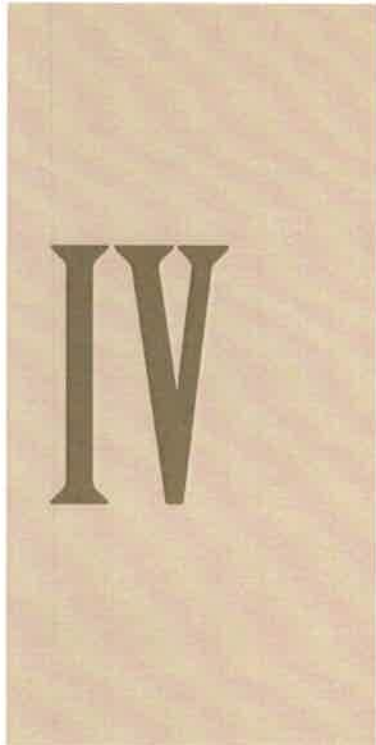
- 1983;166:557–80. doi:10.1016/S0022-2836(83)80284-8.
- [12] Herrero M, De Lorenzo V, Timmis KN. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1990;172:6557–67.
- [13] Ditta G, Schmidhauser T, Yakobson E, Lu P, Liang XW, Finlay DR, et al. Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* 1985;13:149–53. doi:10.1016/0147-619X(85)90068-X.
- [14] De Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U, Timmis KN. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* 1990;172:6568–72. doi:0021-9193/90/116568-05.
- [15] Finan TM, Kunkel B, De Vos GF, Signer ER. Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J Bacteriol* 1986;167:66–72. doi:0021-9193/86/070066-05\$02.00/0.
- [16] Espinosa-urgel M, Salido A, Ramos J. Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds 2000;182:2363–9. doi:10.1128/JB.182.9.2363-2369.2000.Updated.
- [17] De Bruijn FJ. Use of repetitive (REP and ERIC) sequences and the PCR to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:2180–7.
- [18] Cubero J, Graham JH. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:1257–64. doi:10.1128/AEM.68.3.1257-1264.2002.
- [19] Tung WL, Chow KC. A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet* 1995;11:128–9.
- [20] Canals R, Jiménez N, Vilches S, Regué M, Merino S, Tomás JM. The UDP N-acetylgalactosamine 4-epimerase gene is essential for mesophilic *Aeromonas hydrophila* serotype O34 virulence. *Infect Immun* 2006;74:537–48. doi:10.1128/IAI.74.1.537-548.2006.
- [21] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic*

Acids Res 1997;25:3389–402. doi:10.1093/nar/25.17.3389.

- [22] Pflüger-Grau K, Görke B. Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. Trends Microbiol 2010;18:205–14. doi:10.1016/j.tim.2010.02.003.
- [23] Valentini M, García-Mauriño SM, Pérez-Martínez I, Santero E, Canosa I, Lapouge K. Hierarchical management of carbon sources is regulated similarly by the CbrA/B systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. Microbiology 2014;160:2243–52. doi:10.1099/mic.0.078873-0.
- [24] De Los Santos PE, Parret AHA, De Mot R. Stress-related *Pseudomonas* genes involved in production of bacteriocin LlpA. FEMS Microbiol Lett 2005;244:243–50. doi:10.1016/j.femsle.2005.01.049.

CAPITULO IV-

Rol del gen *ptsP* en la producción de bacteriocinas y en la competitividad bacteriana

A large, dark brown Roman numeral 'IV' is centered on a vertical rectangular background with a light beige, textured, paper-like appearance.

IV.1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior se presentaron los resultados de la mutagénesis al azar; mediante la cual, se obtuvo el mutante *ptsP*⁻ (SF39a-451) afectado en la producción de bacteriocinas. En este capítulo, se realizan estudios de complementación para determinar si el fenotipo observado en el mutante SF39a-451 es consecuencia de la inactivación insercional del gen *ptsP* o de un efecto polar del transposón en los genes que se encuentran corriente abajo de *ptsP*. También, se estudia la participación del sistema fosfotransferasa específico para nitrógeno (PTS^{Ntr}) en otros procesos, además de la producción de bacteriocinas, relevantes para una bacteria PGPR.

IV.1.1. Sistemas fosfotransferasas

Un sistema fosfotransferasa (PTS) es una cadena de enzimas que transfieren grupos fosfatos derivados del fosfoenolpiruvato (PEP) desde un miembro del sistema al siguiente en un orden determinado. Se conocen dos tipos generales de PTSs (figura IV-1): Los sistemas fosfotrasferasa de azúcares (PTS^{azúcar}) que son responsables del transporte y fosforilación de un determinado hidrato de carbono dentro de la célula y, los sistemas fosfotrasferasas específicos para nitrógeno (PTS^{Ntr}) que están implicados en funciones regulatorias [1].

Los PTSs^{azúcar} fueron los primeros en descubrirse y por tal motivo, también son llamados PTSs típicos. Estos sistemas consisten en tres proteínas: la enzima I (EI), la proteína HPr y la enzima unida a membrana II (EII). Muchas bacterias poseen diversas EII, cada una específica para un determinado carbohidrato, que contienen al menos tres dominios: EIIA, EIIB y EIIC. La EI cataliza la transferencia del fosfato de alta energía del PEP a la proteína HPr. La HPr fosforilada cede el fosfato a la enzima EIIA específica para el azúcar a transportar, la cual, rápidamente transfiere el fosfato a la EIIB que a su vez fosforila el azúcar. En ese momento, la EIIC pierde su afinidad por el azúcar modificado y este último entra en el citoplasma (figura IV-1) [2,3].

Los PTSs^{Ntr}, en analogía a los PTSs típicos, se componen de la enzima EI^{Ntr} (homóloga a EI) codificada por el gen *ptsP*, la proteína NPr (homóloga a HPr) codificada por el gen *ptsO* y la enzima EII^{Ntr} (homóloga a EII) codificada por el gen *ptsN*. El PTS^{Ntr} carece de los dominios EIIBC que participan en la conexión con el azúcar y, por lo tanto, no participa directamente en la fosforilación y utilización de hidratos de carbono. El PTS^{Ntr} desempeña un papel regulatorio

y utilizaría a EII^{Ntr} como dominio de salida; mientras que, EI^{Ntr} estaría involucrada en la recepción de la señal a través de su dominio GAF. Los $PTS^{azúcar}$ y PTS^{Ntr} son activos independientemente; pero, pueden intercambiar información en determinadas circunstancias a través de la transferencia de grupos fosfatos (figura IV-1) [1,4].

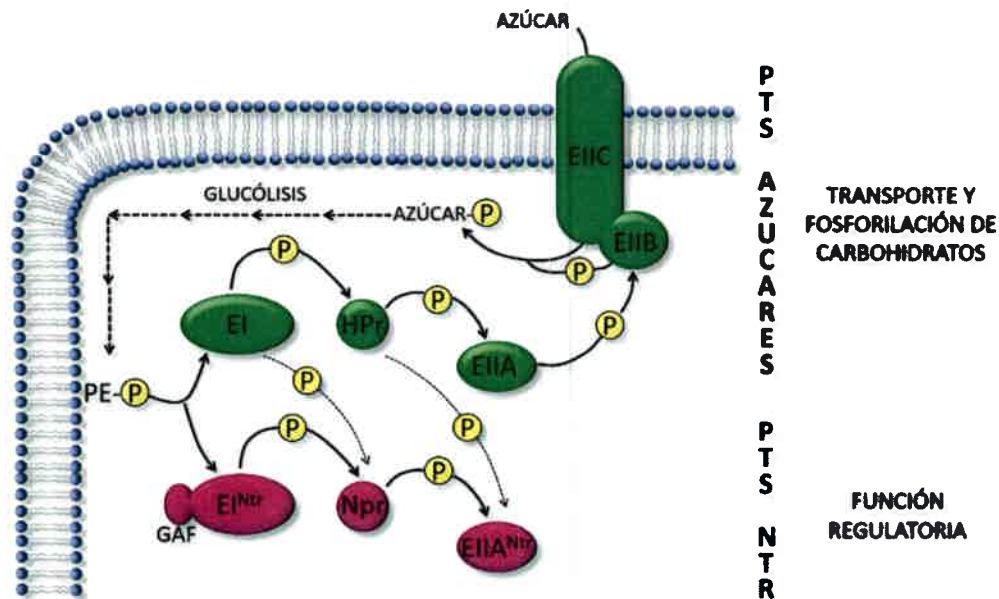


Figura IV-1 | **Sistemas fosfotransferasas en bacterias.** Los PTSs de azúcares (arriba y en color verde) llevan a cabo el transporte de carbohidratos a través de la membrana citoplasmática produciendo simultáneamente la fosforilación de los mismos. Un grupo fosfato derivado de fosfoenolpiruvato se transfiere de un miembro del sistema al siguiente, y finalmente, al azúcar transportado. Los PTS^{Ntr} (abajo y en color violeta) carecen de los módulos EIIB que participan en la conexión con el azúcar y, por lo tanto, desempeñan principalmente un papel regulatorio y no participan directamente en la fosforilación y utilización de hidratos de carbono. Ambos sistemas pueden comunicarse entre sí por intercambio de fosfato (figura adaptada de Chavarría et al. [2])

IV.1.2. Rol del PTS^{Ntr}

El PTS^{Ntr} participa en la regulación de varios procesos, tan diversos como, metabolismo del nitrógeno y carbono, producción de metabolitos secundarios, homeostasis de potasio, selectividad de factores sigma, interacción con las células huésped, virulencia, entre otros. Este sistema, se ha descrito en numerosas especies bacterianas, desde bacterias patógenas como

Salmonella enterica y *Legionella pneumophila* hasta PGPRs como *Rhizobium leguminosarum* y *Bradyrhizobium japonicum* [1,5].

En particular, en el género *Pseudomonas* varios procesos regulados por PTS^{Ntr} pueden ser numerados: el catabolismo del tolueno/xileno y la absorción de potasio en *P. putida* [6,7]; la producción del pigmento piocianina y la formación de biofilm en *P. aeruginosa* [8,9]; la movilidad y la producción de proteasas extracelulares, sideróforos y 2,4-diacetylfloroglucinol (antifúngico) en *P. fluorescens* [10].

La importancia fisiológica del PTS^{Ntr} se ve reflejada por los efectos pleiotrópicos producidos por dicho sistema en las diferentes especies bacterianas [5].

IV.2. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.2.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en esta sección del trabajo son descriptos en la tabla IV-1.

Tabla IV-1: cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Cepa o plásmido	Origen y característica relevante	Referencia u origen
Cepa		
<i>P. fluorescens</i> SF39a	PGPR, aislada de rizósfera de trigo (Argentina)	[11]
<i>P. fluorescens</i> CTR212	Aislado de suelo (Francia)	[12]
<i>P. fluorescens</i> Pf0-1	Aislado de suelo (Estados Unidos)	[13]
<i>P. fluorescens</i> SF39a-451	Mutante <i>ptsP</i> ::mini-Tn5 Km1 de <i>P. fluorescens</i> SF39a, Km ^r	Este trabajo
<i>P. fluorescens</i> SF39a-451pPtsP	<i>P. fluorescens</i> SF39a-451 complementado con el plásmido pPtsP, Km ^r , Gm ^r	Este trabajo
<i>P. fluorescens</i> SF39a-451p	<i>P. fluorescens</i> SF39a-451 (pBBR1MCS-5), Km ^r , Gm ^r	Este trabajo
<i>P. fluorescens</i> SF39aR	Mutante espontáneo resistente a rifampicina de <i>P. fluorescens</i> SF39a, Rif ^r	Este trabajo
<i>P. fluorescens</i> SF39a-451R	Mutante espontáneo resistente a rifampicina de <i>P. fluorescens</i> SF39a-451, Km ^r , Rif ^r	Este trabajo
<i>E. coli</i> DH5α	<i>endA1 recA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 φ80d lacZ ΔM15.</i>	[14]
Plásmido		
pBBR1MCS-5	Vector de amplio rango de huésped. Gm ^r . P _(lac)	[15]
pPtsP	pBBR1MCS-5 conteniendo el gen <i>ptsP</i> de <i>P. fluorescens</i> Pf0-1, Gm ^r	Este trabajo

Km^r, resistencia a kanamicina; Gm^r resistencia a gentamicina; Rif^r resistencia a rifampicina.

IV.2.2. Condiciones de cultivo y técnicas generales de biología molecular

Las condiciones de cultivo y las técnicas generales de biología molecular son especificadas en la sección II.2.2 y II.2.3, respectivamente.

IV.2.3. Complementación del mutantes SF39a-451

IV.2.3.1. Clonado del gen *ptsP* en el plásmido pBBR1MCS-5

El gen *ptsP* fue amplificado por PCR a partir del ADN genómico de *P. fluorescens* Pf0-1, utilizando los cebadores específicos ptsPFw (5'-CggAATTCTCgAgTgTgTTYATYgCCA $\overline{\text{gC}}$ -3') y ptsPRv (5'-CCCAAgCTTggTAAACCggAgTTCgATgg-3'), con sitios de cortes para las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* (subrayados), respectivamente.

La mezcla de reacción y las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes:

MEZCLA DE REACCIÓN		CICLO DE TEMPERATURAS	
Agua	16,5 μl	Desnaturalización inicial	94°C 2 min
Buffer 10X	2,5 μl	35 ciclos de:	
PCR enhancer	2,5 μl	Desnaturalización	94°C 30 seg
dNTP (10 mM)	0,75 μl	Hibridación	54°C 30 seg
Cebador ptsPFw (20 μM)	0,5 μl	Elongación	68°C 3 min
Cebador ptsPRv (20 μM)	0,5 μl	Elongación final	68°C 10 min
SO ₄ Mg (50 mM)	0,75 μl		
ADN molde	1 μl		
Pfx ADN polimerasa	0,25 μl		

El producto de PCR fue purificado usando el Kit QIAquick PCR (QIAGEN) y digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. Por otro lado, el plásmido pBBR1MCS-5 fue extraído y digerido con las mismas enzimas de restricción. Las digestiones fueron sembradas en un gel de agarosa y las bandas correspondientes al plásmido lineal y al producto de PCR fueron purificadas empleando el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

El producto de PCR fue ligado al plásmido pBBR1MCS-5 utilizando la ligasa del fago T4 y, posteriormente, la mezcla de ligación fue utilizada para transformar células de *E. coli* DH5 α competentes químicas. Luego de la transformación, 100 μl de las células transformadas se sembraron en una placa con medio LB sólido suplementado con gentamicina (20 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), resistencia propia del vector pBBR1MCS-5, y X-gal (20 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Las colonias resistentes al

antibiótico y de color blanco fueron seleccionadas. La presencia del inserto en dichos clones fue confirmada mediante digestión del plásmido recombinante y PCR. El plásmido recombinante obtenido fue denominado pPtsP.

IV.2.3.2. Incorporación del plásmido pPtsP en el mutante SF39a-451 y análisis de la producción de bacteriocina

El plásmido recombinante pPtsP fue incorporado mediante electroporación a *P. fluorescens* SF39a-451 (para detalles de la técnica de electroporación y producción de células electrocompetentes ver sección II.2.3.6.). Cien μl de la mezcla de electroporación fueron sembrados en placas con medio LB sólido suplementado con gentamicina ($60 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Las colonias resistentes a gentamicina fueron seleccionadas y, la presencia del plásmido recombinante en estas colonias fue confirmada mediante extracción de plásmidos y amplificación por PCR del gen *ptsP* a partir del plásmido recombinantes extraído. Como control, el plásmido pBBR1MCS-5 vacío fue incorporado al mutante.

La producción de bacteriocina fue utilizada como prueba de complementación. Para ello, las cepas SF39a, SF39a-451, SF39a-451pPtsP (mutante complementado con pPtsP) y SF39a-451p (mutante con el plásmido vacío) fueron cultivadas toda la noche en medio LB líquido y la producción de bacteriocina fue analizada mediante el método de la gota (inciso II.2.4). Como cepa sensible se utilizó *P. fluorescens* CTR212.

IV.2.4. Secuenciación del gen *ptsP* de *P. fluorescens* SF39a

El gen *ptsP* fue amplificado a partir del ADN genómico de la cepa *P. fluorescens* SF39a utilizando los cebadores ptsPFw y ptsPRv (diseñados en base al genoma de *P. fluorescens* Pf0-1). La mezcla de reacción, el ciclo de temperaturas y los cebadores utilizados son los descritos en la sección IV.2.3.1. El producto de PCR del gen *ptsP* fue purificado utilizando el kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) y posteriormente, enviado a secuenciar a MacroGen Inc. (Korea). Mediante la estrategia caminata genómica (Primer Walking) se logró obtener la secuencia completa de este gen.

IV.2.5. Caracterización fenotípica del mutante SF39a-451

La producción de proteasas, la formación de biofilm, la producción de pioverdina y la movilidad fue analizada en las cepas *P. fluorescens* SF39a, *P. fluorescens* SF39a-451 y *P. fluorescens* SF39a-451pPtsP.

IV.2.5.1. Producción de proteasas

Alicuotas de cultivos de toda la noche fueron sembradas sobre una placa de agar leche al 3% e incubadas durante 48 h a 30°C. La producción de proteasas se detectó mediante la aparición de halos transparentes alrededor de las colonias producidos por la hidrólisis de la caseína. El diámetro de las zonas de hidrólisis fue medido y los datos fueron analizados estadísticamente [16].

IV.2.5.2. Producción de pioverdina

- Ensayo cualitativo: Las cepas fueron cultivadas en placas con medio King's B [tripteína 1% (p/v), Peptona de carne 1% (p/v), K₂HPO₄ 8,6 mM, MgSO₄ 12,5 mM, glicerol 1% (v/v)] durante 24, 48 y 72 horas a 30°C. Luego las placas fueron observadas bajo luz ultravioleta para detectar fluorescencia, lo que indica producción de pioverdina.

- Ensayo cuantitativo: Las bacterias fueron cultivadas en medio King's B líquido en agitación a 30°C. Cada 24 horas las células fueron cosechadas por centrifugación (10.000 rpm por 5 min) y los niveles de pioverdina se midieron espectrofotométricamente a DO_{405nm} en el sobrenadante [17,18]. El experimento fue repetido 3 veces con 3 réplicas por cepa y los datos fueron analizados estadísticamente.

IV.2.5.3. Formación de biofilm

Las cepas fueron cultivadas toda la noche en medio LB. Luego, 1,5 µl de cultivo fue transferido a placas de poliestireno de 96 pocillos conteniendo 100 µl de medio K10T-1 [tripteína 1% (p/v), Tris-HCl 50 mM pH:7,4, Glicerol 0,15% (v/v), K₂HPO₄ 1 mM, MgSO₄ 0,61 mM]. Las placas se incubaron estáticamente durante 12 horas a 30°C. Luego de la incubación se agregó a cada pocillo 25 µl de cristal violeta 1% y las placas fueron incubadas durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas fueron lavadas con abundante agua y el cristal violeta se

solubilizó con 200 µl de etanol 95% en cada pocillo. Las placas fueron leídas en un lector de ELISA (Multiskan™ FC-Thermo Scientific) a 570 nm [19,20]. Los datos de absorbancia obtenidos a 570 nm fueron normalizados a la densidad celular (medida a DO_{600nm}). El experimento fue repetido 10 veces con 10 réplicas por cepa y los datos fueron analizados estadísticamente.

IV.2.5.4. Movilidad

La movilidad por swimming y sobre superficie fue evaluada en medio LB suplementado con 0,3% o 0,4% de agar, respectivamente [21,22]. Las placas fueron incubadas a 30°C hasta detectar movilidad bacteriana.

IV.2.5.5. Microscopía electrónica de transmisión

Una gota de suspensión bacteriana se colocó en una grilla de cobre (400 mesh) cubierta por colodion durante 5 minutos. Posteriormente, se quitó el excedente apoyando la grilla sobre un papel de filtro. Las bacterias adheridas a la grilla fueron contrastadas con ácido fosfotúngstico al 2% durante 10 segundos. Luego, las muestras se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL Ltd., Tokio, Japón) y se fotografiaron con una cámara Erlangshen ES1000W, Modelo 785 (Gatan Inc., Pleasanton, California, USA) del Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Las muestras fueron preparadas tanto de cultivos líquidos, como de placas de movilidad sobre superficie. En el primer caso, una gota de un cultivo de toda la noche en medio LB fue colocado directamente sobre la grilla. En el segundo caso, las bacterias fueron tomadas de tres puntos de la colonia en movimiento: 1) punto de inoculación, 2) medio de la colonia en movimiento y 3) borde de la colonia en movimiento. Las bacterias fueron tomadas cuidadosamente con ansa y resuspendidas en una gota de solución fisiológica estéril [23].

IV.2.6. Colonización de la cepa SF39a y el mutante SF39a-451 en la rizósfera de trigo

IV.2.6.1. Recolección y análisis del suelo

Las muestras de suelos utilizadas en el ensayo de competencia fueron obtenidas de un campo de la provincia de Córdoba. Se recolectó el suelo superficial (< 30 cm) y se tamizó a

través de una malla de 2 mm. El suelo fue analizado por el Laboratorio Inducal de la ciudad de Río Cuarto.

IV.2.6.2. Obtención de cepas resistentes a rifampicina

Las cepas fueron cultivadas durante toda la noche en medio LB líquido. Luego, 2 ml de los cultivos fueron centrifugados a 6.000 rpm durante 5 minutos. El pellet celular fue resuspendido en 100 μ l de solución fisiológica y, posteriormente, sembrado en placas de LB suplementado con rifampicina 50 μ g \cdot ml⁻¹. Las colonias resistentes al antibiótico fueron repicadas sucesivamente en placas de LB suplementado con rifampicina. Además, se realizó un repique en LB sin rifampicina para eliminar clones que llevan una resistencia plasmídica. La viabilidad de los mutantes espontáneos resistentes a rifampicina fue determinada en medio mínimo durante la fase exponencial ($DO_{600nm}=0,65$) y comparada con sus cepas parentales para confirmar que su crecimiento no se encuentra afectado [24].

IV.2.6.3. Preparación del inóculo

Las cepas fueron cultivadas en medio LB a 30°C y en agitación hasta $DO_{600nm}=1$. Luego, las células fueron cosechadas por centrifugación (9000 rpm durante 15 min), lavadas y resuspendidas en solución fisiológica a una densidad de $2 \cdot 10^8$ UFC \cdot ml⁻¹ (adaptado de Fischer et al. [24]).

IV.2.6.4. Esterilización y germinación de semillas de trigo

Las semillas de trigo fueron esterilizadas superficialmente. Para ello, las mismas fueron inmersas en etanol 95% durante 5 min, luego fueron enjuagadas (tres veces) con agua destilada estéril y colocadas en hipoclorito 1% durante 20 minutos. Posteriormente, las semillas fueron lavadas seis veces con agua destilada estéril y se mantuvieron en agua durante 1 hora. Por último, se sumergieron nuevamente en hipoclorito 1% durante 5 min y se lavaron con agua destilada estéril hasta remover los restos de hipoclorito. Luego de la desinfección, las semillas fueron pre-germinadas en placas de Petri, conteniendo algodón y papel de filtro empapado con agua destilada, en oscuridad durante 72 horas a 25°C [11].

IV.2.6.5. Ensayo de competencia

Las semillas trigo pre-germinadas fueron transferidas a macetas conteniendo 180 gr de suelo no estéril y colocadas en cámara de cultivo (12 h luz, 12 h oscuridad). A los 7 días, las plantas fueron inoculadas con la cepa salvaje SF39aR o con el mutante SF39-451R a una concentración de $2 \cdot 10^6$ UFC \cdot gr⁻¹ de suelo. Por otro lado, se realizó una co-inoculación colocando $1 \cdot 10^6$ UFC \cdot gr⁻¹ de suelo de cada cepa. Luego de tres semanas post-inoculación, las plantas fueron cosechadas y el número de células viables en el suelo rizosférico fue determinado mediante recuento en placa. Para ello, se realizaron diluciones seriadas del suelo rizosférico, las cuales, fueron sembradas en medio LB suplementados con rifampicina o rifamicina y kanamicina (según corresponda) para distinguir cada cepa. Plantas no inoculadas fueron utilizadas como control [25]. El experimento se repitió 3 veces con un n=5 para cada tratamiento. Los datos se analizaron estadísticamente.

IV.2.7. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente mediante análisis de la varianza (ANOVA) con test a posteriori de Tukey o mediante T-test según corresponda. Las diferencias se consideraron significativas a nivel $p \leq 0.05$.

IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.3.1. Complementación del mutante SF39a-451

En esta sección de la tesis se llevaron a cabo estudios de complementación en el mutante SF39a-451 con el fin de determinar si el fenotipo observado en dicho mutante se debe al gen interrumpido por el transposón o a efectos polares del mini-Tn5 km1 en los genes localizados corriente abajo de *ptsP*.

En el momento de llevar a cabo los estudios de complementación del mutante, el genoma de la cepa SF39a no había sido aún secuenciado. Por lo tanto, se diseñaron cebadores (con sitios de cortes para las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*) en base a la secuencia del gen *ptsP* de la cepa *P. fluorescens* Pf0-1, para posteriormente amplificar el gen completo de la cepa SF39a y clonarlo en el vector pBBR1MCS-5. El producto de PCR obtenido a partir de la cepa *P. fluorescens* SF39a presentó un sitio de restricción interno para *EcoRI* (que no se encuentra en la cepa Pf0-1). Por este motivo, se realizó una complementación heteróloga utilizando el gen de *P. fluorescens* Pf0-1.

La producción de bacteriocinas fue analizada mediante el método de la gota en la cepa salvaje, el mutante, el mutante conteniendo el plásmido recombinante pPtsP o el plásmido pBBR1MCS-5 vacío. Como se puede observar en la figura IV-2, el plásmido pPtsP restauró el fenotipo en la cepa mutante SF39a-451, confirmando que la deficiencia en la producción de bacteriocinas se debe a la inactivación del gen *ptsP* y, por consiguiente, indicando la participación de dicho gen en la expresión de estos compuestos antimicrobianos. Como era de esperar, el mutante con el plásmido pBBR1MCS-5 vacío produce un halo de inhibición pequeño alrededor de la colonia, igual al producido por el mutante SF39a-451, comprobando que la presencia del plásmido vacío no afecta el fenotipo (figura IV-2).

Varios investigadores demostraron la participación del sistema PTS^{Ntr} en la regulación de diversos metabolitos; por ejemplo, pigmentos, sideróforos y antifúngicos [8,10,26]. Sin embargo, no existe en la bibliografía documentación que demuestre que el PTS^{Ntr} regula la producción de bacteriocinas en algún género bacteriano.

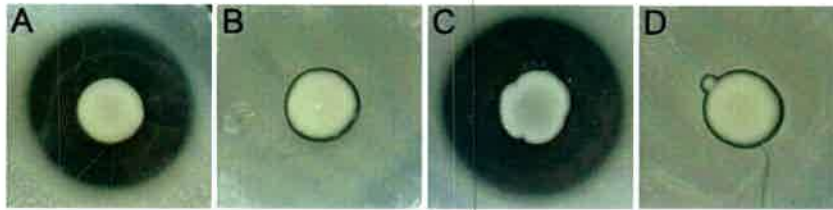


Figura IV-2 | Producción de bacteriocinas analizada mediante el método de la gota. (A) *P. fluorescens* SF39a, (B) *P. fluorescens* SF39a-451, (C) *P. fluorescens* SF39a-451pPtsP, (D) *P. fluorescens* SF39a-451p.

IV.3.2. Obtención de la secuencia completa del gen *ptsP* de *P. fluorescens* SF39a

Como se mencionó anteriormente, en el momento que se realizaron estos estudios no se contaba con la secuencia completa del gen *ptsP* de *P. fluorescens* SF39a; por lo tanto, el producto de amplificación de dicho gen fue enviado a secuenciar y, mediante la estrategia de Primer Walking se logró obtener la secuencia completa. La secuencia del gen *ptsP* de la cepa SF39a tiene un tamaño de 2280 pb y fue depositada en la base de datos GenBank bajo el número de acceso KM948592.

Mediante análisis bioinformático se pudo predecir que el gen *ptsP* codifica una proteína de 759 aminoácidos que tiene un peso molecular de 83387,4 Da y presenta una elevada identidad con sus ortólogos en varias cepas de *Pseudomonas* (*Pseudomonas moraviensis* R28-S, 99% de identidad; *P. fluorescens* Pf0-1, 97% identidad; *P. fluorescens* Q8r1-96, 95% identidad, *P. fluorescens* F113, 95% identidad; *P. protegens* CHA0, 93% identidad y *P. syringae* pv. *glycinea* B076, 91% identidad).

La búsqueda de dominios en Pfam reveló la presencia de cuatro dominios conservados en la proteína EI^{Ntr} codificada por el gen *ptsP* de la cepa SF39a: los dominios N-terminal (residuos 178 a 302), móvil (residuos 318 a 399), y barril TIM (residuos 425 a 715) propios de enzimas de utilización del PEP, y un dominio GAF (residuos 17 a 154) característico de las enzimas EIS^{Ntr} y posiblemente utilizado para la recepción de la señal por PTS^{Ntr}. Mavrodi et al. [10] identificaron estos mismos dominios en la proteína codificada por el gen *ptsP* de *P. fluorescens* Q8r1-96.

IV.3.3. Caracterización fenotípica del mutante SF39a-451

Debido que el PTS^{Ntr} es un sistema regulatorio global, resultó interesante estudiar si otras características relevantes para una PGPR, además de la producción de bacteriocinas, se ven afectadas en el mutante SF39a-451.

IV.3.3.1. Producción de pioverdina

La pioverdina es un pigmento sideróforo producido por *Pseudomonas* spp. fluorescentes, especialmente *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* [27]. Los sideróforos son moléculas que presentan alta afinidad por Fe⁺³ y quelan el hierro presente en el medio. El complejo sideróforo-hierro es reconocido por receptores específicos en la membrana bacteriana permitiendo la absorción de hierro por la célula [28]. La producción de sideróforos es uno de los mecanismos utilizados por las PGPRs para promover el crecimiento vegetal. Por un lado, le permiten a la bacteria productora competir eficientemente por el hierro presente en condiciones limitantes en el suelo y por otro lado, las plantas son capaces de unir el complejo hierro-sideróforo bacteriano y transportarlo a través de la misma quedando de esta forma, disponible para la nutrición de la planta [29,30]. Además, la competencia por el Fe⁺³ entre *Pseudomonas* spp. y fitopatógenos es un mecanismo utilizado por las bacterias para el biocontrol de patógenos de plantas [28].

Los niveles de pioverdina producidos por la cepa salvaje, el mutante y el mutante complementado fueron cuantificados en medio King's B; este medio, estimula la producción de pioverdina e inhibe la producción de otros pigmentos. El nivel de pioverdina en el mutante SF39a-451 fue similar al de la cepa salvaje a las 24 horas de crecimiento. Sin embargo, la inactivación del gen *ptsP* resultó en una sobreproducción de pioverdina a las 48 y 72 horas (figura IV-3A). Por otro lado, las cepas se cultivaron en medio King's B sólido y las placas fueron expuestas a luz UV. La pioverdina es un pigmento que tiene la capacidad de fluorescer bajo luz UV. Como se puede observar en la figura IV-3B la cepa mutante SF39a-451 presentó un aumento en la fluorescencia a las 48 y 72 horas con respecto a la cepa salvaje, lo que se corresponde con los resultados obtenidos en los ensayos de cuantificación de pioverdina en medio líquido. La cepa SF39a-451pPtsP complementó parcialmente el fenotipo de la cepa salvaje.

Ha sido demostrado que el sistema PTS^{Ntr} está implicado en la producción de otros pigmentos. Por ejemplo, un mutante mini-Mu en el gen *ptsP* de *P. aeruginosa* PA68 presentó

una sobreproducción del pigmento pioverdina (sideróforo) [8]. Por otro lado, Huang *et al.* [26] demostraron que la cepa *Pseudomonas* sp. M18, un agente de control biológico aislado de la rizosfera melón y genéticamente similar al patógeno oportunista humano *P. aeruginosa* PAO1, produce preferencialmente el pigmento fenazina-1-carboxílico (PCA) (antibiótico eficaz contra algunos hongos fitopatógenos) a diferencia de *P. aeruginosa* PAO1 cuyo pigmento principal es la pioverdina (PYO). Esta diferencia en la producción de pigmentos está relacionada al gen *phzM* (que codifica para una proteína involucrada en la conversión de PCA a PYO) que a su vez está regulado negativamente por el gen *ptsP*.

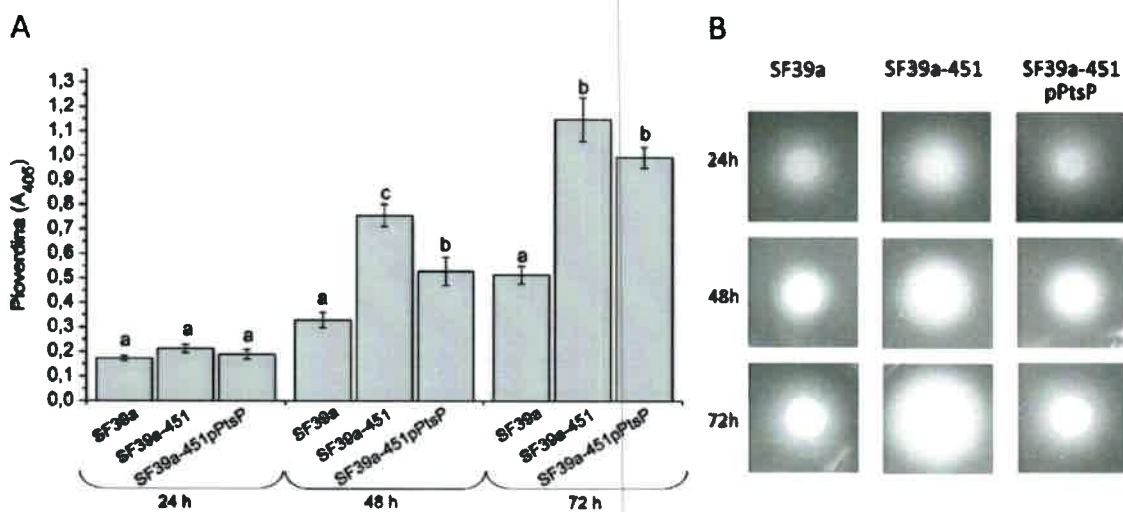


Figura IV-3 | Efecto de la inactivación del gen *ptsP* sobre la producción de pioverdina. (A) cuantificación de los niveles de pioverdina en los sobrenadantes de los cultivos de las cepas SF39a, SF39a-451 y SF39a-451pPtsP a las 24, 48 y 72 h. Las barras representan la media \pm SE de 3 experimentos con un $n=3$. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$) comparando las cepas SF39a, SF39a-451 y SF39a-451pPtsP en cada tiempo. (B) Detección de la producción de pioverdina en placas con medio King's B.

IV.3.3.2. Formación de biofilm

La formación biofilms (comunidades multicelulares asociadas con superficies sólidas y embebidas en una matriz) es una característica intrínseca del ciclo de vida bacteriano y una estrategia para la persistencia de las bacterias en una gran variedad de ambientes [21]. Por lo tanto, la habilidad de formar biofilm fue analizada en el mutante SF39a-451 y comparada con la cepa salvaje. Como se observa en la figura IV-4, el mutante SF39a-451 mostró una marcada

disminución en la formación de biofilm. El mutante complementado con el plásmido pPtsP restauró completamente el fenotipo de la cepa salvaje.

La participación de PTSs en la regulación de la formación de biofilm ha sido descrita en el género *Vibrio*. En la especie *Vibrio cholerae* la formación de biopelículas es regulada por sistemas fosfotrasferasas, tanto típicos (PTS^{azucares}) como específicos para nitrógeno (PTS^{Ntr}). Dichos sistemas modulan la expresión del operón *vps*, el cual, codifica para los exopolisacáridos de *V. cholerae* (conocidos como VPS) que son críticos para la formación de biofilms en esta bacteria [31,32]. Además, recientemente Cabeen et al. [9] demostraron que la ausencia de transferencia de fosfato a través del PTS^{Ntr} afecta la formación de biopelículas en *P. aeruginosa*.

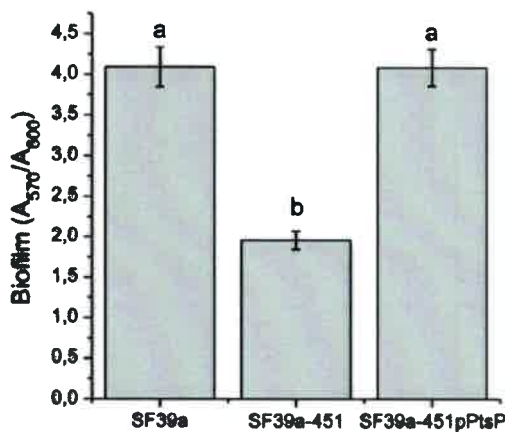


Figura IV-4 | Efecto de la inactivación del gen *ptsP* sobre la formación de biofilm. El biofilm fue cuantificado a 570 nm luego de la tinción con cristal violeta y normalizado a 600 nm. Las barras representan la media \pm SE de 10 experimentos con un $n=10$. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

IV.3.3.3. Producción de Proteasas

La cepa salvaje SF39a fue capaz de producir proteasas extracelulares, lo que se detectó por la formación de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia cuando se cultivó en agar leche 3%. En contraste, la cepa mutante SF39a-451 fue incapaz de producir dicha enzima hidrolítica. El mutante que lleva el plásmido pPtsP restauró parcialmente el fenotipo (figura IV-5).

Resultados similares fueron descritos por Mavrodi et al. [10], quienes demostraron que un mutante *ptsP* de la cepa PGPR *P. fluorescens* Q8r1-96 presentaba una producción de proteasas significativamente disminuida comparado con la cepa salvaje.

La producción de enzimas extracelulares, tales como las proteasas, es una característica importante para una bacteria promotora del crecimiento vegetal y biocontroladora. Estas enzimas hidrolíticas permiten la degradación de componentes de las paredes celulares de

diversas especies fúngicas, inhibiendo de este modo el desarrollo de agentes patógenos. Además, los productos de degradación de las paredes celulares pueden ser utilizados como fuente de nutrientes para la bacteria productora [33,34].

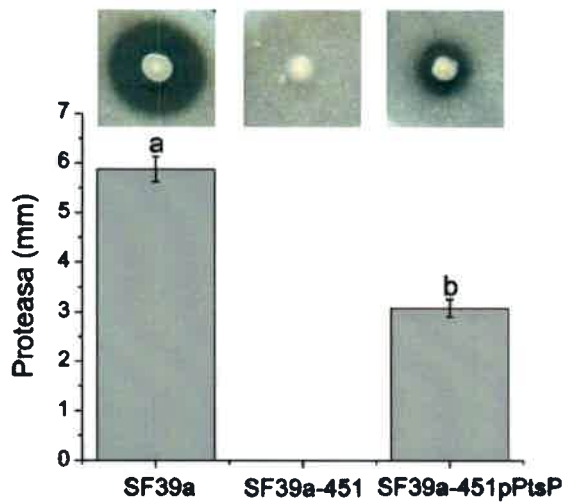


Figura IV-5 | Efecto de la inactivación del gen *ptsP* sobre la producción de proteasas. La producción de proteasas fue analizada en agar leche 3%. La zona de degradación de la caseína de la leche fue medida luego de 48 h de crecimiento bacteriano. Las barras representan la media \pm SE de cinco placas de agar leche independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los halos de hidrólisis de la caseína se muestran arriba del gráfico.

IV.3.3.4. Movilidad

La movilidad bacteriana es uno de los rasgos más importantes para la colonización de la rizósfera. Los mutantes no móviles o no quimiotácticos son las cepas más perjudicadas en ensayos de competencia en la rizósfera. Además, las variantes fenotípicas hipermóviles son seleccionadas por el entorno de la rizósfera, mientras que aquellos que muestran niveles de movilidad menores son desplazados [35].

La movilidad por swimming, movimiento al azar dentro del medio causado por la rotación de los flagelos bacterianos, fue analizada en el mutante SF39a-451 y en la cepa salvaje. Como se observa en la figura IV-6A y 6D la cepa salvaje y el mutante no mostraron diferencia en este tipo de movilidad. Como era de esperar, la microscopía electrónica a partir de medio líquido reveló que no hay diferencias en la flagelación; tanto en la cepa salvaje como en el mutante se observaron penachos de flagelos polares, flagelación característica de la especie *P. fluorescens* (Figura IV-6B, 6C, 6E y 6F). Estos resultados indican la presencia de flagelos funcionales en el mutante SF39a-451.

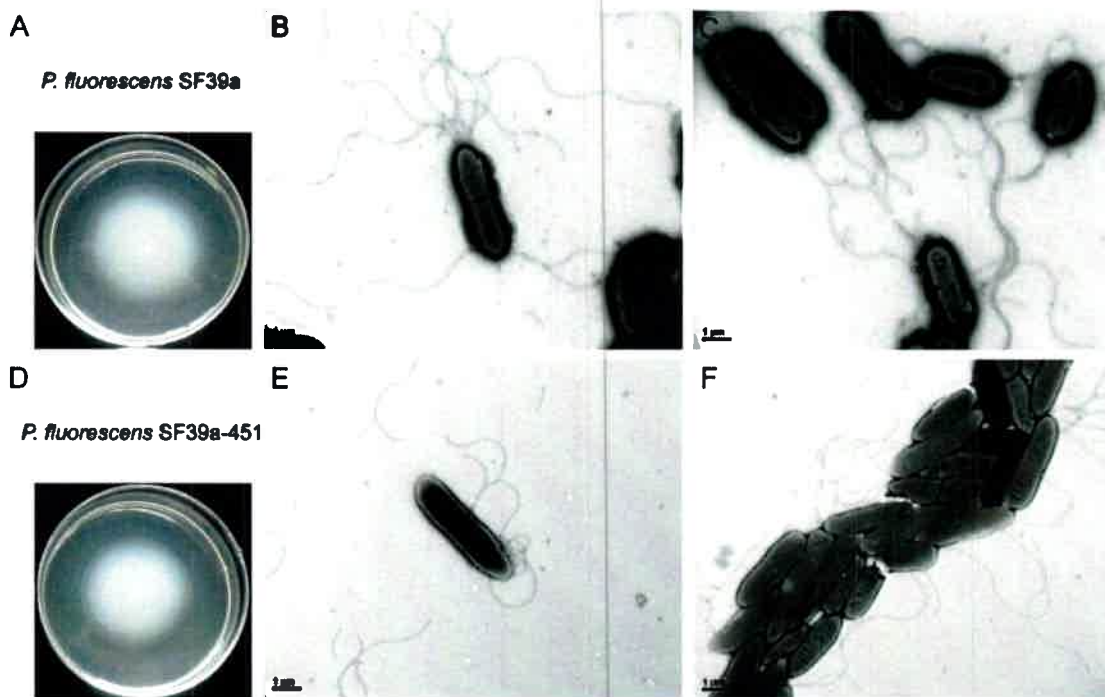


Figura IV-6 | **Movilidad por swimming y observación de las células mediante microscopía electrónica de transmisión.** Movilidad de *P. fluorescens* SF39a (A) y *P. fluorescens* SF39a-451 (D) en placas de LB con 0,3% de agar. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de células de la cepa *P. fluorescens* SF39a (B y C) y *P. fluorescens* SF39a-451 (E y F) tomadas a partir de medio líquido. La barra indica 1 μm .

En contraste con lo observado en la movilidad por swimming, el mutante SF39a-451 mostró un fenotipo hipermóvil en placas solidificadas con 0,4% de agar comparado con la cepa salvaje. La cepa SF39a-451ptsP mostró un fenotipo igual a la cepa salvaje indicando la complementación de dicha característica (Fig. IV-7A).

Los medios que son solidificados con una concentración de agar mayor a 0.3% excluyen la movilidad por swimming y fuerzan a la bacteria a moverse sobre la superficie, por ejemplo, mediante swarming [36]. El swarming es un rápido movimiento multicelular sobre una superficie impulsado por la rotación de los flagelos. En la mayoría de los casos, cuando una bacteria realiza swarming las células se diferencian produciéndose un alargamiento celular y una hiperflagelación [36,37].

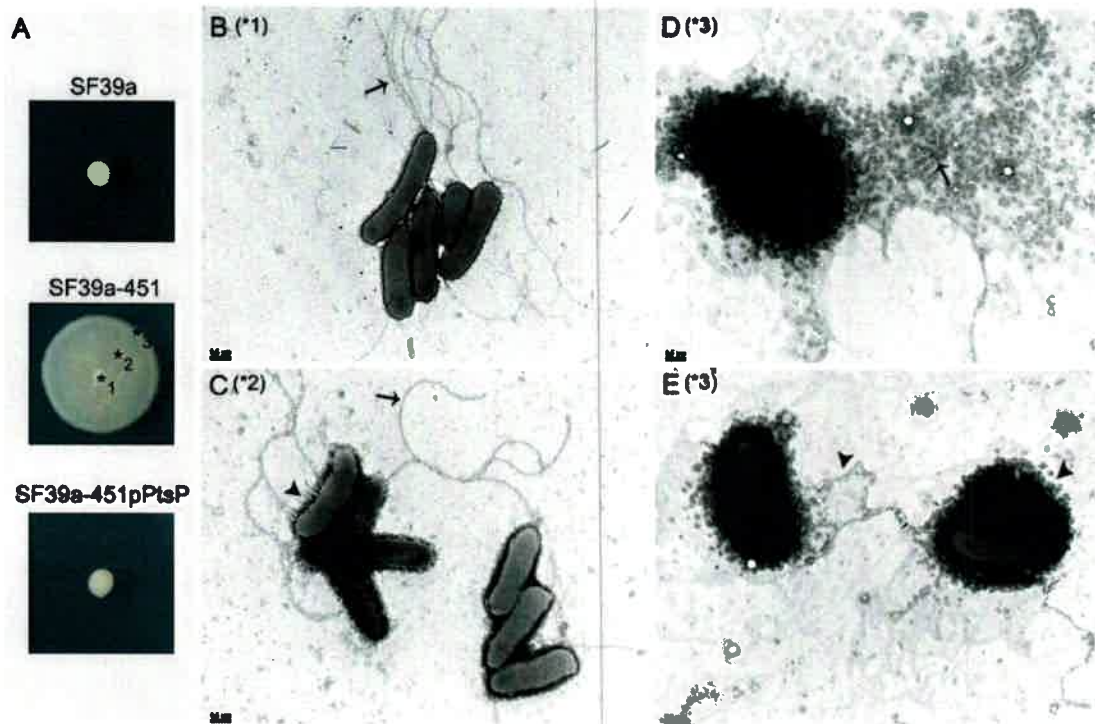


Figura IV-7 | Movilidad sobre superficie y observación de las células mediante microscopía electrónica de transmisión. (A) Movilidad de *P. fluorescens* SF39a, *P. fluorescens* SF39a-451 y *P. fluorescens* SF39a-451pPtsP sobre LB 0,4% de agar. Los asteriscos (*) indican los sitios a partir de los cuales fueron tomadas las bacterias para realizar la microscopía electrónica. *1: punto de inoculación, *2: medio de la colonia en movimiento, *3: borde de la colonia en movimiento. (B-E) Imágenes de microscopía electrónica de células de *P. fluorescens* SF39a-451 tomadas a partir del punto de inoculación (B), medio de la colonia en movimiento (C) y borde de la colonia en movimiento (D y E). Las flechas señalan los flagelos y las cabezas de flechas el material extracelular. La barra indica 0,5 μm .

Con el fin de determinar si el contacto con la superficie induce una diferenciación celular, muestras de células del mutante SF39a-451 tomadas de tres sitios diferentes de la colonia en movimiento (punto de inoculación, medio de la colonia en movimiento y borde de la colonia en movimiento) fueron analizadas mediante microscopía electrónica. No se observaron diferencias en el número de flagelos y en el alargamiento celular entre las células aisladas de estos tres sitios de la colonia (Figura IV-7B, C y D). Por lo tanto, no se pudo confirmar que el movimiento producido por la cepa sobre la superficie del medio se trate de movilidad por swarming. Sin embargo, este movimiento podría ser compatible con movilidad por sliding "una forma pasiva de difusión que implican la producción de tensioactivos para reducir la tensión superficial de la

superficie, permitiendo de esta manera, que la colonia difunda lejos del origen impulsada hacia el exterior por la presión del crecimiento celular". El sliding se confunde fácilmente con el swarming; pero, a diferencia de este, la movilidad por sliding no requiere flagelos [36,38]. En la Figura IV-7 se puede observar material extracelular alrededor de las bacterias aisladas de placas de 0,4% de agar (Figura IV-7C, D y E), tal material, estaba ausente en las bacterias cultivadas en medio líquido (Figura IV-6E y F). Además, se puede observar que el material extracelular aumenta en las células aisladas a partir del borde de la colonia (Figura IV-7D y E) con respecto a las células tomadas de la mitad de colonia (Figura IV-7C) y del punto de inoculación (Figura IV-7B). Este material podría actuar como tensioactivo y, al hacerlo, facilitar la difusión sobre la superficie.

IV.3.4. Competitividad de la cepa SF39a y el mutante SF39a-451 en la rizósfera de trigo

La producción de bacteriocinas, proteasas y sideróforos, la formación de biofilm y la movilidad son características relevantes para el establecimiento de una bacteria en la rizósfera; por lo tanto, resultó interesante evaluar la habilidad del mutante SF39a-451 para colonizar la rizósfera de trigo.

El cultivo de trigo fue elegido para realizar este ensayo debido a que la cepa SF39a ha sido aislada de la rizósfera de este cultivo y es capaz de promover el crecimiento del mismo en condiciones de invernadero [11]. El suelo utilizado para el ensayo fue obtenido de un campo de la región de Córdoba y el análisis del mismo se muestra en la tabla IV-2.

El ensayo de competencia se realizó en suelo no estéril; por lo tanto, para poder rastrear y distinguir nuestras cepas de aquellas indígenas del suelo se obtuvieron mutantes espontáneos resistentes a rifampicina derivadas de las cepas SF39a y SF39a-451 y, fueron denominadas SF39aR y SF39a-451R, respectivamente. Posteriormente, la viabilidad de los mutantes marcados con rifampicina fue evaluada en medio mínimo y comparada con sus cepas parentales. Como se puede observar en la tabla IV-3, la viabilidad de cada uno de los mutantes espontáneos fue similar a la de su correspondiente cepa parental confirmando que su crecimiento no se encuentra afectado. Por lo tanto, estas cepas marcadas pueden ser usadas para el ensayo en plantas.

Tabla IV-2: Características del suelo utilizado para el ensayo de competencia

Característica	Valor
pH	6,4
Nitrógeno-NO ₃	25,8 ppm
Fósforo	106,8 ppm
Azufre-SO ₄	16,4 ppm
Materia orgánica	2,77%

Tabla IV-3: Viabilidad de los mutantes espontáneos resistentes a rifampicina y sus correspondientes cepas salvajes

Cepa	Número de células viables (UFC · 10 ⁸ ml ⁻¹) en MMG a DO ₆₀₀ = 0.65
<i>P. fluorescens</i> SF39a	7,17±0,70
<i>P. fluorescens</i> SF39aR	6,42±1,02
<i>P. fluorescens</i> SF39a-451	7,67±1,57
<i>P. fluorescens</i> SF39a-451R	7,17±0,86

Los valores obtenidos para cada cepa resistente a rifampicina y su correspondiente cepa parental fueron analizados estadísticamente mediante T-test ($p < 0,05$), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas.

Las cepas marcadas con rifampicina SF39aR y SF39a-451R fueron crecidas en LB, lavadas e inoculadas en plantas de trigo individualmente o co-inoculadas (mezcla 1:1). Luego de tres semanas post-inoculación las plantas fueron cosechadas y el número de células viables en el suelo rizosférico fue determinado.

El número de células viables de la cepa salvaje recuperado de la rizósfera de trigo fue de $1,25 \cdot 10^7$ UFC · gr de suelo⁻¹ en las plantas inoculadas individualmente y de $7,64 \cdot 10^6$ UFC · gr de suelo⁻¹ en plantas co-inoculadas. Como se puede observar en la figura IV-8, la densidad poblacional del mutante en la rizósfera fue, aproximadamente, tres veces menos que la de la cepa salvaje tanto en los tratamientos individuales como en las plantas co-inoculadas, presentando en ambos casos diferencias estadísticamente significativas.

Es importante aclarar que es infrecuente encontrar en el suelo bacterias resistentes a rifampicina. A pesar de esto, plantas sin inocular fueron usadas como control en estos

experimentos de competencia para detectar la posible existencia de bacterias nativas, en la rizósfera de trigo, resistentes a rifampicina. Como era de esperar, el recuento de bacterias nativas resistentes a rifampicina estuvo por debajo del límite de detección en las plantas controles.

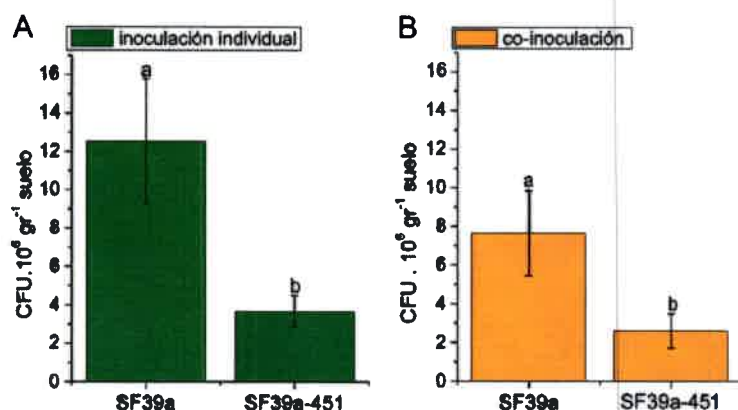


Figura IV-8 | Colonización de la rizósfera de trigo por *P. fluorescens* SF39a y el mutante SF39a-451. Cada cepa fue introducida en la rizósfera a una concentración de $2 \cdot 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{gr}^{-1} \text{ suelo}$ en las inoculaciones individuales (A) o $1 \cdot 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{gr}^{-1}$ en la co-inoculación (B). Las barras representan la media \pm SE de 3 experimentos con un $n=5$.

Los resultados obtenidos indican que el mutante SF39a-451 es menos competitivo e incapaz de colonizar la rizósfera de trigo con el mismo éxito que la cepa salvaje. La competitividad es una característica muy importante para una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal, ya que la misma debe ser capaz de colonizar la raíz y multiplicarse en el microhábitat asociado a la superficie radical, en competencia con la microbiota, el tiempo suficiente para expresar su actividad de promoción [39]. En conjunto, nuestros resultados sugieren que el sistema PTS^{Ntr} controla una plétora de procesos que definen el comportamiento de la bacteria en la rizósfera.

Varios autores han demostrado la importancia del sistema PTS^{Ntr} en la regulación de procesos que impactan en el desempeño de la bacteria en su medio ambiente. Por ejemplo, Higa y Edelstein [40] observaron que un mutante *ptsP*⁻ de *L. pneumophila* crecía normalmente en medios de laboratorio; pero, era defectuoso en su multiplicación en pulmón y bazo de cobayo. Estos investigadores concluyeron que la enzima EI^{Ntr} (codificada por el gen *ptsP*) es requerida para una completa virulencia de *L. pneumophila in vivo*. Por otro lado, se conoce que *Azotobacter vinelandii* es una bacteria del suelo que se somete a un proceso de diferenciación que resulta en la formación de un quiste resistente a la desecación. Recientemente, Muriel-

Millán et al. [41] demostraron que el PTS^{Ntr} regula la expresión del operón de biosíntesis de alquilresorcinoles (ARs), compuestos necesarios para el proceso de enquistamiento.

IV.4. CONCLUSIONES

- La deficiencia en la producción de bacteriocina en el mutante SF39a-451 se debe a la inactivación de *ptsP*, hallazgo confirmado por la complementación del mutante con el gen *ptsP* de *P. fluorescens* Pf0-1. En este estudio se presenta la primera evidencia del rol del gen *ptsP*, y, por lo tanto del sistema PTS^{Ntr}, en la producción de bacteriocinas.
- La mutación en el gen *ptsP* impacta sobre la producción de pioverdina, bacteriocinas y proteasas, la formación de biofilm, la movilidad y la competitividad en la rizósfera de trigo de la cepa SF39a. Estos resultados, sugieren que un establecimiento exitoso de las bacterias en un hábitat determinado requeriría un PTS^{Ntr} funcional.

IV.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Pflüger-Grau K, Görke B. Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. *Trends Microbiol* 2010;18:205–14. doi:10.1016/j.tim.2010.02.003.
- [2] Chavarría M, Kleijn RJ, Sauer U, Pflüger-grau K, Lorenzo V De. Regulatory tasks of the Phosphoenolpyruvate-Phosphotransferase. *MBio* 2012;3:1–9. doi:10.1128/mBio.00028-12.
- [3] Görke B, Stülke J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:613–24. doi:10.1038/nrmicro1932.
- [4] Pflüger K, De Lorenzo V. Evidence of in vivo cross talk between the nitrogen-related and fructose-related branches of the carbohydrate phosphotransferase system of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 2008;190:3374–80. doi:10.1128/JB.02002-07.
- [5] Lee J, Park YH, Kim YR, Seok YJ, Lee CR. Dephosphorylated NPr is involved in an envelope stress response of *Escherichia coli*. *Microbiology* 2015;116:1113–23. doi:10.1099/mic.0.000056.
- [6] Aranda-Olmedo I, Marín P, Ramos JL, Marqués S. Role of the ptsN gene product in catabolite repression of the *Pseudomonas putida* TOL toluene degradation pathway in chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:7418–21. doi:10.1128/AEM.01067-06.
- [7] Wolf S, Pflüger-Grau K, Kremling A. Modeling the interplay of *Pseudomonas putida* EIHA with the potassium transporter KdpFABC. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2015;25:178–94. doi:10.1159/000381214.
- [8] Xu H, Lin W, Xia H, Xu S, Li Y, Yao H, et al. Influence of ptsP gene on pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 2005;253:103–9. doi:10.1016/j.femsle.2005.09.027.
- [9] Cabeen M, Leiman S, Losick R. Colony-morphology screening uncovers a role for the *Pseudomonas aeruginosa* nitrogen-related phosphotransferase system in biofilm formation. *Mol Microbiol* 2015;in press. doi:10.1111/mmi.13250.
- [10] Mavrodi O V, Mavrodi D V, Weller DM, Thomashow LS. Role of ptsP, orfT, and sss recombinase genes in root colonization by *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:7111–22. doi:10.1128/AEM.01215-06.
- [11] Fischer SE, Fischer SI, Magris S, Mori GB. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. *World J Microbiol Biotechnol* 2007;23:895–903. doi:10.1007/s11274-006-9312-4.

- [12] Latour X, Corberand T, Laguerre G, Allard F, Lemanceau P. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:2449–56.
- [13] Compeau G, Al-Achi BJ, Platsouka E, Levy SB. Survival of rifampin-resistant mutants of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in soil systems. *Appl Environ Microbiol* 1988;54:2432–8.
- [14] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983;166:557–80. doi:10.1016/S0022-2836(83)80284-8.
- [15] Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 1995;166:175–6. doi:10.1016/0378-1119(95)00584-1.
- [16] Lazenby JJ, Griffin PE, Kyd J, Whitchurch CB, Cooley MA. A quadruple knockout of *lasIR* and *rhlIR* of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 that retains Wild-Type twitching motility has equivalent infectivity and persistence to PAO1 in a mouse model of lung infection. *PLoS One* 2013;8:e60973. doi:10.1371/journal.pone.0060973.
- [17] Kruczek C, Wachtel M, Alabady MS, Payton PR, Colmer-Hamood JA, Hamood AN. Serum albumin alters the expression of iron-controlled genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2012;158:353–67. doi:10.1099/mic.0.053371-0.
- [18] Dagorn A, Chapalain A, Mijouin L, Hillion M, Duclairoir-Poc C, Chevalier S, et al. Effect of GABA, a bacterial metabolite, on *Pseudomonas fluorescens* surface properties and cytotoxicity. *Int J Mol Sci* 2013;14:12186–204. doi:10.3390/ijms140612186.
- [19] Newell PD, Yoshioka S, Hvorecny KL, Monds RD, O'Toole GA. Systematic analysis of diguanylate cyclases that promote biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *J Bacteriol* 2011;193:4685–98. doi:10.1128/JB.05483-11.
- [20] O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Mol Microbiol* 1998;28:449–61. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x.
- [21] Yousef-Coronado F, Travieso ML, Espinosa-Urgel M. Different, overlapping mechanisms for colonization of abiotic and plant surfaces by *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Lett* 2008;288:118–24. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01339.x.
- [22] Gillis A, Dupres V, Mahillon J, Dufrêne YF. Atomic force microscopy: A powerful tool for studying bacterial swarming motility. *Micron* 2012;43:1304–11. doi:10.1016/j.micron.2012.01.014.
- [23] Rashid MH, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:4885–90. doi:10.1073/pnas.060030097.

- [24] Fischer SE, Jofré EC, Cordero P, Gutiérrez Mañero FJ, Mori GB. Survival of native *Pseudomonas* in soil and wheat rhizosphere and antagonist activity against plant pathogenic fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2010;97:241–51. doi:10.1007/s10482-009-9405-9.
- [25] Validov S, Mavrodi O, De La Fuente L, Boronin A, Weller D, Thomashow L, et al. Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol Lett* 2005;242:249–56. doi:10.1016/j.femsle.2004.11.013.
- [26] Huang J, Xu Y, Zhang H, Li Y, Huang X, Ren B, et al. Temperature-dependent expression of *phzM* and its regulatory genes *lasI* and *ptsP* in rhizosphere isolate *Pseudomonas* sp. strain M18. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:6568–80. doi:10.1128/AEM.01148-09.
- [27] Essén SA, Johnsson A, Bylund D, Pedersen K, Lundström US. Siderophore production by *Pseudomonas stutzeri* under aerobic and anaerobic conditions. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:5857–64. doi:10.1128/AEM.00072-07.
- [28] Djavaheri M, Mercado-Blanco J, Versluis C, Meyer JM, Loon LC, Bakker PAHM. Iron-regulated metabolites produced by *Pseudomonas fluorescens* WCS374r are not required for eliciting induced systemic resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato in *Arabidopsis*. *Microbiol Open* 2012;1:311–25. doi:10.1002/mbo3.32.
- [29] Gray E, Smith D. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol Biochem* 2005;37:395–412.
- [30] Lopez-Berges MS, Capilla J, Turra D, Schaffner L, Matthijs S, Jochl C, et al. HapX-mediated iron homeostasis is essential for rhizosphere competence and virulence of the soilborne pathogen *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 2012;24:3805–22. doi:10.1105/tpc.112.098624.
- [31] Houot L, Chang S, Pickering BS, Absalon C, Watnick PI. The phosphoenolpyruvate phosphotransferase system regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation through multiple independent pathways. *J Bacteriol* 2010;192:3055–67. doi:10.1128/JB.00213-10.
- [32] Lazazzera BA. The phosphoenolpyruvate phosphotransferase system: As important for biofilm formation by *Vibrio cholerae* as it is for metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2010;192:4083–5. doi:10.1128/JB.00641-10.
- [33] Babalola O. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett* 2010;32:1559–70. doi:10.1007/s10529-010-0347-0.
- [34] Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg G V, Lugtenberg BJJ. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytol* 2003;157:503–23. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00686.x.
- [35] Barahona E, Navazo A, Martínez-Granero F, Zea-Bonilla T, Pérez-Jiménez RM, Martín

- M, et al. *Pseudomonas fluorescens* F113 mutant with enhanced competitive colonization ability and improved biocontrol activity against fungal root pathogens. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:5412–9. doi:10.1128/AEM.00320-11.
- [36] Kearns DB. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:634–44. doi:10.1038/nrmicro2405.
- [37] Andersen JB, Koch B, Nielsen TH, Sørensen D, Hansen M, Nybroe O, et al. Surface motility in *Pseudomonas* sp. DSS73 is required for efficient biological containment of the root-pathogenic microfungi *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Microbiology* 2003;149:37–46. doi:10.1099/mic.0.25859-0.
- [38] Murray TS, Kazmierczak BI. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *J Bacteriol* 2008;190:2700–8. doi:10.1128/JB.01620-07.
- [39] Barea JM, Pozo MJ, Azcón R, Azcón-Aguilar C. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J Exp Bot* 2005;56:1761–78. doi:10.1093/jxb/eri197.
- [40] Higa F, Edelstein PH. Potential virulence role of the *Legionella pneumophila* ptsP ortholog. *Infect Immun* 2001;69:4782–9. doi:10.1128/IAI.69.8.4782-4789.2001.
- [41] Muriel-Millán LF, Moreno S, Romero Y, Bedoya-Pérez LP, Castañeda M, Segura D, et al. The unphosphorylated EIIANtr protein represses the synthesis of alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *PLoS One* 2015;10:e0117184. doi:10.1371/journal.pone.0117184.

CAPITULO V-

Rol del sistema CbrA/Crc en la
regulación de bacteriocinas

A large, dark blue, serif letter 'V' is centered on a vertical rectangular background with a light blue to white gradient.

V.1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo III se planteó la importancia de identificar genes implicados en la regulación de bacteriocinas. Por tal motivo, mediante mutagénesis al azar, se obtuvieron mutantes de la cepa *P. fluorescens* SF39a afectados en la producción de estos compuestos antimicrobianos. En uno de los mutantes, denominado SF39a-375, el transposón mini-Tn5 Km1 se insertó en el gen *cbrA*, el cual, codifica para el sensor del sistema regulatorio de dos componentes CbrAB. El mutante SF39a-375 presentó un aumento en la producción de bacteriocinas con respecto a la cepa salvaje lo que sugiere que el sistema CbrAB está implicado en la expresión de este tipo de compuestos. En el presente capítulo se profundiza en el estudio de este sistema regulatorio y su rol en la producción de bacteriocinas en la cepa SF39a.

V.1.1. Sistema de dos componentes CbrAB

El género *Pseudomonas* presenta una gran versatilidad nutricional y un rápido potencial de adaptación a las condiciones ambientales. Uno de los motivos de tal capacidad adaptativa es la presencia de un elevado número de sistemas de dos componentes codificado en sus genomas. En particular, los sistemas de dos componentes CbrAB y NtrBC son de especial importancia en *Pseudomonas* como respuesta a la disponibilidad de nutrientes en su entorno [1]. Ha sido sugerido que el sistema CbrAB funcionaría coordinadamente con el sistema NtrBC para mantener el balance carbono: nitrógeno en la célula [2,3].

El sistema de dos componentes CbrAB fue descrito por primera vez en *P. aeruginosa* [2] y está compuesto por el sensor histidina quinasa CbrA y el regulador de respuesta CbrB. Dicho sistema controla la expresión de varias vías catabólicas que implican la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno. Mutantes en los genes del sistema de dos componentes CbrAB de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. putida* presentan dificultades para crecer en medios conteniendo una gran variedad de compuestos orgánicos como única fuente de carbono y/o nitrógeno [2,4,5]. Por ejemplo, Nishijyo et al. [2] observaron que cepas mutantes *cbrA*⁻ y *cbrB*⁻ de *P. aeruginosa* PAO1 perdieron la capacidad de utilizar varios aminoácidos (arginina, histidina y prolina) y poliaminas como única fuente de carbono y nitrógeno. Además, estos mutantes fueron incapaces de utilizar, o utilizaron pobremente, muchas otras fuentes de carbono, incluyendo manitol, glucosa, piruvato y citrato.

Además, el sistema de dos componentes CbrAB está involucrado en el control de la represión catabólica por carbono (CCR). La CCR es un mecanismo que permite la asimilación de fuentes de carbono necesarias para un crecimiento celular eficiente, mientras que reprime el catabolismo de otras fuentes de carbono que son energéticamente menos favorables [1]. Este mecanismo involucra la proteína de represión catabólica Crc, la cual, inhibe la traducción de ARN mensajeros que presentan motivos ricos en adenina (llamados motivos CA) cerca del sitio de inicio de la traducción y, de esta forma, evita la traducción de los ARNm que codifican enzimas de vías catabólicas de sustratos energéticamente menos favorables. Recientemente, se conoció que la actividad de Crc requiere la chaperona de ARN Hfq, la cual, reconoce los motivos CA y facilita la represión traduccional dependiente de Crc a través de un mecanismo aún no comprendido completamente [6,7].

El mecanismo por el cual el sistema CbrAB controla la represión catabólica no se conoció hasta el año 2009, cuando se descubrió en *P. aeruginosa* el pequeño ARN (sRNA) CrcZ [8]. El descubrimiento de CrcZ permitió relacionar la actividad del sistema de dos componentes CbrAB con la proteína Crc [9]. De esta manera, se completó el esquema de represión catabólica mediada por Crc en *P. aeruginosa* y se propuso el siguiente modelo: cuando las bacterias crecen en fuentes de carbono menos preferidas, el sistema CbrAB se activa. El sensor CbrA se autofosforila y transfiere el fosfato al regulador de respuesta CbrB. Posteriormente, CbrB activado dispara la transcripción del gen que codifica el sRNA CrcZ, el cual, antagoniza la función de la proteína Crc mediante el secuestro de Hfq. Esto, lleva a la de-represión de los ARNm que codifican enzimas para degradar sustratos menos favorables y, por lo tanto, las vías catabólicas para tales sustratos se vuelven funcionales (figura V-1). Por el contrario, en presencia de fuentes de carbono preferenciales la actividad CbrAB se inhibe y los sustratos menos favorables no son degradados [1,6,7]. El tipo de fuente de carbono determina la actividad de CbrAB y, por lo tanto, los niveles de CrcZ, los cuales, son bajos en presencia de una fuente de carbono preferencial como el succinato, medianos en presencia de una fuente de carbono intermedia como la glucosa o, altos cuando un compuesto de carbono menos preferido como el manitol se utiliza como la única fuente de energía [9,10].

El control de la represión catabólica del carbono es la función más conocida de la cascada CbrA/Crc; sin embargo, también se ha demostrado su rol en funciones relacionadas a la virulencia [7,9] como movilidad, formación de biofilm, expresión de porinas, regulación del

sistema de secreción tipo III, sensibilidad a antibióticos y citotoxicidad [11–13]. Los mecanismos regulatorios por los cuales se controlan tales procesos aún no se conocen en detalle molecular [10].

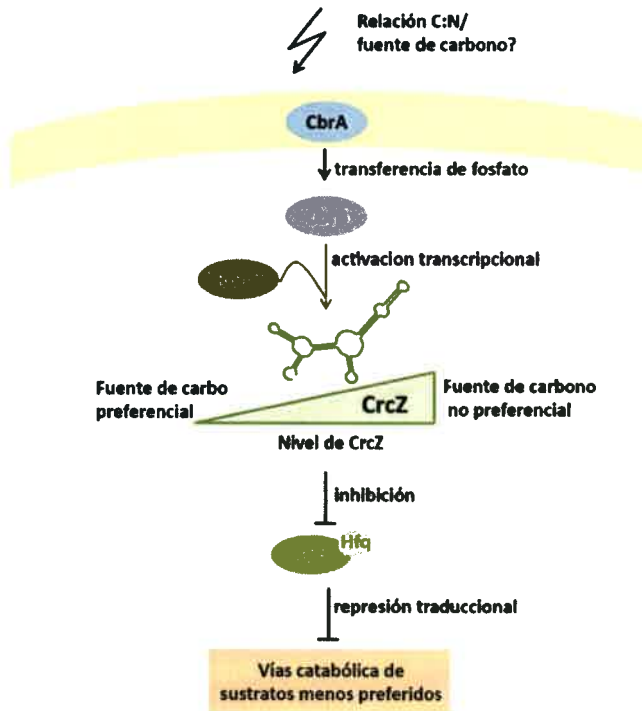


Figura V-1 | Modelo de represión catabólica mediada por el sistema CbrA/Crc en *P. aeruginosa*. El aumento de la expresión de *crcZ* está mediada por la actividad del sistema de dos componentes CbrAB y el factor sigma RpoN. En presencia de una fuente de carbono preferida, los niveles CrcZ son bajos. Por el contrario, la presencia de una fuente de carbono pobre conduce a la regulación positiva de *crcZ* por el regulador de respuesta CbrB y los niveles de CrcZ aumentan dentro de la célula. CrcZ antagoniza la función de la proteína Crc y los ARNm reprimidos por dicha proteína ahora son traducidos. (figura adaptada de Sonnleitner et al. [9])

V.2. MATERIALES Y MÉTODOS

V.2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y cebadores

Las cepas bacterianas, los plásmidos y los cebadores utilizados en esta sección del trabajo son descritos en la tabla V-1 y V-2.

Tabla V-1: cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Cepa o plásmido	Origen y característica relevante	Referencia u origen
Cepa		
<i>P. fluorescens</i> SF39a	PGPR, aislada de rizósfera de trigo (Argentina)	[14]
<i>P. fluorescens</i> CTR212	Aislado de suelo (Francia)	[15]
<i>P. fluorescens</i> SF39a-375	Mutante <i>cbrA::mini-Tn5 Km1</i> de <i>P. fluorescens</i> SF39a, Km ^r	Este trabajo
<i>P. fluorescens</i> SF39a-375pCbrA	<i>P. fluorescens</i> SF39a-375 complementado con el plásmido pCbrA, Km ^r , Gm ^r	Este trabajo
<i>P. fluorescens</i> SF39a-375p	<i>P. fluorescens</i> SF39a-375 (pBBR1MCS-5), Km ^r , Gm ^r	Este trabajo
<i>P. fluorescens</i> SF39a-cbrB	Mutante no polar <i>cbrB::Km</i> de <i>P. fluorescens</i> SF39a, Km ^r	Este trabajo
<i>P. fluorescens</i> SF39a-crcZ	Mutante no polar <i>crcZ::Km</i> de <i>P. fluorescens</i> SF39a, Km ^r	Este trabajo
<i>P. fluorescens</i> SF39a-crc	Mutante no polar <i>crc::Km</i> de <i>P. fluorescens</i> SF39a, Km ^r	Este trabajo
<i>P. fluorescens</i> SF39aR	Mutante espontáneo resistente a rifampicina de <i>P. fluorescens</i> SF39a, Rif	Este trabajo
<i>P. fluorescens</i> SF39a-375R	Mutante espontáneo resistente a rifampicina de <i>P. fluorescens</i> SF39a-375, Km ^r , Rif	Este trabajo
<i>P. fluorescens</i> SF39a-cbrBR	Mutante espontáneo resistente a rifampicina de <i>P. fluorescens</i> SF39a-cbrB, Km ^r , Rif	Este trabajo
<i>P. fluorescens</i> SF39a-crcZR	Mutante espontáneo resistente a rifampicina de <i>P. fluorescens</i> SF39a-crcZ, Km ^r , Rif	Este trabajo
<i>P. fluorescens</i> SF39a-crcR	Mutante espontáneo resistente a rifampicina de <i>P. fluorescens</i> SF39a-crc, Km ^r , Rif	Este trabajo
<i>E. coli</i> CC118 λpir	$\Delta(\text{ara-leu}) \text{ araD } \Delta\text{lacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE(Am) recA1 } \lambda \text{ pir}$ lisogénica.	[16]
<i>E. coli</i> DH5α	<i>endA1 recA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> $\Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169 } \phi\text{80d lacZ } \Delta\text{M15}$.	[17]

Plásmido		
pBBR1MCS-5	Vector de amplio rango de huésped. Gm ^r . P _(lac)	[18]
pCbrA	pBBR1MCS-5 conteniendo el gen <i>cbrA</i> de <i>P. fluorescens</i> SF39a, Gm ^r	Este trabajo
pUC18not	Vector de clonado derivado del plásmido pUC18. Sitio de múltiple clonado flanqueado por sitios <i>NotI</i> , Ap ^r	[16]
pKNG101	Plásmido suicida utilizado para reemplazo de genes, <i>sacB</i> , Sm ^r	[19]
p34S-Km3	Plásmido que contiene un casete de resistencia a Km flanqueado por sitios de restricción duplicados, Km ^r	[20]
pCbrB1	pUC18not portando un fragmento <i>HindIII/BamHI</i> de 1220 pb que contiene la región 5' del gen <i>cbrB</i> (fragmento 1), Ap ^r	Este trabajo
pCbrB12	pCbrB1 portando un fragmento <i>BamHI/KpnI</i> de 1025 pb que contiene la región 3' del gen <i>cbrB</i> (fragmento 2), Ap ^r	Este trabajo
pCbrB12Km	pCbrB12 portando un fragmento <i>BamHI</i> que contiene el casete de resistencia a Km del plásmido p34S-Km3, Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pKNGCbrB	Fragmento <i>NotI</i> del pCbrB12Km clonado en el vector pKNG101, Sm ^r , Km ^r	Este trabajo
pCrcZ1	pUC18not portando un fragmento <i>HindIII/BamHI</i> de 1186 pb que contiene la región 5' del gen <i>crcZ</i> (fragmento 1), Ap ^r	Este trabajo
pCrcZ12	pCrcZ1 portando un fragmento <i>BamHI/KpnI</i> de 914 pb que contiene la región 3' del gen <i>crcZ</i> (fragmento 2), Ap ^r	Este trabajo
pCrcZ12Km	pCrcZ12 portando un fragmento <i>BamHI</i> que contiene el casete de resistencia a Km del plásmido p34S-Km3, Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pKNGCrcZ	Fragmento <i>NotI</i> del pCrcZ12Km clonado en el vector pKNG101, Sm ^r , Km ^r	Este trabajo
pCrcI	pUC18not portando un fragmento <i>HindIII/BamHI</i> de 1143 pb que contiene la región 5' del gen <i>crc</i> (fragmento 1), Ap ^r	Este trabajo

pCrc12	pCrc1 portando un fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI de 1108 pb que contiene la región 3' del gen <i>crc</i> (fragmento 2), Ap ^r	Este trabajo
pCrc12Km	pCrc12 portando un fragmento <i>Bam</i> HI que contiene el casete de resistencia a Km del plásmido p34S-Km3, Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pKNGCrc	Fragmento <i>Not</i> I del pCrc12Km clonado en el vector pKNG101, Sm ^r , Km ^r	Este trabajo

Km^r, resistencia a kanamicina; Gm^r resistencia a gentamicina; Rif^r resistencia a rifampicina.

Tabla V-2: cebadores utilizados

Cebador	Secuencia (5'-3')	Amplificación de:
cbrAFw	<u>ggggTACCT</u> ggCTgATYCTgATTgTCgT	Gen <i>cbrA</i>
cbrARv	g <u>CTCTAgAAATK</u> gTTTCgTCTTCgACgAT	(3059 pb)
Frag1cbrBFw	<u>CCCAA</u> gCTTggCgAAAACTACgTCACCgAA	Fragmento de 1220 pb que contiene el extremo 5' del gen <i>cbrB</i> (fragmento 1)
Frag1cbrBRv	<u>CgggATCCT</u> ggTTTCgTCTTCgACgATCA	
Frag2cbrBFw	<u>CgggATCCACCT</u> gCTgggCATCgACAT	Fragmento de 1025 pb que contiene el extremo 3' del gen <i>cbrB</i> (fragmento 2)
Frag2cbrBRv	<u>ggggTACCTTCTTC</u> AgCATgggATgCACT	
Frag1crcZFw	<u>CCCAA</u> gCTTCgCTgTggATAACAgCAATg	Fragmento de 1186 pb que contiene el extremo 5' del gen <i>crcZ</i> (fragmento 1)
Frag1crcZRv	<u>CgggATCCCC</u> AgTAAAAACAagggtCA	
Frag2crcZFw	<u>CgggATCCTTCT</u> gCAAAAAATCCTCCgC	Fragmento de 914 pb que contiene el extremo 3' del gen <i>crcZ</i> (fragmento 2)
Frag2crcZRv	<u>ggggTACCC</u> AgCTTgAgCACTTCCTCgAA	
Frag1crcFw	<u>CCCAA</u> gCTTTCggTATCTTCCTgCTggC	Fragmento de 1143 pb que contiene el extremo 5' del gen <i>crc</i> (fragmento 1)
Frag1crcRv	<u>CgggATCCCA</u> ATCTgggCTggCgTTT	
Frag2crcFw	<u>CgggATCCCATCC</u> AgTTCAAaggCggA	Fragmento de 1108 pb que contiene el extremo 3' del gen <i>crc</i> (fragmento 2)
Frag2crcRv	<u>CggAATTCAT</u> gTggATCgCACgCTgTA	

Los nucleótidos subrayados corresponden a los sitios de corte para las enzimas de restricción utilizadas en el proceso de clonado

V.2.2. Condiciones de cultivo y técnicas generales de biología molecular

Las condiciones de cultivo y las técnicas generales de biología molecular son especificadas en la sección II.2.2 y II.2.3, respectivamente.

V.2.3. Complementación del mutantes SF39a-375

V.2.3.1. Clonado del gen *cbrA* en el plásmido pBBR1MCS-5

El gen *cbrA* fue amplificado por PCR a partir del ADN genómico de *P. fluorescens* SF39a, utilizando los cebadores *cbrAFw* y *cbrARv* (tabla V-2), con sitios de cortes para las enzimas de restricción *KpnI* y *XbaI*, respectivamente.

La mezcla de reacción y las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes:

MEZCLA DE REACCIÓN		CICLO DE TEMPERATURAS	
Agua	16,5 μ l	Desnaturalización inicial	94°C 2 min
Buffer 10X	2,5 μ l	35 ciclos de:	
PCR enhancer	2,5 μ l	Desnaturalización	94°C 30 seg
dNTP (10mM)	0,75 μ l	Hibridación	54°C 30 seg
Cebador <i>cbrAFw</i> (20 μ M)	0,5 μ l	Elongación	68°C 3 min
Cebador <i>cbrARv</i> (20 μ M)	0,5 μ l	Elongación final	68°C 10 min
SO ₄ Mg (50mM)	0,75 μ l		
ADN molde	1 μ l		
Pfx ADN polimerasa	0,25 μ l		

El producto de PCR fue purificado usando el Kit QIAquick PCR (QIAGEN) y digerido con las enzimas *KpnI* y *XbaI*. Por otro lado, el plásmido pBBR1MCS-5 fue extraído y digerido con las mismas enzimas de restricción. Las digestiones fueron sembradas en un gel de agarosa y las bandas correspondientes al plásmido lineal y al producto de PCR fueron purificadas empleando el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

El producto de PCR fue ligado al plásmido pBBR1MCS-5 utilizando la ligasa del fago T4 y posteriormente, la mezcla de ligación fue utilizada para transformar células de *E. coli* CC118 λ pir competentes químicas. Luego de la transformación, 100 μ l de las células transformadas se sembraron en una placa con medio LB sólido suplementado con gentamicina (20 μ g \cdot ml⁻¹), resistencia propia del vector pBBR1MCS-5, y X-gal (20 μ g \cdot ml⁻¹). Las colonias resistentes al antibiótico y de color blanco fueron seleccionadas. La presencia del inserto en dichos clones fue

confirmada mediante digestión del plásmido recombinante y PCR. El plásmido recombinante obtenido fue denominado pCbrA.

V.2.3.2. Incorporación del plásmido pCbrA en el mutante SF39a-375 y análisis de la producción de bacteriocina

El plásmido recombinante pCbrA fue incorporado mediante electroporación a *P. fluorescens* SF39a-375 y aquellos clones que portan el plásmido fueron seleccionados en placas de LB suplementado con gentamicina ($60 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). En las colonias resistentes a gentamicina, la presencia del plásmido recombinante pCbrA se confirmó mediante extracción de plásmidos y amplificación por PCR del gen *cbrA* a partir del plásmido extraído. Como control, también se incorporó el plásmido pBBR1MCS-5 vacío en el mutante.

La producción de bacteriocina fue utilizada como prueba de complementación. Para ello, la cepa salvaje SF39a, el mutante SF39a-375, el mutante complementado (SF39a-375pCbrA) y el mutante que lleva el plásmido vacío (SF39a-375p) fueron cultivados durante toda la noche y la producción de bacteriocina fue analizada mediante el método de la gota (inciso II.2.4) contra la cepa *P. fluorescens* CTR212.

V.2.4. Identificación de los genes que codifican para la cascada CbrA/Crc en el *draft* del genoma de *P. fluorescens* SF39a y análisis bioinformático de las secuencias

Los genes *cbrA*, *cbrB*, *crcZ* y *crc* fueron identificados en el genoma de la cepa SF39a mediante alineamiento del *draft* del genoma contra las secuencias de los ortólogos de dichos genes de otras *P. fluorescens* disponibles en las bases de datos. Para el análisis de las secuencias se utilizó el software Vector NTI (Invitrogen) y las herramientas bioinformáticas Blast y ORF finder. La predicción de la estructura secundaria del pequeño sRNA CrcZ se realizó utilizando el algoritmo RNAfold disponible en el servidor Vienna RNA (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>).

V.2.5. Construcción de mutantes en los genes *cbrB*, *crcZ* y *crc*

Los mutante en los genes *cbrB*, *crcZ* y *crc* fueron construido mediante doble recombinación homóloga siguiendo la metodología descrita en el inciso II.2.8 para el mutante en el gen *pys* (ver figura II-6).

Los cebadores utilizados para la amplificación de los fragmentos 1 y 2 de cada uno de los genes a mutar se detallan en la tabla V-2. La mezcla de reacción y las condiciones de ciclado fueron las siguientes:

MEZCLA DE REACCIÓN		CICLO DE TEMPERATURAS	
Agua	18,75 μ l	Desnaturalización inicial	95°C 5 min
Buffer 10X	2,5 μ l	35 ciclos de:	
dNTP (10 mM)	0,75 μ l	Desnaturalización	95°C 40 seg
Cebador Fw (20 μ M) *	0,5 μ l	Hibridación	*57°C 40 seg
Cebador Rv (20 μ M) *	0,5 μ l	Elongación	72°C 1 min
Cl ₂ Mg (50 mM)	0,75 μ l	Elongación final	72°C 10 min
ADN molde	1 μ l		
Taq ADN polimerasa	0,25 μ l		

* cebadores correspondientes a la región que se desea amplificar

* con excepción de la amplificación del fragmento 1 del gen *cbrB* donde se utilizó 60°C como temperatura de hibridación.

Los productos de PCR de los fragmentos 1 y 2 de cada uno de los genes a mutar fueron clonados secuencialmente en el vector pUC18not para obtener los plásmidos recombinantes pCbrB12, pCrcZ12 y pCrc12 (ver tabla V-1). Luego, el casete de resistencia a Km del plásmido p34S-Km3 fue clonado entre los fragmentos 1 y 2 de los plásmidos pCbrB12, pCrcZ12 y pCrc12 y se obtuvieron los plásmidos pCbrB12Km, pCrcZ12Km y pCrc12Km (Tabla V-1), respectivamente. Por último, el constructo completo fragmento1-Km-fragmento2 fue escindido del vector pUC18not y transferido al plásmido suicida pKNG101. De esta forma se obtuvieron los plásmidos recombinantes pKNGCbrB, pKNGCrcZ y pKNGCrc (Tabla V-1).

Finalmente, los plásmidos pKNGCbrB, pKNGCrcZ y pKNGCrc fueron incorporados individualmente mediante electroporación a la cepa *P. fluorescens* SF39a para producir el evento de doble recombinación en los genes *cbrB*, *crcZ* y *crc*, respectivamente. Las colonias resistentes a Km, capaces de crecer en sacarosa al 10% y sensibles a Sm fueron elegidas como posibles mutantes por doble recombinación (figura II-6).

En cada una de las colonias seleccionadas, el evento de doble recombinación fue confirmado por PCR y Southern-blot. Para la PCR se utilizó el cebador Fw del fragmento 1 y cebador Rv del fragmento 2 correspondiente al gen que se mutó. El Southern-blot se llevó a

cabo como se detalla en el punto II.2.3.7. utilizando como sonda el fragmento 2 para el mutante en gen *cbrB* y el fragmento 1 para los mutantes en el gen *crcZ* y *crc*. La sonda fue obtenida mediante amplificación por PCR utilizando una mezcla de deoxinucleótidos trifosfato que contienen uno de los nucleótidos marcado con biotina (kit Biotin DecaLabel™ DNA Labeling de Fermentas). El ADN de la cepa salvaje y de los mutantes fue digerido con la enzima *Bam*HI (Fermentas). Dicha enzima genera una diferencia en el patrón de restricción entre la cepa salvaje, los mutantes dobles recombinantes y simples recombinantes.

V.2.6. Producción de bacteriocinas

La cepa salvaje SF39a y los mutantes SF39a-375, SF39a-cbrB, SF39a-crcZ y SF39a-crc fueron cultivados en medio LB líquido durante toda la noche y la producción de bacteriocinas fue analizada mediante el método de la gota (inciso II.2.4). Como cepa sensible se utilizó *P. fluorescens* CTR212.

V.2.7. Ensayo de competencia

Semillas de trigo esterilizadas superficialmente y pre-germinadas fueron transferidas a macetas conteniendo 180 gr de suelo no estéril y colocadas en cámara de cultivo (12 h luz, 12 h oscuridad). A los 7 días, las plantas fueron inoculadas individualmente con las cepas SF39aR, SF39a-375R, SF39a-cbrBR, SF39a-crcZR y SF39a-crcR a una concentración final de $2 \cdot 10^6$ UFC \cdot gr de suelo⁻¹.

Luego de tres semanas post-inoculación las plantas fueron cosechadas y el número de células viables en el suelo rizosférico fue determinado mediante recuento en placa. Para ello, se realizaron diluciones seriadas del suelo rizosférico y se sembró en medio LB suplementados con rifampicina (para la cepa salvaje) o rifampicina y kanamicina (para los mutantes). En todos los casos se adicionó dicloran ($50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) al medio de cultivo para inhibir el crecimiento de hongos que pueden dificultar el recuento de bacterias. El experimento se repitió 3 veces con $n=5$ para cada tratamiento [21]. Plantas no inoculadas fueron utilizadas como control. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el test de ANOVA.

La recolección del suelo, la obtención de cepas resistentes a rifampicina, la preparación del inóculo y la esterilización de las semillas se realizó como se describe en la sección IV.2.6.1., IV.2.6.2., IV.2.6.3 y IV.2.6.4., respectivamente.

V.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.3.1. Complementación del mutante SF39a-375

Un estudio de complementación en el mutante SF39a-375 fue realizado para determinar si el fenotipo observado en dicho mutante es consecuencia de la inactivación insercional del gen *cbrA* o debido a un efecto polar del transposón en los genes que se localizan corriente abajo de *cbrA*. Al momento de realizar el ensayo de complementación, el genoma de la cepa SF39a aún no había sido secuenciado. Por lo tanto, los cebadores para amplificar el gen *cbrA* de SF39a fueron diseñados en base a las secuencias *cbrA* de otras cepas de *P. fluorescens* presentes en las bases de datos (*P. fluorescens* Pf0-1, F113, Pf-5). El producto de amplificación de *cbrA* se clonó en el vector pBBR1MCS-5 y se obtuvo el plásmido recombinante pCbrA. Dicho plásmido fue incorporado a la cepa mutante SF39a-375 mediante electroporación y la producción de bacteriocinas fue realizada como prueba de complementación. Como se puede observar en la figura V-2, el mutante con el plásmido recombinante pCbrA fue capaz de restaurar al fenotipo salvaje confirmando que el aumento en el halo de inhibición en dicho mutante se debe a la inactivación del gen *cbrA* y no a efectos polares del transposón en genes corriente abajo. Como era de esperar, el plásmido pBBR1MCS-5 vacío no afectó el fenotipo del mutante SF39a-375. Este resultado nos permite confirmar que el gen *cbrA* afecta la producción de bacteriocinas en la cepa SF39a.

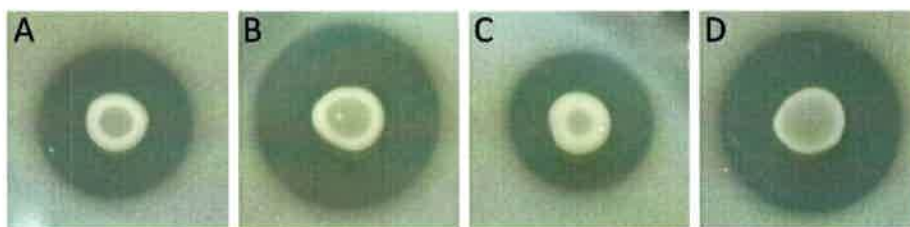


Figura V-2 | **Producción de bacteriocinas analizada mediante el método de la gota.** (A) *P. fluorescens* SF39a, (B) *P. fluorescens* SF39a-375, (C) *P. fluorescens* SF39a-375pCbrA, (D) *P. fluorescens* SF39a-375p.

V.3.2. Identificación de los genes que codifican para la cascada CbrA/Crc en el *draft* del genoma de *P. fluorescens* SF39a

Como se mencionó anteriormente el gen *cbrA* codifica el sensor del sistema de dos componentes CbrAB. En *P. aeruginosa* y *P. putida*, el sistema CbrAB participa en una vía regulatoria más compleja que involucra el pequeño ARN CrcZ y la proteína Crc (el sistema CbrA/Crc) [7]. Para comenzar con el estudio de este sistema regulatorio y su rol en la producción de bacteriocinas, se propuso identificar los genes que codifican el sistema CbrA/Crc en el genoma de la cepa *P. fluorescens* SF39a.

Los genes *cbrA*, *cbrB* y *crcZ* fueron identificados en el contig 13 y el gen *crc* en el contig 2 del *draft* del genoma de SF39a. Al igual que en *P. aeruginosa* y *P. putida* los genes *cbrA*, *cbrB* y *crcZ* se localizan en un mismo *cluster*; mientras que *crc* se localiza en otra parte del genoma. En la figura V-3 se muestra la organización genética de los genes *cbrA*, *cbrB*, *crcZ* y *crc* de la cepa SF39a y otras *Pseudomonas* spp. y se puede observar sintenia entre las diferentes cepas y especies. Además, cada uno de los genes identificados en la cepa SF39a mostró un elevado porcentaje de identidad con su correspondiente ortólogo. Por ejemplo, la región que incluye los genes *cbrA*, *cbrB* y *crcZ* presenta un 91% de identidad con la región de *P. fluorescens* Pf0-1, 87% con *P. fluorescens* F113, 84% con *P. putida* KT2440, 83% con *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 y 81 % con *P. aeruginosa* PAO1. Mientras que el gen *crc* presenta 95% de identidad con el gen *crc* de *P. fluorescens* Pf0-1, 89% con *P. fluorescens* F113, 87% con *P. putida* KT2440, 89% con *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 y 82 % con *P. aeruginosa* PAO1.

En *P. aeruginosa* y *P. putida* se informó que el gen *crcZ* está bajo el control de su propio promotor y que el mismo es dependiente del factor sigma alternativo RpoN (σ^{54}) [22,23]. Nosotros logramos identificar en la cepa SF39a una posible región promotora corriente arriba de *crcZ*, la cual, contiene las cajas -12 y -24 típicas de promotores dependientes de σ^{54} (consenso: TGGCACGN₄TTGC^T / A, donde los nucleótidos más conservados están en negrita y N indica cualquier nucleótido [24]) (figura V-4). Además, en el modelo de regulación planteado en *P. aeruginosa* y *P. putida* el regulador de respuesta CbrB activa la transcripción del gen *crcZ*. Abdou et al. [22] identificaron en *P. aeruginosa* PAO1 el sitio de reconocimiento para el regulador de respuesta CbrB corriente arriba del promotor del gen *crcZ*. Dicho sitio presenta una secuencia de nucleótidos palindrómica cuya secuencia consenso es

CTGTTACCN_{3/12}CGTAACAG. Esta secuencia, correspondiente al sitio de unión para CbrB, también fue observada corriente arriba del promotor del gen *crcZ* en la cepa SF39a (figura V-4).

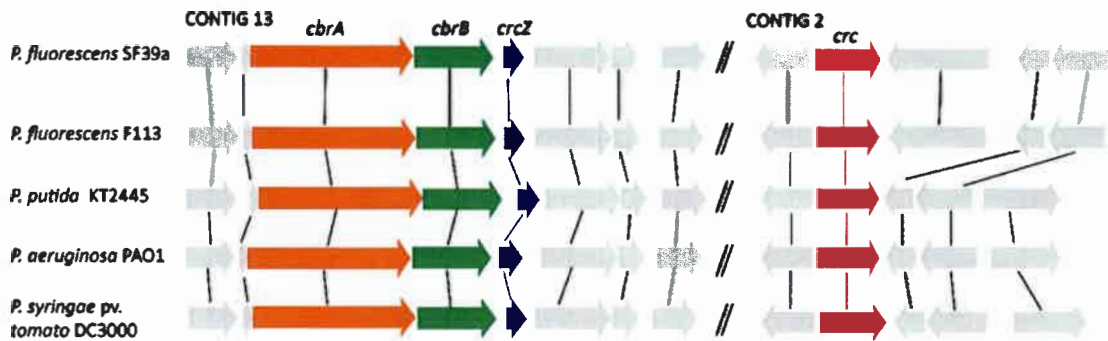


Figura V-3 | Organización genética de los genes *cbrA*, *cbrB*, *crcZ* y *crc* de *P. fluorescens* SF39a y otras cepas del género *Pseudomonas*. Los genes *cbrA*, *cbrB*, *crcZ* y *crc* se muestran en color rojo, verde, azul y rosa, respectivamente. Los ORFs homólogos son conectados con líneas.

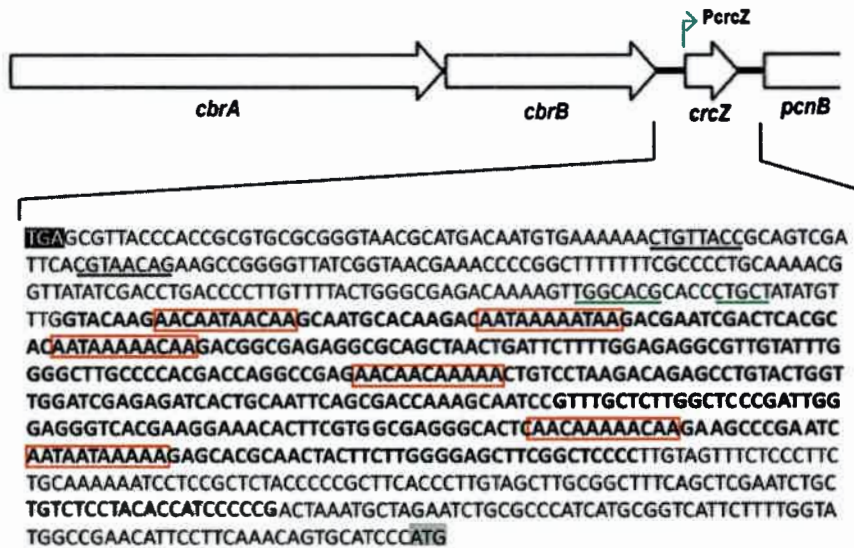


Figura V-4 | Secuencia y contexto genómico del gen *crcZ* de *P. fluorescens* SF39a. La secuencia de nucleótidos del gen *crcZ* es indicada en letra negra y los motivos CA están recuadrados con rectángulos rojos. El posible promotor dependiente de RpoN de *crcZ* está subrayado con verde y el posible sitio de reconocimiento del regulador de repuesta CbrB subrayado con negro. El codón stop del gen *cbrB* se muestra en color negro y el codón de inicio del gen *pcnB* de color gris.

Por otro lado, ha sido informado que el pequeño ARN CrcZ contiene cajas CA (consenso AAnAAnAA) mediante las cuales CrcZ se une y secuestra a la proteína Hfq y, por lo tanto, contrarresta la función de Crc [6,25]. Nosotros observamos que en la secuencia de *crcZ* de la cepa SF39a también se encuentran estos típicos motivos CA de unión a Hfq/Crc (figura V-4). Estos resultados concuerdan con Moreno et al. [23] y Filiatrault et al. [26], quienes también observaron los motivos CA en los genes *crcZ* de *P. putida* KT2445, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A y *P. syringae* pv. *syringae* B728a. En la figura V-5 se muestra la predicción de la estructura secundaria del pequeño ARN CrcZ de la cepa SF39a donde se pueden observar seis posibles bucles donde se encuentran los motivos CA.

El hallazgo in silico de secuencias de reconocimiento para CbrB corriente arriba del promotor de *crcZ* y de cajas CA en el sARN CrcZ sugieren, una posible activación transcripcional (dependiente de RpoN) de *crcZ* por parte del regulador de respuesta CbrB y una represión de Crc/Hfq por parte del pequeño ARN CrcZ en la cepa SF39a, igual a lo descrito previamente en *P. aeruginosa* y *P. putida*.

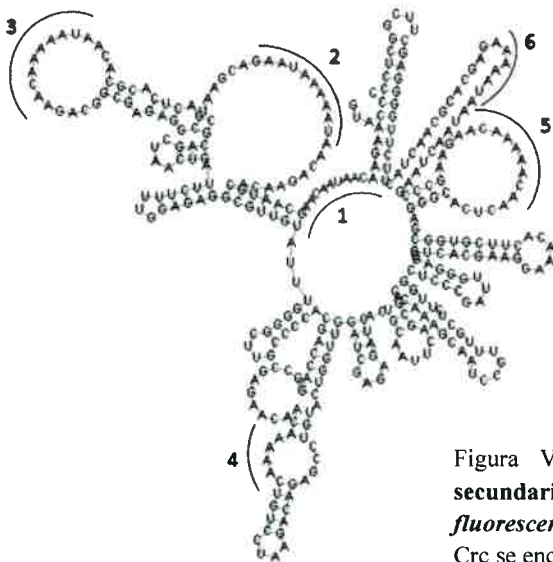


Figura V-5 | Predicción de la estructura secundaria del pequeño ARN CrcZ de *P. fluorescens* SF39a. Los posibles sitios de unión a Crc se encuentran numerados del 1 al 6.

V.3.3. Rol del sistema CbrA/Crc en la producción de bacteriocinas

Mutantes de *P. aeruginosa* en el sistema de dos componentes CbrAB y en el pequeño ARN CrcZ presentan fenotipos similares, pero no idénticos. Lo que sugiere que muchas, pero no todas, de las actividades del sistema de dos componentes CbrAB son mediadas por el pequeño ARN CrcZ y la proteína Crc [10]. Por lo tanto, se han propuesto algunos caminos regulatorios alternativos que pueden surgir del sistema CbrAB y que se desvían de la línea regulatoria central CbrA/Crc [27] (figura V-6).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, un aumento en la producción de bacteriocinas en el mutante SF39a-375 (*cbrA*⁻) no necesariamente sugiere que la vía completa CbrA/Crc esté involucrada en la regulación de bacteriocinas, sino que pueden estar implicadas las vías alternativas. Para dilucidar esto, se planteó construir mutantes de la cepa SF39a en el resto de los componentes de la cascada CbrA/Crc y, estudiar en ellos la producción de bacteriocinas.

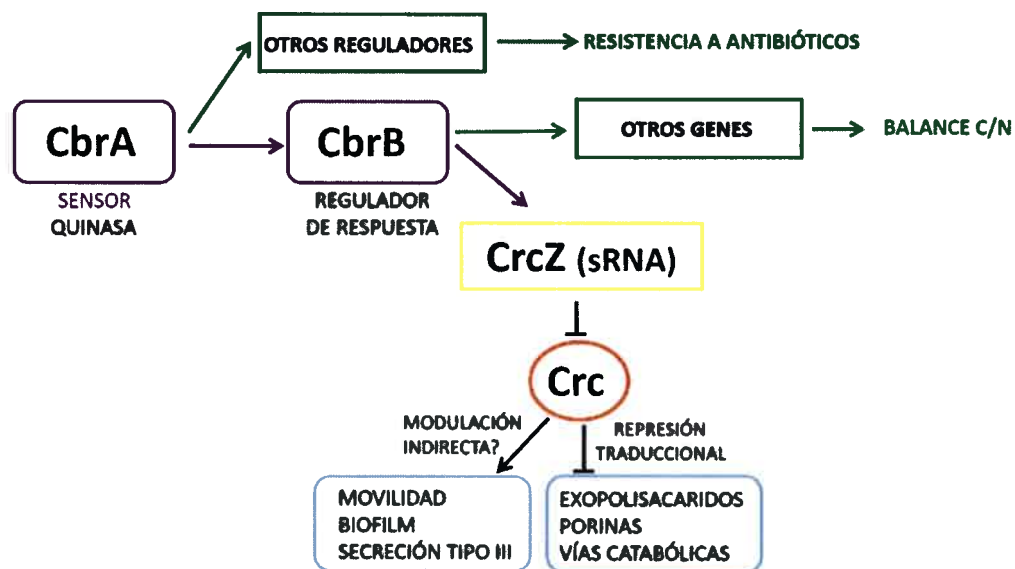


Figura V-6 | Modelo de regulación propuesto para la vía de transducción de señales CbrA/Crc en *P. aeruginosa*. Lo caminos regulatorios alternativos a la vía central CbrA/Crc se indican en color verde. ↓: control positivo, ⊥: control negativo (figura adaptada de Martínez y Rojo [27])

Los mutantes fueron construidos mediante el reemplazo de un fragmento del gen de interés por un casete de resistencia a Km mediante doble recombinación homóloga y, fueron denominados *P. fluorescens* SF39a-cbrB (*cbrB*), *P. fluorescens* SF39a-crcZ (*crcZ*) y *P. fluorescens* SF39a-crc (*crc*). En las figuras V-7, V-8 y V-9 se muestra la confirmación del evento de doble recombinación para los mutantes SF39a-crc, SF39a-crcZ y SF39a-cbrB, respectivamente.

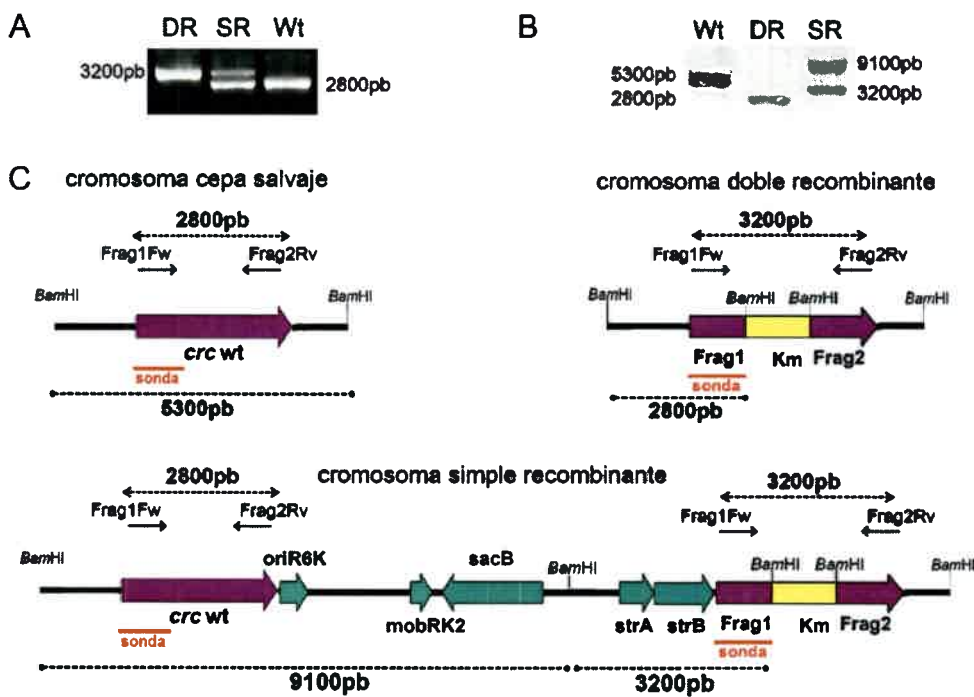


Figura V-7 | Confirmación del evento de doble recombinación homóloga en el mutante SF39a-crc. (A) PCR (B) Southern-blot. (C) Representación esquemática de los productos de amplificación (\longleftrightarrow) y las bandas de hibridación ($\bullet\text{---}\bullet$) esperadas en la cepa salvaje, en las colonias dobles recombinantes y en las colonias simples recombinantes en el análisis por PCR (cebadores Frag1CrcFw y Frag2CrcRv) y Southern-blot (enzima *Bam*HI y sonda para el Frag1), respectivamente. Wt: cepa salvaje SF39a. DR: clon doble recombinantes. SR: clon simple recombinante.

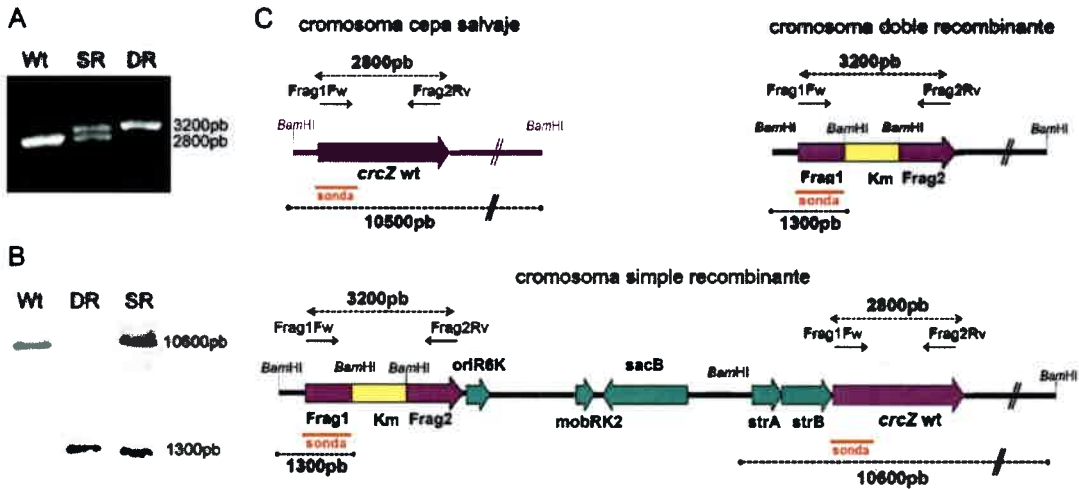


Figura V-8 | Confirmación del evento de doble recombinación homóloga en el mutante SF39a-*crcZ*. (A) PCR (B) Southern-blot. (C) Representación esquemática de los productos de amplificación (\longleftrightarrow) y las bandas de hibridación ($\bullet\text{---}\bullet$) esperadas en la cepa salvaje, en las colonias dobles recombinantes y en las colonias simples recombinantes en el análisis por PCR (cebadores Frag1CrcZfw y Frag2CrcZRv) y Southern-blot (enzima *Bam*HI y sonda para el Frag1). Wt: cepa salvaje SF39a. DR: clon doble recombinantes. SR: clon simple recombinante.

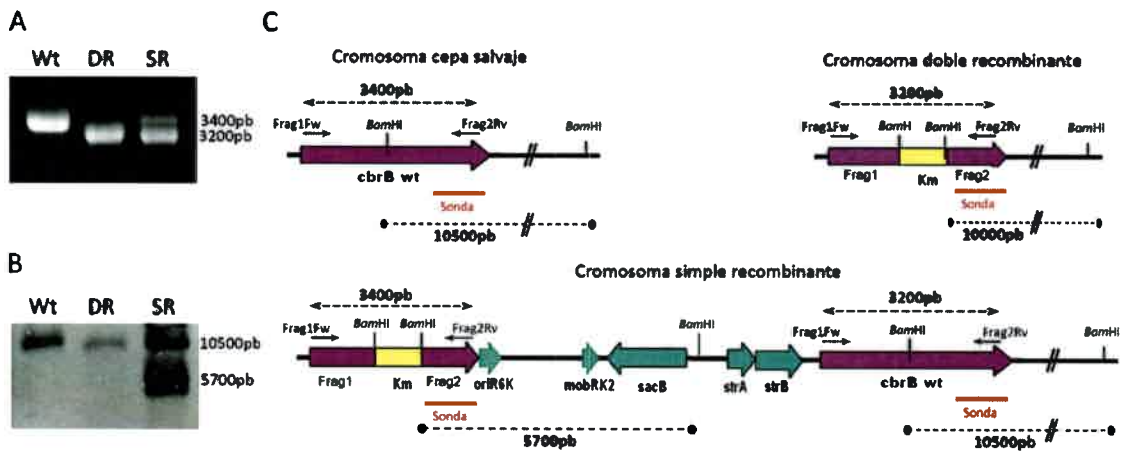


Figura V-9 | Confirmación del evento de doble recombinación homóloga en el mutante SF39a-*cbrB*. (A) PCR (B) Southern-blot. (C) Representación esquemática de los productos de amplificación (\longleftrightarrow) y las bandas de hibridación ($\bullet\text{---}\bullet$) esperadas en la cepa salvaje, en las colonias dobles recombinantes y en las colonias simples recombinantes en el análisis por PCR (cebadores Frag1CbrBFw y Frag2CbrBRv) y Southern-blot (enzima *Bam*HI y sonda para el Frag2), respectivamente. Wt: cepa salvaje SF39a. DR: clon doble recombinantes. SR: clon simple recombinante.

La capacidad de los mutantes obtenidos de producir bacteriocinas fue analizada y comparada con la cepa salvaje. Como se puede observar en la figura V-10 los mutantes SF39a-cbrB y SF39a-crcZ, al igual que el mutante SF39a-375 (*cbrA*⁻), mostraron un aumento en la producción de bacteriocina con respecto a la cepa salvaje. Por el contrario, el mutante SF39a-crc presentó una disminución en el halo de inhibición comparado con la cepa salvaje. Los fenotipos observados concuerdan con el modelo planteado para el sistema CbrA/Crc (figura V-6), donde, el sensor CbrA activa al regulador CbrB y éste, la transcripción del gen *crcZ*; mientras que este último, contrarresta la función de Crc. Por tal motivo se observa el mismo fenotipo en los mutantes SF39a-375, SF39a-cbrB y SF39a-crcZ y el fenotipo opuesto en el mutante SF39a-crc (figura V-10). Sin embargo, hay que tener en cuenta que si la proteína Crc reprime los ARNm de bacteriocinas, una mutación en el gen *crc* debería producir un aumento en la síntesis de bacteriocina y no una disminución como se observa en la figura IV-10E. Por lo tanto, los resultados sugieren un control de la expresión de bacteriocinas por el sistema CbrA-Crc; pero, no a través de la represión traduccional directa de los ARNm de bacteriocinas; sino, probablemente, mediante una modulación indirecta.

En contraste al rol bien conocido de Crc como represor traduccional, algunos autores también informaron que algunos procesos (formación de biofilm, movilidad y sistema de secreción tipo tres) son reprimidas en **ausencia** de *crc* (figura V-6). O'Toole et al. [13] observaron que un mutante *crc*⁻ de *P. aeruginosa* era menos móvil y defectivo en su capacidad de formar biofilm con respecto a la cepa salvaje. Además, dicho mutante presentó una marcada disminución en la expresión del gen estructural de la subunidad mayor del pili tipo IV, el cual, se conoce que está implicado en la movilidad por twitching y en la formación de biofilm. Por otro lado, Linares et al. [11] informaron que la producción de las proteínas del aparato de secreción tipo tres (PscN, PopD and PcrV) fue más baja en un mutante *crc*⁻ de *P. aeruginosa* PAO1 y que dicho mutante fue menos móvil y citotóxico que la cepa salvaje. Estos investigadores sugirieron que la influencia de Crc sobre tales procesos sería indirecta debido al reajuste metabólico que Crc impone sobre el metabolismo de *P. aeruginosa*. Por lo tanto, Crc además de regular la traducción de los ARNm que codifican las enzimas y transportadores implicados en el metabolismo bacteriano, controlaría reguladores transcripcionales adicionales que a su vez controlan la expresión de otros genes [11]. Finalmente, Dong et al. [28] reafirmaron la hipótesis del que Crc ejerce un impacto positivo e indirecto sobre el sistema de secreción tipo

tres (T3SS) en *P. aeruginosa* y demostraron que la función reguladora de Crc sobre el T3SS es mediada a través del principal regulador del T3SS ExsA y de otros reguladores asociados al T3SS. Estos investigadores plantearon que Crc ejerce un control multifacético sobre T3SS a través de diversas vías, las cuales, puede servir para ajustar este mecanismo de virulencia en respuesta a los cambios ambientales y nutricionales. Teniendo en cuenta estos antecedentes, el efecto del sistema CbrA/Crc sobre la producción de bacteriocinas en la cepa SF39a podría ser parte de la reprogramación metabólica que se genera en la bacteria cuando el sistema CbrA/Crc es activado.

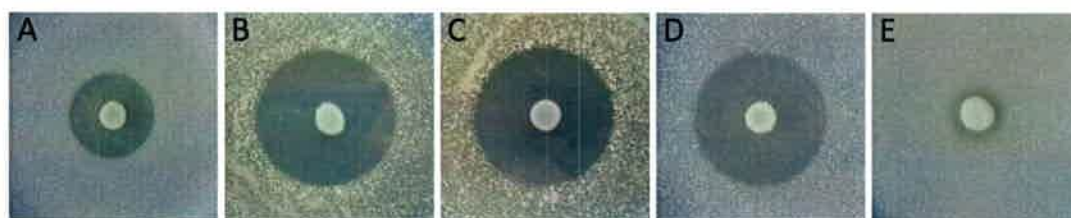


Figura V-10 | **Producción de bacteriocinas analizada mediante el método de la gota.** (A) *P. fluorescens* SF39a, (B) *P. fluorescens* SF39a-375, (C) *P. fluorescens* SF39a-cbrB, (D) *P. fluorescens* SF39a-crcZ, (E) *P. fluorescens* SF39a-crc.

Como se mencionó en la sección introducción de este capítulo, los ARNm reprimidos por la proteína Crc contienen motivos ricos en adenina (cajas CA) que son reconocidos por la chaperona Hfq, la cual, facilita la represión traduccional dependiente de Crc [6]. Los efectos directos de Crc/Hfq sobre la traducción de los ARNm diana involucran al menos un motivo CA (AAnAAAnAA) en la región -50 a +50 relativa al sitio de inicio de la traducción (AUG en el ARNm/ATG en el ADN) [10] y, por lo tanto, la identificación de estos motivos es un indicio para diferenciar entre efectos directos e indirectos de Crc/Hfq [29,30]. Ningún motivo CA fue identificado corriente arriba o abajo del codón de inicio de la traducción del gen de la pirocina S de la cepa SF39a, lo que apoya la hipótesis de la modulación indirecta de CbrA/Crc sobre la producción de bacteriocinas. Sorprendentemente, un motivo CA fue identificado en la posición +8 a +21 relativo al ATG de inicio del gen *recA* de la cepa SF39a. El motivo identificado tiene la secuencia ACAACAAGAAGAAA y podría ser un sitio de unión a la chaperona Hfq. Resultados similares fueron observados por Browne et al. [29], quienes identificaron, mediante un análisis computacional, posibles blancos directos de Crc/Hfq en 17 genomas de

Pseudomonas spp. (incluidas cepas de *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. fluorescens*) y, el gen *recA* fue identificado entre estos blancos directos. Es bien conocido que en *P. aeruginosa* y *E. coli* el gen *recA* está implicado en la regulación de bacteriocinas mediante la respuesta SOS [31,32]. Por otro lado, Dong et al. [28] observaron que un mutante *crc*⁻ de *P. aeruginosa* presentaba un aumento en la expresión del gen *prtR*. Este gen codifica para el represor PrtR de los genes de las piocinas de *P. aeruginosa* [31]. Por lo tanto, el efecto indirecto del sistema CbrA/Crc sobre la producción de bacteriocinas puede ser a través de otros reguladores, como, la proteína RecA y el represor PrtR.

V.3.6. Colonización de la cepa SF39a y los mutantes SF39a-375, SF39a-cbrB, SF39a-crcZ y SF39a-crc en la rizósfera de trigo

Para evaluar la capacidad de los mutantes SF39a-375, SF39a-cbrB, SF39a-crcZ y SF39a-crc de colonizar la rizósfera se realizó un ensayo de competencia, en donde, cada cepa fue inoculada individualmente en plantas de trigo. Para este experimento se utilizó suelo no estéril lo que permitió analizar la capacidad de cada cepa para competir con la flora nativa de dicho suelo. En la tabla V-3 se muestra el análisis de las características del suelo usado en el ensayo.

En primera instancia, las cepas a inocular fueron marcadas con rifampicina para poder rastrearlas y distinguirlas de aquellas indígenas del suelo. Para esto, se generaron mutantes espontáneos resistentes a rifampicina derivados de la cepa salvaje SF39a y las cepas mutantes SF39a-375, SF39a-cbrB, SF39a-crcZ y SF39a-crc y, fueron denominados SF39aR, SF39a-375R, SF39a-cbrBR, SF39a-crcZR y SF39a-crcR, respectivamente. En la tabla V-4 se puede observar que la viabilidad de cada una de las cepas marcadas en medio mínimo no presenta diferencia comparada con su correspondiente cepa parental indicando que el crecimiento de las cepas marcadas no se encuentra afectado y, por lo tanto, pueden ser utilizadas para el ensayo de inoculación en plantas.

Tabla V-3: Características del suelo utilizado para el ensayo de competencia

Característica	Valor
pH	6,89
Nitrógeno-NO ₃	13,0 ppm
Fósforo	11,7 ppm
Azufre-SO ₄	8,9 ppm
Materia orgánica	2,14%

Tabla V-4: Viabilidad de los mutantes espontáneos resistentes a rifampicina y sus correspondientes cepas salvajes

Cepa	Log ₁₀ del número de células viables a DO ₆₀₀ = 0.65
<i>P. fluorescens</i> SF39a	9,04±0,16
<i>P. fluorescens</i> SF39aR	9,08±0,12
<i>P. fluorescens</i> SF39a-375	9,02±0,11
<i>P. fluorescens</i> SF39a-375 R	9,1±0,19
<i>P. fluorescens</i> SF39a-cbrB	9,11±0,04
<i>P. fluorescens</i> SF39a-cbrBR	9,24±0,07
<i>P. fluorescens</i> SF39a-crcZ	9,18±0,06
<i>P. fluorescens</i> SF39a-crcZR	9,16±0,05
<i>P. fluorescens</i> SF39a-crc	8,93±0,24
<i>P. fluorescens</i> SF39a-crcR	9,1±0,04

Los valores obtenidos para cada cepa resistente a rifampicina y su correspondiente cepa parental fueron analizados estadísticamente mediante T-test ($p < 0,05$), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas.

Las plantas fueron cosechadas tres semanas después de la inoculación y el recuento de células viables fue determinado en el suelo rizosférico. La población recuperada de la rizósfera de trigo para todos los mutantes fue menor que la población recuperada de la cepa salvaje SF39a. La mayor diferencia se observó en el mutante SF39a-crcZ; para el cual, el número de células viables en la rizósfera ($1,09 \cdot 10^5$ ufc \cdot g soil⁻¹) fue aproximadamente 30 veces menos que para la cepa de tipo salvaje ($3,22 \cdot 10^6$ ufc \cdot g soil⁻¹). En el caso del mutante SF39a-cbrB la población recuperada de la rizósfera fue $9,61 \cdot 10^5$ ufc \cdot g soil⁻¹, aproximadamente 3 veces menos que la

población de la cepa salvaje. Los mutantes SF39a-cbrA y SF39a-crc fueron los menos afectados. (figura V-11).

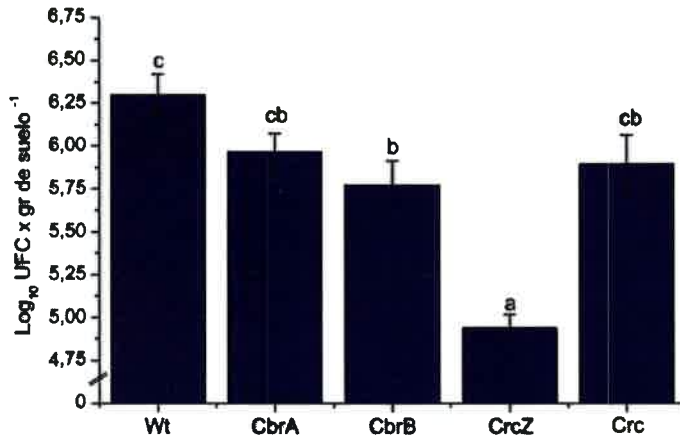


Figura V-11 | Colonización de la rizósfera de trigo por *P. fluorescens* SF39a y los mutantes en el sistema CbrA/Crc. Las barras representan la media del Log₁₀ UFC · gr de suelo⁻¹ ± SE de 3 experimentos con un n=5. Los datos fueron analizados mediante el test de ANOVA y el test a posteriori de Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05). Wt: SF39a, CbrA: SF39a-375, CbrB: SF39a-cbrB, CrcZ: SF39a-crcZ y Crc: SF39a-crc.

Por otro lado, durante los ensayos de competencia algunas de las diluciones del suelo rizosférico fueron sembradas en placas sin la adición de dicloran (inhibidor de hongos). Se observó que el suelo rizosférico proveniente de plantas inoculadas con la cepa salvaje presentaba una marcada disminución en el desarrollo de hongos, con respecto a las plantas control sin inocular. Mientras que, a partir del suelo rizosférico de plantas inoculadas con las cepas mutantes se pudieron aislar un gran número y variedad de hongos (figura V-12). Probablemente, la cepa SF39a es capaz de inhibir a los hongos presentes en el suelo mediante la producción de compuestos antifúngicos y/o la competencia por el espacio, características que podrían encontrarse afectadas en los mutantes.

Los resultados obtenidos en el ensayo de competencia indican que el sistema CbrA/Crc desempeña un rol relevante durante el establecimiento y desarrollo de la cepa PGPR SF39a en la rizósfera. Varios investigadores informaron que la vía de transducción de señales CbrA/Crc influye en el comportamiento de la bacteria en su medio ambiente. Por ejemplo, Sonnleitner et al. [10] surgieron que el sistema CbrA/Crc actuaría como un importante regulador durante las infecciones crónicas de *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística. Linares et al. [11] realizaron un ensayo de virulencia utilizando como modelo la ameba *Dictyostelium discoideum* y observaron que un mutante *crc*⁻ de *P. aeruginosa* fue menos virulento que la cepa salvaje.

Resultados similares fueron observados en un mutante *cbrA* de *P. aeruginosa* utilizando ratones como modelo de infección [33]. Por otro lado, ha sido demostrado que CbrA controla la simbiosis de *Sinorhizobium meliloti* en plantas de alfalfa modulando una compleja red regulatoria que le permite a la bacteria competir eficazmente y colonizar el nódulo [34–38]. Gibson et al. [34] observaron que plantas de alfalfa inoculadas con un mutante *cbrA* de *S. meliloti* eran significativamente más pequeñas que las plantas inoculadas con el tipo salvaje y, presentaban nódulos chicos y blancos en comparación con los nódulos alargados y rosados de la cepa salvaje. Además, en experimentos de competencia, coinoculando la cepa salvaje con el mutante en una proporción 1:1, solo se recuperaron bacterias de tipo salvaje de los nódulos de alfalfa.

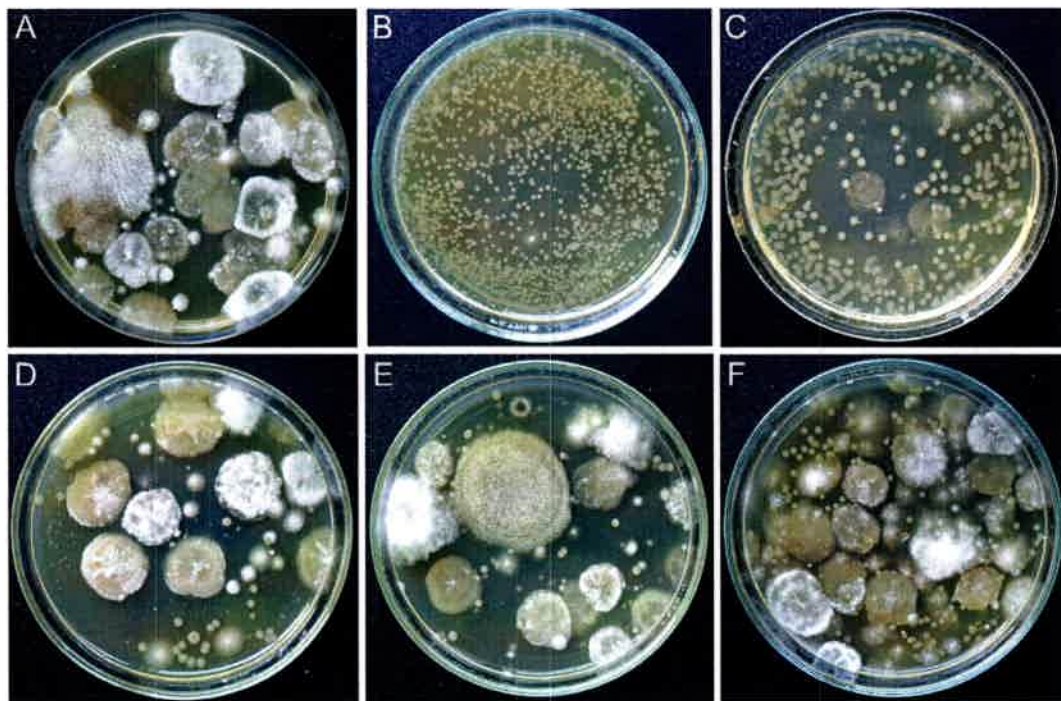


Figura V-12 | Hongos aislados del suelo rizosférico. (A) Plantas control sin inocular. (B) plantas inoculadas con la cepa salvaje SF39a. (C) plantas inoculadas con SF39a-375. (D) plantas inoculadas con SF39a-cbrB. (E) plantas inoculadas con SF39a-crcZ. (F) plantas inoculadas con SF39a-crc. Además del desarrollo de hongos se puede observar el crecimiento de la cepa bacteriana inoculada en cada caso.

V.4. CONCLUSIONES

- El sistema CbrA/Crc controla la producción de bacteriocinas en *P. fluorescens* SF39a; posiblemente, mediante una modulación indirecta a través de otras vías regulatorias y, como parte del reajuste metabólico que genera el sistema CbrA/Crc en respuesta a los cambios ambientales.
- La vía de transducción de señales CbrA/Crc controlaría una red de procesos requeridos para un establecimiento exitoso de la bacteria en el medio ambiente. Esta presunción se obtiene a partir de la menor capacidad competitiva en la rizósfera de trigo exhibida por los mutantes *cbrA*, *cbrB*, *crcZ* y *crc* en relación a la cepa salvaje SF39a.

V.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Valentini M, García-Mauriño SM, Pérez-Martínez I, Santero E, Canosa I, Lapouge K. Hierarchical management of carbon sources is regulated similarly by the CbrA/B systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Microbiology* 2014;160:2243–52. doi:10.1099/mic.0.078873-0.
- [2] Nishijyo T, Haas D, Itoh Y. The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 2001;40:917–31. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02435.x.
- [3] Li W, Lu CD. Regulation of carbon and nitrogen utilization by CbrAB and NtrBC two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2007;189:5413–20. doi:10.1128/JB.00432-07.
- [4] Zhang XX, Rainey PB. Dual involvement of CbrAB and NtrBC in the regulation of histidine utilization in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Genetics* 2008;178:185–95. doi:10.1534/genetics.107.081984.
- [5] Amador CI, Canosa I, Govantes F, Santero E. Lack of CbrB in *Pseudomonas putida* affects not only amino acids metabolism but also different stress responses and biofilm development. *Environ Microbiol* 2010;12:1748–61. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02254.x.
- [6] La Rosa R, Nogales J, Rojo F. The Crc/CrcZ-CrcY global regulatory system helps the integration of gluconeogenic and glycolytic metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* 2015;9:3362–78. doi:10.1111/1462-2920.12812.
- [7] Sonnleitner E, Haas D. Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;91:63–79. doi:10.1007/s00253-011-3332-1.
- [8] Sonnleitner E, Abdou L, Haas D. Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:21866–71. doi:10.1073/pnas.pnas.0910308106.
- [9] Sonnleitner E, Romeo A, Bläsi U. Small regulatory RNAs in *Pseudomonas aeruginosa*. *RNA Biol* 2012;9:364–71. doi:10.4161/rna.19231.
- [10] Sonnleitner E, Valentini M, Wenner N, Haichar FEZ, Haas D, Lapouge K. Novel targets of the CbrAB/Crc carbon catabolite control system revealed by transcript abundance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 2012;7:e44637. doi:10.1371/journal.pone.0044637.
- [11] Linares JF, Moreno R, Fajardo A, Martínez-Solano L, Escalante R, Rojo F, et al. The global regulator Crc modulates metabolism, susceptibility to antibiotics and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 2010;12:3196–212. doi:10.1111/j.1462-

2920.2010.02292.x.

- [12] Yeung ATY, Bains M, Hancock REW. The sensor kinase CbrA is a global regulator that modulates metabolism, virulence, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2011;193:918–31. doi:10.1128/JB.00911-10.
- [13] O'Toole G, Gibbs KA, Hager PW, Paul V, Phibbs JR, Kolter R, et al. The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal Transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2000;182:425–31. doi:10.1128/JB.182.2.425-431.2000.
- [14] Fischer SE, Fischer SI, Magris S, Mori GB. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. *World J Microbiol Biotechnol* 2007;23:895–903. doi:10.1007/s11274-006-9312-4.
- [15] Latour X, Corberand T, Laguerre G, Allard F, Lemanceau P. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:2449–56.
- [16] Herrero M, De Lorenzo V, Timmis KN. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1990;172:6557–67.
- [17] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983;166:557–80. doi:10.1016/S0022-2836(83)80284-8.
- [18] Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 1995;166:175–6. doi:10.1016/0378-1119(95)00584-1.
- [19] Kaniga K, Delor I, Cornelis GR. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 1991;109:137–41. doi:10.1016/0378-1119(91)90599-7.
- [20] Dennis JJ, Zylstra GJ. Improved antibiotic-resistance cassettes through restriction site elimination using Pfu DNA polymerase PCR. *Biotechniques* 1998;25:772–4. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [21] Validov S, Mavrodi O, De La Fuente L, Boronin A, Weller D, Thomashow L, et al. Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol Lett* 2005;242:249–56. doi:10.1016/j.femsle.2004.11.013.
- [22] Abdou L, Chou HT, Haas D, Lu CD. Promoter recognition and activation by the global response regulator CbrB in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2011;193:2784–92. doi:10.1128/JB.00164-11.

- [23] Moreno R, Fonseca P, Rojo F. Two small RNAs, CrcY and CrcZ, act in concert to sequester the Crc global regulator in *Pseudomonas putida*, modulating catabolite repression. *Mol Microbiol* 2012;83:24–40. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07912.x.
- [24] Barrios H, Valderrama B, Morett E. Compilation and analysis of sigma(54)-dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 1999;27:4305–13. doi:gkc653 [pii].
- [25] Sonnleitner E, Bläsi U. Regulation of Hfq by the RNA CrcZ in *Pseudomonas aeruginosa* Carbon Catabolite Repression. *PLoS Genet* 2014;10:e1004440. doi:10.1371/journal.pgen.1004440.
- [26] Filiatrault MJ, Stodghill P V, Wilson J, Butcher BG, Chen H, Myers CR, et al. CrcZ and CrcX regulate carbon source utilization in *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strain DC3000. *RNA Biol* 2013;10:245–55. doi:10.4161/rna.23019.
- [27] Martínez JL, Rojo F. Metabolic regulation of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35:768–89. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00282.x.
- [28] Dong YH, Zhang XF, Zhang LH. The global regulator Crc plays a multifaceted role in modulation of type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Open* 2013;2:161–72. doi:10.1002/mbo3.54.
- [29] Browne P, Barret M, O’Gara F, Morrissey JP. Computational prediction of the Crc regulon identifies genus-wide and species-specific targets of catabolite repression control in *Pseudomonas* bacteria. *BMC Microbiol* 2010;10:300. doi:10.1186/1471-2180-10-300.
- [30] Moreno R, Marzi S, Romby P, Rojo F. The Crc global regulator binds to an unpaired A-rich motif at the *Pseudomonas putida* alkS mRNA coding sequence and inhibits translation initiation. *Nucleic Acids Res* 2009;37:7678–90. doi:10.1093/nar/gkp825.
- [31] Michel-Briand Y, Baysse C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 2002;84:499–510. doi:10.1016/S0300-9084(02)01422-0.
- [32] Cascales E, Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Llobès R, Postle K, et al. Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007;71:158–229. doi:10.1128/MMBR.00036-06.
- [33] Yeung ATY, Janot L, Pena OM, Neidig A, Kukavica-Ibrulj I, Hilchie A, et al. Requirement of the *Pseudomonas aeruginosa* CbrA sensor kinase for full virulence in a murine acute lung infection model. *Infect Immun* 2014;82:1256–67. doi:10.1128/IAI.01527-13.
- [34] Gibson KE, Campbell GR, Lloret J, Walker GC. CbrA is a stationary-phase regulator of cell surface physiology and legume symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 2006;188:4508–21. doi:10.1128/JB.01923-05.
- [35] Gibson KE, Barnett MJ, Toman CJ, Long SR, Walker GC. The symbiosis regulator CbrA modulates a complex regulatory network affecting the flagellar apparatus and cell envelope proteins. *J Bacteriol* 2007;189:3591–602. doi:10.1128/JB.01834-06.

- [36] Pini F, Frage B, Ferri L, De Nisco NJ, Saswat S, Taddei L, et al. The DivJ, CbrA and PleC system controls DivK phosphorylation and symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Microbiol* 2013;90:54–71. doi:10.1111/mmi.12347.The.
- [37] Schallies KB, Sadowski C, Meng J, Chien P, Gibson E. *Sinorhizobium meliloti* CtrA stability is regulated in a CbrA- dependent manner that is influenced by CpdR1 2015;197:2139–49. doi:10.1128/JB.02593-14.
- [38] Sadowsk CS, Wilson D, Schallies KB, Walker G, Gibson KE. The *Sinorhizobium meliloti* sensor histidine kinase CbrA contributes to free-living cell cycle regulation. *Microbiology* 2013;159:1552–63. doi:10.1099/mic.0.067504-0.

CAPITULO VI -
Conclusiones finales

VI

VI. CONCLUSIONES FINALES

- La PGPR *P. fluorescens* SF39a produce una piocina tipo S, sensible a proteasas y al calor. Esta bacteriocina está codificada por el gen *pys*. Corriente abajo de dicho gen se localiza el gen *imm* que codifica para la posible proteína inmunitaria de la bacteriocina. La piocina predicha presenta un tamaño de 6,8 kDa, un dominio DNasa en el extremo C-terminal y un dominio de translocación en la región central de la proteína. Los hallazgos sugirieren que esta bacteriocina se translocaría al interior de las células sensibles, para luego llevar a cabo la degradación de ADN como mecanismo de acción.
- Una deficiencia en el gen *ptsP* afecta negativamente la producción de bacteriocinas en la cepa SF39a indicando que el sistema regulatorio PTS^{Ntr} está involucrado en la expresión de estos compuestos antimicrobianos. La inactivación del gen *ptsP* también afecta la producción de pioverdina, la movilidad, la formación de biofilm y la producción de proteasas. Estos cambios fenotípicos impactan de manera significativa en el comportamiento de la bacteria en la rizósfera de trigo.
- El sistema regulatorio CbrA/Crc controla la producción de bacteriocinas en *P. fluorescens* SF39a. Proponemos, que la vía de transducción de señales CbrA/Crc modula indirectamente la producción de bacteriocinas como parte de la reprogramación metabólica que genera la respuesta mediada por dicha vía de señalización. Por otro lado, el sistema CbrA/Crc se requiere para el establecimiento exitoso de la PGPR *P. fluorescens* SF39a en la rizósfera de trigo, posiblemente, debido a las múltiples funciones que se le atribuyen a este sistema regulatorio global.
- La producción de bacteriocinas en la cepa SF39a fue inducida en presencia de mitomicina C, indicando que la respuesta SOS está involucrada en su expresión. El rol de la respuesta SOS en la producción de bacteriocinas fue previamente demostrado en bacterias Gram-negativas; pero, la participación de los sistemas regulatorios PTS^{Ntr} y CbrA/Crc en la regulación de estos compuestos antimicrobianos no ha sido informado

en ningún género bacteriano, resultando, en un importante aporte acerca de mecanismos de regulación aún no descritos en la producción de bacteriocinas.

- La caracterización de bacteriocinas en PGPRs y el entendimiento de sus mecanismos regulatorios contribuyen al desarrollo de productos biotecnológicos, a base de bacteriocinas o cepas bacteriocinogénicas, para el manejo sustentable de enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas. Además, es crucial entender cómo las PGPRs compiten con la población rizosférica indígena, y contribuir así, a la selección de cepas de *Pseudomonas* que sirvan de base para el desarrollo de bioinoculantes.

75118

34