



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Análisis de las señales de percepción del quórum producidas por *Sinorhizobium fredii* NGR234”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Ing. Ivana Daisy Blancas Nava

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Miguel Ángel Carlos Cevallos Gaos
[Centro de Ciencias Genómicas, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marcela Ayala Aceves
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dra. Katy Juárez López
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Ciudad de México. Agosto, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó dentro del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la tutoría del Dr. Miguel Ángel Carlos Cevallos Gaos, en el programa de Genómica Evolutiva del Centro de Ciencias Genómicas (CCG-UNAM).

Durante la realización de este trabajo recibí una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT) con el número 957535. El financiamiento para el proyecto fue otorgado por CONACyT con el número 000000000253070.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco a mi tutor el Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos por todo el apoyo y dirección para la realización de esta tesis. Así mismo a mi comité tutorial formado por la Dra. Marcela Ayala Aceves y la Dra. Katy Juárez López, por todas las observaciones y sugerencias realizadas a lo largo del proyecto que resultaron en hacer de esta una mejor tesis.

A laboratorio de Ecología Genómica del CCG por permitirme utilizar equipos de su laboratorio para algunos experimentos reportados en este trabajo.

A mi estimada compañera y amiga del laboratorio la M. en B. María de los Ángeles Pérez Oseguera, por compartir conmigo sus conocimientos y por el apoyo en términos generales durante mi estancia en el laboratorio de Genómica Evolutiva.

A mis padres Roberto y Juana. A mis hermanas Joselyn y Maressa que siempre estuvieron escuchándome en momentos de incertidumbre sobre todo al pasar toda esta situación mundial.

A mis amigos del IBT, CCG y a mis amigos de la Universidad, quienes me han brindado su cariño incondicional y su compañía en tiempos de esparcimiento.

A Miguel De Paz por acompañarme durante estos años compartiendo nuestros logros, por todo su apoyo y consejos brindados.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
AGRADECIMIENTOS PERSONALES.....	3
ÍNDICE.....	4
RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Sistema de percepción del quórum.....	7
1.2. Sistema de percepción del quórum en bacterias Gram-negativas.....	8
1.1. Componentes centrales del sistema de percepción del quórum.....	13
1.1.1. Elemento o sitio regulador.....	13
1.1.1. Regulador transcripcional.....	14
1.1.2. Molécula señal y AHL sintasas.....	18
1.2. LuxR huérfanos.....	22
1.3. Interacciones simbióticas entre bacterias y plantas: percepción del quórum en rhizobias.....	24
2. ANTECEDENTES.....	27
2.1. Generalidades de <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234.....	27
3. HIPÓTESIS.....	28
4. OBJETIVOS.....	29
4.1. Objetivo general.....	29
4.2. Objetivos particulares.....	29
5. METODOLOGÍA.....	30
5.1. Generación de las cepas mutantes <i>S. fredii</i> NGR234 en los genes <i>ngl</i> , <i>ngrR</i> , <i>tral</i> , <i>traR</i> y doble mutante de <i>ngl/tral</i> por recombinación homóloga.....	30
5.2. Mutantes nulas de los <i>luxR</i> huérfanos.....	32
5.3. Clonación de los genes <i>ngl</i> y <i>tral</i> en el vector de expresión pSRK.....	33

5.4.	Perfil de expresión de AHLs de las cepas mediante cromatografía de capa fina	34
5.5.	Fusiones transcripcionales	34
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	35
6.1.	Identificación de las AHLs producidas por <i>S. fredii</i> NGR234	35
6.2.	Mutantes nulas de <i>S. fredii</i> NGR234 en los genes <i>ngrI</i> , <i>ngrR</i> , <i>tral</i> , <i>traR</i> y perfiles de AHLs en CCF	37
6.3.	Mutantes nulas de LuxR huérfanos y perfiles de AHLs en CCF.....	41
6.4.	Perfiles de AHLs de las sintasas <i>NgrI</i> y <i>Tral</i> en el vector de expresión pSRK y perfil de la doble mutante <i>ngrI::ΩTc/ tral::ΩKm</i>	42
6.5.	Análisis preliminar de la regulación transcripcional de los genes involucrados en los sistemas de la percepción del quórum de <i>S. fredii</i> NGR234.....	49
8.	PERSPECTIVAS.....	53
9.	ABREVIATURAS	54
10.	BIBLIOGRAFÍA	56
11.	ANEXO.....	61

RESUMEN

El sistema de percepción de quórum es uno de los mecanismos bioquímicos de comunicación intercelular entre bacterias, depende de la densidad de población y tiene como objetivo coordinar acciones conjuntas que favorezcan el desarrollo de la población. El mecanismo consiste en la producción y difusión de moléculas señal (autoinductor), a una alta densidad de población la molécula alcanza una concentración crítica. En este punto, un regulador transcripcional las detecta y se encarga de promover la expresión de los genes relacionados a algún proceso como; la producción de bioluminiscencia, conjugación, producción de biopelículas, etcétera (Whitehead, Barnard, Slater, Simpson, & Salmond, 2001). Además, la activación del regulador transcripcional estimula la producción de la molécula señal (autoinducción). Los componentes centrales del sistema de percepción del quórum canónico en bacterias Gram-negativas son las proteínas del tipo LuxI y LuxR y un sitio regulador localizado en la región promotora del gen diana. LuxI es un autoinductor sintasa que produce generalmente una acil homoserín lactona (AHL) y LuxR es un regulador transcripcional. Los genes *luxI* y *luxR* se encuentran generalmente cerca uno del otro, sin embargo, se han encontrado genes *luxR* que no tienen un *luxI* cercano, a los que se les denominó *luxR* huérfanos (Hudaiberdiev et al., 2015). Se ha descubierto que las AHLs también pueden ser producidas por otro tipo de proteínas que no guardan similitud con las proteínas del tipo LuxI; las proteínas del tipo AinS, LuxM y HdtS (González & Marketon, 2003; Laue et al., 2000).

En este proyecto se trabajó con la cepa *Sinorhizobium fredii* NGR234, se sabe que posee dos sistemas canónicos del sistema de regulación del quórum; *ngrR/I* localizado en el cromosoma y *traR/I* localizado en el plásmido simbiótico. No se conoce si existe una jerarquía de regulación entre el sistema del cromosoma y el otro sistema del quórum de la cepa, no se conoce con certeza que señales producen las dos sintasas de la cepa, ni sus regiones promotoras. Además, en este trabajo se encontraron mediante alineamientos de secuencias, que NGR234 posee al menos cinco *luxR* huérfanos de los cuales no se sabe si tienen alguna participación en la regulación. Por lo tanto, el siguiente trabajo se centró en responder los cuestionamientos anteriores mediante la realización de cepas mutantes nulas de cada uno de los genes de los dos sistemas canónicos de percepción del quórum, una doble mutante de las dos sintasas y mutantes de los cinco *luxR* huérfanos encontrados, para realizar un análisis basado en los perfiles AHLs en cromatografía de capa fina (CCF) utilizando una cepa bioreportera. También se realizó la posible identificación de las señales de NGR234 comparándolas con AHLs sintéticas.

Los resultados arrojaron que NGR234 puede producir al menos cuatro AHLs, aunque no se puede identificar con certeza la estructura de las moléculas señal producidas por la cepa mediante la metodología utilizada. Se concluyó que una de ellas puede tener una cadena acilo de 14 o más carbonos, otra posee un tamaño intermedio, la tercera presumiblemente se trata de 3-Oxo-C₈-HSL y, por último, la cepa sintetiza una molécula de menor tamaño. Se descartó que exista una jerarquía regulatoria entre el sistema localizado en el cromosoma y el localizado en el plásmido simbiótico. Los perfiles de AHLs de las mutantes de los *luxR* huérfanos mostró que su papel en la regulación de la síntesis de AHLs es nulo, o limitado. En el perfil de la doble mutante de las dos AHLs sintasa, se observó que aún se produce una AHL, por lo que se buscó mediante alineamientos de secuencias, si la cepa posee alguna de las otras proteínas que no guardan similitud con la proteína del tipo LuxI y se encontró una HdtS con un porcentaje de identidad de 27.89% con la proteína de referencia, la cual aún no se ha comprobado si es capaz de sintetizar AHLs en NGR234.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistema de percepción del quórum

Se denomina sistema de percepción del quórum (quorum sensing system en inglés) a uno de los mecanismos bioquímicos de comunicación intercelular en bacterias. El mecanismo consiste en la producción de moléculas de señalización denominadas autoinductores (AI). A baja densidad de población, estas moléculas se encuentran a un nivel basal, se acumulan y se difunden al medio conforme la densidad de población aumenta, hasta alcanzar una concentración crítica. En este punto, un regulador transcripcional las detecta y promueve la expresión de aquellos genes que poseen sitios de unión para estas proteínas y permiten coordinar una respuesta en toda una población. Asimismo, la activación del regulador o receptor estimula el aumento de la síntesis de la molécula señal (autoinducción) estableciendo un circuito positivo de retroalimentación. Los procesos controlados por la percepción del quórum incluyen la bioluminiscencia, la simbiosis, la virulencia, la producción de biopelículas, la conjugación, la producción de antibióticos, la motilidad, entre muchos otros.

Se ha descrito el sistema de percepción del quórum tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas con algunas diferencias generales; las bacterias Gram-negativas utilizan principalmente moléculas de Acil Homoserín Lactona (AHL) como autoinductores. Estas moléculas generalmente se difunden fácilmente a través de la membrana y son detectadas por un regulador transcripcional, el cual suele ser altamente específico a la AHL. Cuando el regulador transcripcional detecta la molécula de AHL, en ese momento puede activar la transcripción de los genes diana. En contraste, las bacterias Gram-positivas utilizan oligopéptidos lineales o circulares modificados para comunicarse, que no se difunden libremente a través de la membrana, por lo que necesitan de un transportador específico para transducir la señal al exterior. Para esto utilizan un sistema de dos componentes que consiste en un receptor histidina cinasa unido a la membrana y una proteína de regulación transcripcional de unión a ADN denominado regulador de respuesta. La señal producida se transmite por una cascada de fosforilación (Miller & Bassler, 2002).

1.2. Sistema de percepción del quórum en bacterias Gram-negativas

La percepción de quórum se describió por primera vez en 1979 (Nealson & Hastings, 1979). Este mecanismo de comunicación lo descubrieron estudiando la producción de bioluminiscencia en la bacteria marina *Vibrio fischeri* (Waters & Bassler, 2005). En el mar, esta bacteria no alcanza una concentración crítica del autoinductor para que pueda ser detectada por un regulador de respuesta y desencadenar la producción de bioluminiscencia. Sin embargo, esta bacteria es capaz de colonizar al calamar hawaiano *Euprymna scolopes* y pueden vivir en simbiosis. *V. fischeri* debe infectar el órgano bioluminiscente que posee el calamar desde el momento que eclosiona del huevo, de hecho, si esta infección no ocurre pronto, el órgano bioluminiscente (fotóforo) no se desarrolla correctamente. El calamar provee a la bacteria de nutrientes que le permiten su proliferación para así poder alcanzar una alta densidad celular y con ello la producción de luz. De esta forma, el calamar puede camuflarse o enmascarar su sombra y pasar inadvertido a los depredadores.

El grupo de genes encargados de la producción de la luz en *V. fischeri* es el operón *luxICDABE*, que codifica para la luciferasa y las proteínas accesorias que se requieren para su función. Las proteínas involucradas en la regulación de la expresión de la luciferasa son LuxI y LuxR (Mellbye & Schuster, 2014). LuxI es un AHL autoinductor sintasa que produce N-3-oxo-hexanoil homoserín lactona (3-Oxo-C₆-HSL) y LuxR es un receptor citoplasmático del autoinductor y regulador de la transcripción de aquellos genes que poseen sitios en sus regiones promotoras que se llaman *cajas-lux*.

Específicamente, a densidades celulares bajas, el operón *luxICDABE* se transcribe a un nivel basal bajo. Por lo tanto, la concentración del autoinductor es baja y debido a que los genes que codifican la luciferasa se encuentran río abajo del gen *luxI*, no se produce luz (Miller & Bassler, 2002). Conforme la densidad de población bacteriana crece dentro del fotóforo, también se incrementa la concentración del autoinductor que se difunde libremente por la membrana de las células bacterianas, hasta alcanzar una concentración crítica que es suficiente para la detección y unión a la proteína citoplasmática LuxR. El complejo LuxR:3-Oxo-C₆-HSL activa la transcripción del operón

que codifica a la luciferasa, así como de *luxI* lo que resulta en un circuito positivo de retroalimentación (Figura 1).

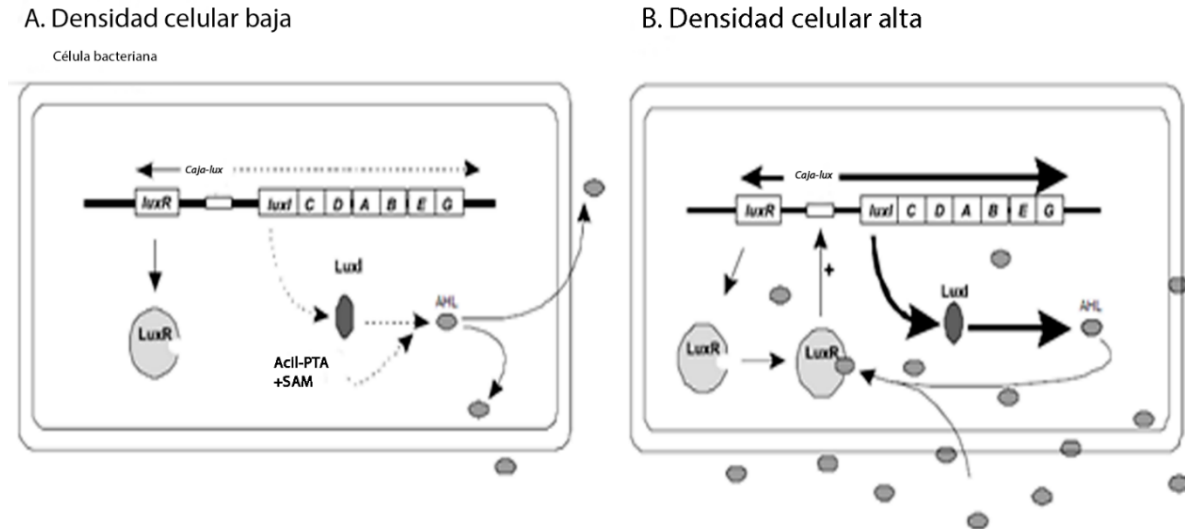


Figura 1. La regulación de la bioluminiscencia en *V. fischeri*. (A) A una densidad celular baja, la transcripción de los genes para bioluminiscencia (*luxICDABEG*) es débil e insuficiente para la emisión de luz debido a los niveles bajos de AHL. (B) A una densidad celular alta, se alcanza una concentración crítica de AHL. AHL se une a LuxR y activa la transcripción de *luxICDABEG*, lo que lleva a una amplificación rápida de la señal AHL y la emisión de luz (Whitehead et al., 2001).

La mayoría de los circuitos de percepción del quórum que se han descrito en las bacterias Gram-negativas se asemejan al de *V. fischeri*. Sin embargo, pueden ser muy diversos, incluso entre cepas de la misma especie, debido a que las bacterias pueden tener más de un sistema de percepción y no siempre tienen los mismos componentes.

Las cepas con más de un sistema de percepción pueden presentar un circuito de regulación dispuesto en paralelo o en serie (Figura 2). En paralelo se presenta cuando la expresión génica se activa o se reprime sólo cuando todas las señales están presentes o ausentes simultáneamente (como sucede en *Vibrio harveyi*) (Waters & Bassler, 2005). Un circuito de regulación en serie ocurre cuando, alguno de los sistemas presenta una mayor jerarquía regulatoria. El sistema de mayor jerarquía tendrá que activarse primero y después activar al o los sistemas de menor jerarquía (como sucede en *Pseudomonas aeruginosa*) (Waters & Bassler, 2005). También puede ocurrir que, los diferentes mecanismos de percepción del quórum en una misma cepa actúen independientemente uno del otro.

Por muchos años se pensó que las únicas moléculas involucradas en la percepción del quórum en las bacterias Gram-negativas eran las AHLs producidas por sintasas del tipo LuxI y los oligopéptidos para las Gram-positivas. Ahora sabemos que el panorama es mucho más complejo. Por ejemplo, en las bacterias como *V. harveyi* y *V. cholerae* se descubrió que pueden utilizar otro tipo de moléculas para comunicarse, las cuales poseen una naturaleza química diferente a las AHLs. *V. harveyi* sintetiza mediante la proteína LuxS (que no comparte homología con las familias LuxI) una molécula señal de furanosil borato diéster (una molécula también conocida como autoinductor del tipo AI-2). En esta misma bacteria se descubrió otra sintasa capaz de producir moléculas de AHLs que tampoco comparte homología con las sintasas del tipo LuxI, la sintasa del tipo LuxM, de la cual se hablará más adelante (sección: 1.1.2 Moléculas señal y AHLs sintasas, Figura 2 y Figura 3) (González & Marketon, 2003).

En *V. harveyi*, una bacteria marina bioluminiscente, Gram-negativa y patógeno de los camarones peneidos asociado a la vibriosis luminosa, utiliza mecanismos de comunicación que recuerdan tanto al sistema de percepción en bacterias Gram-negativas como en Gram-positivas. Al cual, se le denominó sistema de percepción del quórum “híbrido”, debido a que, al igual que *V. fischeri*, *V. harveyi* utiliza una AHL para el control de la expresión de los genes involucrados en la producción de la luz y también utiliza sistemas de dos componentes similares a los sensores de las bacterias Gram-positivas (Figura 2) (Waters & Bassler, 2005).

En la Figura 3 se muestra un resumen comparativo de todo lo mencionado anteriormente sobre los sistemas canónicos de la percepción del quórum en bacterias Gram positivas y negativas, sus moléculas señal y ejemplos de los procesos que regulan en algunas bacterias.

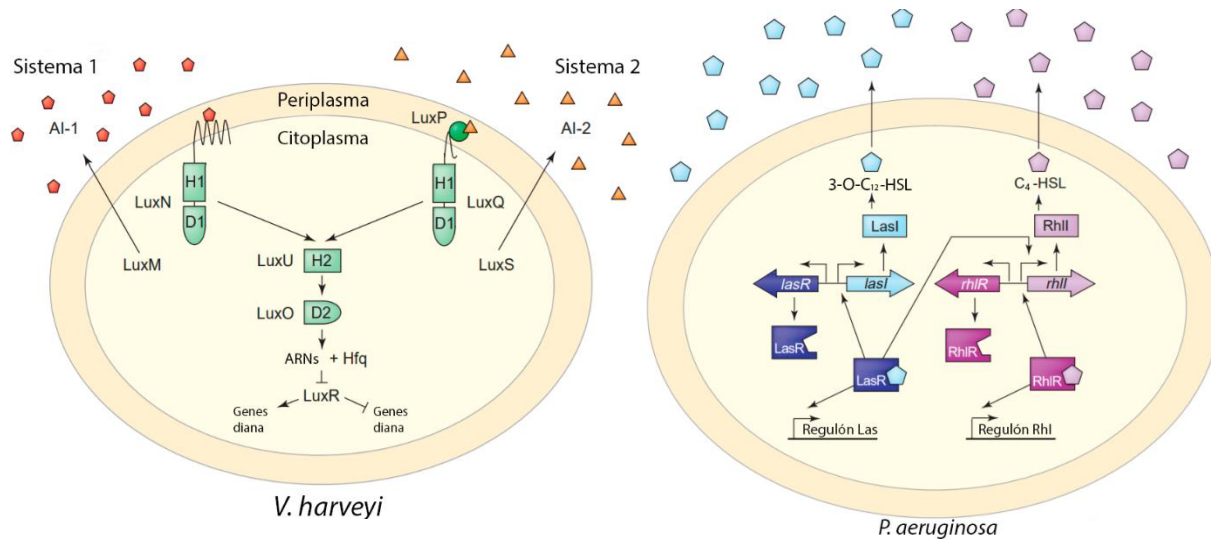


Figura 2. Sistema de percepción del quórum, circuito de regulación en paralelo o en serie. 1). *V. harveyi* posee dos sistemas de percepción del quórum que funcionan en paralelo para regular la expresión génica. Los pentágonos rojos y los triángulos naranjas representan los autoinductores 1 y 2 (AI-1 y AI-2), son detectados por dos sensores distintos histidina cinasa; LuxN y LuxQ, respectivamente. El fosfato fluye en la dirección indicada por las flechas a baja densidad celular (hacia LuxO) y en la dirección opuesta a alta densidad celular. LuxO fosforilado activa la transcripción de múltiples reguladores pequeños de ARN (ARNs) que, junto con la chaperona de ARN “Hfq”, desestabilizan el ARNm de luxR. LuxR es el regulador transcripcional de la cascada de detección de quórum. H y D denotan histidina y aspartato, estos residuos son los sitios de fosforilación. Las alteraciones significativas en la expresión de genes diana controlados por percepción del quórum ocurren solo cuando ambos autoinductores están presentes al mismo tiempo. **2).** El sistema de percepción del quórum de *P. aeruginosa*, utiliza dos sistemas del tipo LuxI/R: LasI/R (azul) y RhlI/R (violeta). LasI produce el autoinductor 3-O-C₁₂-HSL (pentágonos azules) y RhlI produce el autoinductor C₄-HSL (pentágonos violetas). LasR y RhlR se unen a sus autoinductores afines e inducen la expresión génica. Los sistemas controlan conjuntos de genes que se superponen parcialmente. Entre los genes activados por LasI/R se encuentra *rhlI*. Por tanto, los dos sistemas de detección de quórum funcionan secuencialmente o en serie y los genes controlados por LasI/R se inducen antes que los genes activados por RhlI/R. Este circuito podría ser importante para el desarrollo adecuado de biopelículas de *P. aeruginosa* o para activar secuencialmente genes que promueven principios y eventos tardíos en el proceso de infección (Modificado de (Henke & Bassler, 2004).

	Gram-Negativo: LuxR/I	Gram-Positivo: oligopéptidos	Híbrido
Organización del circuito			
Estructuras de los autoinductores		<p>ERGMT</p> <p>CSF/phrC <i>Bacillus subtilis</i></p> <p>ADPITRQWGD*</p> <p>comX <i>B. subtilis</i></p> <p>YSTCDFIM GVNACSSLF</p> <p>INCDFLL YSTCYFIM</p> <p>AIP I-IV <i>Staphylococcus aureus</i></p>	
Procesos regulados	<p><i>P. aeruginosa</i>: Producción de elastasa, producción de ramnolípidos (factores de virulencia).</p> <p><i>A. tumefaciens</i>: Conjugación del plásmido Ti.</p> <p><i>Erwinia carotovora</i>: Producción de exoenzimas (virulencia) y producción de antibióticos.</p> <p><i>V. fischeri</i>: Bioluminiscencia</p> <p><i>Serratia liquefaciens</i>: Producción de pigmentos y producción de antibióticos.</p> <p><i>Sinorhizobium meliloti</i>: Síntesis de exopolisacáridos (simbiosis).</p>	<p><i>B. subtilis</i>: Competencia, Esporulación.</p> <p><i>S. aureus</i>: Virulencia, biopelículas.</p> <p><i>Lactococcus lactis</i>: Producción de nisina.</p> <p><i>Streptococcus pneumoniae</i>: Competencia.</p>	<p><i>V. harveyi</i>: Luminiscencia y secreción tipo III.</p> <p><i>Vibrio cholerae</i>: Virulencia y producción de biopelículas.</p> <p><i>Vibrio anguillarum</i>: Producción de proteasas.</p> <p><i>Photorhabdus luminescens</i>: Producción de antibióticos.</p> <p>**<i>Clostridium perfringens</i>: Producción de toxinas.</p> <p>**<i>Streptococcus pyogenes</i>: Producción de hemolisina</p> <p>**<i>S. typhimurium</i>: Transportador Lsr</p>

Figura 3. Sistemas canónicos de percepción de quórum. Las tres clases generales de los sistemas de percepción canónicos son: Gram-negativos del tipo LuxI/R (columna izquierda), Gram-positivo de oligopéptidos con un sistema de dos componentes (columna central) y un tipo híbrido que tiene características de ambos sistemas (columna derecha). Los pentágonos rojos indican acil homoserín lactonas (AHL o AI-1); las líneas azules onduladas denotan oligopéptidos; los triángulos naranjas denotan los autoinductores del tipo AI-2. Se muestran autoinductores representativos y comportamientos controlados por detección de quórum. Un solo asterisco indica una modificación de isoprenilo. Las especies bacterianas se marcan con un doble asterisco si se desconoce el mecanismo de detección de AI-2. Abreviaturas: HPT, proteína de fosfotransferencia de histidina; P, fosfato; RR, regulador de respuesta; SHK, sensor de histidina cinasa. (Modificada de Henke & Bassler, 2004).

1.1. Componentes centrales del sistema de percepción del quórum

El mecanismo canónico del sistema de percepción del quórum requiere de al menos tres componentes: un regulador transcripcional, una molécula señal difusible (autoinductor) y un elemento o sitio regulador en *cis* localizado en la región promotora del gen diana. Para describir algunas de las características generales de los componentes del quórum, se puede tomar como referencia la estructura cristalográfica de TraR (homólogo de LuxR de *V. fischeri*) de *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria es uno de los patógenos de plantas mejor estudiado, induce la formación de tumores en la corona de muchas plantas dicotiledonias. Este fenómeno se inicia con la transferencia del T-ADN, contenido en el plásmido conjugativo Ti a los núcleos de las células de los huéspedes susceptibles. Una vez que el T-ADN se ha insertado en el ADN genómico de la célula huésped, los genes que ahí se codifican se transcriben. En este grupo de genes se incluyen los que están involucrados en la síntesis de opinas, las cuales son necesarias para el crecimiento de células bacterianas, así como para la síntesis de las fitohormonas que se requieren para el crecimiento del tumor (Vannini et al., 2002).

La transferencia conjugativa del plásmido Ti se regula positivamente por TraR y su ligando autoinductor N-3-oxo-octanoyl-L-homoserín lactona (3-Oxo-C₈-HSL), el complejo unido a su sitio regulador en el ADN activa la expresión de genes *tra* necesarios para la transferencia del plásmido. A continuación, se describe más a fondo cada uno de los componentes de la percepción del quórum en bacterias Gram-negativas.

1.1.1. Elemento o sitio regulador

Los reguladores del tipo LuxR poseen dos regiones altamente conservadas, el dominio de unión a la AHL en el amino terminal y el dominio de unión a ADN en el extremo carboxilo terminal (Gonza, Marketon, & González, 2003). Este último interactúa con el ADN en un sitio específico llamado "*caja-lux*", formada por una repetición invertida 18 a 22 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen diana (Gonzalez & Keshavan, 2006).

La secuencia de ADN específica que reconoce TraR de *A. tumefaciens*, es un dúplex de 18 pb (*caja-tra*). Tiene una simetría perfecta de díada, lo que resulta en una identidad perfecta de las dos mitades de la secuencia.

1.1.1. Regulador transcripcional

En *A. tumefaciens* la estructura cristalográfica de TraR en presencia de 3-Oxo-C₈-HSL revela que la proteína es dimerica [TraR/3-Oxo-C₈-HSL]₂. Cada monómero está compuesto por un dominio N-terminal, el cual une el ligando (3-Oxo-C₈-HSL) en una cavidad cerrada lejos de la región de dimerización, y un dominio C-terminal, que une al ADN a través de un motivo hélice-vuelta-hélice (HVH). La estructura revela un homodímero asimétrico, con un monómero más largo que el otro (Vannini et al., 2002). Como se había mencionado anteriormente, TraR reconoce específicamente secuencias de ADN palindrómico de 18 pares de bases (pb) llamadas *cajas-tra* (o *tra-box* en inglés), una de las cuales está centrada 42 pb río arriba de los promotores divergentes de *traA* y *traC*. También se encuentra otra *caja tra* similar río arriba del promotor de *traI* (Joachimiak et al., 2009). Debido a que TraR posee dos sitios de unión en *A. tumefaciens*, la estructura cristalográfica contiene dos complejos independientes (A:B y C:D). La estructura cristalográfica no mostró diferencias relevantes y las interacciones de cada uno de los dos dímeros con sus sitios de ADN son prácticamente las mismas (Figura 4). Por lo tanto, la descripción de la estructura se centrará únicamente en el complejo [TraR/3-Oxo-C₈-HSL]₂/*caja-tra* formado por el dímero A:B.

En la Figura 5, observamos el complejo [TraR/3-Oxo-C₈-HSL]₂/*caja-tra* formado por el dímero A:B. El monómero B es más alargado que el monómero A, los aminoácidos 163-175 conectan los dos dominios y adoptan dos conformaciones diferentes en el monómero A y B, respectivamente. Como consecuencia, la región N-terminal (aminoácidos 1-32) del monómero A se inserta profundamente entre los dominios de unión al ADN y al ligando, mientras que en el monómero B, la misma región se encuentra externamente.

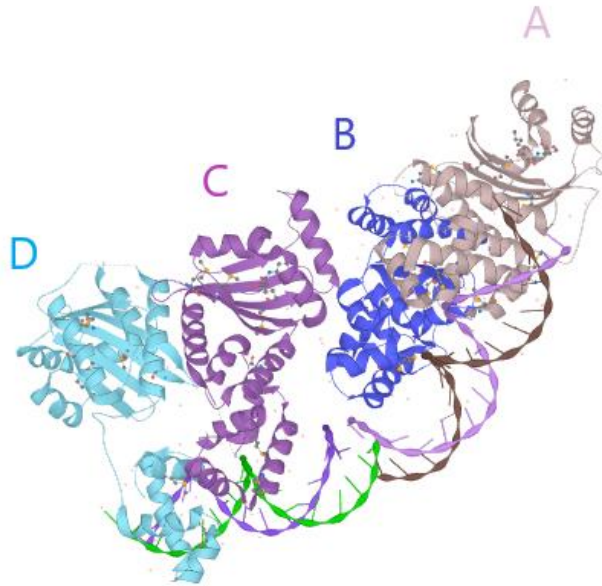


Figura 4. Estructura tridimensional de la proteína TraR unida a su autoinductor y a su ADN objetivo. En *A. tumefaciens* TraR forma dos complejos ternarios [TraR/3-Oxo-C₈-HSL]₂/caja-*tra* cristalográficamente independientes. Un dímero formado por el monómero A y B y otro por el monómero C y D.

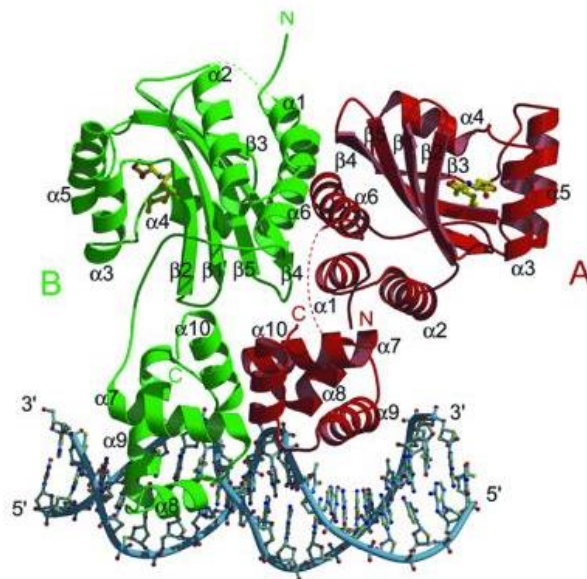


Figura 5. EL complejo ternario [TraR/3-Oxo-C₈-HSL]₂/caja-*tra*. Las dos subunidades, A y B, que forman el homodímero asimétrico se muestran en rojo y verde, respectivamente, α_6 y α_7 en el monómero A, y β_5 y α_6 en el monómero B se muestran como líneas de puntos (Vannini et al., 2002).

Algunas de las características principales del dominio de unión al ligando y el dominio de unión al ADN de TraR en *A. tumefaciens* se describen a continuación.

Dominio de unión al ligando (Figura 6):

- El dominio de unión al ligando se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína, conformado por los aminoácidos 1-162.
- La cavidad donde se une el 3-Oxo-C₈-HSL está formada por un grupo de residuos aromáticos e hidrofóbicos.
- El AI se estabiliza mediante puentes de hidrógeno uno entre Trp 57 y el grupo ceto del anillo, otro entre Asp 70 y el grupo imino, y otro entre Tyr 53 y el grupo 1-ceto.
- Se forma un cuarto puente de hidrógeno entre el grupo 3-ceto de 3-Oxo-C₈-HSL y una molécula de agua que se estabiliza mediante puentes de hidrógeno a Thr 129 y Ala 38. Todos estos residuos están altamente conservados (Joachimiak et al., 2009).
- El resto acilo se estabiliza aún más por interacciones hidrofóbicas con Tyr 53, Leu 40, Tyr 61 y Phe 62.

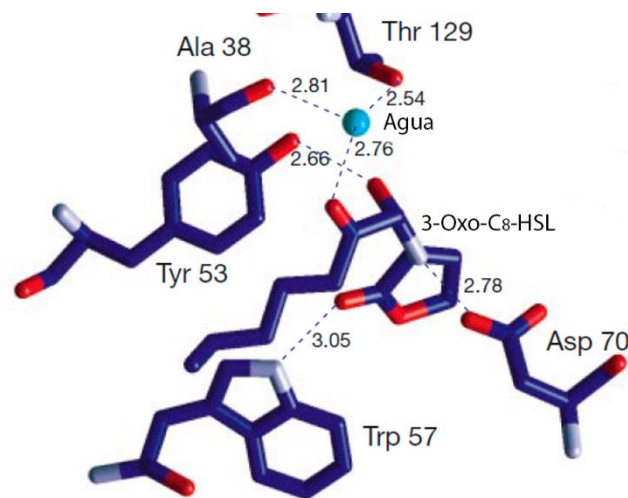


Figura 6. Interacción entre 3-Oxo-C₈-HSL y TraR. La interacción ocurre mediante cuatro puentes de hidrógeno. El puente de hidrógeno entre el grupo 3-ceto y la proteína está mediado por agua. La distancia entre los átomos que interactúan se muestra en Å° (Joachimiak et al., 2009).

Dominio de unión al ADN (Figura 7):

- El dominio de unión al ADN se encuentra en el extremo C-terminal de la proteína (aminoácidos 176–234) y comprende cuatro hélices α .

- La estructura del motivo HVH está soportada por un núcleo de residuos hidrofóbicos, alrededor de los cuales se encuentran las dos hélices HVH, $\alpha 8$ ("andamio") y $\alpha 9$ ("reconocimiento").
- La orientación de la hélice de reconocimiento se estabiliza mediante un puente salino formado entre los residuos conservados Arg 215 y Glu 178.
- TraR establece contactos específicos con el ADN, en seis bases en cada medio sitio de la *caja tra*. Los puentes de hidrógeno que interactúan con el ADN del sitio de unión están formados principalmente por las Arg 206 y Arg 210.
- Se realizan interacciones adicionales de van der Waals entre una timina del sitio de unión a Val 207 y Glu 211.
- Tyr 202 forma un puente de hidrógeno mediado por agua con otra timina del sitio de unión de la cadena complementaria y otro con Arg 206.
- Los residuos Met 191 (grupo imino de la cadena principal), Asn 203, Ser 204, Lys 208 y Lys 221 entran en contacto con el esqueleto del ADN.
- El residuo conservado Gly 188 es parte de la interfaz de dimerización del dominio de unión al ADN.

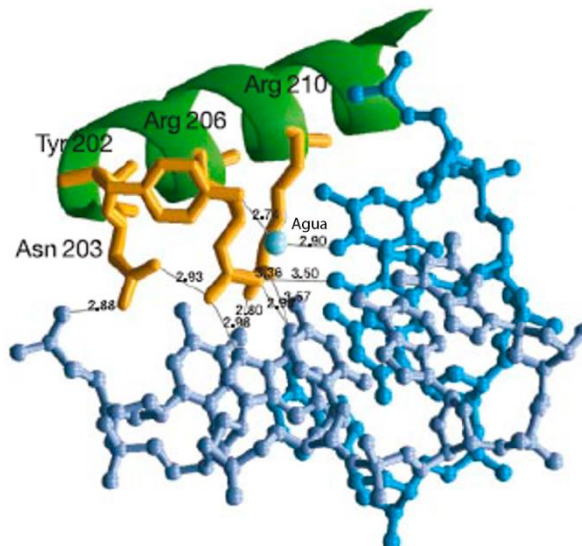


Figura 7. Interacciones específicas de proteína-ácido nucleico entre la hélice de reconocimiento y el ADN de la *caja-tra*. Se muestran las cadenas laterales de Tyr 202, Asn 203, Arg 206 y Arg 210. Una molécula de agua forma un enlace de hidrógeno entre el ADN y Tyr 202. Las distancias se muestran en Å° (Joachimiak et al., 2009).

1.1.2. Molécula señal y AHL sintasas

Las proteínas del tipo LuxI sintetizan las moléculas señal de AHL, una misma LuxI puede producir más de una AHL. Comúnmente, las proteínas LuxR presentan una gran especificidad para unirse a sus respectivas AHLs, por lo cual existe una amplia variedad de moléculas señal en la familia de AHLs producidas por AHL sintasas de distintos organismos. En la Figura 8 se muestra la estructura general de una molécula del tipo AHL. Este grupo de moléculas, se compone de un motivo homoserín lactona y un grupo acilo como cadena lateral que, dependiendo del tipo de molécula señal, varía en longitud, estado de oxidación y nivel de saturación de la cadena de carbonos (Hanzelka & Greenberg, 1996).

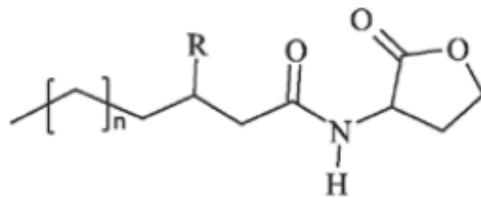
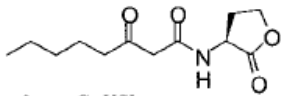
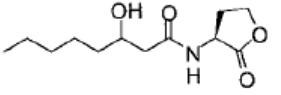
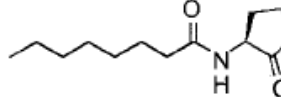
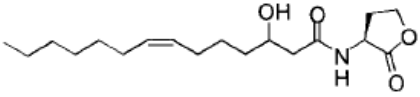
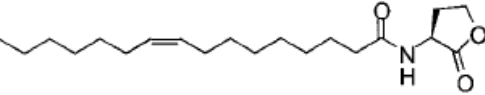


Figura 8. N-acil homoserín lactona (AHL). La estructura general de la principal molécula señal de la percepción del quórum en bacterias Gram-negativas. Todas las AHLs están compuestas por el anillo homoserín lactona y la cadena lateral acilo que varía en longitud, estado de oxidación y presencia de sustituyentes. R - sustituyente en el C₃ en la cadena lateral del acilo, hidrógeno (H), oxígeno (O) o el grupo hidroxilo (OH) en las AHL conocidas (Modificado de Czajkowski & Jafra, 2009).

La anfipatía de la molécula AHL la determina un equilibrio entre la cadena lateral hidrofóbica y el anillo hidrófilo de homoserín lactona, lo que permite que las AHL atraviesen la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular y naveguen por los ambientes acuosos intracelulares y extracelulares. Una de las características que le proporciona especificidad a la señal es que la cadena de acilo varía en longitud, se han identificado cadenas de 4 a 18 carbonos. También se ha observado variabilidad en la tercera posición de carbono de la cadena de acilo, donde puede haber una sustitución de hidrógeno, hidroxilo u oxo (Tabla 1). También se han identificado algunas AHL que tienen cadenas de acilo insaturadas.

La mayoría de los organismos producen más de un tipo de AHL y diferentes organismos pueden producir el mismo AHL, por lo tanto, existe cierta superposición en la producción y reconocimiento de AHL por diferentes organismos (Gonza et al., 2003).

Tabla 1. Características de AHLs (Modificado de Gonza et al., 2003).

Estructura	Organismos representativos
 <p data-bbox="305 577 430 609">3-oxo-C₈-HSL</p>	<p data-bbox="860 493 1333 577"><i>A. tumefaciens</i>, <i>Rhizobium</i> sp. Cepa NGR234, <i>R. leguminosarum</i>, <i>S. meliloti</i>, <i>R. etli</i> CFN42</p>
 <p data-bbox="305 745 430 777">3-OH-C₈-HSL</p>	<p data-bbox="860 651 1333 703"><i>R. leguminosarum</i>, <i>S. meliloti</i>, <i>R. etli</i> CFN42</p>
 <p data-bbox="305 892 365 924">C₈-HSL</p>	<p data-bbox="860 787 1333 819"><i>R. leguminosarum</i>, <i>S. meliloti</i></p>
 <p data-bbox="289 1039 430 1060">3-OH-C_{14:1}-HSL</p>	<p data-bbox="860 934 1333 966"><i>R. leguminosarum</i></p>
 <p data-bbox="305 1176 381 1207">C_{16:1}-HSL</p>	<p data-bbox="860 1071 1333 1102"><i>S. meliloti</i></p>

Como ya se mencionó anteriormente, la síntesis de la molécula señal requiere de proteínas del tipo LuxI. Las LuxI sintasas, catalizan la ligación de S-adenosilmetionina (SAM, un metabolito común en la célula que se usa para una variedad de procesos, muchos de los cuales son esenciales) y la cadena acilo de la proteína transportadora de acilo (acil-PTA), mediante enlaces amida. De dichos sustratos LuxI forma el anillo de homoserín lactona y la cadena acilo, respectivamente, de la AHL resultante. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente las AHL pueden tener cadenas laterales de acilo estructuralmente diferentes y, por lo tanto, deben reconocer diferentes conjugados de acil-PTA (C. Fuqua, Parsek, & Greenberg, 2001).

Los alineamientos de la secuencia de aminoácidos de proteínas de tipo LuxI (de 194 a 226 aminoácidos de longitud) revelan diez aminoácidos completamente conservados (numeración relativa a LuxI de *V. fischeri*: Arg 25, Phe 29, Trp 35, Glu 44, Asp 46, Asp 49, Arg 70, Phe 84, Glu 101, Arg 104). La mayoría de ellos dentro de las mitades amino terminales de las proteínas, mientras que el extremo carboxi es más divergente. Esto sugiere que el extremo C-terminal puede proporcionar el reconocimiento de las diferentes cadenas de acilo en los precursores acil-PTA (Hanzelka, Stevens, Parsek, Crone, & Greenberg, 1997).

Se han encontrado otras AHL sintasas que no guardan similitud con las del tipo LuxI; AinS /LuxM y sintasas del tipo HdtS. Las sintasas del tipo AinS/LuxM descubiertas en *P. fischeri* y *V. harveyi* respectivamente, a pesar de que no comparten similitud con LuxI son capaces de sintetizar AHLs con los mismos sustratos. Además, se ha demostrado que AinS puede catalizar la síntesis de N-octanoil-L-homoserin lactona (C₈-HSL) a partir de SAM y octanoil-PTA u octanoil coenzima A conjugados (octanoil-CoA) (González & Marketon, 2003). Esto contrasta con las proteínas de tipo LuxI, que usan acil-PTA como su principal fuente de cadenas acilo.

Por último, las sintasas de AHLs del tipo HdtS son un grupo de proteínas que no presenta homología con ninguna de las sintasas anteriormente mencionadas y están relacionadas con la familia de aciltransferasas del ácido lisofosfatídico. La primera que se descubrió está en *Pseudomonas fluorescens*, y es capaz de sintetizar tres AHLs (3-OH-C_{14:1}-HSL, C₁₀-HSL y C₆-HSL) (Laue et al., 2000).

Otras sintasas del tipo HdtS similares a la de *P. fluorescens* han sido encontradas en otras bacterias como; *Acidithiobacillus ferrooxidans* donde la sintasa fue nombrada como Act, se encontró que la proteína está envuelta tanto en la actividad de aciltransferasa de ácido lisofosfatídico para la biosíntesis de la membrana celular, así como de la acilación de SAM en la biosíntesis de AHLs (Rivas, Seeger, Jedlicki, & Holmes, 2007).

En *Candidatus Jettenia caeni* se encontraron dos sintasas del mismo tipo; Jqsl-1 y Jqsl-2 (Figura 9). Jqsl-1 y Jqsl-2 sintetizan cuatro moléculas de AHL y encontraron que estas

moléculas influyen en la expresión de HzsA (hidrazina sintasa) para regular la oxidación anaerobia del ion amonio (anammox) (Tang, Guo, Zhu, Tao, & Liu, 2019).

Deinococcus radiodurans posee un sistema canónico del sistema de percepción del quórum Dqsl/DqsR. En 2016 se encontraron dos homólogos de HdtS; Dqsl-1 y Dqsl-2 con un 24 y 18% respectivamente de identidad en la secuencia. Una doble mutante nula de los genes *dqsl-1* y *dqsl-2* en *D. radiodurans*, disminuyó el nivel de AHL en un tercio en comparación con la cepa silvestre (Lin et al., 2016).

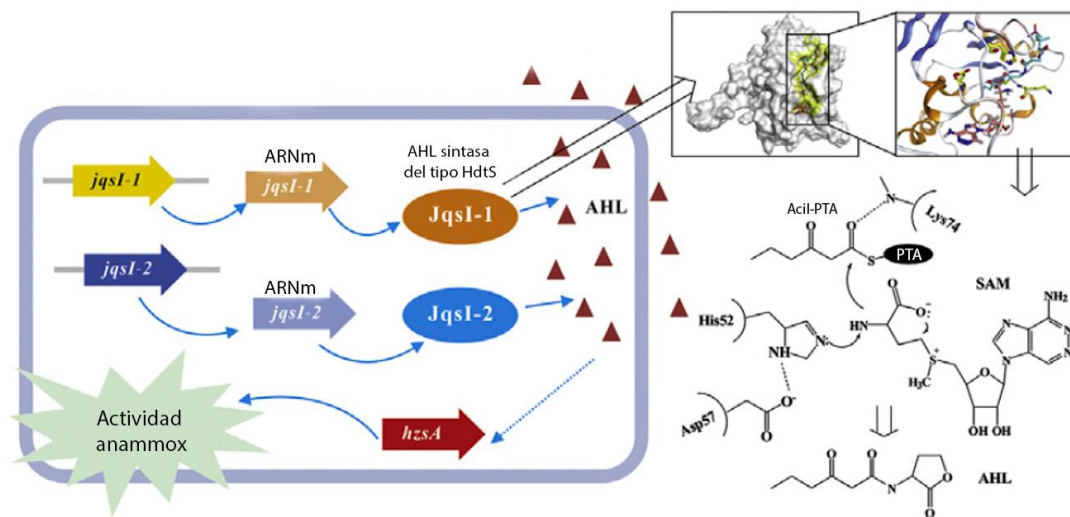


Figura 9. Sintetas del tipo HdtS en *Candidatus Jettenia caeni*. Dos AHL sintetas, Jqs1-1 y Jqs1-2, fueron identificados en *Ca. Jettenia caeni* y sintetizan cuatro tipos de AHLs. Es probable que Jqs1-1 y jqs1-2 influyan en *hzsA* para regular la actividad anammox (Tang et al., 2019).

Las proteínas del tipo HdtS poseen dos motivos; NHQS y PEGTR, que están altamente conservados en aciltransferasas de ácido lisofosfatídico en procariontas y eucariotas (West, 1997). Estos pueden constituir un sitio de unión de acil-CoA o acil-PTA. Aunque se han identificado residuos de aminoácidos fuera de estos motivos que alteran la actividad o especificidad de estas aciltransferasas. Por tanto, es posible que HdtS sea una aciltransferasa que transfiera cadenas de acilo a un sustrato como SAM para generar AHL. Sin embargo, también es posible que HdtS esté involucrado en la síntesis de sustratos necesarios para la formación de AHL a través de otra enzima (Laue et al., 2000).

1.2. LuxR huérfanos

La secuenciación de los genomas bacterianos ha revelado la existencia de muchos homólogos de LuxR y con frecuencia en un exceso significativo en relación al número de sintetas de AHL (Clay Fuqua, 2006). Los genes *luxR* generalmente se encuentran al lado o cerca de un gen *luxI* que codifica a la sintasa de la señal de AHL. Los genes *luxR* que no tienen un *luxI* cercano se les denominó *luxR* huérfanos o *luxR* solos. Los huérfanos se pueden encontrar tanto en cepas que no contienen ningún sistema de percepción de quórum como en cepas que ya tienen otros sistemas completos. Se presumen dos escenarios regulatorios para las proteínas LuxR huérfanas. En uno de los escenarios, el LuxR solo responde a la señal producida por una AHL de un circuito de percepción del quórum de la misma célula (Figura 10B), en el otro escenario la proteína LuxR solo responde a una señal externa que no es necesariamente una molécula de tipo AHL (Figura 10C) (Hudaiberdiev et al., 2015).

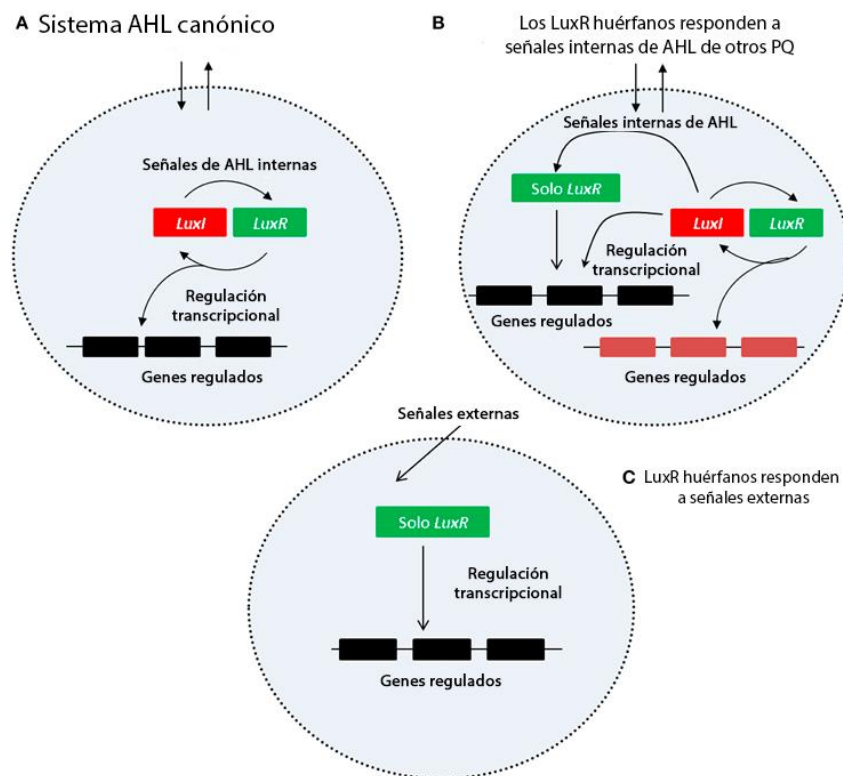


Figura 10. Mecanismos regulatorios del sistema de percepción del quórum de LuxR huérfanos. (A) Sistema canónico de AHL. **(B)** LuxR solo que responde a la señal de una sintasa de LuxI no adyacente. **(C)** LuxR solo que responde a una señal externa (Hudaiberdiev et al., 2015).

En el regulador transcripcional LuxR la unión de la molécula señal puede ser responsable de la estabilidad, también del plegamiento correcto e incluso la dimerización que a su vez permite su unión al ADN. Sorprendentemente, la conservación de la estructura primaria entre las proteínas del tipo LuxR es bastante baja (18%-25%). Sin embargo, los alineamientos múltiples de diversas secuencias de proteínas de esta familia han permitido identificar algunos residuos altamente conservados (mencionados anteriormente en la sección 1.3.2) (Covaceuszach, Degrassi, Venturi, & Lamba, 2013). Posteriormente, otro grupo analizó algunos LuxR huérfanos de algunas bacterias asociadas y no asociadas a plantas (Covaceuszach et al., 2013), observaron que estas proteínas pueden ser parte de un nuevo circuito de regulación entre reinos, involucrados en la comunicación de la planta con patógenos y bacterias beneficiosas, que tienen funciones estructurales similares a las de el sistema canónico LuxR/I, puesto que pueden responder a las señales producidas por las plantas.

Covaceuszach y colaboradores en 2013, mediante el análisis de alineamientos entre secuencias de LuxR canónicos y huérfanos de algunas bacterias asociadas a plantas y no asociadas (TraR de *Agrobacterium tumefaciens* y Sinorhizobium fredii NGR234, LasR y QscR de *Pseudomonas aeruginosa*, CviR de *Chromobacterium violaceum* y SdiA de *Escherichia coli*), observaron tres grupos de aminoácidos conservados; los Grupos I, II y III. El Grupo I formado por Trp 57, Tyr 61, Asp 70, Pro 71, Trp 85 y Gly 113, de los cuales la mayoría interactúan directamente con el ligando, a excepción de Pro 71 y Gly 113 que se encuentran cerca del sitio de unión y que probablemente estén involucrados en la orientación adecuada de la cadena lateral de Asp 70 y Trp 85. El Grupo II con los residuos Val 72, Val 73, Phe 101, Ala 105, Ile 110 y Thr 129, razonablemente conservados y que también están involucrados en la unión al ligando. Finalmente, el Grupo III conformado por los residuos Ala 49, Tyr 53, Gln 58 y Phe 62, representan un grupo menos conservado, los residuos Ala 49, Gln 58 y Phe 62 están altamente sustituidos en los LuxR solos de bacterias asociadas a plantas y en otras no asociadas. Por el contrario, Tyr 53 es muy variable dentro de los miembros de la subfamilia de LuxR solos de bacterias asociadas a plantas, mientras que es conservado en una serie de bacterias no asociadas.

1.3. Interacciones simbióticas entre bacterias y plantas: percepción del quórum en rhizobias

Los mecanismos de percepción del quórum son comunes entre bacterias Gram-negativas asociadas a plantas debido a que regulan varios aspectos fisiológicos en la interacción entre la planta y la bacteria. Hay cuatro clases amplias de bacterias que promueven el crecimiento de las plantas en el suelo: 1) aquellas que entran en simbiosis, incluidas las simbiosis de fijación de nitrógeno rhizobia-leguminosa, 2) Interacciones asociativas las cuales, bacterias como *Pseudomonas* pueden suprimir el crecimiento de microorganismos nocivos, 3) las bacterias asociadas a la raíz que puede proporcionar nutrientes y/o hormonas estimulantes del crecimiento, como se ve con especies de *Azospirillum* y bacterias relacionadas, y 4) bacterias que pueden degradar contaminantes ambientales (Sanchez-Contreras, Bauer, Gao, Robinson, & Downie, 2007). En adelante se hablará principalmente de las bacterias dentro de la primera clase.

Como ya se mencionó en las bacterias comúnmente llamadas “rhizobia” (que pueden pertenecer a las α o β -*proteobacterias*), se ha encontrado que las señales del quórum están relacionadas con diversos procesos que les permiten establecer relaciones simbióticas con plantas leguminosas, como son la nodulación, el desarrollo de los simbiosomas, la producción de exopolisacáridos, la transferencia conjugativa de alguno de sus plásmidos y la fijación de nitrógeno (Krysciak et al., 2014).

En diferentes especies de *Rhizobium* los genes encargados de la fijación de nitrógeno (*nif* y *fix*), producción de exopolisacáridos (*exo* y *exp*) y de los procesos de nodulación (*nod*), pueden encontrarse en megaplásmidos comúnmente llamados “plásmidos simbióticos”.

En la Tabla 2 se describen algunas de las señales de AHLs encontradas en algunas cepas de rhizobia. Por ejemplo, *Rhizobium leguminosarum* cuenta con cuatro sistemas de percepción del quórum; TraR/Tral, RhiR/Rhil, RaiR/Rail y CinR/CinI. De los cuales RaiR/Rail no se conoce que procesos regula. En *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 el sistema de percepción de SinR/SinI regulan la producción de exopolisacáridos. En *S. meliloti* Rm41, TraR/Tral controla la transferencia del plásmido. En *Rhizobium etli*

CNPAF512 se han identificado dos sistemas de percepción del quórum: RaiR/Rail y CinR/CinI; ambos participan en el desarrollo de la simbiosis. Las mutantes de *rail* causa un ligero aumento en el número de nódulos formados por planta, mientras que las mutaciones en *cinI* exhiben una reducción en la eficiencia de fijación de nitrógeno.

Zheng y colaboradores describieron el sistema de percepción del quórum en *R. etli* CFN42. Ellos identificaron tres AHLs sintetas CinI, Rail, y Tral y cuatro reguladores cognados tipo LuxR; CinR, RaiR, TraR1 y TraR2 (*cinR/cinI* localizados en el cromosoma, *traR/tral* en p42a y *raiR/rail* en p42f), encontraron que CinR/CinI además de autoregularse, regula a los otros dos sistemas. CinR se requiere para la expresión de *cinI* (Zheng et al., 2015). Lo interesante es que CinR puede ser activo incluso en ausencia de su AHL, a diferencia de otras proteínas del tipo LuxR. Sin embargo, el complejo CinR-AHL se une con mayor afinidad al ADN diana. Además, *rail* es activado por RaiR y *tral* por TraR1 y TraR2 (Figura 11).

Tabla 2. Producción de AHLs en rhizobia (Modificado de Gonzáles & Marketon, 2003).

Organismo	AHL(s) presente	Sistema responsable de la producción de AHL	Fenómeno regulado por la percepción del quórum
<i>A. tumefaciens</i>	3-Oxo-C ₈ -HSL	<i>traR/tral</i>	Transferencia del plásmido
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	C ₆ -HSL	<i>rhiR/rhil</i>	Eficiencia de nodulación
	C ₇ -HSL		
	C ₈ -HSL		
	3-Oxo-C ₈ -HSL	<i>raiR/rail</i>	Desconocida
	C ₆ -HSL		
	C ₇ -HSL		
	C ₈ -HSL		
	3-Oxo-C ₈ -HSL ^a	<i>traR/tral</i>	Transferencia de plásmido
	C ₈ -HSL ^a		

	3-OH-C _{14:1} -HSL	<i>cinR/cinI</i>	Inhibición del crecimiento
<i>R. etli</i> CNPAF512	AHL de cadena larga hidroxilada	<i>cinR/cinI</i>	Fijación de nitrógeno, desarrollo del simbiosoma, inhibición del crecimiento
	AHLs de cadena corta	<i>raiR/rail</i>	Fijación de nitrógeno, inhibición del crecimiento
<i>R. etli</i> CFN42	3-Oxo-C ₈ -HSL ^a	<i>traR/tral</i>	Transferencia de plásmido
	3-OH-C ₈ -HSL	Desconocido	Desconocido
<i>Rhizobium</i> sp. Cepa NGR234	3-Oxo-C ₈ -HSL ^a	<i>traR/tral</i>	Fijación de nitrógeno, inhibición del crecimiento
	Otras AHLs de cadena corta y larga	Desconocido	Desconocido
<i>S. meliloti</i> Rm1021	C ₁₂ -HSL	<i>sinR/sinI</i>	Producción de exopolisacárido EPS II
	3-Oxo-C ₁₄ -HSL		
	C _{16:1} -HSL		
	3-Oxo-C _{16:1} -HSL		
	C ₁₈ -HSL		
	C ₈ -HSL	<i>mel</i>	Desconocido
	Otros AHLs de cadena corta		
<i>S. meliloti</i> Rm41	3-Oxo-C ₁₄ -HSL	<i>sinR/sinI</i>	Producción de exopolisacárido EPS II
	C ₁₆ -HSL		
	C _{16:1} -HSL		
	3-Oxo-C _{16:1} -HSL		
	3-Oxo-C ₈ -HSL	<i>traR/tral</i>	Transferencia de plásmido

3-OH-C₈-HSL

C₈-HSL

Otros AHLs de
cadena corta

mel

Desconocido

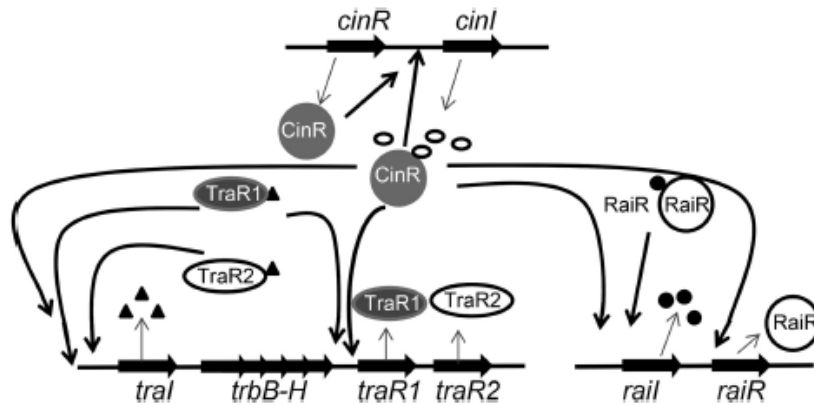


Figura 11. Modelo de la red de regulación de percepción del quórum en *R. etli*. *R. etli* alberga tres sistemas de percepción del quórum. El sistema CinRI activa la regulación de *CinI* mediada por CinR para formar un circuito de retroalimentación positiva. CinRI también controla positivamente los sistemas Rai y Tra. *rail* es activado por RaiR. En el sistema *tra*, TraR1 y TraR2 influyen positivamente en la expresión de *traI* (Zheng et al., 2015).

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de *Sinorhizobium fredii* NGR234

S. fredii NGR234 es una α -proteobacteria (del orden de los Rhizobiales), que se le conoce bien por su excepcional variedad de hospederos con los que interactúa. Esta bacteria es capaz de colonizar a más de 120 diferentes géneros de leguminosas y no leguminosas como *Parasponia andersonii* por lo que se le ha designado como una cepa de amplio rango de hospederos. En contraste, la mayoría de las rhizobias sólo pueden establecer simbiosis con un pequeño número de leguminosas (Majumdar & Pal, 2017).

La cepa NGR234 se aisló, en 1965, del frijol lablab (*Lablab purpureus*), en Papua Nueva Guinea (TRINICK, 1980). Su genoma está compuesto por un cromosoma (3.93 Mb) y dos plásmidos: pNGR234a (536,165 pb) y pNGR234b (2.43 Mb) (He et al., 2003). *S.*

freddii NGR234 cuenta con dos sistemas de percepción del quórum clásico del tipo LuxR/LuxI. El primer sistema, NgrR/NgrI, está codificado en el cromosoma, mientras que el segundo sistema, TraR/TraI, se encuentra codificado en el plásmido simbiótico pNGR234a.

Según He y colaboradores (He et al., 2003), TraI sintetiza una AHL que supuestamente es una N-(3-oxooctanoil)-L-homoserín lactona (3-oxo-C₈-HSL) y *ngrI* codifica una sintasa que produce una molécula autoinductora aún no caracterizada (Schmeisser et al., 2009). Junto al gen *traI* se encuentran los genes reguladores *traR* y *traM*, así como otros genes requeridos para la transferencia conjugativa de ADN y la replicación del plásmido. TraM es una proteína antiactivadora, que evita que TraR active los genes diana en niveles bajos de AI.

Los dos sistemas de percepción del quórum podrían tener una jerarquía de regulación como se ha descrito en otras cepas, en las cuales el sistema de mayor jerarquía es el que se encuentra codificado en el cromosoma. Una vez que este se activa, puede activar al sistema de regulación de menor jerarquía. Hasta el momento no se han descrito con certeza la jerarquía de regulación de *S. freddii* ni todas las moléculas de señalización producidas por la cepa. Además, no se ha descrito si esta cepa posee genes que codifiquen para proteínas del tipo LuxR huérfanos. Mediante un programa informático de alineamiento de secuencias de los genes *ngrR* y *traR* de *S. freddii* NGR234, encontré que la cepa posee cinco genes homólogos huérfanos, se analizaron mediante I-TASSER para saber si conservan los dominios de unión a AHL y ADN (resultados no publicados). No se conoce si estas LuxR huérfanas tienen alguna participación en el sistema de percepción del quórum, ni si estas proteínas pueden responder a otras señales del ambiente. Por lo tanto, este trabajo pretende describir la jerarquía de regulación de los dos sistemas del quórum de *S. freddii* NGR234 y las señales sintetizadas por NgrI y TraI.

3. HIPÓTESIS

Sinorhizobium freddii NGR234 posee dos sistemas de percepción del quórum; NgrR/NgrI codificado en el cromosoma, y TraR/TraI codificado en el plásmido simbiótico. Además, posee cinco proteínas LuxR huérfanas que no se sabe si tienen alguna participación en el sistema de regulación de la percepción del quórum. Si existe jerarquía regulatoria

entre los dos sistemas canónicos, las mutaciones nulas en los genes de mayor jerarquía resultarán en la disminución de la expresión del sistema de menor jerarquía, y si las LuxR huérfanas tienen alguna participación en la regulación de la síntesis de las moléculas señal, se observarán cambios en la producción de las AHLs.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Elucidar los mecanismos de regulación de la percepción del quórum en *S. fredii* NGR234 y sus elementos importantes: proteínas, moléculas señal y regiones promotoras (cajas lux).

4.2. Objetivos particulares

- Elucidar si existe una jerarquía regulatoria mediante el análisis de los perfiles de AHLs, de mutantes nulas en los genes de los dos sistemas de percepción canónicos de *S. fredii* NGR234 (*ngrI*, *ngrR*, *tral*, *traR*) y una doble mutante de *ngrI/tral*.
- Determinar si la ausencia de los *luxR* huérfanos encontrados en *S. fredii* NGR234, afectan la síntesis de AHLs, mediante el análisis de perfiles de las moléculas señal de mutantes nulas de los genes de los cinco *luxR* huérfanos comparados con la cepa silvestre.
- Verificar que moléculas señal son sintetizadas por cada una de las AHL sintasas de NGR234, mediante la expresión heteróloga de las dos sintasas canónicas (*NgrI* y *Tral*) en *E. coli* dH5 α y el posterior análisis de los perfiles de AHLs.
- Realizar un análisis preliminar de la regulación transcripcional de los dos sistemas de percepción del quórum de *S. Fredii*, mediante la obtención de fusiones transcripcionales de las posibles regiones promotoras de los dos sistemas con *lacZ* en los fondos de la cepa silvestre y mutantes nulas.

5. METODOLOGÍA

5.1. Generación de las cepas mutantes *S. fredii* NGR234 en los genes *ngl*, *ngrR*, *tral*, *traR* y doble mutante de *ngl/tral* por recombinación homóloga

Los medios y condiciones de cultivo utilizados en este trabajo están descritos en la Tabla 3 de la sección 11. ANEXO. Las cepas mutantes se generaron siguiendo la siguiente metodología: Se diseñaron los oligos respectivos con para hibridar a 1000 pb río arriba del codón de inicio y a la zona media del gen, y un segundo par de oligos para hibridar de la zona media del gen hasta 1000 pb río abajo del codón de paro. Los oligos incluyeron las secuencias de sitios de restricción adecuados para insertar un interposón omega que porta un gen de resistencia a Kanamicina (Ω Km) flanqueado por terminadores de la transcripción. Posteriormente los genes interrumpidos por el cassette fueron insertados en plásmido suicida pJQ200mp18 (Figura 12). En teoría, la única manera de que ocurra la conservación del plásmido en la cepa transformada es que se recombine en alguna región del genoma de la cepa receptora.

Las construcciones de los genes interrumpidos por Ω Km y clonados en pJQ200mp18 se transformaron en *E. coli* S17-1 para después ser transferidos por conjugación a *S. fredii* NGR234. Se seleccionaron las cepas transconjugantes resistentes a Gentamicina (Gm) y Kanamicina que integraron el vector a la cepa hésped. Para obtener dobles recombinantes y así generar sustituciones alélicas hay que buscar un evento de doble recombinación. Para seleccionar estos eventos, el vector pJQ200mp18 porta el gen *sacB* que codifica para una levansacarasa que es letal en presencia de sacarosa, debido a la acumulación de levanos en el citosol que impiden el crecimiento de la bacteria (Quandt & Hynes, 1993). De modo que, las cepas seleccionadas resistentes a Gm y Km se cultivaron en un medio con sacarosa al 10% y kanamicina con el fin de obtener un evento de doble recombinación por intercambio alélico, por lo que las clonas positivas debieron mantener la resistencia presente en el inserto (Km), pero no la del vector pJQ200mp18 (Gm). Se purificaron las cepas tres veces mediante la técnica de siembra de aislamiento en caja de Petri, en medio PY adicionado de kanamicina y ácido nalidíxico (Nal). *E. coli* S17-1 es sensible a Nal y *S. fredii* NGR234 es resistente, de esta forma se aseguró que el cultivo sea únicamente de *S. fredii* NGR234.

Con los pasos anteriores se obtuvieron las siguientes mutantes nulas de *S. fredii* NGR234: 1). *ngrR*:: Ω Km, 2). *ngl*:: Ω Km, 3). *traR*:: Ω Km, 4). *tral*:: Ω Km.

Para la construcción de la doble mutante nula de los genes de *ngl*/*tral*, se interrumpió el gen *ngl* con otro cassette de resistencia a un antibiótico diferente (Tetraciclina, Tc) y de igual forma se clonó en el vector pJQ200mp18 y se transformó en *E. coli* S17-1. Esta construcción se transfirió por conjugación en la mutante nula *tral*:: Ω Km de *S. fredii* NGR234 y se seleccionó la cepa transconjugante con resistencia a Gm y Tc, se aseguró que también mantuvieran la resistencia a Nal y Gm. Posteriormente, para la doble recombinación se cultivó la cepa seleccionada en PY Tc adicionado de sacarosa al 10%, y se seleccionaron las clonas resistentes a Km y Tc y sensibles a Gm. De esta manera se obtuvo la doble mutante nula *ngl*:: Ω Tc/ *tral*:: Ω Km.

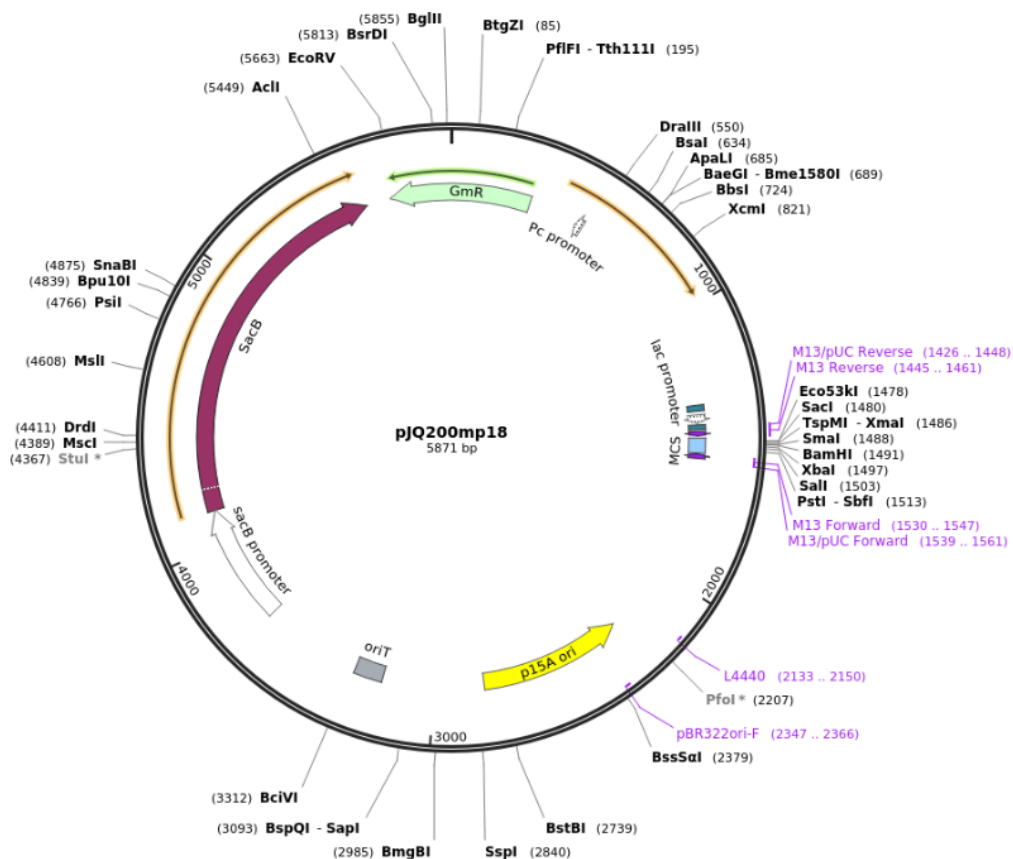


Figura 12. Mapa del plásmido pJQ200mp18. Este vector porta el gen *SacB* que codifica para una levansacarasa que sintetiza levanos en presencia de sacarosa y que son letales para la cepa, ofrece un marcador de resistencia a gentamicina (GmR) y una amplia elección de sitios de restricción. Además, contiene el gen *lacZ α* para selección azul/blanco.

5.2. Mutantes nulas de los *luxR* huérfanos

Para la obtención de las cepas nulas de los *luxR* huérfanos se obtuvieron mediante la clonación de los fragmentos incompletos de los genes, que no contienen los codones de inicio y de término en un vector que no es capaz de replicarse en *S. fredii*, denominado pDO (Figura 13). Este vector porta el gen de resistencia a cloranfenicol, por lo que dicho gen tendrá que recombinarse y como resultado los genes correspondientes a los LuxR huérfanos dejarán de ser funcionales en la cepa. Por lo tanto, las construcciones con los genes de los *luxR* huérfanos insertados en pDO deberán ser transformados de igual forma en *E. coli* S17-1 para ser transferidos por conjugación a *S. fredii* NGR234 y finalmente se seleccionaron las colonias transconjugantes que sean resistentes a cloranfenicol.

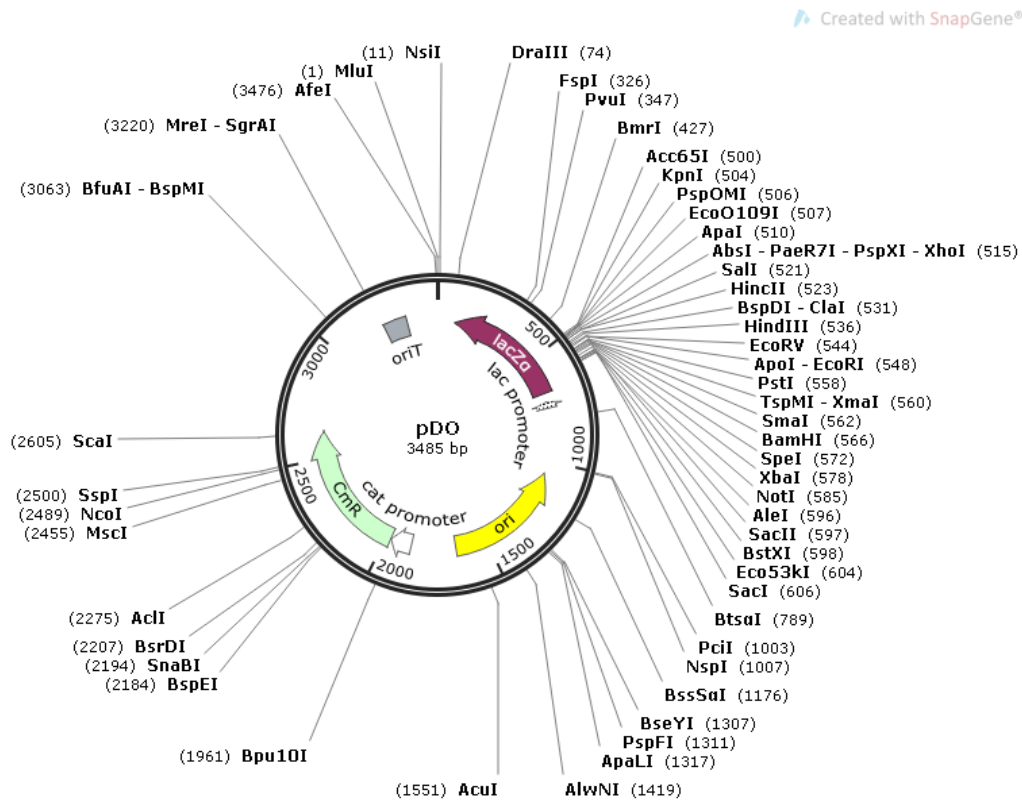


Figura 13. Vector pDO. Porta un gen que confiere resistencia a cloranfenicol y no es capaz de replicar en rhizobia.

5.3. Clonación de los genes *ngri* y *tral* en el vector de expresión pSRK

Se diseñaron los respectivos oligonucleótidos para amplificar los genes *ngri* y *tral* desde el codón de inicio hasta el codón de paro, agregando las bases necesarias para que las secuencias puedan ser reconocidas por las enzimas de restricción *NdeI* en el inicio y *NheI* en el codón de paro. Los dos genes se clonaron en el plásmido pSRK Gm^R (Figura 14), el cual es un vector de expresión de amplio rango de hospederos que contienen un complejo promotor-operador rediseñado (*lacI^q-lac*) en el que los genes clonados se reprimen fuertemente en ausencia del inductor (IPTG). El vector está basado en el plásmido pBBR1 de amplio rango de hospedadores, es movilizable y se replican de manera estable en un número de copias moderado en representantes de las α y γ proteobacterias (Khan, Gaines, Roop, & Farrand, 2008).

Los vectores *ngri*-pSRK y *tral*-pSRK se transformaron en *E. coli* DH5 α y se cultivaron en 100ml medio LB hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.4, en ese momento se adicionó IPTG a una concentración de 1mM y se tomaron muestras del medio gastado para la extracción de AHLs a las 2 horas y a las 24 horas después de la inducción con IPTG.

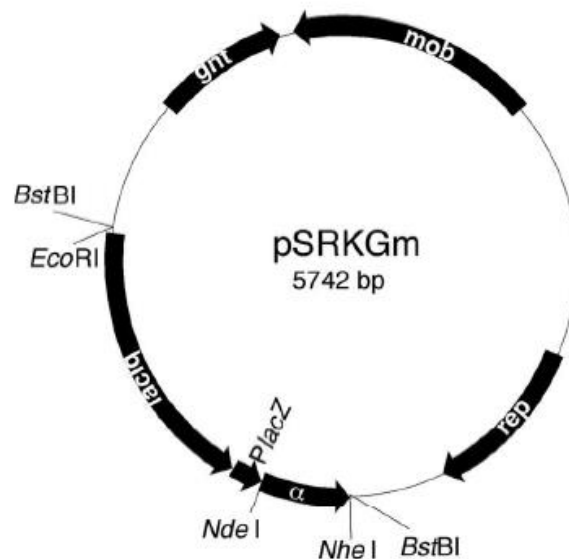


Figura 14. Estructura del vector de expresión de amplio rango de hospederos pSRK Gm^R. Los elementos genéticos clave son: la resistencia de antibiótico de Gentamicina (Gm), el casete de expresión; compuesto por *lacI^q*, el complejo promotor-*O₁* *lac* (*PlacZ*), la secuencia codificante de *lacZ α* (α) y por último, la secuencia del sitio de clonación múltiple, ubicado entre los sitios *NdeI* y *NheI* (Khan et al., 2008).

5.4. Perfil de expresión de AHLs de las cepas mediante cromatografía de capa fina

Se purificaron las acil homoserín lactonas siguiendo el protocolo descrito por Farrand y colaboradores (Farrand, K. Yinping, Q. and Philippe, 2002). Se recuperó el medio de cultivo gastado de *S. fredii* NGR234 en la fase estacionaria de la cepa silvestre y mutantes en medio MYG mediante el método de separación de fases utilizando como solvente acetato de etilo. Los extractos se visualizaron en una placa de Cromatografía de Capa Fina (CCF) de fase invertida de C₁₈ con respaldo de vidrio y se utilizó como solvente una mezcla de metanol y agua (60:40, 70:30 o 90:30) como fase móvil. Se utilizó como cepa bioreportera de *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4), la cual carece del plásmido Ti y del gen *traI*, por lo que no puede producir sus propias señales de AHLs, pero si responde a las señales que sean añadidas al medio. Además, el plásmido pZLR4 contiene una copia de *traR* y una fusión de *lacZ* a *traG* que se expresa con un promotor TraR dependiente, de manera que, en ausencia de la señal, la cepa no produce cantidades significativas de β-galactosidasa y forma colonias blancas en un medio con X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido). Cuando el biosensor perciba la señal de moléculas AIs, TraR induce la expresión de *traG::lacZ* y con ello la producción de β-galactosidasa que hidroliza el X-Gal a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol, que posteriormente, se oxida a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo y permite obtener una coloración azul sobre la placa de C₁₈ mostrando las diferentes AHLs producidas por la cepa silvestre y las mutantes. Esta metodología permitió analizar la jerarquía de los sistemas de percepción del quórum observando las diferencias en los extractos de cada cepa.

5.5. Fusiones transcripcionales

Se amplificó mediante PCR una región de entre 100 a 300 pb río arriba del inicio de la transcripción de los genes de los dos sistemas y se realizó una fusión transcripcional con *lacZ* en un plásmido que es capaz de replicar en *S. fredii* NGR234 (pLESS) y posteriormente se midió la actividad de la β-galactosidasa en la cepa silvestre y en los fondos mutantes para analizar la regulación de los promotores con los genes respectivos.

La determinación de proteína total de cada muestra se realizó por el método de Lowry, el cual consta de dos etapas: 1) los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos esencialmente los de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato. 2) La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfo-molibdo-túngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso el cual se puede medir su absorción en longitudes de onda de entre 560 y 680 nm.

Dado que el complejo coloreado, su composición es desconocida, se realizó una curva de calibración utilizando albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración conocida.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1. Identificación de las AHLs producidas por *S. fredii* NGR234

Los cultivos de *S. fredii* NGR234 se realizaron en MYG debido a que este medio presentó un mejor rendimiento en la producción de AHLs en comparación con otros medios de cultivo disponibles en el laboratorio. Primeramente, para la identificación de las AHLs la cepa silvestre se cultivó en 4ml de medio en tubos de ensaye, hasta alcanzar la fase estacionaria (hasta las 24h de incubación). Las AHLs producidas por la cepa silvestre de *S. fredii* NGR234, se extrajeron con acetato de etilo de 2 ml de medio donde la cepa creció hasta su estado estacionario y se resuspendieron en 10 μ l de solvente. Para su identificación se prepararon diluciones de AHLs sintéticas y se corrieron junto con el extracto de la cepa silvestre en placas de cromatografía de capa fina de fase reversa de C_{18} , con una fase móvil de metanol/agua en una proporción de 70:30 para su posterior detección con *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4). Los resultados se muestran en la Figura 15.

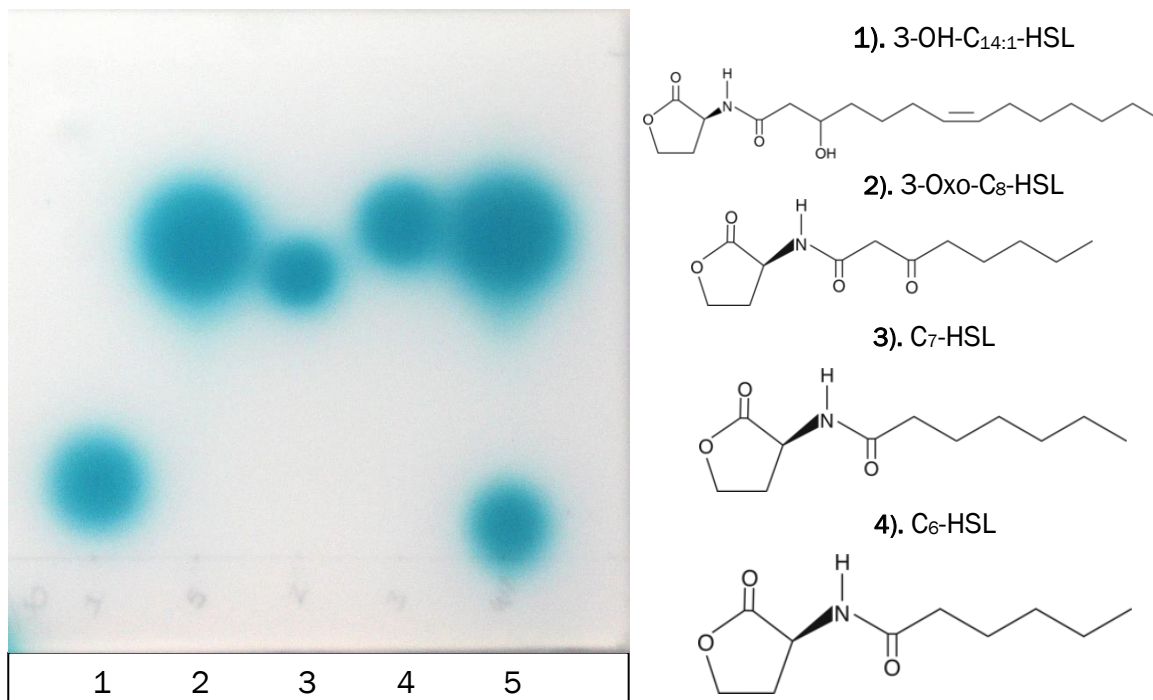


Figura 15. Identificación de AHLs de *S. fredii* NGR234 en CCF. Las muestras de cada carril corresponden a: **1).** N-C₃-hidroxi-7 *cis* tetradecenoil-Homoserín Lactona (Small, 3-OH-C_{14:1}-HSL) (100 ng), **2).** N-3-Oxo-octanoil-L-Homoserín Lactona (3-Oxo-C₈-HSL) (0.2ng), **3).** N-Heptanoil-L-Homoserín Lactona (2 ng, C₇-HSL), **4).** N-Hexanoil-L-Homoserín Lactona (100 ng, C₆-HSL) (0.2ng) y **5).** *S. fredii* NGR234. Las muestras se corrieron en la placa de CCF a una proporción de fase móvil metanol/agua de 70:30. De lado derecho de la imagen se muestra la estructura de las moléculas de AHLs sintéticas utilizadas en este ensayo. En esta placa podemos observar que a la concentración a la que se cargó la muestra, la cepa silvestre de *S. fredii* NGR234 ubicada en el carril 5, produce al menos dos moléculas diferentes de AHLs detectadas por la cepa bioreportera. La molécula de mayor distancia de migración de la cepa silvestre es muy parecida a 3-Oxo-C₈-HSL y C₆-HSL (de los carriles 2 y 4 respectivamente). La molécula de menor distancia de migración en la placa de CCF de *S. fredii* NGR234 es una molécula de AHL con una cadena acilo larga, que pudiera contar con al menos 14 o más carbonos.

En la placa de CCF de la Figura 15, en el carril correspondiente a la cepa silvestre podemos observar que a la concentración a la que se cargó la muestra en la placa, la cepa sintetiza al menos dos AHLs. La AHL sintética con más parecido a la de mayor distancia de migración producida por la cepa silvestre es la del carril 2 que corresponde a N-3-Oxo-octanoil-L-Homoserín Lactona (3-Oxo-C₈-HSL), aunque también migra a una distancia parecida a la del carril 4 correspondiente a N-Hexanoil-L-Homoserín Lactona (C₆-HSL); la forma de la mancha en el carril 4 es circular y en el caso de la AHL del carril 2 la forma de la mancha es en forma de gota, una característica que se ha mencionado en otros artículos que corresponde a las AHLs que poseen un grupo Oxo en la cadena del grupo acilo. Además corresponde a la AHL mencionada por He y colaboradores en 2003 (He et al., 2003) que supuestamente produce NGR234.

correspondiente a N-C₃-hidroxi-7 *cis* tetradecenoil-Homoserín Lactona (Small) migra del punto donde se colocaron las muestras y la AHL de la cepa también migra, pero muy ligeramente, sin embargo, no a la misma distancia, por lo que no podemos identificarla, pero si podemos saber que esta Acil Homoserín Lactona pudiera contar con al menos 14 o más carbonos en la cadena del grupo acilo. Como podemos observar en esta placa, los estándares con mayor número de carbonos en la cadena acilo tienen una menor distancia de migración en la placa.

6.2. Mutantes nulas de *S. fredii* NGR234 en los genes *ngl*, *ngrR*, *tral*, *traR* y perfiles de AHLs en CCF

Como ya se mencionó anteriormente, algunas cepas de *Rhizobium* cuentan con más de un sistema de percepción del quórum. El sistema que se encuentra codificado en el cromosoma comúnmente tiene mayor jerarquía en la cascada de regulación del resto de los sistemas. Algunos ejemplos de este comportamiento son; *R. etli* CFN42 y *R. leguminosarum* A34. Los sistemas de percepción del quórum de *R. etli* CFN42 se mencionaron anteriormente en la sección 1.3, donde veíamos que el sistema CinR/I localizado en el cromosoma, además de autoregularse, regula a los otros dos sistemas localizados en dos plásmidos que posee la cepa; TraR/I en p42a y RaiR/I en p42f. En *R. leguminosarum* A34, que es una cepa derivada de *R. leguminosarum* 8401 (no mencionado en secciones anteriores), cuenta con cuatro sistemas de percepción de quórum, y el sistema CinR/I está localizado en el cromosoma. Este sistema también se encuentra en la parte superior de una cascada regulatoria que induce a los otros tres sistemas de percepción de quórum; Tral/R y Rhil/R codificados en el plásmido simbiótico y Rail/R codificado en el plásmido pIJ9001 (Danino, Wilkinson, Edwards, & Downie, 2003). Tanto en *R. etli* CFN42, como en *R. leguminosarum* A34, si no se activa el sistema de percepción de quórum de mayor jerarquía regulatoria localizado en el cromosoma, no se activan los demás sistemas por debajo de la jerarquía que se encuentran localizados en los plásmidos, por lo tanto, las mutaciones nulas de *cinI* en estas dos cepas (*R. etli* CFN42 y *R. leguminosarum* A34), resulta en una drástica disminución de todas las AHLs sintetizadas por la cepa silvestre (Lithgow et al., 2000; Zheng et al., 2015).

Recordemos que *S. fredii* NGR234 cuenta con dos sistemas de percepción del quórum *ngrR/ngrI* ubicado en el cromosoma y *traR/tral* localizado en el plásmido simbiótico pNGR234a. Si el sistema de percepción del quórum de *S. fredii* NGR234 codificado en el cromosoma (*ngrR/ngrI*) actuara como el sistema de mayor jerarquía regulatoria, en un perfil de AHLs se observaría una drástica disminución de la producción de todas las AHLs producidas por la cepa silvestre en la mutante de mayor jerarquía (de forma similar como se reportó en *R. etli* CFN42 y *R. leguminosarum* A34). A su vez, en el perfil de la mutante con menor jerarquía solo se verían las AHLs producidas por la sintasa de mayor jerarquía. Por lo tanto, para comprobar la hipótesis, se obtuvieron las cepas mutantes nulas en *ngrI*, *ngrR*, *tral* y *traR*. Posteriormente se realizaron los perfiles de AHLs en placas de CCF de C₁₈ a una proporción de metanol/agua de 60:40. Los resultados se muestran en la Figura 16 y Figura 17. En la Figura 16 se partió de cultivos de 4 ml de medio MYG en tubos de ensaye hasta alcanzar la fase estacionaria (aproximadamente de 1.0-1.1DO) y su posterior extracción de AHLs de 2 ml de medio donde crecieron las cepas con acetato de etilo, se resuspendieron en 10 µl del solvente y se cargó toda la muestra en la placa de CCF (igual que en la placa anterior). En la Figura 17 se realizó la extracción de AHLs a partir de cultivos de 100 ml hasta alcanzar la fase estacionaria (1.2 DO), se realizó la extracción de todo el medio gastado, se resuspendieron las muestras en 500 µl y finalmente se cargaron 10 µl de la muestra en la placa de CCF.

En la Figura 16 en el carril de en medio se muestran las AHLs producidas por la cepa silvestre, en el primer y segundo carril los perfiles de las mutantes nulas de *ngrR::ΩKm* y *ngrI::ΩKm* respectivamente, donde podemos observar que si hay producción de AHLs que corresponden a la sintasa del otro sistema de percepción del quórum que no está mutado (*Tral*), por lo que en ese punto podríamos descartar que el sistema codificado en el cromosoma posea una mayor jerarquía de regulación, pues al estar dichos genes nulos los del otro sistema del quórum de la cepa *S. fredii* NGR234 siguen transcribiéndose y produciendo su molécula señal.

Los dos últimos carriles de la Figura 16 corresponden al sistema de percepción del quórum de la cepa codificado en uno de sus plásmidos (*TraR/Tral*). En el cuarto carril

correspondiente a *traR::ΩKm*, se observa el mismo perfil de AHLs que la cepa silvestre, esto podría implicar que, aunque *traR* sea nula, *ngrR* que se encuentra localizado en el cromosoma, o bien alguno de los *luxR* huérfanos que posee la cepa, aún podría regular la transcripción de *tral* y de esta forma las dos sintasas de los dos sistemas continúan produciendo sus AHLs correspondientes. En el último carril que corresponde a *tral::ΩKm*, podemos observar que las AHLs correspondientes a la sintasa del otro sistema no mutado (*NgrI*) se siguen produciendo, por lo cual este sistema localizado en el plásmido tampoco posee una jerarquía regulatoria.

En la Figura 17 se observan los extractos de las mismas cepas, pero que se cultivaron en un volumen mayor de medio de cultivo y con un mejor rendimiento en el crecimiento de las células bacterianas. En esta placa podemos destacar que, a un mayor rendimiento del crecimiento celular y la extracción de un mayor volumen de medio gastado, logramos observar claramente en la cepa silvestre la producción de cuatro AHLs diferentes. Se obtiene el mismo patrón de las mutantes de *ngrR/l::ΩKm*, donde las AHLs correspondientes al gen del autoinductor sintasa que no está mutado (*tral*), muestran una disminución considerable en la producción de la AHL de menor migración en la placa en comparación con la cepa silvestre, de igual forma para el gen nulo correspondiente a *tral::ΩKm* observamos las AHLs de la sintasa que no está mutada (*NgrI*), obteniendo ahora una mayor concentración en la AHL de menor migración (al contrario que las mutantes anteriores). También observamos la ausencia de la segunda AHL contando de abajo hacia arriba de las moléculas de menor a mayor migración y finalmente una disminución en la tercera y cuarta AHL. Podemos ver que las AHLs que produce la cepa silvestre no se dejan de producir totalmente al mutar por separado las dos AHL sintasas, por lo que no existe una jerarquía de regulación en la que el sistema de percepción del quórum del cromosoma tenga que activarse primero para a su vez regular al otro sistema localizado en el plásmido o viceversa. Además, se puede apreciar que *NgrI* sintetiza principalmente la AHL de menor migración que corresponde a una molécula con una cadena del grupo acilo grande de 14 o más carbonos (perfil de la mutante *tral::ΩKm*) y *Tral* podría estar sintetizando principalmente las tres AHLs de mayor migración que corresponden a las moléculas con menor número de carbonos en

la cadena lateral del grupo acilo incluida la AHL que en base a la sección anterior se cree que es una 3-Oxo-C₈-HSL (perfil de la mutante *ngrI::ΩKm*). En este mismo perfil de AHLs correspondiente a las producidas por *Tral*, también se puede observar muy tenuemente que continúa estando presente una AHL de menor migración, de igual forma en las AHLs producidas por *NgrI* se observan dos de mayor migración, lo cual pudiera sugerir (descartando que sea por una contaminación en la muestra), que las dos sintasas comparten la síntesis de alguna de las moléculas, o moléculas con estructura similar. Para confirmar o descartar esta última afirmación más adelante en la sección 6.4, se describen los perfiles de AHLs de la expresión heteróloga de las dos sintasas, de manera independiente en *E. coli* dH5α.

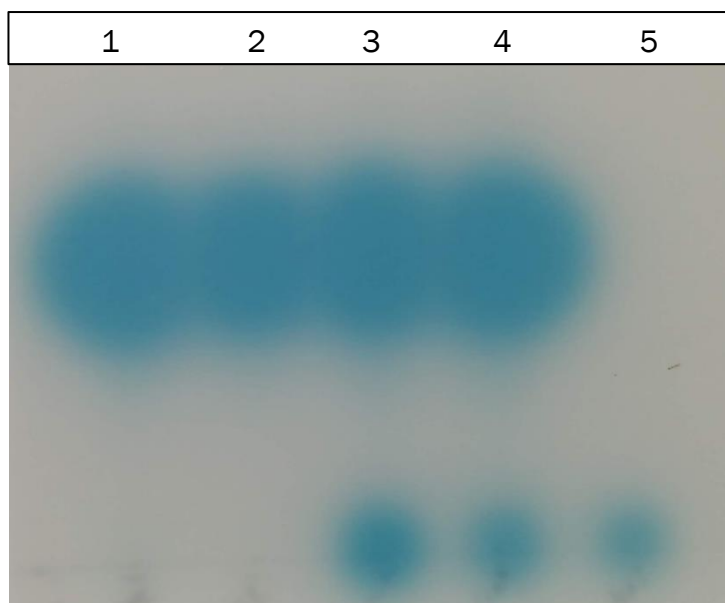


Figura 16. Primer perfil de AHLs de las mutantes nulas de los sistemas de percepción del quórum de *S. fredii* NGR234. Cada carril numerado corresponde a los perfiles de AHLs de las siguientes cepas: **1).** *ngrR::ΩKm*, **2).** *ngrI::ΩKm*, **3).** Cepa silvestre de *S. fredii* NGR234, **4).** *traR::ΩKm* y **5).** *tral::ΩKm*. Las muestras se extrajeron de 2ml del medio en donde crecieron las cepas hasta la fase estacionaria. En la figura se observa que en la muestra del carril 3 correspondiente a la cepa silvestre, la cepa bioreportera detecta dos señales. En las mutantes nulas *ngrR::ΩKm* (carril 1) y *ngrI::ΩKm* (carril 2), se observan las AHLs sintetizadas por *Tral*, por lo que no existe una jerarquía regulatoria por parte del sistema de percepción del quórum localizado en el cromosoma. En el carril 4 y 5, observamos las muestras de las mutantes nulas de *traR::ΩKm* y *tral::ΩKm* respectivamente, en la mutante de *tral::ΩKm* se observan las señales sintetizadas por *NgrI* y en la mutante *traR::ΩKm* se observa un perfil similar al de la cepa silvestre. Las muestras se corrieron en la placa de CCF a una proporción de la fase móvil de 60:40 de la fase móvil.

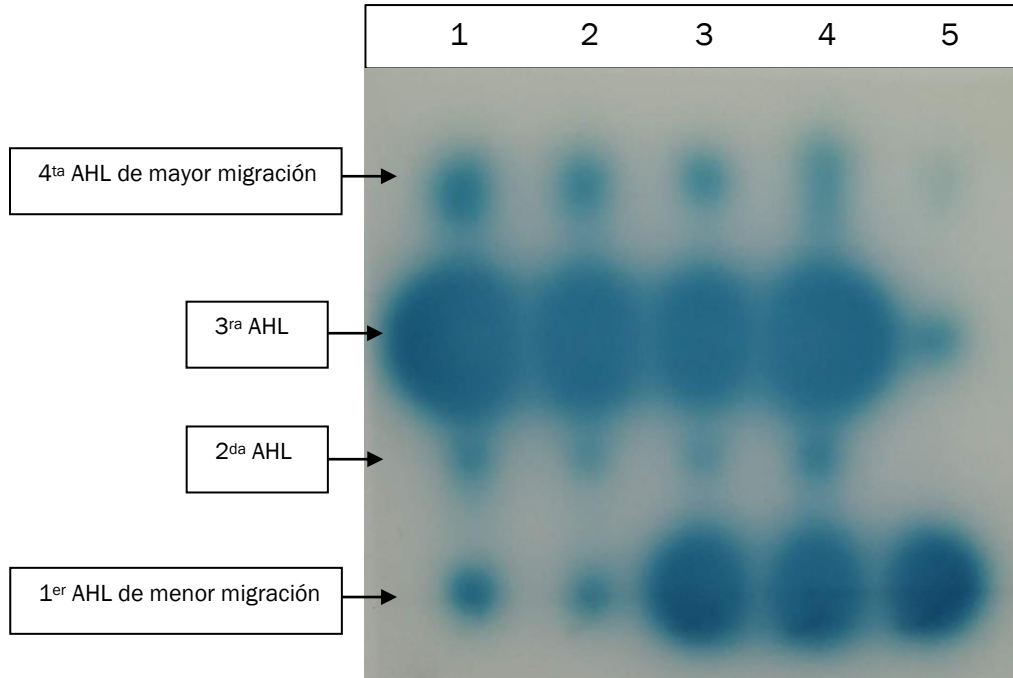


Figura 17. Segundo perfil de AHLs de las mutantes nulas de los sistemas de percepción del quórum de *S. fredii* NGR234. Cada carril numerado corresponde a los perfiles de AHLs de las siguientes cepas: **1).** *ngrR::ΩKm*, **2).** *ngrI::ΩKm*, **3).** Cepa silvestre de *S. fredii* NGR234, **4).** *traR::ΩKm* y **5).** *traI::ΩKm*. Las muestras se extrajeron de 100ml del medio en donde crecieron las cepas hasta la fase estacionaria. En la figura se observa que a estas condiciones de crecimiento de la cepas y mililitros de medio gastado utilizados para la extracción de las moléculas de AHLs, la cepa bioreportera detecta cuatro moléculas señal en la muestra correspondiente a la cepa silvestre (localizada en el carril 3). En las mutantes nulas *ngrR::ΩKm* (carril 1) y *ngrI::ΩKm* (carril 2), se observan cuatro AHLs sintetizadas por TraI. En el carril 4 y 5, observamos las muestras de las mutantes nulas de *traR::ΩKm* y *traI::ΩKm* respectivamente, en la mutante de *traI::ΩKm* se observan las señales sintetizadas por NgrI y en la mutante *traR::ΩKm* se observa un perfil similar al de la cepa silvestre. Las muestras se corrieron en la placa de CCF a uno proporción de la fase móvil de 60:40 de la fase móvil.

6.3. Mutantes nulas de LuxR huérfanos y perfiles de AHLs en CCF

Mediante el alineamiento de secuencias se encontraron al menos cinco LuxR huérfanos en *S. fredii* NGR234 que poseen dominios de unión a AHLs y a ADN. Se obtuvieron las mutantes nulas de cada uno de los genes, se realizaron cultivos de cada mutante incluyendo la cepa silvestre y la mutante de *ngrI* obtenida bajo la misma metodología como control en medio MYG líquido con antibiótico y se extrajeron las AHLs, para visualizar si los LuxR huérfanos tienen alguna participación en la síntesis de las AHLs de la cepa. Los resultados se muestran en la Figura 18.

En los perfiles de AHLs de las mutantes nulas de los LuxR huérfanos en las placas de CCF se puede observar que los perfiles son muy parecidos a los de la cepa silvestre, con

ligeras variaciones de intensidad del color azul en las AHLs con mayor migración, sin embargo, estas observaciones sugieren que su papel en la regulación de la síntesis de AHLs es nulo, o limitado.

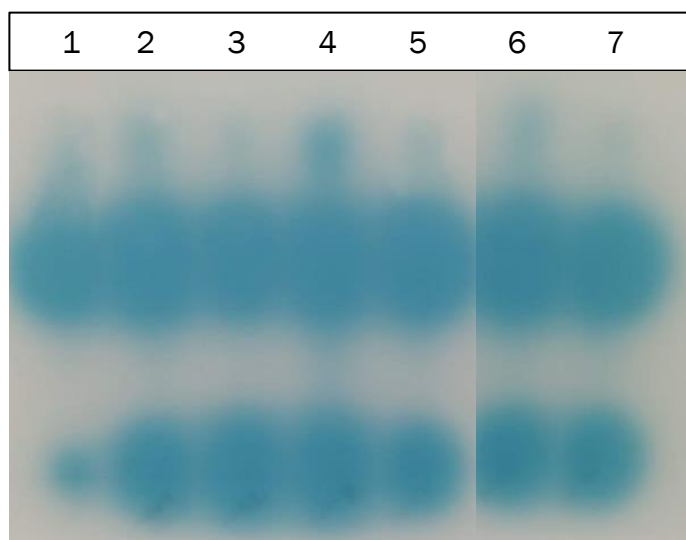


Figura 18. Perfil de AHLs en mutantes nulos de *luxR* huérfanos. Cada carril numerado corresponde a la muestra de: **1).** *ngl::pDO*, **2).** Cepa silvestre, **3).** *luxR1::pDO*, **4).** *luxR2::pDO*, **5).** *luxR3::pDO*, **6).** *luxR4::pDO* y **7).** *luxR5::pDO*. Las muestras se extrajeron de 100ml del medio en donde crecieron las cepas hasta la fase estacionaria. Las muestras se corrieron en la placa de CCF a una proporción de la fase móvil de 60:40. No se observan cambios significativos en los perfiles de las mutantes carentes de los genes de *luxR* huérfanos comparados con el perfil de la cepa silvestre. Estas observaciones sugieren que el papel de los *luxR* huérfanos en la regulación de la síntesis de AHLs es nulo, o limitado.

6.4. Perfiles de AHLs de las sintasas *Ngrl* y *Tral* en el vector de expresión pSRK y perfil de la doble mutante *ngl:: Ω Tc/ tral:: Ω Km*

La cepa de *E. coli* DH5 α es incapaz de producir sus propias AHLs por lo que transformar el vector de expresión pSRK en esta cepa nos permite observar solamente las AHLs que produce individualmente cada sintasa (resultados no mostrados del perfil de AHLs de *E. coli* DH5 α pSRK). Las cepas de *E. coli* con los plásmidos *ngl*-pSRK, *tral*-pSRK se cultivaron hasta alcanzar una DO de 0.4 en matraces de 100ml de medio LB. Una vez que se alcanzó la densidad óptica deseada, se indujeron las cepas con IPTG a distintas concentraciones. Se tomaron muestras del sobrenadante de cultivo a las 24 h (1.4 DO, la DO alcanzada disminuyó en comparación con la cepa de DH5 α sólo con el vector) después de ser inducidas a diferentes concentraciones de IPTG y un control sin inducir

(S/I), los resultados se muestran en la Figura 19. En la Figura 19 con las muestras luego de 24 horas, las muestras S/I son muy parecidas a las que si se indujeron y en ninguna de las muestras se puede observar una diferencia importante en los perfiles de AHLs a las diferentes concentraciones de IPTG.

En este experimento de la Figura 19, podemos apreciar de mejor manera las diferencias entre las dos sintasas, los perfiles de AHLs de *tral*-pSRK muestran de nueva cuenta, la producción mayormente de tres AHLs de mayor migración y una ligera síntesis de una AHLs de menor migración, lo mismo que observamos en la Figura 17 donde la mutante nula de *ngri*:: Ω Km muestra las señales sintetizadas por *Tral*. En el perfil de *ngri*-pSRK se observan dos con menor distancia de migración, en la placa de la Figura 17 observamos que la mutante nula de *tral*:: Ω Km produce mayormente la AHL que menos migra en la placa y que se presume que sea una molécula grande de más de 14 migra en la placa y que se presume que sea una molécula grande de más de 14.

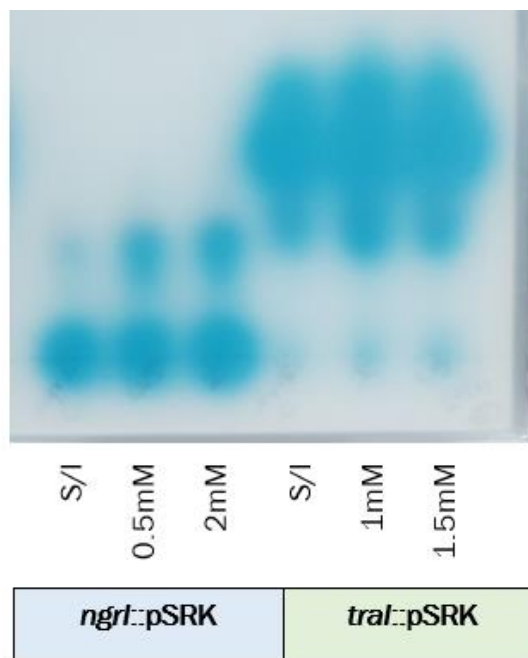


Figura 19. Perfiles de AHLs de la expresión heteróloga de *Ngrl* y *Tral*. En la expresión heteróloga de *Ngrl*, se observa que esta sintasa produce dos AHLs de cadena larga del grupo acilo de la molécula (o de menor distancia de migración). En la expresión heteróloga de *Tral*, observamos mayormente la producción de moléculas de menor tamaño de la cadena del grupo acilo (o de mayor distancia de migración) y una ligera producción de una molécula de cadena larga. Las muestras se extrajeron de 2ml del medio en el que crecieron las cepas de *E. coli* con los vectores *ngri*-pSRK y *tral*-pSRK, luego de las 24 horas de la inducción con IPTG. Además, se realizó el ensayo a diferentes concentraciones de IPTG. La placa de CCF se corrió a una proporción de la fase móvil de 60:40. *S/I: Sin inducir.

En las siguientes placas se observan los perfiles de las cepas con Ngrl/Tral en *E. coli*, así como la comparación con la cepa silvestre y mutantes nulas de las sintasas. Cabe mencionar que las placas de CCF de C₁₈ utilizadas en los experimentos anteriores han sido discontinuadas y ya no se encontraban en existencia. Para los siguientes experimentos se utilizaron las placas recomendadas por los fabricantes que remplazaron a las anteriores (CCF Silica gel 60 RP-18), por ello las AHLs de las placas que se muestran a continuación, no se distribuyen de la misma forma que en las placas anteriores. Adicionalmente en estas placas se cargaron 16µl de los extractos de *S. fredii* NGR234 con el propósito de que las AHLs que se observaban muy poco observarán mejor (en las anteriores se cargaron 10µl). Los resultados se muestran en las Figura 20 y Figura 21.

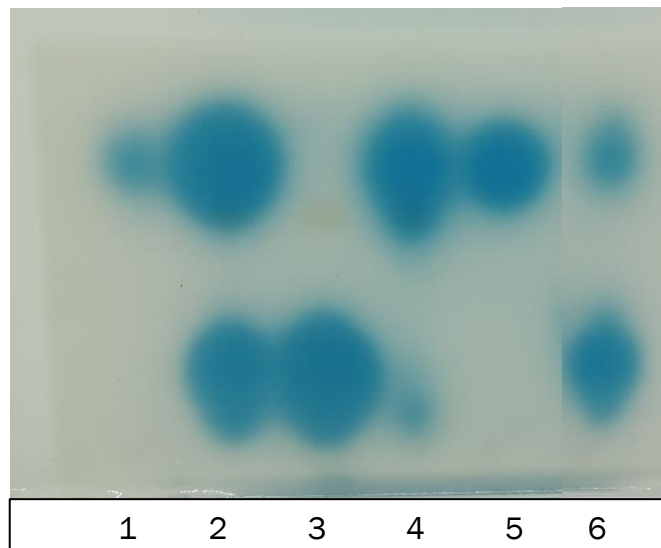


Figura 20. Primer perfil de AHLs de la expresión heteróloga de las sintasas y mutantes nulas en *S. fredii* NGR234. Cada carril numerado corresponde a la muestra: **1).** *S. fredii* *ngrl::ΩTc/tral::ΩKm*, **2).** Cepa silvestre de *S. fredii*, **3).** *E. coli* *ngrl*-pSRK, **4).** *E. coli* *tral*-pSRK, **5).** *S. fredii* *ngrl::ΩKm* y **6).** *S. fredii* *tral::ΩKm*. Podemos observar que en estas placas nuevas y a esta proporción de AHLs algunas moléculas se encuentran superpuestas. Las muestras se corrieron en la placa de CCF a una proporción de la fase móvil de 70:30.

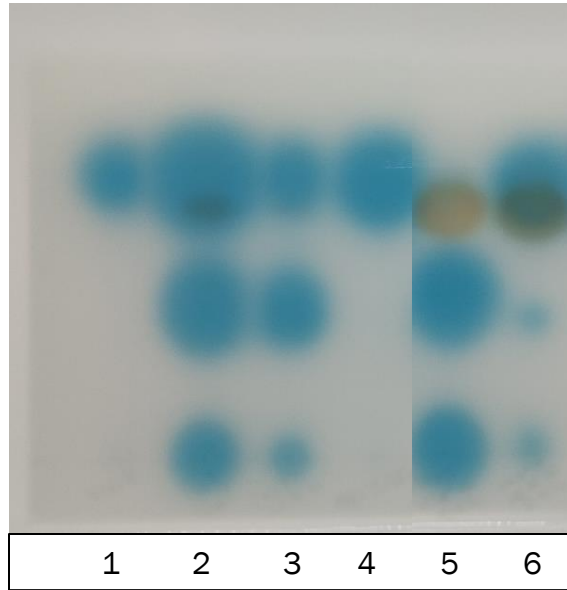


Figura 21. Segundo perfil de AHLs de la expresión heteróloga de las sintasas y mutantes nulas en *S. fredii* NGR234. Cada carril numerado corresponde a la muestra: **1).** *S. fredii ngrl:: Ω Tc/tral:: Ω Km*, **2).** Cepa silvestre de *S. fredii*, **3).** *S. fredii tral:: Ω Km*, **4).** *S. fredii ngrl:: Ω Km*, **5).** *E. coli ngrl*-pSRK y **6).** *E. coli tral*-pSRK. En esta placa podemos observar que en el carril 1, correspondiente a la muestra de la doble mutante nula de las dos sintasas aún se detecta una molécula de AHL. Las muestras de *S. fredii tral:: Ω Km* (carril 3) y *E. coli ngrl*-pSRK (carril 5), corresponden a las AHLs sintetizadas por Ngrl. Podemos apreciar que esta sintasa produce mayormente las moléculas de cadena larga en el grupo acilo. Las muestras de *S. fredii ngrl:: Ω Km* (carril 4) y *E. coli tral*-pSRK (carril 6), corresponden a las moléculas sintetizadas por Tral, donde observamos que esta sintasa produce mayormente AHLs de menor tamaño en la cadena acilo. Las muestras de esta placa de CCF se corrieron a una proporción de la fase móvil de 90:10.

Las figuras anteriores de las placas discontinuadas se corrieron con una fase móvil de metanol/agua 60:40 o 70:30, con un tiempo de migración de la fase móvil de aproximadamente 30 min. En las placas nuevas el tiempo de migración a estas mismas proporciones de metanol/agua es mayor, aproximadamente de 6 horas. En la Figura 20 con estas nuevas placas solo observamos dos AHLs para la cepa silvestre, adicionalmente se cargó en esta placa la muestra del extracto de la doble mutante nula *ngrl:: Ω Tc/ tral:: Ω Km* donde podemos observar que, aunque la cepa no posea ninguna AHL sintasa la cepa es capaz de producir una AHL. Con el propósito de observar la separación de las AHLs se corrió la placa de la Figura 21 aumentando la cantidad de metanol, esta placa se corrió con una fase móvil de metanol/agua de 90:10 el tiempo total de migración de la fase móvil disminuyó a un tiempo total aproximado de 1 hora,

una de las AHL que en la placa anterior se encontraba sobrepuesta en otra migró a una distancia mayor y en esta placa podemos observar tres AHLs para la cepa silvestre.

Al comparar las muestras de las cepas; silvestre, nulas de los genes de las AHLs sintasas y los extractos de las sintasas en pSRK, observamos nuevamente que para el caso de NgrI sintetiza mayormente dos de las AHLs de menor migración, y para el caso de Tral produce mayormente la AHL de mayor migración, en la mutante nula de *ngrI::ΩKm* sólo podemos observar una de las AHLs, en estas placas. Para el caso de *tral*-pSRK observamos la producción de tres señales, en diferente concentración. En comparación de las placas anteriores, donde desde la cepa silvestre y para *tral*-pSRK observamos cuatro AHLs en estas placas solo observamos tres. Seguramente la AHL faltante en estas placas migra a la misma distancia que alguna otra y se encuentra superpuesta. Se tendrían que realizar más perfiles de AHLs con estas muestras, utilizando placas más largas, una fase móvil distinta o placas de doble dimensión para obtener una mejor separación de las moléculas señal. Aun con estos obstáculos para su visualización, podemos seguir observando que NgrI puede producir principalmente la molécula señal más grande y una AHL intermedia, en el caso de Tral sintetiza principalmente las moléculas de menor tamaño en su cadena acilo, una intermedia y una más grande.

Con todo lo obtenido anteriormente ya se tiene un conocimiento más amplio sobre las señales de percepción del quórum de *S. fredii* NGR234. Algo importante a señalar es que algunas de las señales de las dos sintasas migran a la misma distancia en las placas de CCF, sin embargo, no se puede concluir mediante esta metodología si son las mismas moléculas o si tienen una estructura similar. Además, al variar la proporción de la fase móvil pueden superponerse algunas señales que tengan una polaridad similar. También debemos de recordar que para estos experimentos se utilizó como biosensor la cepa de *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4I), dado que este tipo de métodos se basa en la especificidad de un receptor de tipo LuxR determinado para ciertas AHLs en particular, puede tener algunas limitantes; es probable que los biosensores pierdan la detección de AHLs diferentes o nuevos. Otra de las limitantes puede ser la incapacidad para detectar AHLs en concentraciones por debajo del umbral de activación y la incapacidad

general para proporcionar la identidad del AHL exacto y su cuantificación (Patel, Moore, Blackwell, & Amador-Noguez, 2016). Por lo tanto, los resultados obtenidos son en base a la sensibilidad de TraR de *A. tumefaciens* por las señales producidas por *S. fredii* NGR234, de manera que, como perspectivas de este proyecto serían necesarios métodos de mayor cobertura y sensibilidad, más allá de las cepas de biosensores para asegurar la identificación y cuantificación del conjunto completo de AHLs producidos por *S. fredii* NGR234.

Otra de las cosas importantes a destacar es que al mutar las únicas AHLs sintasas canónicas conocidas de la cepa (NgrI y TraI), se esperaría que la bacteria ya no pueda producir ninguna señal. Como es el caso de *R. etli* CFN42, donde Zheng y colaboradores en el 2015 (Zheng et al., 2015). Ellos realizaron un perfil de AHLs en CCF de una triple mutante nula de $\Delta cinI \Delta rail \Delta tral$, que resultó en la ausencia de moléculas señal. Sin embargo, como se puede observar en las placas de CCF de la Figura 20 y Figura 21, en la doble mutante de *S. fredii* NGR234 $ngrI::\Omega Tc/tral::\Omega Km$ aún se visualiza una AHLs, la cual, también podría seguirse observando en las mutantes individuales de las dos sintasas. En la sección 1.1.2 se habló que existen otras sintasas que no tienen similitud con las proteínas del tipo LuxI que pueden producir también AHLs (sintasas del tipo AinS/LuxM, y del tipo HdtS). Considerando estos resultados, se realizó un alineamiento de estas proteínas contra la cepa silvestre de *S. fredii* NGR234 para poder determinar si la cepa posee otro elemento capaz de sintetizar AHLs.

El resultado del alineamiento de HdtS de *P. fluorescens* F113 (AAG30826.1) arrojó una secuencia de alineamiento significativa, anotada como una 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa con un porcentaje de identidad de 27.89% (WP_012709210.1). Perteneciente a la superfamilia de lisofosfolípidos aciltransferasa (LPLAT). También se realizó un análisis de la proteína en I-TASSER, el cual mostró como predicción de la función de la enzima, que puede actuar como un donante de acilo. El alineamiento de la secuencia de la enzima de HdtS de *P. fluorescens* y la enzima encontrada en *S. fredii* NGR234 se presenta en la Figura 22, donde se muestran los aminoácidos conservados y no conservados. Como ya se mencionó anteriormente, se cree que en *P. fluorescens*,

HdtS puede tener la capacidad de sintetizar AHLs, mediante la actividad de aciltransferasa transfiriendo cadenas acilo de acil-CoA/acil-PTA a un sustrato como SAM.

HdtS <i>P. fluorescens</i>	MSILQAIRAF LFYLLLGTSLLWC SLSFFIAPFLPFKARYRFIN VYWCHCALWLSKVFLG	60
HdtS <i>S. fredii</i>	MII--LRSILFNLV FYTNLIVQ-MIVLTP IYFLVPRKTAWFV PKNWVRSNHWLM EKIVG	56
	* * :*:** *:: * . :: : : ** : * : * . ** : :*	
HdtS <i>P. fluorescens</i>	IRYEVKGAENVPDRPCVIQSNHQS TWETFFLSAYFEPLSQVLKRELLFV PFFGWAMAMLR	120
HdtS <i>S. fredii</i>	TFEIEGLDNV PKGAYIFAPKHQS FWDAYALLPWLDDPFYI LKRELTWIP LFGWYIVKQR	116
	:*: * :***. :: :*** *:: * :: : :***** :*:*** . *	
HdtS <i>P. fluorescens</i>	PIAIDRDNPKAALKQVAKKGDELLKDNVWLIF PEGTRV PYPYGTVGKFSRSGSALAVNADL	180
HdtS <i>S. fredii</i>	MVPVNRARGKAMTEVMERTKREMATGRQLI IY PEGTRRPPGAPPEYKYGIARLYRDLQV	176
	: ::* *::* :. . : . :*:***** * * : . . : * : ::	
HdtS <i>P. fluorescens</i>	PVLP IAHNAGKFWPKAGWIRKPGVITV VIGAPMYAEGTG PRA-IAELNDRVQAWNEQ---	236
HdtS <i>S. fredii</i>	PVVPVAMHPGLFWPRRKF LRFPGHF KVRVLPPIEA-GLDPDAFLARLVEVTEAASDELLV	235
	:*:* : * *: :*: ** :.* : * : * * . * * :*.* : :* . :	
HdtS <i>P. fluorescens</i>	-TQREMGSLPPTPTTPATTDQLAV-	259
HdtS <i>S. fredii</i>	ETVRANPHLPLPPTAKQRLRELGAA	260
	* * ** ** : :* . .	

Figura 22. Alineamiento de HdtS de *P. fluorescens* F113 contra *S. fredii* NGR234. El resultado del alineamiento de HdtS de *P. fluorescens* F113 en *S. fredii* NGR234 arrojó una secuencia de alineamiento significativa, anotada como una 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa con un porcentaje de identidad de 27.89%. *Las letras resaltadas en azul corresponden a los motivos que están altamente conservados en aciltransferasas de ácido lisofosfatídico en procariontas y eucariotas.

Se ha demostrado también en otras bacterias que proteínas similares a HdtS de *P. fluorescens* pueden sintetizar AHLs; por ejemplo, en *Acidithiobacillus ferrooxidans* en donde dicha proteína fue renombrada como Act (Rivas et al., 2007). Dos sintasas de tipo HdtS también se encontraron en *Deinococcus radiodurans* (nombradas como Dqsl-1 y Dqsl-2) (Lin et al., 2016). En *Candidatus Jettenia caeni* se encontraron dos sintasas del mismo tipo (nombradas como Jqsl-1 y Jqsl-2) (Tang et al., 2019). Una proteína similar también se encontró en *S. meliloti* Rm41, la cual produce tanto AHLs de cadena larga, como de cadena corta. Esta cepa posee solamente un sistema de percepción del quórum canónico (SinR/SinI). SinI produce varios AHLs de cadena larga y junto con ExpR es necesaria para la producción de un exopolisacárido de importancia simbiótica (EPS II). La alteración del gen *sinI* en *S. meliloti* Rm41 anula la producción de las AHLs de cadena larga, pero no las de cadena corta. Se cree que estas AHLs se sintetizan por una proteína del tipo HdtS y que son parte del sistema que nombraron como *mel* (González & Marketon, 2003). Sin embargo, aún queda por determinar si el homólogo de HdtS

encontrado en *S. meliloti* puede producir las AHLs de cadena corta. Por lo tanto, como expectativas para la caracterización de *S. fredii* NGR234, se tendría que demostrar de igual forma, si esta enzima encontrada en los alineamientos similar a HdtS es capaz de sintetizar la molécula señal que se observa en las placas de CCF.

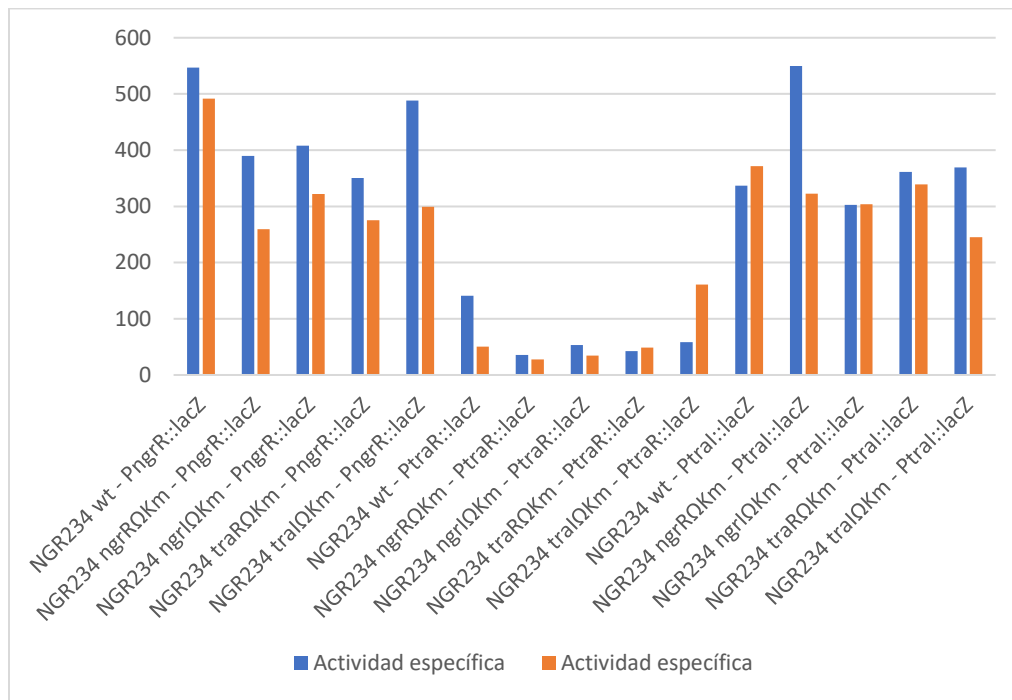
6.5. Análisis preliminar de la regulación transcripcional de los genes involucrados en los sistemas de la percepción del quórum de *S. fredii* NGR234

Para localizar donde se encuentran las regiones promotoras y los elementos que interactúan en esas regiones, se realizaron fusiones transcripcionales con *lacZ* de fragmentos del ADN de *S. fredii* NGR234 donde podrían encontrarse los promotores de cada gen de la percepción del quórum en un plásmido (pLESS) capaz de replicar en la cepa. Las cuatro fusiones; $P_{ngrR}::lacZ$, $P_{ngrI}::lacZ$, $P_{traR}::lacZ$ y $P_{traI}::lacZ$, se conjugaron en la cepa silvestre y en los fondos mutantes; $ngrR::\Omega Km$, $ngrI::\Omega Km$, $traR::\Omega Km$ y $traI::\Omega Km$. Posteriormente se dejaron crecer en tubos con 3 ml de medio MYG sin antibiótico hasta alcanzar la fase estacionaria y se midió la actividad de la β -galactosidasa en las células permeabilizadas, agregando como sustrato, o-nitrofenil- β -D-galactopiranosida (ONPG). La β -galactosidasa hidroliza el ONPG y se libera o-nitrofenol que en un medio alcalino este compuesto tiene un color amarillo y absorbe 420 nm de luz. De esta forma para medir la actividad de la β -galactosidasa, se midió la acumulación de color amarillo (aumento de absorbancia a 420 nm)/minuto.

El experimento se repitió dos veces, se analizaron los resultados y se obtuvo la Gráfica 1. En la Gráfica 1 podemos observar la actividad específica de la enzima β -galactosidasa en unidades de la enzima en cuestión por miligramo de proteína total de las muestras. Sin embargo, entre las dos replicas se obtuvo una variación grande entre las dos réplicas de cada muestra, esto probablemente debido a que los cultivos en tubo no crecieron a la misma densidad óptica en la fase estacionaria lo cual agrega variabilidad a los resultados. Por lo que sería conveniente repetir el análisis en un volumen mayor o en un biorreactor donde se puedan controlar las condiciones de crecimiento.

Faltó medir las muestras que contienen la posible región en donde podría encontrarse el promotor del gen *ngrI* ($P_{ngrI}::lacZ$). Como control se utilizó el vector pLESS vacío sin posibles regiones cercanas a los genes del quórum de la cepa de *S. fredii* NGR234

donde podrían encontrarse los promotores y se conjugó en la cepa silvestre (resultados no mostrados). Sin embargo, en los ensayos de actividad de la β -galactosidasa del control negativo, arrojó valores mayores que las muestras, por lo que se puede inferir que el plásmido contiene regiones que en *S. fredii* NGR234 podrían estar siendo reconocidas por la cepa activando la transcripción de *lacZ*. Por esta razón, sería conveniente poner una región que se conozca que no tiene promotores para la cepa en cuestión o bien añadir un casete de antibiótico con terminadores de la transcripción para evitar la producción de la β -galactosidasa.



Gráfica 1. Actividad específica en unidades de enzima de la β -galactosidasa por miligramo de proteína total de las muestras de las fusiones transcripcionales de las regiones promotoras de los genes de la percepción del quórum en *S. fredii* NGR234.

A pesar de la variabilidad en los resultados podemos concluir algunas cosas, una de ellas es que, la posible región promotora del gen de *traR* que se eligió para este ensayo, no contiene elementos reguladores, puesto que en ninguna de las muestras se observó una actividad específica significativa en comparación con las demás muestras. Para *Ptral::lacZ*, se observó actividad específica de la enzima en todos los fondos. Por lo que los promotores de los genes de *traR* y *tral*, podrían encontrarse en un operón (de forma similar como se encuentran sus homólogos en *A. tumefaciens*), donde *tral* es el primer

gen. Esto coincidiría con los resultados obtenidos de los perfiles de AHLs donde en la mutante nula de *traR* se siguen produciendo las AHLs de forma similar a la cepa silvestre por lo que posiblemente el complejo de NgrR-AHLs o alguno de los LuxR huérfanos podría activar la transcripción de *tral* del sistema de percepción del quórum codificado en el plásmido simbiótico, pues en esta mutante se deja de transcribir *traR* pero *tral* al ser el primer gen en el operón aún puede transcribirse.

7. CONCLUSIONES

En este proyecto se demostró mediante análisis de perfiles de AHLs utilizando como cepa biorreportera a *A. tumefaciens* NTL4, que *S. fredii* NGR234 produce cuando menos cuatro AHLs que son percibidas por la cepa bioreportera. Una AHL de menor distancia de migración en la placa de CCF que se trata posiblemente de una AHL de 14 o más carbonos de la cadena lateral del grupo acilo, una AHL de tamaño intermedio, una de ellas que se trata presumiblemente de 3-Oxo-C₈-HSL y otra AHL con un menor tamaño en la cadena lateral. Además, mediante la visualización de las AHLs de las cepas mutantes nulas *tral::ΩKm*, *traR::ΩKm*, *ngrI::ΩKm*, *ngrR::ΩKm* y *ngrI::ΩTc/ tral::ΩKm*, se concluye que no hay una jerarquía de regulación de la percepción del quórum con respecto al sistema canónico codificado en el cromosoma (NgrR/NgrI), puesto que al mutar la AHL sintasa y el regulador transcripcional, la sintasa del otro sistema de percepción canónico con el que cuenta la cepa (Tral), sigue produciendo sus AHLs y observamos una drástica disminución en la concentración sobre todo de la AHL de menor migración en la placa de CCF. Por otra parte, al mutar el sistema de percepción codificado en el plásmido simbiótico (TraR/Tral), observamos que, NgrI produce sus AHLs, mostrando una disminución en la concentración de dos de ellas; la de mayor migración (la cuarta en orden de aparición en la placa) y la AHL siguiente en distancia de migración que corresponde a 3-Oxo-C₈-HSL (la tercera en orden de aparición en la placa), la segunda AHL en orden de aparición no se observa y la AHL de menor migración en las placas de CCF con una concentración similar a la cepa silvestre (Figura 16). No existe una jerarquía de regulación porque al mutar el sistema de percepción codificado en el cromosoma el otro sistema puede regularse independientemente del faltante, de

forma similar al mutar la sintasa del sistema de percepción localizado en el plásmido simbiótico (*tral*) la sintasa del cromosoma continúa produciendo AHLs y curiosamente, aunque *traR* sea nula, la cepa es aún capaz de activar la transcripción de *tral*, podría ser debido a que NgrR-AHLs o alguno de los LuxR huérfanos activen su transcripción.

El perfil de AHLs de la doble mutante *ngrl::ΩTc/ tral::ΩKm* mostró que, aunque la cepa no tenga sus dos AHLs sintasas de los dos sistemas canónicos, aun es capaz de producir una AHL y se piensa que esto puede estar relacionado con que la cepa tiene una proteína de aciltransferasas parecida a una HdtS como la reportada en *P. fluorescens* F113, una proteína que no tiene ninguna similitud con las proteínas del tipo LuxI, pero que aun así es capaz de sintetizar AHLs en *P. fluorescens*.

Los perfiles de AHLs de la expresión heteróloga en *E. coli* de *Tral* y *NgrI* por separado, en un vector que depende de la inducción con IPTG para la transcripción de las AHLs sintasas (pSRK), mostraron nuevamente que en *S. fredii* NGR234; *NgrI* sintetiza al menos dos de las AHLs de mayor tamaño percibidas por la cepa biorepotera y *Tral* puede ser capaz de sintetizar cuatro AHLs, sobre todo de la molécula que se cree que corresponde a una 3-Oxo-C₈-HSL (Figura 19 y Figura 21). Debido a las limitantes en el uso de cepas como biosensor, no se sabe con certeza si *Tral* sintetiza dos moléculas de AHLs similares en estructura y tamaño a las de *NgrI*, o si comparte la síntesis de las mismas moléculas, por lo que para confirmar o descartar cualquiera de las dos opciones, así como para la correcta identificación de todas las señales producidas por la cepa, se tendrían que realizar la identificación con un método más sensible, por ejemplo, en HPLC acoplado a un espectrofotómetro de masas.

Para los cinco genes que codifican para las LuxR huérfanas encontradas en la cepa, se realizaron mutantes nulas por separado y mediante el análisis de los perfiles de AHLs no se logró concluir si juegan algún papel en la regulación de la percepción del quórum de *S. fredii* NGR234, puesto que no se observaron diferencias significativas en la producción de AHLs (Figura 18).

En los ensayos de medición de la actividad de la β-galactosidasa de las fusiones transcripcionales de las posibles regiones promotoras de los genes de los sistemas de

la percepción del quórum con *lacZ*, no podemos asegurar la actividad de cada uno de los promotores debido a los obstáculos mencionados en la sección anterior. Dichos análisis tendrían que repetirse en condiciones donde las diferencias de crecimiento de la bacteria no agreguen variabilidad a los datos obtenidos y en un vector que no posea actividad en la cepa silvestre de *S. fredii* NGR234 o bien con un casete con terminadores de la transcripción como un buen control negativo. Sin embargo, con los resultados obtenidos, se sospecha, que para la región donde se creía que podría estar el promotor de *traR* debido a que no se observó actividad específica de la enzima, el promotor no se encuentra en esa región. Tal vez esa región se encuentre en algún punto de la región promotora que se analizó para *tral*, por lo que estos dos genes podrían estar dispuestos en un operón de forma similar como sus homólogos en *A. tumefaciens*. Para confirmarlo se tendría que ir reduciendo esa región en las fusiones transcripcionales y realizar las mediciones en los diferentes fondos (Gráfica 1).

8. PERSPECTIVAS

- Demostrar si la posible HdtS de *S. fredii* NGR234 puede producir AHLs. Una forma de hacerlo es clonando la proteína en pSRK, realizar extractos de AHLs y visualizarlas en las placas de CCF.
- Realizar la separación de las diferentes AHLs producidas por la cepa mediante cromatografía en columna para su posterior detección en HPLC acoplado a un espectrofotómetro de masas para la correcta identificación de las moléculas señal.
- Realizar la medición de la actividad de la β -galactosidasa de las fusiones transcripcionales a lo largo del crecimiento de la cepa, en un mayor volumen o en un biorreactor, o bien analizar los promotores con un vector diferente en el que no se presenten los obstáculos para las mediciones como el pLESS. Una opción sería analizarlos con un vector con GFP que permita no depender de la DO de crecimiento de las cepas y medir en tiempo real la actividad de los promotores a lo largo de todo el crecimiento.

9. ABREVIATURAS

μ l	Microlitros
3-O-C ₁₂ -HSL	N-3-oxo-dodecanoil homoserín lactona
3-OH-C _{14:1} -HSL	N-(3-hidroxil7-cis-tetradecenoil) homoserin lactona
3-OH-C ₄ -HSL	N-3-hidroxibutiril-L-homoserín lactona
3-Oxo-C ₆ -HSL	N-3-oxohexanoil homoserín lactona
3-Oxo-C ₈ -HSL	N-3-oxo-octanoil-L-homoserín lactona
Acil-PTA	Proteína transportadora de acilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHL	Acil Homoserín Lactona
AI	Autoinductor
Ala	Alanina
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagína
Asp	Ácido aspártico
C	Citosina
C	Carbono
C ₁₀ -HSL	N-Decanoil-L-homoserín lactona
C ₄ -HSL	N-Butiril-L-homoserín lactona
C ₆ -HSL	N-Hexanoil-L-homoserín lactona
C ₇ -HSL	N-Heptanoil-L-Homoserin lactona
C ₈ -HSL	N-Octanoil-L-homoserin lactona
CCF	Cromatografía de capa fina
CoA	Coenzima A
DO	Densidad óptica
G	Guanina
g	gramos
GFP	Green fluorescent protein o Proteína verde fluorescente en español
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
Gm	Gentamicina
Gm ^R	Gentamicina resistente
H	Hidrógeno
h	Horas
HVH	Hélice-vuelta-hélice
Ile	Isoleucina
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
Km	Kanamicina

LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
Leu	Leucina
Lys	Lisisna
M	Concentración Molar
Mb	Megabases
Met	Metionina
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MYG	
N	Concentración normal
Nal	Ácido Nalidíxico
nm	Nanómetros
O	Oxígeno
Octanoil-CoA	Octanoil coenzima A conjugados
OH	Grupo hidroxilo
OOHL	N-3-oxo-octanoyl-L-homoserín lactona
P	Prolina
pb	Pares de bases
Phe	Fenilalanina
PTA	Proteína transportadora de acilo
PY	Peptone Yeast Extract Agar o Agar de extracto de levadura de peptona (en español)
R	Sustituyente
SAM	S-adenosilmetionina
Ser	Serina
T	Timina
Tc	Tetraciclina
Thr	Treonina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
Val	Valina
Val	Valina

10. BIBLIOGRAFÍA

- Covaceuszach, S., Degrassi, G., Venturi, V., & Lamba, D. (2013). Structural insights into a novel interkingdom signaling circuit by cartography of the ligand-binding sites of the homologous quorum sensing LuxR-family. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(10), 20578–20596. <https://doi.org/10.3390/ijms141020578>
- Czajkowski, R., & Jafra, S. (2009). Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta Biochimica Polonica*, *56*(1), 1–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287806>
- Danino, V. E., Wilkinson, A., Edwards, A., & Downie, J. A. (2003). Recipient-induced transfer of the symbiotic plasmid pRL1J1 in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is regulated by a quorum-sensing relay. *Molecular Microbiology*, *50*(2), 511–525. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03699.x>
- Farrand, K. Yinping, Q. and Philippe, O. (2002). *Quorum-sensing system of Agrobacterium plasmids: Analysis and utility*. *358*, 452–484.
- Fuqua, C., Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: Acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual Review of Genetics*, *35*, 439–468. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090913>
- Fuqua, Clay. (2006). The QscR quorum-sensing regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: An orphan claims its identity. *Journal of Bacteriology*, *188*(9), 3161–3171. <https://doi.org/10.1128/JB.188.9.3169-3171.2006>
- Gonza, J. E., Marketon, M. M., & González, J. E. (2003). Quorum sensing in nitrogen-fixing bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, *67*(4), 574–592. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.574>
- Gonzalez, J. E., & Keshavan, N. D. (2006). Messing with Bacterial Quorum Sensing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *70*(4), 859–875. <https://doi.org/10.1128/membr.00002-06>

- González, J. E., & Marketon, M. M. (2003). Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 67(4), 574–592. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.574>
- Hanzelka, B. L., & Greenberg, E. P. (1996). Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: Evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis. *Journal of Bacteriology*, 178(17), 5291–5294. <https://doi.org/10.1128/jb.178.17.5291-5294.1996>
- Hanzelka, B. L., Stevens, A. M., Parsek, M. R., Crone, T. J., & Greenberg, E. P. (1997). Mutational analysis of the *Vibrio fischeri* luxI polypeptide: Critical regions of an autoinducer synthase. *Journal of Bacteriology*, 179(15), 4882–4887. <https://doi.org/10.1128/jb.179.15.4882-4887.1997>
- He, X., Chang, W., Pierce, D. L., Seib, L. O., Wagner, J., & Fuqua, C. (2003). Quorum sensing in *Rhizobium* sp. Strain NGR234 regulates conjugal transfer (*tra*) gene expression and influences growth rate. *Journal of Bacteriology*, 185(3), 809–822. <https://doi.org/10.1128/JB.185.3.809-822.2003>
- Henke, J. M., & Bassler, B. L. (2004). Bacterial social engagements. *Trends in Cell Biology*, 14(11), 648–656. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.012>
- Hudaiberdiev, S., Choudhary, K. S., Vera Alvarez, R., Gelencsér, Z., Ligeti, B., Lamba, D., & Pongor, S. (2015). Census of solo LuxR genes in prokaryotic genomes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(March), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00020>
- Joachimiak, A., Zhang, R., Pappas, T., Brace, J., Miller, P., Bashkin, J., & Winans, S. (2009). Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with autoinducer-type pheromone and DNA. *Acta Crystallographica Section A Foundations of Crystallography*, 58(s1), c274–c274. <https://doi.org/10.1107/s0108767302095934>
- Khan, S. R., Gaines, J., Roop, R. M., & Farrand, S. K. (2008). Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of

TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), 5053–5062.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01098-08>

Krysciak, D., Grote, J., Orbegoso, M. R., Utpatel, C., Förstner, K. U., Li, L., ... Streit, W. R. (2014). RNA sequencing analysis of the broad-host-range strain *Sinorhizobium fredii* NGR234 identifies a large set of genes linked to quorum sensing-dependent regulation in the background of a *traI* and *ngri* deletion mutant. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(18), 5655–5671.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01835-14>

Laue, B. E., Jiang, Y., Chhabra, S. R., Jacob, S., Stewart, G. S. A. B., Hardman, A., ... Williams, P. (2000). The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl) homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology*, 146(10), 2469–2480. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2469>

Lin, L., Dai, S., Tian, B., Li, T., Yu, J., Liu, C., ... Hua, Y. (2016). DqsIR quorum sensing-mediated gene regulation of the extremophilic bacterium *Deinococcus radiodurans* in response to oxidative stress. *Molecular Microbiology*, 100(3), 527–541.
<https://doi.org/10.1111/mmi.13331>

Lithgow, J. K., Wilkinson, A., Hardman, A., Rodelas, B., Wisniewski-Dyé, F., Williams, P., & Downie, J. A. (2000). The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Molecular Microbiology*, 37(1), 81–97.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01960.x>

Majumdar, S., & Pal, S. (2017). Cross-species communication in bacterial world. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 11(2), 187–190.
<https://doi.org/10.1007/s12079-017-0383-9>

Mellbye, B., & Schuster, M. (2014). More than Just a Quorum: Integration of Stress and Other Environmental Cues in Acyl-Homoserine Lactone Signaling. *Bacterial Stress Responses*, Second Edition, (May), 349–363.

<https://doi.org/10.1128/9781555816841.ch20>

Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2002). Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), 165–199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>

Nealson, K. H., & Hastings, J. W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological Reviews*, 43(4), 496–518. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/396467><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC281490>

Patel, N. M., Moore, J. D., Blackwell, H. E., & Amador-Noguez, D. (2016). Identification of unanticipated and novel N-Acyl L-homoserine lactones (AHLs) using a sensitive non-targeted LC-MS/MS method. *PLoS ONE*, 11(10), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163469>

Quandt, J., & Hynes, M. F. (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene*, 127(1), 15–21. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90611-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90611-6)

Rivas, M., Seeger, M., Jedlicki, E., & Holmes, D. S. (2007). Second acyl homoserine lactone production system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), 3225–3231. <https://doi.org/10.1128/AEM.02948-06>

Sanchez-Contreras, M., Bauer, W. D., Gao, M., Robinson, J. B., & Downie, J. A. (2007). Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1483), 1149–1163. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2041>

Schmeisser, C., Liesegang, H., Krysciak, D., Bakkou, N., Le Quéré, A., Wollherr, A., ... Streit, W. R. (2009). *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), 4035–4045. <https://doi.org/10.1128/AEM.00515-09>

Tang, X., Guo, Y., Zhu, T., Tao, H., & Liu, S. (2019). Identification of quorum sensing signal AHLs synthases in *Candidatus Jettenia caeni* and their roles in anammox activity.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.192>

- TRINICK, M. J. (1980). Relationships Amongst the Fast-growing Rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their Affinities with Other Rhizobial Groups. *Journal of Applied Bacteriology*, 49(1), 39–53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1980.tb01042.x>
- Vannini, A., Volpari, C., Gargioli, C., Muraglia, E., Cortese, R., De Francesco, R., ... Di Marco, S. (2002). The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *EMBO Journal*, 21(17), 4393–4401. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf459>
- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 319–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>
- West, J. (1997). Cloning and expression of two human lysophosphatidic acid acyltransferase cDNAs that enhance cytokine-induced signaling responses in cells. *DNA and Cell Biology*, 16(6), 691–701. <https://doi.org/10.1089/dna.1997.16.691>
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M. L., Slater, H., Simpson, N. J. L., & Salmond, G. P. C. (2001). *Quorum-sensing in Gram-negative bacteria*. 25.
- Zheng, H., Mao, Y., Zhu, Q., Ling, J., Zhang, N., Naseer, N., ... Zhu, J. (2015). The Quorum Sensing Regulator CinR Hierarchically Regulates Two Other Quorum Sensing Pathways in Ligand-Dependent and -Independent Fashions in *Rhizobium etli*. *Journal of Bacteriology*, 197(9), 1573–1581. <https://doi.org/10.1128/jb.00003-15>

11. ANEXO

Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de las cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Medio de cultivo y composición del medio	Condiciones de crecimiento
<i>Escherichia coli</i> dH5α y S17-1	Medio LB: -Extracto de levadura 10 g/l -Peptona de caseína 5 g/l -NaCl 10 g/l -Agar bacteriológico 15 g/l	Incubar a 37 °C
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4(pZLR4)	Medio MM para placas de CCF para 100ml: -Manitol al 20% agregar 2.5 ml <ul style="list-style-type: none"> • -Sales de fosfatos 20x agregar 2ml. La composición de las sales de fosfato 20X es: K₂HPO₄ 60g/l o K₂HPO₄*3H₂O 78.6g/l • NaH₂PO₄ 20g/l o NaH₂PO₄*3H₂O 23g/l -Sales de nitrato 20X agregar 2ml. La composición de las sales de nitrato 20X es: <ul style="list-style-type: none"> • NH₄Cl 20g/l • MgSO₄*7H₂O 6g/l • KCL 3g/l • CaCl₂*2H₂O 0.26g/l • FeSO₄*7H₂O 0.05g/l -Agar bacteriológico 1.12 g -Xgal 20mg/ml agregar 333.3μl	Incubar a 30 °C
<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	Para la obtención de las mutantes se utilizó medio PY: -Extracto de levadura 5 g/l -Peptona de caseína 3 g/l -Agar bacteriológico 15 g/l	Incubar a 30 °C
	Para los extractos de AHLs las cepas se cultivaron en medio MYG -NH ₄ Cl 0.54g/l	Incubar a 30 °C

	<ul style="list-style-type: none">- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.205g/l- K_2HPO_4 1.5g/l- Glucosa 3g/l Ajustar el pH a 6.8 con H_3PO_4 2N Después de esterilizar agregar: <ul style="list-style-type: none">- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100X (stock 29g/l), agregar 10ml- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 500X (stock 4.5g/l), agregar 2 ml- Biotina 500X (stock 0.5g/l diluido con NaOH 1M), agregar 2ml	
--	---	--