



**UNIVERSIDAD NACIONALAUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD
LEÓN**

TEMA:

**CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE MUTANTES EN
SINORHIOBIUM MELILOTI INCAPACES DE SINTETIZAR
POLIAMINAS ESPECIFICAS**

MODALIDAD DE TITULACIÓN:

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS

P R E S E N T A:

**ANA CECILIA MÉNDEZ
SOTELO**

TUTOR:

**DR. MICHAEL F. DUNN
DR. ANTONIO HERNÁNDEZ LÓPEZ**





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.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Michael Frederick Dunn en el Laboratorio de Genómica Funcional de Procariotes del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM en Cuernavaca, Morelos.

El comité evaluador estuvo integrado por la Dra. Kalpana Nanjereddy, el Dr. Julio Amezcua Romero, el Dr. Julio Vega Arreguín, el Mtro. Eduardo Sánchez Sanmiguel y el Dr. Antonio Hernández López.

Durante la realización de esta tesis recibí una beca por parte de la UNAM proyecto PAPIIT (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica) No. IN206317.



Agradecimientos

Al doctor Michael F. Dunn por ser mi tutor y darme la oportunidad de trabajar en su equipo de laboratorio. Por todo su apoyo y conocimiento brindado antes, durante y después de mi estancia en el CCG.

Al todos los integrantes del laboratorio de Genómica Funcional de Procariotes: Victor, Alejandra y Victor Becerra por toda su ayuda y asesoría durante la realización del proyecto y por su compañerismo. A todas las personas, amigos, compañeros que conocí en Cuernavaca por hacer más agradable mi estancia y darme todo su apoyo y ayuda cuando lo necesité.

A mis profesores de la ENES León por todo su conocimiento, sus valiosos consejos y asesoría que nos han ido ofreciendo y compartiendo a lo largo de toda la carrera. Especialmente a la Dra. Harumi y el Dr. Julio Vega por ayudarme a crecer en el ámbito profesional y personal, por estar siempre al pendiente de cada uno.

A la UNAM ENES León y al CCG por otorgarme esta oportunidad y por toda la ayuda económica brindada.

A mis padres y hermanos por estar siempre conmigo en todo momento, por creer en mi e impulsarme a cumplir mis metas, por todo su amor, sus consejos y sus regaños, los amo.

A todos mis amigos y amigas por su valiosa amistad y cariño, especialmente le doy las gracias a mi compañera en esta aventura Leslie, por ser mi roomie, amiga, compañera y consejera durante este proyecto lejos de casa, gracias por estar conmigo en cada momento, por hacer más divertida nuestra vida en Cuernavaca y por los paseos y las comidas que me preparabas. Gracias por todo su apoyo.

A mi compañero de vida, Héctor; por motivarme siempre, por todo tu amor y cariño, por ser mi cómplice en todo lo que hago y por creer en mí, te amo.

ÍNDICE

1. Resumen	5
2. Abstract.....	6
3. Introducción	7
4. Antecedentes	9
4.1 Poliaminas	9
4.2 Vía clásica de la síntesis de poliaminas.....	10
4.3 Poliaminas en rizobias	11
4.4 <i>Sinorhizobium meliloti</i>	12
4.5 Síntesis de poliaminas en <i>Sinorhizobium meliloti</i>	13
4.6 Función de la vía alterna de poliaminas en procariotas	15
5. Justificación	17
6. Hipótesis	17
7. Objetivos	17
7.1 General	17
7.2 Específicos	17
8. Materiales y métodos	18
8.1 Medios de cultivo	18
8.2 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	20
8.3 Material genético	20
8.3.1 Protocolos moleculares	22
8.3.2 Extracción de DNA genómico	22
8.3.3 Extracción de DNA plasmídico	22
8.3.4 Análisis genético de mutantes por PCR.....	23

8.3.5	Electroforesis	23
8.4	Caracterización fisiológica	24
8.4.1	Ensayo de crecimiento celular	24
8.4.2	Cromatografía en capa fina (HPTLC)	25
8.4.3	Ensayo de motilidad tipo enjambre	25
8.4.4	Complementación química	26
8.4.5	Autoagregación	26
9.	Resultados	27
9.1	Confirmación de mutantes	27
9.2	Crecimiento celular	28
9.3	Perfil de poliaminas (HPTLC's)	36
9.4	Motilidad tipo enjambre (swimming)	39
9.5	Autoagregación	40
10.	Discusión	42
11.	Conclusiones	46
12.	Referencias bibliográficas	47

1. RESUMEN

Las poliaminas son pequeñas moléculas policatiónicas presentes en casi todos los organismos y están relacionadas con un sinnúmero de procesos biológicos dentro de estos. En bacterias, se ha descrito que participan en diferentes procesos como crecimiento, resistencia a estrés abiótico, patogenicidad, entre otros. Dentro de las bacterias rizobias, las poliaminas también se han estudiado por su importancia en la relación simbiótica con leguminosas, favoreciendo esta misma; sin embargo, se conoce poco sobre sus efectos en otros procesos fisiológicos. *Sinorhizobium meliloti*, modelo de estudio de este proyecto es una rizobia simbiote de la alfalfa y el estudio de las poliaminas dentro de esta especie ha sido de gran interés para dilucidar las funciones que ejercen estas moléculas en diferentes procesos biológicos. En el presente trabajo se estudiaron e identificaron las funciones biológicas que ejercen las poliaminas espermidina (Spd), noespermidina (NSpd) y diaminopropano (Dap) sintetizadas por *S. meliloti* a través de mutantes incapaces de sintetizarlas. Hasta el momento, demostramos que la mutación en el gen que codifica la enzima CANSDH involucrada en la síntesis de Spd (*cansdh*) reduce hasta un 23% y 24% el crecimiento celular bajo estrés ácido y salino respectivamente y que la aplicación exógena de Spd (1mM) puede restaurar el crecimiento de la bacteria similar a la cepa silvestre (wt). En cambio, la presencia de otra fuente de Carbono parece no causar ningún efecto en ninguna de las dos cepas mutantes (*cansdh* y *dabaat*). Por otro lado, la ausencia de Spd disminuye la capacidad de la bacteria de moverse a través de una superficie (enjambre), contrario a lo que sucede con la mutante *dabaat*. La falta de NSpd sintetizada a través de la enzima DABAAT no tuvo diferencia alguna en los ensayos de motilidad en comparación con la wt. Encontramos también que la Spd, NSpd y Dap no están involucradas en la agregación bacteriana de *S. meliloti* Rm8530.

2. ABSTRACT

Polyamines are small polycationic molecules present in almost all organisms and are important for many biological processes. In bacteria, their function in growth, resistance to abiotic stress, pathogenicity, and other processes, has been described. In rhizobia, polyamines have also been well studied due to their presumed importance in the symbiotic relationship with legumes, however, little is known about their effects on physiological processes in free life. *Sinorhizobium meliloti*, is a rhizobial symbiont of alfalfa and a genetically and biochemically well defined model organism among rhizobia. For this reason, the study of polyamines in this species facilitates the elucidation of the functions performed by these molecules in different biological processes. The present work is based on the identification and study of the roles exerted by the polyamines spermidine (Spd), norspermidine (NSpd) and diaminopropane (Dap) synthesized by *S. meliloti* by using mutants unable to synthesize them. We demonstrate that the mutation in the gene encoding CANS DH, required for Spd synthesis (*cansdh*), reduces growth under acid and saline stress 23% and 24%, respectively and that exogenous Spd (1mM) restores growth to wild type levels. In contrast, the presence of different carbon sources seems to have no effect on the growth of either mutant. The absence of Spd decreases the ability of the bacteria to move on surfaces (swimming), while, motility is unimpaired in a *dabaat* mutant, which presumably lacks NSpd. We also found that Spd, NSpd and Dap do not appear to be required for the cellular aggregation of *S. meliloti* Rm 8530.

3. INTRODUCCIÓN

Las poliaminas (PAs) son moléculas policatiónicas de bajo peso molecular presentes en todos los organismos incluyendo bacterias, arqueas y eucariotas; siendo la putrescina y espermidina las que se encuentran con mayor frecuencia. Están implicadas en una amplia variedad de procesos fisiológicos (Di Martino *et al.*, 2013; López-Gómez *et al.*, 2014), que incluyen procesos como: crecimiento, movilidad, resistencia a estrés abiótico, patogenicidad, replicación de DNA, transcripción, y traducción (Shah y Swiatlo, 2008; López-Gómez *et al.*, 2014)

Dentro de las bacterias, las PAs más abundantes son la putrescina (Put), cadaverina (Cad), espermidina (Spd) y en algunas especies se puede encontrar homoespermidina (Hspd) como PA alternativa de la Spd (Shaw *et al.*, 2010). Las funciones de éstas en las bacterias abarcan un amplio rango, desde ser componentes de las membranas externas en bacterias gram negativas como *Escherichia coli* hasta ser fundamentales en la patogénesis en especies como *Vibrio cholerae*. Además, actúan en la formación de biofilm y la síntesis de algunos sideróforos (Brickman y Armstrong, 1996; Patel *et al.*, 2006; Shah y Swiatlo, 2008).

Particularmente, en bacterias fijadoras de N₂ las PAs también han desarrollado un rol en las relaciones simbióticas con leguminosas. Las rizobias producen principalmente las poliaminas Put, Spd y Hspd, sintetizadas a partir de los aminoácidos precursores arginina y ornitina por las vías de la arginina descarboxilasa (ADC) y ornitina descarboxilasa (ODC), respectivamente (Dunn, 2015; Dunn, 2017; Becerra-Rivera *et al.*, 2018).

Las PAs han sido clave en el estudio de dicho fenómeno dentro de varias especies de rizobias; una de ellas, *Sinorhizobium meliloti*, es una α -proteobacteria gram negativa que se encuentra tanto en vida libre como en asociación simbiótica con algunas especies de leguminosas, entre ellas, la alfalfa (*Medicago sativa*) (Galibert *et al.*, 2001; Finan, 2015).

S. meliloti a diferencia de otras bacterias requiere de una vía alternativa para la síntesis de Spd (Becerra-Rivera *et al.*, 2018), que se sintetizan a partir de la Put por la carboxinorespermidina deshidrogenasa (CANSDH) (Shaw *et al.*, 2010). Además *S. meliloti* contiene una ruta para la síntesis de norespermidina (NSpd), que no se ha reportado anteriormente en otras rizobias y diaminopropano (Dap) por la enzima ácido diaminobutírico transferasa (DABAAT) (Karatan *et al.*, 2005; Becerra-Rivera *et al.*, 2018).

La mayoría de los estudios de PAs en rizobias incluida *S. meliloti*, se centra en entender e identificar las funciones que ejercen estas moléculas en esta interacción mutualista, dejando de lado procesos fisiológicos en vida libre. Por ello, el presente trabajo tiene por objeto la caracterización fisiológica de mutantes de *S. meliloti* diseñadas para interrumpir pasos claves en la biosíntesis de Dap, NSpd y Spd.

4. ANTECEDENTES

4.1 Poliaminas (PAs)

Las PAs son moléculas policatiónicas, alifáticas y de bajo peso molecular, constituidas por un esqueleto hidrocarbonado y al menos dos grupos amino (NH_2) (Schneider y Wendisch, 2011). Con base en los cuales se pueden clasificar en diaminas, triaminas, tetraaminas, pentaminas y hexaminas.

Las PAs están presentes en todos los organismos eucariotas, procariotas y arqueas (Di Martino *et al.*, 2013, Kusano *et al.*, 2008). Su abundancia varía desde concentraciones micromolares hasta milimolares (Kim *et al.*, 2015); siendo la putrescina (Put) y espermidina (Spd) las PAs más comunes presentes en las células (Lee *et al.*, 2009).

Las PAs están asociadas a diversos procesos fisiológicos como: replicación de DNA, transcripción y traducción (Kim *et al.*, 2015). Debido a su carga positiva, son capaces de unirse a diferentes macromoléculas causando su estabilización o desestabilización (Kusano *et al.*, 2008); actúan como puentes electrostáticos entre las cargas negativas de los nucleótidos (Shah y Swiatlo, 2008), participan en conjunto con el Mg^{+2} y el RNA para la estabilización de estructuras, aceleran la síntesis de proteínas mediante su unión a ribosomas (Shah y Swiatlo, 2008), confieren resistencia a estrés abiótico, crecimiento, movilidad, formación de biofilm, patogenicidad, regulan la apoptosis, diferenciación y proliferación celular, entre otras (Schneider y Wendisch, 2011; Di Martino *et al.*, 2013; Palma *et al.*, 2013)

En bacterias, además de Put y Spd encontramos cadaverina (Cad) y Hspd (Shaw, 2010; Schneider y Wendisch, 2011; Palma *et al.*, 2013; López-Gómez *et al.*, 2014). Se sabe que en estos organismos las PAs ejercen funciones como: I) ser componentes de las membranas externas de bacterias gram negativas (*Salmonella entérica*, *E. coli* y *Proteus mirabilis*), por ejemplo: la Spd y Put tienen efectos sobre la función y producción de porinas (Patel *et al.*, 2006; Shah y Swiatlo, 2008); II) participar en la síntesis de compuestos quelantes de hierro (sideróforos) (Brickman y Armstrong,

1996); III) contribuir en la señalización y diferenciación celular; IV) inducir resistencia a estrés abiótico: la cadaverina, por ejemplo, disminuye los radicales superóxidos en *Vibrio vulnificus* aumentando la resistencia a estrés oxidativo (Shah y Swiatlo, 2008) y V) formar comunidades adheridas a superficies de tejido vivo formando una matriz de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (biofilm, Ej: *Vibrio cholerae* y *Yersinia pestis*) (Patel *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Flemming y Wingender, 2010; Schneider y Wendisch, 2011), promoviendo la expresión de factores de transcripción (Tales como: OppA, Cya, RpoS) (Miller-Fleming *et al.*, 2015).

4.2 Vía clásica para la síntesis de PAs

La síntesis de PAs en bacterias comienza con reacciones de descarboxilación de los aminoácidos L-lisina, L-ornitina, y L-arginina (Schneider y Wendisch, 2011). Se conocen dos vías principales para la producción de Put y han sido bien detalladas en el modelo de *E. coli* (Fig.1). La primera vía, parte de L-ornitina convirtiéndola en Put por acción de la ornitina descarboxilasa, también llamada ODC (codificada por el gen SpeC). La segunda vía, utiliza L-arginina y mediante una arginina descarboxilasa, nombrada como ADC (SpeA) forma agmatina, la cual posteriormente será hidrolizada por la agmatina ureohidrolasa (SpeB) obteniendo Put como producto final (Casero Jr y Pegg, 1993; Morris y Pardee, 1966; Patel *et al.*, 2006; Shah y Swiatlo, 2008; Schneider y Wendisch, 2011). La cadaverina, se sintetiza por una vía totalmente independiente que involucra la descarboxilación de L-lisina mediante la lisina descarboxilasa (LDC, Cada) (Becerra-Rivera *et al.*, 2018).

La síntesis de Spd está regulada bajo un operón que incluye los genes SpeD y SpeE (Shah y Swiatlo, 2008). Esta ruta inicia convirtiendo la metionina en S-adenosil metionina (SAM) por acción de la S- adenosil transferasa (codificada por metK), después la SAM es descarboxilada por la enzima SAM descarboxilasa (SpeD) y forma S- adenosil metionina descarboxilada. Esta molécula es clave en la síntesis de Spd, ya que es donadora de un grupo aminopropilo y con ayuda

de la espermidina sintasa (SpeE) convierte Put en Spd (Casero Jr y Pegg, 1993, Morris y Pardee, 1966).

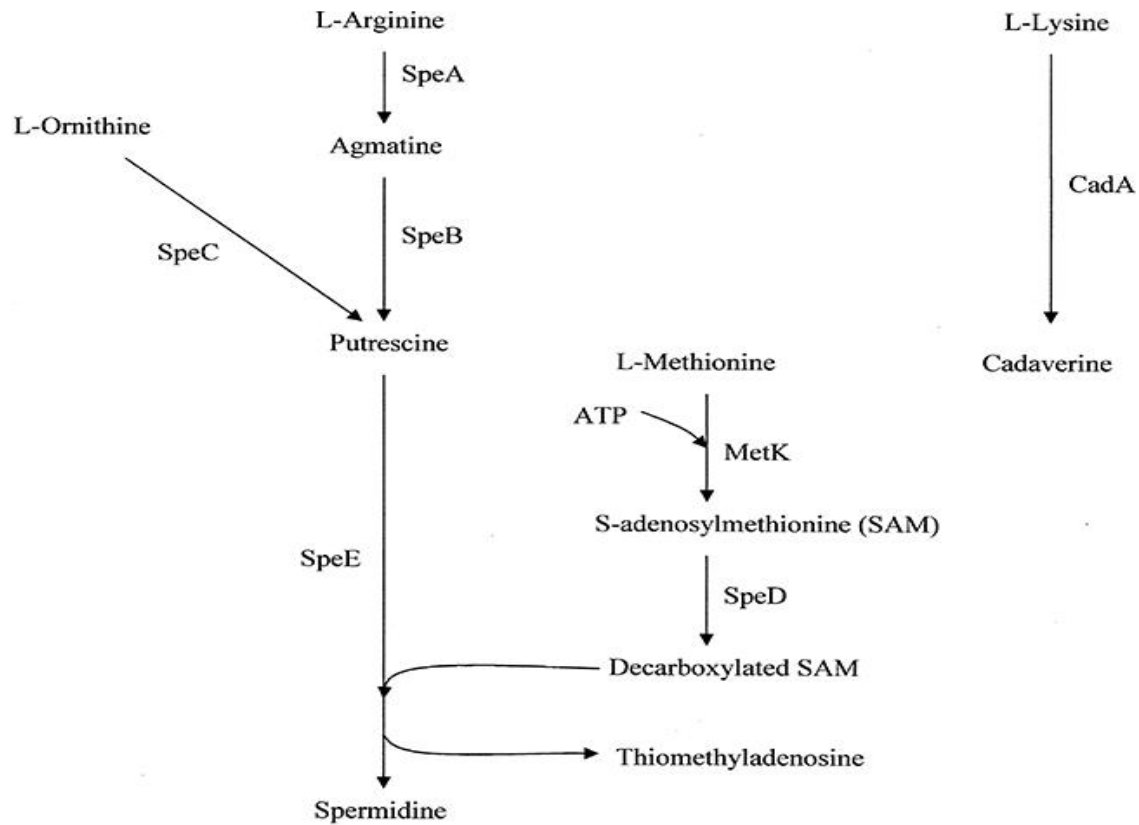


Fig 1. Esquema de la biosíntesis de PAs en *E. coli*. Las abreviaturas SpeA, SpeC, CadA, corresponden a las enzimas arginina, ornitina y lisina descarboxilasas respectivamente; SpeB, agmatina ureohidrolasa; SpeD, S- adenosil metionina descarboxilasa; SpeE, espermidina sintasa y MetK, metionina adeniltransferasa. Tomado de Shah, P., y Swiatlo, E. (2008).

4.3 Las PAs en rizobias

Las bacterias capaces de fijar N₂ en asociación con leguminosas se denominan rizobias y pertenecen a géneros como: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium*; entre otros (Fujihara, 2008; Dunn, 2017). Las rizobias se encuentran también de forma libre en el suelo

induciendo la formación de nódulos que se encargan de la fijación del nitrógeno disponible en el suelo a través de los bacteroides, reduciendo el N₂ a amoníaco de tal manera que sea asimilable para la planta (Galibert *et al.*, 2001; López-Gómez *et al.*, 2014). Por ende, las rizobias son de gran importancia fijando más del 50% del N₂ anualmente (Capela *et al.*, 2001).

Las rizobias tienen la capacidad de sintetizar PAs, que participan en el crecimiento normal de los rizobios, regulan la formación y actividad de los nódulos y proliferación del bacteroide (Vassileva, 1999). Además, se ha reportado que estas moléculas le confieren resistencia a estrés abiótico, mientras que en bacterias como *Rhizobium tropici* en asociación con *Phaseolus vulgaris* se ha mostrado que incrementa su concentración en nódulos lo que sugiere un mecanismo para tolerar el estrés salino (Fujihara, 2008; López-Gómez *et al.*, 2014).

Las PAs sintetizadas por las rizobias son la Put, Cad, Spd y en mayor cantidad la homoespermidina (Hspd) (Hamana, 1990; Vassileva, 1999). La Hspd es un análogo de la Spd que se encuentra en bacterias, algas, plantas y algunos vertebrados. Los nódulos formados por las rizobias albergan gran cantidad de Hspd, pero se desconoce el papel que ejerce dentro de estos órganos, así como su mecanismo fisiológico y regulatorio (Fujihara, 2008).

4.4 *Sinorhizobium meliloti*

Sinorhizobium meliloti es una α -proteobacteria gram negativa, endosimbionte de algunas especies leguminosas para la fijación de N₂ como *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*, también se puede encontrar en vida libre en la tierra y la rizosfera. Pertenece a la familia Rhizobiaceae de la subdivisión Alphaproteobacteria donde también se encuentran especies como *Bartonella*, *Brucella*, *Agrobacterium* y *Rhizobium* (Fuhrer *et al.*, 2005; Biondi *et al.*, 2009).

Se ha dado a conocer el genoma multipartito de *S. meliloti*, el cual contiene tres replicones grandes: el cromosoma de ~ 3.7 Mb, un megaplásmido de ~1.4 Mb (pSymA) y un crómido (pSymB)

de ~1.7 Mb (Galibert *et al.*, 2001; Finan, 2015; diCenzo *et al.* 2016). El análisis *in silico* del genoma de *S. meliloti* realizado por diCenzo *et al* (2016), arrojó que esta bacteria contiene 1,575 genes, 1,825 reacciones y 1,579 metabolitos. Debido a esto, tiene alta diversidad genética, encontrando gran variedad de elementos genéticos móviles (transposones, intrones móviles, secuencias de inserción) dentro de diferentes cepas de *S. meliloti*; así como también diversidad fenotípica (morfología de la célula, eficiencia de fijación de N) (Biondi *et al.*, 2009).

S. meliloti ha sido el sistema mejor estudiado de interacción rizobio-leguminosa; además, muestra otras características que la hacen interesante, como tolerancia a estrés salino u otros estreses abióticos y alto polimorfismo genético (Biondi *et al.*, 2009). Particularmente *Sinorhizobium meliloti* sintetiza Hspd, Put, Spd, y adicionalmente NSpd, mediante rutas alternas a la vía clásica (Becerra-Rivera *et al.*, 2018).

4.5 Síntesis de PAs en *S. meliloti*

Al igual que en *E. coli* la síntesis de Put en *S. meliloti* parte de los aminoácidos arginina y ornitina por las vías ADC y ODC respectivamente. La ADC produce agmatina (Agm) que posteriormente se convierte en Put por la agmatinasa (Becerra-Rivera *et al.*, 2018). Cad es sintetizado a partir de lisina por la LDC. Sin embargo, *S. meliloti* tiene genes homólogos que codifican para la síntesis de Spd por una vía “alterna” caracterizada anteriormente en *V. cholerae* y está presente en todas las subdivisiones de las Proteobacterias (Shaw *et al.*, 2010; Dunn, 2017; Becerra-Rivera *et al.*, 2018).

En *S. meliloti* la Spd requiere de la vía CANSDH/CANSDC. En la primera reacción la Put en conjunto con el aspartato β -semialdehído como donante del grupo carboxiaminopropilo por medio de la carboxinorespermidina deshidrogenasa (CANSDH) origina carboxiespermidina como

producto intermedio, posteriormente es descarboxilada por la carboxinorespermidina descarboxilasa (CANSDC) y genera Spd como producto final (Lee *et al.*, 2009; Shaw *et al.*, 2010).

Adicionalmente sintetiza NSpd utilizando las enzimas ácido diaminobutírico transferasa (DABAAT) y ácido diaminobutírico descarboxilasa (DABADC; Dunn, 2017) que genera 1,3-diaminopropano (Dap) para posteriormente ser convertida a carboxinorespermidina (CNspd) por la CANSDH, finalmente es transformada en NSpd por acción de la CANSDC.

La síntesis de Hspd requiere de dos moléculas de Put como precursora y posteriormente se forma por acción de la homospermidina sintasa (HSS). La ruta de la HSS está evolutivamente relacionada con la ruta CANSDH y se encuentra en muchas α -, γ - y δ -proteobacterias, particularmente en especies patógenas (Krossa *et al.*, 2016).

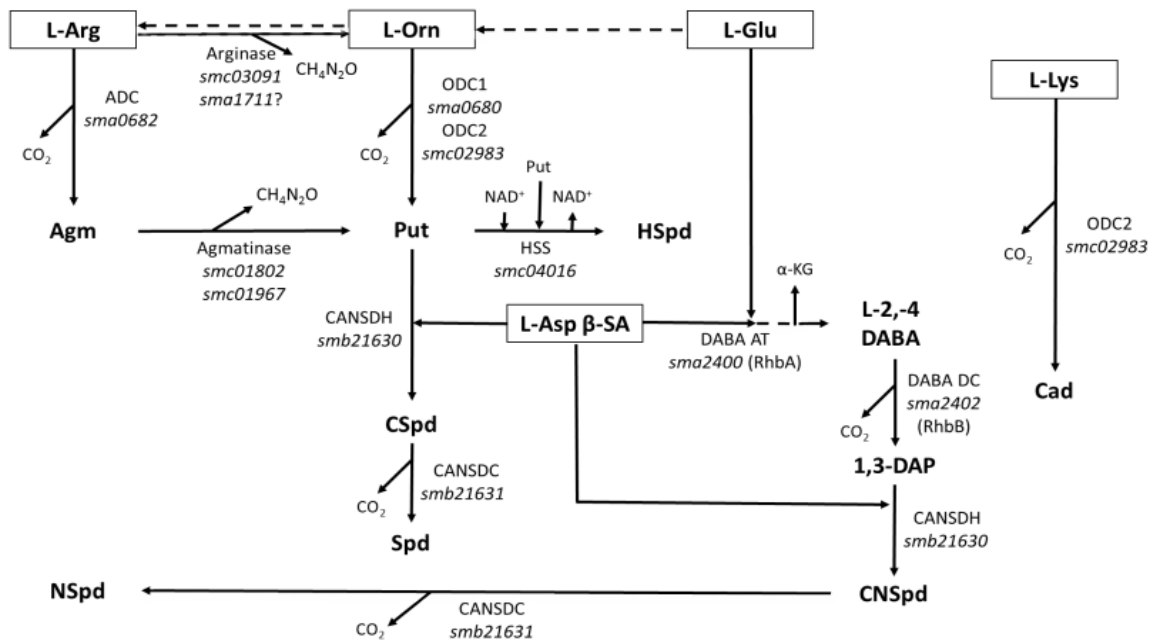


Fig 2. Vía de la biosíntesis de PAs en *Sinorhizobium meliloti* Rm8530. Las abreviaturas corresponden a: L-Arg, L-Orn, L-Lys, corresponden a los aminoácidos arginina, ornitina y lisina respectivamente; α -KG, α -cetoglutarato; CNSpd, carboxinorespermidina; CANSDC, carboxinorespermidina descarboxilasa; CANSDH, carboxinorespermidina deshidrogenasa; CSpd, carboxiespermidina; DABA, ácido diaminobutírico; DABA AT, ácido diaminobutírico aminotransferasa; DABA DC, ácido diaminobutírico descarboxilasa; L-Glu, L-glutamato; HSS, homospermidina sintasa; ADC, arginina descarboxilasa; ODC, ornitina descarboxilasa; L-Asp β -SA, L-aspartato β semialdehído. Tomado de Becerra-Rivera *et al* (2018).

4.6 Función de la vía alternativa de PAs en procariotes

Se ha evaluado la importancia de la vía CANSDH/CANSDC en diferentes especies bacterianas destacando su participación esencial en la formación de biofilm. Lee et al (2009), demostraron que la vía CANSDH/CANSDC es indispensable para la formación de biofilm en *V. cholerae*. Observaron además que la eliminación de estas enzimas disminuía hasta 10 veces la formación de biofilm y que este efecto puede ser remediado añadiendo NSpd. Por el contrario, la espermidina es incapaz de remediar la producción de biofilm, concluyendo que *V. cholerae* tiene mayor preferencia por la NSpd ya que es detectada por una proteína de unión a Spd, NspS (Karatan et al., 2005; Lee, 2009).

En contraste, Sobe et al (2017), proponen que la Spm (PA abundante en el intestino) tiene mayor importancia fisiológica actuando como una señal externa para controlar la formación de biofilm en *V. cholerae*, por lo tanto; la NSpd incrementa la producción de biofilm a través del sistema NspS/MbaA y la Spm inhibe la formación de biofilm (Sobe et al., 2017).

Las PA también se han encontrado en la formación de biofilm en rizobios. Particularmente *S. meliloti* 1021 codifica genes ortólogos para la detección de PA de dos componentes NspS/MbaA (smc00991 y smc00992, respectivamente), el primero es una proteína de unión periplásmica a Put y el segundo es una proteína de membrana integral (Dunn, 2015). Este sistema de detección de PA es similar al que se encuentra en *V. cholerae* descrito anteriormente.

Años más tarde, Hobley et al. (2014), pusieron a prueba la efectividad de la Spd para la producción de biofilm en *B. subtilis* y demuestran que al igual que en *V. cholerae* la Spd es necesaria para la formación de biofilm y que la Spd exógena puede restaurar la formación de biofilm en cepas mutantes en la biosíntesis de esta PA. A diferencia de *V. cholerae*, *B. subtilis* carece de la vía CANSDH/CANSDC y no puede sintetizar NSpd como lo hacen *V. cholerae* y *S. meliloti* (Hobley et al, 2014; Becerra-Rivera et al., 2018).

Además de demostrar la importancia de la Spd y/o NSpd para la formación de biofilm en algunas especies patógenas, también se ha estudiado su papel en el crecimiento celular. En *Campylobacter jejuni*, una especie perteneciente a las proteobacterias se requiere fundamentalmente de la Spd para su crecimiento y su función puede ser remplazada por la Hspd y por la NSpd, siendo esta última menos eficaz (Hanfrey et al., 2011).

Recientemente, Kim et al. (2015), informaron que al igual que en *C. jejuni* la Spd es absolutamente esencial para la α -proteobacteria *Agrobacterium tumefaciens*, en especial su grupo aminopropilo (Kim et al., 2015). En contraste con estos resultados, Sakanaka, et al. (2016) probaron una cepa mutante de *Bacteroides thetaiotaomicron*, la cual tenía una delección en el gen que codifica a una CASDC (análogo de CANSDC), que como ya se mencionó anteriormente está involucrada en la síntesis de Spd. Demostraron que *B. thetaiotaomicron* tiene una ruta de PAs similar a *C. jejuni* y que CASDC contribuye al crecimiento normal de la célula. Concluyendo, que la síntesis y acumulación de Spd es importante pero no esencial para el crecimiento normal de *B. thetaiotaomicron* (Sakanaka et al., 2016).

Con base en los antecedentes, creemos que las PAs (Spd y NSpd) podrán ejercer funciones dentro de *S. meliloti* en diferentes procesos como motilidad, crecimiento, formación de biofilm, agregación bacteriana, resistencia a estrés abiótico, entre otros.

5. JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento se cuenta con muy poca evidencia sobre las funciones de PAs en *S. meliloti*. Actualmente se ha publicado un estudio sobre el efecto en la inhibición de la síntesis de PAs (Becerra-Rivera et al., 2018); sin embargo, hace falta evidencia sobre posibles funciones dentro de los procesos fisiológicos de *S. meliloti* en vida libre. El desarrollo de mutantes de poliaminas particulares (NSpd, Dap y Spd) permitirá el esclarecimiento de sus papeles en la fisiología de *S. meliloti* Rm8530.

6. HIPÓTESIS

S. meliloti Rm8530 requiere PAs como Dap, NSpd y Spd para procesos fisiológicos como: crecimiento normal, agregación bacteriana y motilidad.

7. OBJETIVOS

7.1 General

Caracterizar fisiológicamente mutantes de *S. meliloti* Rm8530 incapaces de sintetizar poliaminas específicas (Dap, NSpd y Spd).

7.2 Específicos

- ✓ Confirmar genéticamente mutantes sencillas en los genes: *dabaat* y *cansdh* de *S. meliloti* Rm8530.
- ✓ Caracterizar el efecto de la ausencia de poliaminas específicas (Dap, NSpd y Spd) en el crecimiento con y sin estrés abiótico, motilidad y agregación bacteriana.
- ✓ Determinar el efecto de diferentes fuentes de C y N sobre la producción de poliaminas en cepas silvestres y mutantes de *S. meliloti* Rm8530.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

La fase experimental del presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Genómica Funcional de Procariotas del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM en Cuernavaca, Morelos.

8.1 Medios de Cultivo

Medio LB

5 g/L Extracto de levadura

10 g/L Peptona de caseína

5 g/L NaCl

1 ml/L de NaOH 1 N

Medio PY

0.5 g/L peptona

3 g/L extracto de levadura

15 g/L agar

10 ml/L de CaCl₂ a 0.7M

Medio Bf 0.3% agar

0.04% triptona

0.01% extracto de levadura

0.01% CaCl₂

0.3% agar noble Difco

Medio Mínimo (MM)

0.1 g/L MgSO₄

0.22 g/L K₂HPO₄

10 ml/L de CaCl₂ (2.2 g/100 ml)

10 ml/L NH₄Cl (5.3 g/100 ml)

1 ml/L FeCl₃ (0.1g/20 ml)

Medio mínimo salino (MM-NaCl)

0.1 g/L MgSO₄

0.22 g/L K₂HPO₄

10 ml/L de CaCl₂ (2.2 g/100 ml)

11 ml/L NH₄Cl (5.3 g/100 ml)

1 ml/L FeCl₃ (0.1g/20 ml)

17.56 g/L NaCl

Medio mínimo ácido (MM-pH 5.5)

0.1 g/L MgSO₄

0.22 g/L K₂HPO₄

10 ml/L de CaCl₂ (2.2 g/100 ml)

12 ml/L NH₄Cl (5.3 g/100 ml)

1 ml/L FeCl₃ (0.1g/20 ml)

Ajustar a pH 5.5

El medio mínimo succinato (MMS) contiene 10 mM de succinato y 10 mM de NH₄Cl.

El medio mínimo glucosa contiene 10 mM de L-glucosa y 10 mM de NH₄Cl.

8.2 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se resumen en la Tabla 1 (ver sección 8.3). Se utilizó *S. meliloti* Rm8530 como especie modelo obtenida del stock del laboratorio de Genómica Funcional de Procariontes del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM. Para el mantenimiento de las cepas transconjugantes se cultivaron en medio PY (sólido y/o líquido) con o sin antibióticos (según sea necesario): 200 µg/ml de estreptomicina (sm), 100 µg/ml de espectinomicina (sp) y 15 µg/ml de gentamicina (gm) según fuera necesario. Se almacenaron a 29°C por aproximadamente 24 h en constante agitación a 200 rpm. Para la reproducción de las cepas transformantes de *E.coli*, se cultivaron en medio LB (sólido y/o líquido) y se incubaron por 24 h a 37°C en agitación (200 rpm).

8.3 Material genético

Las secuencias de cebadores y los plásmidos utilizados en este estudio se enumeran en la Tabla 1 (ver sección 8.3). El proceso para la formación de mutantes fue realizado previamente mediante inactivación por inserción esencialmente como se describe en Becerra-Rivera *et al*, (2018). Para confirmar la construcción correcta de mutantes mediante PCR se diseñaron primers específicos que flanquean los sitios donde se insertó el casete de resistencia a Ω Sp en *cansdh* o loxSp en *dabaat*. Para el diseño se tomaron ~20 pb rio arriba y rio abajo del sitio de inserción y con ayuda del software oligo calculator se comprobó su %CG y se obtuvo la secuencia complementaria. Los cebadores se sintetizaron en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Tabla 1: Cepas, plásmidos y primers	
Cepa, plásmido o primer	Características relevantes
<i>Cepas de S. meliloti</i>	
Rm8530	Cepa 1021 <i>expR</i> ⁺ , Sm ^r (Becerra-Rivera <i>et al.</i> , 2018)
Rm8530 <i>cansdh</i> :: \wedge Sp-49	Rm8530 <i>cansdh</i> :: \wedge Sp-49, mutante nulo en <i>cansdh</i> , Sm ^r Sp ^r [M. Dunn]
Rm8530 <i>dabaat</i> :: <i>loxP</i> Sp DR2	Rm8530 <i>dabaat</i> :: <i>loxP</i> Sp, mutante nulo en <i>dabaat</i> , Sm ^r Sp ^r [M. Dunn]
Rm8530 <i>dabaat</i> :: <i>loxSp</i> DR3	Rm8530 <i>dabaat</i> :: <i>loxP</i> Sp, mutante nulo en <i>dabaat</i> , Sm ^r Sp ^r [M. Dunn]
Rm8530 <i>dabaat</i> :: <i>loxSp</i> DR4	Rm8530 <i>dabaat</i> :: <i>loxP</i> Sp, mutante nulo en <i>dabaat</i> , Sm ^r Sp ^r [M. Dunn]
<i>Cepas de E. coli</i>	
JM109	Cepa para clonación (colección del laboratorio)
DH5 α	Cepa para clonación (colección del laboratorio)
Plásmidos	
pJQ- <i>dabaat</i> :: <i>loxSp</i> -4	Rm8530 <i>dabaat</i> :: <i>loxP</i> Sp clonado en pJQ200SK ⁺ , Sp ^r Gm ^r [M. Dunn]
pJQ- <i>cansdh</i> :: Ω Sp-5	Rm8530 <i>cansdh</i> :: Ω Sp clonado en pJQ200SK ⁺ , Sp ^r Gm ^r [M. Dunn]
pHP45 Ω Sp	Fuente de elemento Ω Sp, Sp ^r (Prentki and Krisch 1984)
pJMS2 <i>loxSp</i>	Fuente de interposon <i>loxP</i> Sp, Sp ^r [Martinez-Salazar and Romero 2000]
pTZ- <i>dabaat</i> 600-9	Plásmido pTZ57R/T con el gen <i>dabaat</i> , Ap ^r
pCR2.1Topo- <i>cansdh</i> 600-8	Plásmido pCR2.1Topo con el gen <i>cansdh</i> , Km ^r
Oligonucleótidos	
MuthssF: GCC GGA ACT GCA CGT CCT GG	Oligo forward para <i>hss</i> , longitud: 20 nt
MuthssR: GTC GAA GTA GAA GCC GAG CCA G	oligo reverse para <i>hss</i> , longitud: 22 nt
MutCansdhF: CCA TGA GGA GCC GAA CAA GAT C	Oligo forward para <i>cansdh</i> , longitud: 22 nt
MutCansdhR: GTC CTT GGC GAG GCG GGC	Oligo reverse para <i>cansdh</i> , longitud: 18 nt
MutdabaatF: TCC GCG CCG CTT TCC CGT C	Oligo forward para <i>dabaat</i> , longitud: 19 nt
MutdabaatR: GTA GAA GCT GCC CGT GCG CC	Oligo reverse para <i>dabaat</i> , longitud: 20 nt

Ap^r, Km^r, Sp^r, Sm^r indican la resistencia a ampicilina, kanamicina, espectinomicina y estreptomina respectivamente.

8.4 Protocolos moleculares

8.4.1 Extracción de DNA genómico

A partir de un cultivo de *S. meliloti* Rm8530 de 5ml de medio PY líquido hasta la fase log a 29°C, se recuperaron las células por centrifugación a 7000 g por 2 minutos. Se lavaron las células con 1 ml de MgSO₄ 10mM y nuevamente se centrifugaron a 7000 g por 2 min, posteriormente se resuspendieron en 1 ml de TE 50:20 y se centrifugaron a 7000 g por 2 min.

Nuevamente se resuspendieron las células en 400 µl de TE 1X y se añadió 4 µl de RNAsa (100 mg/ml), 50 µl de SDS 10%, 55 µl de EDTA 0.5 M y 50 µl de proteinasa K (25 mg/ml), se incubó por 1 h a 37 °C. Seguido de esto, se lisaron con aguja insulínica (tres veces), después se realizó una extracción con fenol- cloroformo (300 µl- 300 µl) y seguido de una centrifugación a 14,000 g por 5 min para recuperar el sobrenadante (repetir este paso 3 veces).

Se realizó una segunda extracción únicamente con 500 µl de cloroformo y se precipitó el DNA agregando 1/10 de volumen de KOAc 3 M y 2 volúmenes de EtOH absoluto frío y se centrifugó a 14,000 g por 10 min. Se lavó con 700 µl de EtOH al 70%, seguido de una centrifugación, finalmente se secó la muestra y se resuspendió en 60 µl de H₂O estéril o TE 1X. Las muestras de DNA genómico se cuantificaron y se ajustaron a una concentración de 25 ng/µl. Se confirmó la integridad de las muestras por medio de electroforesis como se describe en la Sección 8.4.4.

8.4.2 Extracción de DNA plasmídico

Se realizó la preparación del DNA plasmídico de las cepas bacterianas de *E. coli* mediante minipreps. Se prepararon cultivos de 3 ml en medio LB líquido de pJQ-dabaat::loxSp-4 y pJQ-cansdh::ΩSp-5 enriquecido con el antibiótico correspondiente para cada cepa e incubados a 37 °C en agitación toda la noche. Se concentraron las células por centrifugación, se resuspendieron en 100 µl de solución I (25 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 50 mM glucosa) y se añadió 20 µl 10

mg/ml de solución con lisozima (0.250 mM tris pH 8, 0.01 g lisozima). Se dejaron reposar por 2 min a temperatura ambiente, seguido de esto se adicionaron 200 µl de solución II (20% SDS, 10 N NaOH, H₂O estéril), inmediatamente se colocaron en hielo durante 5 min y se añadió 150 µl de solución III (3 M KoAc, ácido acético glacial), nuevamente se colocaron en hielo durante 5 min. Se precipitó por centrifugado a 12,000 g por 5 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, posteriormente se añadió 1 ml de EtOH, se mezcló y se dejó reposar durante 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugó la muestra a 12,000 g por 5 min, se desechó el sobrenadante y se lavó con 1 ml de EtOH al 70%. Finalmente se secó la muestra y se resuspendió el pellet en 50 µl de TE/RNAsa (20 µg/ml).

8.4.3 Análisis genético de mutantes por PCR

Mediante la realización de PCRs con los primers diseñados para este proyecto se llevó a cabo la confirmación de las mutantes. Se llevaron a cabo reacciones de 10 µl que contenían 1 µl de DNA de las muestras, Taq poly master 2X 5 µl, primer Reverse (R) 0.25 µl, primer Forward (F) 0.25 µl y H₂O cantidad basta para 10 µl. Las reacciones se amplificaron usando las siguientes condiciones: 95 ° C por 30 segundos, 64° C y 56 °C por 30 segundos para *dabaat* y *cansdh* respectivamente y 72 ° C por 2.5 minutos, durante 35 ciclos.

8.4.4 Electroforesis

Se confirmaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% sumergidos en buffer TAE (0.04 M Tris· acetato/0.001 M ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)). Los productos de PCR se visualizaron por tinción con bromuro de etidio (solución de 0.2 µg/ml en buffer TAE) después de la electroforesis a 130 V, 30 min.

8.5 Protocolos para la caracterización fisiológica

8.5.1 Ensayo de crecimiento

Se cultivó la cepa silvestre de Rm8530 y las mutantes (*cansdh* y *dabaat*) en 5 ml de PY más antibióticos y se dejó crecer por 24 h a 29 °C en agitación a 200 rpm. Pasado el tiempo de incubación se utilizó 1 ml de los precultivos para inocular en 50 ml de MM (10 mM succinato/ 10 mM NH₄Cl; ver sección 8.1) con la mitad de antibiótico correspondiente a cada cepa y se dejó 24 h a 29°C en agitación. En algunos ensayos se varió la fuente de carbono cambiando succinato por glucosa (10 mM, ver sección 8.1).

Al día siguiente se centrifugaron los cultivos a 5500 x *g* por 8 min a 20 °C, se retiró el sobrenadante y se lavaron (2x) las células resuspendiéndolas en 25 ml de MM, nuevamente se centrifugaron a las mismas condiciones. Posteriormente se ajustaron a una OD₆₂₀ ~0.05 nm en 50 ml de MM, MMS/0.3 M NaCl, MMS/pH 5.5 y MM-Glucosa (ver sección 8.1) preparados previamente en matraces de 125 ml estériles por duplicado. El crecimiento fue monitoreado por densidad óptica a las 4 H, 8 H, 10 H, 24 H y 30 H posteriores a 30 °C. Después de la última lectura, se centrifugó 1 ml del cultivo, se aspiró el sobrenadante, se resuspendió en 500 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 5% y se mantuvieron por 16 horas a 4°C hasta su uso.

Se calculo el crecimiento específico de las cuatro lecturas obtenidas a las horas indicadas anteriormente mediante la fórmula:

$$\mu = (\log_{10} A_{620} t_{\text{final}} - \log_{10} A_{620} t_{\text{initial}}) 2.303 / \text{horas transcurridas}$$

μ es generaciones por hora

donde t está en horas

8.5.2 Análisis de PAs por medio de Cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC)

A partir de 1 ml de muestras obtenidas del ensayo de crecimiento, se centrifugaron a 5900 x *g* por 10 min y se prepararon en viales las alícuotas para la dansilación con 40 µl del sobrenadante de las muestras, 80 µl de Cloruro de Dansil (DNSC a 5mg/ml en acetona) y 40 µl de solución de Na₂CO₃ sobresaturada. Se colocaron las muestras a 80°C por 1 h, luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se añadió 20 µl de solución L-prolina (150 mg/ml) y se incubaron en oscuridad por 30 min. Posteriormente se realizó la extracción de las aminos dansilados dos veces con 100 µl de tolueno y se transfirió el sobrenadante a viales color ámbar. Se secaron las muestras bajo una corriente de gas nitrógeno y se resuspendieron en 40 µl de tolueno.

Para la muestra estándar se tomaron 4 µl cada una de las poliaminas (Spm, Spd, NSpd, Cad, Put, Dap y NH₄Cl; 0.3 mg/ml en agua) más cantidad basta para 40 µl de H₂O, más 80 µl de DNSCl y 40 µl de Na₂Cl₃ y se continuó la preparación como en las otras muestras. Se preparó previamente la cámara cromatográfica con una fase móvil de 120 ml de CHCl₃/Trietilamina (5:1 v/v). Finalmente se cargaron 10 µl de las muestras en una placa HPTLC de sílica-gel de 10 x 20 cm y se corrieron por aproximadamente 1 hora. Se visualizó la placa bajo UV.

8.5.3 Motilidad tipo enjambre (swimming)

Cuatro colonias pequeñas del mismo tamaño de cada cultivo fueron tomadas con un palillo estéril y se transfirieron a cajas con medio BF 0.3% agar noble. Se incubaron por 72 h a 29°C, pasado el tiempo se midieron los diámetros del nado y se calculó el promedio de las áreas obtenidas.

8.5.4 Complementación química

La complementación química se realizó paralelamente con los ensayos de crecimiento y motilidad. Para ello, se llevaron a cabo los ensayos de crecimiento y motilidad como se describe

anteriormente con la única diferencia de que a los medios se les adicionó 1mM de Spd estéril al momento del uso.

8.5.5 Ensayo de Autoagregación

El ensayo de autoagregación se realizó de acuerdo como se describe en Rachwał *et al* (2015) con algunas modificaciones. De un precultivo sólido, se inocularon en 5 ml de medio líquido MMS las cepas mutantes (*dabaat* y *cansdh*) por triplicado e incubaron por 24 H a 30 °C en agitación. Después de las 24 H se colocaron los cultivos sin agitación por 24 H a 30 °C. Posteriormente se tomó una muestra de 600 µl del sobrenadante y se midió OD₆₂₀ (A2), luego se vortexearon los cultivos por 30 segundos y se tomó una muestra para medir OD₆₂₀ (A1). El porcentaje de autoagregación se calculó de la siguiente forma: $[1-(A2/A1)] * 100$.

10. RESULTADOS

10.1 Confirmación de mutantes

Mediante una Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) se confirmaron las clonas mutantes en *cansdh* y *dabaat*, con el uso de oligonucleótidos (Tabla 1) que solo amplificaran el casete de Sp dentro de cada uno de los genes de interés (*cansdh*, *dabaat*), con el objetivo de obtener fragmentos cortos (~2.3 Kb). Para ello, primero se estandarizó la técnica con un gradiente de temperaturas para encontrar la temperatura óptima, obteniendo para Rm8530 *dabaat*::loxP Sp (*dabaat*) 64°C y 61°C para Rm8530 *cansdh*:: \wedge Sp-49 (*cansdh*).

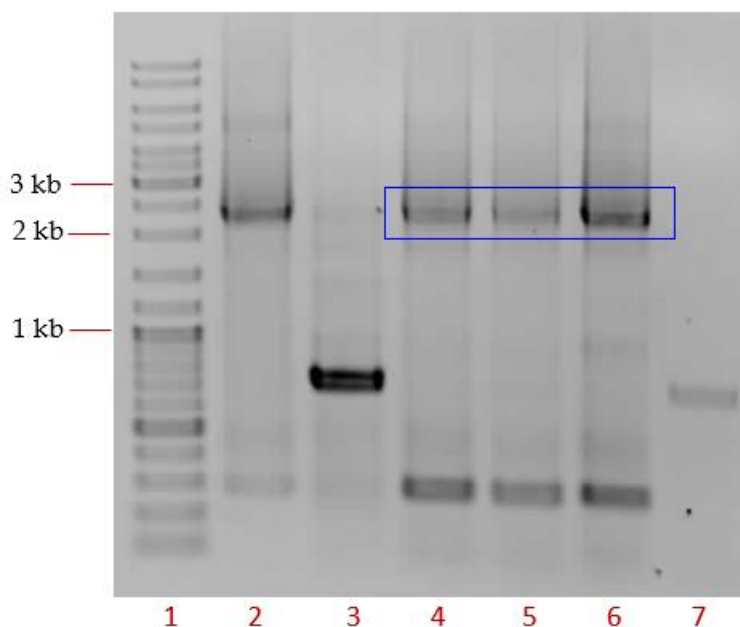


Fig 3. Gel de agarosa de los productos de PCR de la mutante de *S. meliloti* en *dabaat*. Los carriles corresponden a: 1, marcador de peso molecular (1KB); 2, control + (pJQ-*dabaat*::loxSp); 3, Rm8530 *dabaat*::loxSp; 4, Rm8530 *dabaat*::loxSp DR2; 5, Rm8530 *dabaat*::loxSp DR3; 6, Rm8530 *dabaat*::loxSp DR4 y 7, control - (Rm8530 wt). Las clonas mutantes confirmadas que contienen el casete de resistencia a Sp se encierran en un cuadro azul.

El ensayo de PCR reveló el patrón esperado para la mutagénesis de *dabaat* (carriles 4, 5 y 6, Fig. 3), el cual es similar a la construcción pJQ-*dabaat*::loxSp (~2.3 Kb) usado como control positivo. De estas

tres clonas confirmadas, se tomó una (Rm8530 *dabaat*::loxSp DR4 (*dabaat*); Fig. 3, carril 6) para la caracterización fisiológica.

De igual manera, el PCR para la mutagénesis de *cansdh* (Fig. 4, carril 3), el fragmento esperado corresponde al tamaño de la construcción pJQ-*cansdh*:: Ω Sp (~2 Kb). Cabe mencionar que para esta mutante se obtuvieron otros fragmentos no esperados que pudieran deberse a inespecificidades generadas por la PCR; sin embargo, el perfil de PAs también valida la mutación (Fig. 10).

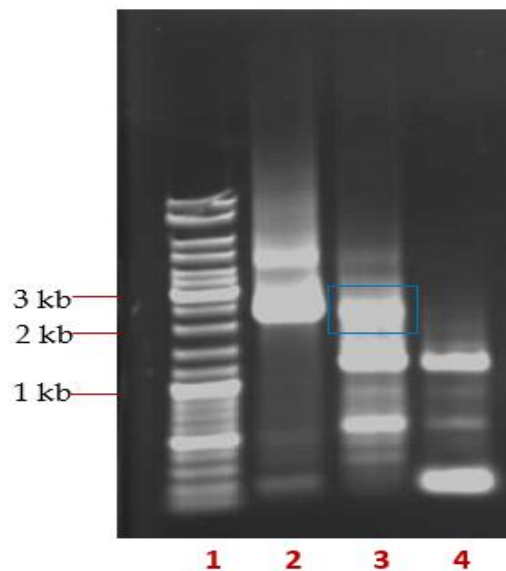


Fig. 4 Gel de agarosa de los productos de PCR de la mutante de *S. meliloti* en *cansdh*. Los carriles corresponden a: 1, Marcador de peso molecular (1 Kb); 2, control (+) (pJQ-*cansdh*:: Ω Sp); 3, Rm8530 *cansdh*:: Ω Sp-49 y 4, Control (-) (Rm8530 wt). En un cuadro color azul se encierra el fragmento que corresponde al tamaño del casete Ω Sp (~2.2 Kb) en *S. meliloti*.

10. 2 Crecimiento celular

Para determinar si la mutación en *cansdh* influye en el crecimiento celular se realizaron ensayos de crecimiento por densidad óptica en condiciones normales y diferentes estreses (ácido y salino). El crecimiento reveló que hay una disminución significativa del 23% ($p < 0.05$) en la cepa *cansdh* bajo estrés ácido y una disminución del 24% en estrés salino (Fig. 5) en comparación al crecimiento de la wt en MM sin estrés. La mayor diferencia en crecimiento de la mutante en

estrés ácido se observó entre las 8 y las 10 H, en las lecturas posteriores la mutante retoma su crecimiento normal e incrementa a niveles similares a la wt (Fig. 5). Para el crecimiento en estrés salino el patrón observado es diferente, la mutante inicia con un crecimiento normal hasta las 10 H y posteriormente disminuye su crecimiento en comparación tanto con la mutante en condiciones sin estrés (MM) como en la cepa wt.

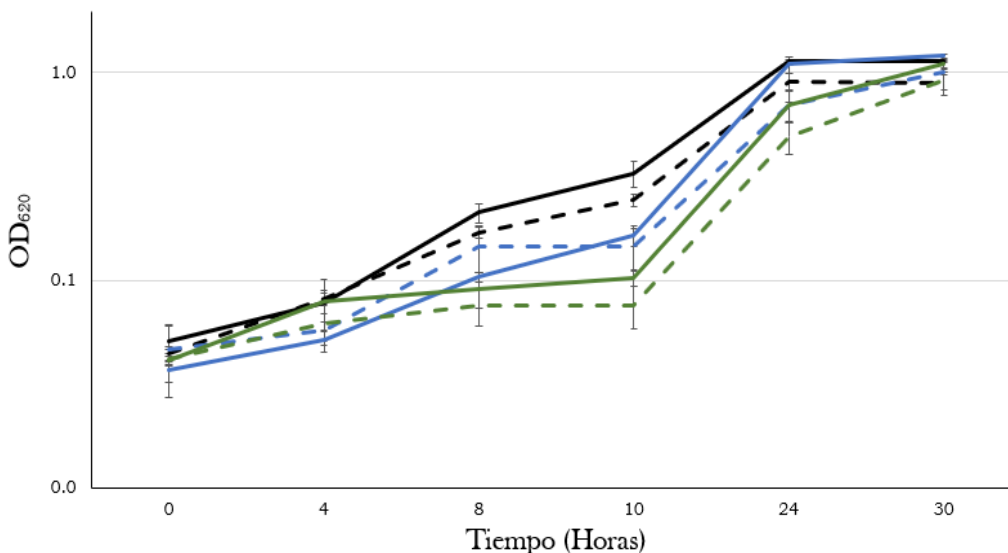


Fig 5. Crecimiento celular de la cepa mutante en *cansdh*. Representa el crecimiento de la mutante a través del tiempo bajo estrés ácido (pH 5.5) y estrés salino (NaCl 3M). Las líneas están representadas por: negro, Rm8530-MMS; línea negra punteada, *cansdh*-MMS; línea azul, Rm8530-NaCl; línea azul punteada, *cansdh*-NaCl; línea verde, Rm8530-pH; línea verde punteada, *cansdh*-pH. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

El análisis estadístico ANOVA reveló que hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos de la mutante con estrés comparados con el crecimiento de la bacteria wt y la mutante sin estrés (Fig. 6). Los análisis demostraron que aproximadamente el 84% del crecimiento entre las 4 y las 10 horas se debe a las condiciones de estrés al que se somete la bacteria independientemente de si es wt o mutante, el resto del crecimiento se debe a otros factores.

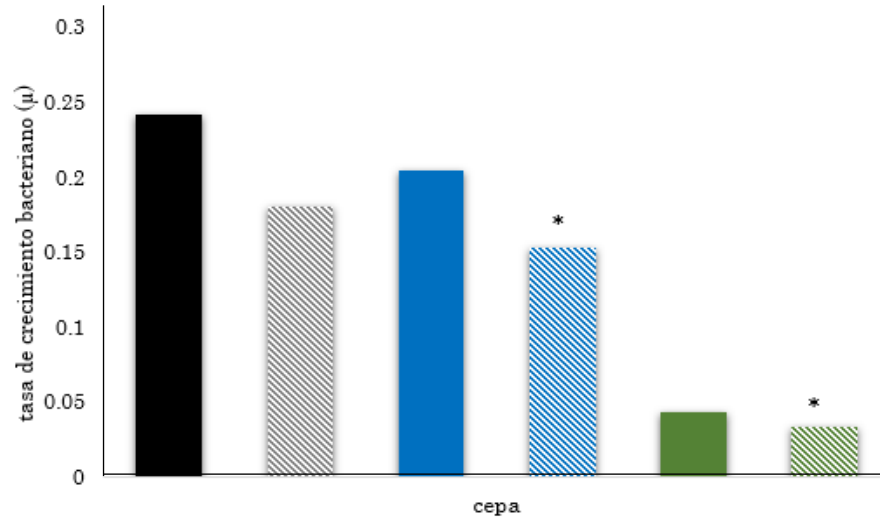


Fig 6. Crecimiento celular de la mutante en *cansdh*. Representa la tasa de crecimiento (μ) de la bacteria bajo estrés ácido (pH 5.5) y estrés salino (NaCl 3M). Las barras están representadas por: negro, Rm8530-MMS; barra negra rayada, *cansdh*-MMS; barra azul, Rm8530-NaCl; barra azul rayada, *cansdh*-NaCl; barra verde, Rm8530-pH; barra verde rayada, *cansdh*-pH. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes. Los asteriscos representan los resultados significativos usando ANOVA ($p < 0.05$).

Posteriormente, para determinar si la Spd exógena restaura el fenotipo de tolerancia a estrés ácido y salino, agregamos 1mM de Spd en condiciones de estrés. La figura 7, representa el crecimiento similar entre la cepa wt y la mutante *cansdh* en condiciones de estrés complementado con Spd exógena. Demostramos que no hay diferencias significativas entre la wt y la mutante complementada ($p < 0.05$); por lo tanto, se afirma que la Spd es necesaria para el crecimiento de *S. meliloti* en ambas condiciones de estrés, restaurando hasta niveles como la wt (Rm8530) el crecimiento celular.

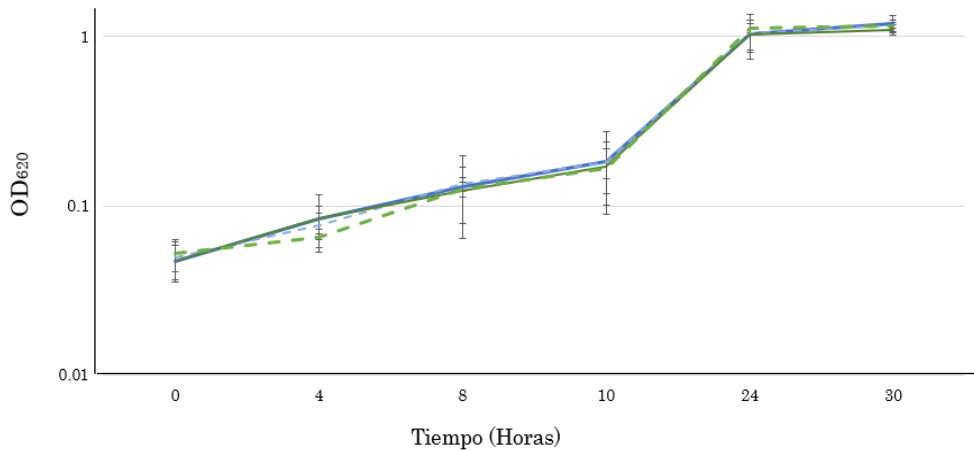


Fig 7. Complementación química de *cansdh* bajo estrés abiótico. Representa el crecimiento de la mutante bajo estrés ácido (pH 5.5) y estrés salino (NaCl 3M). Las líneas están representadas por: azul, Rm8530-NaCl; azul punteada, *cansdh*-NaCl; verde, Rm8530-pH; verde punteada, *cansdh*-pH. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

Evaluamos también el comportamiento del crecimiento de *dabaat* bajo estrés ácido y salino. Descubrimos que para esta mutante no hay diferencias significativas ($p < 0.05$) en su crecimiento bajo estrés salino o ácido (Fig. 8) comparada con la cepa wt, mostrando incluso un mejor crecimiento. En la Fig 8, se muestra que la cepa wt en condiciones de estrés ácido es significativamente menor ($p < 0.05$) en comparación con la mutante y la wt sin estrés entre las 4 y las 10 horas de crecimiento.

La complementación química del crecimiento del mutante *cansdh* con Spd indica que su presunta falta de NSpd no es la causa de su crecimiento reducido. Por lo tanto, la incapacidad del mutante *dabaat* para producir NSpd no debería causar un defecto de crecimiento, como se observa. También parece que la presunta ausencia de Dap en este mutante no tiene un efecto adverso en su crecimiento. Debido a que MM contiene una concentración relativamente alta de hierro, la síntesis del sideróforo rizobactina 1021, sintetizado bajo estrés por hierro en *S. meliloti* y siendo Dap uno de los precursores en la síntesis, tampoco sería necesario para el crecimiento normal.

Se espera que el mutante *dabaat* sea incapaz de sintetizar Dap, NSpd y el sideróforo rizobactina 1021 (Dunn, 2017). Observamos entonces que los efectos en el crecimiento generados por la mutante *cansdh* difieren totalmente de la mutante *dabaat*, y concluimos que Spd en lugar de NSpd o Dap es importante para el crecimiento normal, especialmente bajo estrés abiótico (Fig 5 y 6).

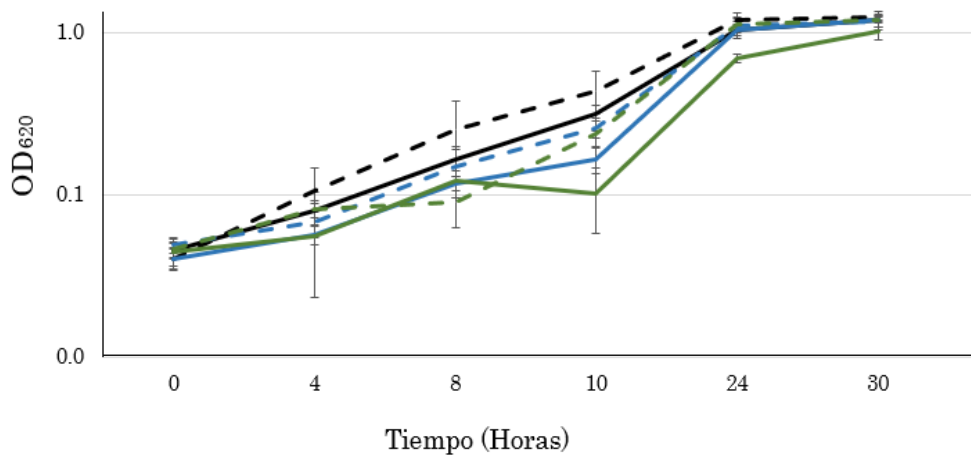


Fig 8. Crecimiento celular de la cepa mutante en *dabaat*. Crecimiento de la mutante bajo estrés ácido (pH 5.5) y estrés salino (NaCl 3M). Las líneas corresponden a: negra, Rm8530 -MMS; negra punteada, *dabaat* -MMS; azul, Rm8530 -NaCl; azul punteada, *dabaat* -NaCl; verde, Rm8530 -pH; verde punteada, *dabaat* -pH. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

Por otra parte, quisimos probar si existen otras condiciones de crecimiento donde la falta de Spd, Dap y NSpd influyen en el crecimiento de *S. meliloti*. Por ende, evaluamos en ambas mutantes (*cansdh* y *dabaat*) la glucosa en lugar de succinato como fuente de Carbono en condiciones normales (sin estrés). El succinato es una fuente de carbono gluconeogénico, la ruta principal de metabolismo usado por *S. meliloti* en simbiosis. En cambio, la glucosa es una fuente glicolítica y el metabolismo por esta vía en *S. meliloti* es probablemente importante en el suelo (diCenzo *et al.*, 2016). Observamos que no hay diferencias significativas ($p < 0.05$) en el crecimiento tanto en

la cepa wt como en las mutantes (Fig. 8), teniendo una tasa de crecimiento de 0.17 h^{-1} para ambas fuentes de Carbono. Por lo tanto, afirmamos que la bacteria hace uso por igual de la glucosa y el succinato como sustratos para su crecimiento y las PAs (Spd, Dap y NSpd) parecen no tener un papel en este caso.

Para corroborar estos datos, se utilizó una cepa doble mutante en ornitina descarboxilasa (*ode*) como control, anteriormente caracterizada por Becerra Rivera, *et al* (2018). Este mutante produce niveles muy bajos de Put Spd y HSpd y se ha confirmado que su crecimiento disminuye un 40% (Becerra-Rivera *et al.*, 2018).

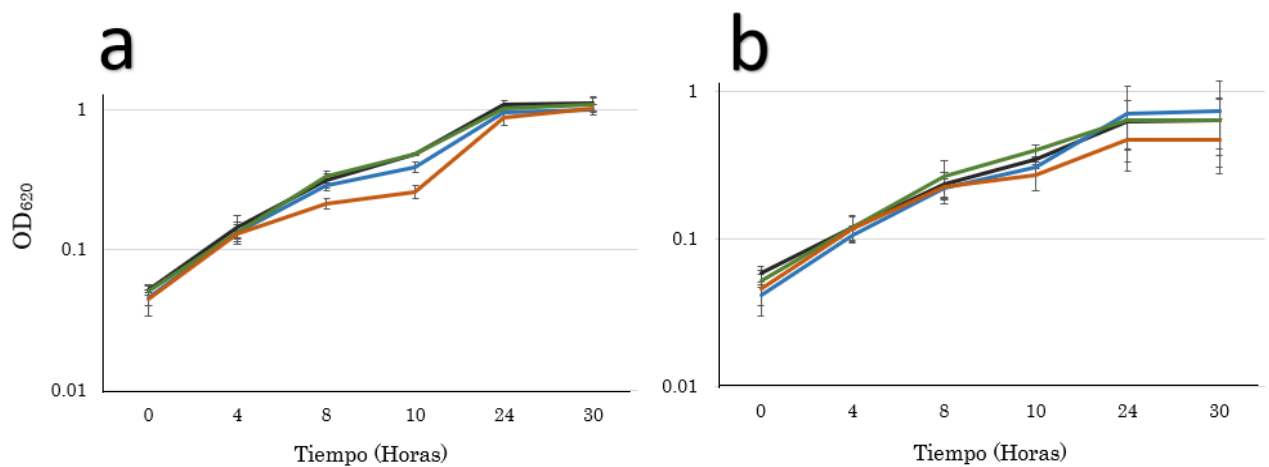


Fig 9. Crecimiento celular de las cepas mutantes en diferentes fuentes de Carbono. a) Crecimiento de las mutantes en medio mínimo suplementado con succinato como fuente de C. b) Crecimiento de las mutantes en medio mínimo suplementado con glucosa como fuente de C. Las líneas corresponden a: negro, Rm8530; azul, *cansdh*; verde, *dabaat*; naranja, 2983/0680 (doble mutante). Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

Para comprobar los datos obtenidos investigamos si hubo diferencias entre las unidades formadoras de colonias (UFC) y las curvas de crecimiento de las cepas mutantes *cansdh* y *dabaat* en crecimiento con glucosa o succinato; para ello, se tomaron muestras a las 8 horas de crecimiento. La figura 10 muestra el número de UFC de las diferentes cepas, observamos que los resultados no difieren con respecto a las OD₆₂₀ nm obtenidas en las curvas de crecimiento, a

excepción de la mutante *cansdh* crecida en medio con glucosa; sin embargo, este resultado puede deberse a errores durante el ensayo. Las grandes diferencias entre las desviaciones estándar sugieren que no haya diferencias reales, debido al manejo de números exponenciales; el conteo de ± 1 colonia en números exponenciales da la variación tan grande en las desviaciones.

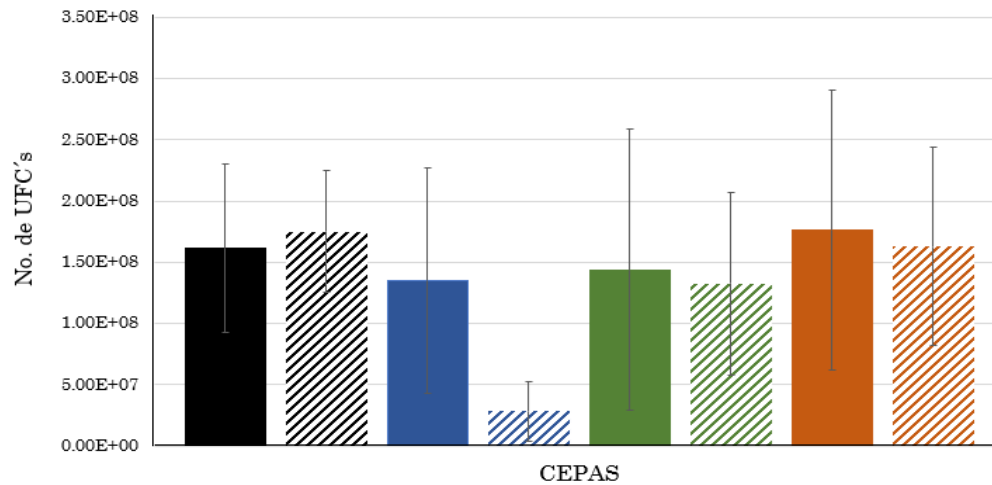


Fig 10. Conteo de UFC's de las mutantes en diferentes fuentes de Carbono. Las barras corresponden a: negro sólido, Rm8530- succinato; negro rayado, Rm8530 – glucosa; azul sólido, *cansdh*- succinato; azul rayado, Rm8530 *cansdh*- glucosa; verde sólido, *dabaat*- succinato; verde rayado, *dabaat*- glucosa; naranja sólido, 2983/0680 (doble mutante) y naranja rayado, 2983/0680. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

Después de observar estos resultados, se propuso probar otras fuentes de Carbono únicamente en la cepa wt. Para ello, utilizamos galactosa, citrato, malato, manosa, arabinosa, alanina y aspartato en condiciones normales (MM).

Los resultados mostraron que el uso de aminoácidos como fuentes de Carbono no tienen papel en el crecimiento de *S. meliloti* observando prácticamente un crecimiento nulo, contrario a lo que ocurre con los azúcares como fuentes de Carbono. Esto se debe a que en el metabolismo de *S. meliloti*, el succinato, malato y citrato entran directamente al ciclo de Krebs; la glucosa primero es metabolizada a piruvato en la glucolisis y posteriormente entra al ciclo de Krebs (Dunn, 1998);

la galactosa se metaboliza por la vía Deley-Duodoroff produciendo piruvato (Geddes y Ornesnik., 2012); la manosa es catabolizada a gliceraldehído 3-fosfato y luego entra a glucólisis; la arabinosa se degrada a 2-oxoglutarato que entra a ciclo de Krebs (Poysti et al., 2007) y la alanina según la base de datos KEGG no es catabolizada en *S. meliloti*.

Las mejores fuentes de Carbono fueron galactosa y malato con una tasa de crecimiento de 0.16 y 0.17 h⁻¹, respectivamente (Tabla 2); similar al crecimiento con succinato (0.17 h⁻¹) y glucosa (0.17 h⁻¹) que observamos anteriormente (Fig. 9). Como no se observó un mejor crecimiento de *S. meliloti* comparado con glucosa y succinato se optó por no probar estas fuentes de Carbono en las mutantes, sugerimos que se observaría un crecimiento similar en las mutantes como en la wt utilizando malato, galactosa y arabinosa como fuentes de C; en cambio, para los aminoácidos el crecimiento se vería afectado.

Tabla 2. Tasas de crecimiento de *S. meliloti* Rm8530 en condiciones normales (MMS) sin estrés con diferentes fuentes de Carbono.

Fuente de C	Crecimiento específico (h⁻¹)
Succinato	0.17
Glucosa	0.17
Malato	0.17
Manosa	0.02
Galactosa	0.16
Citrato	0.11
Alanina	0.006
Aspartato	0.04
Arabinosa	0.017

10. 3 Perfil de poliaminas

Para comprobar la presencia o ausencia de las PAs específicas se realizó la extracción de PAs de las muestras obtenidas en los ensayos de crecimiento mediante ácido tricloroacético (TCA) y se visualizaron por cromatografía en capa fina. El perfil de PAs, mostrado en la figura 11 reveló que bajo condiciones de estrés y control la Spd está ausente en la mutante en *cansdh*.

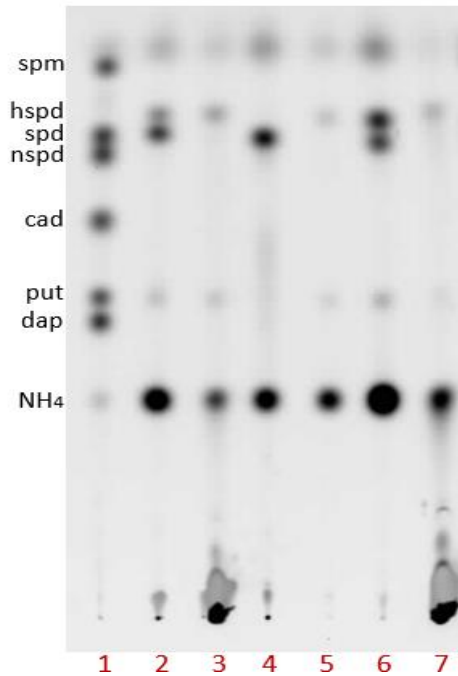


Fig 11. Perfil de poliaminas de la mutante en *cansdh*. Muestra la presencia o ausencia de las PAs en una placa de TLC de las muestras obtenidas a las 30 hrs del ensayo de crecimiento celular. Los carriles corresponden a: 1, estándar (spm, spd, nspd, cad, put, dap, NH₄); 2, Rm8530 wt-MMS; 3, *cansdh*-MMS; 4, Rm8530 wt - NaCl; 5, *cansdh*-NaCl; 6, Rm8530- pH; 7, *cansdh*- pH.

Por otra parte, el perfil de poliaminas de la mutante *dabaat* mostró la presencia de otras PAs libres como Spd y HSpd en todas las condiciones sin estrés (MMS) y estrés ácido a diferencia del crecimiento bajo estrés salino, donde observamos que se inhibe la síntesis de HSpd. Comprobamos en todas las condiciones que está ausente la NSpd, debido a que es una molécula que se encuentra ligada a otras macromoléculas, por lo tanto, requiere de otros métodos de extracción para poder visualizarse (Becerra-Rivera *et al.*, 2018, Fig. 12).

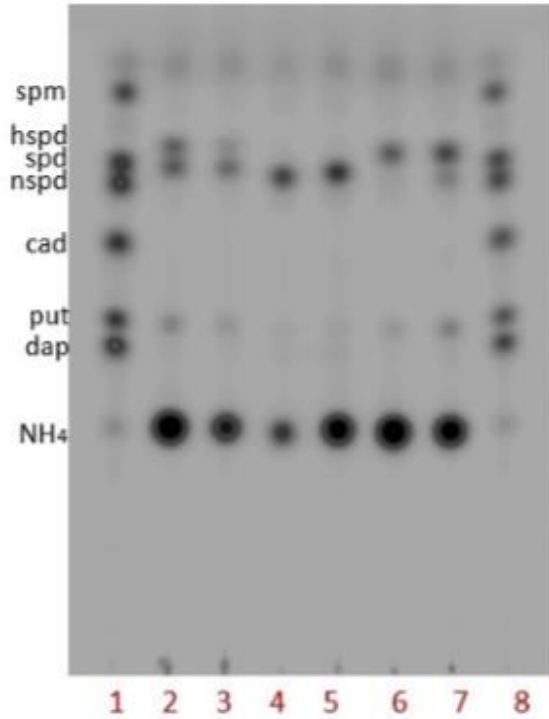
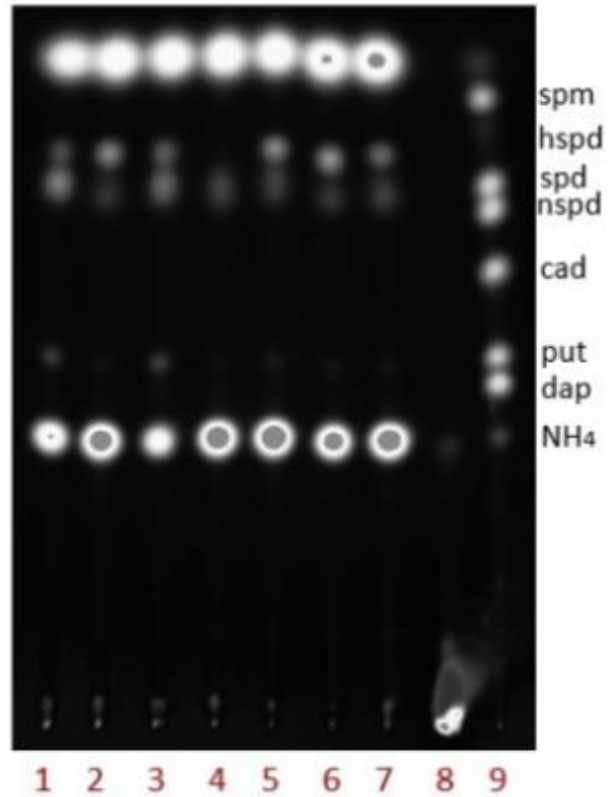


Fig 12. Perfil de poliaminas de la mutante en *dabaat*. Muestra la presencia o ausencia de las PAs en una placa de TLC de las muestras obtenidas a las 30 horas del ensayo de crecimiento celular. Los carriles corresponden a: 1, estándar (spm, spd, nspd, cad, put, dap, NH₄); 2, Rm8530 wt- MMS; 3, *dabaat*-MMS; 4, Rm8530 wt- NaCL; 5, *dabaat*-NaCL; 6, Rm8530 wt- pH; 7, *dabaat*-pH; 8, estándar.

El perfil de PAs de células crecidas con diferentes fuentes de C (succinato o glucosa), reveló que el patrón de PAs es similar entre las cepas crecidas con succinato y las crecidas con glucosa. Con excepción de la mutante *cansdh* crecida en glucosa (Fig. 13, carril 4) no se observó síntesis de Hspd y en la cepa doble mutante (Fig. 13, carril 8) no hay evidencia de la presencia de PAs (Fig. 13). La aparición de la Spd en la mutante *cansdh* (Fig. 13, carril 3) probablemente se deba a alguna contaminación en el proceso de extracción de PAs; ya que anteriormente observamos que la mutante carece de esta PA.

Fig 13. Perfil de poliaminas de las mutantes bajo crecimiento en succinato o glucosa. Muestra la presencia o ausencia de las PAs en una placa de TLC de las muestras obtenidas a las 30 horas del ensayo de crecimiento celular en succinato o glucosa. Los carriles corresponden a: 1, Rm8530 -succ; 2, Rm8530-glu; 3, *cansdh*-succ; 4, *cansdh*-glu; 5, *dabaat* -succ; 6, *dabaat* -glu; 7, 2983/0680-succ; 8, 2983/0680-glu; 9, estándar (spm, spd, nspd, cad, put, dap, NH₄).



También observamos que, en ausencia de la Spd, la mutante sintetiza Hspd, lo cual se revierte al añadirle Spd exógena 1 mM al medio (Fig. 14). En la Fig. 14 no se observan diferencias entre la wt y la cepa mutante; por lo tanto, podemos inferir que la Spd exógena restablece el fenotipo de *cansdh* previamente observado en la Fig. 11.

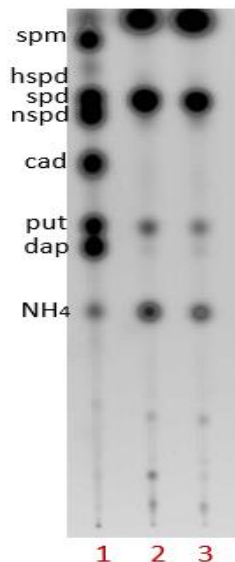


Fig 14. Perfil de poliaminas de la complementación química de *cansdh*. Representa la presencia de las PAs en una placa de TLC de las muestras obtenidas del ensayo de complementación química (spd 1mM) de la mutante bajo estrés ácido. Los carriles corresponden a: 1, estándar (spm, spd, nspd, cad, put, dap, NH₄); 2, Rm8530; 3, *cansdh*.

10. 4 Motilidad tipo enjambre (swimming)

Investigamos si las mutaciones en estos genes importantes en la vía de biosíntesis de PAs en *S. meliloti* afectaban su capacidad de trasladarse a través de una superficie semisólida (enjambre). El área de desplazamiento mostrado para *cansdh* en el ensayo de motilidad fue aproximadamente 1/3 menor que el área de desplazamiento de la cepa wt (Fig. 15). La disminución de su movimiento de la mutante *cansdh* sugiere que la falta de Spd podría ser un factor clave que afecta la capacidad de la bacteria de moverse.

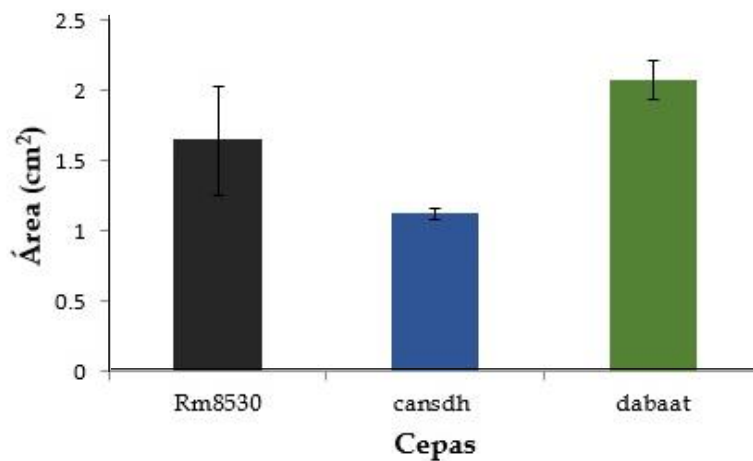


Fig 15. Ensayo de motilidad tipo enjambre de las mutantes en *cansdh* y *dabaat*. Las barras corresponden a: negro, Rm8530; azul, *cansdh*; verde, *dabaat*. Los datos representan las medias de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

Para comprobar esto, realizamos la complementación química con 1 mM de Spd, y curiosamente observamos que el fenotipo no se revierte, si no que ocurre lo contrario, se inhibe por completo el crecimiento y por ende el desplazamiento aún en condiciones control (Fig.16). En la Fig. 16 se muestran las cepas de *cansdh* y Rm8530 wt en cajas con medio agar Bf, el punto que se encuentra al centro es el área de desplazamiento de las cepas, observando que ambas tienen un área similar; es decir, no hubo desplazamiento de la bacteria a través del medio.

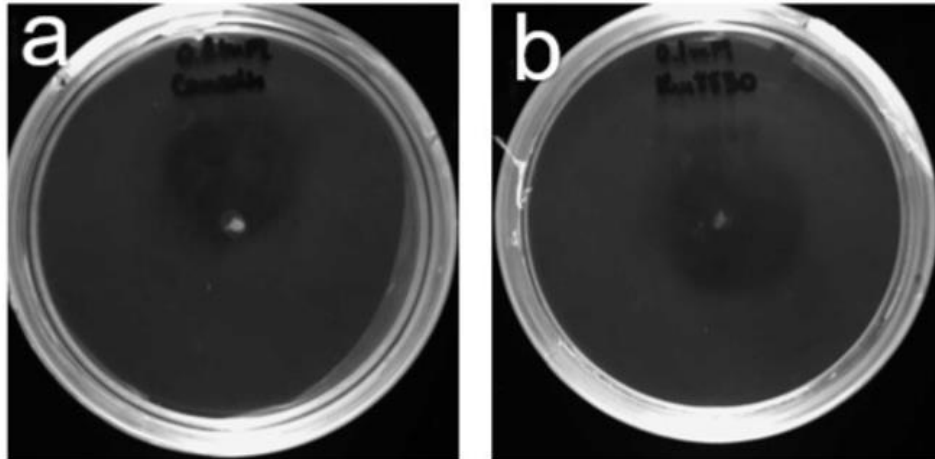


Fig 16. Ensayo de motilidad tipo enjambre de las mutantes complementado con 1 mM de spd. a) Rm8530 *cansdh::ΩSp-49* y b) Rm8530.

En comparación con *cansdh*, *dabaat* no mostró ningún efecto por la falta de NSpd y Dap. Como se observa en la Fig. 15 no hubo diferencia en el área desplazada entre la cepa wt y la mutante *dabaat*. Lo que sugiere que la ausencia del gen que codifica para la enzima ácido diaminobutírico aminotransferasa (DABAAT) no genera cambios dentro de esta función en *S. meliloti* 8530.

10. 5 Autoagregación bacteriana

La agregación bacteriana es la capacidad de las bacterias de unirse entre sí para formar microcolonias. Con el fin de evaluar las PAs implicadas en este fenómeno las mutantes fueron crecidas en medio mínimo MMS para medir su capacidad de agregarse. Sin embargo, no se observó ningún efecto sobre este fenómeno en particular, lo que nos indica que al menos la Spd, NSpd o Dap no están implicadas en la autoagregación de *S. meliloti* 8530 (Fig. 17).

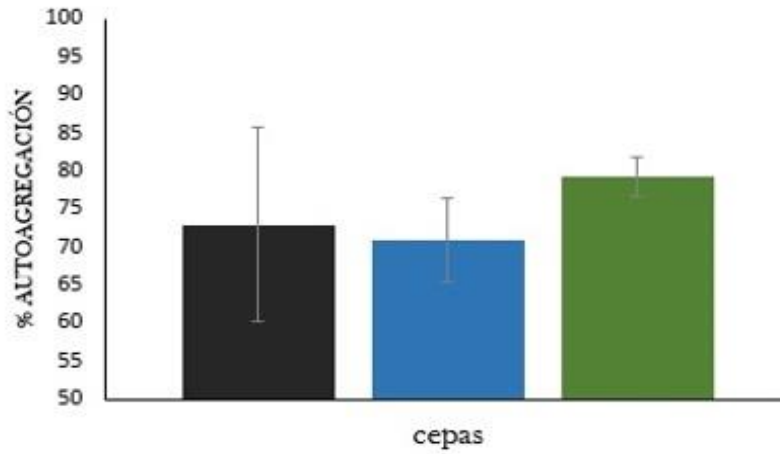


Fig 17. Ensayo de agregación de las mutantes en *cansdh* y *dabaat*. Las barras corresponden a: negro, Rm8530; azul, *cansdh*; verde, *dabaat*. Los datos representan las medias de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

11. DISCUSIÓN

La confirmación de las mutantes *cansdh* y *dabaat*, dio lugar a la caracterización fisiológica, demostrando que la ausencia de la enzima carboxinorespermidina deshidrogenasa (CANSDH) causa una reducción en el crecimiento de la bacteria bajo estrés salino y ácido. Shamseldin, *et al* (2006), identificaron un grupo de proteínas sobreexpresadas en *S. meliloti* bajo estrés salino, dentro de estas se encuentra la carboxinorespermidina descarboxilasa (CANSDC) que conduce a la síntesis de Spd. De acuerdo con estos hallazgos, las PAs actúan como osmoprotectores bajo estrés salino debido a su naturaleza catiónica, además participan como eliminadores radicales y reguladores de canales K (Shamseldin *et al.*, 2006). Por lo tanto, inferimos que la Spd trabaja de manera similar para su crecimiento en ambientes salinos y ácidos.

De acuerdo con Dominguez-Ferreras *et al* (2006), las altas concentraciones de sal pueden ser perjudicial para las rizobias; sin embargo, estas cuentan con mecanismos de adaptación osmótica cuando se encuentran bajo estrés salino. Entre sus mecanismos se encuentra la acumulación de solutos orgánicos como: aminoácidos, azúcares y poliaminas; y la acumulación de iones (Dominguez-Ferreras *et al.*, 2006). Además, encontraron que *S. meliloti* tiene preferencia en la inducción de genes del plásmido pSymB lo que sugiere ser necesario para la adaptación al estrés osmótico (Dominguez-Ferreras *et al.*, 2006). Ruberg *et al* (2003), determinaron que cuando se exponía a *S. meliloti* 1021 a concentraciones de 380 mM de NaCl se inhibía la biosíntesis de aminoácidos, la captación de hierro, la motilidad, la quimiotaxis y la activación de genes relacionados con la biosíntesis de polisacáridos.

Contrario a lo que ocurre con el mutante *cansdh*, observamos que, para *dabaat* no hay un decremento en su crecimiento celular; sugerimos que la eliminación del gen, en este caso *dabaat*, conduce a un mejor crecimiento porque la bacteria no se ve forzada a sintetizar un producto proteico innecesario.

En la fig. 2 vemos que tanto la síntesis de NSpd como de Spd requiere previamente de la proteína CANSDH lo que nos llevó a suponer que la mutación de *cansdh* repercutiría en el crecimiento

celular de la mutante; sin embargo, la complementación química nos permitió confirmar esta interrogativa. Aunque la actividad de *cansdh* también se requeriría para la síntesis de NSpd, la capacidad de Spd para complementar químicamente al mutante de *cansdh* indica que Spd es la poliamina requerida para el crecimiento normal.

Por otra parte, el crecimiento de las mutantes frente a otra fuente de Carbono parece no causar efectos; y en cambio, su crecimiento se ve favorecido en medio mínimo con succinato. Consistente con diCenzo *et al* (2016) gracias a su representación in silico del metabolismo de *S. meliloti* dan a conocer que dicha bacteria transporta succinato a la célula mucho más rápido que la glucosa bajo condiciones óptimas. *S. meliloti* utiliza la vía Entner-Doudoroff (ED), las enzimas de esta vía son altamente inducidas en presencia de glucosa a comparación de succinato. Sin embargo, este último es la fuente de Carbono preferida por *S. meliloti* (Geddes y Oresnik, 2014). Por ello, los resultados obtenidos entre el crecimiento con glucosa vs el crecimiento con succinato no difieren mucho en la tasa de crecimiento.

Estudios demuestran que *S. meliloti* es capaz de crecer en muchas fuentes de Carbono (monosacáridos, polisacáridos, ácidos orgánicos) (Geddes y Oresnik, 2014), en contraste con nuestros resultados donde los azúcares utilizados como fuentes de Carbono fueron mejor que los aminoácidos, mostrando una tasa de crecimiento similar a la tasa de crecimiento con succinato como fuente de Carbono, extrapolarlo estos resultados se esperaría al igual una reducción en el crecimiento bajo condiciones de estrés. La importancia de las PAs se ha ido estudiando previamente demostrando que la inhibición de la biosíntesis de PAs afecta el crecimiento celular en diversos organismos (Kusano *et al.*, 2008).

Recientemente se ha comprobado en *S. meliloti* (Rm8530) que tanto la Put como las PAs derivadas de ésta son necesarias para el crecimiento normal de la bacteria (Becerra-Rivera *et al.*, 2018). *Agrobacterium tumefaciens* una α -proteobacteria a diferencia de *S. meliloti*, requiere esencialmente de Spd para su crecimiento (Kim *et al.*, 2015). Como pudimos demostrar aquí, *S.*

meliloti requiere de la Spd para su óptimo crecimiento destacando que es necesaria para la resistencia de estrés salado y ácido, pero no es esencial en esta bacteria.

Yoshida, *et al.* (2004) propusieron un modulón de poliaminas en *E. coli* implicado en la activación de factores de transcripción para el control del crecimiento celular, debido a que la Spd se une al RNA e influye en la traducción de un conjunto de RNAs. En base a esto y con los resultados obtenidos se infiere que exista un mecanismo molecular similar en *S. meliloti* que controla su crecimiento a través de la biosíntesis de PAs, el cual se ve afectado con la ausencia de PAs específicas sintetizadas dentro de esta especie (Spd y NSpd).

Por otro lado, también se exhibió la función que ejercen estas PAs en la capacidad de *S. meliloti* para moverse a través de una superficie. Se ha demostrado que las rizobias como otras bacterias requieren de la síntesis de PAs para su movimiento tipo swarming (Dunn, 2017). Con los resultados presentados corroboramos que la falta de Spd igualmente disminuye la motilidad de la bacteria, y que la ausencia de NSpd y Dap parece no tener efectos sobre esta función. En contraste, la inactivación del gen *rhbA* *S. meliloti* 2011 que codifica a DABAAT resulta en una incapacidad de la célula para su motilidad tipo swarming, se propuso que este efecto se debe a la incapacidad de la bacteria de sintetizar rizobactina (Nogales *et al.*, 2010).

A pesar de haber observado una disminución del mutante *cansdh* en su movilidad tipo swimming la complementación química no restaura el fenotipo observado. Suponemos que a concentración 1 mM de Spd es en cierta manera tóxica para la bacteria. Por ello, propusimos probar un gradiente de concentraciones menores de Spd (0.3, 0.1 y 0.05 mM).

La Fig. 18 muestra los resultados obtenidos del gradiente de concentraciones que se utilizaron para encontrar la concentración adecuada que revierta el fenotipo ocasionado por la ausencia de la enzima CANSDH. Se probaron diferentes concentraciones partiendo de la concentración utilizada igualmente en el ensayo de crecimiento (1mM) que observamos en la Fig. 16 no revierte la motilidad de la mutante. Propusimos entonces utilizar concentraciones más pequeñas: 0.3

mM, 0.1 mM y 0.05 mM y observamos que conforme disminuye la concentración el efecto se revierte poco a poco, pero no por completo.

En la Fig. 18 a podemos ver que el diámetro obtenido en la concentración de 0.3 mM es menor al que se obtiene con 0.1 mM. Hasta ahora podríamos pensar entonces que la mutante para este proceso fisiológico requiere concentraciones más pequeñas de Spd. Después se probó una concentración menor (0.05 mM) y observamos que el diámetro y el área (Fig. 18 b) incrementa en la mutante, pero disminuye en la wt en comparación con 0.1 mM de Spd. Podemos decir entonces que la Spd exógena no revierte el fenotipo de la mutante y provoca un fenómeno similar en la cepa wt. Estos resultados podrían ser interesantes para futuras investigaciones y esclarecer el por qué ocurren dichos fenómenos dentro de la bacteria.

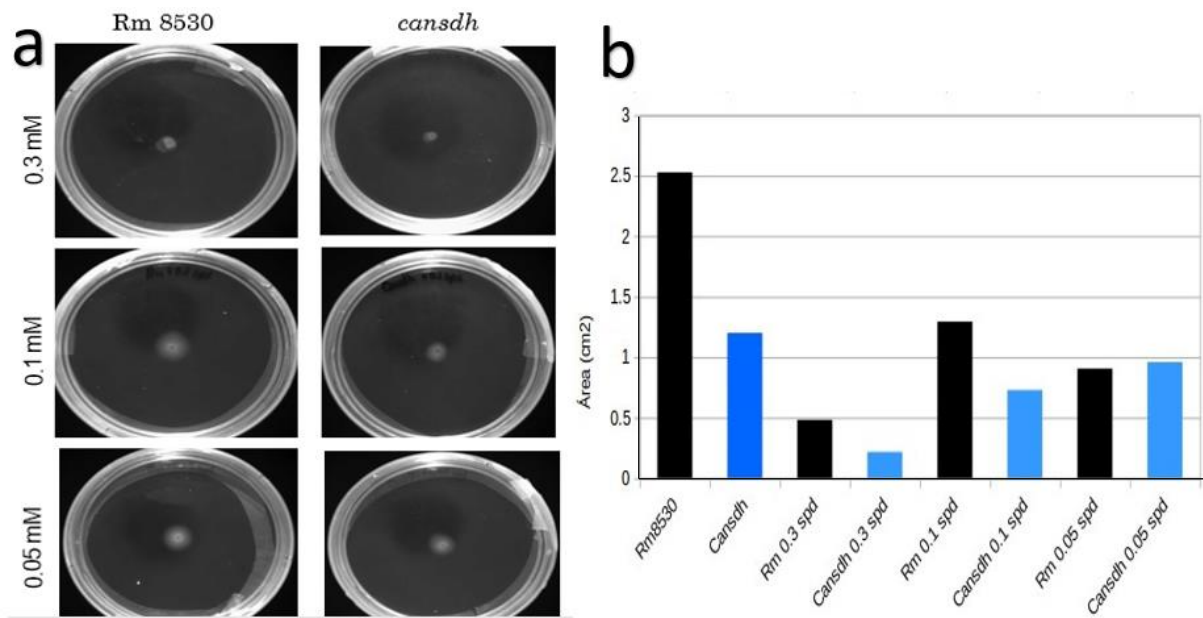


Fig 18. Ensayo de motilidad tipo enjambre de las mutantes complementado con diferentes concentraciones de spd. a) imágenes de los diámetros obtenidos a diferentes concentraciones de Spd y b) gráfica de las áreas obtenidas con diferentes concentraciones de Spd (0.3 mM, 0.1 mM, 0.05 mM).

12. CONCLUSIONES

Hasta ahora podemos concluir que los efectos de la mutación en *cansdh* afecta el crecimiento celular en estrés abiótico y hay déficit de la bacteria en su motilidad tipo enjambre. Además, al añadirle Spd al medio bajo condiciones de estrés restaura el crecimiento a niveles wt. Por el contrario, notamos que la mutante en *dabaat* no tiene el mismo fenotipo que la *cansdh*, por lo que se podría pensar que NSpd y Dap son importantes, pero no esenciales para *S. meliloti*. Por otro lado, las PAs sintetizadas por *cansdh* y *dabaat* parecen no tener un papel fundamental en la autoagregación de la bacteria.

13. Referencias bibliográficas

Becerra-Rivera, V. A., Bergström, E., Thomas-Oates, J., & Dunn, M. F. (2018). Polyamines are required for normal growth in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology*, 164(4), 600-613.

Biondi, E. G., Tatti, E., Comparini, D., Giuntini, E., Mocali, S., Giovannetti, L., ... & Viti, C. (2009). Metabolic capacity of *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* strains as determined by phenotype microarray analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(16), 5396-5404.

Brickman, T. J., & Armstrong, S. K. (1996). The ornithine decarboxylase gene *odc* is required for alcaligin siderophore biosynthesis in *Bordetella spp.*: putrescine is a precursor of alcaligin. *Journal of bacteriology*, 178(1), 54-60.

Capela, D., Barloy-Hubler, F., Gouzy, J., Bothe, G., Ampe, F., Batut, J., ... & Dréano, S. (2001). Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17), 9877-9882.

Casero Jr, R. A., & Pegg, A. E. (1993). Spermidine/spermine N1-acetyltransferase--the turning point in polyamine metabolism. *The FASEB Journal*, 7(8), 653-661.

Di Martino, M. L., Campilongo, R., Casalino, M., Micheli, G., Colonna, B., & Prosseda, G. (2013). Polyamines: emerging players in bacteria-host interactions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(8), 484-491.

diCenzo GC, Checucci A, Bazzicalupo M, Mengoni A, Viti C, Dziewit L, Finan TM, Galardini M, Fondi M (2016). Metabolic modelling reveals the specilization of secondary replicons for niche adaptation in *Sinorhizobium meliloti*. *Nat. Commu.* DOI: 10.1038/ncomms12219.

Domínguez-Ferreras, A., Pérez-Arnedo, R., Becker, A., Olivares, J., Soto, M. J., & Sanjuán, J. (2006). Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymB for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology*, 188(21), 7617-7625.

Dunn MF (1998) Tricarboxylic acid cycle and anaplerotic enzymes in rhizobia. *FEMS Microbiol Rev* 22:105-123.

Dunn, M. F. (2015). Key roles of microsymbiont amino acid metabolism in rhizobia-legume interactions. *Critical reviews in microbiology*, 41(4), 411-451.

Dunn, M. F. (2017). 26 Rhizobial Amino Acid Metabolism: Polyamine Biosynthesis and Functions. *The Handbook of Microbial Metabolism of Amino Acids*, 352.

- Finan, T. M. (2015). Genetic redundancy is prevalent within the 6.7 Mb *Sinorhizobium meliloti* genome. *Molecular genetics and genomics*, 290(4), 1345-1356.
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623.
- Fuhrer, T., Fischer, E., & Sauer, U. (2005). Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *Journal of bacteriology*, 187(5), 1581-1590.
- Fujihara, S. (2008). Biogenic amines in rhizobia and legume root nodules. *Microbes and environments*, 0812190038-0812190038.
- Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Pühler, A., Abola, P., Ampe, F., ... & Bothe, G. (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*, 293(5530), 668-672.
- Geddes BA, Oresnik IJ (2012). Inability to catabolize galactose leads to increased ability to compete for nodule occupancy in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 194:5044-5053.
- Geddes, B. A., & Oresnik, I. J. (2014). Physiology, genetics, and biochemistry of carbon metabolism in the alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Canadian journal of microbiology*, 60(8), 491-507.
- Hamana, K., Minamisawa, K., & Matsuzaki, S. (1990). Polyamines in *rhizobium*, *bradyrhizobium*, *azorhizobium* and *argobacterium*. *FEMS Microbiology Letters*, 71(1-2), 71-76.
- Hanfrey, C. C., Pearson, B. M., Hazeldine, S., Lee, J., Gaskin, D. J., Woster, P. M., ... & Michael, A. J. (2011). Alternative spermidine biosynthetic route is critical for growth of *Campylobacter jejuni* and is the dominant polyamine pathway in human gut microbiota. *Journal of Biological Chemistry*, 286(50), 43301-43312.
- Hobley, L., Kim, S. H., Maezato, Y., Wyllie, S., Fairlamb, A. H., Stanley-Wall, N. R., & Michael, A. J. (2014). Norspermidine is not a self-produced trigger for biofilm disassembly. *Cell*, 156(4), 844-854.
- Karatan, E., Duncan, T. R., & Watnick, P. I. (2005). NspS, a predicted polyamine sensor, mediates activation of *Vibrio cholerae* biofilm formation by norspermidine. *Journal of bacteriology*, 187(21), 7434-7443.
- Kim, J. H., Kim, H. J., Kim, Y. H., Jeon, J. M., Song, H. S., Kim, J., ... & Yang, Y. H. (2016). Functional study of lysine decarboxylases from *Klebsiella pneumoniae* in *Escherichia coli* and application of whole cell bioconversion for cadaverine production. *J. Microbiol. Biotechnol*, 26(9), 1586-1592.
- Kim, S. H., Wang, Y., Khomutov, M., Khomutov, A., Fuqua, C., & Michael, A. J. (2015). The essential role of spermidine in growth of *Agrobacterium tumefaciens* is determined by the 1, 3-diaminopropane moiety. *ACS chemical biology*, 11(2), 491-499.

- Krossa, S., Faust, A., Ober, D., & Scheidig, A. J. (2016). Comprehensive structural characterization of the bacterial homospermidine synthase—an essential enzyme of the polyamine metabolism. *Scientific reports*, 6, 19501.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., & Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228(3), 367-381.
- Lee, J., Sperandio, V., Frantz, D. E., Longgood, J., Camilli, A., Phillips, M. A., & Michael, A. J. (2009). An alternative polyamine biosynthetic pathway is widespread in bacteria and essential for biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(15), 9899-9907.
- López-Gómez, M., Cobos-Porras, L., Hidalgo-Castellanos, J., & Lluch, C. (2014). Occurrence of polyamines in root nodules of *Phaseolus vulgaris* in symbiosis with *Rhizobium tropici* in response to salt stress. *Phytochemistry*, 107, 32-41.
- López-Gómez, M., Hidalgo-Castellanos, J., Iribarne, C., & Lluch, C. (2014). Proline accumulation has prevalence over polyamines in nodules of *Medicago sativa* in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* during the initial response to salinity. *Plant and soil*, 374(1-2), 149-159.
- Miller-Fleming, L., Olin-Sandoval, V., Campbell, K., & Ralser, M. (2015). Remaining mysteries of molecular biology: the role of polyamines in the cell. *Journal of molecular biology*, 427(21), 3389-3406.
- Morris, D. R., & Pardee, A. B. (1966). Multiple pathways of putrescine biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 241(13), 3129-3135.
- Nogales, J., Domínguez-Ferreras, A., Amaya-Gómez, C. V., Van Dillewijn, P., Cuéllar, V., Sanjuán, J., ... & Soto, M. J. (2010). Transcriptome profiling of a *Sinorhizobium meliloti* fadD mutant reveals the role of rhizobactin 1021 biosynthesis and regulation genes in the control of swarming. *BMC genomics*, 11(1), 157.
- Palma, F., López-Gómez, M., Tejera, N. A., & Lluch, C. (2013). Salicylic acid improves the salinity tolerance of *Medicago sativa* in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* by preventing nitrogen fixation inhibition. *Plant science*, 208, 75-82.
- Patel, C. N., Wortham, B. W., Lines, J. L., Fetherston, J. D., Perry, R. D., & Oliveira, M. A. (2006). Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. *Journal of bacteriology*, 188(7), 2355-2363.
- Poysti NJ, Loewen EDM, Wang Z, Oresnik IJ (2007) *Sinorhizobium meliloti* pSymB carries genes necessary for arabinose transport and catabolism. *Microbiol.* 153:727-736.

- Rachwał, K., Matczyńska, E., & Janczarek, M. (2015). Transcriptome profiling of a *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* rosR mutant reveals the role of the transcriptional regulator RosR in motility, synthesis of cell-surface components, and other cellular processes. *BMC genomics*, 16(1), 1111.
- Rüberg, S., Tian, Z. X., Krol, E., Linke, B., Meyer, F., Wang, Y., ... & Becker, A. (2003). Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *Journal of biotechnology*, 106(2-3), 255-268.
- Sakanaka, M., Sugiyama, Y., Kitakata, A., Katayama, T., & Kurihara, S. (2016). Carboxyspermidine decarboxylase of the prominent intestinal microbiota species *Bacteroides thetaiotaomicron* is required for spermidine biosynthesis and contributes to normal growth. *Amino acids*, 48(10), 2443-2451.
- Schneider, J., & Wendisch, V. F. (2011). Biotechnological production of polyamines by bacteria: recent achievements and future perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(1), 17.
- Shah, P., & Swiatlo, E. (2008). A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Molecular microbiology*, 68(1), 4-16.3
- Shamseldin, A., Nyalwidhe, J., & Werner, D. (2006). A proteomic approach towards the analysis of salt tolerance in *Rhizobium etli* and *Sinorhizobium meliloti* strains. *Current microbiology*, 52(5), 333-339.
- Shaw, F. L., Elliott, K. A., Kinch, L. N., Fuell, C., Phillips, M. A., & Michael, A. J. (2010). Evolution and multifarious horizontal transfer of an alternative biosynthetic pathway for the alternative polyamine sym-homospermidine. *Journal of Biological Chemistry*, 285(19), 14711-14723.
- Sobe, R. C., Bond, W. G., Wotanis, C. K., Zayner, J. P., Burriss, M. A., Fernandez, N., ... & Karatan, E. (2017). Spermine inhibits *Vibrio cholerae* biofilm formation through the NspS-MbaA polyamine signaling system. *Journal of Biological Chemistry*, 292(41), 17025-17036.
- Vassileva, V., & Ignatov, G. (1999). Polyamine-induced changes in symbiotic parameters of the *Galega orientalis*-*Rhizobium galegae* nitrogen-fixing system. *Plant and soil*, 210(1), 83-91.
- Yoshida, M., Kashiwagi, K., Shigemasa, A., Taniguchi, S., Yamamoto, K., Makinoshima, H., ... & Igarashi, K. (2004). A unifying model for the role of polyamines in bacterial cell growth, the polyamine modulon. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 46008-46013.