



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO de Ciencias Biológicas

Trabajo de Tesis Doctoral:

Metabolismo energético de *Bradyrhizobium diazoefficiens* en relación con la biosíntesis y actividad flagelar

Tesista: Ing. Carolina Cogo

Director: Dr. Aníbal R. Lodeiro

Director: Dr. Augusto A. Melgarejo

Año: 2019

El presente trabajo de Tesis, para optar al grado Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Departamento de Ciencias Básicas de la Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM-Departamento de Ciencias Biológicas - Facultad de Ciencias Exactas - UNLP, CCT - La Plata - CONICET), bajo la dirección del Dr. Aníbal R. Lodeiro y la dirección del Dr. Augusto A. Melgarejo.

Agradecimientos

Mi Reconocimiento

A la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) que me permitió mi formación de grado

A la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP) la cual me permitió mi formación de posgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) que me permitió mediante una beca dedicarme a este trabajo.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y a la UNLP por la financiación que permitió llevar a cabo esta Tesis.

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) y al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) por facilitarme la infraestructura y el instrumental necesario para desarrollar los experimentos realizados en este trabajo de Tesis.

Al Departamento de Ciencias Básicas y de Electrotecnia de la Facultad de Ingeniería (UNLP) por darme el espacio de trabajo.

Mi agradecimiento

A mis directores Aníbal y Augusto les agradezco por la paciencia, la generosidad y dedicación. Por aceptar realizar este trabajo en conjunto, por el desafío interdisciplinario para entendernos y por el esfuerzo realizado para sortear los vaivenes de este trabajo.

Al grupo R3: los grandes y los chicos, les agradezco por compartir conmigo los aportes que hicieron al conocimiento en este grupo de trabajo. A ustedes les debo todo lo que pude aprender. A los grandes les agradezco sus enseñanzas invaluable en el laboratorio; gracias Nacho, Pity, Elías, JPG y Julia. Gracias Nacho por tus enseñanzas y JPG por tu interés, tu didáctica y tu generosidad. Gracias petisa por ayudarme en la obtención del mutante, por responder a mis dudas y por el fulbito!. Y a las chicas: Cove y Florcita quienes dejaron también sus valiosos aportes.

A los chicos! les agradezco también sus enseñanzas y los días compartidos en el laboratorio, por no sólo hacerme un lugar en el cuartito de becarios sino también por brindarme su valiosa amistad. Por alegrarme los días, compartir estos años con ustedes fue una de las mejores cosas; gracias Estebitan, Mengü, Vale, Flor, Carito y Gabi. Ah... y por aguantarse mis seminarios.

A RPS, "los de al lado", Juli, Ile, Piru, Lucas, Eze, Fran... por dar una mano siempre.

A Paula, Silvana, Luciana, Larisa, Claudio y Juan (CPA) por su predisposición y ayuda en la preparación del material para realizar los ensayos.

Al resto de los integrantes del IBBM por el espíritu colaborativo; a los becarios, en especial, por el espíritu festivo.

A Flavia! por tu ayuda desinteresada, por acompañarme en estos días. A todo su grupo de trabajo que me soportaron en mi periodo CINDEFI. A Marina por asistirme con los fermentadores.

A Chandrasekar B. Rajeswari (Chandré) quien extrajo las proteínas utilizadas en el análisis proteómico durante su estadía en el IBBM.

A Pía Valacco (CEQUIBIEM, UBA), por su paciencia y dedicación con todas las consultas que tuvimos.

A Chris, por compartirme el gabinete en el primer piso los primeros años.

A mis compañeros de cátedra, por su comprensión. A Vivi, por ayudar a la convivencia en el gabinete.

A Marita por aceptarme y acompañarme en mis primeros pasos en el INIFTA.

A Carlitos, mi amor y mi compañero por estar siempre presente, por su infinita paciencia y su comprensión.

A Ale, por el aventón en enero; y a su familia, por prestarme la piletta en los días de calor y un par de kWh cuando estuvimos sin luz.

A mis padres por darme la posibilidad de estudiar lo que quise.

A los familiares y amigos que alentaron.

Índice general

Resumen	1
1. Introducción	3
1.1. Bioenergética y sistemas vivos	4
1.1.1. Bioenergética y estados fuera del equilibrio	6
1.1.2. Cambios metabólicos y energía de la célula	7
1.2. Movilidad de bacterias	8
1.2.1. Cómo hacen las bacterias para orientar su movimiento	11
1.2.2. Estructura, funcionamiento y regulación del flagelo	12
1.3. Metabolismo y biosíntesis de flagelos en <i>B. diazoefficiens</i>	18
1.3.1. Metabolismo de las distintas fuentes de carbono	20
1.4. Objetivos	21
2. Materiales y métodos	23
2.1. Material biológico	23
2.1.1. Cepas bacterianas	23
2.1.2. Manipulación de ADN	23
2.1.3. Plantas	23
2.2. Medios y condiciones de cultivo	24
2.2.1. Medios de cultivo	24
2.2.2. Condiciones generales de cultivo	26
2.2.3. Cultivos <i>batch</i> en biorreactor	27
2.2.4. Análisis bioquímicos	31
2.2.5. Métodos de esterilización	32
2.3. Técnicas de biología molecular	32
2.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32
2.3.2. Electroforesis en geles de agarosa	33
2.4. Análisis de proteínas	34
2.4.1. Extracción y análisis de flagelinas	34
2.4.2. Análisis del perfil de proteínas diferenciales	34
2.5. Ensayos de nodulación	36
2.5.1. Esterilización superficial y germinación de las semillas	36
2.5.2. Ensayos de nodulación en macetas	36
2.6. Microscopía	37
3. Modelo para respiración y fuerza protón motriz	39
3.1. Caracterización del modelo	39
3.1.1. Agrupación en supercomplejos	40
3.1.2. Distribución de la concentración de enzimas	40
3.2. Modelado del consumo de O_2 e intercambio de H^+	41
3.2.1. Expresiones para los flujos	44

3.3.	Análisis de resultados. Resolución del sistema. Estados estacionarios	47
3.3.1.	Estados estacionarios	48
3.3.2.	Dispersiones individuales	49
4.	Parámetros de crecimiento de <i>B. diazoefficiens</i> y su relación con la síntesis de flagelos	55
4.1.	Cultivos en biorreactor	56
4.1.1.	Parámetros de crecimiento de LP 3004	57
4.1.2.	Parámetros de crecimiento del mutante <i>lafR::Km</i>	59
4.2.	Competición en crecimiento	61
5.	Proteómica de <i>B. diazoefficiens</i> cultivada con Ara o Mtl como fuentes de carbono y energía	63
5.1.	Análisis de los proteomas obtenidos	63
5.2.	Catabolismo de Ara y Mtl en <i>B. diazoefficiens</i>	64
5.2.1.	Oxidación de Ara	66
5.2.2.	Oxidación de Mtl	69
5.2.3.	Oxidación y rendimiento energético	73
5.3.	Diferencias en el estado redox y movilidad	74
5.3.1.	Síntesis de polihidroxitirato	74
5.3.2.	Producción de NAD^+ y <i>FAD</i>	76
5.3.3.	Movilidad celular y quimiotaxis	76
6.	Caracterización genotípica y fenotípica del mutante en el gen <i>cbbL</i> de <i>B. diazoefficiens</i>	79
6.1.	Construcción del mutante en el gen <i>cbbL</i>	79
6.1.1.	Construcción del plásmido	80
6.1.2.	Conjugación y obtención del mutante doble	82
6.2.	Caracterización fenotípica	85
6.2.1.	Cinéticas de crecimiento y morfología	85
6.2.2.	Nodulación en raíces de soja	88
7.	Discusión general	91
A.	Apéndices	97
A.1.	Vías metabólicas	97
A.1.1.	L-Arabinosa	98
A.1.2.	D-Manitol	100
A.1.3.	Enzimas relativas a las vías encontradas en el proteoma	108
A.2.	Cepa USDA 110 $\Delta cbbL$	110
A.2.1.	Alineamiento de las secuencias	110
	Bibliografía	113
	Nomenclatura	125

Resumen

Muchas bacterias son capaces de moverse en forma autopropulsada tanto en medio líquido como semisólido, siendo la natación o *swimming* uno de los tipos de movimiento más estudiados. Para este tipo de movimiento se requieren unos apéndices llamados flagelos, estructuras filamentosas que protruyen del cuerpo de la bacteria y se caracterizan por tener una longitud de varias veces la de la célula. Es mediante la rotación de estos filamentos que la bacteria puede nadar alcanzando velocidades de hasta $30 \mu\text{m}\cdot\text{seg}^{-1}$. La rotación de estos flagelos es producida por un motor celular inserto en la membrana de la bacteria, que rota gracias a un flujo de protones desde el periplasma hacia el citoplasma. El flujo de protones en los motores celulares es posible gracias a una diferencia de potencial de protones en este sentido, al que llamaremos Δp .

El potencial Δp se mantiene por la translocación de protones desde el interior de la bacteria hacia el exterior en la cadena de transporte de electrones (CTE). Este potencial es utilizado también para la síntesis de *ATP*, metabolito que interviene en múltiples reacciones bioquímicas, y es conocido como moneda de energía de la célula. Entonces, una bacteria que posee flagelos debe administrar Δp entre la síntesis de *ATP* y el movimiento de los flagelos. En este sentido construimos un modelo basado en la quimiosmótica y la termodinámica de no-equilibrio que relaciona el consumo de O_2 en la CTE con la formación de *ATP* y el flujo de protones a través de los motores flagelares, para estudiar la contribución de Δp en uno u otro proceso. Como resultado, observamos que al incrementarse el número de flagelos manteniendo constante la tasa de consumo de *ATP*, se incrementa la tasa de consumo de O_2 , siendo estos procesos dependientes de la regulación de la relación $NADH/NAD^+$.

Bradyrhizobium diazoefficiens utiliza para nadar dos sistemas de flagelos: el flagelo subpolar y los flagelos laterales, ambos son activados por Δp . El primero es constitutivo y los segundos se inducen en ciertas fuentes de carbono (como L-arabinosa) y en otras no (como D-manitol). Para estudiar los parámetros energéticos de *B. diazoefficiens* con relación a la presencia de los flagelos laterales, realizamos cultivos en biorreactor de la cepa salvaje y de una mutante carente de flagelos laterales. Observamos que en la cepa salvaje la tasa de consumo de O_2 era tres veces mayor con L-arabinosa que con D-manitol, en concordancia con la predicción del modelo matemático. Por su parte, el mutante no mostró diferencias entre los cultivos con L-arabinosa o D-manitol, corroborando que la diferencia en la tasa de consumo de O_2 se debió a la actividad de los flagelos laterales. También realizamos una comparación del proteoma de cultivos de la cepa salvaje en L-arabinosa o D-manitol, de lo cual dedujimos que estos dos azúcares se oxidan por rutas muy diferentes. La L-arabinosa se oxida por la ruta L-KDA (similar a la de Entner-Doudoroff) seguida de la oxidación de oxalato, mientras que el D-manitol primero debe ser oxidado a D-fructuosa y luego pasa por la ruta de las pentosas-fosfato o el ciclo de Calvin-Benson-Bassham. Estas diferentes ru-

tas podrían arrojar rendimientos energéticos distintos los cuales podrían explicar por qué en una fuente de carbono la bacteria puede mantener estructuras tan costosas como los flagelos laterales y en la otra no. Sin embargo, nuestras observaciones indicaron que el rendimiento energético de ambas rutas es similar, con lo cual la diferencia en la tasa de consumo de O_2 parece ser más una consecuencia que la causa de la expresión diferencial de los flagelos laterales en L-arabinosa. Curiosamente, los cultivos en D-manitol expresaron diferencialmente la ribulosa-bisfosfato-carboxilasa-oxigenasa (RuBisCO) y la ribuloquinasa, indicando que en esas condiciones estaría activo el ciclo Calvin-Benson-Bassham. Para determinar en qué podría requerirse la actividad RuBisCO, obtuvimos un mutante delecional en *cbbL*, que codifica la subunidad catalítica de dicha enzima, y observamos que la mutación produjo defectos en el crecimiento y en la competitividad para nodular raíces de soja.

1. Introducción

La mayoría de las especies de bacterias que habitan los suelos, o cursos de agua tales como ríos, lagos y mares, son capaces de desplazarse en forma autopropulsada. Estos desplazamientos tienen lugar a velocidades del orden de 10 a 30 veces el tamaño corporal por segundo, lo cual requiere una enorme cantidad de energía celular, que la bacteria destina a dicho movimiento con una extraordinaria eficiencia. Esta propiedad permite a las bacterias colonizar eficientemente sus hábitats y eventualmente, explorar el ambiente en busca de nuevos sitios para colonizar y reproducirse. Así, la movilidad de las bacterias despierta un gran interés por sus implicancias en los procesos infecciosos, como así también en el aprovechamiento de aquellas especies a las que consideramos benéficas.

Entre las especies bacterianas benéficas se encuentran aquellas utilizadas en la agricultura como biofertilizantes o biocontroladores. Unos y otros se integran en las tecnologías de la agricultura sustentable, que intenta disminuir el uso de agroquímicos contaminantes y mejorar la conservación de los suelos. Entre los biofertilizantes se destacan los rizobios fijadores de N_2 en simbiosis con las leguminosas. Estos rizobios son utilizados desde hace más de un siglo en reemplazo de los fertilizantes nitrogenados, pero los resultados obtenidos hasta el momento en términos de rendimiento de los cultivos deben mejorarse. El cultivo de leguminosas más extendido en Argentina es la soja, que actualmente ocupa unos 20 millones de hectáreas. Dada la gran superficie sembrada, cualquier mejora en la fijación de N_2 puede tener un gran impacto en términos de mejora de los suelos, con los consiguientes beneficios en términos de servicios agroecológicos. En el laboratorio donde se desarrolló esta Tesis Doctoral se ha estado trabajando durante muchos años con el simbionte de la soja, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, y se ha observado que una mejora de la movilidad de esta bacteria en el suelo puede contribuir positivamente a mejorar la simbiosis y el rendimiento del cultivo [2, 73]. Sin embargo, el logro de esa mejora puede implicar un mayor consumo de energía por parte de la bacteria, lo cual puede volverla más vulnerable a diversas amenazas del ambiente, o a la competencia de otros rizobios capaces de asociarse con la soja. Por lo tanto, es necesario realizar un estudio de las relaciones entre el metabolismo energético y la movilidad bacteriana con el fin de evaluar la mejor manera de cultivar estas bacterias y aplicarlas al cultivo de soja para aprovechar su potencial. Es en este camino que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral, utilizando para ello herramientas de modelado matemático y de biología molecular, en un esfuerzo interdisciplinario para abarcar el problema bioenergético. A continuación haremos una breve introducción a los principios sobre los que se desarrolló este trabajo, para luego describir más pormenorizadamente la problemática encarada.

1.1. Bioenergética y sistemas vivos

Los sistemas vivos transforman parte de la energía tomada de los nutrientes de los cuales se alimentan (o de la radiación solar) para llevar a cabo funciones tales como sintetizar y ensamblar proteínas, transportar sustancias a través de las membranas, moverse, etc. Entonces, para mantenerse vivo, el sistema requiere de un flujo constante de energía y materia las cuales convierte en otras formas de energía y materia necesarias para su funcionamiento y reproducción [133]. La caracterización y descripción cuantitativa de estos procesos de transformación y conservación de la energía han sido de gran interés en los últimos años y se agrupan desde una perspectiva macroscópica en una disciplina conocida como Bioenergética.

Los procesos más estudiados en bioenergética tienen que ver con el intercambio de energía en las membranas celulares. Las mismas consisten en una bicapa de fosfolípidos arreglados en forma tal que la parte hidrofóbica de la molécula se orienta hacia adentro de la bicapa y la parte hidrofílica hacia cada lado del borde de la membrana, separando así dos compartimentos, el interior y el exterior. A través de proteínas ancladas en la membrana se llevan a cabo reacciones entre sustancias o el transporte de las mismas, que hacen que estos dos espacios intercambien materia y energía. Estas membranas, tanto en mitocondrias como en procariotas son referidas como «membranas acoplantes», pues en ellas se llevan a cabo los procesos de transporte de electrones y las reacciones asociadas a la síntesis de adenosina trifosfato (*ATP*) [19]. El *ATP* posee tres residuos de fosfato unidos entre sí por dos enlaces anhidro con una energía libre de hidrólisis relativamente alta.

Los microorganismos obtienen energía de la oxidación de los carbohidratos, entre otras fuentes, lo que sucede a través de diferentes rutas metabólicas. Como resultado, la energía liberada por estas reacciones se transforma en la energía de los enlaces anhidro del *ATP*. Estos procesos son catalizados por enzimas que, a medida que oxidan los sustratos, reducen moléculas conocidas como cofactores enzimáticos, la nicotinamida adenina dinucleótido o el flavín dinucleótido (*NADH* y *FADH₂*, en sus formas reducida, respectivamente). Estos cofactores (en parte) son reoxidados en los complejos enzimáticos anclados en la membrana. Estas reacciones de óxido-reducción están acopladas a la translocación de protones desde el interior de la célula hacia el exterior manteniendo un gradiente de H^+ a través de la membrana. Esta diferencia de concentraciones de H^+ a ambos lados de la membrana es denominada fuerza protón motriz (FPM).

En el sentido estricto la FPM no es una fuerza sino un potencial, por lo que nos referiremos a ella como el Δp . El Δp es utilizado por la célula para la síntesis de *ATP* a partir de adenosina difosfato (*ADP*) y fosfato inorgánico (*Pi*), en una reacción catalizada por la enzima *ATP*-sintasa (F_oF_1), en el proceso conocido como fosforilación oxidativa. Dado que la reacción de fosforilación del *ADP* es endergónica, estos dos procesos (respiración y síntesis de *ATP*) se acoplan a través del intercambio de protones (H^+) [81, 82], de modo tal que la energía necesaria para la síntesis de *ATP* es aportada por la disipación del Δp .

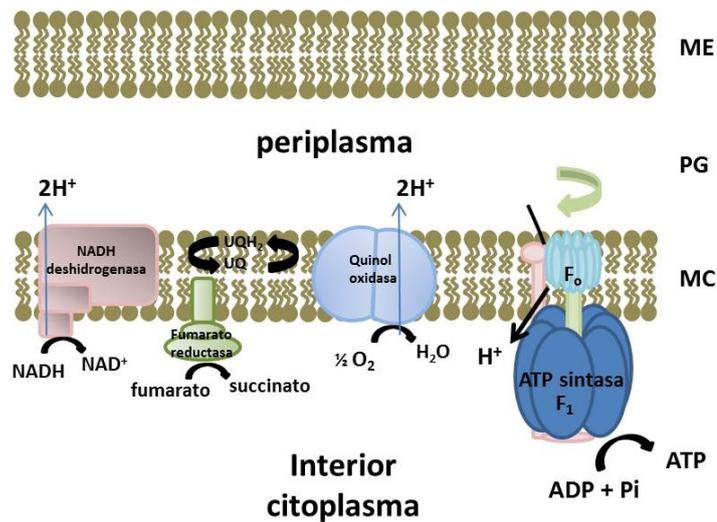


Figura 1.1.: Esquema de una cadena de transporte de electrones (CTE) y síntesis de *ATP*. Algunos de los complejos enzimáticos involucrados en la CTE de una bacteria Gram-negativa (complejos NADH deshidrogenasa, fumarato reductasa y quinol oxidasa) y el complejo F_0F_1 -ATP sintasa. ME, membrana externa; PG, capa de peptidoglicano; MC, membrana citoplasmática.

Los complejos enzimáticos que catalizan tanto las reacciones que tienen lugar en la cadena de transporte de electrones (CTE) como la F_0F_1 no son simples moléculas sueltas si no que se encuentran ancladas en las membranas. Cabe destacar que son estructuras ubicuas; están presentes tanto en las membranas mitocondriales de células eucariotas, como en la membrana citoplasmática de microorganismos procariotas. Se caracterizan por poseer una parte hidrofílica, la cual está asociada al citoplasma (en el caso de bacterias Gram-negativas) y una parte hidrofóbica que se asocia a la membrana (Figura 1.1).

A través de los complejos que constituyen la CTE se producen reacciones de transferencia de electrones a través de sucesivas óxido-reducciones de diferentes cofactores; junto con estas reacciones se translocan H^+ desde el citoplasma al periplasma, en el caso de bacterias Gram-negativas. Cada complejo enzimático se caracteriza por catalizar una reacción de óxido-reducción entre un sustrato (dador de electrones, D_e) y un producto (aceptor de electrones, A_e) definidos, en la que se transfieren n_e electrones. Los aceptores o dadores de electrones poseen diferentes valores de potenciales de óxido-reducción ΔE_m y translocan una cantidad diferente de protones por cada electrón transferido (H^+/e^-). En la Tabla 1.1 se exponen los diferentes valores de ΔE_m para los complejos considerados.

Tabla 1.1.: Potenciales estándar de óxido-reducción (ΔE_m) de los pares redox que reaccionan en cada complejo enzimático según $D_e + n_e \rightarrow A_e$. En cada complejo se acoplan una reacción de oxidación inicial con otra de reducción final en la que n_e electrones son transferidos y m_{H^+} protones son translocados. UQ : ubiquinona, UQH_2 : ubiquinol, Cit_{ox} : citocromo c oxidado y Cit_{red} : citocromo c reducido.

Complejo enzimático	Par redox	ΔE_m (V)	H^+/e^-	m_{H^+}	n_e
NADH deshidrogenasa	$NAD^+/NADH$	-0,32	2	4	2
	UQ/UQH_2	+0,06			
Fumarato reductasa	$fumarato/succinato$	+0,03	0	0	2
	UQ/UQH_2	+0,06			
Ubiquinol citocromo-c oxidoreductasa	UQ/UQH_2	+0,06	1	2	2
	Cit_{ox}/Cit_{red}	+0,22			
Quinol oxidasa <i>bd</i>	UQ/UQH_2	+0,06	1	2	2
	$\frac{1}{2}O_2/H_2O$	+0,82			
citocromo c oxidasa	Cit_{ox}/Cit_{red}	+0,22	2	4	2
	$\frac{1}{2}O_2/H_2O$	+0,82			

Por otra parte, la estructura de la F_oF_1 ha sido ampliamente estudiada y varios modelos han sido propuestos acerca de su mecanismo de síntesis de ATP . En procariotas, la fracción F_o se encuentra anclada en la membrana, mientras que la parte soluble F_1 se sitúa en el citoplasma. La subunidad F_o puede rotar gracias al pasaje de H^+ a través de sus canales iónicos, mientras que en F_1 se encuentran los sitios catalíticos donde se unen los sustratos para producir la reacción de síntesis de ATP [87]. La rotación de F_o se encuentra fuertemente acoplada a la síntesis en F_1 . Se estima que existen 10 canales iónicos en la fracción F_o y unos tres sitios catalíticos en la fracción F_1 , por lo que son necesarios 10 H^+ para producir una rotación y sintetizar hasta tres moléculas de ATP en un giro [87].

1.1.1. Bioenergética y estados fuera del equilibrio

Los procesos bioenergéticos pueden ser abarcados por la termodinámica clásica o de equilibrio, la cual da fundamentos para describir la dirección de cambio en un proceso mediante balances energéticos entre estados, aunque poco podemos inferir utilizando este enfoque acerca de los procesos que tuvieron lugar entre estos estados. La termodinámica clásica compara estados de equilibrio y a partir de esta comparación realiza una inferencia sobre el proceso. En este sentido, no

aborda lo que en sistemas vivos es relevante, esto es, la velocidad con que se desarrollan tales procesos.

Los sistemas fuera del equilibrio termodinámico son sistemas inhomogéneos en los cuales al menos uno de los parámetros intensivos (T , x , P ...) es una función del tiempo y/o la posición. Para caracterizar un sistema que no se encuentra en equilibrio se utiliza una descripción local, mediante la cual podemos asignar localmente los valores de las variables termodinámicas. En este sentido, como la mayoría de los procesos celulares ocurren a presión y temperatura constantes, el estado de los sistemas biológicos puede definirse con un vector cuyas componentes se corresponden con las concentraciones de los n metabolitos $x_i(t)$ ($i = 1, 2 \dots n$) que intervienen en los r flujos metabólicos J_j ($j = 1, 2 \dots r$). [28].

Considerando que la célula es capaz de mantener la concentración de metabolitos constante mientras intercambia materia y energía con su entorno, nos concentraremos en la determinación de los estados estacionarios (x_i^0), los cuales permiten evaluar los flujos asociados a los procesos de nuestro interés. En este contexto, el problema de la respiración en las mitocondrias de células eucariotas y en membranas de bacterias, donde la CTE cumple un rol central dentro del metabolismo celular, ha sido estudiado en el marco de la quimiosmótica y la termodinámica del no equilibrio [57]. En este sentido, el conocimiento de una relación cuantitativa para el flujo de electrones a través de la CTE en relación a los ΔE de los cofactores participantes y el Δp , nos permite analizar desde una perspectiva bioenergética tanto el proceso de respiración como el de fosforilación oxidativa.

1.1.2. Cambios metabólicos y energía de la célula

“Metabolismo” es el término usado para referirse a más de 1000 transformaciones químicas que tienen lugar en una célula, que culminan en la duplicación de la misma. El metabolismo se divide en dos grandes procesos: anabolismo o biosíntesis (proceso que requiere energía para construir el material celular) y catabolismo (proceso que libera energía mediante la oxidación de diversos compuestos). Ambos procesos están organizados en pequeños pasos a través de diferentes rutas metabólicas.

Los procesos de anabolismo y catabolismo están íntimamente relacionados. Los microorganismos requieren una fuente de carbono y de energía para conducir las reacciones metabólicas. La energía para el crecimiento es derivada de la oxidación de compuestos químicos (microorganismos quimiotrópicos) o de la luz (microorganismos fototrópicos). Como se mencionó en la sección 1.1, la oxidación de los sustratos, además de producir *ATP*, produce equivalentes reducidos de *NADH* y *FADH₂* los cuales pueden ser reoxidados para generar *ATP* a través de la fosforilación oxidativa.

Típicamente, para entender y caracterizar el crecimiento de un microorganismo particular, las células son cultivadas en un medio nutritivo en el cual los nutrientes y las condiciones ambientales están controladas. Registrando la biomasa de las células a lo largo del tiempo, puede obtenerse una curva de crecimiento para este microorganismo particular. Esta curva consta de fases de crecimiento distintivas, caracterizadas por cambios fisiológicos en el cultivo de células: fase de retardo, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte. Si se quisiera describir de-

talladamente las reacciones que ocurren durante el proceso, deberíamos usar un modelo segregado y estructurado, puesto que durante el crecimiento los microorganismos metabolizan varios sustratos a la vez, lo cual es muy complejo. Una ecuación que describe aceptablemente la relación entre la producción de biomasa (X) y la concentración del nutriente limitante del crecimiento (S) es la ecuación de Monod [84], en la que se supone que, si bien pueden existir muchos sustratos, uno de ellos será el limitante, es decir, que el crecimiento cesará cuando se agote dicho sustrato, independientemente de la disponibilidad de los otros sustratos.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} X$$

Donde S es la concentración del sustrato limitante, K_S la constante de saturación y μ_{max} la velocidad específica de crecimiento máxima (siendo la velocidad específica de crecimiento $\mu = \mu_{max} S / (K_S + S)$). Sin embargo, el modelo de Monod no considera que parte del sustrato puede utilizarse para reacciones de mantenimiento de la integridad celular, además del crecimiento. Herbert [47] y luego Pirt [94] introdujeron la idea de que no todo el sustrato consumido es utilizado para la generación de biomasa, sino que también debe considerarse que una parte de éste se utilizará para el mantenimiento de funciones celulares. A este valor lo llamamos energía de mantenimiento. Los procesos relacionados con esta energía son: el mantenimiento de los gradientes de concentración a través de la membrana citoplasmática, la renovación de moléculas tales como el ARNm las cuales son continuamente degradadas y re-sintetizadas dentro de la célula, la renovación de proteínas, el transporte de solutos, y en el caso de la mayoría de las bacterias ambientales, la movilidad autopropulsada [130].

El principal objetivo de este trabajo de Tesis será estudiar la relación entre esta energía de mantenimiento y la movilidad impulsada por flagelos, con lo cual a continuación describiremos los aspectos relacionados con dicha movilidad.

1.2. Movilidad de bacterias

Muchas bacterias poseen la capacidad de moverse en forma autopropulsada, esta característica les permite dispersarse y explorar ambientes más propicios para su desarrollo. La capacidad de dispersarse y colonizar nuevos hábitats tiene consecuencias ecológicas importantes. En general, las bacterias en vida libre oscilan entre dos estados: uno móvil o planctónico y el otro, sésil, en el cual a menudo las células bacterianas se asocian formando estructuras conocidas como biopelículas. Se cree que las bacterias pasan la mayor parte de su ciclo en las biopelículas, pero cuando estas estructuras crecen más allá del límite en el cual comienzan a acumular demasiados desechos, colapsan y es necesario que la biopelícula se rejuvenezca. En ese momento las bacterias deben salir en busca de un ambiente nuevo donde volver a asentarse, para lo cual vuelven al estado planctónico, que les permite explorar el ambiente y dispersarse en él [9].

Existen distintos tipos de movimiento autopropulsado, estos se clasifican en seis categorías según el tipo de mecanismo que las bacterias utilicen para moverse [46]. En dos de ellos se utilizan unos apéndices llamados flagelos, mientras que

para los restantes se utilizan otro tipo de sistemas, como por ejemplo, las fimbrias [56]. A continuación describiremos los movimientos dependientes de flagelos, que son el objeto de esta Tesis.

Natación o *Swimming*

Este tipo de movimiento se puede producir solo en medio líquido, para lo cual las bacterias utilizan unos apéndices llamados flagelos. Estos apéndices constan de tres estructuras básicas: el cuerpo basal, inserto en el sistema de membranas, el gancho conector y el filamento extracelular, cuya longitud es de varias veces la longitud del cuerpo de la bacteria [56]. En la mayoría de las bacterias, estos filamentos pueden rotar en sentido horario y antihorario, aunque en algunos casos, como *Ensifer meliloti* y el flagelo lateral de *B. diazoefficiens*, el flagelo rota en un solo sentido, siendo la rotación interrumpida por cortos períodos a intervalos irregulares. La rotación ocurre gracias a un motor celular, el cual transmite el movimiento rotatorio al filamento extracelular a través del gancho conector [14]. Algunos microorganismos pueden nadar sin flagelos como es el caso de la cianobacteria marina *Synechococcus sp.* [31] y el caso de las espiroquetas, las cuales, por su morfología, pueden moverse como un sacacorchos gracias a unos filamentos internos [136].

El número y disposición de los flagelos en la superficie bacteriana es diferente para cada especie, distinguiéndose cuatro grupos: monótricos (un solo flagelo enganchado a uno de los polos), anfítricos (un flagelo en cada polo), lofótricos (grupos de flagelos en uno o en ambos polos) y perítricos (flagelos distribuidos sobre la superficie de la célula) [109]. Además, un número limitado de bacterias poseen un sistema dual de flagelos, y de esta manera pueden expresar dos sistemas de flagelos completamente diferentes, como es el caso de *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *Rhodospirillum centenum* y varias *Bradyrhizobium spp.*, las cuales poseen un flagelo polar (o subpolar en el caso de *Bradyrhizobium spp.*) y flagelos laterales (Figura 1.2).

Existen diferentes patrones de natación dependiendo del número y tipo de flagelos presentes. Uno de los más estudiados es el realizado por *Escherichia coli*, que posee más de un flagelo perítrico. Cuando los filamentos rotan en sentido antihorario éstos se agrupan formando un ramillete y permiten a la bacteria realizar una carrera en medio líquido, y cuando uno o más de estos filamentos cambia súbitamente su sentido de rotación, el ramillete se desarma, lo cual permite a la bacteria dar un tumbo, y al reasumir la orientación antihoraria y rearmarse el ramillete, realizar una carrera en una nueva dirección [15] (ver Figura 1.3). Las bacterias que poseen un flagelo (sub)polar como *V. alginolyticus*, *V. coralliilyticus* y *B. diazoefficiens* presentan un patrón de nado diferente. Estas bacterias, en lugar de dar un tumbo, se re-acomodan en otra dirección mediante un patrón de corrida y reversa (*run-reverse*), o bien corrida-reversa y aleteo (*run-reverse-flick*). Cuando el flagelo gira en un sentido puede empujar o arrastrar al cuerpo de la bacteria (Figura 1.3). Si inicialmente el flagelo empuja al cuerpo de la bacteria, al cambiar el sentido de rotación del flagelo éste pasa a arrastrarla, lo que ocasiona el patrón de corrida y reversa. Si, por el contrario, el flagelo inicialmente arrastra al cuerpo de la bacteria, al cambiar el sentido de rotación, el flagelo pasa a empujarla produciendo un movimiento en reversa, pero dado que el gancho conector es flexible, este empuje también provoca que el flagelo se corra respecto del eje del cuerpo de la bacteria, lo que lleva a comenzar su carrera en otra dirección

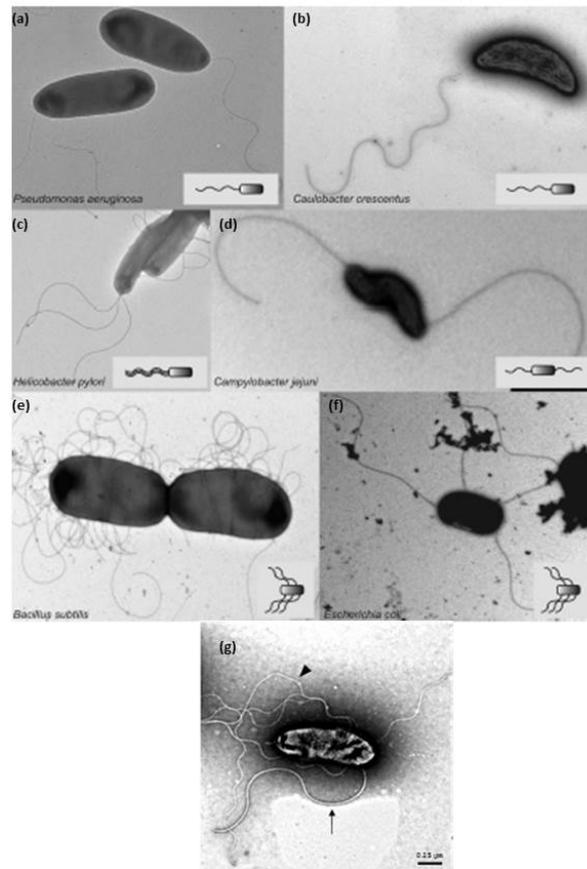


Figura 1.2.: Ejemplos de bacterias con diferente número y ubicación de los flagelos. Monótricos: (a) *Pseudomonas aeruginosa* y (b) *Caulobacter crescentus*. Lofótricos: (c) *Helicobacter pylori*. Anfítricos: (d) *Campylobacter jejuni*. Perítricos: (e) *Bacillus subtilis* y (f) *Escherichia coli*. Bacterias con sistemas duales: subpolar (flecha) y lateral (puntero) (g) *B. diazoefficiens*, con un flagelo subpolar y varios laterales. Fotografías tomadas con microscopía electrónica de transmisión, extraídas (a-f) de [109] y (g) de [96].

(aleteo) [138, 114]).

Verbenear o *Swarming*

Este tipo de movimiento se ha observado sobre superficies y también requiere de flagelos como la natación. A diferencia de la natación, en la cual las bacterias se mueven en forma individual, el verbenear es un movimiento de tipo grupal; las bacterias del borde de la colonia se agrupan y se mueven en forma de oleadas. Aquellas bacterias que pueden moverse en forma de natación también pueden hacerlo en forma de verbenear. El pasaje de un tipo de movimiento a otro tiene que ver con las condiciones del entorno y va acompañado de un cambio morfológico: para verbenear las bacterias expresan múltiples flagelos y, en algunos casos, va acompañado de una elongación del cuerpo celular [56]. En el laboratorio, este movimiento puede observarse sobre la superficie de medios agarizados (0,5-2% agar) en los cuales la colonia de bacterias se expande en forma de ramificaciones desde el centro de la colonia hacia el borde [45] (Figura 1.4).

Algunas bacterias como *Proteus mirabilis* poseen flagelos perítricos con los cuales desarrolla tanto la natación como el verbenear. Otras, como *V. parahae-*

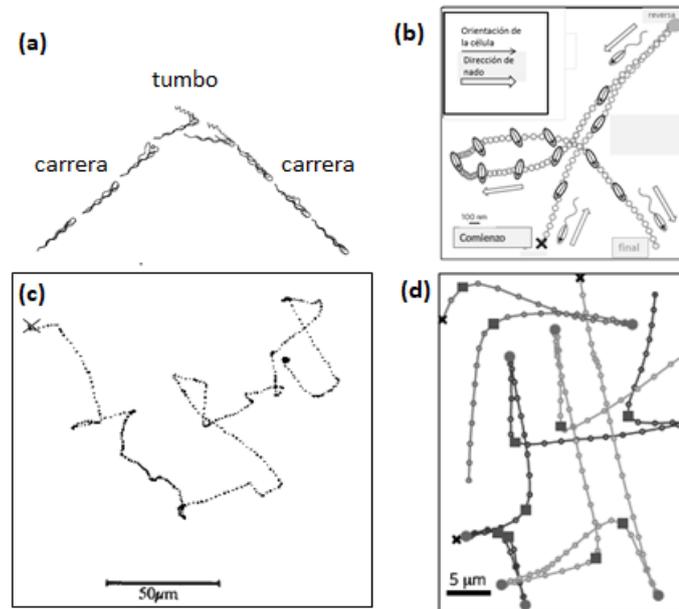


Figura 1.3.: Mecanismo de reorientación del movimiento para (a) una bacteria con flagelos peritricos (carreras y tumbos), modificada de [25] y (b) para una bacteria monotrica (carreras y reversas y carreras, reversas y aleteo), modificada de [114]. Trayectorias (inicio: \times) (c) de carreras y tumbos para *E. coli*, extraída de [11] y (d) de carrera, reversa (círculo) y aleteo (cuadrado) para *V. coralliilyticus*, extraída de [114].

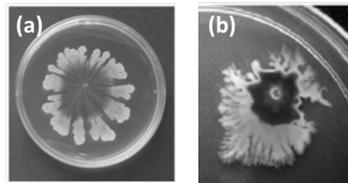


Figura 1.4.: Verbenear o *swarming* de (a) *P. aeurogenosa*, extraída de [88] y (b) *B. diazoefficiens*, extraída de [24]

molyticus poseen diferentes sistemas de flagelos para cada movimiento; para la natación utilizan un flagelo polar (anclado en el polo) mientras que para verbenear inducen la expresión de múltiples flagelos laterales (o peritricos) [80].

B. diazoefficiens utiliza ambos sistemas de flagelos para desarrollar este movimiento, aunque los flagelos laterales son más aptos para el verbenear [24].

1.2.1. Cómo hacen las bacterias para orientar su movimiento

Esta secuencia de carreras y tumbos con cambios de dirección se encuentra regulada por el proceso de quimiotaxis, el cual consiste en una serie de señalizaciones internas que orientan a la bacteria en un gradiente hacia una mayor concentración de nutrientes, o una menor concentración de sustancias tóxicas. Para detectar las sustancias quimioatrayentes o repelentes las bacterias cuentan con receptores específicos en su superficie. Estos son proteínasceptoras de grupos metilos (*methyl-accepting chemotaxis proteins* o MCP) y para transmitir las señales poseen proteínas que se activan o desactivan uniéndose a un grupo fosfa-

to, de las cuales las más importantes son CheA y CheY. Cuando las MCP están activas, aumentan la fosforilación de CheA (CheA~P), la cual transfiere el grupo fosfato a CheY activándola (CheY~P). La activación de CheY aumenta la probabilidad de que el flagelo gire en sentido horario (tumbos) [8]. Si una sustancia quimioatrayente se une a los receptores MCP éstos reducen su actividad, con la consecuente inactivación de CheA y CheY y es más probable que el flagelo rote en sentido antihorario (carrera) [14] (Figura 1.5).

Otras proteínas implicadas en la quimiotaxis son CheW, CheR y CheB. La CheW tiene un rol en la unión de los MCP a CheA y promueven la activación de CheA a CheA~P [14]. Por su parte CheR y CheB son importantes para la adaptación, puesto que son enzimas que metilan y desmetilan el MCP, respectivamente. Su función es regular la actividad de este complejo receptor generando una adaptación y proporcionando a cada célula una “memoria temporal” [7]. Estos procesos permiten la comparación temporal de las concentraciones de atrayente, y avanzar en el sentido de concentraciones más altas de quimioatrayente.

Para el caso de las bacterias con sistemas de flagelos duales, no está claro si cada uno tiene su propio juego de proteínas de quimiotaxis. En el caso de *B. diazoefficiens*, existen al menos dos cúmulos de quimiotaxis en su genoma, y uno de ellos ha sido reportado como funcional [29]. Además, mutantes carentes del filamento flagelar subpolar se vieron afectados en la quimiotaxis, mientras que mutantes carentes del filamento lateral no produjeron respuestas significativas, con lo cual parecería que el flagelo lateral no posee asociación con estos sistemas de orientación [96].

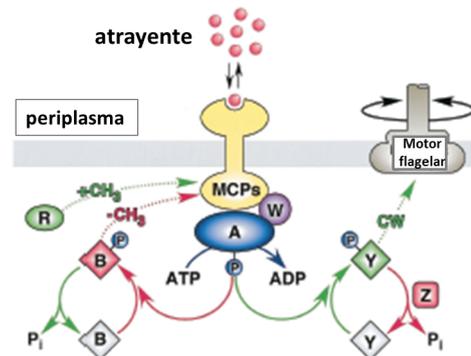


Figura 1.5.: Modelo de señalización de la quimiotaxis. Esquemáticamente se representan sobre la membrana plasmática los quimiorreceptores (MCPs) y el motor del flagelo. En el citosol se ubican las proteínas de señalización: CheA (A), CheW (W), CheY (Y), CheZ (Z), CheB (B) y CheR (R). En verde se muestra la vía que activa el sentido horario de rotación del flagelo y en rojo la que activa el sentido antihorario (condición establecida por defecto). La unión de un quimioatrayente o la remoción de un grupo metilo llevan del estado fosforilado activo (verde) al estado desfosforilado inactivo. Modificado de [89].

1.2.2. Estructura, funcionamiento y regulación del flagelo

Para entender mejor cómo es que se produce el movimiento de los flagelos y su relación con el Δp describiremos con más detalle cada una de las partes que lo componen:

El flagelo bacteriano es un complejo supramolecular el cual se compone de alrededor de cuarenta proteínas diferentes que se han denominado como Flg, Flh o Fli (Figura 1.6). Se pueden distinguir tres partes del flagelo: el cuerpo basal (FlgB, FlgC, FlgF-I, FlhA, FlhB, FliE-J, FliM-R MotA y MotB), el gancho conector (FlgE) y el filamento (FliC y FliD). El cuerpo basal se encuentra embebido entre las membranas celulares y actúa como un motor rotacional mientras que el gancho y el filamento se extienden en el exterior de la célula, aunque en algunas especies pueden estar envueltos por la membrana externa [112]. Más allá de estos detalles, el filamento posee una estructura helicoidal, que al rotar empuja o arrastra al cuerpo de la bacteria. El gancho une el cuerpo basal con el filamento, también es helicoidal pero más corto, y funciona como un conector universal que trasmite el torque producido por el motor hacia el filamento.

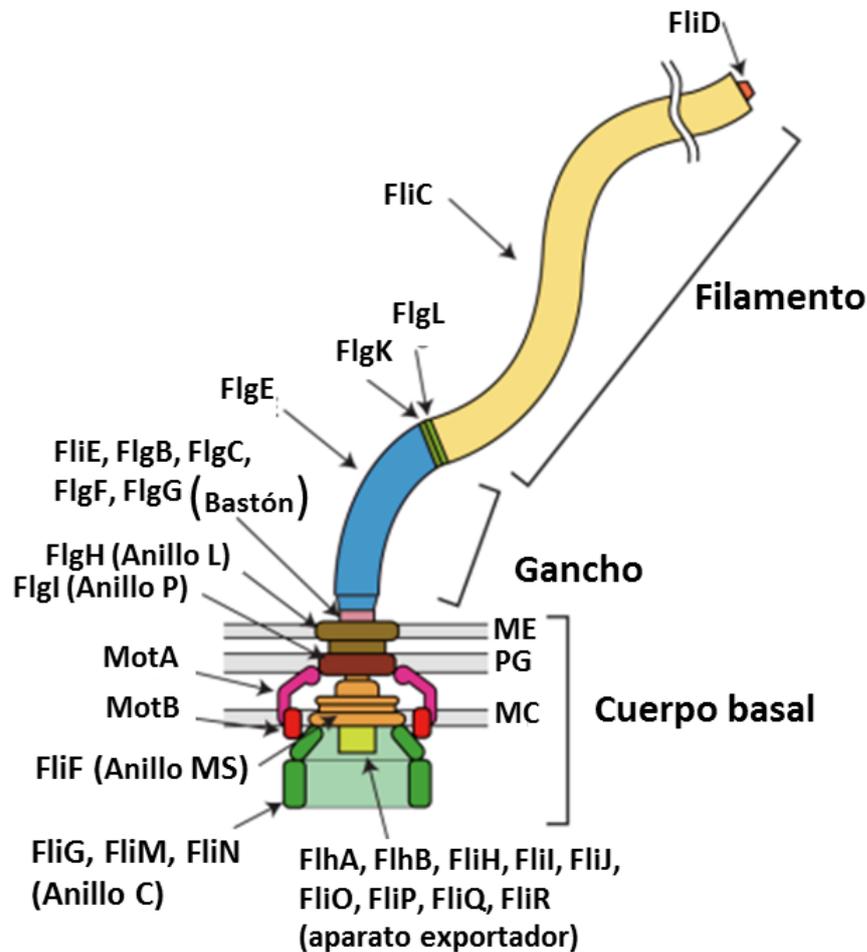


Figura 1.6.: Diagrama de un flagelo. Se esquematiza cada una de las partes embebidas, como es en el caso de bacterias Gram-negativas, en las membranas externa y citoplasmática y el peptidoglicano que compone el espacio periplasmático. Cada parte del complejo flagelar está compuesta por proteínas específicas. Las proteínas que constituyen la parte móvil del flagelo se nombraron Fl (i, h o l) y las que dan cuenta del estator se llamaron Mot. ME, membrana externa; PG, capa de péptidoglicano; MC, membrana citoplasmática. Modificada de [85]

1.2.2.1. Estructura y funcionamiento

El motor flagelar es una máquina bioquímica capaz de rotar a altas velocidades con una gran eficiencia; consta de un rotor y unas once subunidades que forman el estator. La energía para su funcionamiento la obtiene del gradiente iónico de la membrana citoplasmática de la bacteria. En las bacterias entéricas *E. coli* y *Salmonella spp.* el motor flagelar es activado por protones (H^+) [75], mientras que especies marinas como *V. alginolyticus* y otras alcalófilas extremas como *Bacillus alcalophilus* utilizan iones sodio (Na^+) [54, 49].

El rotor se compone de dos anillos: el anillo MS formado por 26 copias de FliF y el anillo C formado por FliG, FliM y FliN (Figura 1.7). FliG se asocia en forma directa con FliF, se han observado desde 26 a 38 copias de FliG por lo que no es necesaria una estequiometría 1 FliG:1 FliF. FliM y FliN forman un complejo estable con una estequiometría 1 FliM:4 FliN [120]. Se estima que las proteínas del anillo C son las responsables del cambio de sentido de rotación del motor en *E. coli* y *Salmonella enterica* *bv typhimurium* dado que mutaciones en FliG, FliM y FliN han afectado el sentido de rotación [139, 69].

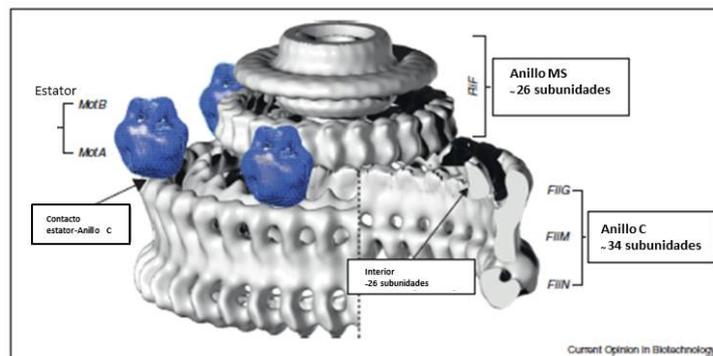


Figura 1.7.: Arquitectura del motor flagelar. Estructura tridimensional reconstruida de Microscopía Electrónica de *Salmonella enterica* *bv typhimurium*. En la misma se pueden apreciar la estructura y simetría de los anillos que conforman el cuerpo basal (gris) y las estructuras que conforman el estator, dispuestas en torno a los anillos (azul). Modificada de [120]

Cada estator se compone de las proteínas de membrana MotA y MotB en una composición $MotA_4MotB_2$. MotA posee cuatro segmentos transmembrana, con un dominio relativamente largo en el citoplasma mientras que en el periplasma el segmento es muy corto. MotB posee un segmento corto en el citoplasma, un solo segmento transmembrana y un dominio largo en el periplasma fuertemente unido al péptidoglicano. Esta estructura les permite a las unidades del estator anclarse a la membrana y comunicar el periplasma con el citoplasma. Cada estator posee dos canales iónicos a través de los cuales se acopla el pasaje de protones (H^+) con la generación del torque gracias a las interacciones entre MotA y la proteína del anillo C, FliG [61]. Los motores impulsados por iones sodio (Na^+) poseen estatores similares compuestos por las proteínas PomA y PomB y un anillo adicional compuesto por MotX y MotY [107, 125] (Figura 1.8).

Cada estator actúa en forma independiente, pudiendo funcionar el motor con un único estator [70], las subunidades del estator se van acoplando al motor según las condiciones externas [127, 128, 6]. Existen modelos estructurales que

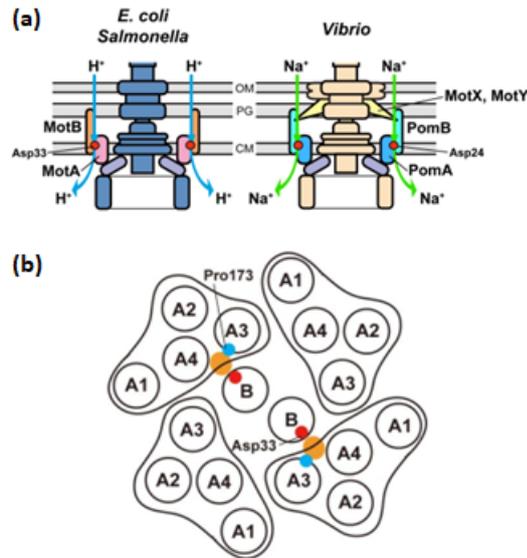


Figura 1.8.: En la parte (a) Diagramas esquemáticos de un motor flagelar impulsado por H^+ y otro impulsado por Na^+ . En la parte (b) Arreglo de los segmentos transmembrana MotA/B consistentes de cuatro copias de MotA y dos de MotB. El complejo posee dos canales conductores de H^+ . Extraída de [85]

proponen cómo se transmitiría el torque desde los canales del estator al rotor. Existe un residuo aspartato (altamente conservado) en el segmento de membrana de la proteína MotB, que al parecer es esencial para la rotación del motor y está directamente asociado a la conducción de H^+ a través del estator. Se ha propuesto que la interacción de los H^+ con el residuo aspartato induce un cambio conformacional en MotA y este último interactúa con FliG [141].

1.2.2.2. Velocidad de rotación del flagelo y Δp

Se han realizado múltiples experimentos para medir la velocidad de rotación de los flagelos bacterianos en bacterias «atadas». Estos consisten en fijar la bacteria a un vidrio ya sea mediante el flagelo o mediante el cuerpo de la bacteria (en cuyo caso se fija al extremo del flagelo una bolita de látex) y se observa la frecuencia con la que rota o bien el cuerpo de la bacteria o bien la bolita de látex respectivamente (Figura 1.9 a y b). Para una bacteria fija la velocidad de rotación (ω) depende del torque ejercido por el motor flagelar (τ) y la carga viscosa del medio $\omega = \tau/2\pi f$ [12], donde f es el coeficiente de arrastre viscoso y depende de la forma característica del cuerpo que rota, de su geometría y de la viscosidad del fluido. De estos experimentos se ha observado que el motor flagelar es capaz de funcionar en dos regímenes diferentes: uno de bajas velocidades (o alta carga viscosa) en el cual el torque es aproximadamente constante y otro de altas velocidades (o baja carga viscosa) en el cual el torque decae con ω [21] (Figura 1.9). El punto de separación entre estos dos regímenes se conoce como «rodilla» y es variable según la temperatura a la que se realizaron las mediciones [21] y el pH interno [86]. Este comportamiento característico torque- ω es propio de todas las especies bacterianas en las que se ha medido, tanto para motores que funcionan con H^+

como para aquellos que lo hacen con Na^+ [118].

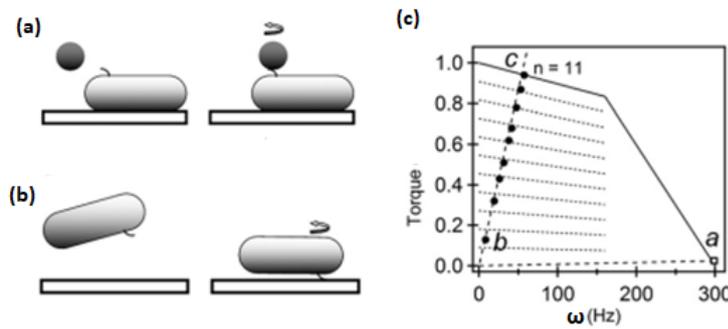


Figura 1.9.: Relación torque velocidad para bacteria fijada al vidrio de diferentes maneras para que posean cargas viscosas diferentes: (a) por su cuerpo, en este caso se une al flagelo una bolita de látex (b) por medio del flagelo, en este caso rota el cuerpo de la bacteria. (c) Curva relación torque-velocidad angular: en el punto **a** el flagelo puede rotar con uno o dos estatores, mientras que en el punto **b** la carga es mayor y el motor incrementa el número de estatores hasta el punto **c**. Imagen modificada de [70].

Se ha observado que para una dada viscosidad, ω es proporcional a la Δp . Este comportamiento se mantiene para ambos regímenes [39]. Para un motor altamente acoplado el flujo de protones es proporcional a ω [78] $J_H = n\omega/2\pi$ (n es el número de protones por revolución). Dado que ω es proporcional al Δp $\omega = \alpha(f) \Delta p$ (f coeficiente de arrastre viscoso) tenemos que $J_H = nf\Delta p/(2\pi)$. Los coeficientes asociados a J_H y ω pueden agruparse en un único coeficiente de conductividad del motor $\eta = n\alpha(f)/(2\pi)$, mediante el cual se obtiene una ley ohmica para el flujo de protones a través del motor con relación al Δp para una dada viscosidad, $J_H = \eta\Delta p$.

1.2.2.3. Regulación de la síntesis de los flagelos

El ensamblaje de uno o más flagelos requiere una cantidad de energía significativa para la bacteria. El proceso de ensamblaje del sistema flagelar ha evolucionado en una forma regulada, que le permite construirse por etapas, comenzando por el cuerpo basal y formando luego las estructuras extracelulares. En términos globales, la regulación de la expresión de los genes implicados en el ensamble de los flagelos es altamente conservada para todas las especies bacterianas. Una de las características claves en la coordinación de la expresión de los genes es el chequeo en determinados puntos del ensamblaje, estos chequeos permiten evitar la acumulación de proteínas que deben ser exportadas cuando el aparato de exportación aún no se encuentra funcional [22].

En el modelo de *E. coli*, la síntesis del flagelo comienza con la formación del cuerpo basal; éste se compone del anillo MS, el anillo C y el aparato exportador como así también de un bastón rodeado de los anillos P y L. Primeramente se ensambla el anillo MS en la membrana citoplasmática y éste será la base del resto de la estructura. El anillo C se ensambla en la interfase citoplasmática del anillo MS junto con el aparato exportador. Este aparato se compone de proteínas

chaperonas gracias a las cuales se secretan las proteínas estructurales que forman el resto del flagelo. La primera estructura que se sintetiza fuera del citoplasma es el bastón, el cual se extiende a través del espacio periplasmático (en bacterias Gram-negativas) o de la pared celular (en bacterias Gram-positivas). La iniciación del bastón actúa como un punto de chequeo intermedio en las especies como *C. crescentus*, *Vibrio spp.* y *Pseudomonas spp.* [55].

Una vez completo el cuerpo basal, el gancho se ensambla en el punto final del bastón. El gancho completo es utilizado como punto de chequeo en la expresión de todos los sistemas flagelares estudiados [52]. Al final del gancho se ensamblan las proteínas FlgK y FlgL, las cuales forman la unión del gancho con el filamento. Las decenas de subunidades de flagelina que forman el filamento (por ej: FliC) son exportadas e incorporadas sucesivamente hasta la proteína final FliD [55].

Todos los sistemas flagelares poseen un regulador maestro al inicio de su jerarquía transcripcional, éste es el que dicta cuándo la bacteria comenzará la síntesis de un flagelo o no. En general el regulador maestro induce la expresión de los operones flagelares que codifican el cuerpo basal, el gancho, las proteínas relativas a éste y los reguladores de la síntesis de las flagelinas del filamento. Por último se sintetizan las flagelinas del filamento junto con las proteínas de quimiotaxis [77].

Esta organización jerárquica sugiere que el primer nivel tendría un rol importante en la regulación de la movilidad debido a factores externos. Los reguladores maestros, como *flhDC* en las enterobacterias y *fleQ* o *flrA* en *P. aeruginosa* y *V. cholerae*, respectivamente, son altamente reguladas en respuesta a cambios en el entorno y por proteínas regulatorias globales [117]. En el caso de *C. crescentus* el sistema de regulación del flagelo polar responde a señales relativas al ciclo celular; es así que en esta bacteria la síntesis del flagelo está coordinada con el ciclo celular [137]. En el caso de especies como *E. meliloti* y *Brucella melitensis*, la expresión del flagelo se encuentra controlada por requerimientos nutricionales y fisiológicos específicos [103, 37].

Como expresáramos antes, *B. diazoefficiens* posee dos sistemas flagelares diferentes: un flagelo subpolar, parecido al de *C. crescentus* y un sistema de flagelos laterales, similares a los de *E. meliloti*. Este patrón es particular entre los rizobios y se observa en casi la mitad de las cepas del género *Bradyrhizobium* que han sido secuenciadas [40]. La regulación y expresión de ambos flagelos es diferente. El flagelo subpolar es constitutivo mientras que la expresión del flagelo lateral se induce bajo ciertas condiciones. El regulador maestro del flagelo lateral, *lafR*, es de tipo IB [83] por similitud con los reguladores *rem* y *ftcR* de *E. meliloti* y *B. melitensis*, respectivamente. Estos últimos están regulados por otro regulador de tipo IA (*visNR* y *vjbR*, respectivamente) los cuales responden a señales del ciclo celular o estímulos del ambiente para activar o inactivar la síntesis de flagelos [103, 37]. En el caso de *B. diazoefficiens* la actividad de la CTE parece ser la señal ligada a la transcripción de *lafR*, puesto que en condiciones en las que la velocidad de respiración se ve disminuida, como microaerobiosis [93] y deficiencia de hierro [140], la transcripción de *lafR* se ve disminuida, mientras que en condiciones que aumentan la actividad de la CTE, como un estrés oxidativo moderado, inducen su transcripción [29].

1.3. Metabolismo y biosíntesis de flagelos en *B. diazoefficiens*

Los rizobios son un conjunto de alfa- y beta-proteobacterias, cuya característica común es establecer simbiosis fijadoras de N_2 con leguminosas, por ejemplo *B. diazoefficiens* con soja, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* con trébol, *E. meliloti* con alfalfa, *Mesorhizobium ciceri* con garbanzo, *Burkholderia phymatum* con poroto, etc. Todos los rizobios pueden existir tanto en vida libre en el suelo como asociados simbióticamente con las raíces de las leguminosas formando nódulos. Sólo los rizobios que se encuentran en los nódulos son capaces de fijar nitrógeno, ya que en éstos se expresa la actividad del complejo nitrogenasa, el cual cataliza la reducción de N_2 atmosférico a NH_4^+ . El amonio queda a disposición para la planta mientras que, en compensación, los rizobios dentro del nódulo reciben sustratos carbonados de la planta.

El rendimiento en fijación de N_2 por parte de los rizobios depende tanto de la eficacia de cada nódulo como del número de nódulos. Cada nódulo es ocupado por la descendencia clonal de una única bacteria. Existe en el suelo una variedad de genotipos que forman parte de la población alóctona del suelo, capaces de nodular las raíces de soja, cuya eficacia fijadora de N_2 es muy variable. Por su parte las plantas solo permiten la formación de un número limitado de nódulos en sus raíces [92], por lo que para obtener un buen rendimiento de fijación de N_2 es deseable que la mayoría de los nódulos sean ocupados por bacterias de alta calidad, incorporadas en los inoculantes.

Se ha logrado seleccionar en el laboratorio a variantes más móviles derivadas de distintas cepas de *B. diazoefficiens* y *B. japonicum* [2, 4, 32]. Estas cepas poseen desreprimido el flagelo lateral, de modo tal que son capaces de expresarlo aún en condiciones donde la cepa parental no lo expresa. Experimentos realizados a campo en soja inoculada con una de estas cepas, llamada *B. diazoefficiens* LP 3008 han mostrado que estas bacterias lograron ocupar significativamente más nódulos, y en consecuencia, se obtuvo un mayor rendimiento en grano que en las parcelas inoculadas con la cepa parental [2, 73].

B. diazoefficiens utiliza para nadar los dos sistemas de flagelos, el subpolar y los laterales, y se ha reportado que ambos serían movidos por gradientes de H^+ [58]. El flagelo subpolar, como su nombre lo indica, se inserta a un lado de uno de los polos del cuerpo de la bacteria, es más bien grueso y corto, está compuesto por las flagelinas (68-kDa) FliC1, FliC2, FliC3 y FliC4 (Bll5843-Bll5846) y solo hay uno por bacteria. Los flagelos laterales, si bien se desconoce cuáles son específicamente sus puntos de anclaje, se estima que se insertan en los laterales del cuerpo bacteriano y su estructura filamentosa es más bien fina y larga. Este flagelo está compuesto por las flagelinas de peso molecular más bajo (34-kDa) LafA1 (Bll6866) y LafA2 (Bll6865). Cada bacteria parece tener de 3 a 5 flagelos de este sistema [96].

Resulta llamativo que una gran parte de las cepas de *Bradyrhizobium spp.* posean sistemas de flagelos duales mientras que otras no [40], siendo que todas ellas comparten hábitats similares (Figura 1.10), y asimismo que resulte relativamente fácil aislar en el laboratorio derivadas más móviles que tienen desreprimida la expresión del sistema de flagelos laterales [2]. Es decir, la evolución no ha conducido a bacterias que expresan constitutivamente los dos sistemas flagelares, sino que

parece haber optimizado el número de sistemas flagelares y su nivel de expresión a ciertas formas de vida, si bien aún no podemos deducir cuáles serían. La pregunta sobre el valor adaptativo de los sistemas de flagelos duales no está resuelta y en parte la encararemos, desde un punto de vista bioenergético, en este trabajo de Tesis.

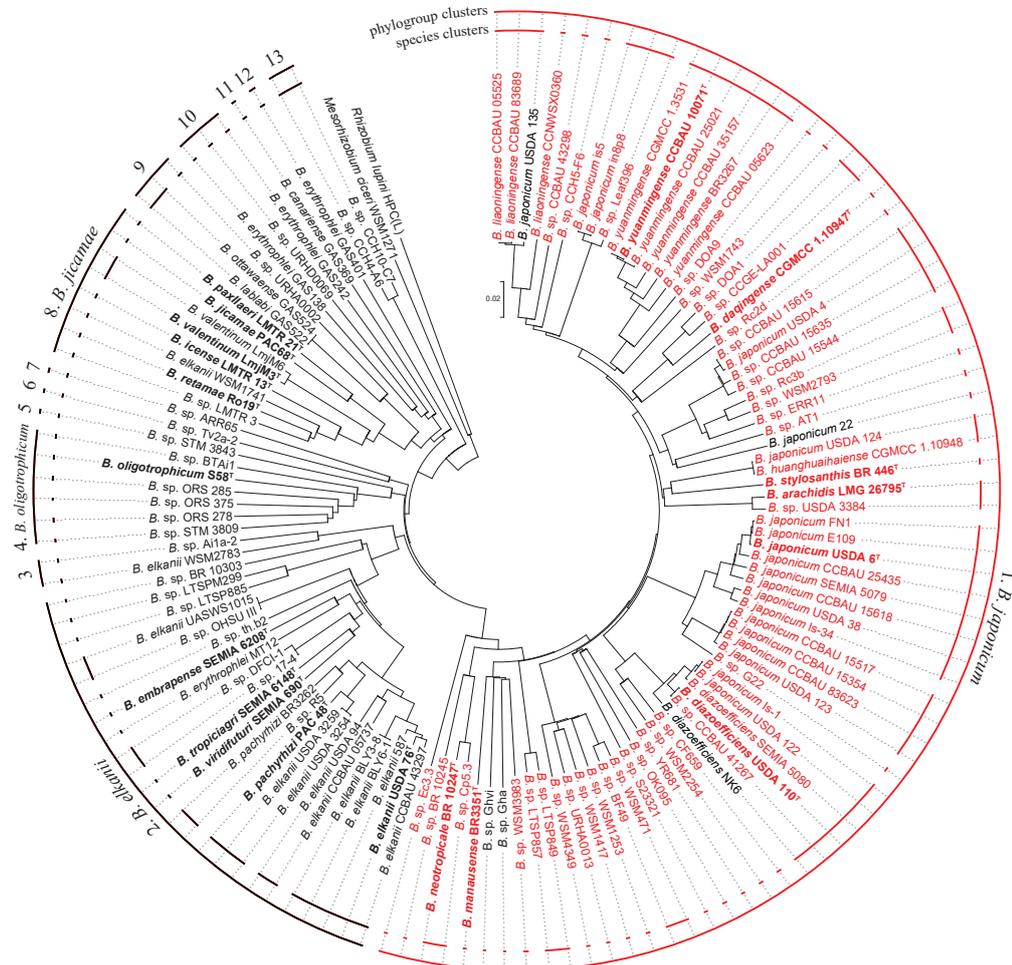


Figura 1.10.: Arbol filogenómico basado en distancias intergenómicas de 128 genomas de *Bradyrhizobium spp.*. Los genomas se agruparon a nivel filogenético (círculo externo) y de especies (círculo interno). *Rhizobium lupini* HPC(L) y *Mesorhizobium ciceri* WSM1271 se utilizaron como *outgroups*. Solo los genomas del grupo filogenético 1 poseen ambos flagelos: subpolar y lateral (rojo), mientras que el resto de los genomas (2 a 13) solo presentan el flagelo subpolar (negro). Las cepas tipo están indicadas en negrita y con una T. Extraída de [40].

Para nadar en medios líquidos *B. diazoefficiens* puede prescindir de los flagelos laterales y valerse solo del flagelo subpolar, pero para moverse en medio viscoso necesita de los flagelos laterales [96]. Además de ser inducidos en medios viscosos, los flagelos laterales se expresan ante una mayor actividad de la CTE, pues se ha observado que en microaerobiosis [93] o en deficiencia de hierro [140], la transcripción de *lafR* se ve disminuida, mientras que en condiciones que aumentan la actividad de la CTE, como un estrés oxidativo moderado, inducen su trans-

cripción. Esta inducción selectiva también se produce cuando *B. diazoefficiens* es crecida en diferentes fuentes de carbono [24]. Dos fuentes de carbono típicamente utilizadas para cultivar *B. diazoefficiens* son L-arabinosa (Ara) y D-manitol (Mtl). En los medios de cultivo líquidos suplementados con Ara, *B. diazoefficiens* expresa los flagelos laterales, mientras que si se utiliza Mtl, éstos no se inducen. Hasta el momento, esta capacidad de expresar ambos sistemas flagelares en medio líquido es compartida solamente con *Shewanella putrefaciens* [96], lo cual abre el interrogante de cuál será la particularidad del metabolismo de Ara que hace disparar la síntesis del sistema lateral. Por lo tanto, podríamos pensar que el metabolismo de cada fuente de carbono estaría relacionado con la eficiencia para translocar protones y el estado energético de la célula, de tal manera de posibilitar la expresión de los flagelos laterales -energéticamente costosa- cuando las condiciones para el crecimiento sean más favorables.

1.3.1. Metabolismo de las distintas fuentes de carbono

Las bacterias del orden *Rhizobiales* son capaces de metabolizar diversas fuentes de carbono, como ser aldosas, polioles o ácidos orgánicos de distinto número de carbonos; para esto disponen de diferentes vías catabólicas. La vía Entner-Doudoroff (ED) se encuentra presente en la mayoría de las bacterias del orden *Rhizobiales* y se ha postulado como la vía de catabolismo de las hexosas [122]. La vía de las pentosas fosfato (PP) no se ha detectado y aún no está claro si la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) está activa en estas especies [115](Figura 1.11). El ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA, por sus siglas en inglés) también se ha encontrado completo y activo en rizobios y a través de éste se metabolizan algunas fuentes de carbono de cuatro carbonos y los subproductos de las vías anteriores [122].

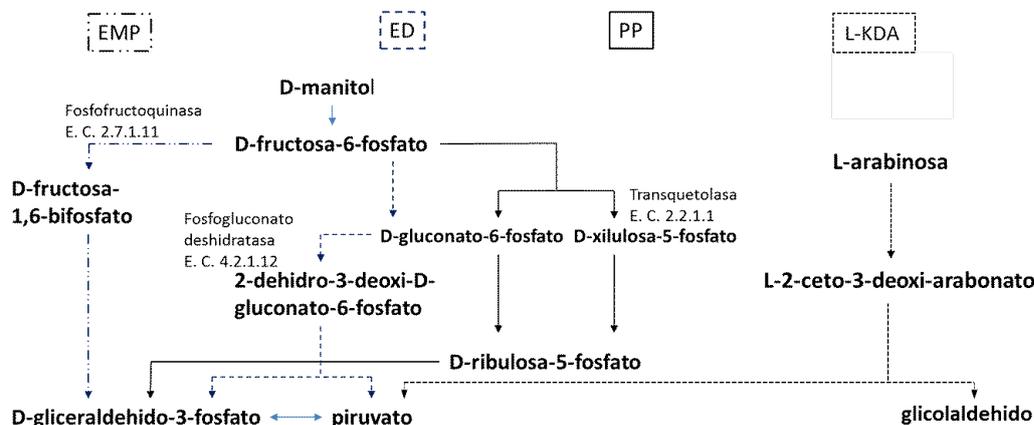


Figura 1.11.: Esquema simplificado de las vías EMP, ED y PP. Las tres vías culminan con la formación de piruvato. La vía EMP (línea de guiones y puntos) requiere de la fosfofructoquinasa, mientras que la de ED (línea de guiones) oxida el D-gluconato-6-fosfato a través de la fosfogluconato deshidratasa, mientras que la vía PP (línea llena) requiere el pasaje a una pentosa. La L-arabinosa, por su parte, se degradaría a través del L-KDA.

Al momento del desarrollo de este trabajo de Tesis, las vías de degradación de Ara y Mtl en *B. diazoefficiens* no estaban del todo claras.

Mtl es un poliol derivado de la hexosa manosa, en *B. diazoefficiens* se ha reportado que este poliol primeramente es oxidado a D-fructosa mediante una deshidrogenasa específica de Mtl [63] y luego fosforilado a D-fructosa-6-fosfato en una reacción catalizada por una D-fructosa quinasa. Si bien existe el gen que codifica la enzima fosfofructoquinasa en *B. diazoefficiens*, no se ha detectado aún su actividad [122, 115]; por lo que hay controversia respecto de si Mtl se metabolizaría a través de la vía EMP. La otra vía posible, la ED, tampoco tendría una actividad significativa en esta especie bacteriana, y se ha postulado que, en ausencia de esta vía, las hexosas seguirían la vía de las PP [115].

Por otro lado, Ara es una pentosa y se ha descrito que su metabolismo en *B. diazoefficiens* se produce a través de la ruta del L-2-ceto-3-deoxi-arabonato (L-KDA) la cual da por resultado una molécula de tres carbonos –piruvato– y otra de dos –glicolaldehído– [90]. Así, esta ruta es similar a la descrita por Entner-Doudoroff para la glucosa, pero con un precursor de cinco carbonos. El piruvato continuaría su degradación por el TCA, pero la ruta de degradación del glicolaldehído no estaba descrita. Durante el desarrollo de esta Tesis, se ha postulado que estaría acoplada a la oxidación de oxalato o se degradaría a glicerato [62].

Tanto las vías descritas para Mtl como para Ara podrían confluir en piruvato, el cual ingresaría al TCA. Luego, los productos reducidos cederían sus electrones a la CTE los cuales finalmente se transferirían hasta el O_2 como aceptor final. Por lo tanto, conocer el mapa metabólico del catabolismo de la fuente de carbono es importante en el sentido de que pueden obtenerse balances de rendimiento energético para una u otra fuente de carbono y por lo tanto evaluar sus eficiencias para translocar H^+ .

1.4. Objetivos

La síntesis y la rotación de cada sistema flagelar requieren el aporte de una gran cantidad de energía metabólica. Por ello, llama la atención la expresión diferencial del sistema de flagelos laterales en medio líquido con Ara, ya que para nadar en medios líquidos *B. diazoefficiens* puede prescindir de los flagelos laterales y valerse solo del flagelo subpolar. Dado que Ara es utilizada comúnmente en la formulación de medios líquidos para el crecimiento de *B. diazoefficiens*, es importante conocer cómo estos requerimientos energéticos podrían afectar la producción de biomasa. Además, es importante entender si la expresión diferencial de los flagelos laterales responde a un cierto estado energético o a la fuente de carbono en sí. No está claro cuál es la señal que induce la expresión de los flagelos laterales en medio líquido, pero puesto que el Δp necesario para mover estas estructuras proviene de la oxidación de las fuentes de carbono a través de la actividad de la CTE, se piensa que la disponibilidad de energía en la célula estaría en conexión con la regulación de la expresión de estos flagelos. Para evaluar la eficiencia energética del crecimiento en Ara o Mtl y con ello, la disponibilidad de energía en una u otra fuente de carbono, es necesario conocer las rutas para el catabolismo de cada fuente de carbono.

Al comienzo de esta Tesis las rutas metabólicas de degradación de las fuentes de carbono no estaban claras [90, 63, 115], y además existía un solo trabajo muy antiguo donde se reportaba que la tasa de consumo de O_2 es significativamente

mayor en Ara que en Mtl [126]. Hasta lo que sabíamos, este trabajo no había sido nunca corroborado con metodologías modernas o cepas de referencia. En vista de que los flagelos laterales parecen ser movidos por el Δp derivado de la respiración aeróbica [58], propusimos la hipótesis de que la permisividad de la biosíntesis de los flagelos laterales podría relacionarse con un mayor Δp generado en Ara. En este marco, el objetivo general de esta Tesis es contribuir al conocimiento de la energética de la movilidad de *B. diazoefficiens*. Para ello, abordamos los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar un modelo que tenga en cuenta el rol del Δp entre la fosforilación oxidativa y la rotación de los flagelos bacterianos, considerando cómo el número de flagelos podría afectar la tasa de consumo de O_2 , la biosíntesis de *ATP* y la rotación del motor flagelar.
- Medir experimentalmente la tasa de consumo de O_2 durante el crecimiento bacteriano en condiciones donde difiere el número de flagelos (crecimiento con Mtl o Ara), empleando cepas salvajes y mutantes carentes de flagelos laterales.
- Investigar las vías metabólicas de degradación de Mtl y Ara mediante proteómica comparativa, establecer las estequiometrías correspondientes, y deducir la eficiencia energética en cada caso.

2. Materiales y métodos

Se describirán a continuación los materiales y métodos que se escogieron para la realización de los ensayos de laboratorio como así también para los cálculos y análisis de los datos obtenidos de los experimentos.

2.1. Material biológico

2.1.1. Cepas bacterianas

Para la realización de los experimentos de laboratorio se utilizaron las cepas bacterianas detalladas en la Tabla 2.1

Tabla 2.1.: Cepas utilizadas en este estudio

Cepas	Características	Referencia
<i>B. diazoefficiens</i>		
USDA 110	Cm ^r , Cepa salvaje	[63]
LP 3004	Sm ^r , Cm ^r	[72]
<i>lafR::Km</i>	Km ^{r*}	[83]
$\Delta cbbL$	Cm ^{r**}	desarrollada para esta tesis
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α		Bathesda Res. Lab
S17 – 1		[111]

*mutante insercional en *lafR* derivada de USDA 110.

**mutante delecional en *cbbL* derivada de USDA 110

2.1.2. Manipulación de ADN

Para la obtención del mutante delecional en la región que codifica la enzima RuBisCO (Blr2585 y Blr2586) se utilizó el material descrito en la Tabla 2.2

Los cebadores fueron sintetizados por encargo a Invitrogen S. A.

2.1.3. Plantas

Se trabajó con *Glycine max* (soja), variedad Don Mario 4800, provista por el Ing. Agr. Alejandro Peticari del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola del Centro de Investigaciones en Ciencias Agropecuarias de INTA (Castelar, Pcia. de Buenos Aires).

Tabla 2.2.: Cebadores y plásmidos utilizados en este estudio. Los sitios de restricción relevantes se destacan en negrita. Los cebadores RvUp_RBC y FwDw_RBC poseen regiones de secuencias complementarias (en gris)

Cebadores	Enzima de corte	Secuencia 5'-3'
FwUp_RBC	<i>EcoRI</i>	AAAAGAATTCGCTATTGGGAGCCCGACTAC
RvUp_RBC	<i>Bam-HI</i>	GCCGTCGACGGATCCGAGGGCAAACACGTTGCCGATGATCG
FwDw_RBC	<i>Bam-HI</i>	TGCCTCGGATCCGTGACGGCATGAAACTGACCCAGGGCTG
RvDw_RBC	<i>Hind-III</i>	AAAAAAGCTTAAGGAGATTTCGCACCCGACTC
FwExt_RBC		GCCGCCTAGTCATTCAGAGA
RvExt_RBC		ACGGTGGTGTAGCGGATTG
M13_Fw		GTA AACGACGGCCAGT
M13_Rv		GCGGATAACAATTCACACAGG
Plásmidos	Características	
pK18 <i>mobsacB</i>	Vector suicida en rizobios, Km ^r . [108]	
<i>pCC1</i>	Esta Tesis	

2.2. Medios y condiciones de cultivo

2.2.1. Medios de cultivo

Las cepas de *B. diazoefficiens* fueron crecidas en medio líquido HM sales [104] suplementado con 0,1% (p/v) de extracto de levadura (HME) y además, suplementado o bien con 0,5% (p/v) de D-manitol (Mtl) o bien con 0,5% (p/v) de L-arabinosa (Ara) como fuentes de carbono (HME-Mtl o HME-Ara, respectivamente). El pH del medio fue ajustado a 7 utilizando *NaOH* y *HCl*. La composición del medio se detalla en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3.: Composición del medio HME-Ara ó HME-Mtl

Sustancia	Cantidad
<i>Na₂HPO₄</i>	0,125 g
<i>Na₂SO₄</i>	0,25 g
<i>NH₄Cl</i>	0,32 g
<i>MgSO₄·7 H₂O</i>	0,18 g
<i>FeCl₃</i>	0,004 g
<i>CaCl₂·2 H₂O</i>	0,013 g
<i>HEPES</i>	1,3 g
<i>MES</i>	1,1 g
<i>Extracto de levadura</i>	1 g
<i>Mtl o Ara</i>	5 g
<i>Agua destilada</i>	1000 ml

Para los repiques mensuales y los recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC) utilizamos el medio extracto de levadura-manitol (YEM) [131], ajustado a pH 7. La composición del medio se detalla en la Tabla 2.4

Tabla 2.4.: Composición del medio YEM

Sustancia	Cantidad
<i>Mtl</i>	10 g
K_2HPO_4	0,5 g
<i>Extracto de levadura</i>	0,4 g
<i>NaCl</i>	0,1 g
$MgSO_4,7 H_2O$	0,2 g
<i>Rojo congo</i>	2,5 g
<i>Agua destilada</i>	1000 ml

Para hacer crecer y repicar las cepas de *E. coli* se utilizó el medio de cultivo Luria Bertani (LB) (Tabla 2.5) [105].

Tabla 2.5.: Composición del medio LB

Sustancia	Cantidad
<i>glucosa</i>	1 g
<i>NaCl</i>	5 g
<i>Triptona</i>	10 g
<i>Extracto de levadura</i>	5 g
<i>Agua destilada</i>	1000 ml

Para los experimentos de conjugación se utilizó el medio peptona-extracto de levadura (PSY) [101] suplementado con Ara al 0,1 % (p/v), cuya composición se detalla en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6.: Composición del medio PSY-Ara 0,1 %

Sustancia	Cantidad
<i>Peptona</i>	1 g
<i>Extracto de levadura</i>	1 g
KH_2PO_4	0,3 g
Na_2HPO_4	0,3 g
$MgSO_4,7H_2O$	0,1 g
$CaCl_2$	0,05 g
<i>Biotina</i>	0,2 g
H_3BO_3	10 mg
$ZnSO_4,2H_2O$	1 mg
$FeCl_3,6H_2O$	1 mg
$CuSO_4,5H_2O$	0,5 mg
$MnCl_2,4H_2O$	0,15 mg
$Na_2MoO_4,2H_2O$	0,1 mg
<i>Ara</i>	1 g
<i>agua destilada</i>	1000 ml

Los medios sólidos se prepararon agregando 15 g de agar por litro de medio.

Para los ensayos de crecimiento de la cepa $\Delta cbbL$ se utilizaron el medio Taylor [76] y el medio Taylor suplementado o bien con 0,1 % de Mtl o bien con 0,1 % de Ara (Tabla 2.7). En todos los casos el pH final se ajustó en 6,8.

Tabla 2.7.: Composición del medio Taylor

Sustancia	Cantidad
NH_4Cl	1 g
KH_2PO_4	2 g
$MgSO_4,7 H_2O$	0,8 g
$Na_2SO_3,5 H_2O$	1 g
agua destilada	1000 ml
Metales traza (1000 X)	Cantidad
Na_2EDTA	5 g
$ZnSO_4,7 H_2O$	2,2 g
$CaCl_2,2 H_2O$	7,3 g
$MnCl_2,4 H_2O$	0,5 g
$CoCl_2,6 H_2O$	0,5 g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24},7 H_2O$	0,5 g
$FeSO_4,7 H_2O$	5 g
$CuSO_4,5 H_2O$	0,2 g
agua destilada	1000 ml

Para el cultivo hidropónico de plantas se utilizó la solución Fahraeus modificada [71], cuya composición se detalla en la Tabla 2.8.

Tabla 2.8.: Solución Fahraeus modificada

Sustancia	Cantidad
$CaCl_2 2 H_2O$	0,11 g
$MgSO_4 7 H_2O$	0,12 g
K_2HPO_4	0,2 g
KH_2PO_4	0,17 g
$NaCl$	0,06 g
citrato férrico	0,005 g
KCl	3,73 g
H_3BO_3	1,55 g
$MnSO_4 H_2O$	0,85 g
$CuSO_4 5 H_2O$	0,13 g
$ZnSO_4 7 H_2O$	0,58 g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	0,018 g
agua destilada	1000 ml

2.2.2. Condiciones generales de cultivo

Para cada cultivo de *B. diazoefficiens* se tomó una colonia aislada crecida en medio YEM sólido (agar 1,5 %) y se la inoculó en 10 ml de medio líquido

HME-Ara ó HME-Mtl. Los cultivos se dejaron en agitación (180 rpm) a 28 °C hasta alcanzar la saturación. Este cultivo se utilizó como inóculo, tomándose una alícuota del mismo que se diluyó en 10 ml del medio fresco correspondiente. La biomasa del cultivo se estimó mediante la densidad óptica del mismo a 500 nm (DO_{500}). El número de células viables se estimó haciendo un recuento en placa de las UFC. ml^{-1} en medio YEM sólido, utilizando el método de la gota [50].

Las cepas de *E. coli*, se cultivaron a 37 °C en LB.

2.2.3. Cultivos *batch* en biorreactor

Los cultivos *batch* en biorreactor se realizaron utilizando los medios de cultivo HME-Mtl o HME-Ara por duplicado. Para esto se utilizó un biorreactor LH-210 (Inceltech, Toulouse, Francia) de 5 l con un volumen de trabajo de 4,5 l. La temperatura se fijó en 30 °C y la agitación en 220 rpm. El flujo de aire fue de 25-30 $l \cdot h^{-1}$, y se midió utilizando un caudalímetro de burbuja. Se hizo una dilución en escala del inóculo partiendo del cultivo inicial de 10 ml de medio, diluyéndolo en cultivos posteriores de 100 ml. En todos los casos se trabajó con una DO_{500} inicial de 0,2 por el agregado de un volumen adecuado de inóculo. Para monitorear el crecimiento bacteriano se tomaron tres muestras por día tanto de la fase líquida como de la gaseosa. Se partió de un pH inicial de 7 y se determinó el pH en cada muestra líquida con un pH-metro de laboratorio. Los cultivos tuvieron una duración de 4 días. Hacia el final del cultivo se tomó una muestra de mayor volumen de la cual 30 ml se procesaron para determinar la presencia de flagelinas (2.4.1).

De la fase líquida se tomaron muestras de entre 30-50 ml cada 4 horas, cada una de las cuales se separó en alícuotas para realizar las medidas descriptas a continuación, con las cuales se calcularon los parámetros cinéticos y estequiométricos.

2.2.3.1. Determinación del peso seco

Se tomaron 10 ml de la muestra líquida y se centrifugaron a $12000 \times g$ durante 40 min a 4 °C. Del sobrenadante se realizó la determinación de la concentración de la fuente de carbono y energía (sustrato carbonado). El sedimento de células se lavó con buffer PBS (cantidades en un litro de agua destilada: KH_2PO_4 0,43 g, Na_2HPO_4 1,48 g, $NaCl$ 7,2 g) y se centrifugó nuevamente. Para la determinación del peso seco según [48] el sedimento de células se resuspendió en cantidad suficiente de agua destilada y se trasvasó completamente a recipientes previamente tarados. Dichos recipientes se llevaron a estufa a 110 °C hasta peso constante.

2.2.3.2. Determinación de la concentración de sustrato remanente

El sobrenadante de la muestra líquida se conservó a -20 °C para determinar la concentración de sustrato remanente en el medio de cultivo.

La misma se realizó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC); para esto se realizaron diluciones de las muestras que luego se filtraron manualmente en membranas de nitrocelulosa de 0,22 μm . A su vez se preparó un patrón de Ara o Mtl con concentraciones conocidas para construir una curva de calibración entre 5-50 $mg \cdot l^{-1}$. Luego, una alícuota de 10 μl de cada muestra fue inyectada

manualmente (rheodyne 7725I inyector) en una columna (Carbopac PA 1) a 35 °C, utilizando como fase móvil una solución 0,1 M de $NaOH$ a una velocidad de flujo de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. La altura de los picos se midió con el detector electroquímico Waters 2465 y la concentración de sustrato se cuantificó con el programa Empower Pro, 2002 Waters.

2.2.3.3. Composición de O_2 y CO_2 en los gases de entrada y salida del biorreactor

Para el análisis de la composición de la fase gaseosa se utilizó un analizador paramagnético de O_2 (Servomex 1100 A; Norwood, Mass.) y un analizador infrarrojo de CO_2 (Horiba PIR 2000; Japan).

2.2.3.4. Cálculos

Los datos obtenidos de las muestras líquidas y gaseosas, se utilizaron para calcular parámetros cinéticos y estequiométricos. Para realizar estos cálculos se realiza un balance general de materia para un componente determinado en un cultivo en biorreactor que estará dado por:

$$\text{acumulación} = \text{entrada} - \text{salida} + \text{producción} - \text{consumo}$$

Para un biorreactor con un volumen (V_m) de medio constante, el cambio en la concentración del componente z (C_z) dentro de este estará dado por:

$$V_m \frac{dC_z}{dt} = F^e C_z^e - F^s C_z^s + V_m r_z^f - V_m r_z^c \quad (2.1)$$

donde F se corresponde con los caudales ($l\cdot h^{-1}$) de entrada (e) y salida (s) respectivamente, mientras que r se corresponde con la velocidad volumétrica ($mol_z\cdot l^{-1}\cdot h^{-1}$) de formación (f) y consumo (c) del componente z . r normalmente se expresa en términos de la biomasa seca en unidades de $g\cdot l^{-1}\cdot h^{-1}$ o bien en $C - mol\cdot l^{-1}\cdot h^{-1}$. Un carbono mol ($C - mol$) de una sustancia se define como la cantidad de esa sustancia que contiene un átomo gramo de carbono. Así, la unidad $C - mol$ resulta más práctica para hacer balances de materia pues permite estandarizar respecto a un carbono, cuando no todas las sustancias poseen el mismo número de carbonos en su fórmula molecular.

En el caso de un cultivo tipo *batch* los caudales de entrada y salida de biomasa (X), sustrato (S) y producto (P) (en caso que lo hubiere) son nulos, por lo que los balances de materia para estos tres componentes se reducen a:

$$\frac{dX}{dt} = r_X \quad (2.2)$$

$$\frac{dS}{dt} = r_S \quad (2.3)$$

$$\frac{dP}{dt} = r_P \quad (2.4)$$

Donde r_X y r_P son velocidades de producción y r_S velocidad de consumo. Para una concentración de biomasa dada (X) definimos las velocidades específicas de consumo o producción como:

$$\mu = \frac{r_X}{X} \quad (2.5)$$

$$q_S = \frac{r_s}{X} \quad (2.6)$$

$$q_P = \frac{r_P}{X} \quad (2.7)$$

Para el caso de los componentes gaseosos (O_2 y CO_2), los caudales de entrada y salida del biorreactor no son nulos. En condiciones de no acumulación se tiene que la velocidad de consumo de O_2 y producción de CO_2 se corresponderá con la diferencia entre lo que se alimenta y lo que sale. Entonces las velocidades volumétricas de consumo de O_2 y producción de CO_2 fueron determinadas siguiendo el balance de masas propuesto por [23] para el cual se obtiene la siguiente expresión:

$$r_{O_2} = \frac{1000 F^e (1 - x_{CO_2}^S - x_{O_2}^S)}{R T_{op} V} \left(\frac{x_{O_2}^E}{1 - x_{CO_2}^E - x_{O_2}^E} - \frac{x_{O_2}^S}{1 - x_{CO_2}^S - x_{O_2}^S} \right) \quad (2.8)$$

$$r_{CO_2} = \frac{1000 F^e (1 - x_{CO_2}^S - x_{O_2}^S)}{R T_{op} V} \left(\frac{x_{O_2}^S}{1 - x_{CO_2}^S - x_{O_2}^S} - \frac{x_{O_2}^E}{1 - x_{CO_2}^E - x_{O_2}^E} \right) \quad (2.9)$$

F^e : caudal de aire que ingresa al fermentador ($l h^{-1}$)

R : constante universal de los gases ideales ($l atm (K mol)^{-1}$)

V : volumen de cultivo (l)

T_{op} : temperatura de operación

$x_{O_2}^i$: fracción de O_2 en los gases de entrada ($i = E$) o salida ($i = S$)

$x_{CO_2}^i$: fracción de CO_2 en los gases de entrada ($i = E$) o salida ($i = S$)

Al igual que para la biomasa, el sustrato y el producto; dividiendo r_{O_2} y r_{CO_2} por una X dada, se tienen las velocidades específicas de consumo de O_2 y producción de CO_2 :

$$q_{O_2} = \frac{r_{O_2}}{X} \quad (2.10)$$

y

$$q_{CO_2} = \frac{r_{CO_2}}{X} \quad (2.11)$$

Los rendimientos en biomasa respecto del sustrato consumido entre dos tiempos de cultivo t_1 y t_2 se obtuvieron de los datos de peso seco y concentración de sustrato remanente, en términos de gramos de biomasa por gramos de sustrato se tiene:

$$Y_{X/S} = \frac{X_2 - X_1}{S_2 - S_1} \quad (2.12)$$

Para que este rendimiento sea comparable con fuentes de carbono diferentes debe ser estandarizado a unidades de $C - mol$ (Tabla 2.9).

$$y_{x/s} = \frac{(X_2 - X_1)/cm_X}{(S_2 - S_1)/cm_S} \quad (2.13)$$

donde cm_i es la masa de un $C - mol$ de la sustancia correspondiente.

Tabla 2.9.: Masas de un carbono mol ($C - mol$) de cada una de las sustancias utilizadas

Sustancia	Fórmula	Masa molar (g)	Masa de un carbono mol (g)
Biomasa	$CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$	25,5	25,5
Manitol	$C_6H_{14}O_6$	182	30,3
Arabinosa	$C_5H_{10}O_5$	150	30

Por otro lado, los microorganismos creciendo en cultivo *batch* presentan diversas fases de crecimiento ([74], ver Figura 2.1). Teniendo en cuenta que el crecimiento de los microorganismos sigue una cinética de tipo exponencial y que existe un mezclado perfecto, se pueden calcular los parámetros de crecimiento para la fase exponencial del cultivo. En esta fase de crecimiento todos los nutrientes se encuentran disponibles en exceso por lo que la velocidad específica de formación de biomasa (μ), lo mismo que las velocidades volumétricas de formación o producción de los otros componentes, serán máximas. Por lo tanto los valores de q_{O_2} y q_{CO_2} ((2.10) y (2.11)) determinados utilizando los correspondientes valores de r_{O_2} y r_{CO_2} y X de fase exponencial serán los q_{O_2max} y q_{CO_2max} .

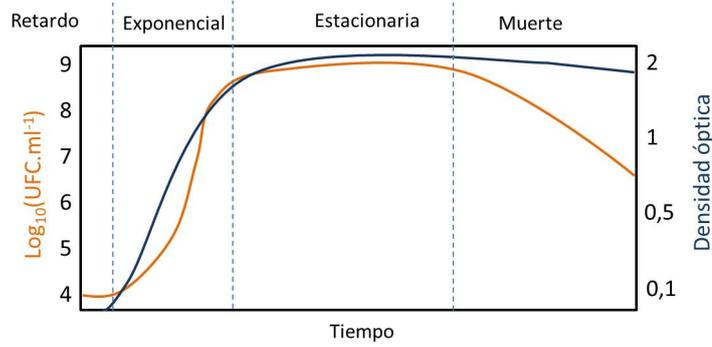


Figura 2.1.: Fases de crecimiento en un cultivo *batch*.

Los valores de r_S no son sencillos de estimar, puesto que se requiere una buena aproximación de la curva de concentración de sustrato respecto al tiempo. Pero puede calcularse como:

$$q_{Smax} = \frac{\mu_{max}}{y_{\frac{X}{S}}} \quad (2.14)$$

donde μ_{max} es la velocidad máxima de crecimiento (o duplicación), es decir la μ correspondiente a la fase exponencial.

Para determinar la μ_{max} ; del balance para X en fase exponencial (2.2) el cambio en la biomasa presente en el cultivo ($\frac{dX}{dt}$) es proporcional a X , siendo la constante de proporcionalidad la μ_{max} :

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \quad (2.15)$$

e integrando se tiene:

$$X = X_0 e^{\mu_{max} t} \quad (2.16)$$

la cual puede ser expresada como:

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu_{max} t \quad (2.17)$$

donde X_0 corresponde al peso seco al tiempo t_0 y X el peso seco al tiempo t . Los valores de μ_{max} se pueden determinar como resultado de la regresión de los puntos de la fase exponencial de crecimiento en términos de peso seco.

2.2.4. Análisis bioquímicos

2.2.4.1. Cuantificación de PHB

El cultivo líquido se centrifugó durante 45 min a $12000 \times g$ a 4 °C. Luego, el sedimento celular se homogeneizó con lavandina comercial en tubos de vidrio Corex [20]. La suspensión se centrifugó a $12000 \times g$ y el sedimento se resuspendió

en agua bidestilada. Se repitió la centrifugación en las mismas condiciones y luego se resuspendió este último sedimento en una mezcla de alcohol-acetona en una relación 1:1. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y el sedimento se lo resuspendió en 1 ml de cloroformo. La mezcla se homogeneizó por agitación vigorosa intercalada con breves inmersiones en agua a 60°C e inmediatamente se dispusieron 3 alícuotas de entre 5 y 100 µl en tubos de ensayo de vidrio previamente lavados con acetona. Los tubos se secaron en estufa a 60°C, se agregaron 10 ml de H_2SO_4 a cada uno y se llevaron a baño de agua a 100°C por 10 minutos. Se dejaron enfriar y se tomaron alícuotas de 1 ml para medir la cantidad de ácido crotónico a 235 nm [67].

2.2.5. Métodos de esterilización

Los medios de cultivo, las soluciones y las mezclas de perlita y arena se esterilizaron por calor húmedo en autoclave a 120 °C por períodos de 20 a 60 minutos, según el volumen y el tipo de material. Los antibióticos y micronutrientes se esterilizaron mediante filtración utilizando filtros comerciales (Minisat, SARTORIUS) de acetato de celulosa de 0,22 µm de tamaño de poro. Los vasos plásticos para los ensayos de plantas se esterilizaron por lavado con etanol 70 % v/v seguido de exposición a radiación ultravioleta durante 40 minutos.

2.3. Técnicas de biología molecular

2.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los ensayos de PCR fueron realizados empleando un ciclador térmico. La composición de cada mezcla de reacción fue: $MgCl_2$ 3 mM, dNTPs 200 µM, TAq polimerasa 2 U y los cebadores correspondientes a 10 µM, en un volumen final de 10 µl.

El ciclador se utilizó con un esquema básico de una desnaturalización inicial de 3 minutos, 35 ciclos de desnaturalización, pegado y elongación y por último, una elongación final. En todos los casos, la desnaturalización se realizó a 94 °C y la elongación a 72 °C. La temperatura de pegado utilizada fue de 57°C para todos los juegos de cebadores utilizados (Tabla 2.10), y los tiempos los determinó el largo del fragmento a amplificar en cada caso.

El ADN utilizado como molde para los ensayos de PCR se extrajo mediante lisis por calor: las células de los cultivos en placa fueron resuspendidas en 50-100 µl de agua bidestilada estéril. La suspensión fue hervida por 10 ó 15 minutos y centrifugada a 14.000 x g por 10 minutos; 2 µl de los sobrenadantes fueron usados como ADN molde.

Tabla 2.10.: Ensayos de PCR realizados

PCR	Cebadores utilizados
PCR 1	FwUp_RBC y RvUp_RBC
PCR 2	FwDw_RBC y RvDw_RBC
PCR 3	FwUp_RBC y RvDw_RBC
PCR Fw	M13Fw y FwExt_RBC
PCR Rv	M13Rv y RvExt_RBC
PCR Ext	FwExt_RBC y RvExt_RBC

2.3.2. Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis horizontal en geles de agarosa fue la técnica que se utilizó para observar el producto de las PCR, los productos del tratamiento con enzimas de restricción y los extractos de ADN plasmídico. La concentración de agarosa (0,8-1,5 % p/v) se eligió de acuerdo al tamaño del ADN a observar. La agarosa se preparó empleando solución tampón Tris-bórico-EDTA (TBE, Tris 89 mM, EDTANa₂ 2,5 mM, H₃BO₃H₃ 89 mM, pH 8,2). Las muestras se mezclaron para su siembra con una solución de carga (sacarosa 40 %, azul de bromofenol 0,25 % en una relación 5 µl solución de ADN en agua o Tris-EDTA(TE)/µl solución de carga) y las corridas se realizaron a voltaje constante (80 a 120 volts), utilizando como solución tampón de corrida al TBE.

La presencia de moléculas de ácidos nucleicos en los geles de agarosa fue detectada por fluorescencia. Ésta fue generada por el agregado de bromuro de etidio 0,5 µg/ml a la solución de agarosa y, luego de la corrida electroforética, exposición a luz ultravioleta. El registro de los resultados se realizó mediante fotografía de los geles con una cámara Kodak modelo DC 120 (software-EDAS-Kodak) bajo iluminación ultravioleta. Como marcadores de masas moleculares utilizamos al fago λ digerido con *Hind*III y al ladder-100 (L100, Promega)

Electrotransformación

Los vectores plasmídicos construídos en este trabajo de Tesis se introdujeron en células electrocompetentes de *E. coli* DH5α y S17-1, mediante técnica de electrotransformación. Para este procedimiento se utilizó un equipo Gene Pulser (Bio Rad) y cubetas comerciales de 0,2 cm de ancho, bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (25 µF, 200 Ω y 2,5 kV). Inmediatamente después de la electrotransformación se adicionó a las células 1 ml de medio LB fresco, y la mezcla se incubó 1 hora a 37°C para permitir que la información contenida en el ADN introducido se expresara. Pasado este tiempo se plaquearon las bacterias en medio LB sólido selectivo y se incubaron el tiempo necesario a 37 °C.

Selección de transformante *DH5α*

La selección de las células transformadas de *E. coli* *DH5α* se realizó en placas de Petri conteniendo el medio LB suplementado con Km y el reactivo 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactósido (X-gal). El antibiótico Km permite seleccionar entre aquellas *E. coli* que hayan adquirido el plásmido, puesto que pCC1 tiene inserto un cassette de resistencia a Km; en tanto que el reactivo X-gal permite discernir entre aquellas que además de haber adquirido el plásmido, lleven el inserto interrumpiendo al fragmento *lacZ* del mismo, lo que inactiva la actividad

β -galactosidasa.

Conjugación biparental y selección de conjugantes

Para realizar la conjugación a células de USDA 110, los plásmidos incorporados en *E. coli* DH5 α se extrajeron mediante miniprep [105] y se transformaron en *E. coli* S17-1. Desde allí fueron transferidos a la cepa receptora *B. diazoefficiens* mediante conjugación biparental a partir de un cultivo de *B. diazoefficiens* crecido en PSY-Ara y otro cultivo de *E. coli* S17-1 crecida en medio LB, ambos en fase exponencial. De estos cultivos se mezclaron 800 μ l de la cepa aceptora con 600 μ l de la cepa donadora. Se mezcló suavemente y se centrifugó a $640 \times g$ durante ocho minutos. El precipitado se resuspendió con mucho cuidado y se plaqueó en medio PSY-Ara sólido sin antibiótico, en forma de gota. El mismo procedimiento se realizó como control para cada una de las cepas. Las cajas se incubaron a 28 °C durante 48 hs. Posteriormente, se las extrajo de las cajas con una punta para resuspenderlas en 1 ml de PSY-Ara líquido y se esparcieron con espátula de Drigalski 100 μ l en medio YEM sólido suplementado con Km y Cm, para seleccionar aquellos clones de USDA 110 en los que se podría haber insertado el plásmido.

2.4. Análisis de proteínas

2.4.1. Extracción y análisis de flagelinas

Para extraer las flagelinas se partió de 30 ml de cultivo fresco, éste se colocó en un tubo falcon el cual se sumergió en hielo para favorecer la conservación, se le dio vortex al tubo para favorecer el desprendimiento del flagelo subpolar sin perder el frío. Luego se centrifugó durante 45 min a $12000 \times g$ a 4 °C, se extrajo el sobrenadante y este se dejó precipitando con polietilenglicol al 20 % *NaCl* 0,2 M en una relación 3,3 ml cada 50 ml de sobrenadante, durante una noche a 4°C. Luego se centrifugó en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y el pellet de flagelinas se resuspendió en buffer de siembra de geles desnaturizantes [65] para su posterior corrida en gel de SDS-PAGE . Los geles de apilamiento se prepararon con 5 % de poliacrilamida en Tris -HCl a pH 6,8, mientras que los de separación se hicieron con 12,5 % de poliacrilamida en Tris-HCl a pH 8,8. En ambos casos con el agregado de SDS y β -mercaptoetanol, para obtener desnaturizantes y disociantes. Las corridas se llevaron a cabo durante 30 a 60 minutos a voltaje constante de 100 o 130 volts.

2.4.2. Análisis del perfil de proteínas diferenciales

Este análisis se realizó sobre proteínas extraídas y purificadas por el Dr. Chandrasekar B. Rajeswari (IBBM, La Plata). *B. diazoefficiens* USDA 110 fue cultivada en tres cultivos *batch* independientes de HME-Mtl (condición Mtl) ó HME-Ara (condición Ara) hasta la fase exponencial ($DO_{500} = 1$) y las bacterias fueron obtenidas por centrifugación y lavadas como se describió en [91]. Durante la purificación las proteínas se separaron en dos fracciones: soluble y microsomal. La fracción soluble estaba enriquecida en proteínas citoplasmáticas y la microsomal en proteínas de membrana. Como resultado de la purificación se obtuvieron tres

réplicas biológicas de proteínas provenientes de cada uno de los medios de cultivo separadas en dos fracciones.

La identificación de proteínas se realizó con la colaboración de Dra. María Pía Valacco (CEQUIBIEM, UBA). Las proteínas de cada muestra se separaron y digirieron con tripsina y se identificaron por nano-HPLC acoplado en tándem a un espectrómetro de masa (nLC-MS/MS). Para cuantificarlas, se calcularon las áreas debajo de los picos mediante el *software* Proteome Discoverer (Thermo Scientific, Versión 1.4). Para identificar cada proteína el programa realizó una digestión virtual con tripsina y comparó estos datos con los presentes en la base de datos para *B. diazoefficiens* USDA 110, UP000002526 (*Uniprot* (<http://www.uniprot.org/>)). La comparación se realizó con una tolerancia de ion-precursor de 10 ppm y una tolerancia de fragmento de masa iónica de 0,05 Da especificando la oxidación de metionina como la modificación dinámica y la carbamidometilación como la modificación estática. Seteamos el nivel de confianza de péptidos como "alto" (*high*) (al 1% de *false discovery-rate*). Las espectrometrías de masa completas se encuentran compartidas en el repositorio ProteomeXchange Consortium a través de PRIDE [132] con el número de identificación de la base de datos PXD008263 y 10.6019/PXD008263.

Finalmente procesamos los datos de las áreas normalizadas con el *software* Perseus (Max Planck Institute of Biochemistry, versión 1.5.5.3, de uso libre), para realizar un test de Student de cada una de las proteínas. Algunas de las proteínas identificadas no fueron detectadas en todas las réplicas biológicas; reemplazamos los valores ausentes por 0 cuando las proteínas se encontraban presentes en ambas condiciones (Mtl o Ara). Definimos el nivel de expresión diferencial como el $\log_2(\text{área}_{Mtl}/\text{área}_{Ara})$, siendo área_{Mtl} y área_{Ara} las medias geométricas entre las tres réplicas biológicas. Realizamos un test de Student de dos entradas para cada una de las proteínas comparando las de la fracción enriquecida en membrana en HME-Mtl con la correspondiente de HME-Ara y lo mismo con las enriquecidas en citoplasma. Seleccionamos como diferenciales aquellas cuyo valor promedio en una condición (HME-Mtl) fuera más de dos veces mayor (*fold-change*) al de la otra condición (HME-Ara), con una significancia estadística (valor p del test de Student) por debajo de 0,05. Es decir una proteína sobreexpresada en HME-Mtl será aquella para la cual $1 < \log_2(\text{área}_{Mtl}/\text{área}_{Ara})$, mientras que una proteína sobreexpresada en HME-Ara será aquella para la cual $\log_2(\text{área}_{Mtl}/\text{área}_{Ara}) < -1$. También fueron catalogadas como diferenciales aquellas proteínas que estuvieron presentes solamente en alguna de las condiciones (*on/off*) (Mtl o Ara) (solo en Mtl o solo en Ara) en al menos dos réplicas biológicas. Luego buscamos en las bases de datos (1/12/2017) *RhizoBase* (<http://genome.annotation.jp/rhizobase/Bradyrhizobium>), *KEGG pathway* (<http://www.genome.jp/kegg/genes.html>) y *Uniprot* las proteínas que se expresaron en forma diferencial para así obtener sus posibles funciones. Luego clasificamos las proteínas de acuerdo a las vías en las cuales tendrían intervención y utilizamos los códigos de gene tag tabulados en *RhizoBase* para localizarlas en los mapas metabólicos disponibles en *KEGG-pathway*. A continuación, nos focalizamos en aquellas rutas para las cuales un grupo de enzimas (no una única enzima) estuviera expresada en forma diferencial o bien en HME-Mtl o bien en HME-Ara para estudiar cómo serían los diferentes flujos metabólicos en cada fuente de carbono. Con esta reconstrucción de las vías metabólicas, modelamos

las estequiometrías de las rutas, considerando solo aquellas proteínas que fueron detectadas en al menos dos réplicas biológicas.

2.5. Ensayos de nodulación

2.5.1. Esterilización superficial y germinación de las semillas

Las semillas se sumergieron unos segundos en alcohol 96° y luego diez minutos en solución de lavandina comercial diluida al 20 % v/v. Seguidamente, se lavaron al menos seis veces con agua destilada estéril. Las semillas esterilizadas de esta manera fueron germinadas sobre una superficie de agar-agua al 1,5 % durante dos a cuatro días en la oscuridad a 28°C.

2.5.2. Ensayos de nodulación en macetas

Se trabajó con macetas de aproximadamente 700 cm³ en las cuales se dispuso una mezcla de perlita y arena (3:1) previamente esterilizada. Las cepas de *B. diazoefficiens* USDA 110, LP 3004 y USDA 110 $\Delta cbbL$ fueron cultivadas en medio HME-Mtl hasta fase exponencial de crecimiento. Para los ensayos de competición para la nodulación se diluyeron en la solución de Fahraeus iguales cantidades de LP 3004 y USDA 110 en un recipiente; e iguales cantidades de LP 3004 y USDA 110 $\Delta cbbL$ en otro para obtener una concentración final de 1 10⁶ UFC.ml⁻¹ de cada cepa. Las cantidades de bacterias se establecieron mediante recuento de las unidades formadoras de colonias. Lo mismo se hizo con cada cepa por separado. En cada maceta se colocó una semilla de soja germinada e inmediatamente se la regó con 200 ml de estas soluciones de modo de tener: diez macetas con LP 3004 y USDA 110, diez macetas con LP 3004 y USDA 110 $\Delta cbbL$, tres macetas con LP 3004, tres macetas con USDA 110 y tres macetas con $\Delta cbbL$. Además se prepararon otras dos macetas que se regaron sólo con solución Fahraeus para reservar como control negativo. Las macetas se trasladaron al invernáculo donde permanecieron durante 25 días con una temperatura diurna de 30 °C y una nocturna de 15 °C y un fotoperíodo de 14 h. Las plantas se regaron periódicamente con agua destilada estéril, alternando con solución Fahraeus.

Al cabo de los 25 días los nódulos de cada tratamiento fueron extraídos, contados y cada uno colocado en fosas de placas multipocillo estériles. Posteriormente, se los esterilizó con una solución de lavandina comercial diluida al 20 % v/v durante 5 minutos y se los lavó al menos siete veces con agua destilada estéril. Luego, los nódulos fueron macerados individualmente con palillos estériles y con este mismo elemento se depositó el material extraído en cajas de Petri réplica suplementadas o no con estreptomicina, que permitieron el crecimiento selectivo de la cepa de referencia LP 3004, resistente a Sm, o las cepas objeto del experimento, ambas sensibles a Sm. Los resultados se analizaron por análisis de varianza de la transformación angular de los porcentajes de ocupación de nódulos por parte de las cepas sensibles a Sm.

2.6. Microscopía

Con el objeto de medir los tamaños de las células, las bacterias se llevaron a un microscopio óptico Nikon Eclipse E400 con aumentos de 1.000 X equipado con una cámara digital Nikon CoolPix 4500. Las imágenes tomadas en contraste de fase se analizaron utilizando el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>), de acceso libre. Se midieron entre 250-300 células de cada cepa utilizando la grilla de una cámara de Neubauer (Petroff-Hausser; área: $1/400 \text{ mm}^2$; profundidad: $1/50 \text{ mm}$) como referencia, y los tamaños se analizaron mediante el análisis de varianza de Fisher.

3. Modelo para respiración y fuerza protón motriz

Este capítulo estará dedicado a la presentación y discusión del modelo matemático utilizado en el análisis de los roles que cumplen el consumo de O_2 y la generación y la utilización de la fuerza protón motriz (Δp) para la síntesis de *ATP* y en la rotación de los motores flagelares. En una primera instancia, presentaremos los supuestos constitutivos básicos para la construcción del modelo, así como al modelo en sí mismo. En una segunda instancia, presentaremos los resultados y los discutiremos en el marco de las observaciones realizadas en la presente Tesis.

3.1. Caracterización del modelo

Nuestro modelo tiene como propósito estudiar aspectos poblacionales de una población de bacterias. Con este objetivo, construimos el estado de la población a partir del conocimiento del estado de una célula individual y el hecho que, como se discutirá en la subsección 3.1.2, la cantidad de enzima en cada célula individual de una población obedece una distribución Gamma. En particular, nos concentraremos en la relación entre el consumo de O_2 debido a la respiración celular y su relación con la síntesis y movimiento de los flagelos bacterianos. En este sentido, nuestro modelo no tiene en cuenta los aspectos provenientes de posibles interacciones entre bacterias.

Para encontrar el estado de una célula consideramos como válidas las siguientes suposiciones:

- Para cada célula el flujo de protones a través de la membrana es debido solo a las reacciones de respiración celular, la fosforilación oxidativa (síntesis de *ATP*), y el que demande la rotación de los flagelos.
- En cuanto a la respiración celular, consideramos solamente los procesos que acontecen en los complejos NADH deshidrogenasa y quinol oxidasa de la cadena transportadora de electrones (CTE), puesto que construimos nuestro modelo a partir de datos tabulados para *E. coli*, cuya CTE está conformada, en parte, por estos dos complejos. Estos complejos se agrupan en super-complejos llamados «respirasomas» [79]. Cabe señalar que descartaremos al complejo fumarato reductasa dado su bajo potencial de óxido-reducción (Tabla 1.1).
- Las cantidades de moléculas de cada enzima que catalizan las reacciones en células individuales, poseen una distribución dentro de la población de bacterias [38].

3.1.1. Agrupación en supercomplejos

Los complejos enzimáticos de la CTE se han podido aislar y purificar manteniendo su actividad enzimática individual. A partir de esta observación se sugirió que éstos se organizan de tal manera que pueden fluir libremente por la membrana lipídica y la transferencia de electrones es producida por choques aleatorios entre los complejos de la CTE. Este modelo es conocido como de "estado fluido". [43]

Más recientemente se ha sugerido que los complejos enzimáticos, tanto en mitocondrias como en procariotas, se agrupan en «supercomplejos» denominados «respirasomas» [79]. Es decir, se conectan entre sí formando un único complejo; este modelo se conoce como de "estado sólido". El mismo se basa en observaciones experimentales tales como: resolución en geles de poliacrilamida, estructuras obtenidas mediante microscopía electrónica las cuales revelan interacciones definidas de los complejos, experimentos de control de flujo que confirman que la CTE opera como una unidad funcional, mutaciones puntuales en genes que codifican una de la subunidades del complejo afectan la estabilidad de otro complejo, entre otras [30]. La asociación en respirasomas optimizaría la fosforilación oxidativa, ya que permitiría la formación de canales para los sustratos, estabilizaría los complejos individuales y protegería a la célula de la formación de sustancias reactivas de oxígeno (ROS).

3.1.2. Distribución de la concentración de enzimas

Los flujos metabólicos, asociados a las reacciones enzimáticas que tienen lugar en las células, dependen en mayor o menor medida de la concentraciones de las enzimas intervinientes $[E]$ [34]. En una población de bacterias genéticamente idénticas y crecidas en el mismo medio, existen variaciones en la abundancia de las proteínas presentes en cada célula, debido a la estocasticidad en la expresión de los genes que codifican las mismas [13]. Esta variabilidad puede conducir a una heterogeneidad en los perfiles metabólicos de una población bacteriana [64].

Con el fin de tener en cuenta este aspecto poblacional, usamos el modelo desarrollado por Friedman y colaboradores [38] quienes encuentran que la distribución estacionaria de concentraciones de enzimas de células individuales obedece una distribución Gamma.

$$p(x) = \frac{1}{b^a \Gamma(a)} x^{a-1} \exp^{-x/b} \quad (3.1)$$

donde x representa la cantidad media de enzima en cada célula y los números a y b están relacionados con parámetros cinéticos de la expresión de proteínas [38].

Debido a las características de nuestro modelo, consideraremos la distribución poblacional de sólo dos complejos multienzimáticos; el respirasoma (E_{Res}) y la F_0F_1 asociada a la síntesis de ATP . Estas consideraciones nos permiten usar nuestro modelo para el estudio del comportamiento de la población de bacterias.

3.2. Modelado del consumo de O_2 e intercambio de H^+

Para cada célula, estudiaremos el proceso de intercambio de protones en la membrana mediante un sistema de ecuaciones diferenciales acoplado a través de la velocidad de consumo de O_2 (v). Nos concentraremos en el proceso de respiración, la formación de ATP y el flujo de protones a través de los motores flagelares. Cada célula estará caracterizada por las concentraciones y los flujos de estado estacionario, dado que suponemos que la célula es capaz de mantener la concentración de metabolitos constante mientras intercambia materia y energía con su entorno.

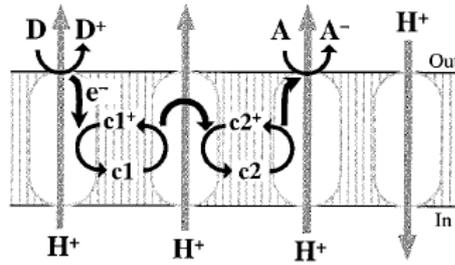


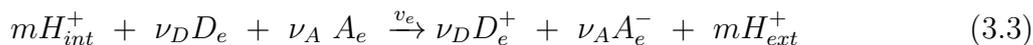
Figura 3.1.: Esquema de la transferencia de electrones a través de la CTE. Extraída de [57]

Para modelar el proceso de respiración consideraremos que los complejos enzimáticos de la CTE se encuentran agrupados en supercomplejos, de esta manera la velocidad de consumo de O_2 (v) será proporcional al flujo global de electrones (v_e) que tiene lugar en el respirasoma. Este enfoque es compatible con el modelo de transferencia de electrones a través de la CTE desarrollado por Jin y Bethke [57]. Estos autores propusieron una expresión sintetizada de la transferencia de electrones, relacionada, en nuestro caso, con el consumo de O_2 . Conceptualmente, el modelo de Jin y Bethke consiste en pensar la transferencia de electrones en tres pasos principales: un primer paso donde se produce la primera cesión de electrones (D), un paso de transferencia de electrones (I) y un último paso de captación de electrones (A). Entonces, el proceso neto de respiración comienza con la oxidación de un sustrato (D_e , donador de electrones) y culmina con la reducción de un producto (A_e , aceptor de electrones), dando la reacción de óxido reducción global [57]:



donde D_e y D_e^+ representan las formas reducida y oxidada de la especie dadora, en tanto que A_e y A_e^- representan las formas oxidada y reducida de la especie aceptora y ν_i los coeficientes estequiométricos. La reacción (3.2) está acoplada a la translocación de protones desde el interior (H_{int}^+) al exterior (H_{ext}^+) de la membrana citoplasmática (Figura 3.1). El proceso completo se representa por la

reacción electrogénica global:



donde m es el número de H^+ que se transloca por cada D_e (A_e) que se oxida (reduce).

La afinidad de esta reacción (3.3) estará dada por la diferencia entre el aporte que hacen los potenciales de óxido reducción de las reacciones de oxidación de D_e y reducción de A_e (ΔE) y el potencial de membrana que deben superar los protones para ser translocados, o Δp . Al transferirse n_e electrones a través de la CTE y translocarse m protones, la afinidad (A_f)¹ global estará dada por:

$$A_f = n_e F \Delta E - m F \Delta p \quad (3.4)$$

Donde F se corresponde con la constante de Faraday. El potencial ΔE obedece la ley de Nernst:

$$\Delta E = \Delta E^0 - \frac{RT}{n_e F} \ln \left(\frac{\prod_{D^+} [D^+]^{\nu_D} \prod_{A^-} [A^-]^{\nu_A}}{\prod_D [D]^{\nu_D} \prod_A [A]^{\nu_A}} \right) \quad (3.5)$$

en donde ΔE^0 es la diferencia entre los potenciales de óxido reducción para las mismas reacciones que ΔE , pero en una condición estándar. Para sistemas biológicos se considera un $pH^0 = 7$.

Por su parte, Δp es la fuerza protón motriz intermembrana a la cual ya hicimos referencia en el Capítulo 1.

El Δp tiene dos contribuciones: la diferencia de potencial electroquímico producido por la diferencia de concentración de iones tales como Na^+ , K^+ , etc ($\Delta\psi$) y la diferencia de pH ($pH_{int} - pH_{ext}$) a un lado y otro de la membrana citoplasmática. El Δp estará definido como:

$$\Delta p = \Delta\psi + \frac{\ln(10) RT}{F} (pH_{int} - pH_{ext}) \quad (3.6)$$

o bien, en términos de la concentración de protones externa ($[H_{ext}^+]$) e interna ($[H_{int}^+]$):

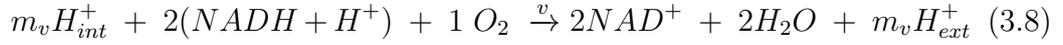
$$\Delta p = \Delta\psi + \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{[H_{ext}^+]}{[H_{int}^+]} \right) \quad (3.7)$$

Siendo R la constante universal de los gases ideales y T la temperatura.

¹Recordemos que la afinidad para una reacción química está definida por: $A_f = \sum_i \nu_i \mu_i$,

siendo ν_i el coeficiente estequiométrico y μ_i el potencial químico de la especie i [95] (comúnmente simbolizada como A , en este trabajo la llamaremos A_f para no confundirla con la especie aceptora de electrones)

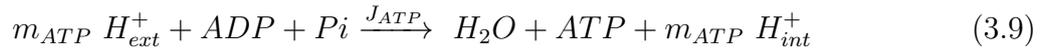
En la evaluación de la velocidad de consumo de O_2 consideramos un respirasoma formado por los complejos NADH deshidrogenasa y quinol oxidasa de la CTE (Tabla 1.1). En este caso la especie donadora (D_e) de electrones es el cofactor $NADH$, en tanto que la aceptora (A_e) se corresponde con el O_2 . Así la ecuación (3.3) resulta:



De acuerdo a como hemos construido la ecuación estequiométrica 3.8, v representa la velocidad de consumo de O_2 , que no debe confundirse con la velocidad de transporte de electrones (v_e), la cual se relaciona con v mediante la relación $v_e = 4v$, dado que son necesarios 4 electrones para reducir una molécula de O_2 .

Se recuerda en este punto que no hemos considerado el complejo fumarato reductasa por su bajo potencial óxido-reducción y que éste no transloca protones (ver Tabla 1.1).

El Δp generado por el proceso descrito en la ecuación (3.8) es utilizado por la célula para generar ATP , para este proceso consideramos un flujo de síntesis (J_{ATP}):



en donde m_{ATP} es el número de protones que ingresa por cada ATP que se sintetiza. Teniendo en cuenta que la síntesis de ATP está fuertemente acoplada al Δp , fijamos este número en 3 [60, 119]. Por otro lado, dado que las medidas de la relación H^+/e^- en la CTE son realizadas usualmente en condiciones en las que Δp es más bien pequeño, la fuerza que se opone al movimiento de los protones no tiene efecto. Si la relación H^+/e^- puede variar de acuerdo al valor de Δp entonces esta debe disminuir ante un alto Δp [135, 129]. En otras palabras, existe una relación funcional entre m_v y Δp . En nuestro modelo consideramos esta dependencia a través de una relación lineal entre m_v y Δp :

$$m_v = -a \Delta p + b \quad (3.10)$$

$a = 60$ y $b = 21$ fueron calculadas utilizando los datos de [135].

En el proceso de transporte de electrones se translocan protones desde el interior de la bacteria al exterior (espacio periplasmático), mientras que en la síntesis de ATP , se requiere del pasaje de protones a través de la F_oF_1 en sentido contrario. Estos dos procesos influyen en la concentración de protones dentro ($[H_{int}^+]$) y fuera de la célula ($[H_{ext}^+]$) y por lo tanto en el Δp . Podemos pensar en un entorno que mantenga su pH constante, entonces un cambio en el valor del Δp estará asociado a un cambio de $[H_{int}^+]$.

Para una bacteria en un medio aeróbico, la dinámica entre la translocación de H^+ estará acoplada al consumo de $O_2(v)$. Considerando una bacteria individual con un volumen característico V_b , el Δp disponible generado y acoplado a v estará

descrito por el sistema:

$$\begin{cases} V_b \frac{d[H_{int}^+]}{dt} = -m_v v + m_{ATP} J_{ATP} + J_H \\ V_b \frac{d[O_2]}{dt} = -v + J_{O_2} \end{cases} \quad (3.11)$$

La velocidad de consumo de O_2 (v), como describiremos con más detalle abajo, es una función de los parámetros $[NAD^+]$, $[NADH]$, y las variables $[O_2]$ y $[H_{int}^+]$; en tanto que el flujo de formación de ATP (J_{ATP}) es función de $[H_{int}^+]$. Además, estos dos flujos dependen de la concentración de las enzimas intervinientes. El flujo J_H representa el flujo de protones a través del motor flagelar (pudiendo haber más de uno) y, con el objeto de considerar el intercambio con el entorno de la célula, tuvimos en cuenta además un flujo de O_2 desde el medio hacia la membrana celular (J_{O_2}).

Los estados estacionarios definidos mediante el vector $([O_2], [H_{int}^+])$ resultan de la resolución numérica del sistema (3.11) teniendo en cuenta las distribuciones para las concentraciones de enzimas (3.1) y para una combinación definida de $[NAD^+]$ y $[NADH]$ en términos del número de motores (n_{mot}). A continuación explicitaremos la dependencia funcional de los cuatro flujos v , J_{ATP} , J_{O_2} y J_H respecto de los parámetros y variables para luego abordar los resultados de la resolución del sistema (3.11).

3.2.1. Expresiones para los flujos

3.2.1.1. Velocidad de Respiración

Como expresáramos antes, el consumo de O_2 debido a la respiración (v) es proporcional al flujo de electrones en la CTE, por lo que optamos por usar la expresión desarrollada por Jin and Bethke [57]. En este marco de ideas, la transferencia de electrones consiste en tres pasos principales (Figura 3.1): un primer paso donde se produce la primera cesión de electrones (D), un paso de transferencia de electrones (I) y un último paso de captación de electrones (A). Basados en la idea de que, en estado estacionario, cada paso de una reacción electrogénica global ocurre a la velocidad neta de la reacción global, estos autores desarrollaron una expresión cinética global para el transporte de electrones para los casos en que a alguno de estos tres pasos (D, I o A) se le asocia la mayor afinidad. A continuación desarrollaremos los elementos centrales usados en nuestro modelo.

Para una bacteria en un medio con disponibilidad de O_2 , consideramos que el paso que consume la mayor cantidad de fuerza termodinámica es el aceptor de electrones (la reducción de O_2). La capacidad de flujo neto de electrones (v^+), sin tener en cuenta los aspectos termodinámicos, es la del paso (A) (Figura 3.1). Por lo tanto, la expresión cinética para v^+ es [57]:

$$v^+ = k^+ [E_{Res}] [O_2] [c_2] \quad (3.12)$$

En donde k^+ es la constante cinética del paso de aceptores de electrones, $[E_{Res}]$ es la concentración de la enzima que cataliza la reducción del O_2 (respirasoma) y $[c_2]$ la concentración de la coenzima c_2 (Figura 3.1).

Como comentáramos antes, en la ecuación (3.12) v^+ tiene en cuenta solo factores cinéticos del paso (A). Para obtener un flujo global que considere el aspecto termodinámica de toda la reacción, utilizamos la expresión para el flujo de electrones (v_e) como [57]:

$$v_e = v^+ F_T \quad (3.13)$$

donde F_T es el factor de potencial termodinámico global. Este factor tiene en cuenta la temperatura (T) y la afinidad global de la reacción (A_f) (3.4), corregido por el factor χ , cuyo valor depende de cómo está distribuida la fuerza termodinámica en cada paso individual y de cómo está escrita la reacción global [17].

$$F_T = 1 - \exp\left(-\frac{A_f}{\chi RT}\right) \quad (3.14)$$

Para incluir los procesos que ocurren en los pasos anteriores al paso (A), debe introducirse el factor dador de electrones (F_D), el cual se intruce a través de $[c_2]$. Introduciendo los factores F_T y F_D , la expresión de v_e quedaría [57]:

$$v_e = k_D^+ [E_{Res}] [O_2] F_D F_T \quad (3.15)$$

donde F_D tiene en cuenta la concentración del metabolito donde comienza el proceso de respiración (complejo NADH deshidrogenasa) y la diferencia de potencial aportada por la reacción de oxidación de éste (Tabla 1.1).

El factor F_D toma una forma diferente de acuerdo a la elección del paso determinante. Puesto que hemos escogido la reacción de reducción de O_2 como tal (Tabla 1.1), la expresión para el factor F_D tiene la forma [57]:

$$F_D = \frac{1}{1 + K_{NADH} \left(\frac{[NAD^+]}{[NADH]}\right)} \quad (3.16)$$

donde K_{NADH} es un factor que relaciona el potencial de oxido-reducción del par $NAD^+/NADH$ y Δp , cuya expresión viene dada por:

$$K_{NADH} = \exp \left[-\frac{n_e F (\Delta E_{NADH}^0 + \Delta E_I^0) - (m_{NADH}) F \Delta p}{2RT} \right] \quad (3.17)$$

donde ΔE_I^0 es el potencial estándar de óxido reducción de las reacciones involucradas en los pasos intermedios: estos son la reducción y oxidación de UQ . En tanto que m_{NADH} se corresponde con el número de protones translocados en el complejo NADH deshidrogenasa y n_e con el número de electrones transferidos a

través de la CTE.

Con todo ello, la expresión final para la velocidad de consumo de O_2 (v):

$$v = k_0 [E_{Res}] [O_2] F_D F_T \quad (3.18)$$

Esta única expresión para v contiene los efectos de los pasos de óxido-reducción de la CTE y los efectos termodinámicos de ésta. La constante cinética k_0 ($k_0 = k_D^+/4$) es una constante efectiva la cual fue elegida en un rango tal que v acordara con los valores fisiológicos para *E. coli* [64, 16].

Por último, para considerar la distribución poblacional de la enzima E_{Res} tuvimos en cuenta los datos de cuantificación proteómica en *E. coli* [123] en células individuales, los cuales establecen una concentración media para la enzima CydA del complejo quinol oxidasa *bd*. Considerando para *E. coli* un respirasoma formado por NuoA-N:CydAB [116], $[E_{Res}]$ media sería de 485 moléculas por bacteria con sus correspondientes parámetros de distribución (Tabla 3.1).

3.2.1.2. Flujo de ATP

Con el objeto de contar con una relación funcional entre el flujo de síntesis de ATP (J_{ATP}) con Δp , consideramos los datos cinéticos obtenidos de la reconstrucción de la enzima F_oF_1 en liposomas con Δp variable [53, 113]. Del ajuste de estos datos se tiene la expresión (3.19), en términos de moléculas de ATP sintetizadas por molécula de enzima F_oF_1 por segundo.

$$J_{ATP} = k_1 [F_oF_1] \frac{20}{1 + (0,625) \left(\frac{[H_{int}^+]}{[H_{ext}^+]} \right)^{1,3}} \quad (3.19)$$

La constante cinética k_1 la fijamos en 320 s^{-1} teniendo en cuenta lo determinado por [53].

Nuevamente, para el estudio poblacional tuvimos en cuenta los datos de la cantidad de enzima F_oF_1 en células individuales de *E. coli* [123], y la composición de la enzima F_1 ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$). Teniendo en cuenta esta estequiometría, calculamos el valor que tendría la concentración media de la F_1 considerando este valor como el de aquella subunidad que arroja el valor máximo (Tabla 3.1).

Tabla 3.1.: Concentraciones medias (en número de moléculas de proteínas por célula) y sus respectivos parámetros de la distribución Gamma para las enzimas E_{Res} y F_oF_1 ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$)

Enzima	concentración media	a	b
E_{Res}	485	1,875	242,332
F_oF_1	228	8,55	82,25

3.2.1.3. Flujo de protones a través del estator para el movimiento de los flagelos

Como se expuso en el Capítulo 1, los canales de los estatores del motor flagelar funcionan como canales de transporte de protones, donde el flujo a través de estos sigue una ley de Ohm:

$$J_H = \eta (f) \Delta p$$

donde $\eta(f)$ es la conductividad del canal. Esta ley es consistente con el hecho de que el flujo de protones (J_H) está fuertemente acoplado a la velocidad de rotación de los flagelos bacterianos (ω) [78] y la dependencia lineal de ω con Δp en los regímenes de bajas y altas ω [39] :

$$\omega = \alpha(f) \Delta p \tag{3.20}$$

donde $\alpha(f)$ es la constante de proporcionalidad determinada para una condición externa específica. Estas observaciones fueron realizadas para bacterias uniflagelares. Utilizando estas relaciones, para el flujo de H^+ para una cantidad de motores (n_{mot}), J_H puede escribirse como:

$$J_H = n_{mot} \eta(f) \Delta p \tag{3.21}$$

donde Δp se introduce en unidades de V , $\eta = 1,7 \cdot 10^6 \text{ H}^+ \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ y n_{mot} es el número de flagelos que posee la bacteria.

3.2.1.4. Flujo externo de O_2

Para modelar el flujo de O_2 desde el entorno a la célula, consideramos un perfil de $[O_2]$ pseudoestacionario [35]:

$$J_{O_2} = 4 \pi r_b D_l ([O_2]^* - [O_2]) \tag{3.22}$$

donde r_b es el radio de la bacteria, D_l el coeficiente de difusión de O_2 en agua y $[O_2]^*$ la concentración de O_2 en el líquido que rodea a la bacteria a una distancia r^* , siendo $r^* \gg r_b$. En esta aproximación no se produce acumulación de O_2 en el entorno de la célula.

3.3. Análisis de resultados. Resolución del sistema. Estados estacionarios

En esta sección presentaremos y analizaremos el comportamiento de los flujos evaluados en los estados estacionarios del sistema (3.11), el cual representa el intercambio de protones entre la célula y su entorno, donde el proceso de respiración es el principal responsable de este intercambio. En primer lugar, haremos

una breve descripción de la metodología seguida para la determinación numérica de los estados estacionarios. En segundo lugar, estudiaremos el comportamiento de los flujos evaluados en tales estados para diferentes configuraciones de los parámetros intervinientes en el proceso.

Para la implementación de nuestro modelo en *B. diazoefficiens* no contamos con datos de los parámetros necesarios para nuestros cálculos; debido a esta dificultad hemos decidido usar datos correspondientes a *E. coli* cuyo comportamiento ha sido muy estudiado en diferentes condiciones. Sin embargo, dado que la estructura del motor flagelar es similar y funciona bajo las mismas premisas, esperamos que nuestros resultados sean compatibles con los resultados experimentales presentados en esta Tesis.

En la Tabla 3.2 listamos las expresiones y parámetros que se utilizaron para resolver el sistema (3.11).

Tabla 3.2.: Expresiones y parámetros del sistema 3.11

Flujo	Parámetro	Valor	Referencia
v	k_0	$9 \cdot 10^3 \cdot s^{-1}$	[64] [16]
	T	303 K	
J_{ATP}	k_1	320 s^{-1}	[53]
	pH_{ext}	7	
J_H	$\eta(f)$	$1, 7 \cdot 10^6 \text{ H}^+ \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$	[78][39]
J_{O_2}	D_l	$3 \cdot 10^3 \text{ } \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	[121]
	r_b	$1 \text{ } \mu\text{m}$	[121]
	$[O_2]^*$	$0, 24 \text{ mM}$	[130]

3.3.1. Estados estacionarios

Los estados estacionarios $([O_2], [H_{int}^+])$ se obtuvieron resolviendo en forma numérica el sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias acoplado (3.11). El estado estacionario es aquel para el cual el vector $([O_2], [H_{int}^+])$ no cambia con el tiempo. En el cálculo de estos estados consideramos en primer lugar la variabilidad en la población celular de las cantidades de moléculas correspondientes al complejo respirasoma E_{Res} y las correspondientes a F_oF_1 , cada una de ellas obedeciendo su correspondiente distribución Gamma (Tabla 3.1). En este sentido, para cada par (E_{Res}, F_oF_1) asociamos un estado estacionario $([O_2], [H_{int}^+])$.

Respecto a los parámetros $[NADH]$ y $[NAD^+]$, consideramos que durante el proceso uno se reconvierte en el otro de manera que su suma se mantiene constante $[NADH] + [NAD^+] = C$. Por otro lado, la célula necesita una mínima producción de ATP para funciones asociadas al crecimiento y mantenimiento, por lo que la presencia de motores puede requerir un aumento del $NADH$ para no comprometer estas necesidades básicas. Dado que en nuestro modelo se puede esperar "una competencia" de la rotación de los motores flagelares (J_H) con la síntesis de ATP (J_{ATP}) por el Δp , suponemos una regulación de la tasa de producción de $NADH$ a nivel celular. Esta regulación mantiene un nivel adecuado de carga energética intracelular ². Por ejemplo, en la vía glicolítica, la actividad fosfofructoquinasa

²Entendiéndose la carga energética, de acuerdo a la definición de Atkinson ([5]), como

aumenta cuando la carga energética es baja, mientras que disminuye cuando la carga energética es alta. Esta regulación ocurre en forma alostérica siendo el ATP una de las moléculas más importantes para modular la actividad fosfofructoquinasa [18]. Sin embargo, no podemos considerar explícitamente la regulación de la fosfofructoquinasa porque nuestro modelo está restringido al respirasoma, la F_oF_1 y los motores flagelares, por lo que tomamos en cuenta la regulación de la tasa de producción de $NADH$ de la siguiente manera:

$$[NADH] = (1 - e^{-\lambda n_{mot}}) + [NADH]^0 \quad (3.23)$$

en donde $[NADH]^0$ es el valor de $[NADH]$ en ausencia de motores y λ es un parámetro que está asociado al «costo» de mantener una cantidad de motores (n_{mot}) funcionando.

Dado que en nuestros cálculos la magnitud relevante es el cociente ($[NADH] / [NAD^+]$) (3.16), usamos la relación:

$$f(n_{mot}) = \frac{[NADH](n_{mot})}{C - [NADH](n_{mot})}. \quad (3.24)$$

Teniendo en cuenta que $[NADH] + [NAD] = C$, podemos escribir $[NADH]^0$ en términos de $f(n_{mot} = 0)$:

$$[NADH]^0 = \frac{f(n_{mot} = 0) C}{1 + f(n_{mot} = 0)}$$

En condiciones de crecimiento aeróbicas las bacterias suelen tener hasta un máximo de 8 flagelos por célula [110]. Teniendo en cuenta que el rango de variación del cociente ($[NADH] / [NAD^+]$) en estas condiciones se encuentra en el intervalo 0,03-0,2 [26], para $[NADH] + [NAD^+] = 2,68 \text{ mM}$ [10] fijamos λ en 0,05 para respetar el rango de crecimiento aeróbico.

3.3.2. Dispersiones individuales

Como lo explicitamos en la sección previa, para cada par ($[E_{Res}], [F_oF_1]$) asociamos un estado estacionario ($[O_2], [H_{int}^+]$) mediante el cual estamos en condiciones de calcular todos los flujos de entrada y salida para cada estado del sistema. Por otro lado, si pensamos que a cada célula se le puede asociar un par ($[E_{Res}], [F_oF_1]$), la colección de estados calculados se puede vincular con una población de bacterias. En este sentido, usaremos esta vinculación para estudiar el comportamiento poblacional.

Resolviendo el sistema (3.11) para 5000 células con $n_{mot} = 1$ y $n_{mot} = 8$; observamos que los valores de velocidad de consumo de O_2 individuales (v) se separan en dos subpoblaciones distinguibles (Figura 3.2). La separación en dos subpoblaciones observadas para $n_{mot} = 1$ es más notable que la que se observa para $n_{mot} = 8$ (Figura 3.2). Sin embargo, este comportamiento no se ve reflejado

$\frac{[ATP]+1/2 [ADP]}{[ATP]+[ADP]+[AMP]}$, ésta toma valores entre 0 y 1.

para los valores de J_{ATP} (Figura 3.3) donde, si bien hay una separación en dos subpoblaciones, estas no se corresponden con valores diferentes de J_{ATP} .

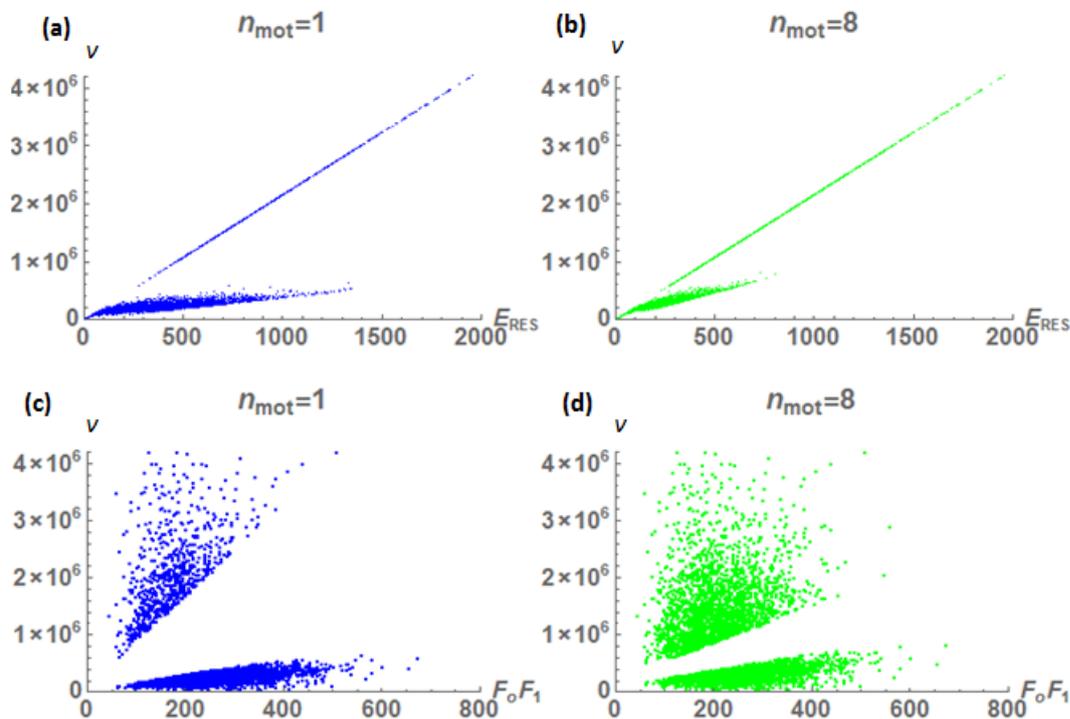


Figura 3.2.: Distribución de flujos individuales, en unidades del número de moléculas (n) por segundo para una célula; (a) v ($n_{O_2}.s^{-1}$) para una población de 5000 células en relación a E_{Res} para $n_{mot} = 1$ (azul) y (b) $n_{mot} = 8$ (verde). (c) v ($n_{O_2}.s^{-1}$) para una población de 5000 células en relación a F_oF_1 , para $n_{mot} = 1$ y (d) $n_{mot} = 8$.

Un resultado relevante, susceptible de ser comparado con datos observacionales que se realizan en una población de células, es el estudio de la v media (v_{prom}) para la población de bacterias a medida que aumentamos el número de flagelos (n_{mot}). Dado que los motores flagelares consumen el gradiente de protones, esperaríamos una mayor v para aquellas poblaciones que tengan un mayor n_{mot} . A su vez la presencia de flagelos no debería afectar el crecimiento de las bacterias, lo cual se ve reflejado en la síntesis de ATP (J_{ATP}), por lo que este flujo en promedio debería mantenerse aproximadamente constante para cualquier n_{mot} . A partir de nuestros cálculos encontramos que, en relación a la población, las bacterias con $n_{mot} = 8$ poseen una v_{prom} 1,78 veces más grande que la correspondiente a $n_{mot} = 1$, mientras que, si comparamos para estas mismas poblaciones la media poblacional de la síntesis de ATP ($J_{ATP_{prom}}$), este aumenta solo en un **1,15** veces (Figura 3.4). Este resultado es compatible con el comportamiento poblacional (Figura 3.3).

Los valores de v_{prom} para las poblaciones coinciden con el rango de las medidas experimentales para *E. coli* utilizando diferentes sustratos [3], teniendo en cuenta que los valores de v_{prom} graficados en la Figura 3.4 corresponderían, en las unidades usuales para estas determinaciones y considerando el peso seco de una célula como $2,8 \cdot 10^{-13} g$, a un rango de entre $8 - 20 mmol_{O_2}.g^{-1}.h^{-1}$.

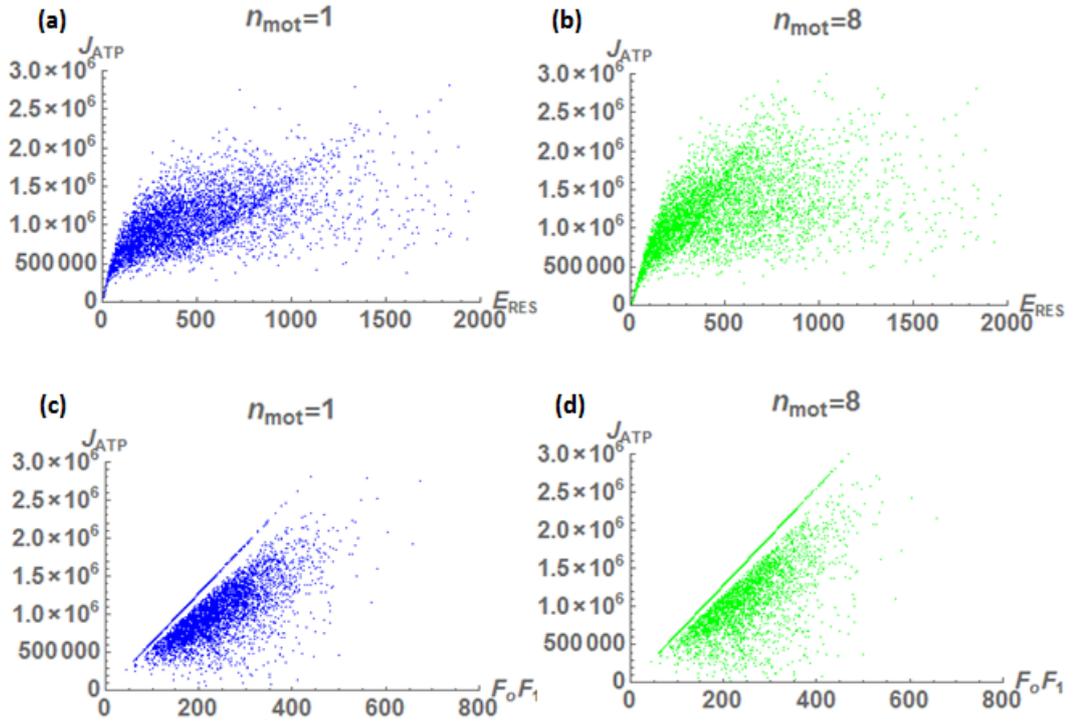


Figura 3.3.: Distribución de flujos individuales, en unidades del número de moléculas (n) por segundo para una célula; (a) $J_{ATP}(n_{ATP}.s^{-1})$ para una población de 5000 células en relación a E_{Res} para $n_{mot} = 1$ (azul) y (b) $n_{mot} = 8$ (verde). (c) $J_{ATP}(n_{ATP}.s^{-1})$ para una población de 5000 células en relación a $F_o F_1$, para $n_{mot} = 1$ y (d) $n_{mot} = 8$.

Por otro lado, las estimaciones teóricas y experimentales del J_{ATP} total necesarias para la duplicación de células arrojan valores de $2,5 \cdot 10^6$ a $8,3 \cdot 10^6$ $n_{ATP}.s^{-1}$ en un amplio rango de condiciones aeróbicas con un tiempo de duplicación celular de 40 minutos [124], los cuales estarían en el orden de los J_{ATP} calculados (Figura 3.3). Si comparamos el número de moléculas de ATP formadas por átomo de O_2 (o relación P/O) tenemos que para $n_{mot} = 1$ esta sería de 0,89, mientras que para $n_{mot} = 8$ este sería de 0,66. Lo que indica, como era de esperar, un mejor acoplamiento de la CTE con la síntesis de ATP cuando las bacterias poseen menos flagelos.

Régimen de nado

Recordando la relación (3.20), suponiendo que esta es válida para cualquier n_{mot} , tenemos que para el caso de $n_{mot} = 1$, ω representa la velocidad angular de un flagelo, mientras que para el caso de $n_{mot} = 8$, ω representa la velocidad angular del ramillete de flagelos. Al observar la distribución de las ω para las poblaciones con $n_{mot} = 1$ y $n_{mot} = 8$, vemos que en el caso de $n_{mot} = 1$ la mayoría de las células se encuentran en un régimen de menor ω (subpoblación inferior), mientras que para $n_{mot} = 8$ es más probable encontrar células con ω por encima de 150 Hz (subpoblación superior).

Por otro lado y de acuerdo a estudios previos, la relación entre ω y el torque ejercido por el motor flagelar tiene dos comportamientos distintos (Figura 1.9): en el rango de bajo ω el torque es casi constante y máximo, acercándose a este

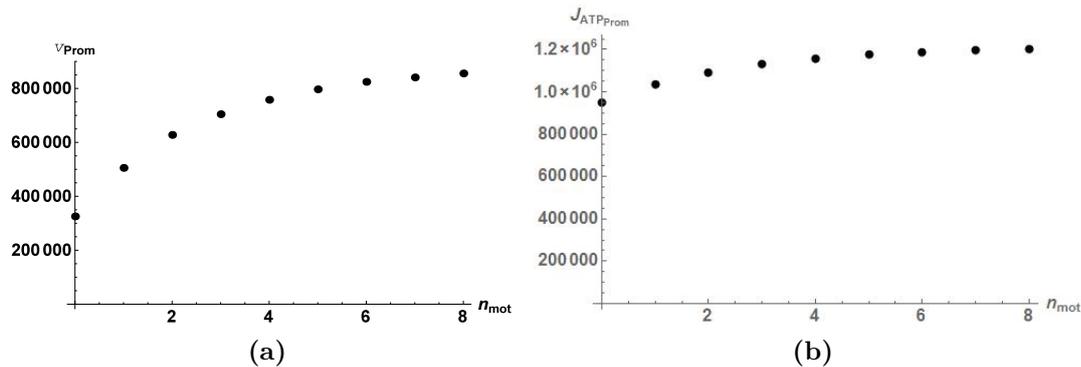


Figura 3.4.: flujos medios (a) v_{prom} ($n_{O_2}.s^{-1}$) y (b) $J_{ATP_{prom}}$ ($n_{ATP}.s^{-1}$) en relación al número de flagelos (n_{mot}). Los valores medios se calcularon para 5000 puntos.

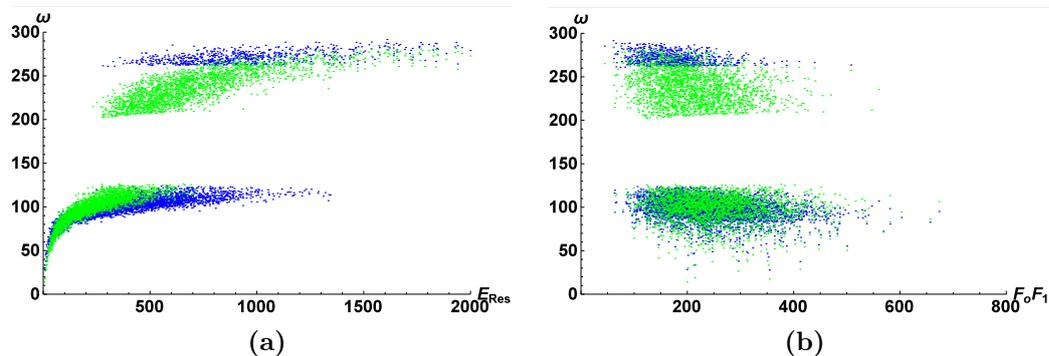


Figura 3.5.: velocidad de rotación (ω) (Hz) de los flagelos para los casos $n_{mot} = 1$ (azul) y $n_{mot} = 8$ (verde). En relación a (a) el parámetro E_{Res} y (b) el parámetro F_oF_1 .

valor de torque cuando $\omega = 0$, mientras que en el rango más alto de ω el torque disminuye monótonamente con el aumento de ω [21]. Este comportamiento describe una relación bifásica del torque como función de ω con dos pendientes, interrumpida por una transición entre el régimen de torque casi constante y el régimen de torque decreciente. Esta transición se produce a una dada relación con la temperatura. En *E. coli* a $24^\circ C$ la transición ocurre a $180 Hz$ [39, 21].

Nuestros resultados (Figura 3.5) nos muestran que, dependiendo de la configuración interna de la concentración enzimática tanto de respirasoma (E_{Res}) como de F_oF_1 e independientemente del número de flagelos, la población de bacterias se separa en dos subpoblaciones con un régimen de movilidad distintos. En este sentido, ambos regimens de movilidad se encuentran originados por procesos metabólicos en una célula individual. Si bien nuestro modelo no tiene en cuenta la interacción del flagelo con su entorno, encontramos que la configuración interna de la célula condiciona el estado de movilidad. Este comportamiento bifásico ha sido observado en experimentos que relacionan el torque con la velocidad angular del motor flagelar (Figura 1.9).

Si tenemos en cuenta el desacoplamiento de la CTE para las células más ener-

gizadas, podemos pensar que para aquellas células en que el Δp tiene valores más bajos (menos energía), y por lo tanto poseen un mejor acoplamiento para la síntesis de ATP , se les puede asociar un régimen de ω baja (recordando que $\omega \propto \Delta p$), mientras que para aquellas bacterias que poseen una Δp mayor estarían en un régimen de ω altas.

Los parámetros de crecimiento macroscópicos provienen de medidas realizadas sobre una población de células y el resultado de estos puede verse afectado por la heterogeneidad de la distribución de proteínas en células individuales [64]. Este aspecto fue tenido en cuenta al considerar una distribución Gamma para $[E_{Res}]$ y $[F_oF_1]$. Al hacer la comparación con datos experimentales estos se ajustan a los observados previamente [3]. La v_{prom} aumenta respecto al número de motores para mantener el J_{ATP} con poca variación. Este comportamiento es una consecuencia de la regulación de la relación $NADH/NAD^+$, el cual juega un rol determinante en la oxidación de la fuente de carbono.

Resulta interesante poder medir la velocidad específica de consumo de O_2 (q_{O_2}) (la cual se correlaciona con v_{prom} del modelo presentado en este capítulo) en situaciones donde el número de flagelos de las bacterias pueda hacerse variar en forma experimental. Un sistema de estas características es *B. diazoefficiens*, donde los flagelos laterales se expresan diferencialmente en un medio con Ara como fuente de carbono, pero no en un medio con Mtl como fuente de carbono (Capítulo 1 1.3). Por lo tanto, en el siguiente capítulo describiremos nuestros resultados con este sistema experimental, donde hemos podido corroborar la relación existente entre el número de flagelos y el q_{O_2} .

4. Parámetros de crecimiento de *B. diazoefficiens* y su relación con la síntesis de flagelos

Los microorganismos son capaces de oxidar una gran variedad de fuentes de carbono y energía con una concomitante transferencia de electrones a coenzimas como $NAD(P)^+$ y FAD^+ para producir sus equivalentes en estado reducido además de generar *ATP in situ* a través de la fosforilación a nivel sustrato. En condiciones aeróbicas de crecimiento, estas coenzimas se oxidan transfiriendo sus electrones a la cadena transportadora de electrones (CTE), que se encuentra en la membrana celular. La CTE transfiere sus electrones hasta un aceptor final, liberando una importante cantidad de energía. Existen diversos aceptores finales de electrones, entre los cuales el O_2 es el que posee el mayor potencial redox. Este proceso, como ya hemos mencionado antes, está acoplado con la síntesis de *ATP* (fosforilación oxidativa) a través de la ATP sintasa (F_oF_1). El *ATP* es la principal fuente de energía celular, siendo utilizado tanto para el crecimiento como para el mantenimiento celular. Los procesos de mantenimiento involucran un gasto de energía en: mantenimiento de los gradientes de concentración a través de la membrana citoplasmática, renovación de moléculas tales como el ARNm las cuales son continuamente degradadas y re-sintetizadas dentro de la célula, y en movilidad celular [130].

B. diazoefficiens es una bacteria de crecimiento lento en condiciones de cultivo aeróbicas en comparación a otros microorganismos [74]. En medios mínimos como por ejemplo Götz [41] con L-arabinosa (Ara) o D-manitol (Mtl) como fuentes de carbono y energía, el tiempo de duplicación de esta bacteria es similar, con valores promedios de 21 hs [24]. Como se describió en el Capítulo 1 (Sección 1.3), *B. diazoefficiens* posee dos sistemas de flagelos (subpolar y lateral), y es capaz de expresar ambos en medio líquido cuando crece utilizando Ara como fuente de carbono, mientras que si se utiliza Mtl solo expresa el flagelo subpolar. Puesto que los flagelos laterales parecen ser movidos por el Δp derivado de la respiración aeróbica [58], propusimos la hipótesis de que la permisividad de la biosíntesis de los flagelos laterales podría relacionarse con un mayor Δp generado en Ara.

Según nuestro conocimiento no existen reportes que apoyen esta hipótesis pero resultados reportados en 1940 para una cepa de rizobios noduladores de soja [126] mostraron que la tasa de consumo de O_2 fue mayor en medios suplementados con Ara respecto de los suplementados con Mtl. Sin embargo, estos estudios no se han confirmado con técnicas más modernas y cepas bien caracterizadas. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, nos propusimos estimar la velocidad específica de consumo de O_2 (q_{O_2max}) de *B. diazoefficiens* creciendo en cultivo *batch* en biorreactor. El empleo de biorreactores para la realización de los cultivos *batch*, permite controlar el caudal de aire de ingreso al biorreactor, que junto con la

posibilidad de medición de la composición de los gases de ingreso y egreso del equipo, nos permiten realizar el cálculo de las velocidades de consumo de O_2 y producción de CO_2 mediante los balances en fase gaseosa descritos en el Capítulo 2 (subsección 2.2.3.4).

Los cultivos *batch*, o cultivos discontinuos son sistemas cerrados que contienen todos los nutrientes necesarios para suplir las necesidades fisiológicas del organismo. Mientras los sustratos se encuentran en exceso en el medio de cultivo, la velocidad específica de crecimiento es máxima (μ_{max}) y el crecimiento es exponencial. Posteriormente, cuando disminuye la concentración de sustratos, el crecimiento se hace más lento hasta llegar a la fase de no crecimiento o fase estacionaria donde el sustrato estequiométricamente limitante se acaba. En un cultivo tipo *batch*, la concentración de biomasa, sustratos, etc. cambian con el tiempo, por lo tanto, es difícil separar la respuesta fisiológica a la modificación de una variable determinada de los cambios inherentes a este sistema de cultivo. Sin embargo, es el cultivo más sencillo y útil para la caracterización de parámetros estequiométricos y cinéticos de crecimiento microbiano. En un sistema de cultivo *batch*, durante la fase de crecimiento exponencial todas las velocidades específicas son máximas y constantes y, si consideramos un mezclado perfecto, se pueden calcular los parámetros estequiométricos y cinéticos de crecimiento que caracterizan fisiológicamente a los microorganismos. Como ya expresáramos en Materiales y Métodos (subsección 2.2.3.4) el q_{O_2} estimado para un cultivo *batch* en fase de crecimiento exponencial será el máximo (q_{O_2max}).

4.1. Cultivos en biorreactor

Mediante el balance de gases a la entrada y salida del biorreactor se calcula la velocidad volumétrica de consumo de O_2 (r_{O_2} (2.9)), con la que se calcula el q_{O_2max} , teniendo en cuenta la biomasa producida (2.10). Puesto que los valores de velocidad específica máxima de crecimiento son bajos para *B. diazoefficiens* en comparación a otros microorganismos, el q_{O_2max} para este microorganismo también resultaría bajo. Por lo tanto, es necesario contar con una gran masa de microorganismos (X) para alcanzar velocidades volumétricas de consumo de O_2 (r_{O_2}) tales que nos permitan detectar una diferencia en la composición de los gases de entrada y salida del biorreactor, y así poder calcular el q_{O_2max} . En una primera prueba utilizamos un fermentador de 1,5 l de capacidad alimentado con aire en una relación de volumen de aire por volumen de líquido por minuto (VVM) de 0,28. Utilizando este equipo no pudimos observar una diferencia significativa en la composición de los gases en la entrada y salida del fermentador por lo que consideramos la utilización de otro biorreactor con un volumen útil de 4 a 5 l y una alimentación de aire lo más baja posible para hacer más visible la diferencia en la composición de los gases de entrada y salida del biorreactor en los cultivos de *B. diazoefficiens*.

En estas condiciones realizamos cultivos tipo *batch* en biorreactor¹ de *B. diazoefficiens* LP 3004 (salvaje resistente a estreptomicina derivada de la cepa tipo

¹Los experimentos realizados en biorreactor, de los cuales se exponen los resultados en este capítulo, fueron realizados en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentadores Industriales (CINDEFI) bajo la supervisión y colaboración de la Dra. Ma. Flavia Luna.

USDA 110, [72]) y de *B. diazoefficiens* *lafR::Km* (mutante insercional de USDA 110 en la secuencia codificante del regulador maestro del flagelo lateral, [83]) utilizando el medio de cultivo HME-Ara o HME-Mtl. En estas condiciones, la cepa salvaje expresa ambos tipos de flagelos en Ara pero no en Mtl, mientras que la cepa mutante es incapaz de expresar los flagelos laterales en HME-Ara, incluyendo no solo a los filamentos sino también a todas las estructuras del motor y estator de estos flagelos. Con estos cultivos, procedimos a medir el q_{O_2max} y otros parámetros de crecimiento de estas dos cepas en cada medio de cultivo. Así, los cultivos realizados con la cepa salvaje nos permitieron observar los efectos del número de flagelos sobre el q_{O_2max} , mientras que los cultivos realizados con la cepa mutante nos permitieron comparar los valores de q_{O_2max} en HME-Ara respecto de HME-Mtl cuando la cepa no presenta diferencias en el número de flagelos.

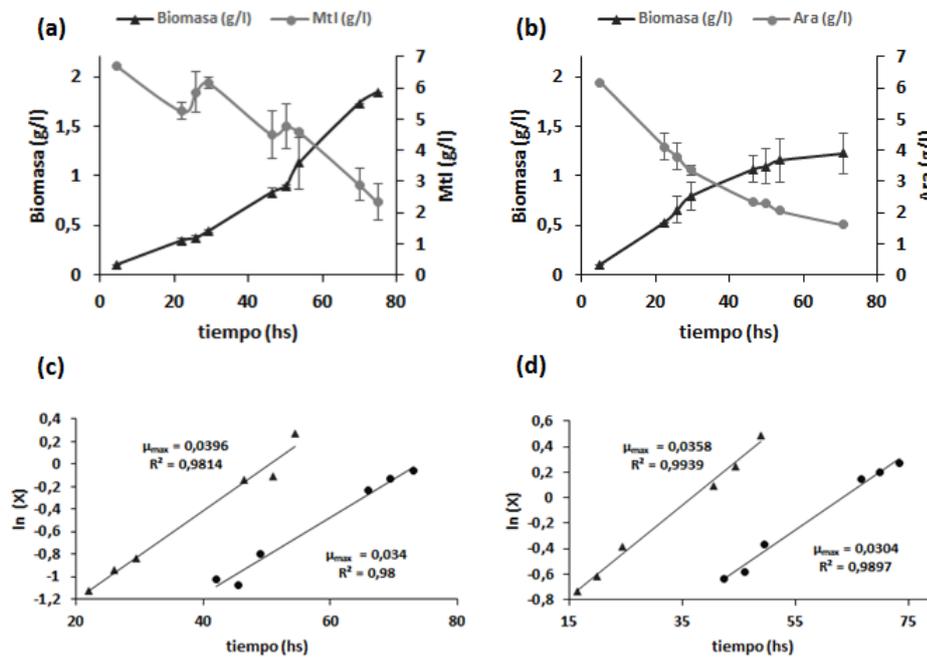


Figura 4.1.: Gráficas superiores: Cinéticas de crecimiento en biomasa (g/l) y de consumo de sustrato (g/l) de LP 3004 crecida en biorreactor utilizando como medio de cultivo (a) HME-Mtl o (b) HME-Ara. Gráficas inferiores: regresiones de los pares $\{\ln(X), t\}$ que se ajustan a la recta $\ln(X) = \ln(X_0) + \mu_{max} t$ para la determinación de μ_{max} para dos réplicas biológicas de LP 3004 crecida en biorreactor utilizando como medio de cultivo (c) HME-Mtl o (d) HME-Ara. Los valores de los tiempos de inicio de las regresiones (c) y (d) se corrieron solamente a los fines ilustrativos.

4.1.1. Parámetros de crecimiento de LP 3004

Para los cultivos de la cepa salvaje LP 3004 realizados en biorreactor registramos la biomasa en términos de peso seco, como así también la concentración remanente de fuente de carbono (sustrato) para cada muestra, obteniendo las curvas de crecimiento y consumo de sustrato que se muestran en la Figura 4.1. Se observó que el crecimiento de la cepa salvaje en ambos medios de cultivo no presentó diferencias en términos de la velocidad específica de crecimiento (μ_{max})

ya que al hacer la regresión de los pesos secos los valores resultaron similares (Tabla 4.1) y (Figuras 4.1 c y d). Con respecto al valor de q_{O_2max} calculado para los cultivos realizados en HME-Ara, éste fue casi tres veces el registrado para los de HME-Mtl, confirmando las observaciones previas [126]. Por otra parte, en HME-Mtl se obtuvo un rendimiento en biomasa mayor ($y_{x/s}$) respecto al observado para HME-Ara (Tabla 4.1), mientras que, los valores de velocidad específica de consumo de sustrato (q_{Smax}) y de producción de CO_2 (q_{CO_2max}) estimados, en concordancia con el q_{O_2max} , fueron tres veces mayores en HME-Ara que en HME-Mtl.

Para corroborar que la cepa salvaje haya expresado los flagelos en forma diferencial en los cultivos realizados en biorreactor con HME-Ara, realizamos la extracción de flagelinas de ambos cultivos y su posterior separación por electroforesis en gel de poliacrilamida. En concordancia con observaciones previas [24], en los cultivos de LP 3004 realizados en HME-Mtl solo se observó la presencia de las flagelinas de alta masa molecular que constituyen el flagelo subpolar (FliC), mientras que en los realizados en HME-Ara se observaron éstas y además las de baja masa molecular, correspondientes al flagelo lateral (LafA) (Figura 4.2 a y b).

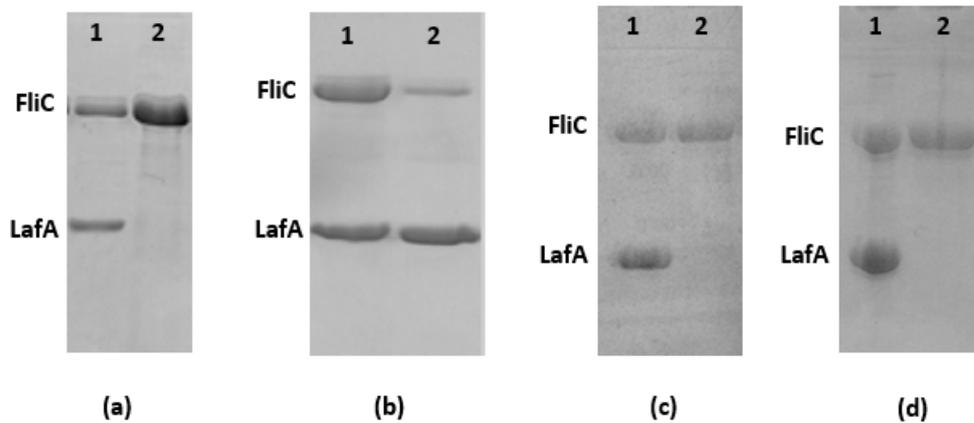


Figura 4.2.: Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) para las proteínas extracelulares de LP 3004 cultivada en (a) HME-Mtl y (b) HME-Ara, o para las de *lafR::Km* cultivada en (c) HME-Mtl y (d) HME-Ara. En ambos geles la calle 1 se corresponde con un estándar de las flagelinas purificadas y la 2 con la muestra correspondiente.

Tabla 4.1.: Parámetros de crecimiento en biorreactor para la cepa salvaje LP 3004 y para la mutante *lafR::Km* en fase exponencial

LP 3004			
Parámetro	HME-Mtl	HME-Ara	Relación Ara/Mtl
$\mu_{max}(h^{-1})$	$0,04 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,02$	1,0
$q_{O_2max}(mmol.g^{-1}h^{-1})$	$0,86 \pm 0,02$	$2,53 \pm 0,11$	2,9
$y_{x/s}(C - mol.Cmol^{-1})$	$0,5 \pm 0,1$	$0,27 \pm 0,08$	0,5
$q_{Smax}(mC - mol.g^{-1}.h^{-1})$	$2,81 \pm 0,46$	$7,66 \pm 0,47$	2,7
$q_{CO_2max}(mmol.g^{-1}.h^{-1})$	$0,67 \pm 0,03$	$2,39 \pm 0,05$	3,6
<i>lafR::Km</i>			
Parámetro	HME-Mtl	HME-Ara	Relación Ara/Mtl
$\mu_{max}(h^{-1})$	$0,03 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	1,0
$q_{O_2max}(mmol.g^{-1}h^{-1})$	$1,26 \pm 0,12$	$1,63 \pm 0,07$	1,3
$y_{x/s}(C - mol.Cmol^{-1})$	$0,52 \pm 0,13$	$0,41 \pm 0,07$	0,8
$q_{Smax}(mC - mol.g^{-1}.h^{-1})$	$2,17 \pm 0,34$	$2,9 \pm 0,64$	1,3
$q_{CO_2max}(mmol.g^{-1}.h^{-1})$	$0,60 \pm 0,01$	$1,05 \pm 0,08$	1,7

4.1.2. Parámetros de crecimiento del mutante *lafR::Km*

Como estrategia adicional, para evaluar si la presencia diferencial de los flagelos contribuyó a las diferencias observadas en los parámetros de crecimiento de la cepa salvaje *B. diazoefficiens* LP 3004 en HME-Ara respecto de HME-Mtl, realizamos estos mismos cultivos *batch* en biorreactor con la mutante *lafR::Km*. Como describiéramos antes, esta cepa es incapaz de expresar el sistema de flagelos laterales en HME-Ara, por lo que esperaríamos que la cepa mutante no consuma la misma cantidad de energía que la cepa salvaje ya que no tiene que mantener estas estructuras. En este sentido esta cepa es un modelo similar a la condición donde se tiene un único flagelo en el modelo propuesto en el Capítulo 3 (Figura 3.2).

El análisis de los resultados mostró que los parámetros de crecimiento (μ_{max} y q_{O_2max}) de la mutante *lafR::Km* creciendo en HME-Ara comparados con los de HME-Mtl fueron similares (Tabla 4.1), e incluso la $\mu_{máx}$ de la mutante *lafR::Km* fue similar a la observada para LP 3004 en ambos medios (Figura 4.3).

La mutante *lafR::Km* es incapaz de expresar los flagelos laterales, por lo que podemos pensar que su requerimiento de *ATP* en términos de mantenimiento celular en HME-Ara fuera semejante al de los cultivos en HME-Mtl. Para corroborar que los flagelos laterales estuvieran efectivamente ausentes en los biorreactores hicimos una extracción de las flagelinas y su posterior separación por electroforesis en gel de poliacrilamida. En concordancia con el efecto esperado de la mutación, en los cultivos de *lafR::Km* realizados tanto en HME-Mtl como en HME-Ara solo se observó la presencia de las flagelinas que constituyen el flagelo subpolar (FliC) (Figura 4.2 c y d).

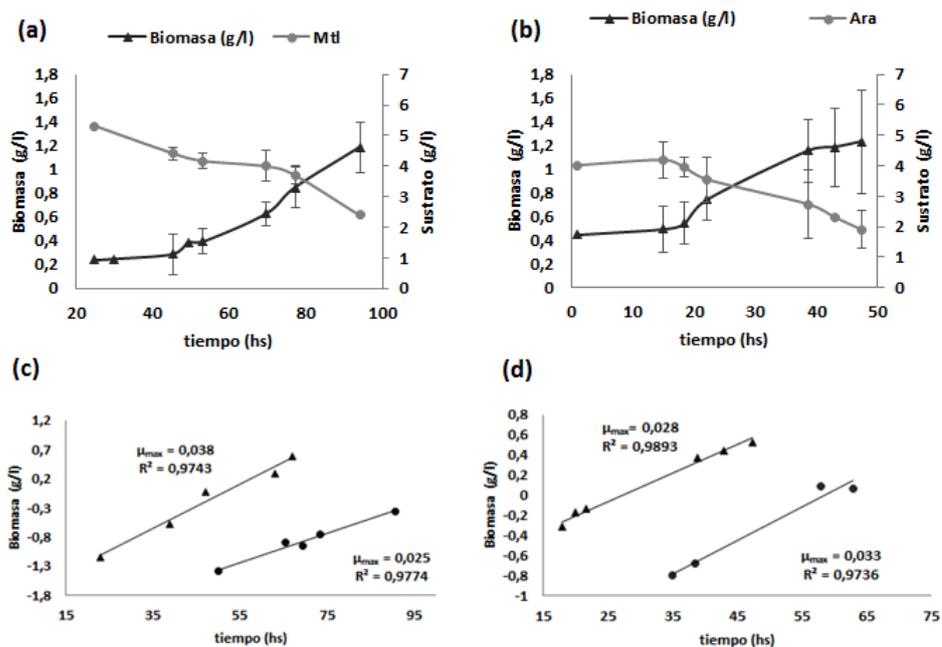


Figura 4.3.: Graficas superiores: Cinéticas de crecimiento en biomasa (g/l) y consumo de sustrato (g/l) de *B. diazoefficiens* *lafR::Km* crecida en biorreactor utilizando como medio de cultivo (a) HME-Mtl o (b) HME-Ara. Gráficas inferiores: Regresiones de los pares $\{\ln(X), t\}$ para la determinación de μ_{max} para dos réplicas biológicas de *B. diazoefficiens* *lafR::Km* crecida en biorreactor utilizando como medio de cultivo (c) HME-Mtl o (d) HME-Ara. Las escalas temporales en (c) y (d) se corrieron solamente a los fines ilustrativos.

4.2. Competición en crecimiento

Las diferencias que se observaron en los valores de $q_{O_2 \max}$ y en $y_{x/s}$ en los cultivos realizados tanto con la cepa salvaje como con la mutante sugieren que este mutante podría competir exitosamente con la cepa salvaje si ambas especies son cultivadas juntas. Para investigar esta posibilidad, co-inoculamos las cepas en medios líquidos HME-Ara y en HME-Mtl y las crecimos hasta fase exponencial tardía, registrando el número final de viables para luego diluir estos cultivos en medio fresco y repetir las mediciones. Al cabo de tres cultivos consecutivos de co-inoculación se observó un mayor porcentaje de viables la cepa *lafR::Km* respecto de LP 3004 para los cultivos realizados en HME-Ara (Figura 4.4).

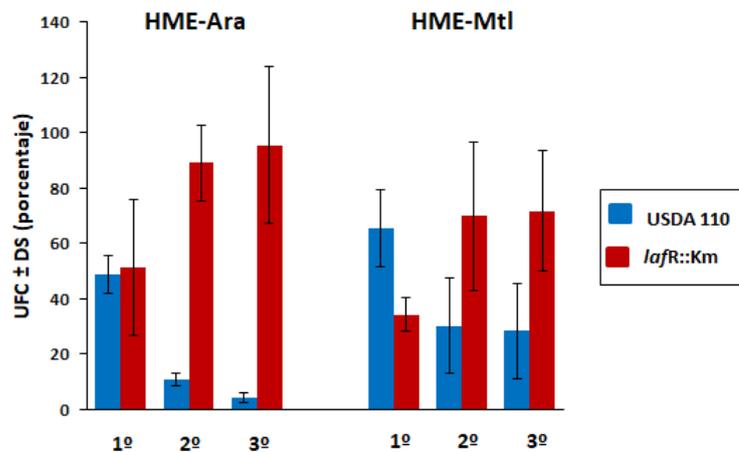


Figura 4.4.: Recuentos en placa ($UFC, 10^6.ml^{-1}$) en los medios de cultivo HME-Ara y HME-Mtl de las cepas salvaje y mutante carente de flagelos laterales.

De acuerdo a lo expuesto en este capítulo, el crecimiento de *B. diazoefficiens* con Mtl o con Ara como fuente de carbono y energía lleva a diferencias en el comportamiento fisiológico de la bacteria, aun cuando con ambos nutrientes el microorganismo crece a la misma μ_{max} . El análisis de los parámetros de crecimiento de *B. diazoefficiens* LP 3004 (Tabla 4.1) indica que, utilizando Ara el $q_{O_2 \max}$ de esta cepa es tres veces mayor que si se la cultiva utilizando Mtl. Esta diferencia podría deberse a que *B. diazoefficiens* expresa los flagelos laterales en HME-Ara, mientras que en HME-Mtl no se ha detectado su presencia (Figura 4.2). Por lo tanto, ese mayor consumo de O_2 en los cultivos con Ara estaría asociado a una producción de energía extra relacionada con funciones de mantenimiento entre las que se encuentran incluidas la síntesis de proteínas de los flagelos laterales y la rotación de los mismos.

Por otro lado, el análisis del modelo propuesto en el Capítulo 3 para estudiar la contribución de la Δp al movimiento de los flagelos y a la síntesis de *ATP* nos sugiere que la capacidad de las bacterias para sintetizar flagelos las conduciría a un estado de mayor consumo de O_2 sin que esto implicara necesariamente una mayor producción de *ATP*, es decir, a un consumo de O_2 desacoplado de la producción de *ATP*, regulado por el estado energético de la célula. Por lo tanto,

este modelo propuesto se ajusta al comportamiento observado en los cultivos con Ara y contribuye a explicar los mayores valores de q_{O_2max} en HME-Ara respecto de HME-Mtl. En concordancia con esta hipótesis observamos que la mutante *lafR::Km*, la cual no puede expresar los flagelos laterales, no presenta esta diferencia en el q_{O_2max} al ser crecida tanto en HME-Ara como en HME-Mtl (Tabla 4.1). Además al ser crecidas juntas en HME-Ara, *lafR::Km* es más competitiva en el crecimiento respecto de la cepa salvaje (Figura 4.4), lo que indicaría que la expresión y funcionamiento de los flagelos laterales insumen en esta bacteria una importante cantidad de energía.

Estos experimentos se realizaron utilizando dos fuentes de carbono diferentes (Ara o Mtl), que parecerían metabolizarse por vías catabólicas distintas [122]. Al momento de inicio de este trabajo de Tesis, las vías de degradación de Ara y Mtl en *B. diazoefficiens* se encontraban parcialmente descriptas. Esto nos motivó a que estudiemos las vías metabólicas que podrían estar activas en una u otra condición a partir del análisis proteómico en cada condición de cultivo, lo cual se detallará en el capítulo siguiente.

5. Proteómica de *B. diazoefficiens* cultivada con Ara o Mtl como fuentes de carbono y energía

Hemos mostrado en el Capítulo 4 que el consumo de O_2 para la cepa salvaje es mayor cuando la cultivamos en HME-Ara respecto de cuando lo hacemos en HME-Mtl (Tabla 4.1), y hemos atribuido esa diferencia a la expresión diferencial de los flagelos laterales en HME-Ara, lo cual generaría un consumo de energía de mantenimiento mayor que en HME-Mtl, tal como lo predice el modelo presentado en el Capítulo 3. Sin embargo, las evidencias disponibles indican que la fuente de carbono con la que se suplementa cada medio (Ara o Mtl) podría metabolizarse por vías diferentes en rizobios [122] por lo que no podríamos descartar que haya rendimientos energéticos diferentes en una u otra fuente de carbono. Si esto es así, las diferencias observadas en los parámetros de crecimiento como q_{O_2max} podrían deberse a diferencias de eficiencia energética en vez de diferencias de consumo de energía por parte de los flagelos. La elucidación de esta cuestión también podría ayudar a entender cuál podría ser el efector de la regulación del flagelo lateral.

Estas vías han sido estudiadas parcialmente y no se cuenta con información muy precisa para *B. diazoefficiens*. Para estudiar e inferir las vías metabólicas activas en una u otra condición realizamos un estudio de la proteómica de *B. diazoefficiens* cultivada en HME-Mtl o en HME-Ara con el fin de identificar las enzimas catabólicas presentes en cada condición. A partir de estos datos, calculamos la estequiometría de cada vía, y con ella, pudimos estimar las respectivas eficiencias energéticas.

5.1. Análisis de los proteomas obtenidos

Las proteínas extraídas de los cultivos de *B. diazoefficiens* constaron de dos fracciones: una microsomal y otra soluble. De esta manera, en la primer fracción se extrajo la mayor parte de proteínas de membrana (de aquí en adelante, fracción membrana) mientras que la segunda fracción se enriqueció en proteínas de citoplasma (de aquí en adelante, fracción citoplasma). Ambas fracciones fueron sometidas a digestión triptica, y los perfiles peptídicos resultantes fueron comparados con los de una digestión in silico del proteoma de *B. diazoefficiens* USDA 110 mediante el programa Proteome Discoverer (Thermo Scientific, versión 1.4) y de esta manera se identificaron un total de 3334 proteínas, las cuales representaron un 40 % del total de las proteínas predichas en el proteoma de *B. diazoefficiens* USDA 110 [59].

Comparamos el nivel de expresión de las proteínas provenientes de los cultivos en HME-Ara respecto de las provenientes de HME-Mtl para las fracciones

de membrana por un lado, y las fracciones citoplasma por el otro. Las proteínas sobreexpresadas o expresadas exclusivamente en una u otra de las fracciones –citoplasmática o de membrana– en los cultivos realizados en HME-Ara respecto de los realizados en HME-Mtl fueron catalogadas como **Ara-Dif**, mientras que aquellas proteínas que se sobreexpresaron o se expresaron exclusivamente en HME-Mtl respecto de HME-Ara fueron catalogadas como **Mtl-Dif**. De este análisis, 237 proteínas resultaron estar en el conjunto Ara-Dif, de las cuales 91 se encontraban expresadas en ambas fracciones (citoplasma y de membrana, no necesariamente en forma diferencial); mientras que 266 proteínas resultaron pertenecer al conjunto Mtl-Dif, de las cuales 115 se encontraban expresadas en ambas fracciones de citoplasma y membrana, no necesariamente en forma diferencial.

Las proteínas diferenciales fueron clasificadas en *Cluster of Orthologous Groups* (COGs)¹, resultando una mayor proporción de proteínas relacionadas al transporte y metabolismo de carbohidratos (grupo G) en Mtl-Dif respecto de Ara-Dif, mientras que las proteínas relacionadas a la movilidad y la transducción de señales fueron más abundantes en Ara-Dif (Figura 5.1).

Las proteínas diferenciales fueron clasificadas utilizando bases de datos como *Uniprot*² y *RhizoBase*³ de acuerdo a sus funciones específicas en *B. diazoefficiens*. Dentro de las proteínas analizadas encontramos aquellas que intervienen en rutas específicas del catabolismo de los hidratos de carbono. Algunas de estas rutas ya se encontraban descritas para *B. diazoefficiens*. Del conjunto de proteínas diferenciales y utilizando bases de datos como *KEGG pathway*⁴ y *MetaCyc*⁵ se pudieron reconstruir y proponer las rutas a través de las cuales se metabolizan Ara y Mtl en *B. diazoefficiens* para estas condiciones de cultivo. A su vez se identificaron proteínas relacionadas con la síntesis de cofactores de óxido-reducción. Dentro de las proteínas que cumplen funciones estructurales como las flagelinas, en particular, como ya habíamos observado antes, se identificaron como diferenciales a las flagelinas que conforman la estructura del flagelo lateral solo en Ara-Dif. La clasificación en COGs resultó en una mayor proporción de proteínas relacionadas al transporte y metabolismo de carbohidratos (grupo G) en Mtl-Dif respecto de Ara-Dif, mientras que las proteínas relacionadas a la movilidad y la transducción de señales fueron mayores en Ara-Dif (Figura 5.1).

5.2. Catabolismo de Ara y Mtl en *B. diazoefficiens*

Conocer el mapa metabólico del catabolismo de cada fuente de carbono es importante en el sentido de que pueden obtenerse balances de rendimiento energético para una u otra fuente de carbono.

A partir del conjunto de proteínas diferenciales identificadas y caracterizadas usando *RhizoBase* y *Uniprot* se pudieron reconstruir y proponer las rutas a través de las cuales se metabolizarían Ara y Mtl en *B. diazoefficiens* para estas condiciones de cultivo, mediante el empleo de *KEGG pathway* y *MetaCyc*. De esta manera pudimos detectar en Ara-Dif a una buena cantidad de proteínas ya des-

¹<http://weizhongli-lab.org/webMGA>

²<http://www.uniprot.org/>

³<http://genome.annotation.jp/rhizobase/Bradyrhizobium>

⁴<http://www.genome.jp/kegg/genes.html>

⁵<http://metacyc.org/>

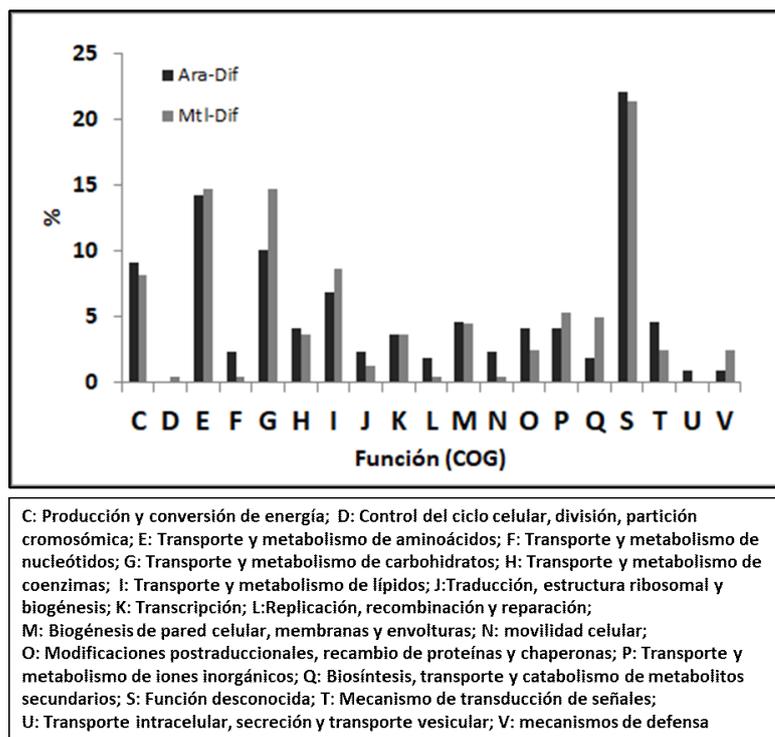


Figura 5.1.: Histograma de la clasificación de las proteínas Ara-Dif y Mtl-Dif según su función de acuerdo a la base de datos *Cluster Orthologous Groups* (COGs). No se observaron todas las funciones para los grupos Ara-Dif y Mtl-Dif.

criptas para la vía de Ara [90, 62], mientras que en Mtl-Dif detectamos proteínas correspondientes a la vía PP y, para nuestra sorpresa, proteínas pertenecientes al ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB), el cual no se había descrito aún para la degradación de Mtl en *B. diazoefficiens*. Asimismo, identificamos proteínas relacionadas con la síntesis de cofactores de óxido-reducción, y varias de las proteínas que son compartidas por la oxidación de ambas fuentes de carbono, como es el caso de las enzimas que catalizan el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA, por su abreviatura en inglés). Dentro de las proteínas que cumplen funciones estructurales como las flagelinas, en particular, como ya habíamos observado antes, se identificaron como diferenciales a las flagelinas que conforman la estructura del flagelo lateral solo en Ara-Dif. Así, a partir de las proteínas expresadas en forma diferencial hipotetizamos cuáles serían las vías activas en la degradación de cada fuente de carbono. Luego, confirmamos que todas las restantes enzimas de cada vía hayan sido detectadas por nosotros en nuestro proteoma (ProteomeX-change (PXD008263)) y basándonos en *KEGG pathway* obtuvimos los balances estequiométricos para cada caso, a fin de inferir el rendimiento energético que pudiera tener Ara o Mtl. Detallamos a continuación las enzimas identificadas para estas vías metabólicas y la reconstrucción de las mismas.

5.2.1. Oxidación de Ara

Tabla 5.1.: Proteínas Ara-Dif que tienen un rol en la ruta de oxidación de Ara.
 Las enzimas subrayadas estuvieron presentes solo en Ara.

Locus (<i>Rhizobase</i>)	Proteína ID (<i>Uniprot</i>)	Gen	Descripción	Nivel de expresión diferencial ⁶ $\log_2(\text{área}_{Mtl}/\text{área}_{Ara})$	
				Citoplasma	Membrana
<u>blr2316</u>	Q89ST4		Probable NADH-ubiquinona oxidoreductasa cadena F	Solo en Ara	-
<u>blr2929</u>	Q89R43		Hidroxi piruvato isomerasa	NS ⁷	Solo en Ara
<u>blr2974</u>	Q89QZ8		Dehidratasa. Similar a una supuesta D-galactarato deshidratasa	-1,2323	-
<u>bll3156</u>	Q89QH2	<i>frc</i>	Formil-CoA:oxalato CoA-transferasa	-2,1294	Solo en Ara
<u>bll3157</u>	Q89QH1	<i>oxc</i>	Oxalil-CoA decarboxi-lasa	-2,3829	NS
<u>blr3166</u>	Q89QG2	<i>gcl</i>	Glioxilato carboligasa	Solo en Ara	Solo en Ara
<u>blr3167</u>	Q89QG1	<i>hyi</i>	Hidroxi piruvato isomerasa	Solo en Ara	Solo en Ara
<u>blr3168</u>	Q89QG0		Tartronato semialdehido reductasa	Solo en Ara	Solo en Ara
<u>blr3205</u>	Q89QC3		Dehidrogenasa. Similar a Galactosa 1-deshidrogenasa	-	-3,3450
<u>blr3207</u>	Q89QC1		L-arabinonolactonasa	-4,7706	Solo en Ara
<u>bll7287</u>	Q89E00	<i>dgoA</i>	2-deshidro-3- deoxifosfagalactonato aldolasa	-1,4610	-

En primer lugar Ara se oxida a L-KDA para lo cual se han descrito tres pasos [62]: primero la oxidación a L-arabino- γ -lactona catalizada por la L-arabinosa-1-deshidrogenasa, identificada en Ara-Dif como Blr3205, (*Uniprot*, Q89QC3). En segundo lugar la L-arabino- γ -lactona se hidroliza a L-arabonato en una reacción catalizada por la L-arabinonolactonasa (Blr3207), enzima que también hemos encontrado en Ara-Dif. Por último la L-arabonato deshidratasa cataliza la conversión del L-arabonato a L-KDA; esta enzima no está anotada en el genoma de

⁶Nivel de expresión diferencial. Se expresa como $\log_2(\text{área}_{Mtl}/\text{área}_{Ara})$. Cuando es mayor a 1, la proteína se encuentra sobreexpresada en Mtl. Cuando es menor a -1 la proteína se encuentra sobreexpresada en Ara. Para aquellas proteínas que solo están presentes en una condición (Mtl o Ara), expresaremos «solo en» la condición correspondiente.

⁷No Significativo: la proteína fue detectada en esta fracción y condición, pero no se expresa en forma diferencial con un nivel de significancia aceptable.

B. diazoefficiens USDA 110, pero ha sido descrita para otros microorganismos [134]. En Ara-Dif encontramos la Blr2974, la cual es similar a una supuesta D-galactarato deshidratasa (*Uniprot*, Q89QZ8) y sería la que participaría en este paso del catabolismo (Tabla 5.1). En la Figura 5.2 esquematizamos estos primeros pasos del catabolismo de Ara.

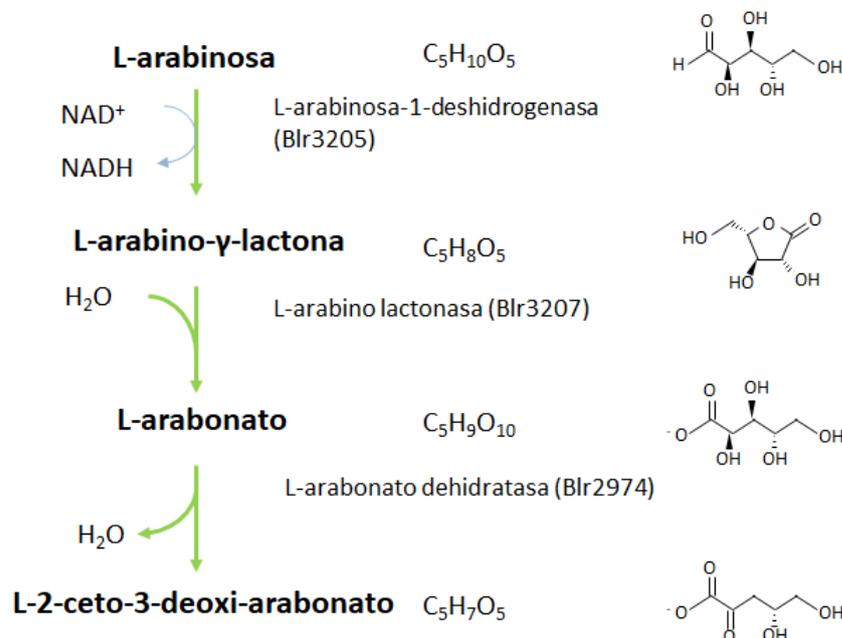


Figura 5.2.: Esquema de los primeros pasos de la vía de oxidación de Ara. En verde las reacciones catalizadas por las enzimas identificadas en Ara-Dif.

En el caso de los rizobios de crecimiento lento, como es *B. diazoefficiens*, L-KDA se degrada a piruvato y glicolaldehído mediante una L-KDA aldolasa [90], sin embargo esta enzima tampoco está anotada como tal en el genoma de *B. diazoefficiens* USDA 110. La proteína identificada en *Uniprot* como Q89E00 o 2-deshidro-3-deoxifosfogalactonato aldolasa (BlI7287) cataliza una reacción similar a esta utilizando 2-deshidro-3-deoxi-D-galactonato-6-fosfato como sustrato. Dado que esta proteína se encontró en Ara-Dif (Tabla 5.1) podría ser la aldolasa que interviene en la degradación de L-KDA a piruvato y glicolaldehído.

El piruvato es decarboxilado a acetil-CoA continuando su oxidación completa a CO_2 en el TCA. El glicolaldehído, por otro lado, se degrada a glioxilato, el cual puede continuar su degradación a través de dos rutas diferentes (Figura 5.3). Por un lado puede oxidarse a oxalato, para finalizar en CO_2 a través de tres pasos de una ruta lineal en la que intervienen la formil-CoA:oxalato CoA-transferasa (BlI3156) y la oxalil-CoA decarboxilasa (BlI3157), las cuales han sido identificadas en Ara-Dif. También hemos identificado en Ara-Dif a Blr2316 y Blr2317, las que pueden estar asociadas con esta vía. Blr2316 está anotada como NADH-ubiquinona oxidorreductasa, por lo que catalizaría la oxidación del NADH proveniente de la actividad formiato deshidrogenasa de Blr2317 [62]. La otra vía de oxidación del glioxilato la hemos propuesto a partir de la identificación de las enzimas Blr3166, Blr3167, Blr3168 y Blr7172 las cuales se encuentran en Ara-Dif y catalizan los pasos de degradación a glicerato para luego finalizar en piruvato, el cual se degrada en el TCA. Esto último se esquematiza en la Figura 5.3.

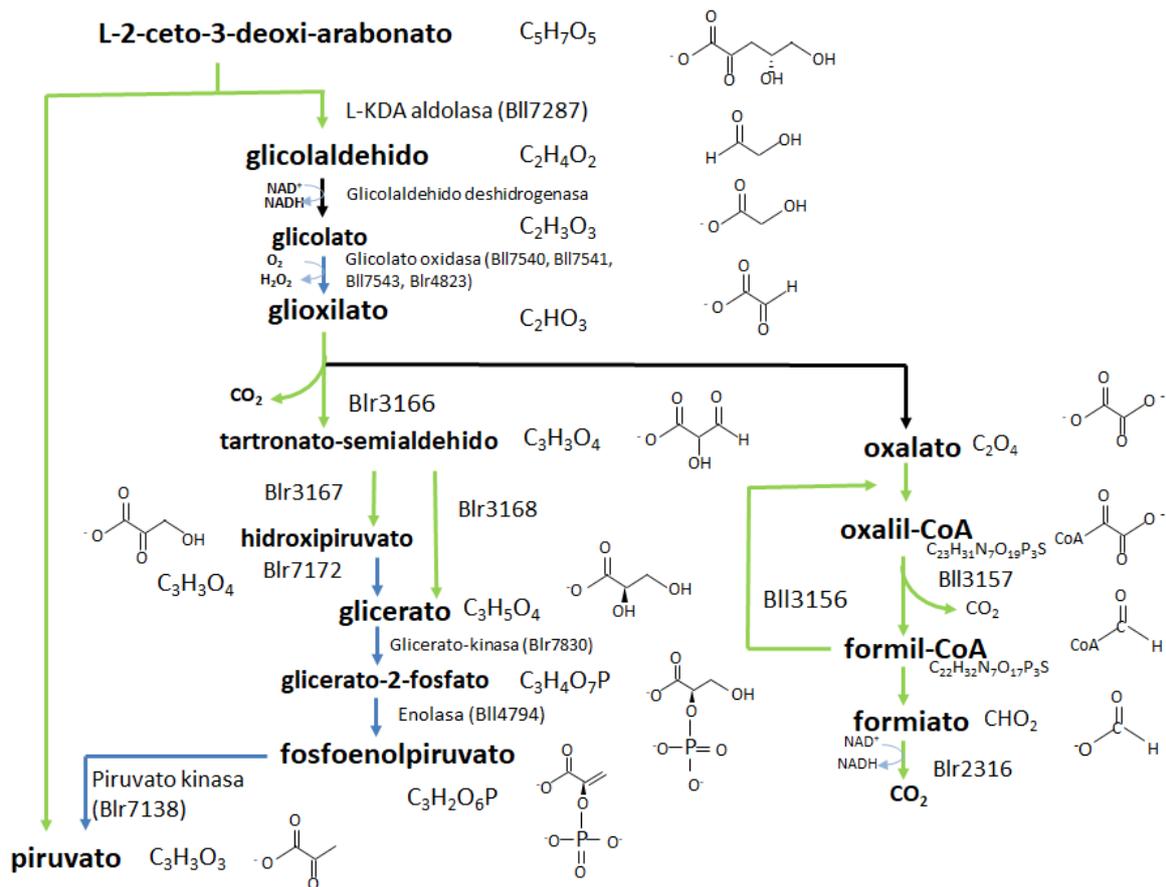


Figura 5.3.: Esquema de los últimos pasos de la vía de oxidación de Ara. En verde se marcan las reacciones para las cuales se han identificado las enzimas en nuestro proteoma y están en el grupo Ara-Dif. En azul aquellas reacciones catalizadas por enzimas que se han identificado en nuestro proteoma pero no son diferenciales. En negro aquellas reacciones para las que las enzimas no están anotadas pero cuya actividad ha sido observada experimentalmente [62].

5.2.2. Oxidación de Mtl

Tabla 5.2.: Proteínas Mtl-Dif seleccionadas que tienen un rol en la vía de oxidación de Mtl.

Locus (<i>Rhizobase</i>)	Proteína ID (<i>Uniprot</i>)	Gen	Descripción	Nivel de expresión diferencial $\log_2(\text{área}_{Mtl}/\text{área}_{Ara})$	
				Citoplasma	Membrana
<u>blr0337</u>	Q89XH7		Supuesta carbono monóxido deshidrogenasa cadena media	1,1132	NS
<u>bl11419</u>	Q89UJ7	<i>metF</i>	Metilendetrahidrofolate reductasa	Solo en Mtl	NS
<u>bl11521</u>	Q89U96		Supuesta proteína fructosa-1,6-bifosfato aldolasa	1,9439	NS
<u>blr2168</u>	Q89T82		Supuesta proteína transquetolasa subunidad alfa	Solo en Mtl	-
<u>blr2581</u>	Q8GKS1	<i>fbp</i>	Fructosa-1,6-bifosfato clase 1	Solo en Mtl	-
<u>blr2582</u>	H7C6I1	<i>cbbP</i>	Fosforibuloquinasa	Solo en Mtl	-
<u>blr2583</u>	H7C6U6	<i>cbbT</i>	Transquetolasa	Solo en Mtl	Solo en Mtl
<u>blr2584</u>	H7C7W4	<i>cbbA</i>	Fructosa-bifosfato aldolasa	Solo en Mtl	Solo en Mtl
<u>blr2585</u>	Q9ZI34	<i>cbbL</i>	Ribulosa bifosfato carboxilasa oxigenasa cadena larga	Solo en Mtl	Solo en Mtl
<u>blr2586</u>	Q9ZI33	<i>cbbS</i>	Ribulosa bifosfato carboxilasa oxigenasa cadena corta	Solo en Mtl	Solo en Mtl
<u>blr2588</u>	Q89S24	<i>cbbE</i>	Ribulosa-fosfato 3-epimerasa	Solo en Mtl	-
<u>blr2815</u>	Q89RF7		Supuesta proteína transquetolasa. Piruvato deshidrogenasa componente E1	Solo en Mtl	Solo en Mtl
<u>blr3224</u>	Q89QA6		Transportador ABC dependiente de ATP. Supuesto sistema de transporte de sorbitol/manitol	Solo en Mtl	NS
<u>blr3225</u>	Q89QA5		Oxidoreductasa. Similar a una supuesta glucosa/ribitol oxidoreductasa	5,0927	Solo en Mtl

Tabla 5.3.: Proteínas Mtl-Dif seleccionadas que tienen un rol en la vía de oxidación de Mtl.

Locus (<i>Rhizobaze</i>)	Proteína ID (<i>Uniprot</i>)	Gen	Descripción	Nivel de expresión diferencial $\log_2(\text{área}_{Mtl}/\text{área}_{Ara})$	
				Citoplasma	Membrana
blr3226	Q89QA4		Ribitol quinasa	3,9234	-
blr3227	Q89QA3		Supuesta fructoquinasa	Solo en Mtl	-
bll3754	Q89NT0	<i>gph</i>	Fosfoglicolato fosfatasa	Solo en Mtl	NS
bll6549	Q89FZ9		D-3-fosfoglicerato:NAD oxidoreductasa	Solo en Mtl	-
blr7063	Q89EL0		Probable 2-ketogluconato reductasa	2,5998	-

La obtención de energía a partir de Mtl requiere primero que este poliol se oxide a fructosa-6-fosfato, en una reacción catalizada por la manitol deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.67). Si bien la actividad de esta enzima fue medida experimentalmente [63], el gen que la codifica no fue anotado aún en el genoma de *B. diazoefficiens*. En nuestro caso hemos observado dentro del grupo Mtl-Dif (Tablas 5.2 y 5.3) a Blr3225, la cual es similar a la glucosa/ribitol oxidorreductasa y junto a ésta Blr3224 (supuesta transportadora de Mtl), Blr3226 (D-ribitol kinasa) y Blr3227 (D-fructoquinasa); esta última catalizaría la fosforilación de la D-fructosa producida en la reacción anterior. Teniendo en cuenta lo antes dicho parecería que Blr3225 es efectivamente la Mtl deshidrogenasa descrita anteriormente [63].

De acuerdo a lo descrito para la oxidación de Mtl, la D-fructosa-6-fosfato obtenida podría seguir la ruta de EMP, ED o la vía PP (Figura 1.11). Para seguir su curso por la vía EMP la fructosa-6-fosfato debe fosforilarse a fructosa-1,6-bifosfato mediante la fosfofructoquinasa (E.C. 2.7.1.11). No observamos en todo el grupo de proteínas identificadas a esta enzima (la cual se correspondería con los genes bll2580 y blr4659), lo que indicaría, como ya se había reportado antes [115], que la vía EMP se encuentra inactiva en estas condiciones. Respecto a la vía ED, si bien la enzima 2-ceto-3-deoxigluconato-6-fosfato aldolasa (4.1.2.14, Código Blr3923) fue identificada, no está expresada en forma diferencial y no encontramos evidencia de que se expresara la fosfogluconato deshidratasa (E. C. 4.2.1.12) (Figura 1.11). Se ha sugerido que en las especies de *Bradyrhizobium* en las cuales las rutas EMP y ED se encuentran inactivas, las hexosas se metabolizarían a través de la vía PP [115].

Tal como expusimos antes, en lugar de encontrar expresadas las enzimas características de las vías EMP y ED encontramos fuertemente expresadas las enzimas correspondientes a la vía PP como Blr2168, Blr2583 y Blr2588 (Tabla 5.2 y Figura 5.5). Las pentosas fosfato (xilulosa-5-fosfato, ribosa-5-fosfato y ribulosa-5-fosfato) son degradadas finalmente a gliceraldehído-3-fosfato el cual continúa su degradación a piruvato culminando en el TCA.

Además de las enzimas propias de la vía PP, observamos una fuerte inducción de la fosforribuloquinasa (Blr2582) y las dos subunidades de la ribulosa-bifosfato

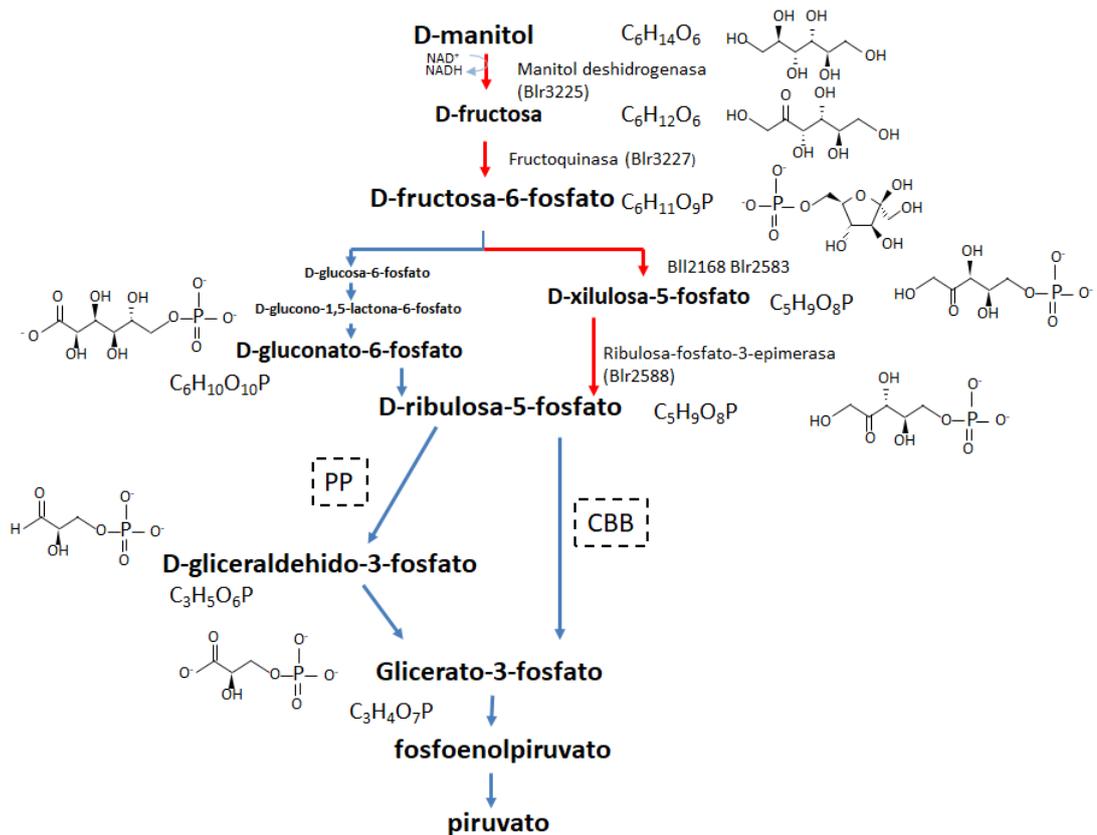


Figura 5.4.: Esquema de la oxidación de Mtl. Las vías PP y CBB comparten algunas proteínas, algunas otras solo son características de CBB. En rojo aquellas reacciones en las cuales participan enzimas identificadas dentro del grupo Mtl-Dif y en azul las reacciones que son catalizadas por enzimas identificadas en nuestro proteoma pero que no son diferenciales.

carboxilasa-oxigenasa (RuBisCO): la subunidad de cadena larga (Blr2585) codificada por el gen *cbbL* y la subunidad de cadena corta (Blr2586) codificada por *cbbS*. Estas proteínas son específicas de la vía de fijación de CO_2 , denominada Ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB), el cual también comparte algunas enzimas con la vía PP (Figura 5.5).

RuBisCO se compone de ocho subunidades de cadena larga y ocho de cadena corta y ha sido detectada tanto en plantas superiores como en varios microorganismos capaces de crecer en forma autotrófica. La región catalítica de RuBisCO puede ser atacada tanto por CO_2 , actuando como carboxilasa, como por O_2 , actuando como oxigenasa [51]. En el primer caso resultará la síntesis de dos equivalentes de glicerato-3-fosfato a partir de ribulosa-1,5-bifosfato y CO_2 , y en el segundo en la síntesis de un glicerato-3-fosfato y un glicolato-2-fosfato a partir de ribulosa-1,5-bifosfato.

En *B. diazoefficiens* se ha reportado la sobreexpresión de RuBisCO cuando se somete a las bacterias a una atmósfera modificada (84% N_2 , 5% CO_2 , 1% O_2 y 10% H_2). En estas condiciones *B. diazoefficiens* es capaz de utilizar H_2 como dador de electrones para reducir O_2 y así obtener la energía suficiente para el ciclo celular, y asimilar CO_2 mediante la enzima RuBisCO [36, 44].

El glicerato-3-fosfato producido continuará su degradación a glicerato-2-fosfato

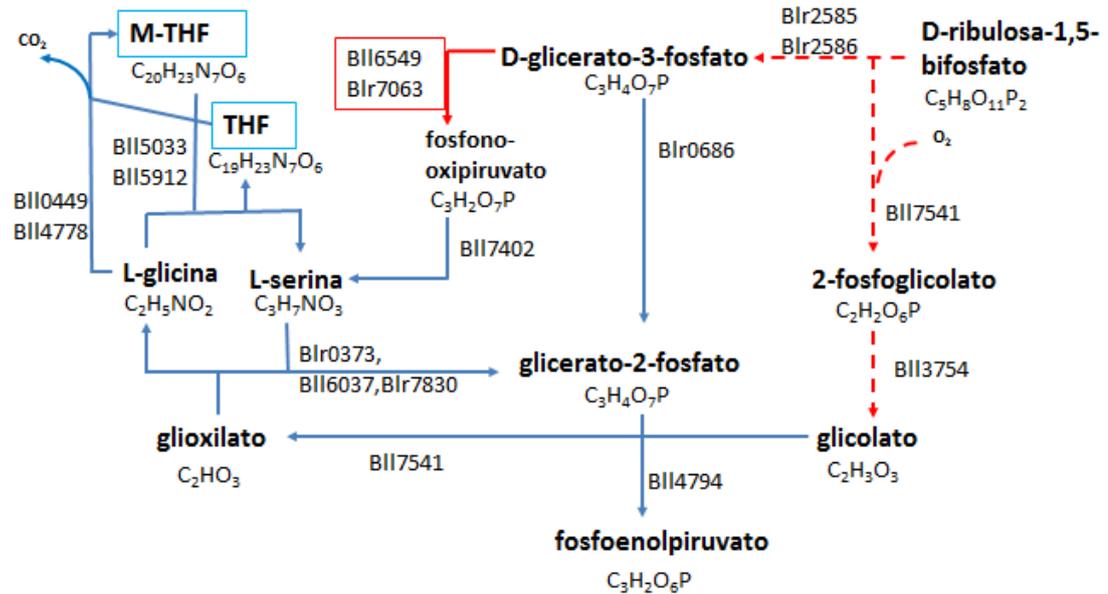


Figura 5.6.: Esquema de la oxidación final de glicoxilato a través del ciclo THF. En rojo las enzimas encontradas como Mtl-Dif y en azul aquellas que fueron identificadas pero no con una expresión diferencial.

5.2.3. Oxidación y rendimiento energético

Luego de reconstruir las vías metabólicas a partir de las enzimas que se encuentran diferencialmente expresadas, realizamos el balance estequiométrico de cada vía. Si bien varios intermediarios de la vía sirven como esqueletos carbonados para generar otros metabolitos en las reacciones anapleróticas, no nos es posible hasta el momento modelar dichas reacciones. Nuestro objetivo al presente es realizar una estimación del rendimiento energético de cada vía para evaluar si este aspecto podría estar relacionado con las diferencias en la tasa de consumo de O_2 (q_{O_2max}) observadas en el capítulo 4, y con la expresión diferencial del flagelo lateral. Por ello, solamente tomamos en cuenta el balance energético de la oxidación completa de cada fuente de carbono. En las tablas del Apéndice A.1 se resumen las reacciones que tienen lugar en cada paso de los esquemas (Figuras 5.2, 5.3, 5.4, 5.5 y 5.6) con sus respectivos coeficientes estequiométricos para obtener la oxidación completa de Ara o Mtl.

Rendimiento energético

Calculamos el rendimiento energético para cada una de las vías metabólicas propuestas como así también la producción de piruvato (precursor del TCA) para estudiar el potencial anaplerótico de cada vía. A los fines de comparar los potenciales energéticos de las vías, suponemos que toda la fuente de carbono es totalmente oxidada hasta CO_2 para generar ATP . También asumimos que todos los cofactores $NADH$ y $FADH_2$ producidos transfieren sus electrones al O_2 , el cual será el aceptor final de electrones. Para contabilizar los ATP generados suponemos una eficiencia en términos de P/O de 3 para el caso un $NADH$ que se oxida y de 2 para el caso de un $FADH_2$.

En el caso de Ara, puesto que la vía es única (Ara:LKDA) el balance estequiométrico es más directo (A.1.1.1). Para el caso de Mtl es más difícil puesto que, al no tener medidas acerca de la actividad enzimática, no podemos estimar cuál de las dos vías (PP o CBB) está activa. Además, si es la vía CBB la que está activa, cabe preguntarse en qué proporción carboxilasa/oxigenasa está activa la RuBisCO. Ante estas posibilidades planteamos los balances por separado para cada una de las posibilidades: PP (A.1.2.1), CBB:carboxilasa (A.1.2.2), CBB:oxigenasa:oxalato (A.1.2.3) y CBB:oxigenasa:THF (A.1.2.4). A los fines de hacer comparables ambas fuentes de carbono, expresamos las cantidades de O_2 que demandaría cada vía y el *ATP* formados por carbono de Ara o Mtl (Tabla 5.4).

Tabla 5.4.: Balances estequiométricos para cada una de las vías, expresados en términos de un carbono.

sustrato/vía	<i>ATP</i>	O_2	<i>piruvato</i>
Ara (LKDA)	5,2	1,13	0,3
Mtl (PP)	6,7	1,08	0,2
Mtl CBB (carboxilasa)	6	1,08	0,3
Mtl CBB (oxigenasa: oxalato)	3,73	1,28	0,1
Mtl CBB (oxigenasa: THF)	3,77	1,19	0,1

5.3. Diferencias en el estado redox y movilidad

5.3.1. Síntesis de polihidroxitirato

El polihidroxitirato (PHB) es un polímero compuesto de monómeros de ácido 3-hidroxitirico unidos mediante enlaces éster. Solo algunos microorganismos tienen la capacidad de sintetizarlo y en general se lleva a cabo en una serie de tres reacciones a partir de acetyl-CoA. En primer lugar la enzima 3-cetoacetyl-CoA tiolasa (PhaA) cataliza la condensación de dos moléculas de acetyl-CoA para dar aceto acetyl-CoA, luego éste es reducido a 3-hidroxitiril-CoA mediante la acetoacetyl-CoA reductasa (PhaB) y por último se polimerizan las moléculas de 3-hidroxitiril-CoA en una reacción catalizada por la polihidroxitirato sintasa (PhaC). En el caso particular de *B. diazoefficiens* la síntesis de PHB está regulada por el regulador PhaR (Blr0227) y existen cinco parálogos que codifican polihidroxitirato sintasa (*phaC1-5*) de los cuales sólo *phaC1* (bll4360) y *phaC2* (bll6073) codifican proteínas que tienen efectos en la síntesis de PHB [99].

En las proteínas analizadas observamos una expresión diferencial de las proteínas descritas para la síntesis de PHB. Tanto el regulador maestro PhaR (Blr0227) como la acetoacetyl-CoA reductasa (Bll0225) y la PHB sintasa PhaC1 (Bll4360) se encontraron en Mtl-Dif. En cambio, la PHB sintasa PhaC2 (Bll6073) y Blr0908 (similar a una PHB depolimerasa) se encontraron en Ara-Dif (Tabla 5.5).

Tabla 5.5.: Proteínas encontradas en Mtl-Dif y Ara-Dif que participan en la síntesis y degradación de PHB

Locus (<i>Rhizobase</i>)	Proteína ID (<i>Uniprot</i>)	Gen	Descripción	Nivel de expresión diferencial	
				$\log_2(\text{área}_{Mtl}/\text{área}_{Ara})$	
				Citoplasma	Membrana
blI0225	Q89XT2	<i>phaB</i>	Acetoacetyl CoA reductasa	2,7381	NS
blr0227	Q89XT0	<i>phaR</i>	Regulador transcripcional	1,6828	NS
			de la síntesis de		
			polihidroxi-butirato		
blr0908	Q89VY7		Proteína hipotética.	Solo en	-2,0085
			Similar a PHB	Ara	
			depolimerasa		
blI4360	Q89M33	<i>phaC1</i>	Poli-3-hidroxi-butirato	2,7271	NS
			sintasa		
blI6073	Q89HC1	<i>phaC2</i>	Polihidroxi-butirato sintasa	Solo en	NS
			PhaC2	Ara	
blr2885		<i>phaC4</i>			

A los fines de corroborar que tanto la síntesis como la acumulación de PHB puede ser mayor en células cultivadas en HME-Mtl respecto de las cultivadas en HME-Ara, realizamos la cuantificación de PHB en *B. diazoefficiens* provenientes de cultivos en fase exponencial de crecimiento ($DO_{500} = 1, 0$) y en fase estacionaria ($DO_{500} = 6, 7$, en HME-Mtl y $DO_{500} = 4, 8$, en HME-Ara). Estos resultados indicaron que el contenido de PHB es similar para los cultivos en HME-Mtl y HME-Ara en fase exponencial (Tabla 5.6), en tanto que en fase estacionaria el contenido de PHB es más alto para la condición de crecimiento en HME-Mtl, llegando en esta última a alcanzar una concentración de una vez y media de PHB respecto de las cultivadas en HME-Ara (Tabla 5.6).

Tabla 5.6.: Contenido de PHB ($fg\ PHB.UFC^{-1}$) en cultivos de *B. diazoefficiens* crecidos a 28 ° C con agitación hasta la fase exponencial HME-Mtl ($DO_{500} = 1$) y HME-Ara ($DO_{500} = 1$) o estacionaria HME-Mtl ($DO_{500} = 6, 7$) y HME-Ara ($DO_{500} = 4, 8$) en los medios de cultivo indicados.

	PHB ($fg\ PHB.UFC^{-1}$)	Desvío estándar
Exponencial		
HME-Mtl ($DO_{500} = 1$)	1,11	0,027
HME-Ara ($DO_{500} = 1$)	1,17	0,44
Estacionaria		
HME-Mtl ($DO_{500} = 6, 7$)	21,44	1,55
HME-Ara ($DO_{500} = 4, 8$)	13,87	0,56

5.3.2. Producción de NAD^+ y FAD

Los cofactores nicotamida adenina dinucleótido (NAD^+) y flavina adenina dinucleótido (FAD) intervienen como aceptores o dadores de electrones de pares redox en la mayoría de las reacciones de óxido-reducción. Estos cofactores se sintetizan *de novo* a partir de otros compuestos como aspartato y triptofano. Hemos detectado cuatro enzimas que intervienen en la síntesis de NAD a partir de L-aspartato sobreexpresadas en el grupo Ara-Dif, mientras que una proteína involucrada en la síntesis de FAD ha sido observada solo en Ara (Bll5472), en la fracción citoplasmática (Tabla 5.7).

Tabla 5.7.: Enzimas Mtl-Dif y Ara-Dif que tienen un rol en la producción de NAD^+ y FAD .

Locus (<i>Rhizobase</i>)	Proteína ID (<i>Uniprot</i>)	Gen	Descripción	Nivel de expresión diferencial	
				$\log_2(\text{área}_{Mtl}/\text{área}_{Ara})$ Citoplasma	Membrana
blr0430	Q89X84	<i>nadD</i>	Probable nicotinato-nucleótido adenililtransferasa	-1,3324	-
bll2541	Q89S64	<i>nadB</i>	L-aspartato oxidasa	Solo en Ara	-1,7782
bll4547	Q89LJ7	<i>nadE</i>	Glutamina-dependiente NAD sintetasa	-1,2616	-
bll7452	Q89DI7	<i>ribH2</i>	6,7-dimetil-8- ribitillumazine sintasa 2	Solo en Ara	-
blr8123	Q89BM5		Familia de proteínas MutT/nudix	-1,3450	NS

5.3.3. Movilidad celular y quimiotaxis

Por último destacaremos las proteínas involucradas en quimiotaxis y movilidad. De acuerdo a las observaciones previas ([24] y Figura 4.2) encontramos las flagelinas estructurales del flagelo lateral (LafA1 y LafA2, Bll6866 y Bll6865, respectivamente) y la proteína estructural del gancho del flagelo lateral (FlgE_J, Bll6858) solo en el grupo Ara-Dif. Aunque no se pudieron detectar la mayoría de los otros componentes del flagelo lateral, podemos sugerir que éstos han sido sintetizadas pues la secreción de las flagelinas requiere que al menos el aparato de exportación y el cuerpo basal estén ensamblados [33].

Además, se detectaron en Ara-Dif a la mayoría de las proteínas codificadas en uno de los cúmulos génicos (*clusters*) de quimiotaxis. Estas proteínas son el sensor histidina quinasa de un sistema de dos componentes (Blr2343), CheWII (Blr2344) y CheW (Blr2346) y las proteínas metil-aceptoras (Blr2345 y Blr2347) y además el regulador de respuesta (Blr2349) cuyos *loci* son parte de un cúmulo génico funcional en quimiotaxis [29]. La Blr2931, que también fue detectada en Ara-Dif, es una supuesta proteína aceptora de metilos implicada también en quimiotaxis

(Tabla 5.8).

Tabla 5.8.: Proteínas Mtl-Dif y Ara-Dif que tienen un rol en la movilidad celular y la quimiotaxis

Locus (<i>Rhizobase</i>)	Proteína ID (<i>Uniprot</i>)	Gen	Descripción	Nivel de expresión diferencial $\log_2(\text{área}_{Mtl}/\text{área}_{Ara})$	
				Citoplasma	Membrana
blr2343	Q89SQ7	<i>cheA</i>	Sensor de dos componentes histidina kinasa. Quimiotaxis	NS	-1,8082
blr2344	Q89SQ6	<i>cheWII</i>	Proteína CheWII	Solo en Ara	NS
blr2345	Q89SQ5	<i>mcpK</i>	Proteína metil-acceptora de quimiotaxis	NS	-1,8623
blr2346	Q89SQ4	<i>cheW</i>	Proteína CheW	Solo en Ara	-
blr2347	Q89SQ3		Proteína metil-acceptora de quimiotaxis	NS	-1,5919
blr2349	Q89SQ1	<i>cheB</i>	Regulador de respuesta. Proteína glutamato metilesterasa.	-	Solo en Ara
blr2931	Q89R41		Supuesta proteína de quimiotaxis metil-acceptora	-	Solo en Ara
bll6858	Q89F43	<i>flgE_L</i>	Proteína del gancho del flagelo lateral	Solo en Ara	-
bll6865	Q89F36	<i>lafA2</i>	Flagelina lateral 2	Solo en Ara	Solo en Ara
bll6866	Q89F35	<i>lafA1</i>	Flagelina lateral 1	Solo en Ara	Solo en Ara

Luego de estudiar el perfil de proteínas de *B. diazoefficiens* cultivada en HME-Ara o HME-Mtl podemos resaltar algunos aspectos de los resultados encontrados.

Hemos podido reconstruir las vías metabólicas para ambas fuentes de carbono. Para la vía de Ara fueron corroboradas las proteínas que ya se habían identificado [90, 62]. Además propusimos que el glicerato originado a partir de glioxilato es convertido en piruvato, el cual sigue su degradación en el TCA. Al igual que en estos trabajos tampoco fue identificada la posible glioxilato oxidoreductasa que catalizaría la oxidación de glioxilato a oxalato. En tanto que para Mtl reafirmamos la inactividad de las vías EMP y ED y en lugar de estas encontramos activas la vía PP, la cual estaba propuesta como activa en *B. diazoefficiens* para el metabolismo de las hexosas [115] y además el ciclo CBB, el cual no había sido detectado para el metabolismo de Mtl.

De acuerdo a los balances estequiométricos, el rendimiento potencial en *ATP* es como máximo 1,25 veces más alto para el catabolismo de Mtl respecto del de Ara, mientras que el consumo de oxígeno potencial resulta bastante similar para el catabolismo de ambas. Si bien los rendimientos en *ATP* de la vía CBB(oxigenasa:oxalato) y CBB(oxigenasa:THF) resultan más bajas, desconocemos cuán activa estaría cada una de las vías; considerando un promedio de actividad de cada una, el rendimiento en *ATP/C – mol* de Mtl resulta muy similar al de Ara. En cuanto a la producción de piruvato, esta es más alta para Ara, lo cual indica un cierto potencial anaplerótico respecto de Mtl.

En general la producción de PHB se incrementa bajo condiciones de crecimiento desbalanceadas, especialmente cuando la densidad de bacterias es alta (lo cual implicaría una acumulación de equivalentes reducidos) y la fuente de carbono se encuentra en exceso. Hemos observado una sobreexpresión del regulador *phaR* y de las enzimas acetoacetyl-CoA reductasa y PHB sintasa *phaC1* en HME-Mtl. Mientras que en HME-Ara se encuentran sobreexpresadas la PHB sintasa *phaC2* y la Blr0908 (similar a una PHB depolimerasa). La PHB sintasa es activa en forma de dímero, de los parálogos estudiados, *PhaC1* y *PhaC2* son los más relevantes, *PhaC1* es activa, mientras que *PhaC2* no lo es. Probablemente la abundancia de los posibles dímeros: *PhaC1/PhaC1*, *PhaC1/PhaC2* y *PhaC2/PhaC2* determinaría la actividad de síntesis de PHB [97, 99]. Esta observación se condice con la mayor cantidad de PHB acumulado en la fase de crecimiento estacionaria para *B. diazoefficiens* cultivada en HME-Mtl respecto de HME-Ara (Tabla 5.6). Esto último sugiere, teniendo en cuenta el valor más bajo de q_{O_2max} obtenido en HME-Mtl (Tabla 4.1) que el excedente de poder reductor desembocaría en la síntesis de PHB.

En HME-Ara observamos una mayor estimulación de las proteínas que intervienen en la síntesis *de novo* de los cofactores *NAD* y *FAD* (Tabla 5.7). Esto indicaría que hay una producción mayor de aceptores/dadores de electrones en las células crecidas en HME-Ara, lo que permitiría un mayor flujo de electrones a través de la CTE. Sin embargo, no observamos una expresión diferencial de las proteínas de la CTE identificadas, lo que nos sugiere que la mayor actividad de la CTE sería consecuencia de una mayor disponibilidad de cofactores antes que por una diferencia en la abundancia de las proteínas de la CTE.

Por otra parte, las diferencias en la expresión de proteínas implicadas en quimiotaxis es algo que no esperaríamos *a priori*, puesto que el flagelo lateral no parecería responder a señales de quimiotaxis y Ara no es un quimioatrayente fuerte para esta cepa [96].

6. Caracterización genotípica y fenotípica del mutante en el gen *cbbL* de *B. diazoefficiens*

Como se describió en el Capítulo 5 dentro del grupo de proteínas de *B. diazoefficiens* diferencialmente expresadas en HME-Mtl encontramos las enzimas fosforibuloquinasa (*cbbP*) y RuBisCO (*cbbL* y *cbbS*), las cuales son características del ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB). En particular, la RuBisCO es capaz de tener una actividad carboxilasa mediante la cual cataliza la fijación de CO_2 atmosférico [51]. La RuBisCO se compone de dos subunidades: CbbL y CbbS. La subunidad CbbL, de mayor tamaño molecular, es la subunidad catalítica [68]. Por otro lado, mutaciones en *cbbS*, que codifica la subunidad pequeña, alteran la selectividad por el CO_2 y el número de recambio [100].

En *B. diazoefficiens* se ha reportado la actividad de esta enzima en condiciones de crecimiento autotróficas y microaeróbicas, en las cuales la fuente de carbono proviene de la fijación de CO_2 , el dador de electrones es el H_2 , y la concentración de O_2 es de 1 % [36, 44]. Siendo que las proteínas estudiadas en el capítulo 5 provienen de cultivos de *B. diazoefficiens* realizados en condiciones aeróbicas y en un medio de cultivo rico (en el cual dispone de Mtl como fuente de carbono en abundancia) nos resultó sorprendente que estas proteínas, exclusivas del ciclo CBB, se encontraran fuertemente inducidas allí. Nuestros cálculos estequiométricos sugirieron la posibilidad de que las bacterias cultivadas en HME-Mtl utilizaran en parte el CO_2 como fuente de carbono, tanto suponiendo un 100 % de actividad carboxilasa en la RuBisCO, como un 50 %. Sin embargo, resulta intrigante la posibilidad de que estas bacterias necesiten fijar CO_2 en presencia de una fuente de carbono orgánico apropiada.

Para estudiar el posible rol de la RuBisCO durante el crecimiento de *B. diazoefficiens* en medios de cultivo suplementados con Mtl como fuente de carbono, se construyó un mutante que consistió en la delección, en la cepa salvaje USDA 110, del gen que codifica la subunidad catalítica de la RuBisCO (*cbbL*). La cepa producto de esta mutación se denominó USDA 110 $\Delta cbbL$.

6.1. Construcción del mutante en el gen *cbbL*

Para obtener el mutante en el gen *cbbL* utilizamos una técnica de mutagénesis por doble recombinación homóloga mediante la cual eliminamos una parte de la región codificante de *cbbL* con el fin de producir una delección que no afecte el marco de lectura ni provoque efectos polares sobre la expresión de genes contiguos. Los pasos seguidos se detallan a continuación.

6.1.1. Construcción del plásmido

Seleccionamos la secuencia del gen *cbbL* a ser deletionada, para lo cual: seleccionamos un fragmento de 1092 pb (Figura 6.1). En base a esto diseñamos los cebadores específicos FwUp_RBC, RvUp_RBC, FwDw_RBC y RvDw_RBC (Tabla 2.2) para realizar la construcción. Combinamos estos cebadores para amplificar por PCR, utilizando un molde de ADN de USDA 110, el fragmento flanqueado por FwUp_RBC y RvUp_RBC (PCR 1) y el flanqueado por FwDw_RBC y RvDw_RBC (PCR 2). Los fragmentos obtenidos, que denominamos Up_RBC y Dw_RBC, flanquean al fragmento a ser deletionado (Figura 6.1) en el mutante $\Delta cbbL$ que nos proponemos obtener. Estos fragmentos seguirán presentes en el genoma deletionándose todo lo que está entre ellos. Además, los cebadores han sido diseñados de tal forma que ambos fragmentos poseen una secuencia complementaria en su extremo, la cual les permite unirse en tándem, utilizando los cebadores FwUp_RBC y RvDw_RBC (PCR 3) y como molde los fragmentos Up_RBC y Dw_RBC purificados. Así, utilizamos este molde para amplificar por PCR el fragmento UpDw_RBC. Este fragmento purificado será luego insertado en el plásmido suicida pK18*mobsacB* (Figura 6.1).

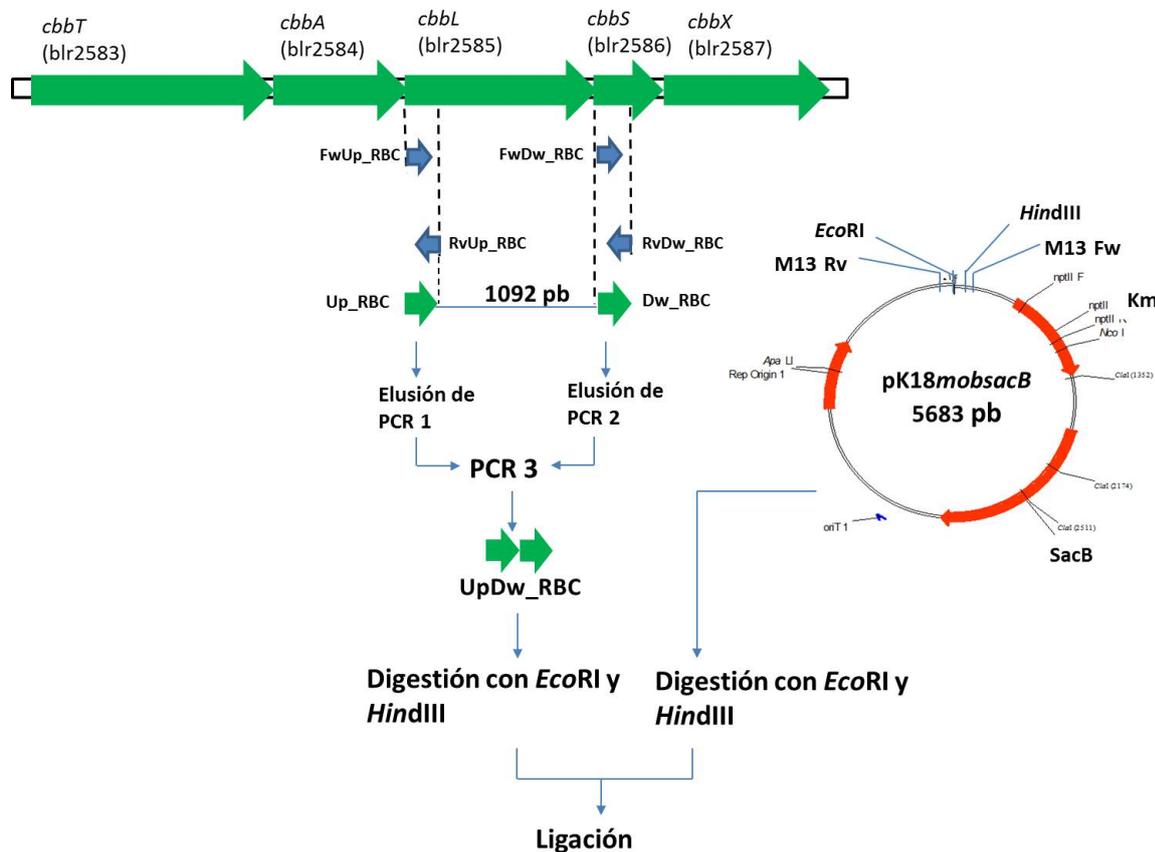


Figura 6.1.: Esquema de clonado para la construcción del plásmido. Los fragmentos Up_RBC y Dw_RBC flanquean la región a deletionar. Estos dos fragmentos se unen para dar el fragmento UpDw_RBC el cual se insertará en el plásmido pK18*mobsacB*.

Para esto realizamos primero la digestión del plásmido pK18*mobsacB* y del inserto UpDw_RBC con las enzimas *EcoRI* y *Hind-III* a 37 °C. De esta manera,

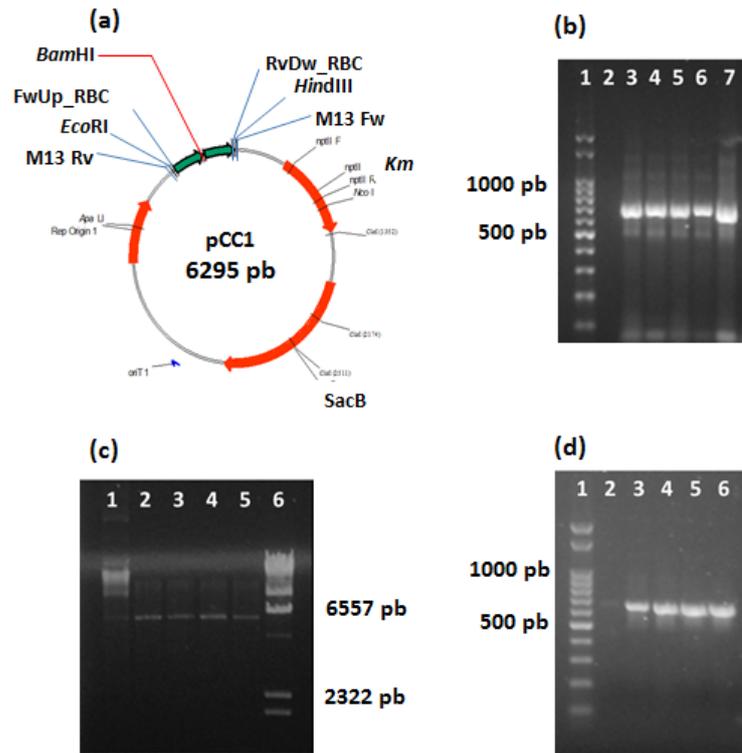


Figura 6.2.: Chequeos de la construcción del plásmido pCC1 a partir del *pk18mobsacB* y el inserto *UpDw_RBC* realizados sobre el ADN plasmídico de los clones de *DH5 α* transformadas. (a) plásmido pCC1. (b) Resultado de la PCR realizada con los cebadores M13 Fw y M13 Rv: Calle 1: marcador de peso molecular L100, calle 2: vacía, Calle 3 a 7 resultado de los clones 1 a 5. (c) Resultado de la digestión con la enzima *Bam*HI: Calle 1: ADN plasmídico del clon 3 sin digerir, Calles 2 a 5, resultado de los clones 2 a 5, Calle 6: Marcador de peso molecular λ *Hind*III. (d) Resultado de la PCR 3: Calle 1: marcador de peso molecular L100, calle 2 a 6, resultado de los clones 1 a 5.

los sitios de corte *Eco*RI y *Hind*-III, tanto en el plásmido como en el inserto, quedan habilitados para ligarse. Luego de digeridos, ligamos el plásmido con el fragmento *UpDw_RBC*. El nuevo plásmido ligado, que nombramos pCC1 (Figura 6.2 a), lo transformamos, previa desalinización, a células electrocompetentes de *E. coli DH5 α* . Estas células se seleccionaron por resistencia a Km y actividad β -galactosidasa. De esta manera seleccionamos aquellas transformantes que contuvieran el plásmido ligado correctamente con el fragmento en el sitio de inserción donde el plásmido posee el gen *lacZ*. Extrajimos el ADN plasmídico de algunos de los clones seleccionados y como primera prueba realizamos sobre éstos una PCR con los cebadores M13Fw y M13Rv, externos al inserto (Figura 6.2 a). Por lo tanto, esperaríamos un fragmento amplificado de 679 pb. Este chequeo nos sirvió para identificar que el plásmido pCC1 efectivamente se replicó en las *E. coli DH5 α* . Puesto que esta prueba resultó positiva para los clones estudiados (Figura 6.2 b), continuamos con la purificación del ADN plasmídico.

Realizamos chequeos por digestión y PCR sobre los plásmidos purificados. El inserto UpDw_RBC se diseñó con un sitio de corte para la enzima *Bam*-*HI* entre medio de los fragmentos Up_RBC y Dw_RBC (Figura 6.2 a); por lo tanto, al digerir con esta enzima obtendríamos un plásmido linealizado de 6295 pb (Figura 6.2 c). Además, realizamos un chequeo por PCR con los cebadores FwUp_RBC y RvDw_RBC (PCR 3) para amplificar el inserto UpDw_RBC del cual esperaríamos un fragmento de 612 pb (Figura 6.2 d).

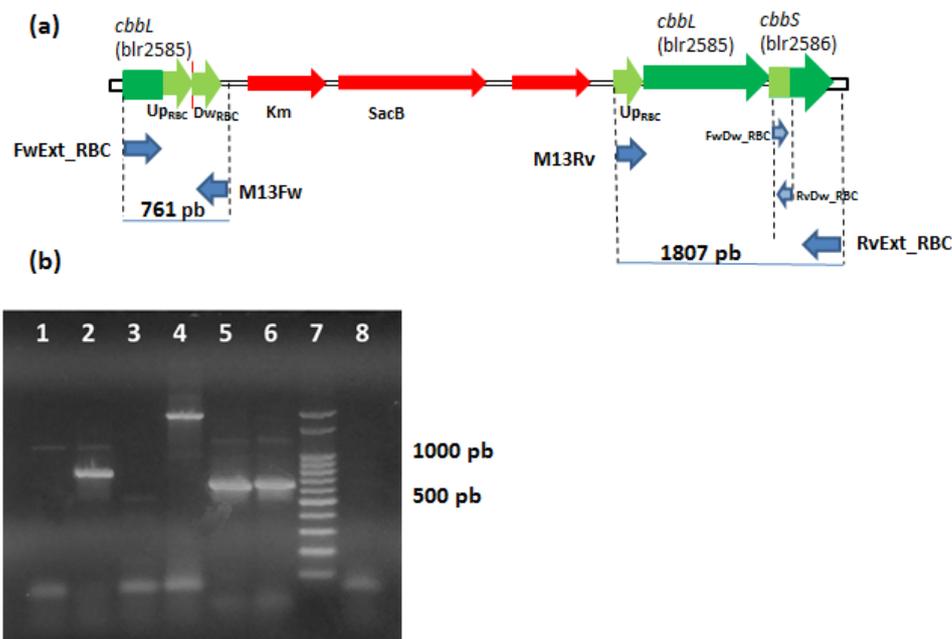


Figura 6.3.: Mutante simple: (a) Esquema de cómo quedó inserto el plásmido dentro del gen *cbbL* de *B. diazoefficiens* USDA 110. Se muestra qué fragmentos amplificarían los cebadores específicos. (b) Gel de agarosa: la amplificación de estos genes demuestra que el plásmido se ha insertado por el fragmento Up_RBC: Calles 1 y 2: resultado de la PCR Fw sobre los clones 1 y 3, calles 3 y 4: resultado de la PCR Rv sobre los clones 1 y 3, calles 5 y 6: resultado de la PCR 3 sobre los clones 1 y 3, calle 7: marcador de peso molecular L100, calle 8: control negativo.

6.1.2. Conjugación y obtención del mutante doble

Transformamos el plásmido pCC1 purificado a células electrocompetentes de *E. coli* S17-1 para luego conyugarlas con USDA 110. Al conyugar las células, USDA 110 puede adquirir el plásmido pCC1 pero no lo puede replicar, ya que este plásmido no posee un origen de replicación reconocible por *B. diazoefficiens*. Así, al seleccionar los *B. diazoefficiens* transconjugantes por su resistencia a Km, estaremos obteniendo aquellos clones donde se espera que el plásmido haya sido insertado en su cromosoma mediante un entrecruzamiento simple por el sitio donde se encuentra o bien el fragmento Up_RBC (recombinación Up_RBC), o bien el fragmento Dw_RBC (recombinación Dw_RBC). En la Figura 6.3 (a) esquematizamos cómo debería quedar el clon de USDA 110 como resultado de la recombinación Up_RBC, al que llamaremos mutante simple. Para corroborar la in-

serción realizamos amplificaciones por PCR con los cebadores específicos M13Fw y FwExt_RBC (PCR Fw) en un caso y los cebadores M13Rv y RvExt_RBC (PCR Rv) en otro caso. Los cebadores FwExt_RBC y RvExt_RBC fueron diseñados específicamente para amplificar desde una región externa a los fragmentos Up_RBC y Dw_RBC. En el caso de producirse una recombinación Up_RBC, los cebadores de la PCR Fw amplificarían 716 pb y los de la PCR Rv 1807 pb, mientras que si se produce la recombinación Dw_RBC, estos valores serían de 1830 pb y 715 pb respectivamente (Figura 6.3 a). El resultado de estas amplificaciones (Figura 6.3 b) nos muestra que en uno de los clones (clon 3) el plásmido se ha recombinado en USDA 110 a través del fragmento Up_RBC puesto que la corrida del producto de la PCR Fw muestra una banda entre las 700 y 800 pb y la del proveniente de la PCR Rv muestra una banda entre las 1500 y 2000 pb. También realizamos un control con los cebadores de la PCR 3.

Para finalizar la delección fue necesario inducir una doble recombinación. Con este objetivo, el mutante simple se sembró en placas de Petri con medio YEM suplementado con sacarosa 10% p/v. El gen *sacB* del plásmido pCC1 codifica una enzima que convierte a la sacarosa en un metabolito tóxico para los clones que lo poseen. Por lo tanto, al sembrar los transconjugantes en un medio con sacarosa se puede seleccionar en contra de las bacterias que no fueron capaces de perder el plásmido por doble recombinación. Esta recombinación puede darse por el fragmento Up_RBC devolviendo la forma salvaje o por el Dw_RBC produciendo la delección deseada. En la Figura 6.4 (a) se muestra un esquema de cómo quedarían los genes para los clones de USDA 110 en los que se ha dado la doble recombinación por el Dw, en los que se deleccionaría la mayor parte de *cbbL*.

Los posibles clones recombinantes se seleccionaron en placas réplicas suplementadas o bien con Km y Cm, o bien con Cm. Así, los clones seleccionados como resistentes a Cm (resistencia intrínseca de *B. diazoefficiens*) y sensibles a Km (debido a que supuestamente perdieron el plásmido que los hacía resistentes a Km) se chequearon mediante PCR utilizando los cebadores específicos FwExt y RvExt (PCR Ext). En el caso de que se produjera la delección, los cebadores externos amplificarían un fragmento de 818 pb (Figura 6.4 a), mientras que en la cepa salvaje éstos amplificarían un fragmento de 1889 pb. También realizamos la PCR 3 con los clones candidatos, en este caso esperábamos amplificar 612 pb para el mutante y aproximadamente 2000 pb para la salvaje. El resultado de estas pruebas (Figura 6.4 b) mostraron que en uno de los clones (clon 9) se había producido la doble recombinación por el Dw_RBC.

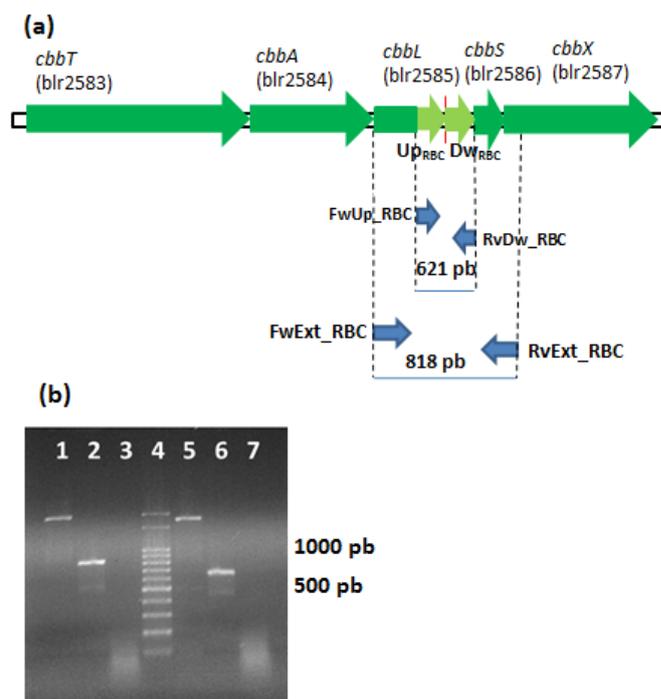


Figura 6.4.: (a) Esquema del genotipo esperado de $\Delta cbbL$, donde se ha intentado deletar la mayor parte *cbbL*. (b) Gel de agarosa para chequear la doble recombinación: calle 1 a 3: resultado de la PCR Ext sobre la cepa salvaje y sobre los clones 9 y 3 del posible mutante doble, calle 4: marcador de peso molecular L100, calle 5 a 7: resultado de la PCR 3 sobre la cepa salvaje y sobre los clones 9 y 3 del posible mutante doble.

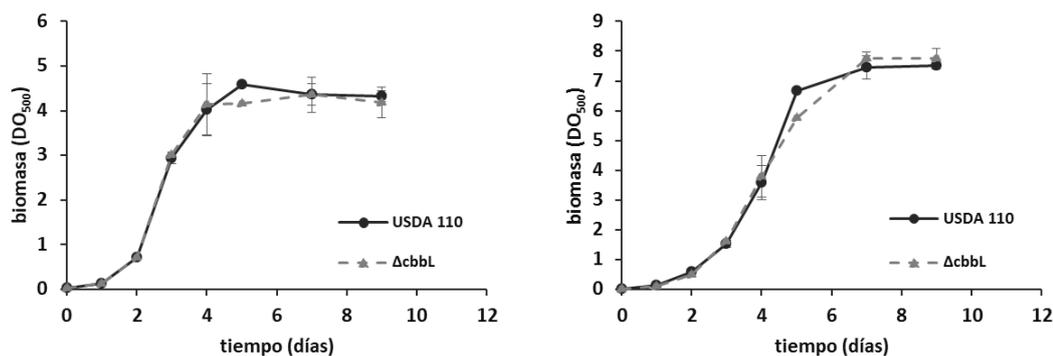
Se extrajo el ADN del clon 9, se amplificó por PCR con los cebadores FwExt_RBC y RvExt_RBC (PCR Ext) y se envió a secuenciar (Macrogen Inc., Corea del Sur). El resultado se muestra en las Figuras A.1, A.2 y A.3 (Ver Apéndice A.2.1) donde puede observarse que efectivamente se deletó gran parte de *cbbL* y que probablemente se removió también la secuencia de unión del ribosoma (RBS) de *cbbS*. Por lo tanto, podríamos esperar que la subunidad CbbL se exprese como una proteína truncada y que posiblemente CbbS no pueda sintetizarse. En cualquier caso, nuestra mutante (a la que llamaremos USDA 110 $\Delta cbbL$ o simplemente $\Delta cbbL$) no debería poseer actividad RuBisCO.

6.2. Caracterización fenotípica

Para estudiar los posibles efectos de la mutación se realizaron algunos experimentos preliminares con USDA 110 $\Delta cbbL$ en comparación con la cepa salvaje USDA 110. Como primera aproximación se estudió el crecimiento en distintos medios y su comportamiento simbiótico, y como consecuencia de estos estudios, observamos diferencias en la morfología celular y la competitividad para nodular.

6.2.1. Cinéticas de crecimiento y morfología

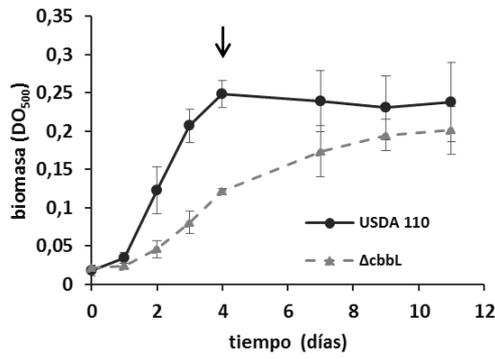
La delección de *cbbL* no tuvo efectos sobre el crecimiento en HME-Ara y HME-Mtl. En ambos medios la duración de la fase de retardo, el tiempo de duplicación y la biomasa total alcanzada fueron similares entre la cepa mutante $\Delta cbbL$ y la salvaje USDA 110. Como se había observado anteriormente con la cepa salvaje y la mutante USDA 110 *lafR::Km*, la biomasa total alcanzada por ambas cepas fue menor en HME-Ara que en HME-Mtl (Figura 6.5, obsérvese la diferencia de escala en los ejes de las ordenadas).



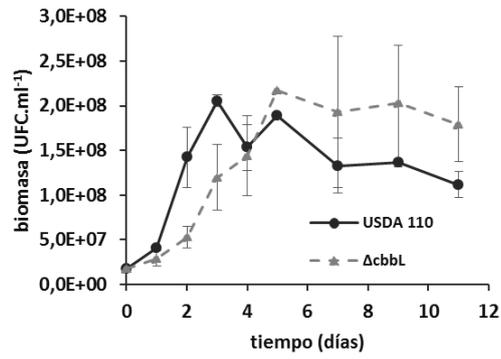
(a) USDA 110 y $\Delta cbbL$ en medio HME-Ara (b) USDA 110 y $\Delta cbbL$ en medio HME-Mtl

Figura 6.5.: Cinética de crecimiento de la cepa salvaje USDA 110 (negro) comparada con la mutante $\Delta cbbL$ (gris). El crecimiento se midió como biomasa total (DO_{500}) en dos medios ricos: HME-Ara (a) y HME-Mtl (b). Las barras de error representan el desvío estándar, donde están ausentes significa que son más chicas que el símbolo.

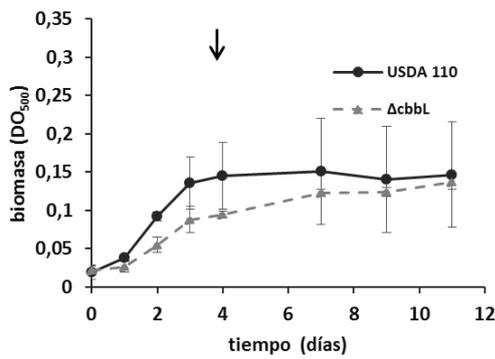
Se ha reportado que otra mutación en *cbbL* produce alteraciones en el crecimiento de *B. diazoefficiens* cuando utiliza tiosulfato ($[S_2O_3]^{-2}$) como dador de electrones en atmósfera aeróbica [76]. Teniendo en cuenta esta información realizamos curvas de crecimiento de la cepa salvaje y de la mutante $\Delta cbbL$ en el medio de cultivo de Taylor utilizado por Masuda y col. [76] para el crecimiento en $[S_2O_3]^{-2}$ como dador de electrones, como así también en este mismo medio suplementado con Mtl 0,1% (p/v). Para estos ensayos partimos inicialmente de cultivos realizados en HME-Mtl.



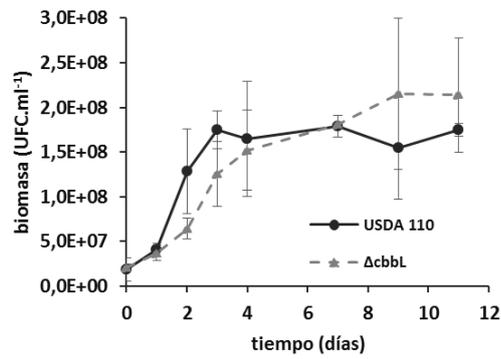
(a) Taylor Mtl



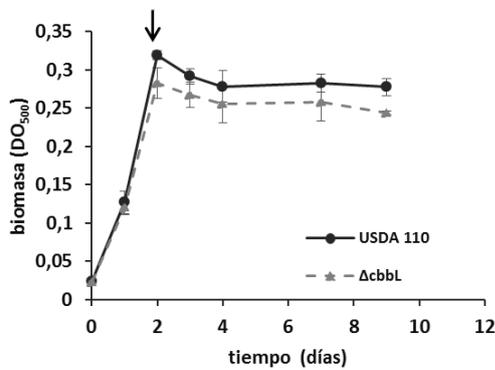
(b) Taylor Mtl



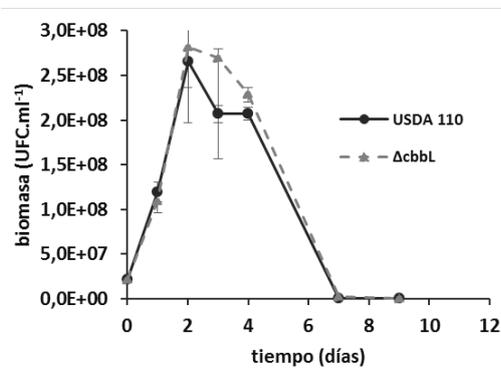
(c) Taylor



(d) Taylor



(e) Taylor Ara



(f) Taylor Ara

Figura 6.6.: Cinética de crecimiento de la cepa salvaje USDA 110 (negro) comparada con la mutante $\Delta cbbL$ (gris). El crecimiento se midió como biomasa total (DO_{500}) y unidades formadoras de colonias ($UFC.ml^{-1}$) en los medios: Taylor-Mtl (a) y (b), Taylor (c) y (d) y Taylor-Ara (e) y (f). Las barras de error representan el desvío estándar, donde están ausentes significa que son más chicas que el símbolo.

En estos medios, el aumento de biomasa total de la mutante $\Delta cbbL$ se vio

retrasado respecto de la cepa salvaje USDA 110 durante las primeras horas de cultivo. Sin embargo, luego de un tiempo prolongado ambas cepas llegaron a una DO similar (Figura 6.6 a y c).

Llamativamente, este comportamiento no se observó cuando registramos el crecimiento en términos de UFC, pues el número de $UFC.ml^{-1}$ de la mutante USDA 110 $\Delta cbbL$ alcanzó al de la cepa salvaje, y luego de ese momento incluso lo superó levemente hacia el final del experimento (Figura 6.6 b y d).

También realizamos estas curvas de crecimiento para el mismo medio pero utilizando Ara 0,1 % p/v como fuente de carbono (medio Taylor-Ara), partiendo de cultivos realizados en HME-Ara. Esta comparación nos permitiría pensar si los efectos observados en las Figuras (6.6 a y b) se deben a la falta de actividad de CbbL, puesto que en Ara *B. diazoefficiens* no la induce. Para esta condición no observamos diferencias en las cinéticas de crecimiento de $\Delta cbbL$ respecto de USDA 110, aunque sí una pronunciada mortandad de ambas cepas luego de entrar en la fase estacionaria de crecimiento (Figura 6.6 e y f).

Puesto que la diferencia en el número de viables no correlacionó con los cambios en la DO en Taylor y Taylor-Mtl, nos preguntamos si estas diferencias podrían deberse a diferencias en el tamaño celular. En efecto, si hacia el final de la fase exponencial las células de la mutante fueran más pequeñas que las de la salvaje, se observaría una DO similar entre ambas cepas, con mayor número de $UFC.ml^{-1}$ en la mutante. Por otro lado, esta diferencia de tamaño no debería observarse en Taylor-Ara, ya que en este medio el progreso de la DO y el de las viables se correlacionaron durante las primeras 50 horas, mientras que después la DO se mantuvo constante y las viables disminuyeron en ambas cepas.

Para chequear esta hipótesis estudiamos el tamaño de las células de ambas cepas para el momento correspondiente a la finalización de la fase de crecimiento exponencial (4 días en Taylor-Mtl y Taylor, y 2 días en Taylor-Ara, indicado con una flecha en la Figura 6.6). En estos tiempos, en Taylor-Mtl y Taylor la biomasa total de la cepa salvaje es significativamente mayor que la de la mutante USDA 110 $\Delta cbbL$, mientras que el número de viables por unidad de volumen se equipara; en cambio, en Taylor-Ara ambos parámetros coinciden para las dos cepas.

Como resultado, observamos que el tamaño de las células de la mutante USDA 110 $\Delta cbbL$ se vio afectado en los medios Taylor-Mtl y Taylor (Figura 6.7), mientras que esta diferencia no se presentó en las células cultivadas en Taylor-Ara (Figura 6.6), indicando que la mutación $\Delta cbbL$ afectó un requerimiento de Ru-BisCO en Mtl que tuvo como consecuencia una disminución del tamaño celular.

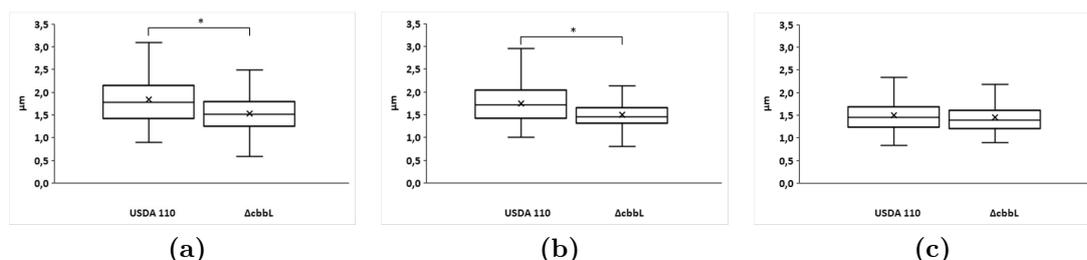


Figura 6.7.: Diagrama de la distribución en cuartiles y valor medio (\times) de las longitudes de las células en μm de las cepa salvaje (USDA 110) y la mutante ($\Delta cbbL$) extraídas al final de cada fase exponencial de los cultivos de estas cepas realizados en el medio de cultivo (a) Taylor Mtl, (b) Taylor y (c) Taylor-Ara. En todos los casos los promedios se realizaron utilizando entre 250 y 300 células. Los datos experimentales se analizaron estadísticamente mediante ANOVA. Las medias de las muestras resultaron significativamente diferentes entre USDA 110 y $\Delta cbbL$ ($p < 0,05$) para los casos (a) y (b).

6.2.2. Nodulación en raíces de soja

Puesto que la enzima RuBisCO puede actuar como carboxilasa, la actividad de esta enzima podría ser importante en el interior del suelo, donde la atmósfera edáfica posee una concentración de CO_2 de 10-50 veces la del aire [66]. En estas condiciones la mutante USDA 110 $\Delta cbbL$ podría verse desfavorecida. Para evaluar esta posibilidad realizamos un ensayo de nodulación en plantas de soja con la cepa salvaje y la mutante USDA 110 $\Delta cbbL$ ambas crecidas en HME-Mtl. Se eligió esta condición de crecimiento para que se pudieran manifestar los efectos de la mutación, si los hubiera, sin que los cultivos celulares tengan diferencias en el crecimiento. Para el ensayo colocamos las plantas en macetas provistas de perlita y arena, las regamos con solución mineral libre de nitrógeno, y las inoculamos con la cepa USDA 110 $\Delta cbbL$ para evaluar su capacidad de nodular las raíces. La cepa USDA 110 $\Delta cbbL$ noduló perfectamente las plantas de soja, no presentando diferencias en la morfología y color de los nódulos.

En paralelo, otras macetas fueron inoculadas con una proporción 1:1 de USDA 110 $\Delta cbbL$ respecto de la cepa salvaje *B. diazoefficiens* LP 3004. La cepa *B. diazoefficiens* LP 3004 es resistente a Sm por lo que nos permitió comparar el número de nódulos ocupados con una u otra cepa al recuperar los nódulos en cajas réplicas. Para hacer comparables los efectos, es decir, que la eficiencia para ocupar nódulos no sea un efecto secundario de LP 3004, además realizamos el mismo ensayo comparativo de la competición de las cepas USDA 110 y LP 3004. Como resultado de este experimento observamos que la ocupación de USDA 110 $\Delta cbbL$ fue mucho menor respecto de la salvaje (Figura 6.8).

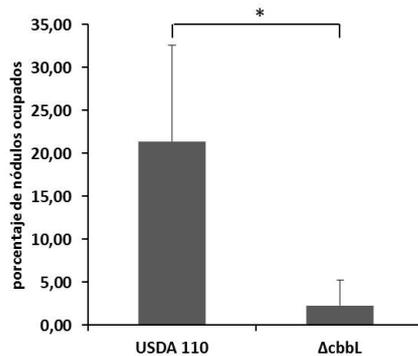


Figura 6.8.: Competición por la ocupación de nódulos. La cepa salvaje (USDA 110) y la mutante ($\Delta cbbL$) fueron coinoculadas con su parental resistente a estreptomicina. Porcentaje de USDA 110 y $\Delta cbbL$ recuperados de los nódulos de las plantas. Los datos experimentales se analizaron estadísticamente mediante el teste de Fisher. Los porcentajes recuperados fueron significativamente diferentes entre USDA 110 y $\Delta cbbL$ ($p < 0,05$)

En el capítulo anterior hemos observado una fuerte inducción de la enzima RuBisCO en *B. diazoefficiens* cuando se la cultiva en HME-Mtl. Esta enzima es capaz de estar activa como carboxilasa, y su actividad se asocia más bien a condiciones de crecimiento autotróficas. Para estudiar los efectos de esta enzima en el crecimiento de *B. diazoefficiens* en medios suplementados con Mtl obtuvimos un mutante delecional en la subunidad catalítica de esta enzima $\Delta cbbL$.

En los ensayos practicados hasta el momento, se puede observar que en los medios ricos como HME-Mtl y HME-Ara no hay una diferencia de crecimiento de la mutante respecto de la cepa salvaje USDA 110. Mientras que sí parece haber una diferencia en el crecimiento y la morfología de las células entre estas cepas cuando son crecidas utilizando $[SO_3^{-2}]$ suplementado con Mtl. Este comportamiento no es observado cuando se suplementa el medio con Ara.

El porcentaje de nódulos ocupados por la mutante respecto de la cepa salvaje resultó ser menor en el ensayo preliminar de nodulación realizado en semillas de soja (Figura 6.8). Si bien no puede descartarse una fijación de CO_2 a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos en reversa (rTCA), si en la rizósfera hay más CO_2 , podría ocurrir que la cepa salvaje tenga ventaja sobre la mutante USDA $\Delta cbbL$. Aunque no descartaríamos que este efecto sea indirecto si hay una síntesis diferenciada de exopolisacárido (EPS) [98].

Resulta interesante continuar los estudios de los efectos de esta mutación en la simbiosis de *B. diazoefficiens*-soja. No obstante, sería necesario realizar una complementación con el gen *cbbL* salvaje para corroborar que estos efectos efectivamente se deben a la deleción de dicho gen.

7. Discusión general

Bradyrhizobium diazoefficiens es uno de los rizobios que se utilizan como biofertilizantes para soja, pero a menudo sus efectos sobre el rendimiento del cultivo son escasos. Se ha observado que la respuesta del rendimiento a la biofertilización puede aumentarse si se mejora la capacidad de *B. diazoefficiens* para dispersarse en el suelo y colonizar las raíces [73], lo que nos motivó a avanzar en el conocimiento de la movilidad de esta importante especie bacteriana.

B. diazoefficiens se caracteriza por expresar su sistema de flagelos laterales en medio líquido según la fuente de carbono utilizada durante el crecimiento. Dos fuentes de carbono comúnmente empleadas para el crecimiento de estas bacterias son Mtl y Ara. Si las bacterias crecen con Mtl como fuente de carbono, no inducen los flagelos laterales, mientras que con Ara sí lo hacen. No está claro cuál es la señal que induce la expresión de los flagelos laterales en Ara o la reprime en Mtl, pero en vista de que los flagelos laterales parecen ser movidos por el Δp derivado de la CTE a través de la oxidación de las fuentes de carbono, es posible que la disponibilidad de energía en la célula esté en conexión con la regulación de la expresión de estos flagelos.

En el desarrollo de esta Tesis nos propusimos contribuir al conocimiento de la energética de la movilidad de *B. diazoefficiens* desde un aspecto general a través de modelos que vinculen la actividad de la CTE y la fosforilación oxidativa con el Δp . Este estudio fue complementado con experimentos de laboratorio donde pudimos establecer los parámetros de crecimiento y las vías catabólicas principales de *B. diazoefficiens* en medio líquido utilizando Mtl o Ara como fuentes de carbono. En adición, estudiamos el ciclo de CBB expresado diferencialmente en el catabolismo de Mtl.

Consumo de energía por los flagelos laterales en medio líquido

Los parámetros de crecimiento de *B. diazoefficiens* en medio líquido demostraron que esta bacteria posee un q_{O_2max} tres veces mayor cuando es cultivada en HME-Ara que cuando lo es en HME-Mtl. Esto podría ser explicado por el hecho de que las bacterias crecidas en HME-Ara poseen flagelos laterales mientras que en HME-Mtl no. Dado que el flagelo lateral es impulsado aparentemente por el mismo Δp que el utilizado para la síntesis de *ATP* [58], la síntesis y la rotación de los flagelos en HME-Ara quizás "compita" por el Δp con la síntesis de *ATP*. Esto fue observado en el modelo matemático del Capítulo 3, indicando así que la bacteria requeriría un mayor q_{O_2max} en HME-Ara respecto de HME-Mtl para mantener la misma μ_{max} , tal como se observa en las cinéticas de crecimiento del Capítulo 4. Alternativamente, dado que Ara y Mtl se catabolizan por vías metabólicas diferentes, éstas podrían ser menos eficientes para producir *ATP* en Ara respecto de Mtl, por lo cual en Ara debería producir más *ATP* por unidad de tiempo. De acuerdo a los cálculos estequiométricos realizados en el Capítulo 5, la producción teórica máxima de *ATP* respecto de cada sustrato no parece diferir, lo que refuerza la hipótesis de que el mayor q_{O_2max} en Ara respecto de Mtl

es debido a la producción y funcionamiento de los flagelos laterales. De acuerdo con esta hipótesis, observamos que la mutante *lafR::Km* posee valores similares de q_{O_2max} en HME-Ara y HME-Mtl y desplaza a la cepa salvaje cuando se las cultivan juntas (Tabla 4.1 y Figura 4.4).

Por otro lado, a partir de los resultados del modelo matemático propuesto para estudiar la contribución del Δp al movimiento de los flagelos y a la síntesis de *ATP*, pudimos ver que la capacidad de las bacterias para sintetizar flagelos lleva a un mayor consumo de O_2 sin que esto implique una síntesis de *ATP* mayor, lo cual responde a la regulación del cociente $NADH/NAD^+$. Si bien los flagelos laterales parecen actuar como desacoplantes, la mayor expresión de enzimas ligadas a la producción de cofactores de óxido-reducción en Ara observada en la proteómica podría conducir a una mayor concentración de los mismos, lo que podría modificar el cociente $NADH/NAD^+$. Asimismo, una mayor producción de cofactores de óxido-reducción en Ara podría ser necesaria para satisfacer una mayor velocidad de transferencia de electrones a la CTE. Los datos de proteómica expuestos en el Capítulo 5 mostraron que la vía EMP no funcionaría en esta bacteria, con lo cual no puede esperarse que la regulación del cociente $NADH/NAD^+$ ocurra vía la carga energética a través de la modulación de la fosfofructoquinasa. Al presente, no sabemos cuál podría ser el sistema regulador del cociente $NADH/NAD^+$ en estas condiciones.

Tomando los resultados anteriores en conjunto, podríamos preguntarnos si la expresión de los flagelos laterales es la causa o la consecuencia de un mayor q_{O_2max} en HME-Ara. Otros experimentos han demostrado que la síntesis de los flagelos laterales es también estimulada en respuesta a una exposición permanente a un estrés oxidativo moderado [29], o es inhibida en microaerobiosis [93] o ante la deficiencia de hierro [140]; lo cual indicaría que el estado de oxigenación y/o respiración de la célula es un elemento clave en el control de la expresión de los flagelos laterales. De acuerdo a las observaciones mostradas en el Capítulo 4 comparando la cepa salvaje con la mutante *lafR::Km*, el incremento en q_{O_2max} en HME-Ara no es independiente de la presencia de flagelos laterales, sugiriendo que la síntesis de estas organelas podría ser la causa, más que la consecuencia, de un alto q_{O_2max} . Sin embargo, no puede descartarse que Ara, o alguno de sus intermediarios, induzca el inicio de la síntesis de los flagelos, y éstos, una vez en funcionamiento, estimulen la CTE ejerciendo una retroalimentación positiva sobre la síntesis de flagelos.

La movilidad de las bacterias es altamente regulada por su sistema interno y las interacciones con el entorno, puesto que la síntesis y funcionamiento de los flagelos requiere de una gran cantidad de energía. Ciertas especies de *Vibrio spp.* con flagelos duales inducen la expresión de flagelos laterales para moverse en ambientes más viscosos.

Estudios taxonómicos sobre el orden *Rizobiales* han demostrado que la mayoría de las especies secuenciadas poseen el sistema de flagelos laterales respecto al flagelo subpolar, y solo el 10 % de estas especies posee un sistema dual de flagelos. Dentro del género *Bradyrhizobium*, con especies capaces de nodular la soja y fijar nitrógeno, todas las especies estudiadas (128) poseen el flagelo subpolar, mientras que 70 de estas poseen además el flagelo lateral [40]. Sin embargo, entre los linajes que poseen los dos flagelos se verifican pérdidas en algunas ramas (Figura 1.10), sugiriendo que la presencia de los dos flagelos en la misma bacteria es

inestable, en concordancia con nuestras observaciones de la competitividad de la cepa mutante *lafR::Km* sobre la salvaje. Así, teniendo en cuenta que solo el 10 % de las especies del orden *Rizobiales* posee un sistema dual de flagelos, existiría una tendencia por mantener solamente uno de los sistemas flagelares. La presencia de los sistemas flagelares duales en la mitad de los genomas conocidos del género *Bradyrhizobium*, siendo que estos suponen un costo energético superior, sugiere interrogantes acerca de las funciones particulares de estos flagelos y cuáles serían las ventajas evolutivas de mantenerlos.

De ensayos anteriores sabemos que los mutantes de *B. diazoefficiens* que no poseen flagelos laterales ($\Delta lafA$) resultaron más competitivos que la cepa salvaje a la hora de nodular raíces de soja; por lo tanto, la presencia de flagelos laterales no suponen una ventaja en este sentido [1]. Además, los flagelos laterales no son los únicos necesarios para el movimiento tipo verbenear [24] y tampoco parecen contribuir a la quimiotaxis y a la velocidad de nado. La cepa salvaje posee una velocidad de nado de $28,8 \mu m.s^{-1}$, para la $\Delta lafA$ es de $26,9 \mu m.s^{-1}$, mientras que para la mutante carente del flagelo subpolar ($\Delta fliC$) es de $17,2 \mu m.s^{-1}$ [96]. El único rol propuesto para los flagelos laterales es su contribución, junto con el subpolar, al nado cerca de las superficies, puesto que el flagelo subpolar tiende a adherirse a estas superficies mientras que el flagelo lateral lo evita [96].

Una funcionalidad aparente de los flagelos laterales es el nado en un medio con obstáculos lo cual sería relevante en ambientes como el suelo. Esto puede visualizarse en ensayos de natación realizados en agar semisólido (0,3%), los cuales han demostrado que esta condición induce la síntesis de los flagelos laterales aun con Mtl como fuente de carbono. En estas concentraciones el medio no es lo suficientemente viscoso como para inducir el verbenear en la superficie del agar, sino que las bacterias nadan a través del líquido retenido entre los retículos del agar. En estos casos la presencia de los flagelos laterales presentaría una ventaja respecto de la cepa que no los posee [96, 83] (Figura 7.1).

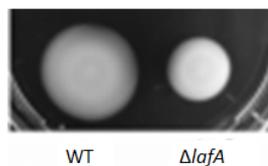


Figura 7.1.: Halos de movilidad de la cepa salvaje de *B. diazoefficiens* (WT) y la mutante carente de flagelos laterales ($\Delta lafA$). Extraída de [83]

De los resultados del modelo expuesto en el Capítulo 3 hemos visto que para las bacterias que poseen un mayor número de flagelos, la fracción de bacterias presentes en la subpoblación con mayores ω es superior (Figura 3.5). Hemos expresado antes que los flagelos no parecen aportar a una mayor velocidad de natación; sin embargo, estos estudios se realizaron siguiendo las trayectorias de bacterias visiblemente móviles sobre una población en la que no todas se mueven. Cabe preguntarse si el mayor número de flagelos conduciría a una población más móvil. Es decir, a una población en la cual una mayor fracción de bacterias posea velocidades altas de natación respecto de aquellas que poseen un solo flagelo, siendo esta una ventaja evolutiva de los *Bradyrhizobium spp.* que poseen sistemas duales respecto de los que no. Esto es consistente con la morfología de los halos

de movilidad, los cuales se suelen ver más concentrados para las bacterias con un único flagelo respecto de las que poseen más de uno (Figura 7.1), indicando que en éstas la sub-población de bacterias con alta movilidad es menor. En este sentido, sería interesante poder tratar de detectar la presencia de una población muy diluida de bacterias de la cepa $\Delta lafA$ o de la cepa $lafR::Km$ más allá del halo denso de movilidad donde se las observa, para ver si efectivamente la población de bacterias más móviles es muy escasa en estas mutantes.

Los resultados de nuestro modelo se han construido para datos obtenidos para *E. coli*, por no disponer de datos para *B. diazoefficiens*. Sin embargo se trata de un modelo simple, en el cual pueden reemplazarse los parámetros por aquellos que puedan ser determinados para otras cepas y así estudiar el comportamiento eventualmente de otras bacterias con un grado de generalización limitada. Adicionalmente, también puede emplearse para estudiar el comportamiento en medios donde la cantidad de O_2 es menor (microoxia) y para mutantes con mayor actividad en alguna de las enzimas.

En búsqueda de posibles roles de la actividad RuBisCO en *B. diazoefficiens*

El estudio proteómico de las vías metabólicas nos condujo a observar que se encontraban presentes las proteínas del ciclo CBB en los cultivos realizados con HME-Mtl, pero no en aquellos crecidos en HME-Ara. Esto resultó curioso, por tratarse de una condición aeróbica y en presencia de una fuente de carbono abundante. No sabemos si esta vía estaría activa en el metabolismo de Mtl puesto que no hemos medido la actividad RuBisCO, por ejemplo incubando con $^{14}CO_2$ e intentando encontrar la marca en intermediarios de la vía CBB. Como alternativa para estudiar el posible rol de la RuBisCO en el metabolismo de Mtl en *B. diazoefficiens*, realizamos una mutación que consistió en la delección de una parte del gen *cbbL*, la cual parece haber resultado en una subunidad CbbL truncada y puede haber repercutido negativamente sobre la síntesis de CbbS. Por lo tanto, la mutación parece haber conducido a la eliminación de la actividad RuBisCO. Esta mutación llevó a observar efectos en el crecimiento y la morfología de células cultivadas en medios quimioautotróficos y mixotróficos, en este caso cuando la fuente de carbono fue Mtl pero no cuando fue Ara.

Si bien los estudios mostrados en Capítulo 6 son preliminares, de acuerdo a lo observado en las curvas de crecimiento realizadas en medio con $[S_2O_3]^{-2}$ suplementado con Mtl o Ara, podríamos pensar que en un medio con Ara la expresión de la RuBisCO se encuentra reprimida, pues en este medio las bacterias mueren más rápidamente (cuando se les termina la Ara), mientras que en los medios suplementados con Mtl las cinéticas de crecimiento son más prolongadas. La RuBisCO no estuvo presente en los medios suplementados con Ara, pero sí en los medios suplementados con Mtl puesto que la mutante $\Delta cbbL$ presentó una cinética de crecimiento retrasada respecto de la salvaje.

La RuBisCO se ha detectado en bacteroides como así también las otras enzimas de la vía PP [106, 27]. Sin embargo, desconocemos cuál sería el rol de esta enzima en el nódulo. Reportes previos indicaron que la RuBisCO puede condicionar al menos en parte la fijación de N_2 [42], lo que podría explicar la mala performance de la mutante a la hora de competir por la ocupación de los nódulos con una cepa salvaje que sí es capaz de expresar la RuBisCO, a través de un sistema de sanciones impuesto por la planta [102].

En conclusión, en este trabajo de Tesis hemos avanzado en el estudio de los parámetros de crecimiento en medio líquido y las vías de oxidación de sustratos de *B. diazoefficiens* y su relación con la síntesis de flagelos. Sería interesante continuar los estudios de posibles señalizaciones que tengan que ver con el estado redox de la célula para comprender cómo es que relaciona movilidad con disponibilidad de energía y la movilidad de estas cepas en medios reticulados. Asimismo, debería ampliarse esta investigación a otras fuentes de carbono, para intentar elucidar patrones metabólicos comunes.

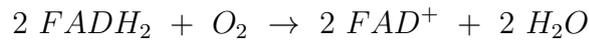
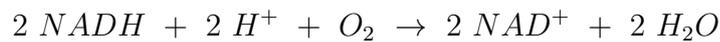
A partir del análisis por proteómica comparativa de cuáles serían las posibles rutas metabólicas del catabolismo de ambas fuentes de carbono, el estudio para Mtl nos condujo a nuevas investigaciones sobre el posible rol de la enzima RuBisCO en la nodulación de raíces de soja. Sería interesante continuar con la complementación del mutante y el crecimiento de esta cepa mutante en otros medios de cultivo. Asimismo, sería interesante llevar a cabo estudios más detallados de la simbiosis para intentar determinar si el defecto de la competitividad del mutante $\Delta cbbL$ se produce a nivel de la infección temprana o de sanciones durante el desarrollo del nódulo y la fijación de N_2 .

A. Apéndices

A.1. Vías metabólicas

En las siguientes tablas se presentan las reacciones de los balances estequiométricos para las vías metabólicas sugeridas para la reducción de L-Arabinosa o D-Manitol que se consideraron para los balances energéticos presentados en el Capítulo 5. En cada uno de los casos el balance de $ATP + GTP$ formado se realizó teniendo en cuenta el producido o consumido en la vía y a partir del $NADH$ y $FADH_2$, contabilizándose 3 ATP para un $NADH$ y 2 para un $FADH_2$.

Lo mismo con el O_2 , se tuvo en cuenta el consumido en la vía y los consumidos en la oxidación de $NADH$ y $FADH_2$ siguiendo las estequiometrías siguientes:



En tanto que el piruvato (para evaluar el grado anaplerótico de la vía) se contabilizaron los producidos antes de entrar en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA).

A.1.1. L-Arabinosa

A.1.1.1. Vía del LKDA

Tabla A.1.: Reacciones de la ruta de oxidación de Ara balanceadas estequiométricamente (Ara : LKDA) con las respectivas enzimas que catalizan cada reacción. En verde aquellas proteínas pertenecientes al grupo Ara-Dif y en azul aquellas encontradas en el proteoma pero que no están expresadas en forma diferencial.

Sustrato	Producto	Enzimas detectadas
$6 L - arabinosa + 6 NAD^+$	$6 L - arabino - \gamma - lactona + 6 NADH + 6 H^+$	Blr3205
$6 L - arabino - \gamma - lactona + 6 H_2O$	$6 L - arabonato$	Blr3207
$6 L - arabonato$	$6 L - 2 - ceto - 3 - deoxi - arabonato + 6 H_2O$	Blr2974
$6 L - 2 - ceto - 3 - deoxi - arabonato$	$6 piruvato + 6 glicaldehído$	BlI7287
$6 glicaldehído + 6 H_2O + 6 NAD^+$	$6 glicolato + 6 NADH + 6 H^+$	No anotada
$6 glicolato + 6 O_2$	$6 glioxilato + 6 H_2O_2$	BlI7540, BlI7541, BlI7543, Blr4823
$4 glioxilato$	$2 tartronatosemialdehído + 2CO_2$	Blr3166
$1 tartronatosemialdehído$	$1 hidroxipiruvato$	Blr3167
$1 hidroxipiruvato + NADH + H^+$	$1 glicerato + NAD^+$	Blr7172
$1 tartronatosemialdehído + NADH + H^+$	$1 glicerato + NAD^+$	Blr3168
$2 glicerato + 2 ATP$	$2 glicerato - 2 - fosfato + 2 ADP$	Blr7830
$2 glicerato - 2 - fosfato$	$2 fosfoenolpiruvato + 2 H_2O$	BlI4794
$2 fosfoenolpiruvato + 2 ADP$	$2 piruvato + 2 ATP$	Blr7138
$2 glioxilato + 2 O_2 + 2 H_2O$	$2 oxalato + 2 H_2O_2$	No anotada
$2 oxalato + 2 formil - CoA$	$2 oxalil - CoA + 2 formato$	BlI3156
$2 oxalil - CoA$	$2 formil - CoA + 2 CO_2$	BlI3157
$2 formato + 2 NAD^+$	$2 CO_2 + 2 NADH + 2 H^+$	Blr2316, Blr2317
$8 piruvato + 8 SH - CoA + 8 NAD^+$	$8 acetil - CoA + 8 CO_2 + 8 NADH + 8 H^+$	BlI4782, BlI4783
$8 acetil - CoA + 8 oxaloacetato + 8 H_2O$	$8 citrato + 8 DH - CoA$	Blr4839
$8 citrato$	$8 isocitrato$	BlI0466
$8 isocitrato + 8 NAD^+$	$8 2 - oxoglutarato + 8 NADH + 8 CO_2 + 8 H^+$	Blr5747
$8 2 - oxoglutarato + 8 SH - CoA + 8 NAD^+$	$8 succinil - CoA + 8 CO_2 + 8 NADH + 8 H^+$	BlI0452
$8 succinil - CoA + 8 P + 8 GDP$	$8 succinato + 8 GTP + 8 SH - CoA$	BlI0453
$8 succinato + 8 FAD^+$	$8 fumarato + 8 FADH_2$	Blr0514, Blr0515
$8 fumarato + 8 H_2O$	$8 malato$	BlI5796, Blr6519
$8 malato + 8 NAD^+$	$8 oxaloacetato + 8 NADH + 8 H^+$	BlI0456

Balance



Rendimiento

$$ATP + GTP : 8 + 44 \times 3 + 8 \times 2 : 156$$

$$O_2 : 8 + 44/2 + 8/2 : 34$$

$$piruvato : 8$$

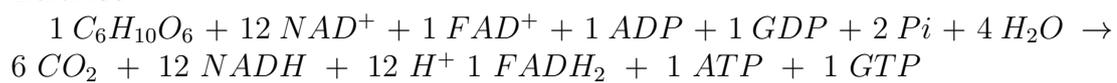
A.1.2. D-Manitol

A.1.2.1. Vía PP

Tabla A.2.: Estequiometría para la degradación de Mtl por la vía pentosa fosfato (PP) con las respectivas enzimas que catalizan cada reacción. En rojo aquellas proteínas pertenecientes al grupo Mtl-Dif y en azul aquellas encontradas en el proteoma pero que no están expresadas en forma diferencial.

Sustratos	Productos	Enzimas detectadas
1 <i>D</i> - manitol + NAD^+	1 <i>D</i> - fructosa + $NADH + H^+$	Blr3225
1 <i>D</i> - fructosa + ATP	1 <i>D</i> - fructosa - 6 - fosfato + ADP	Blr3227
3 <i>D</i> - fructosa - 6 - fosfato	3 <i>D</i> - glucosa - 6 - fosfato	Blr6758
3 <i>D</i> - glucosa - 6 - fosfato + 3 NAD^+	3 <i>D</i> - glucono - 1,5 - γ - lactona - 6 - fosfato + 3 $NADH + 3 H^+$	Blr6760
3 <i>D</i> - glucono - 1,5 - γ - lactona - 6 - fosfato + 3 H_2O	3 <i>D</i> - gluconato - 6 - fosfato	Blr0368
3 <i>D</i> - gluconato - 6 - fosfato + 3 NAD^+	3 <i>D</i> - ribulosa - 5 - fosfato + 3 $CO_2 + 3 NADH + 3 H^+$	Blr6759
1 <i>D</i> - ribulosa - 5 - fosfato	1 <i>D</i> - ribosa - 5 - fosfato	Blr3755
2 <i>D</i> - ribulosa - 5 - fosfato	2 <i>D</i> - xilulosa - 5 - fosfato	Blr2588
1 <i>D</i> - xilulosa - 5 - fosfato + 1 <i>D</i> - ribosa - 5 - fosfato	1 <i>D</i> - gliceraldehído - 3 - fosfato + 1 <i>D</i> - sedoheptulosa - 7 - fosfato	Blr2168, Blr2583
1 <i>D</i> - gliceraldehído - 3 - fosfato + 1 <i>D</i> - sedoheptulosa - 7 - fosfato	1 <i>D</i> - fructosa - 6 - fosfato + 1 <i>D</i> - eritrosa - 4 - fosfato	Blr6758
1 <i>D</i> - xilulosa - 5 - fosfato + 1 <i>D</i> - eritrosa - 4 - fosfato	1 <i>D</i> - fructosa - 6 - fosfato + 1 <i>D</i> - gliceraldehído - 3 - fosfato	Blr2168, Blr2583
1 <i>D</i> - gliceraldehído - 3 - fosfato + 1 $NAD^+ + 1 Pi$	1 <i>D</i> - glicerato - 1,3 - bifosfato + 1 $NADH + 1 H^+$	Bll1523
1 <i>D</i> - glicerato - 1,3 - bifosfato + 1 ADP	1 <i>D</i> - glicerato - 3 - fosfato + 1 ATP	Bll1522
1 <i>D</i> - glicerato - 3 - fosfato	1 <i>D</i> - glicerato - 2 - fosfato	Blr0686
1 <i>D</i> - glicerato - 2 - fosfato	1 fosfoenolpiruvato + 1 H_2O	Bll4794
1 fosfoenolpiruvato + ADP	1 piruvato + 1 ATP	Blr7138
1 piruvato + 1 NAD^+	1 acetil - CoA + 1 $CO_2 + 1 NADH + 1 H^+$	Bll4782, Bll4783, Blr2815
1 acetil - CoA + 1 oxaloacetato + 1 H_2O	1 citrato + CoA	Blr4839
1 citrato	1 isocitrato	Bll0466
1 isocitrato + 1 NAD^+	1 2 - oxoglutarato + 1 $CO_2 + 1 NADH + 1 H^+$	Blr5747
1 2 - oxoglutarato + CoA + 1 NAD^+	1 succinil - CoA + 1 $CO_2 + 1 NADH + 1 H^+$	Bll0452
1 succinil - CoA + 1 $Pi + 1 GDP$	1 succinato + CoA 1 GTP	Bll0453
1 succinato + 1 FAD^+	1 fumarato + 1 $FADH_2$	Blr0514, Blr0515
1 fumarato + 1 H_2O	1 malato	Bll5796, Blr6519
1 malato + 1 NAD^+	1 oxaloacetato + 1 $NADH + 1 H^+$	Bll0456

Balance



Rendimiento

$$ATP + GTP : 2 + 12 \times 3 + 1 \times 2 : 40$$

$$O_2 : 12/2 + 1/2 : 6,5$$

$$piruvato : 1$$

A.1.2.2. Ciclo CBB(carboxilasa)

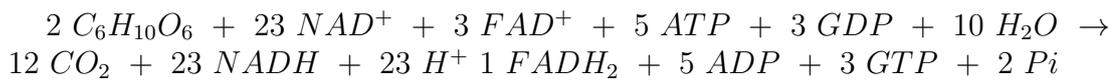
Tabla A.3.: Estequiometría para la degradación de Mtl por la vía CBB, suponiendo que la RuBisCO está activa como carboxilasa (CBB (carboxilasa)) con las respectivas enzimas que catalizan cada reacción. En rojo aquellas proteínas pertenecientes al grupo Mtl-Dif y en azul aquellas encontradas en el proteoma pero que no están expresadas en forma diferencial.

Sustratos	Productos	Enzimas detectadas
$2 \text{ manitol} + 2 \text{ NAD}^+$	$2 \text{ fructosa} + 2 \text{ NADH}$	Blr3225
$2 \text{ D-fructosa} + 2 \text{ ATP}$	$2 \text{ D-fructosa-6-fosfato} + 2 \text{ ADP}$	Blr3227
$6 \text{ D-fructosa-6-fosfato}$	$6 \text{ D-glucosa-6-fosfato}$	Blr6758
$6 \text{ D-glucosa-6-fosfato} + 6 \text{ NAD}^+$	$6 \text{ D-glucono-1,5-}\gamma\text{-lactona-6-fosfato} + 6 \text{ NADH} + 6 \text{ H}^+$	Blr6760
$6 \text{ D-glucono-1,5-}\gamma\text{-lactona-6-fosfato} + 6 \text{ H}_2\text{O}$	$6 \text{ D-gluconato-6-fosfato}$	Blr0368
$6 \text{ D-gluconato-6-fosfato} + 6 \text{ NAD}^+$	$6 \text{ D-ribulosa-5-fosfato} + 6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ NADH} + 6 \text{ H}^+$	Blr6759
$1 \text{ D-ribulosa-5-fosfato}$	$1 \text{ D-ribosa-5-fosfato}$	Blr3755
$2 \text{ D-ribulosa-5-fosfato}$	$2 \text{ D-xilulosa-5-fosfato}$	Blr2588
$1 \text{ D-xilulosa-5-fosfato} + 1 \text{ D-ribosa-5-fosfato}$	$1 \text{ D-gliceraldehído-3-fosfato} + 1 \text{ D-sedoheptulosa-7-fosfato}$	Blr2168, Blr2583
$1 \text{ D-xilulosa-5-fosfato} + 1 \text{ D-eritrosa-4-fosfato}$	$1 \text{ D-fructosa-6-fosfato} + 1 \text{ D-gliceraldehído-3-fosfato}$	Blr2168, Blr2583
$2 \text{ D-gliceraldehído-3-fosfato} + 2 \text{ D-sedoheptulosa-7-fosfato}$	$2 \text{ D-fructosa-6-fosfato} + 2 \text{ D-eritrosa-4-fosfato}$	Blr6758
$3 \text{ D-ribulosa-5-fosfato} + 3 \text{ ATP}$	$3 \text{ D-ribulosa-1,5-bifosfato} + 3 \text{ ADP}$	Blr2582
$3 \text{ D-ribulosa-1,5-bifosfato} + 3 \text{ CO}_2 + 3 \text{ H}_2\text{O}$	$6 \text{ D-glicerato-3-fosfato}$	Blr2585, Blr2586
$3 \text{ D-glicerato-3-fosfato} + 3 \text{ ATP}$	$3 \text{ D-glicerato-1,3-bifosfato} + 3 \text{ ADP}$	Bll1522
$3 \text{ D-glicerato-1,3-bifosfato} + 3 \text{ NADH} + 3 \text{ H}^+$	$3 \text{ D-gliceraldehído-3-fosfato} + 3 \text{ NAD}^+ + 3 \text{ P}$	Bll1523
$2 \text{ D-gliceraldehído-3-fosfato}$	$2 \text{ D-glicerona-3-fosfato}$	Bll4807
$1 \text{ D-gliceraldehído-3-fosfato} + 1 \text{ D-glicerona-3-fosfato}$	$1 \text{ D-fructosa-1,6-bifosfato}$	Bll1521, Blr2584
$1 \text{ D-fructosa-1,6-bifosfato}$	$1 \text{ D-fructosa-6-fosfato} + 1 \text{ Pi}$	Blr2581
$1 \text{ D-glicerona-3-fosfato} + 1 \text{ D-eritrosa-4-fosfato}$	$1 \text{ D-sedoheptulosa-1,7-bifosfato}$	Bll1521, Blr2584
$1 \text{ D-sedoheptulosa-1,7-bifosfato} + 1 \text{ H}_2\text{O}$	$1 \text{ D-sedoheptulosa-7-fosfato} + 1 \text{ Pi}$	Blr4363
$3 \text{ D-glicerato-3-fosfato}$	$3 \text{ D-glicerato-2-fosfato}$	Blr0686
$3 \text{ D-glicerato-2-fosfato}$	$3 \text{ fosfoenolpiruvato} + 3 \text{ H}_2\text{O}$	Bll4794
$3 \text{ fosfoenolpiruvato} + 3 \text{ ADP}$	$3 \text{ piruvato} + 3 \text{ ATP}$	Blr7138
$3 \text{ piruvato} + 3 \text{ CoA} + 3 \text{ NAD}^+$	$3 \text{ acetil-CoA} + 3 \text{ CO}_2 + 3 \text{ NADH} + 3 \text{ H}^+$	Bll4782, Bll4783, Blr2815

Tabla A.5.: Continuación. Estequiometría para la degradación de Mtl por la vía CBB, suponiendo que la RuBisCO está activa como carboxilasa (CBB (carboxilasa)) con las respectivas enzimas que catalizan cada reacción. En rojo aquellas proteínas pertenecientes al grupo Mtl-Dif y en azul aquellas encontradas en el proteoma pero que no están expresadas en forma diferencial.

Sustratos	Productos	Enzimas detectadas
$3 \text{ acetil-CoA} + 3 \text{ oxaloacetato} + 3 \text{ H}_2\text{O}$	$3 \text{ citrato} + 3 \text{ CoA}$	Blr4839
3 citrato	3 isocitrato	BlI0466
$3 \text{ isocitrato} + 3 \text{ NAD}^+$	$3 \text{ 2-oxoglutarato} + 3 \text{ CO}_2 + 3 \text{ NADH} + 3 \text{ H}^+$	Blr5747
$3 \text{ 2-oxoglutarato} + 3 \text{ CoA} + 3 \text{ NAD}^+$	$3 \text{ succinil-CoA} + 3 \text{ CO}_2 + 3 \text{ NADH} + 3 \text{ H}^+$	BlI0452
$3 \text{ succinil-CoA} + 3 \text{ Pi} + 3 \text{ GDP}$	$3 \text{ succinato} + 3 \text{ GTP} + 3 \text{ P}$	BlI0453
$3 \text{ succinato} + 3 \text{ FAD}^+$	$3 \text{ fumarato} + 3 \text{ FADH}_2$	Blr0514, Blr0515
$3 \text{ fumarato} + 3 \text{ H}_2\text{O}$	3 malato	BlI5796, Blr6519
$3 \text{ malato} + 3 \text{ NAD}^+$	$3 \text{ oxaloacetato} + 3 \text{ NADH} + 3 \text{ H}^+$	BlI0456

Balance



Rendimiento

$$\text{ATP} + \text{GTP} : -2 + 23 \times 3 + 3 \times 2 : 73$$

$$\text{O}_2 : 23/2 + 3/2 : 13$$

$$\text{piruvato} : 3$$

A.1.2.3. Ciclo CBB(oxigenasa:oxalato)

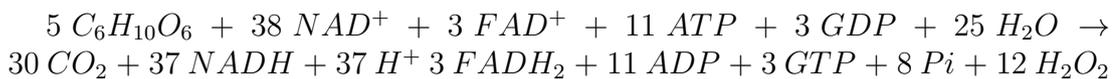
Tabla A.7.: Estequiometría para la degradación de Mtl por la vía CBB, suponiendo actividad oxigenasa de la RuBisCO y la degradación del glioxilato vía oxalato (CBB (oxigenasa:oxalato)) con las respectivas enzimas que catalizan cada reacción. En rojo aquellas proteínas pertenecientes al grupo Mtl-Dif, en azul aquellas encontradas en el proteoma pero que no están expresadas en forma diferencial y en verde aquellas que pertenecen al grupo Ara-Dif.

Sustratos	Productos	Enzimas detectadas
5 <i>manitol</i> + 5 NAD^+	5 <i>fructosa</i> + 5 $NADH$ + 5 H^+	Blr3225
5 <i>D-fructosa</i> + 5 ATP	5 <i>D-fructosa</i> - 6 - <i>fosfato</i> + 5 ADP	Blr3227
9 <i>D-fructosa</i> - 6 - <i>fosfato</i>	9 <i>D-glucosa</i> - 6 - <i>fosfato</i>	Blr6758
9 <i>D-glucosa</i> - 6 - <i>fosfato</i> + 9 NAD^+	9 <i>D-glucono</i> - 1,5 - γ - <i>lactona</i> - 6 - <i>fosfato</i> + 9 $NADH$ + 9 H^+	Blr6760
9 <i>D-glucono</i> - 1,5 - γ - <i>lactona</i> - 6 - <i>fosfato</i> + 9 H_2O	9 <i>D-gluconato</i> - 6 - <i>fosfato</i>	Blr0368
9 <i>D-gluconato</i> - 6 - <i>fosfato</i> + 9 NAD^+	9 <i>D-ribulosa</i> - 5 - <i>fosfato</i> + 9 CO_2 + 9 $NADH$ + 9 H^+	Blr6759
1 <i>D-ribulosa</i> - 5 - <i>fosfato</i>	1 <i>D-ribosa</i> - 5 - <i>fosfato</i>	Blr3755
2 <i>D-ribulosa</i> - 5 - <i>fosfato</i>	2 <i>D-xilulosa</i> - 5 - <i>fosfato</i>	Blr2588
1 <i>D-xilulosa</i> - 5 - <i>fosfato</i> + 1 <i>D-ribosa</i> - 5 - <i>fosfato</i>	1 <i>D-gliceraldehído</i> - 3 - <i>fosfato</i> + 1 <i>D-sedoheptulosa</i> - 7 - <i>fosfato</i>	Blr2168, Blr2583
1 <i>D-xilulosa</i> - 5 - <i>fosfato</i> + 1 <i>D-eritrosa</i> - 4 - <i>fosfato</i>	1 <i>D-fructosa</i> - 6 - <i>fosfato</i> + 1 <i>D-gliceraldehído</i> - 3 - <i>fosfato</i>	Blr2168, Blr2583
2 <i>D-gliceraldehído</i> - 3 - <i>fosfato</i> + 2 <i>D-sedoheptulosa</i> - 7 - <i>fosfato</i>	2 <i>D-fructosa</i> - 6 - <i>fosfato</i> + 2 <i>D-eritrosa</i> - 4 - <i>fosfato</i>	Blr6758
6 <i>D-ribulosa</i> - 5 - <i>fosfato</i> + 6 ATP	6 <i>D-ribulosa</i> - 1,5 - <i>bifosfato</i> + 6 ADP	Blr2582
6 <i>D-ribulosa</i> - 1,5 - <i>bifosfato</i> + 6 O_2	6 <i>D-glicerato</i> - 3 - <i>fosfato</i> + 6 <i>glicolato</i> - 2 - <i>fosfato</i>	Blr2585, Blr2586
3 <i>D-glicerato</i> - 3 - <i>fosfato</i> + 3 ATP	3 <i>D-glicerato</i> - 1,3 - <i>bifosfato</i> + 3 ADP	BlI1522
3 <i>D-glicerato</i> - 1,3 - <i>bifosfato</i> + 3 $NADH$ + 3 H^+	3 <i>D-gliceraldehído</i> - 3 - <i>fosfato</i> + 3 NAD^+ + 3 P	BlI1523
2 <i>D-gliceraldehído</i> - 3 - <i>fosfato</i>	2 <i>D-glicerona</i> - 3 - <i>fosfato</i>	BlI4807
1 <i>D-gliceraldehído</i> - 3 - <i>fosfato</i> + 1 <i>D-glicerona</i> - 3 - <i>fosfato</i>	1 <i>D-fructosa</i> - 1,6 - <i>bifosfato</i>	BlI1521, Blr2584
1 <i>D-fructosa</i> - 1,6 - <i>bifosfato</i>	1 <i>D-fructosa</i> - 6 - <i>fosfato</i> + 1 Pi	Blr2581
1 <i>D-glicerona</i> - 3 - <i>fosfato</i> + 1 <i>D-eritrosa</i> - 4 - <i>fosfato</i>	1 <i>D-sedoheptulosa</i> - 1,7 - <i>bifosfato</i>	BlI1521, Blr2584
1 <i>D-sedoheptulosa</i> - 1,7 - <i>bifosfato</i> + 1 H_2O	1 <i>D-sedoheptulosa</i> - 7 - <i>fosfato</i> + 1 P	Blr4363
3 <i>D-glicerato</i> - 3 - <i>fosfato</i>	3 <i>D-glicerato</i> - 2 - <i>fosfato</i>	Blr0686
3 <i>D-glicerato</i> - 2 - <i>fosfato</i>	3 <i>fosfoenolpiruvato</i> + 3 H_2O	BlI4794
3 <i>fosfoenolpiruvato</i> + 3 ADP	3 <i>piruvato</i> + 3 ATP	Blr7138
3 <i>piruvato</i> + 3 CoA + 3 NAD^+	3 <i>acetil-CoA</i> + 3 CO_2 + 3 $NADH$ + 3 H^+	BlI4782, BlI4783, Blr2815

Tabla A.8.: Continuación. Estequiometría para la degradación de Mtl por la vía CBB, suponiendo actividad oxigenasa de la RuBisCO y la degradación del glioxilato vía oxalato (CBB (oxigenasa:oxalato)) con las respectivas enzimas que catalizan cada reacción. En rojo aquellas proteínas pertenecientes al grupo Mtl-Dif, en azul aquellas encontradas en el proteoma pero que no están expresadas en forma diferencial y en verde aquellas que pertenecen al grupo Ara-Dif.

Sustratos	Productos	Enzimas detectadas
$3 \text{ acetil-CoA} + 3 \text{ oxaloacetato} + 3 \text{ H}_2\text{O}$	$3 \text{ citrato} + 3 \text{ CoA}$	Blr4839
3 citrato	3 isocitrato	BlI0466
$3 \text{ isocitrato} + 3 \text{ NAD}^+$	$3 \text{ 2-oxoglutarato} + 3 \text{ CO}_2 + 3 \text{ NADH} + 3 \text{ H}^+$	Blr5747
$3 \text{ 2-oxoglutarato} + 3 \text{ CoA} + 3 \text{ NAD}^+$	$3 \text{ succinil-CoA} + 3 \text{ CO}_2 + 3 \text{ NADH} + 3 \text{ H}^+$	BlI0452
$3 \text{ succinil-CoA} + 3 \text{ Pi} + 3 \text{ GDP}$	$3 \text{ succinato} + 3 \text{ CoA} + 3 \text{ GTP}$	BlI0453
$3 \text{ succinato} + 3 \text{ FAD}^+$	$3 \text{ fumarato} + 3 \text{ FADH}_2$	Blr0514, Blr0515
$3 \text{ fumarato} + 3 \text{ H}_2\text{O}$	3 malato	BlI5796, Blr6519
$3 \text{ malato} + 3 \text{ NAD}^+$	$3 \text{ oxaloacetato} + 3 \text{ NADH} + 3 \text{ H}^+$	BlI0456
$6 \text{ glicolato} - 2 - \text{fosfato} + 6 \text{ H}_2\text{O}$	$6 \text{ glicolato} + 6 \text{ P}$	BlI3754
$6 \text{ glicolato} + 6 \text{ O}_2$	$6 \text{ glioxilato} + 6 \text{ H}_2\text{O}_2$	BlI7541
$6 \text{ glioxilato} + 6 \text{ O}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O}$	$6 \text{ oxalato} + 6 \text{ H}_2\text{O}_2$	no anotada
$6 \text{ oxalato} + 6 \text{ formil-CoA}$	$6 \text{ oxalil-CoA} + 6 \text{ formiato}$	BlI3156
$6 \text{ oxalil-CoA} + 6 \text{ H}^+$	$6 \text{ formil-CoA} + 6 \text{ CO}_2$	BlI3157
$6 \text{ formiato} + 6 \text{ NAD}^+$	$6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ NADH} + 6 \text{ H}^+$	Blr2316, Blr2317

Balance



Rendimiento

$$\text{ATP} + \text{GTP} : -8 + 38 \times 3 + 3 \times 2 : 112$$

$$\text{O}_2 : 18 + 38/2 + 3/2 : 38$$

$$\text{piruvato} : 3$$

A.1.2.4. Ciclo CBB(oxigenasa:THF)

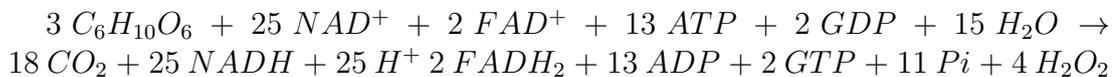
Tabla A.9.: Estequiometría para la degradación de Mtl por la vía CBB, suponiendo actividad oxigenasa de la RuBisCO y la degradación del glioxilato vía el tetrahidrofolato (CBB (oxigenasa:THF)), con las respectivas enzimas que catalizan cada reacción. En rojo aquellas proteínas pertenecientes al grupo Mtl-Dif y en azul aquellas encontradas en el proteoma pero que no están expresadas en forma diferencial.

Sustratos	Productos	Enzimas detectadas
3 <i>manitol</i> + 3 <i>NAD</i> ⁺	3 <i>fructosa</i> + 3 <i>NADH</i> + 3 <i>H</i> ⁺	Blr3225
3 <i>D-fructosa</i> + 3 <i>ATP</i>	3 <i>D-fructosa</i> - 6 - <i>fosfato</i> + 3 <i>ADP</i>	Blr3227
10 <i>D-fructosa</i> - 6 - <i>fosfato</i>	10 <i>D-glucosa</i> - 6 - <i>fosfato</i>	Blr6758
10 <i>D-glucosa</i> - 6 - <i>fosfato</i> + 10 <i>NAD</i> ⁺	10 <i>D-glucono</i> - 1,5 - γ - <i>lactona</i> - 6 - <i>fosfato</i> + 10 <i>NADH</i> + 10 <i>H</i> ⁺	Blr6760
10 <i>D-glucono</i> - 1,5 - γ - <i>lactona</i> - 6 - <i>fosfato</i> + 10 <i>H</i> ₂ <i>O</i>	10 <i>D-gluconato</i> - 6 - <i>fosfato</i>	Blr0368
10 <i>D-gluconato</i> - 6 - <i>fosfato</i> + 10 <i>NAD</i> ⁺	10 <i>D-ribulosa</i> - 5 - <i>fosfato</i> + 10 <i>CO</i> ₂ + 10 <i>NADH</i> + 10 <i>H</i> ⁺	Blr6759
2 <i>D-ribulosa</i> - 5 - <i>fosfato</i>	2 <i>D-ribosa</i> - 5 - <i>fosfato</i>	Blr3755
6 <i>D-ribulosa</i> - 5 - <i>fosfato</i>	6 <i>D-xilulosa</i> - 5 - <i>fosfato</i>	Blr2588
2 <i>D-xilulosa</i> - 5 - <i>fosfato</i> + 2 <i>D-ribosa</i> - 5 - <i>fosfato</i>	2 <i>D-gliceraldehído</i> - 3 - <i>fosfato</i> + 2 <i>D-sedoheptulosa</i> - 7 - <i>fosfato</i>	Blr2168, Blr2583
2 <i>D-xilulosa</i> - 5 - <i>fosfato</i> + 2 <i>D-eritrosa</i> - 4 - <i>fosfato</i>	2 <i>D-fructosa</i> - 6 - <i>fosfato</i> + 2 <i>D-gliceraldehído</i> - 3 - <i>fosfato</i>	Blr2168, Blr2583
4 <i>D-gliceraldehído</i> - 3 - <i>fosfato</i> + 4 <i>D-sedoheptulosa</i> - 7 - <i>fosfato</i>	4 <i>D-fructosa</i> - 6 - <i>fosfato</i> + 4 <i>D-eritrosa</i> - 4 - <i>fosfato</i>	Blr6758
4 <i>D-ribulosa</i> - 5 - <i>fosfato</i> + 4 <i>ATP</i>	4 <i>D-ribulosa</i> - 1,5 - <i>bifosfato</i> + 4 <i>ADP</i>	Blr2582
4 <i>D-ribulosa</i> - 1,5 - <i>bifosfato</i> + 4 <i>O</i> ₂	4 <i>D-glicerato</i> - 3 - <i>fosfato</i> + 4 <i>glicolato</i> - 2 - <i>fosfato</i>	Blr2585, Blr2586
4 <i>D-glicerato</i> - 3 - <i>fosfato</i> + 4 <i>ATP</i>	4 <i>D-glicerato</i> - 1,3 - <i>bifosfato</i> + 4 <i>ADP</i>	BlI1522
4 <i>D-glicerato</i> - 1,3 - <i>bifosfato</i> + 4 <i>NADH</i> + 4 <i>H</i> ⁺	4 <i>D-gliceraldehído</i> - 3 - <i>fosfato</i> + 4 <i>NAD</i> ⁺ + 4 <i>P</i>	BlI1523
3 <i>D-gliceraldehído</i> - 3 - <i>fosfato</i>	3 <i>D-glicerona</i> - 3 - <i>fosfato</i>	BlI4807
1 <i>D-gliceraldehído</i> - 3 - <i>fosfato</i> + 1 <i>D-glicerona</i> - 3 - <i>fosfato</i>	1 <i>D-fructosa</i> - 1,6 - <i>bifosfato</i>	BlI1521, Blr2584
1 <i>D-fructosa</i> - 1,6 - <i>bifosfato</i>	1 <i>D-fructosa</i> - 6 - <i>fosfato</i> + 1 <i>Pi</i>	Blr2581
2 <i>D-glicerona</i> - 3 - <i>fosfato</i> + 2 <i>D-eritrosa</i> - 4 - <i>fosfato</i>	2 <i>D-sedoheptulosa</i> - 1,7 - <i>bifosfato</i>	BlI1521, Blr2584
1 <i>D-sedoheptulosa</i> - 1,7 - <i>bifosfato</i> + 1 <i>H</i> ₂ <i>O</i>	1 <i>D-sedoheptulosa</i> - 7 - <i>fosfato</i> + 1 <i>P</i>	Blr4363
2 <i>D-glicerato</i> - 2 - <i>fosfato</i>	2 <i>D-glicerato</i> - 3 - <i>fosfato</i>	Blr0686
3 <i>D-glicerato</i> - 2 - <i>fosfato</i>	3 <i>fosfoenolpiruvato</i> + 3 <i>H</i> ₂ <i>O</i>	BlI4794
2 <i>fosfoenolpiruvato</i> + 2 <i>ADP</i>	2 <i>piruvato</i> + 2 <i>ATP</i>	Blr7138
2 <i>piruvato</i> + 2 <i>CoA</i> + 2 <i>NAD</i> ⁺	2 <i>acetil-CoA</i> + 2 <i>CO</i> ₂ + 2 <i>NADH</i> + 2 <i>H</i> ⁺	BlI4782, BlI4783, Blr2815

Tabla A.10.: Continuación. Estequiometría para la degradación de Mtl por la vía CBB, suponiendo actividad oxigenasa de la RuBisCO y la degradación del glioxilato vía el tetrahidrofolato (CBB (oxigenasa:THF)), con las respectivas enzimas que catalizan cada reacción. En rojo aquellas proteínas pertenecientes al grupo Mtl-Dif y en azul aquellas encontradas en el proteoma pero que no están expresadas en forma diferencial.

Sustratos	Productos	Enzimas detectadas
$2 \text{ acetil} - \text{CoA} + 2 \text{ oxaloacetato} + 2 \text{ H}_2\text{O}$	$2 \text{ citrato} + 2 \text{ CoA}$	Blr4839
2 citrato	2 isocitrato	BlI0466
$2 \text{ isocitrato} + 2 \text{ NAD}^+$	$2 \text{ 2-oxoglutarato} + 2 \text{ CO}_2 + 2 \text{ NADH} + 2 \text{ H}^+$	Blr5747
$2 \text{ 2-oxoglutarato} + 2 \text{ CoA} + 2 \text{ NAD}^+$	$2 \text{ succinil} - \text{CoA} + 2 \text{ CO}_2 + 2 \text{ NADH} + 2 \text{ H}^+$	BlI0452
$2 \text{ succinil} - \text{CoA} + 2 \text{ Pi} + 2 \text{ GDP}$	$2 \text{ succinato} + 2 \text{ CoA} + 2 \text{ GTP}$	BlI0453
$2 \text{ succinato} + 2 \text{ FAD}^+$	$2 \text{ fumarato} + 2 \text{ FADH}_2$	Blr0514, Blr0515
$2 \text{ fumarato} + 2 \text{ H}_2\text{O}$	2 malato	BlI5796, Blr6519
$2 \text{ malato} + 2 \text{ NAD}^+$	$2 \text{ oxaloacetato} + 2 \text{ NADH} + 2 \text{ H}^+$	BlI0456
$4 \text{ glicolato} - 2 - \text{fosfato} + 4 \text{ H}_2\text{O}$	$4 \text{ glicolato} + 4 \text{ P}$	BlI3754
$4 \text{ glicolato} + 4 \text{ O}_2$	$4 \text{ glioxilato} + 4 \text{ H}_2\text{O}_2$	BlI7541
$4 \text{ glioxilato} + 4 \text{ L-serina}$	$4 \text{ hidroxipiruvato} + 4 \text{ L-glicina}$	Blr0373, BlI6037
$2 \text{ L-glicina} + 2 (5,10)\text{-metilenTHF} + 2 \text{ H}_2\text{O}$	$2 \text{ L-serina} + 2 \text{ THF}$	BlI5033, BlI5912
$2 \text{ THF} + 2 \text{ L-glicina} + 2 \text{ NAD}^+$	$2 \text{ NH}_4^+ + 2 (5,10)\text{-metilenTHF} + 2 \text{ CO}_2 + 2 \text{ NADH} + 2 \text{ H}^+$	BlI0449, BlI4778
$4 \text{ hidroxipiruvato} + 4 \text{ NADH} + 4 \text{ H}^+$	$4 \text{ glicerato} + 4 \text{ NAD}^+$	No anotada
$4 - \text{glicerato} + 4 \text{ ATP}$	$4 - \text{glicerato} - 2 - \text{fosfato} + 4 \text{ ADP}$	Blr7830
$2 \text{ glicerato} - 3 - \text{fosfato} + 2 \text{ NAD}^+$	$2 \text{ fosfonoxipiruvato} + 2 \text{ NADH} + 2 \text{ H}^+$	BlI6549, Blr7063
$2 \text{ 3-fosfonoxipiruvato} + 2 \text{ L-glutamato}$	$2 \text{ fosfo-L-serina} + 2 \text{ oxoglutarato}$	BlI7402
$2 \text{ fosfo-L-serina} + 3 \text{ H}_2\text{O}$	$2 \text{ L-serina} + 3 \text{ P}$	Blr6505
$2 \text{ oxoglutarato} + 2 \text{ NH}_4^+ + 2 \text{ NADH} + 2 \text{ H}^+$	$2 \text{ L-glutamato} + 2 \text{ NAD}^+ + 2 \text{ H}_2\text{O}$	Blr7995

Balance



Rendimiento

$$\text{ATP} + \text{GTP} : -11 + 25 \times 3 + 2 \times 2 : 68$$

$$\text{O}_2 : 8 + 25/2 + 2/2 : 21,5$$

$$\text{piruvato} : 2$$

A.1.3. Enzimas relativas a las vías encontradas en el proteoma

En las Tablas A.11 y se listan las enzimas encontradas en el proteoma estudiado que no se expresaron en forma diferencial en HME-Mtl respecto de HME-Ara. Estas enzimas completan las vías de oxidación propuestas.

Tabla A.11.: Proteínas detectadas en el proteoma estudiado que no se expresaron en forma diferencial, pero participan en las vías descriptas en el Capítulo 5.

Locus (Rhizobase)	Proteína ID (Uniprot)	Gen	Descripción
bll7540	Q89D99	<i>glcF</i>	Glicolato oxidasa Fe-S
bll7541	Q89D98	<i>glcE</i>	Glicolato oxidasa
bll7543	Q89D96	<i>glcD</i>	Glicolato oxidasa (subunidad)
blr4823	Q89KT0	<i>lldA</i>	Lactato deshidrogenasa
blr7172	Q89EB5		2-hidroxiacido deshidrogenasa
blr2317	Q89ST3		Formato deshidrogenasa (subunidad α)
bll4782	Q89KW8		Piruvato deshidrogenasa (subunidad β)
bll4783	Q89KW7		Privato deshidrogenasa E1 (subunidad α)
blr4839	P94325	<i>gltA</i>	Citrato sintasa
bll0466	P70920	<i>acnA</i>	Aconitato hidratasa
blr5747	Q89I92	<i>icdA</i>	Isocitrato deshidrogenasa
bll0452	Q89X63	<i>sucA</i>	α -cetoglutarato deshidrogenasa
bll0453	Q89X62	<i>sucD</i>	Succinato CoA-ligasa (subunidad α)
blr0514	H7C6R5	<i>sdhA</i>	Succinato deshidrogenasa
blr0515	H7C6L4	<i>sdhB</i>	Succinato deshidrogenasa
bll5796	Q89I93		Fumarato hidratasa
blr6519	P28894	<i>fumC2</i>	Fumarato hidratasa (subunidad II)
bll0456	Q89X59	<i>mdh</i>	Malato deshidrogenasa

Tabla A.12.: Proteínas detectadas en el proteoma estudiado que no se expresaron en forma diferencial, pero participan en las vías descritas en el Capítulo 5.

Locus (Rhizobase)	Proteína ID (Uniprot)	Gen	Descripción
blr6758	Q89FE3	<i>tal</i>	Transaldolasa
blr6760	Q89FE1	<i>zwf</i>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
blr0368	Q89XE6		6-fosfogluconolactonasa
blr6759	Q89FE2		6-fosfogluconato deshidrogenasa
blr3755	Q89NS9		Ribosa-5-fosfato isomerasa A
bll1522	Q89U95		Fosfoglicerato quinasa
bll1523	Q89U94	<i>gapA</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
bll4807	Q89KU3	<i>tpiA</i>	Triosafosfato isomerasa
blr4363	Q89M30		Fructosa-1,6-bifosfatasa
blr0686	Q89WK1	<i>gpmA</i>	2,3-bifosfoglicerato mutasa
bll4794	Q89KV6	<i>eno</i>	Enolasa
blr7138	Q89EE7	<i>pykA</i>	Piruvato quinasa
blr0373	Q89XE1		Aminotransferasa hipotética
bll6037	Q89HF4		
bll5033	P24060	<i>glyA</i>	Serina hidrometil transferasa
bll5912	Q89HS7	<i>glyA</i>	Serina hidrometil transferasa
bll0449	Q89X65	<i>lpdA</i>	Dihidrodipoil deshidrogenasa
bll4778	Q89KX2	<i>lpdA</i>	Dihidrodipoil deshidrogenasa
blr7830	Q89CG7		Hidroxipiruvato reductasa
bll7402	Q89DN7	<i>serC</i>	Fosfoserina aminotransferasa
blr6505	Q89G42	<i>serB</i>	Fosfoserina fosfatasa

WT	TTCCTCTATTGCATTGAGGCCGTGAACCGCGCACAGGCCGCGTCGGGCGAGGTGAAGGGC	717
$\Delta cbbLFw$	-----	419
$\Delta cbbLRv$	-----	418
WT	ACGTACCTCAACATCACCGCGGAACGATGGAGGACATGTACGAGCGTGCGGAGTTCGCG	777
$\Delta cbbLFw$	-----	419
$\Delta cbbLRv$	-----	418
WT	AAGGAGCTCGGATCCTGCATCGTCATGATCGACCTCGTGATCGGCTACACCGGATCCAG	827
$\Delta cbbLFw$	-----	419
$\Delta cbbLRv$	-----	418
WT	TCGATGGCCAAAGTGGGCCCGGCCAATGACATGATCCTGCATCTGCATCGCGCCGCCAC	897
$\Delta cbbLFw$	-----	419
$\Delta cbbLRv$	-----	418
WT	TCGACCTATACGCGGCAGAAGAGCCATGGCGTGTGTTCCGTGTCATCGCCAAATGGATG	957
$\Delta cbbLFw$	-----	419
$\Delta cbbLRv$	-----	418
WT	CGGCTCGCCGGGTAGATCACATCCATGCCCGCACGGTGGTCGGCAAGCTCGAAGCCGAT	1017
$\Delta cbbLFw$	-----	419
$\Delta cbbLRv$	-----	418
WT	CCCAACACCACGCGTGGCTACTACGATGTCTGCCGCGAGGATTTCAATCCGACCAAGCTC	1077
$\Delta cbbLFw$	-----	419
$\Delta cbbLRv$	-----	418
WT	GAGCACGGCCTGTTCTTCGACCAGTCTCGGGCGAGCCTGAACAAGATGATGCCGGTGGCC	1137
$\Delta cbbLFw$	-----	419
$\Delta cbbLRv$	-----	418
WT	TCCGGCGCATCCATGCCGGCCAGATGCACCAGCTGCTCGATCTGTTGGGCGAGGACGTC	1197
$\Delta cbbLFw$	-----	419
$\Delta cbbLRv$	-----	418
WT	GTGCTGCAATTCGGCGGTGGCACGATCGGCCATCCCATGGGGATCGCGGCCGGCGGATC	1257
$\Delta cbbLFw$	-----	419
$\Delta cbbLRv$	-----	418
WT	GCCAACCGCGTGGCGCTGGAAGCGATGATCCTCGCCCGCAACGAGGGGCGCGACTACGTC	1317
$\Delta cbbLFw$	-----	419
$\Delta cbbLRv$	-----	418

Figura A.2.: Continuación. Secuencia de la mutante $\Delta cbbL$. (a) Salida de ClustalW2 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) donde se alineó la secuencia salvaje que abarca *cbbL* (rojo) y *cbbS* (azul) obtenida de *Rhizobase* con las secuencias de la región mutagenizada obtenidas por nosotros a partir de los cebadores FwExt_RBC ($\Delta cbbLFw$) y RvExt_RBC ($\Delta cbbLRv$). (b) Secuencia de aminoácidos deducida desde el marco de lectura de *cbbL*. Realizada con Expasy-Translate Tool (<https://web.expasy.org/translate/>). En rosa se muestran los marcos de lectura abiertos.

WT	CACGAAGGCCCGGAGATCCTGGCCAAGGCGGCCAGACCTGCACGCCGCTCAAGTCCGGC	1377
$\Delta cbbLFw$	-----	419
$\Delta cbbLRv$	-----	418
WT	CTCGAGGCTCTGGAAGGACGTGACCTTCAACTACCAGTCCACCGACACGCCGGACTTCGTG	1437
$\Delta cbbLFw$	-----	419
$\Delta cbbLRv$	-----	418
WT	CCAACGGCGCTGGAACCCGTTTGA AGGAGATGAGACATGAAACTGACCCAGGGCTGCTTCT	1497
$\Delta cbbLFw$	-----ATGAAACTGACCCAGGGCTGCTTCT	429
$\Delta cbbLRv$	-----ATGAAACTGACCCAGGGCTGCTTCT *****	428
WT	CGTTCCTACCCGATCTGACCGACGACCAGATCTATAAGCAGGTGCAGTATTGCCTCGCCA	1557
$\Delta cbbLFw$	CGTTCCTACCCGATCTGACCGACGACCAGATCTATAAGCAGGTGCAGTATTGCCTCGCCA	489
$\Delta cbbLRv$	CGTTCCTACCCGATCTGACCGACGACCAGATCTATAAGCAGGTGCAGTATTGCCTCGCCA *****	488
WT	AGGGCTGGGCGGTGAACATCGAGTTC ACTGACGATCCGCATCCCCGCAACACCTATTGGG	1617
$\Delta cbbLFw$	AGGGCTGGGCGGTGAACATCGAGTACTACTGACGATCCGCATCCCCGCAACACCTATTGGG	549
$\Delta cbbLRv$	AGGGCTGGGCGGTGAACATCGAGTACTACTGACGATCCGCATCCCCGCAACACCTATTGGG *****	548
WT	AGATGTGGGGCCTGCCGATGTTCCGACCTCCAGGACGCCGCCGGCGTGATGATGGAGCTCG	1677
$\Delta cbbLFw$	AGATGTGGGGCCTGCCGATGTTCCGACCTCCAGGACGCCGCCGGCGTGATGATGGAGCTCG	609
$\Delta cbbLRv$	AGATGTGGGGCCTGCCGATGTTCCGACCTCCAGGACGCCGCCGGCGTGATGATGGAGCTCG *****	608
WT	CGGAGTCCCGCAGGGTGTATGGCGACCGCTACATCCGCATCAGTGGCTTCGATTCCAGCC	1737
$\Delta cbbLFw$	CGGAGTCCCGCAGGGTGTATGGCGACCGCTACATCCGCATCAGTGGCTTCGATTCCAGCC	669
$\Delta cbbLRv$	CGGAGTCCCGCAGGGTGTATGGCGACCGCTACATCCGCATCAGTGGCTTCGATTCCAGCC *****	668
WT	CTGGCTGGGAGTCGGTGCGAATCTCCTTCCTCGTCAACCGGCCGCCGAGGAAGCCGAAT	1797
$\Delta cbbLFw$	CTGGCTGGGAGTCGGTGCGAATCTCCTTCCTCGTCAACCGGCCGCCGAGGAAGCCGAAT	729
$\Delta cbbLRv$	CTGGCTGGGAGTCGGTGCGAATCTCCTTCCTCGTCAACCGGCCGCCGAGGAAGCCGAAT *****	728
WT	TCGAGCTGGTGCGCCAGGAAGTGGGGGACCGCAATCCGCTACACCACCGTCCGAAAGG	1857
$\Delta cbbLFw$	CGAGCTGTCGCCAG-----	743
$\Delta cbbLRv$	TCGAGCTGGTGCGCCAG----- *	745
WT	CTCCCGCACACGTGTCCTGA	1877
$\Delta cbbLFw$	-----	743
$\Delta cbbLRv$	-----	745

(b) 5' Frame 1

MNAHTGTVRGKERYRSGVMEYKRMGYWEPDYTPKDTDVIALFRVTPQEGVDPPIEASAAVA
 GESSTATWTVVWTDRLTAAEKYRAKCYRVDVPGTPGSYFAYIAYDLDFEPGSIANLSA
 SIIGNVFGFKPLKA-N-PRAASRSYPI-PTTRSISRCSIASPRAGR-TSSSLTIRIPATP
 IGRCGACRCSTSRTPPA--WSSRSAAGCMATATSASVASIPALAGSRCESPSSSTGRRRK
 PNSSWCARKWGDQSATPPCERLPHTCE

Figura A.3.: Continuación. Secuencia de la mutante $\Delta cbbL$. (a) Salida de ClustalW2 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) donde se alineó la secuencia salvaje que abarca *cbbL* (rojo) y *cbbS* (azul) obtenida de *Rhizobase* con las secuencias de la región mutagenizada obtenidas por nosotros a partir de los cebadores FwExt_RBC ($\Delta cbbLFw$) y RvExt_RBC ($\Delta cbbLRv$). (b) Secuencia de aminoácidos deducida desde el marco de lectura de *cbbL*. Realizada con ExPasy-Translate Tool (<https://web.expasy.org/translate/>). En rosa se muestran los marcos de lectura abiertos.

Bibliografía

- [1] ALTHABEGOITI, M. J., COVELLI, J. M., PÉREZ-GIMÉNEZ, J., QUELAS, J. I., MONGIARDINI, E. J., LÓPEZ, M. F., LÓPEZ-GARCÍA, S. L., AND LODEIRO, A. R. Analysis of the role of the two flagella of bradyrhizobium japonicum in competition for nodulation of soybean. *FEMS microbiology letters* 319, 2 (2011), 133–139.
- [2] ALTHABEGOITI, M. J., LÓPEZ-GARCÍA, S. L., PICCINETTI, C., MONGIARDINI, E. J., PÉREZ-GIMÉNEZ, J., QUELAS, J. I., PERTICARI, A., AND LODEIRO, A. R. Strain selection for improvement of bradyrhizobium japonicum competitiveness for nodulation of soybean. *FEMS microbiology letters* 282, 1 (2008), 115–123.
- [3] ANDERSEN, K. B., AND VON MEYENBURG, K. Are growth rates of escherichia coli in batch cultures limited by respiration? *Journal of Bacteriology* 144, 1 (1980), 114–123.
- [4] AR, L., MJ, A., C, P., JM, C., EJ, M., J, P. G., JI, Q., SL, L. G., AND A, P. II jornadas bonaerenses de microbiología de suelos para una agricultura sustentable. azul. cepas con mayor movilidad para la mejora de la fijación de n₂ en soja. In *Herramientas Microbiológicas y Biotecnológicas Aplicadas a la Producción Vegetal*. (2009).
- [5] ATKINSON, D. E. Energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7, 11 (1968), 4030–4034.
- [6] BAKER, A. E., AND O'TOOLE, G. A. Bacteria, rev your engines: Stator dynamics regulate flagellar motility. *Journal of bacteriology* 199, 12 (2017), e00088–17.
- [7] BAKER, M. D., WOLANIN, P. M., AND STOCK, J. B. Signal transduction in bacterial chemotaxis. *Bioessays* 28, 1 (2006), 9–22.
- [8] BARAK, R., AND EISENBACH, M. Correlation between phosphorylation of the chemotaxis protein cheY and its activity at the flagellar motor. *Biochemistry* 31, 6 (1992), 1821–1826.
- [9] BARRAUD, N., KJELLEBERG, S., AND RICE, S. A. Dispersal from microbial biofilms. *Microbiol Spectr* 3, 6 (2015).
- [10] BENNETT, B. D., KIMBALL, E. H., GAO, M., OSTERHOUT, R., VAN DIEN, S. J., AND RABINOWITZ, J. D. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in escherichia coli. *Nature chemical biology* 5, 8 (2009), 593.

-
- [11] BERG, H. C., AND BROWN, D. A. Chemotaxis in escherichia coli analysed by three-dimensional tracking. *Nature* 239, 5374 (1972), 500.
- [12] BERG, H. C., AND TURNER, L. Torque generated by the flagellar motor of escherichia coli. *Biophysical journal* 65, 5 (1993), 2201–2216.
- [13] BERG, O. G. A model for the statistical fluctuations of protein numbers in a microbial population. *Journal of theoretical biology* 71, 4 (1978), 587–603.
- [14] BERRY, R. M. Bacterial flagella: Flagellar motor. *eLS* (2001).
- [15] BERRY, R. M., AND ARMITAGE, J. P. The bacterial flagella motor. In *Advances in microbial physiology*, vol. 41. Elsevier, 1999, pp. 291–337.
- [16] BOLGIANO, B., SALMON, I., AND POOLE, R. K. Reactions of the membrane-bound cytochrome bo terminal oxidase of escherichia coli with carbon monoxide and oxygen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1141, 1 (1993), 95–104.
- [17] BOUDART, M. Consistency between kinetics and thermodynamics. *The Journal of Physical Chemistry* 80, 26 (1976), 2869–2870.
- [18] CABRERA, R., BAEZ, M., PEREIRA, H. M., CANIUGUIR, A., GARRATT, R. C., AND BABUL, J. The crystal complex of phosphofructokinase-2 of escherichia coli with fructose-6-phosphate kinetic and structural analysis of the allosteric atp inhibition. *Journal of Biological Chemistry* 286, 7 (2011), 5774–5783.
- [19] CAIRNS, C. B., WALTHER, J., HARKEN, A. H., AND BANERJEE, A. Mitochondrial oxidative phosphorylation thermodynamic efficiencies reflect physiological organ roles. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 274, 5 (1998), R1376–R1383.
- [20] CEVALLOS, M. A., ENCARNACION, S., LEIJA, A., MORA, Y., AND MORA, J. Genetic and physiological characterization of a rhizobium etli mutant strain unable to synthesize poly-beta-hydroxybutyrate. *Journal of Bacteriology* 178, 6 (1996), 1646–1654.
- [21] CHEN, X., AND BERG, H. C. Torque-speed relationship of the flagellar rotary motor of escherichia coli. *Biophysical journal* 78, 2 (2000), 1036–1041.
- [22] CHILCOTT, G. S., AND HUGHES, K. T. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in salmonella enterica serovar typhimurium and escherichia coli. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 4 (2000), 694–708.
- [23] COONEY, C. L., WANG, H. Y., AND WANG, D. I. Computer-aided material balancing for prediction of fermentation parameters. *Biotechnology and bioengineering* 19, 1 (1977), 55–67.

- [24] COVELLI, J. M., ALTHABEGOITI, M. J., LÓPEZ, M. F., AND LODEIRO, A. R. Swarming motility in bradyrhizobium japonicum. *Research in microbiology* 164, 2 (2013), 136–144.
- [25] DARNTON, N. C., TURNER, L., ROJEVSKY, S., AND BERG, H. C. On torque and tumbling in swimming escherichia coli. *Journal of bacteriology* 189, 5 (2007), 1756–1764.
- [26] DE GRAEF, M. R., ALEXEEVA, S., SNOEP, J. L., AND DE MATTOS, M. J. T. The steady-state internal redox state (nadh/nad) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in escherichia coli. *Journal of bacteriology* 181, 8 (1999), 2351–2357.
- [27] DELMOTTE, N., AHRENS, C. H., KNIEF, C., QELI, E., KOCH, M., FISCHER, H.-M., VORHOLT, J. A., HENNECKE, H., AND PESSI, G. An integrated proteomics and transcriptomics reference data set provides new insights into the bradyrhizobium japonicum bacteroid metabolism in soybean root nodules. *Proteomics* 10, 7 (2010), 1391–1400.
- [28] DEMIREL, Y., AND SANDLER, S. I. Thermodynamics and bioenergetics. *Biophysical chemistry* 97, 2-3 (2002), 87–111.
- [29] DONATI, A. J., JEON, J.-M., SANGURDEKAR, D., SO, J.-S., AND CHANG, W.-S. The genome-wide transcriptional and physiological responses of bradyrhizobium japonicum to paraquat-mediated oxidative stress. *Applied and environmental microbiology* (2011), AEM-00047.
- [30] DUDKINA, N. V., KOUŘIL, R., PETERS, K., BRAUN, H.-P., AND BOEKEMA, E. J. Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1797, 6-7 (2010), 664–670.
- [31] EHLERS, K., AND OSTER, G. On the mysterious propulsion of synechococcus. *PLoS One* 7, 5 (2012), e36081.
- [32] ET, I., J, P. G., JM, C., AND AR, L. Selección de variantes más móviles de dos cepas aloctonas con buena capacidad fijadora de n₂. In *III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental (CAMAyA). Libro de Resúmenes. Poster A53* (2015).
- [33] EVANS, L. D., HUGHES, C., AND FRASER, G. M. Building a flagellum outside the bacterial cell. *Trends in microbiology* 22, 10 (2014), 566–572.
- [34] FELL, D., AND CORNISH-BOWDEN, A. *Understanding the control of metabolism*, vol. 2. Portland press London, 1997.
- [35] FENCHEL, T., AND FINLAY, B. J. *Ecology and evolution in anoxic worlds*. Oxford; New York: Oxford University Press, 1995, 1995.
- [36] FRANCK, W. L., CHANG, W.-S., QIU, J., SUGAWARA, M., SADOWSKY, M. J., SMITH, S. A., AND STACEY, G. Whole-genome transcriptional profiling of bradyrhizobium japonicum during chemoautotrophic growth. *Journal of bacteriology* 190, 20 (2008), 6697–6705.

- [37] FRETIN, D., FAUCONNIER, A., KÖHLER, S., HALLING, S., LÉONARD, S., NIJSKENS, C., FERROOZ, J., LESTRATE, P., DELRUE, R.-M., DANESE, I., ET AL. The sheathed flagellum of brucella melitensis is involved in persistence in a murine model of infection. *Cellular microbiology* 7, 5 (2005), 687–698.
- [38] FRIEDMAN, N., CAI, L., AND XIE, X. S. Linking stochastic dynamics to population distribution: an analytical framework of gene expression. *Physical review letters* 97, 16 (2006), 168302.
- [39] GABEL, C. V., AND BERG, H. C. The speed of the flagellar rotary motor of escherichia coli varies linearly with protonmotive force. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 15 (2003), 8748–8751.
- [40] GARRIDO-SANZ, D., REDONDO-NIETO, M., MONGIARDINI, E., BLANCO-ROMERO, E., DURÁN, D., QUELAS, J. I., MARTIN, M., RIVILLA, R., LODEIRO, A. R., AND ALTHABEGOITI, M. J. Phylogenomic analyses of bradyrhizobium reveal uneven distribution of the lateral and subpolar flagellar systems, which extends to rhizobiales. *Microorganisms* 7, 2 (2019), 50.
- [41] GÖTZ, R., LIMMER, N., OBER, K., AND SCHMITT, R. Motility and chemotaxis in two strains of rhizobium with complex flagella. *Microbiology* 128, 4 (1982), 789–798.
- [42] GOURION, B., DELMOTTE, N., BONALDI, K., NOUWEN, N., VORHOLT, J. A., AND GIRAUD, E. Bacterial rubisco is required for efficient bradyrhizobium/aeschynomene symbiosis. *PloS one* 6, 7 (2011), e21900.
- [43] HACKENBROCK, C. R., CHAZOTTE, B., AND GUPTE, S. S. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 18, 5 (1986), 331–368.
- [44] HANUS, F. J., MAIER, R. J., AND EVANS, H. J. Autotrophic growth of h₂-uptake-positive strains of rhizobium japonicum in an atmosphere supplied with hydrogen gas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 4 (1979), 1788–1792.
- [45] HARSHEY, R. M. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Reviews in Microbiology* 57, 1 (2003), 249–273.
- [46] HENRICHSEN, J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological reviews* 36, 4 (1972), 478.
- [47] HERBERT, D. Recent progress in microbiology. In *VII International Congress for Microbiology* (1958), pp. 381–396.
- [48] HERBERT, D., PHIPPS, P., AND STRANGE, R. Chapter iii chemical analysis of microbial cells. In *Methods in microbiology*, vol. 5. Elsevier, 1971, pp. 209–344.

- [49] HIROTA, N., KITADA, M., AND IMAE, Y. Flagellar motors of alkalophilic bacillus are powered by an electrochemical potential gradient of Na^+ . *FEBS Letters* 132, 2 (1981), 278–280.
- [50] HOBEN, H., AND SOMASEGARAN, P. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of rhizobium spp. in inoculants made from presterilized peat. *Applied and environmental microbiology* 44, 5 (1982), 1246–1247.
- [51] HORKEN, K. M., AND TABITA, F. R. Closely related form i ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase molecules that possess different CO_2/O_2 substrate specificities. *Archives of biochemistry and biophysics* 361, 2 (1999), 183–194.
- [52] HUGHES, K. T., GILLEN, K. L., SEMON, M. J., AND KARLINSEY, J. E. Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* 262, 5137 (1993), 1277–1280.
- [53] IINO, R., HASEGAWA, R., TABATA, K. V., AND NOJI, H. Mechanism of inhibition by c-terminal alpha-helices of the epsilon subunit of escherichia coli fof1-atp synthase. *Journal of Biological Chemistry* (2009), jbc-M109.
- [54] IMAE, Y., AND ATSUMI, T. Na^+ -driven bacterial flagellar motors. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 21, 6 (1989), 705–716.
- [55] JARRELL, K. F. *Pili and flagella: current research and future trends*. Horizon Scientific Press, 2009.
- [56] JARRELL, K. F., AND MCBRIDE, M. J. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nature Reviews Microbiology* 6, 6 (2008), 466–476.
- [57] JIN, Q., AND BETHKE, C. M. Kinetics of electron transfer through the respiratory chain. *Biophysical Journal* 83, 4 (2002), 1797–1808.
- [58] KANBE, M., YAGASAKI, J., ZEHNER, S., GÖTTTFERT, M., AND AIZAWA, S.-I. Characterization of two sets of subpolar flagella in bradyrhizobium japonicum. *Journal of bacteriology* 189, 3 (2007), 1083–1089.
- [59] KANEKO, T., NAKAMURA, Y., SATO, S., MINAMISAWA, K., UCHIUMI, T., SASAMOTO, S., WATANABE, A., IDESAWA, K., IRIGUCHI, M., KAWASHIMA, K., ET AL. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium bradyrhizobium japonicum usda110. *DNA research* 9, 6 (2002), 189–197.
- [60] KASHKET, E. R. Stoichiometry of the proton-atpase of growing and resting, aerobic escherichia coli. *Biochemistry* 21, 22 (1982), 5534–5538.
- [61] KIM, E. A., PRICE-CARTER, M., CARLQUIST, W. C., AND BLAIR, D. F. Membrane segment organization in the stator complex of the flagellar motor: implications for proton flow and proton-induced conformational change. *Biochemistry* 47, 43 (2008), 11332–11339.

- [62] KOCH, M., DELMOTTE, N., AHRENS, C. H., OMASITS, U., SCHNEIDER, K., DANZA, F., PADHI, B., MURSET, V., BRAISSANT, O., VORHOLT, J. A., ET AL. A link between arabinose utilization and oxalotrophy in bradyrhizobium japonicum. *Applied and environmental microbiology* (2014), AEM-03314.
- [63] KUYKENDALL, L., AND ELKAN, G. Some features of mannitol metabolism in rhizobium japonicum. *Microbiology* 98, 1 (1977), 291–295.
- [64] LABHSETWAR, P., COLE, J. A., ROBERTS, E., PRICE, N. D., AND LUTHEY-SCHULTEN, Z. A. Heterogeneity in protein expression induces metabolic variability in a modeled escherichia coli population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 34 (2013), 14006–14011.
- [65] LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *nature* 227, 5259 (1970), 680.
- [66] LAMBORG, M., HARDY, R., AND PAUL, E. Microbial effects. In *Am. Assoc. Adv. Sci., Symp.:(United States)* (1983), no. CONF-8205274-, CF Kettering Research Lab., Yellow Springs, OH.
- [67] LAW, J. H., AND SLEPECKY, R. A. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *Journal of bacteriology* 82, 1 (1961), 33–36.
- [68] LEE, B., BERKA, R., AND TABITA, F. Mutations in the small subunit of cyanobacterial ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase that modulate interactions with large subunits. *Journal of Biological Chemistry* 266, 12 (1991), 7417–7422.
- [69] LELE, P. P., AND BERG, H. C. Switching of bacterial flagellar motors triggered by mutant flig. *Biophysical journal* 108, 5 (2015), 1275–1280.
- [70] LELE, P. P., HOSU, B. G., AND BERG, H. C. Dynamics of mechanosensing in the bacterial flagellar motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 29 (2013), 11839–11844.
- [71] LODEIRO, A. R., LOPEZ-GARCIA, S. L., VAZQUEZ, T. E., AND FAVELUKES, G. Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of bradyrhizobium japonicum by its pretreatment with soybean seed lectin. *FEMS microbiology letters* 188, 2 (2000), 177–184.
- [72] LÓPEZ-GARCÍA, S., FAVELUKES, G., AND LODEIRO, A. Infectivity and competitiveness for nodulation of n-limited bradyrhizobium japonicum. In *Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity*. Springer, 2002, pp. 609–609.
- [73] LÓPEZ-GARCÍA, S., PERTICARI, A., PICCINETTI, C., VENTIMIGLIA, L., ARIAS, N., DE BATTISTA, J., ALTHABEGOITI, M., MONGIARDINI, E., PÉREZ-GIMÉNEZ, J., QUELAS, J., ET AL. In-furrow inoculation and selection for higher motility enhances the efficacy of bradyrhizobium japonicum nodulation. *Agronomy journal* 101, 2 (2009), 357–363.

- [74] MAIER, R. M., AND PEPPER, I. L. Bacterial growth. In *Environmental microbiology*. Elsevier, 2015, pp. 37–56.
- [75] MANSON, M. D., TEDESCO, P., BERG, H. C., HAROLD, F. M., AND VAN DER DRIFT, C. A protonmotive force drives bacterial flagella. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *74*, 7 (1977), 3060–3064.
- [76] MASUDA, S., EDA, S., SUGAWARA, C., MITSUI, H., AND MINAMISAWA, K. The *cbbl* gene is required for thiosulfate-dependent autotrophic growth of bradyrhizobium japonicum. *Microbes and environments* *25*, 3 (2010), 220–223.
- [77] MCCARTER, L. L. Regulation of flagella. *Current opinion in microbiology* *9*, 2 (2006), 180–186.
- [78] MEISTER, M., LOWE, G., AND BERG, H. C. The proton flux through the bacterial flagellar motor. *Cell* *49*, 5 (1987), 643–650.
- [79] MELO, A. M., AND TEIXEIRA, M. Supramolecular organization of bacterial aerobic respiratory chains: From cells and back. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* *1857*, 3 (2016), 190–197.
- [80] MERINO, S., SHAW, J. G., AND TOMÁS, J. M. Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. *FEMS microbiology letters* *263*, 2 (2006), 127–135.
- [81] MITCHELL, P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. In *Biochemical Journal* (1961), vol. 79, PORTLAND PRESS 59 PORTLAND PLACE, LONDON W1N 3AJ, ENGLAND, p. P23.
- [82] MITCHELL, P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biological Reviews* *41*, 3 (1966), 445–501.
- [83] MONGIARDINI, E. J., QUELAS, J. I., DARDIS, C., ALTHABEGOITI, M. J., AND LODEIRO, A. R. Transcriptional control of the lateral-flagellar genes of bradyrhizobium diazoefficiens. *Journal of bacteriology* (2017), JB–00253.
- [84] MONOD, J. The growth of bacterial cultures. *Annual Reviews in Microbiology* *3*, 1 (1949), 371–394.
- [85] MORIMOTO, Y. V., AND MINAMINO, T. Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor. *Biomolecules* *4*, 1 (2014), 217–234.
- [86] NAKAMURA, S., KAMI-IKE, N., JUN-ICHI, P. Y., KUDO, S., MINAMINO, T., AND NAMBA, K. Effect of intracellular ph on the torque–speed relationship of bacterial proton-driven flagellar motor. *Journal of molecular biology* *386*, 2 (2009), 332–338.
- [87] OKUNO, D., IINO, R., AND NOJI, H. Rotation and structure of f o f 1-atp synthase. *The Journal of Biochemistry* *149*, 6 (2011), 655–664.

- [88] O'MAY, C., AND TUFENKJI, N. The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 9 (2011), 3061–3067.
- [89] PARKINSON, J. S. Bacterial chemotaxis: a new player in response regulator dephosphorylation. *Journal of bacteriology* 185, 5 (2003), 1492–1494.
- [90] PEDROSA, F. O., AND ZANCAN, G. T. L-arabinose metabolism in *Rhizobium japonicum*. *Journal of bacteriology* 119, 1 (1974), 336–338.
- [91] PÉREZ-GIMÉNEZ, J., COVELLI, J. M., LÓPEZ, M. F., ALTHABEGOITI, M. J., FERRER-NAVARRO, M., MONGIARDINI, E. J., AND LODEIRO, A. R. Soybean seed lectin prevents the accumulation of S-adenosyl methionine synthetase and the S1 30S ribosomal protein in *Bradyrhizobium japonicum* under C and N starvation. *Current microbiology* 65, 4 (2012), 465–474.
- [92] PÉREZ-GIMÉNEZ, J., QUELAS, J. I., AND LODEIRO, A. R. Competition for nodulation. In *Soybean Physiology and Biochemistry*. InTech, 2011.
- [93] PESSI, G., AHRENS, C. H., REHRAUER, H., LINDEMANN, A., HAUSER, F., FISCHER, H.-M., AND HENNECKE, H. Genome-wide transcript analysis of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids in soybean root nodules. *Molecular plant-microbe interactions* 20, 11 (2007), 1353–1363.
- [94] PIRT, S. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 163, 991 (1965), 224–231.
- [95] PRIGOGINE, I., AND KONDEPUDI, D. Modern thermodynamics. *From heat engines to dissipative structures* (1998).
- [96] QUELAS, J. I., ALTHABEGOITI, M. J., JIMENEZ-SANCHEZ, C., MELGAREJO, A. A., MARCONI, V. I., MONGIARDINI, E. J., TREJO, S. A., MENGUCCI, F., ORTEGA-CALVO, J.-J., AND LODEIRO, A. R. Swimming performance of *Bradyrhizobium diazoefficiens* is an emergent property of its two flagellar systems. *Scientific Reports* 6 (2016), 23841.
- [97] QUELAS, J. I., MESA, S., MONGIARDINI, E. J., JENDROSSEK, D., AND LODEIRO, A. Regulation of polyhydroxybutyrate synthesis in the soil bacterium *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *Applied and environmental microbiology* 82, 14 (2016), 4299–4308.
- [98] QUELAS, J. I., MONGIARDINI, E. J., CASABUONO, A., LÓPEZ-GARCÍA, S. L., ALTHABEGOITI, M. J., COVELLI, J. M., PÉREZ-GIMÉNEZ, J., COUTO, A., AND LODEIRO, A. R. Lack of galactose or galacturonic acid in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 exopolysaccharide leads to different symbiotic responses in soybean. *Molecular plant-microbe interactions* 23, 12 (2010), 1592–1604.

- [99] QUELAS, J. I., MONGIARDINI, E. J., PÉREZ-GIMÉNEZ, J., PARISI, G., AND LODEIRO, A. R. Analysis of two polyhydroxyalkanoate (pha) synthases in bradyrhizobium japonicum usda 110. *Journal of bacteriology* (2013), JB-02203.
- [100] READ, B. A., AND TABITA, F. R. A hybrid ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase enzyme exhibiting a substantial increase in substrate specificity factor. *Biochemistry* 31, 24 (1992), 5553–5560.
- [101] REGENSBURGER, B., AND HENNECKE, H. Rna polymerase from rhizobium japonicum. *Archives of microbiology* 135, 2 (1983), 103–109.
- [102] REGUS, J. U., QUIDES, K. W., O’NEILL, M. R., SUZUKI, R., SAVORY, E. A., CHANG, J. H., AND SACHS, J. L. Cell autonomous sanctions in legumes target ineffective rhizobia in nodules with mixed infections. *American journal of botany* 104, 9 (2017), 1299–1312.
- [103] ROTTER, C., MÜHLBACHER, S., SALAMON, D., SCHMITT, R., AND SCHARF, B. Rem, a new transcriptional activator of motility and chemotaxis in sinorhizobium meliloti. *Journal of bacteriology* 188, 19 (2006), 6932–6942.
- [104] SADOWSKY, M. J., TULLY, R. E., CREGAN, P. B., AND KEYSER, H. H. Genetic diversity in bradyrhizobium japonicum serogroup 123 and its relation to genotype-specific nodulation of soybean. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 11 (1987), 2624–2630.
- [105] SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T., ET AL. *Molecular cloning: a laboratory manual*. No. Ed. 2. Cold spring harbor laboratory press, 1989.
- [106] SARMA, A. D., AND EMERICH, D. W. Global protein expression pattern of bradyrhizobium japonicum bacteroids: a prelude to functional proteomics. *Proteomics* 5, 16 (2005), 4170–4184.
- [107] SATO, K., AND HOMMA, M. Functional reconstitution of the na⁺-driven polar flagellar motor component of vibrio alginolyticus. *Journal of Biological Chemistry* 275, 8 (2000), 5718–5722.
- [108] SCHÄFER, A., TAUCH, A., JÄGER, W., KALINOWSKI, J., THIERBACH, G., AND PÜHLER, A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the escherichia coli plasmids pk18 and pk19: selection of defined deletions in the chromosome of corynebacterium glutamicum. *Gene* 145, 1 (1994), 69–73.
- [109] SCHUHMACHER, J. S., THORMANN, K. M., AND BANGE, G. How bacteria maintain location and number of flagella? *FEMS microbiology reviews* 39, 6 (2015), 812–822.
- [110] SIM, M., KOIRALA, S., PICTON, D., STRAHL, H., HOSKISSON, P. A., RAO, C. V., GILLESPIE, C. S., AND ALDRIDGE, P. D. Growth rate control of flagellar assembly in escherichia coli strain rp437. *Scientific reports* 7 (2017), 41189.

- [111] SIMON, R., PRIEFER, U., AND PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/technology* 1, 9 (1983), 784.
- [112] SJOBLAD, R. D., EMALA, C. W., AND DOETSCH, R. N. Invited review: bacterial flagellar sheaths: structures in search of a function. *Cell motility* 3, 1 (1983), 93–103.
- [113] SOGA, N., KINOSITA, K., YOSHIDA, M., AND SUZUKI, T. Kinetic equivalence of transmembrane ph and electrical potential differences in atp synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 287, 12 (2012), 9633–9639.
- [114] SON, K., GUASTO, J. S., AND STOCKER, R. Bacteria can exploit a flagellar buckling instability to change direction. *Nature physics* 9, 8 (2013), 494.
- [115] SOSA-SAAVEDRA, F., LEÓN-BARRIOS, M., AND PÉREZ-GALDONA, R. Pentose phosphate pathway as the main route for hexose catabolism in bradyrhizobium sp. lacking entner–doudoroff pathway. a role for nad⁺-dependent 6-phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating). *Soil Biology and Biochemistry* 33, 3 (2001), 339–343.
- [116] SOUSA, P. M., VIDEIRA, M. A., BOHN, A., HOOD, B. L., CONRADS, T. P., GOULAO, L. F., AND MELO, A. M. The aerobic respiratory chain of escherichia coli: from genes to supercomplexes. *Microbiology* 158, 9 (2012), 2408–2418.
- [117] SOUTOURINA, O. A., AND BERTIN, P. N. Regulation cascade of flagellar expression in gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews* 27, 4 (2003), 505–523.
- [118] SOWA, Y., HOTTA, H., HOMMA, M., AND ISHIJIMA, A. Torque–speed relationship of the na⁺-driven flagellar motor of vibrio alginolyticus. *Journal of molecular biology* 327, 5 (2003), 1043–1051.
- [119] STEIGMILLER, S., TURINA, P., AND GRÄBER, P. The thermodynamic h⁺/atp ratios of the h⁺-atpsynthases from chloroplasts and escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 10 (2008), 3745–3750.
- [120] STOCK, D., NAMBA, K., AND LEE, L. K. Nanorotors and self-assembling macromolecular machines: the torque ring of the bacterial flagellar motor. *Current opinion in biotechnology* 23, 4 (2012), 545–554.
- [121] STOLPER, D. A., REVSBECH, N. P., AND CANFIELD, D. E. Aerobic growth at nanomolar oxygen concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 44 (2010), 18755–18760.
- [122] STOWERS, M. D. Carbon metabolism in rhizobium species. *Annual Reviews in Microbiology* 39, 1 (1985), 89–108.

- [123] TANIGUCHI, Y., CHOI, P. J., LI, G.-W., CHEN, H., BABU, M., HEARN, J., EMILI, A., AND XIE, X. S. Quantifying e. coli proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. *Science* 329, 5991 (2010), 533–538.
- [124] TAYMAZ-NIKEREL, H., DE MEY, M., RAS, C., TEN PIERICK, A., SEIFAR, R. M., VAN DAM, J. C., HEIJNEN, J. J., AND VAN GULIK, W. M. Development and application of a differential method for reliable metabolome analysis in escherichia coli. *Analytical biochemistry* 386, 1 (2009), 9–19.
- [125] TERASHIMA, H., FUKUOKA, H., YAKUSHI, T., KOJIMA, S., AND HOMMA, M. The vibrio motor proteins, motx and moty, are associated with the basal body of na⁺-driven flagella and required for stator formation. *Molecular microbiology* 62, 4 (2006), 1170–1180.
- [126] THORNE, D., AND BURRIS, R. Respiratory enzyme systems in symbiotic nitrogen fixation: Iii. the respiration of rhizobium from legume nodules and laboratory cultures 1. *Journal of bacteriology* 39, 2 (1940), 187.
- [127] TIPPING, M. J., DELALEZ, N. J., LIM, R., BERRY, R. M., AND ARMITAGE, J. P. Load-dependent assembly of the bacterial flagellar motor. *MBio* 4, 4 (2013), e00551–13.
- [128] TIPPING, M. J., STEEL, B. C., DELALEZ, N. J., BERRY, R. M., AND ARMITAGE, J. P. Quantification of flagellar motor stator dynamics through in vivo proton-motive force control. *Molecular microbiology* 87, 2 (2013), 338–347.
- [129] VERKHOVSKAYA, M., AND BLOCH, D. A. Energy-converting respiratory complex i: on the way to the molecular mechanism of the proton pump. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45, 2 (2013), 491–511.
- [130] VILLADSEN, J., NIELSEN, J., AND LIDÉN, G. *Bioreaction engineering principles*. Springer Science & Business Media, 2011.
- [131] VINCENT, J. M., ET AL. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria*. (1970).
- [132] VIZCAÍNO, J. A., CSORDAS, A., DEL-TORO, N., DIANES, J. A., GRISS, J., LAVIDAS, I., MAYER, G., PEREZ-RIVEROL, Y., REISINGER, F., TERNENT, T., ET AL. 2016 update of the pride database and its related tools. *Nucleic acids research* 44, D1 (2015), D447–D456.
- [133] WALZ, D. Biothermokinetics of processes and energy conversion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1019, 3 (1990), 171–224.
- [134] WATANABE, S., SHIMADA, N., TAJIMA, K., KODAKI, T., AND MAKINO, K. Identification and characterization of l-arabonate dehydratase, l-2-keto-3-deoxyarabonate dehydratase and l-arabinolactonase involved in an alternative pathway of l-arabinose metabolism: novel evolutionary insight into sugar metabolism. *Journal of Biological Chemistry* (2006).

-
- [135] WIKSTRÖM, M., AND HUMMER, G. Stoichiometry of proton translocation by respiratory complex i and its mechanistic implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2012).
- [136] WOLGEMUTH, C. W. Flagellar motility of the pathogenic spirochetes. In *Seminars in cell & developmental biology* (2015), vol. 46, Elsevier, pp. 104–112.
- [137] WU, J., AND NEWTON, A. Regulation of the caulobacter flagellar gene hierarchy; not just for motility. *Molecular microbiology* 24, 2 (1997), 233–239.
- [138] XIE, L., ALTINDAL, T., CHATTOPADHYAY, S., AND WU, X.-L. Bacterial flagellum as a propeller and as a rudder for efficient chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 6 (2011), 2246–2251.
- [139] YAMAGUCHI, S., AIZAWA, S.-L., KIHARA, M., ISOMURA, M., JONES, C., AND MACNAB, R. Genetic evidence for a switching and energy-transducing complex in the flagellar motor of salmonella typhimurium. *Journal of bacteriology* 168, 3 (1986), 1172–1179.
- [140] YANG, J., SANGWAN, I., LINDEMANN, A., HAUSER, F., HENNECKE, H., FISCHER, H.-M., AND O'BRIAN, M. R. Bradyrhizobium japonicum senses iron through the status of haem to regulate iron homeostasis and metabolism. *Molecular microbiology* 60, 2 (2006), 427–437.
- [141] ZHOU, J., SHARP, L. L., TANG, H. L., LLOYD, S. A., BILLINGS, S., BRAUN, T. F., AND BLAIR, D. F. Function of protonatable residues in the flagellar motor of escherichia coli: a critical role for asp 32 of motB. *Journal of Bacteriology* 180, 10 (1998), 2729–2735.

Nomenclatura

Ara	L-arabinosa
Ara-Dif	Grupo de proteínas diferenciales en L-arabinosa
ARNm	Acido Ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina Trifosfato
ATP	Adenosin trifosfato
C-mol	Carbono mol
CBB	Calvin Benson Bassham
Cm	Cloranfenicol
CoA	Coenzima A
CTE	Cadena Transportadora de Electrones
CTE	Cadena de transporte de electrones
DO	Densidad Óptica
ED	Entner-Doudoroff
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
FADH ₂	Flavin adenin dinucleótido reducido
HME	Medio HM sales con extracto de levadura
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
Km	Kanamicina
L-KDA	2-keto-3-deoxi-L-arabonato
Mtl	D-manitol
Mtl-Dif	Grupo de proteínas diferenciales en D-manitol
NADH	Nicotin adenin dinucleótido reducido
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PHB	Polihidroxi butirato
PP	Pentosas Fosfato

rpm	revoluciones por minuto
RuBisCO	Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
Sm	Estreptomicina
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos o Ciclo de Krebs
UFC	Unidad Formadora de Colonia
VVM	Volumen de aire por volumen de líquido por minuto
YEM	Medio Extracto de Levadura-Manitol