

INFLUENCIA DE LA DENSIDAD CELULAR SOBRE LA PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS (EPS), POLISACÁRIDOS CAPSULARES (KPS), LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS) Y PROTEÍNAS CELULARES TOTALES EN LAS CEPAS *S. meliloti* B-399 y *B. japonicum* E-109

S. LARROULET^{1*}; C. CASTAÑO¹; G. LORDA¹ y F. PAGLIERO¹

Recibido: 14/06/11

Aceptado: 14/07/11

RESUMEN

Ciertas bacterias regulan genes específicos en respuesta a la densidad de población (*quorum sensing*), hecho que ha sido relacionado con varios fenómenos como la eficiencia de nodulación, producción de polisacáridos, fijación de nitrógeno, entre otros. El objetivo de este trabajo fue conocer si las densidades celulares alcanzadas por los cultivos rizobianos en diferentes fases de la curva de crecimiento, afectan la producción de exopolisacáridos (EPS), polisacáridos capsulares (KPS), lipopolisacáridos (LPS) y proteínas totales. Para tal fin se utilizaron las cepas de referencia *Bradyrhizobium japonicum* E-109 y *Sinorhizobium meliloti* B-399. Los resultados mostraron aumento en la concentración de EPS, KPS y proteínas, así como diferencias en los perfiles de LPS y proteínas totales en las diferentes fases comparadas, permitiendo concluir que los distintos niveles de densidad celular alcanzados por cultivos rizobianos, inducirían una respuesta fisiológica diferente en relación con la síntesis de EPS, KPS, LPS y proteínas totales.

Palabras clave. Rizobios; fases de crecimiento; polisacáridos y proteínas celulares.

INFLUENCE OF CELL DENSITY ON EXOPOLYSACCHARIDES (EPS), CAPSULAR POLYSACCHARIDES (KPS), LIPOPOLYSACCHARIDES (LPS) AND TOTAL CELL PROTEINS PRODUCTION IN *S. meliloti* B-399 AND *B. japonicum* E-109 STRAINS

SUMMARY

Some bacteria regulate specific genes in response to population density (*quorum sensing*) and have been related to different phenomena including nodulation efficiency, polysaccharides production, nitrogen fixation, among others. The aim of this work has been to determine whether the cell densities reached by the rhizobium cultures at different points of the growth curve affect the production of exopolysaccharides (EPS), capsular polysaccharides (KPS), lipopolysaccharides (LPS) and total cell proteins. For this purpose the reference strains *Bradyrhizobium japonicum* E-109 and *Sinorhizobium meliloti* B-399, were used. Results showed an increase in EPS, KPS and protein concentration as well as differences in the LPS and total cell protein profiles in different compared phases, allowing conclude that the different levels of cell density reached by rhizobium cultures might induce a different physiological response in relation to EPS, KPS, LPS and total protein synthesis.

Keywords. Rhizobia; growth phases; polysaccharides and proteins cellular.

¹ Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de La Pampa. Uruguay 151, (6300) Santa Rosa, La Pampa, Argentina.

*Correspondencia: slarroulet@exactas.unlpam.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La adopción y uso eficaz de biofertilizantes microbianos en agricultura está llamada a ser una de las tecnologías clave para asegurar la sustentabilidad y productividad de este sector tan importante para las economías y sociedades de los países Latinoamericanos (Sanjuán, 2007). El término biofertilizantes está asociado a los inoculantes formulados en base a rizobios específicos para leguminosas, ya que se ha dado un gran desarrollo tecnológico en estos productos acompañando el crecimiento de las áreas cultivadas con soja (Moretti, 2007). Los rizobios utilizados en la formulación de inoculantes tienen la propiedad de mejorar la nutrición y el crecimiento vegetal por medio de un proceso de simbiosis. Éste proceso es el resultado de una interacción selectiva entre los rizobios y la familia de las leguminosas (*Fabaceae*), en el cual cada leguminosa es nodulada por especies bacterianas específicas. La nodulación de las leguminosas por los rizobios requiere una serie de interacciones bioquímicas entre la bacteria (microsimbionte) y su huésped (macrosimbionte). La primera señal en la interacción la provee la planta, secretando moléculas de bajo peso molecular tales como flavonoides, isoflavonoides y betaínas. En respuesta, los rizobios sintetizan los factores Nod (señales específicas) que tienen un papel clave en la inducción de las etapas iniciales de la nodulación. Históricamente se pensó que las bacterias eran individuos solitarios creciendo cada una independientemente de la población, sin embargo, Nealson (1970) describió que las bacterias pueden censar la población y responder coordinadamente. Esto implica la regulación de genes específicos en respuesta a la densidad de población, hecho relacionado con varios fenómenos importantes para el establecimiento de una simbiosis satisfactoria tales como: eficiencia de nodulación, desarrollo del simbiosoma, producción de exopolisacáridos y fijación de nitrógeno (González y Marketon, 2003).

El objetivo de este trabajo fue conocer si diferentes densidades celulares alcanzadas por cultivos rizobianos en distintas fases de la curva de crecimiento, afectan la producción de componentes de importancia para el establecimiento de la simbiosis, tal como exopolisacáridos (EPS), polisacáridos capsulares (KPS), lipopolisacáridos (LPS) y proteínas totales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Para este trabajo se utilizaron las cepas *Bradyrhizobium japonicum* E-109 y *Sinorhizobium meliloti* B-399, obtenidas del IMyZA, INTA Castelar. Ambas cepas se desarrollaron en medio enriquecido 20E (Werner, 1975), a escala de agitador rotatorio (250 rpm y 2,5cm de excentricidad) en cuarto estufa a 30 °C, hasta que se alcanzó en los cultivos una fase exponencial temprana con baja densidad celular ($\sim 10^7$ cfu.mL⁻¹) y una fase estacionaria con alta densidad celular ($\sim 10^{10}$ cfu.mL⁻¹). El crecimiento de los microorganismos se determinó mediante la densidad óptica del cultivo (λ : 550 nm) y el número de células viables como ufc (unidades formadoras de colonias) por el método de recuento en placa (Somasegaran y Hoben, 1994).

Procesamiento de los cultivos

Los cultivos de ambas cepas fueron centrifugados a 12.000g durante 40 min. El sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación de EPS. El pellet celular se lavó con NaCl 0,5M y esta suspensión se centrifugó durante 15 min a 14.000 rpm en micro centrífuga. El sobrenadante se mantuvo a -20 °C hasta la determinación de KPS y el pellet celular se guardó para las determinaciones de LPS y proteínas celulares totales (López-García, 2001).

Extracción y cuantificación de EPS y KPS

Los EPS y KPS se precipitaron con 3 volúmenes de etanol 95% a -20 °C, se resuspendieron en buffer fosfato salino (NaCl 8g/L; KCl 0,2g/L; Na₂HPO₄ 1,44g/L; KH₂PO₄ 0,24g/L) y se mantuvieron a -20 °C para futuros análisis (Skorupska, 1985). Su concentración se determinó de manera indirecta a través del método de Antrona (Dische, 1962).

Extracción y electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) para LPS

La extracción se realizó adicionando a las muestras buffer lisis (1M Tris; 2% dodecil sulfato de sodio (SDS); 4% β -mercaptoetanol; 10% glicerol; 0,005% azul de bromofenol) y llevándolas a ebullición. Posteriormente, se incubaron con Proteinasa K (2,5mg Proteinasa K/mL) y se mantuvieron en buffer muestra (120mM Tris; 3% SDS; 9% β -mercaptoetanol; 30% glicerol; 0,03% azul de bromofenol) hasta el momento de la siembra en el gel (Hitchcock and Brown, 1983). Para obtener el perfil de bandas de LPS, se prepararon dos geles: el gel concentrador (T: 4% y C: 3%) y el gel separador (T: 16,5% y C: 6%). La electroforesis se

realizó en cuba Biorad Miniprotean III, a una corriente constante de 30mA durante 2 horas (Laemli, 1970) y el revelado de los geles se realizó por tinción con nitrato de plata (Hitchcock y Brown, 1983).

Extracción y cuantificación de proteínas celulares totales

La extracción se realizó por tratamiento con ultrasonido, utilizando 3 pulsos de 10 segundos cada uno a máxima potencia (López-García, 2001). Los sobrenadantes así obtenidos se utilizaron para cuantificar la concentración proteica tal como describe Bradford (1976).

Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para proteínas celulares totales

Para obtener el perfil de proteínas se prepararon dos geles: el gel concentrador (4%) y el gel separador (12%). La electroforesis se realizó en cuba BioRad MiniProtean II, a un voltaje constante de 200 volt por 4 horas (o hasta que el frente de corrida se observó en la parte final del gel) y el revelado de los geles se realizó por tinción con Coomassie Blue R-250 (Laemli, 1970).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente utilizando un test ANOVA con $\alpha=0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la densidad celular sobre el contenido de EPS y KPS

Los rizobios sintetizan diferentes clases de polisacáridos que son necesarios para la formación de nódulos simbióticamente efectivos, entre ellos se encuentran: exopolisacáridos (EPS), polisacáridos capsulares (KPS), lipopolisacáridos (LPS) y glucanos cíclicos. Los EPS son productos extracelulares abundantes con un importante rol en el desarrollo del nódulo, principalmente en la invasión del mismo. Además están relacionados con la organización del citoesqueleto del pelo de la raíz y actúan como modulador negativo de la respuesta de defensa de la planta (Lepek y D'Antuono, 2005). Los KPS rodean a la bacteria constituyendo una matriz hidratada, lo que hace que comiencen a actuar después del primer contacto entre el simbiote microbiano y el hospedador. Estos

polisacáridos pueden actuar protegiendo a la bacteria contra productos de defensa naturales de la leguminosa, asignando un rango de hospedador determinado y pueden afectar la iniciación y desarrollo del hilo de infección (Frayse, 2003).

En este trabajo se observó un aumento significativo en la concentración de EPS en cultivos con alta densidad celular respecto a cultivos de baja densidad celular, tanto para la cepa *S. meliloti* B-399 como para *B. japonicum* E-109 (Fig. 1). Por otra parte, en relación al contenido de KPS se puede observar en la Figura

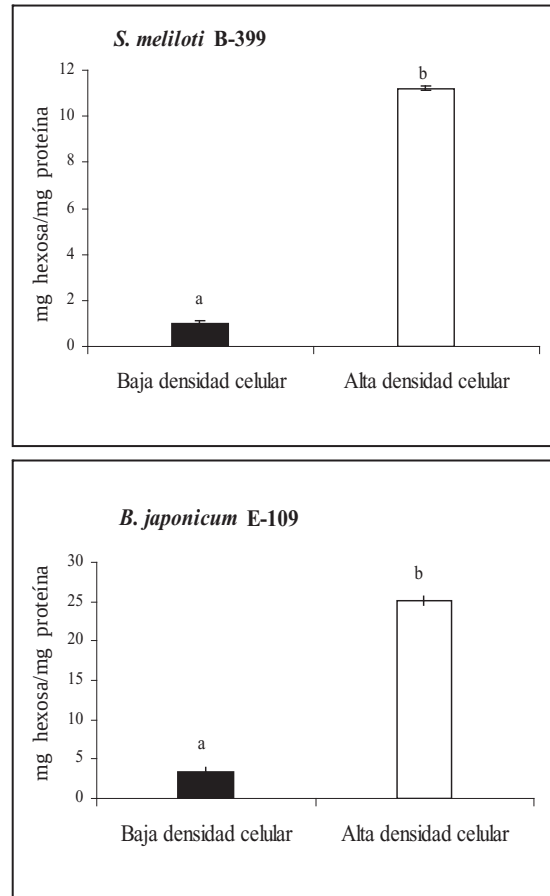


FIGURA 1. Concentración de exopolisacáridos (EPS) en cultivos con baja y alta densidad celular, para las cepas *S. meliloti* B-399 y *B. japonicum* E-109. Los datos son medias $\pm$ E. E de 4 determinaciones independientes. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas de acuerdo al test ANOVA ($\alpha=0,05$).

2 que hubo un pequeño aumento en la concentración de los mismos, pero desde el punto de vista estadístico no se encontraron diferencias significativas entre las densidades celulares comparadas. Estos resultados son coincidentes con la bibliografía, según la cual sólo sería esperable un aumento significativo en los niveles de KPS en los casos en que la concentración de EPS disminuya, relacionándolo con el importante rol que cumplen los KPS reemplazando a los EPS en sus funciones en la nodulación (Beck von Bodman, 1998; Pellok, 2000; Fraysse, 2003; Koutsoudis, 2006). También pueden relacionarse con lo planteado por Sánchez-Contreras (2007) respecto a que los rizobios utilizan el sistema de *quorum sensing* para regular, entre otras cosas, la producción de polisacáridos superficiales, considerando que dicho sistema está directamente relacionado con la densidad celular.

Efecto de la densidad celular sobre los perfiles de LPS

Los LPS son glucolípidos anfipáticos complejos (específicos de cada cepa) que desde el punto de vista estructural pueden dividirse en tres dominios: lípido A, oligosacárido núcleo (ON) y una cadena conocida como antígeno O (parte más variable de la molécula).

Estos polisacáridos participan en el proceso simbiótico tanto en la infección como en el mantenimiento del bacterioide y su papel fisiológico estaría relacionado con la protección de la bacteria ante las reacciones de defensa de la planta. Los cambios estructurales en los LPS son importantes para el proceso simbiótico dependiendo de la naturaleza exacta de los cambios y del par rizobio-leguminosa que se considere (Bedmar, 2006).

En el perfil de LPS obtenido para cultivos con alta densidad celular de la cepa *S. meliloti* B-399, las bandas se encuentran más separadas y se observa diferente intensidad de las mismas, indicando una variación en la concentración de los LPS en las distintas densidades celulares comparadas (Fig. 3). Con respecto al perfil de LPS obtenido para la cepa *B. japonicum* E-109, las bandas correspondientes a cultivos con alta densidad celular se ven más oscuras, con menor desplazamiento y mayor separación que las bandas correspondientes a cultivos con baja densidad celular (Fig. 3). Estos resultados indican mayor concentración de LPS y variaciones en la estructura de los mismos, en particular en la longitud del antígeno O. Las moléculas con antígeno más pequeño se mueven más en el gel, mientras que los LPS con mayores antígenos O quedan más retenidos (Bedmar, 2006).

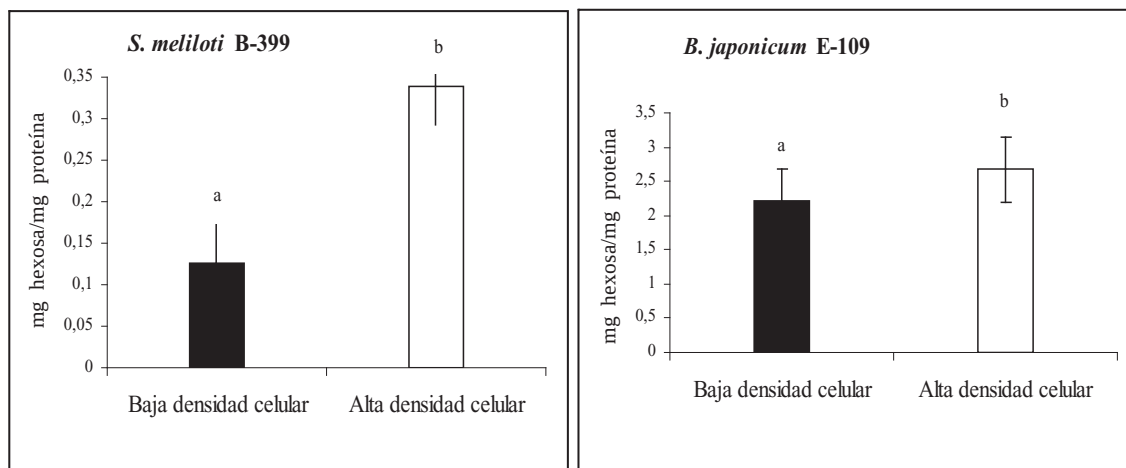


FIGURA 2. Concentración de polisacáridos capsulares (KPS) en cultivos de baja y alta densidad celular, para las cepas *S. meliloti* B-399 y *B. japonicum* E-109. Los datos son medias $\pm$ E. E de 4 determinaciones independientes. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas de acuerdo al test ANOVA ($\alpha=0,05$).

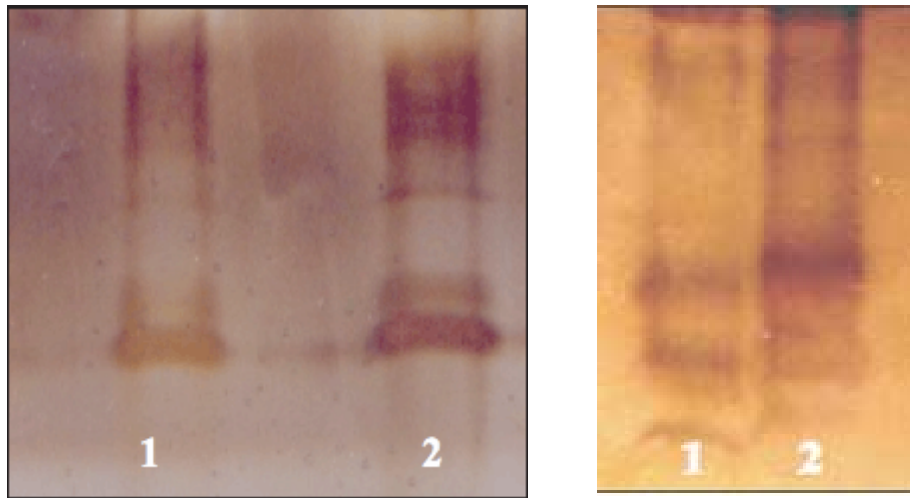


FIGURA 3. Geles de poliacrilamida para muestras de LPS. La figura de la izquierda corresponde a la cepa *S. meliloti* B-399 y la figura de la derecha corresponde a la cepa *B. japonicum* E-109. En ambas figuras la Calle 1 corresponde a muestras de cultivos con baja densidad celular y la Calle 2 corresponde a muestras de cultivos con alta densidad celular.

Los resultados obtenidos coinciden con lo planteado por Bedmar (2006) respecto a las características de los perfiles electroforéticos de las cepas pertenecientes a los géneros *Bradyrhizobium* y *Sinorhizobium*. Estos autores plantean que en las cepas del género *Bradyrhizobium* predominan las formas de LPS con antígeno O de diferentes longitudes, por lo que se obtiene un perfil de bandas con una forma que se asemeja al de una escalera de mano. En cambio, para las cepas del género *Sinorhizobium* se observa una banda de mayor tamaño y movilidad correspondiente a los LPS rugosos y una serie de bandas más pequeñas y de menor movilidad correspondientes a los LPS lisos.

Efecto de la densidad celular sobre la concentración y el perfil de proteínas celulares totales

Junto con los factores Nod y los polisacáridos bacterianos, ciertas proteínas han sido relacionadas con la eficiencia en el proceso de nodulación.

Para las dos cepas en estudio, se encontraron diferencias significativas entre los valores de concentración proteica (Fig. 4) en las diferentes densidades celulares comparadas, hecho que podría relacionarse con los cambios en la intensidad de las bandas que se observaron en los perfiles electroforéticos (Fig. 5). En éstos

también se observó aparición o desaparición de bandas y diferentes desplazamientos de las mismas. Estos resultados muestran que la fase de crecimiento en la que se encuentran las células y en consecuencia la densidad celular alcanzada, incide sobre la síntesis y concentración de proteínas, alterando la expresión de los genes implicados y dando como resultado un patrón de bandas diferentes, según la fase de crecimiento considerada. El aumento de concentración proteica observado en los cultivos con alta densidad celular respecto de los de baja densidad celular y la aparición de nuevas bandas o desaparición de otras, puede relacionarse con lo planteado por Unni y Rao (2001) quienes describen que en fase estacionaria (alta densidad celular) los microorganismos se encuentran en una situación de estrés por disminución de la concentración de nutrientes, mayor población y/o acumulación de productos del metabolismo microbiano y esto puede llevar a que se sinteticen nuevas proteínas o que aumente la concentración de las ya existentes. Estos resultados también pueden relacionarse con lo planteado por Sánchez-Contreras (2007) respecto a que los rizobios utilizan el sistema de *quorum sensing* para regular, entre otras cosas, la adaptación a la fase estacionaria de crecimiento, considerando que este fenómeno está directamente relacionado con la densidad celular.

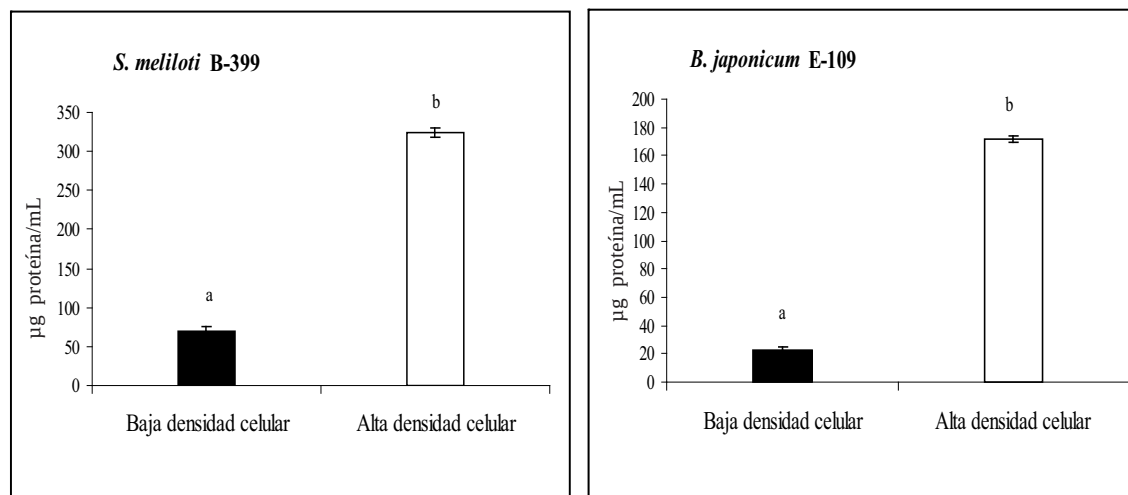


FIGURA 4. Concentración de proteínas celulares totales en cultivos de baja y alta densidad celular, para las cepas *S. meliloti* B-399 y *B. japonicum* E-109. Los datos son medias $\pm$ E. E de 4 determinaciones independientes. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas de acuerdo al test ANOVA ($\alpha=0,05$).

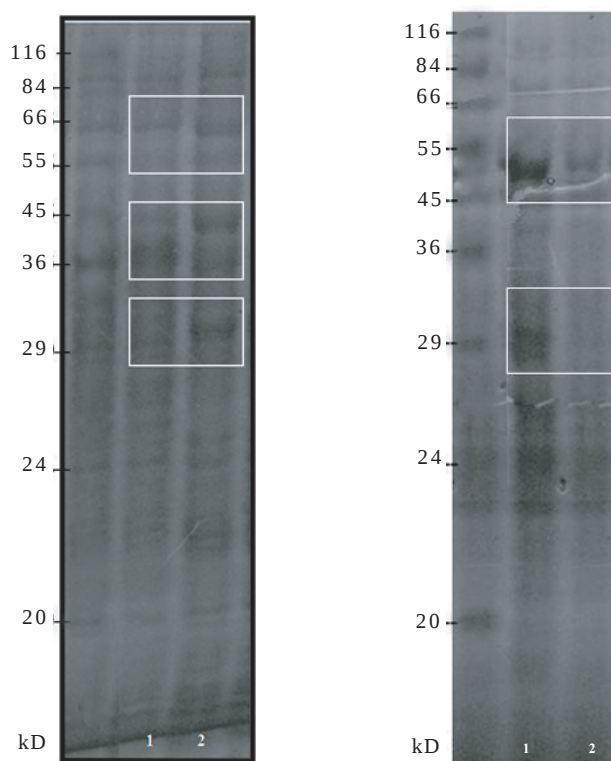


FIGURA 5. SDS-PAGE para muestras de proteínas celulares totales. La figura de la izquierda corresponde a la cepa *S. meliloti* B-399 y la figura de la derecha corresponde a la cepa *B. japonicum* E-109. En ambas figuras la Calle 1 corresponde a muestras de cultivos con baja densidad celular y la Calle 2 corresponde a muestras de cultivos con alta densidad celular.

El hecho que los resultados de este trabajo muestren cambios en la producción de polisacáridos y proteínas en función de la densidad celular, nos permite plantear la posibilidad que los sistemas de *quorum sensing* incidan en el proceso simbiótico tanto en la nodulación como en la fijación de nitrógeno, considerando que estos componentes celulares son esenciales para una simbiosis efectiva entre los rizobios y el huésped específico.

CONCLUSIONES

Es bien conocido que existe una señalización extracelular en la interacción entre la planta huésped y la bacteria. Los rizobios utilizan diferentes metabolitos como método de señalización, incluyendo polisacáridos extracelulares y proteínas. Los ensayos realizados en el desarrollo de este trabajo permitieron confirmar, para las cepas *S. meliloti* B-399 y *B. japonicum* E-109, a través de los perfiles de bandas de LPS

y proteínas totales, que el contenido y/o composición de los mismos dependen de la densidad celular de los cultivos rizobianos. Los perfiles de bandas revelan modificaciones estructurales en los LPS y variaciones en la expresión de genes relacionados con la síntesis de estas proteínas, lo que provocaría cambios en los procesos fisiológicos implicados en el establecimiento de la simbiosis. Por ello, se prevé en un futuro continuar estos estudios con ensayos en plantas para determinar si el comportamiento simbiótico frente a la variedad vegetal específica, se ve influenciado por las diferentes densidades celulares de los cultivos rizobianos utilizados.

AGRADECIMIENTO

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de La Pampa, quién hizo posible el desarrollo de éste trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- BEDMAR, E.J.; J. GÓNZALEZ.; C. LLUCH y B. RODELAS. 2006. Polisacáridos y lipopolisacáridos rizobianos. Estructura y papel en la simbiosis. Granada, España. p. 148-159. Editorial de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno. Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. 332 p.
- BECK VON BODMAN, S.; D.R. MAJERCZAK and D.I. COPLIN. 1998. A negative regulator mediates *quorum-sensing* control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 7687-7692.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- DISCHE, Z. 1962. General colours reactions. *Methods Carbohydr Chemistry* 1: 478-492.
- FRAYSSE, N.; F. COUDERC and V. POINSOT. 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *European Journal of Biochemistry* 270: 1365-1380.
- GONZÁLEZ, J.E. and M.M. MARKETON. 2003. *Quorum sensing* in Nitrogen-Fixing Rhizobia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4): 574-592.
- HITCHOCK, P.J. and T. M. BROWN. 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Bacteriology* 154: 269-277.
- KOUTSOUDIS, M.D.; D. TSALTAS.; T.D. MINOGUE and S. BECK VON BODMAN. 2006. *Quorum-sensing* regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(15): 5983-5988.
- LAEMLI, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LEPEK, V. and A. D'ANTUONO. 2005. Bacterial surface polysaccharides and their role in the rhizobia-legume association. *Lotus Newsletter* 35: 93-105.

- LÓPEZ-GARCÍA, S.L.; T.E. VÁZQUEZ.; G. FAVELUKES and A.R. LODEIRO. 2001. Improved soybean root association of N-starved *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology* 183(24): 7241-7252.
- MORETTI, E.R. 2007. Visión de los biofertilizantes desde el punto de vista de la industria. Montevideo, Uruguay. p 13-15. Eds. Izaguirre-Mayoral, M. L.; C. Labandera y J. Sanjuán. Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica, científica y empresarial. 98 p.
- NEALSON, K.H.; T. PLATT and J.W. HASTINGS. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology* 104: 313-322.
- PELLOCK, B.J.; H. CHENG and G.C. WALKER. 2000. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *Journal of Bacteriology* 182(15): 4310-8.
- SÁNCHEZ-CONTRERAS, M.; W.D. BAUER.; M. GAO.; J.B. ROBINSON and J.A. DOWNIE. 2007. *Quorum-sensing* regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 362: 1149-1163.
- SANJUÁN, J. Introducción. 2007. Montevideo, Uruguay. Eds. Izaguirre-Mayoral, M.L.; C. Labandera y J. Sanjuán. Biofertilizantes en Iberoamérica: una visión técnica científica y empresarial. 98 p.
- SKORUPSKA, A.; M. DERYLO and Z. LORKIEWICZ. 1985. Role of noncarbohydrate substitutions of *Rhizobium* exopolysaccharide in nodulation process. *Archive of Microbiology* 143: 307-310.
- SOMASEGARAN, P. and H.J. HOBEN. 1994. Quantifying the growth of rhizobia. New York, USA. p 47-57. Ed. Springer Verlag. Handbook for rhizobia. 450 p.
- UNNI, S. and K.K. RAO. 2001. Protein and lipopolysaccharide profiles of a salt-sensitive *Rhizobium* sp and its exopolysaccharide-deficient mutant. *Soil & Biochemistry* 33: 111-115.
- WERNER, D.; J. WILCOCKSON and E. ZIMMERMAN. 1975. Adsorption and selection of rhizobia by ion exchange papers. *Archive of Microbiology* 105: 27-32.