

# Práctico de Laboratorio para Bioquímica II

**Módulo:** Metabolitos producidos por bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento vegetal.

Del 31 de octubre al 18 de noviembre, 2005. De 15:00 a 19:00 horas.

**Lugar:** Laboratorio de Ecología Microbiana. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (Unidad Asociada Bioquímica, IIBCE). Av. Italia 3318. Tel. 4871616 int. 146.

## INTRODUCCIÓN TEÓRICA

### SISTEMAS DE ASIMILACIÓN DE HIERRO EN BACTERIAS

#### Importancia Biológica del Hierro y Biodisponibilidad

La importancia del hierro en los mecanismos bioquímicos básicos celulares, responde a la potencialidad funcional del mismo. La estructura electrónica de este elemento experimenta cambios reversibles a través de varios estados de oxidación. La poderosa actividad catalítica que esto representa para las reacciones de óxido-reducción, probablemente haya determinado que el hierro fuera favorablemente seleccionado como cofactor de muchas enzimas importantes, volviéndose esencial con relación a otros elementos disponibles en etapas muy iniciales de la evolución de la vida.

Es así que las rutas metabólicas esenciales que conducen a la producción de compuestos de alta energía (por ejemplo ATP), dependen de cierto número de flavoproteínas ferrosulfuradas, y otras metaloproteínas (Fe/S proteínas y citocromos). Entre otras enzimas y proteínas que dependen funcionalmente del hierro se encuentran varias oxidasas, hidrogenasas, enzimas involucradas en la detoxificación de radicales libres del oxígeno (soperóxido dismutasa y catalasa) y hemoproteínas con capacidad de unión reversible con el oxígeno (hemoglobina, leghemoglobina).

Si bien el hierro es un elemento esencial, en exceso resulta tóxico debido a su capacidad de catalizar la reducción del oxígeno para formar anión superóxido ( $O_2^-$ ) peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical oxhidrilo ( $OH\cdot$ ). Todos estos radicales oxidantes pueden ser extremadamente nocivos para las biomoléculas. Para eludir este problema la mayoría de los organismos cuentan con sistemas de transporte y almacenamiento del hierro ingresado. El hierro es transportado por el torrente sanguíneo de los animales ligado a la transferrina y se almacena como ferritinas en

el hígado. En los vegetales las ferritinas se asocian con los cloroplastos. Existen también evidencias de la existencia de ferritinas en bacterias.

Si bien el hierro es el cuarto elemento más abundante de la corteza terrestre, bajo condiciones aerobias y a pH neutro, se encuentra formando parte de minerales prácticamente insolubles (óxidos e hidróxidos). Teniendo en cuenta que la  $K_{ps}$  del hidróxido férrico a pH 7 es de  $10^{-38}$  M, la concentración de  $Fe^{3+}$  disponible (soluble) a ese pH será de  $10^{-14}$  M (con cada unidad de pH esta concentración varía en tres órdenes de magnitud).

Dado que la concentración de hierro requerida para un crecimiento microbiano normal es de aproximadamente  $10 \mu M$ , será crucial en los microorganismos la presencia de un sistema de asimilación de hierro de alta afinidad. Por otro lado, la toxicidad de este elemento ha forzado a los microorganismos a desarrollar un mecanismo de regulación fina de su absorción, comprometido con el mantenimiento de una concentración intracelular que minimice el riesgo que representaría su excesiva acumulación en el citosol.

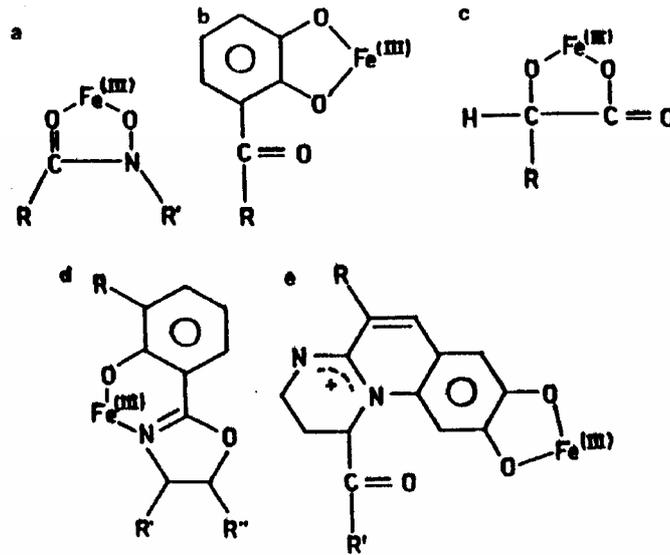
Otro mecanismo para amortiguar las condiciones oxidantes intracelulares generadas por el transporte de  $Fe^{3+}$ , viene dado por la actividad de reductasas inespecíficas (citoplasmáticas o ligadas a membranas; NADH o NADPH dependientes) que reducen el  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ .

### **Estrategias adoptadas por los microorganismos frente a la limitación del hierro**

Ciertos microorganismos como *Lactobacillus*, se han adaptado a utilizar otros metales con menos problemas que el hierro para su adquisición (por ej. Mo). Otros están adaptados a microambientes anaerobios donde este elemento se encuentra principalmente en su forma  $Fe^{2+}$ , relativamente soluble. Sin embargo, la mayoría de los microorganismos continúan dependiendo del hierro, y se ha observado en general que cuando bacterias y hongos crecen en condiciones limitantes del mismo, producen y excretan al medio agentes quelantes específicos de bajo peso molecular, llamados sideróforos, que solubilizan al  $Fe^{3+}$  formando un complejo  $Fe^{3+}$ :sideróforo. Estos complejos son reconocidos y transportados hacia el citosol por una proteína receptora específica de membrana externa.

Aunque los sideróforos difieren ampliamente en su estructura química, lo que va a resultar en un reconocimiento muy específico por los receptores, la naturaleza química de los grupos funcionales responsables del quelado del  $Fe^{3+}$  es muy conservada. Para formar un complejo de coordinación hexadentado con el  $Fe^{3+}$ , los sideróforos contienen generalmente grupos catecoles, hidroxamatos o hidroxiácidos, siendo los primeros y en menor medida los segundos, los más ampliamente distribuidos (Fig. 1).

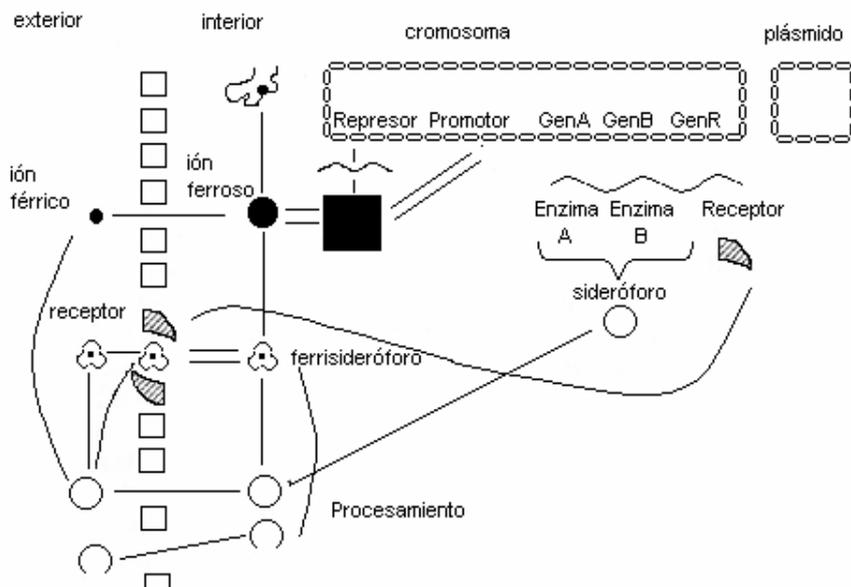
Además de los sideróforos varios compuestos orgánicos (por ejemplo los ácidos orgánicos) pueden formar complejos con el hierro. El ácido cítrico, a través de la solubilización de cationes  $Fe^{3+}$ , constituye una fuente de ingreso de hierro para algunas especies, aunque se trata de un quelante débil. Es interesante destacar que el citrato puede ser utilizado como solubilizador de hierro en cepas de *Bradyrhizobium* y *E.coli*, pero no como fuente de carbono.



**Figura 1** - Sistemas de ligandos bidentados comunes en sideróforos: (a) hidroxamato, (b) catecol, (c)  $\alpha$ -hidroxiácido, (d) 2-(2-hidroxifenil)-oxazolina, y (e) cromóforo quinoleínico fluorescente.

Todos los sistemas de transporte de hierro de alta afinidad, están regulados por una proteína represora (Fur) que sería sintetizada en forma constitutiva. Esta proteína debido a su capacidad de experimentar cambios conformacionales al coordinarse con iones  $\text{Fe}^{2+}$ , representaría un "sensor" intracelular de la concentración de hierro. Cuando esta concentración incrementa, el complejo

$\text{Fe}^{2+}$ :Fur formado, se ligaría a secuencias operadoras del ADN inhibiendo la expresión de los genes requeridos para la biosíntesis de sideróforos y de sus proteínas receptoras de membrana externa (Fig. 2).



**Figura 2**- Representación esquemática de la asimilación de hierro de baja y alta afinidad en microorganismos aerobios y anaerobios facultativos.

## LA RIZÓSFERA Y LAS RIZOBACTERIAS

La rizósfera se define como la estrecha zona de suelo que rodea a la raíz (hasta 1-2mm de distancia) y está sujeta a su influencia. En esta zona existe una intensa actividad microbiana y se encuentran mayores poblaciones de microorganismos que en el resto del suelo. Esto responde a la liberación por parte de las raíces de grandes cantidades de materia orgánica (50-100mg/g raíz) en forma de exudados, lisados y mucílagos. Se calcula que hasta un 18% del carbono asimilado mediante fotosíntesis puede ser liberado por las raíces. Azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, nucleótidos, vitaminas y enzimas son algunos de los compuestos orgánicos liberados por las raíces. Debido a la riqueza de los exudados, las poblaciones microbianas pueden alcanzar hasta  $1 \times 10^9$  células por  $\text{cm}^3$ , entre 10 y 100 veces más que lo encontrado en el resto del suelo. Entre los microorganismos rizosféricos se encuentran bacterias, virus, hongos, artrópodos, ácaros, amebas y flagelados. Estos microorganismos se subdividen en benéficos (simbióticos o de vida libre), perjudiciales (pueden ser deletéreos o patógenos) y neutros (sin efecto notorio), de acuerdo a su efecto sobre el crecimiento de las plantas.

Las actividades deletéreas de los patógenos se basan en alteraciones del crecimiento de la raíz o de sus funciones, que llevan a disminuciones en el suministro de agua, de iones y de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal.

Los mecanismos por los cuales los microorganismos beneficiosos (bacterias u hongos) afectan positivamente el crecimiento vegetal incluyen: a) promoción directa a través de un aumento de la disponibilidad y captación de nutrientes minerales, o provisión de sustancias estimuladoras del crecimiento, y b) promoción indirecta a través de la supresión de los microorganismos deletéreos de la rizósfera. Se denomina rizobacterias a las bacterias que viven en este hábitat. Estas bacterias ocupan un sitio privilegiado dentro de la comunidad de organismos del suelo, y pueden actuar como "barrera" para el ataque de hongos patógenos de plantas. En general, al grupo de bacterias que favorecen el crecimiento de las plantas, ya sea de forma directa o indirecta, se las denomina PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*: Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal) (Kloepper y Schroth, 1978).

### Rizobios y Fijación Biológica de Nitrógeno

La familia Rhizobiaceae está formada por bacterias rizosféricas Gram-negativas cuya característica más relevante es la capacidad para establecer asociaciones simbióticas con plantas leguminosas. Esta asociación lleva a la formación de estructuras morfológicas en las raíces y tallos de las plantas hospedadoras conocidas como nódulos. En los nódulos, las bacterias se diferencian a bacteroides los cuales son capaces de llevar a cabo el proceso de fijación de nitrógeno, que consiste en la reducción del  $\text{N}_2$  atmosférico a formas utilizables por la planta.

Como en otros organismos, tampoco en las plantas se encuentra hierro libre, por consiguiente los rizobios en simbiosis deben poseer algún sistema para acceder al mismo. La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es totalmente dependiente del hierro debido a que éste es un componente estructural de varias proteínas claves del proceso tales como la nitrogenasa, la hidrogenasa y la leghemoglobina. Se ha reportado que la deficiencia de hierro tiene diversos efectos negativos sobre la simbiosis rizobio-leguminosa, por ejemplo afectando la competitividad de rizobio para nodular plantas de alfalfa, previniendo el inicio de la formación de nódulos o bloqueando el desarrollo de nódulos ya iniciados. Por lo tanto un suministro adecuado de hierro es esencial para un correcto establecimiento y función de la simbiosis nodular.

### **Adquisición de hierro en rizobio mediada por sideróforos**

Numerosos trabajos han correlacionado la expresión diferencial de proteínas de membrana externa con la expresión de sideróforos específicos, en condiciones de baja disponibilidad de hierro. A su vez se ha observado que los sistemas de adquisición de hierro mediados por sideróforos, son una característica muy extendida entre las bacterias formadoras de nódulos. Se ha demostrado que no todos los rizobios producen el mismo sideróforo, sino que diferentes especies y cepas producen distintos tipos incluyendo los tipos carboxilato (como la rizobactina), hidroxamatos, catecoles, citrato y antranilato. Específicamente todas las rizobacterias estudiadas pertenecientes al género *Sinorhizobium* producen sideróforos del tipo di-hidroxamato, mientras que las cepas de *Rhizobium leguminosarum* producen sideróforos de estructura tri-hidroxamatos. También se ha comprobado la capacidad que presentan varias cepas de rizobio de utilizar sideróforos exógenos tales como los compuestos fúngicos ferricromo y ferroxiamina B.

### **Pseudomonas fluorescentes y control biológico**

El control biológico de enfermedades de plantas puede ser usado como una alternativa menos agresiva para el ambiente que los pesticidas químicos. En 1987 la National Academy of Science de los EE.UU. definió el control biológico como "el uso de organismos naturales o modificados, genes o sus productos, para reducir los efectos de organismos indeseables (pestes) y favorecer organismos deseables tales como cultivos, árboles, animales, insectos y microorganismos benéficos". Esta definición amplió el concepto de la definición clásica, más centrada en el uso de animales para control de enfermedades ocasionadas en general por otros animales. En la misma se hablaba del uso de patógenos, parásitos y/o depredadores para regular la población de una peste a un nivel más bajo del que tendría en ausencia de estos enemigos naturales (DeBach, 1964).

Los microorganismos constituyen una enorme fuente natural de agentes para el control biológico de pestes y enfermedades, y actualmente varias bacterias y hongos están comercialmente disponibles y registrados en la *Biopesticide and*

*Pollution Prevention Division* de la *Environmental Protection Agency*, EE.UU, para su utilización como control biológico (Ristaino y Thomas, 1997).

Uno de los grupos de rizobacterias más estudiados por su actividad biocontroladora lo constituyen las *Pseudomonas* fluorescentes. Investigaciones realizadas a fines de los 70 y principios de los 80 en la Universidad de California, Berkeley, demostraron que algunas cepas de *Pseudomonas* fluorescentes eran capaces de mejorar el crecimiento de papa y caña de azúcar cuando eran aplicadas a las semillas. Los resultados de estos estudios, junto con la toma de conciencia sobre los efectos adversos de los pesticidas químicos, propiciaron el resurgimiento a nivel mundial de la investigación sobre el uso de inoculantes bacterianos para controlar patógenos y mejorar el crecimiento vegetal.

Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacilos Gram-negativos, quimioheterótrofos y en general aerobios estrictos, que han tenido una gran capacidad adaptativa, colonizando diferentes tipos de suelos o aguas y desarrollando diversas formas patógenas (animales o vegetales) y asociaciones endofíticas.

Uno de los grupos que comprende este género es el de las *Pseudomonas* fluorescentes, que incluye a más de diez especies diferentes entre las cuales *P. fluorescens*, *P. putida* y *P. aureofaciens* son las más frecuentes en la rizósfera. La denominación de este grupo de bacterias es debida a la producción de sideróforos fluorescentes detectables bajo radiación ultravioleta, como resultado del crecimiento en condiciones deficientes en hierro.

Estos sideróforos, llamados indistintamente pioverdinas o pseudobactinas, son cromopéptidos que presentan una cadena peptídica cuya longitud varía entre 6 y 10 aminoácidos que se encuentra siempre unida al mismo tipo de cromóforo derivado de la 2,3-diamino-6,7-dihidroxiquinolina. Estos sideróforos se ligan al  $Fe^{3+}$  a través de seis enlaces de coordinación mediados por tres grupos quelantes bidentados: catecolatos, hidroxamatos e hidroxiaácidos u otro hidroxamato. La variabilidad entre las distintas pioverdinas se debe a diferencias ya sea en el número como en la secuencia de aminoácidos de la cadena peptídica, o en la identidad de los grupos funcionales que participan del quelado del hierro.

Se ha observado que entre las *Pseudomonas* existe una capacidad variable para hacer uso de sideróforos producidos por otras cepas o especies (sideróforos exógenos). Esta ventaja resulta de la presencia de la proteína receptora específica para este quelante en la membrana externa del microorganismo que lo utiliza. En otros casos el crecimiento de determinadas cepas resulta inhibido en presencia de ciertos sideróforos exógenos.

## **Mecanismos de control biológico**

Los mecanismos de biocontrol que presentan las PGPR pueden ser:

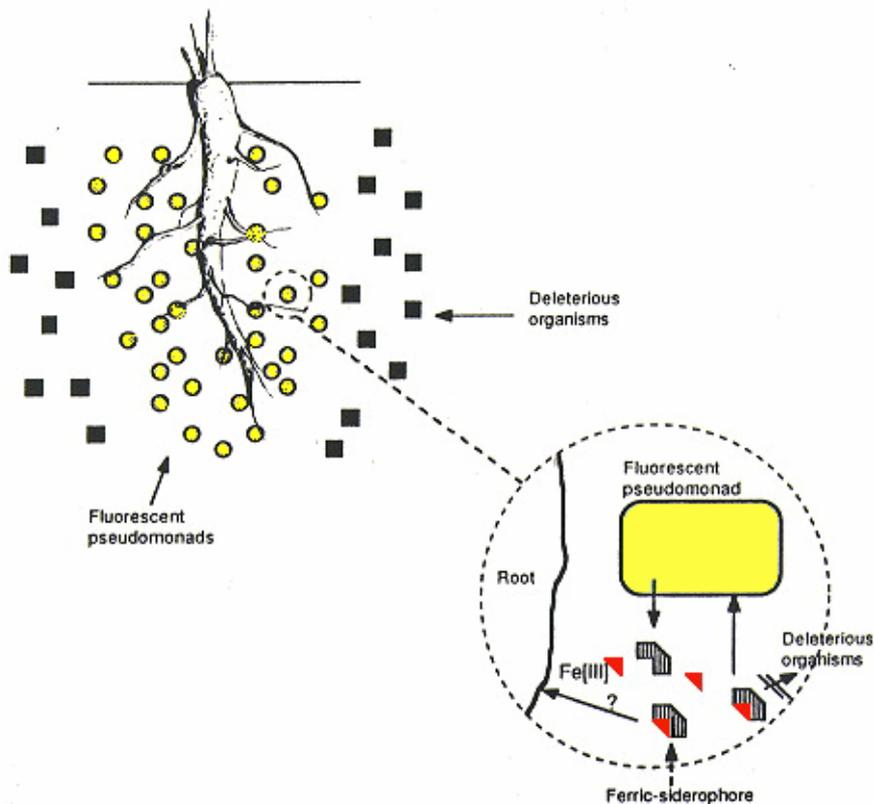
- a) competencia por un determinado sustrato y consecuente exclusión del nicho
- b) antagonismo directo del patógeno por predación, parasitismo o producción de compuestos de acción antimicrobiana como enzimas (ej. quitinasas, glucanasas), compuestos volátiles (ej. HCN), o antibióticos

c) inducción de resistencia sistémica en la planta huésped

Con respecto a los mecanismos que han sido descritos más comúnmente en *Pseudomonas* fluorescentes, nos detendremos en dos de los más estudiados: producción de sideróforos y antibióticos.

### a) Actividad biocontroladora mediada por sideróforos

La promoción del crecimiento vegetal que resulta de la introducción de *Pseudomonas* fluorescentes en la rizósfera puede deberse a la producción de sideróforos (bajo condiciones limitantes de hierro) y a la consecuente competencia con los patógenos por el  $Fe^{3+}$ . Este efecto supresor sobre los microorganismos fitopatógenos (mfp) puede deberse a varios motivos: a) los mfp no producen sideróforos; b) los mfp no son capaces de utilizar los sideróforos producidos por su antagonista; c) los mfp producen bajos niveles de sideróforos, o un sideróforo con menos afinidad por el  $Fe^{3+}$  que el de su antagonista; d) los mfp producen un sideróforo que puede ser utilizado por el antagonista pero ellos no son capaces de hacer uso del sideróforo del último (Fig. 3).



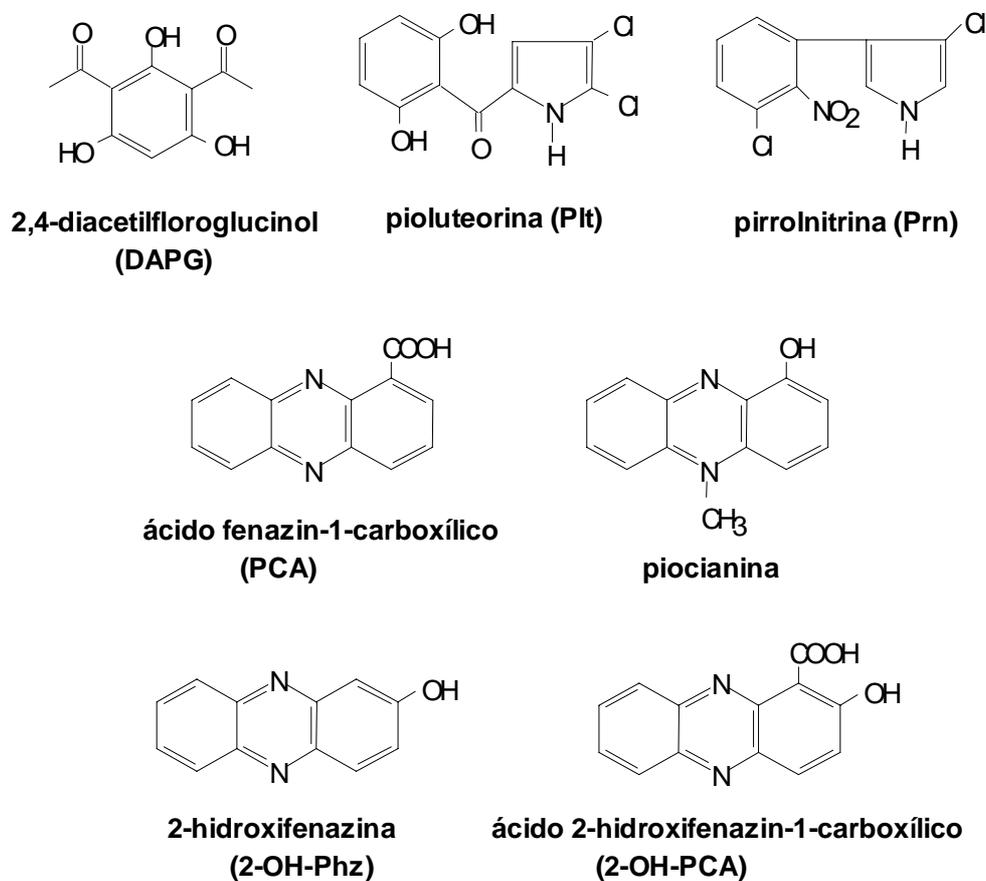
**Figura 3** - Modelo para la supresión de patógenos mediada por sideróforos producidos por *Pseudomonas* fluorescentes.

### b) Antibiosis

Los antibióticos son compuestos orgánicos pequeños de origen microbiano que a bajas concentraciones (del orden de los  $\mu\text{g/ml}$ ) pueden inhibir o matar otros

microorganismos susceptibles. Aunque se sabe de su participación en la supresión de patógenos del suelo desde hace más de 60 años, su importancia fue cuestionada por no existir evidencias de su producción en la rizósfera, ni conocerse si las cantidades producidas eran suficientes para provocar una interacción entre los microorganismos. Estudios genéticos y moleculares acompañados del uso de sistemas de detección altamente sensibles y específicos confirmaron la producción y actividad de los antibióticos en el suelo y su importancia en la defensa de las plantas.

Son muchos los géneros de hongos y bacterias que producen antibióticos. Las *Pseudomonas* fluorescentes producen varios compuestos, de diversa estructura, que tienen un amplio espectro de actividad y de los cuales se sabe muy poco sobre su mecanismo de acción (Thomashow y Weller, 1996). Entre ellos se incluyen derivados de fenazina, 2,4-diacetilfloroglucinol, pirrolnitrina y pioluteorina (Fig. 4).



**Figura 4** - Estructuras de algunos de los antibióticos producidos por *Pseudomonas* spp. fluorescentes involucrados en el control biológico de las enfermedades de plantas.

### Bibliografía

DeBach, P (Ed.). 1964. Biological control of insect pests and weeds. Reinhold, New York.

- Kloepper, J. W. y M. N. Schroth.** 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radish. **En** Proc. 4<sup>th</sup> International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Gibert-Clarey, Tours, France, pp. 879-882.
- National Academy of Sciences.** 1987. Report of the Research Briefing Panel on Biological Control in Managed Ecosystems. National Academy Press. Washington, DC.
- Ristaino, J. B. y W. Thomas.** 1997. Agriculture, methyl bromide, and the ozone hole: can we fill the gaps? *Plant Dis.* **81**:964-977.
- Thomashow, L. S. y D. M. Weller.** 1996. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. **En** Plant-Microbe Interactions, Vol. 1. G. Stacey y N. Keen (Eds.). Chapman & Hall, New York, USA, pp. 187-235.

## **Metabolitos producidos por bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento vegetal.**

### **OBJETIVOS**

- Aislamiento de *Pseudomonas* fluorescentes a partir de suelo rizosférico y estudio de su capacidad antagónica frente a un hongo fitopatógeno.
- Estudio de la influencia de la disponibilidad de hierro en el antagonismo *in vitro* de cepas de *P. fluorescens* sobre el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*.
- Detección de sideróforos y proteínas de membrana externa reguladas por hierro en cultivos de *Pseudomonas fluorescens*.
- Detección de la producción de antibióticos en cultivos de *Pseudomonas fluorescens*.
- Purificación de sideróforos producidos por *Sinorhizobium meliloti* y evaluación de su funcionalidad.

## **TÉCNICAS**

### **Aislamiento de *Pseudomonas* fluorescentes de suelo rizosférico**

Desprender de las raíces de plantas recién cosechadas el suelo no rizosférico (más suelto). Cortar las raíces y colocarlas en 10 ml de suero fisiológico (NaCl 9 g/l). Agitar en *vortex* durante 10 minutos para desprender el suelo rizosférico. Hacer diluciones seriadas de la suspensión anterior, pasando 1 ml de cada suspensión a 9 ml de suero. Plaquear en superficie las diluciones, esparciendo con un rastrillo 100  $\mu$ l de las mismas en placas de KB conteniendo los antibióticos cicloheximida (Chex), ampicilina (Amp) y cloramfenicol (Cm). Secar y pesar las raíces. Incubar las placas a 30°C y observar el crecimiento de colonias aisladas fluorescentes bajo luz ultravioleta. Reaislar las colonias fluorescentes en placas de KB.

### **Fraccionamiento de citosol y envolturas celulares por lisis enzimática y centrifugación diferencial**

- Crecer la cepa de *Pseudomonas fluorescens* en tubos conteniendo 5 ml de KB y 5 ml de KB + FeCl<sub>3</sub> c.f. 100  $\mu$ M a 30 °C durante 72 hs a 150 rpm.
- Centrifugar a 10000 rpm 5 min, 4 °C.
- Lavar con 2 ml de NaCl 1M (6000 rpm, 5 min).
- Lavar con 2 ml de T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (6000 rpm, 5 min, 4 °C)
- Resuspender pellet en:
  - 660  $\mu$ l T<sub>2,5</sub>E<sub>0,25</sub> (TE diluído 1:4)
  - 120  $\mu$ l de lisozima (stock 2 mg/ml)
  - 200  $\mu$ l DNAsa (stock 1 mg/ml)
  - 20  $\mu$ l de RNAsa (stock 10 mg/ml)
- Colocar en tubo eppendorff y homogeneizar bien.
- Incubar 15 min a 37 °C.
- Agregar 150  $\mu$ l de TRITÓN X-100 5%.
- Incubar 1 h a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 10000 rpm 5 min (4 °C) para separar las células no lisadas.

- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y centrifugar a 14000 rpm durante 1 hora a 4 °C.

———— Pellet: fracción de envolturas celulares  
Sobrenadante: fracción de citosol

- Guardar sobrenadante y pellet a –20 °C.
- Lavar pellet con buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,0.
- Centrifugar a 14000 rpm 30 min a 4 °C.
- Resuspender el pellet en 100 µl de agua.
- Guardar las fracciones en congelador para determinar perfil de proteínas de membrana por SDS-PAGE.

### **Extracción de antibióticos**

Crece las cepas de *Pseudomonas fluorescens* en matraces conteniendo 50 ml de medio de cultivo durante 3 días a 30°C con agitación. Centrifugar 10 min a 5000 rpm para separar las células del medio de cultivo. Acidificar el sobrenadante con ácido trifluoroacético (TFA) 10% hasta pH 2-3. Tomar alícuotas del sobrenadante acidificado, agregar 1.5 volúmenes de acetato de etilo y agitar vigorosamente. Dejar decantar o centrifugar por 10 minutos a 5.000 rpm para separar las fases. Conservar la fase orgánica (superior). Si es necesario, se puede hacer una segunda extracción de la fase acuosa con más acetato de etilo. Secar el solvente por evaporación y mantener el residuo seco a –20° C.

### **Cromatografía en capa fina (TLC)**

La cromatografía en capa fina (TLC: *thin-layer chromatography*) es una de las formas de cromatografía más usadas. Permite realizar análisis cualitativos y semi-cuantitativos de mezclas, seguir el desarrollo de reacciones y hacer separaciones de tipo preparativo.

La separación se lleva a cabo sobre una placa (que puede ser de vidrio, aluminio o plástico) cubierta con una fina capa de un adsorbente como sílica gel o alúmina (fase estacionaria). La mezcla a ser separada, disuelta en un solvente apropiado, se siembra en un extremo de la placa formando pequeños puntos (en una TLC analítica) o una línea (en el caso de una TLC preparativa). Luego que el disolvente se ha evaporado la placa se coloca en una cuba conteniendo el solvente de corrida (fase móvil). El solvente sube por la capa de adsorbente por capilaridad y los distintos componentes de la mezcla ascienden a diferentes velocidades dependiendo de su afinidad por cada una de las fases. Cuando el

solvente casi ha alcanzado el borde superior de la placa, ésta se retira de la cuba, se deja secar y, si es necesario, se revela.

En el práctico se separarán por TLC los compuestos orgánicos extraídos de cultivos de *Pseudomonas fluorescens*, resuspendidos en metanol. Se utilizarán placas de sílica gel con soporte de aluminio que poseen un indicador fluorescente y como fase móvil una mezcla de isopropanol:amoníaco:agua (8:1:1) o acetato de etilo. Se realizará primero una TLC analítica para comparar la muestra problema con compuestos antibióticos conocidos (ej. fenazina, floroglucinol, pioluteorina y pirrolnitrina). Luego de la corrida la placa se observará bajo luz ultravioleta. Cuando se ilumina con luz UV el adsorbente fluoresce y los compuestos orgánicos (ej. antibióticos) se ven como una mancha oscura. Posteriormente se revelará la placa con vapores de yodo.

Se realizará también una TLC preparativa para probar la actividad antifúngica de los distintos compuestos presentes en la muestra e identificar el compuesto activo.

### **Elución de compuestos de la placa de TLC**

Recortar en pequeños pedacitos la banda o sector de la placa de TLC preparativa que se quiere eluir. Colocar en un tubo con 10 ml de acetona o metanol y agitar durante 1 hora. Retirar con pinzas los pedacitos de aluminio y centrifugar por 10 minutos a 10000 rpm. Retirar el solvente con pipeta pasteur, sin remover la sílica. Eliminar el solvente por evaporación a presión reducida. Conservar el residuo seco a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Prueba de difusión en agar**

Cargar un disco de papel estéril con el compuesto a ensayar disuelto en un solvente volátil. Dejar evaporar el solvente y colocar el disco sobre una placa de agar-agua 1.5 %. Sembrar la misma placa con un trozo de agar conteniendo micelio joven del hongo blanco (*Pythium ultimum* o *Rhizoctonia solani*). Utilizar como control un disco de papel cargado sólo con el solvente. Incubar en estufa a  $25^{\circ}\text{C}$  y observar el crecimiento del hongo.

### **Obtención y purificación de sideróforos de rizobio**

Crece las cepas de *Sinorhizobium meliloti* con agitación durante 3 días a  $30^{\circ}\text{C}$  en tubos conteniendo 5 ml de medio de cultivo (MV). Sembrar una alícuota de 1 ml en 50 ml de medio mínimo sin hierro (Mvmet SIN hierro) y dejar crecer el cultivo durante 4 días. Leer la densidad óptica del cultivo a 620nm. Centrifugar el cultivo a 10.000 rpm durante 10 min, descartar las células y guardar el sobrenadante. Filtrar el sobrenadante usando un filtro de  $0,45\ \mu\text{m}$  para retirar las células que hayan quedado. Agregar  $100\ \mu\text{l}$  de  $\text{FeCl}_3$  37mM para obtener el sideróforo en la forma férrica. Acidificar el medio con ácido trifluoroacético (TFA) 10% hasta pH 3. Dejar 10

min a temperatura ambiente. Lavar la minicolumna de fase reversa (Sep-pak C<sub>18</sub>) con 10 ml de metanol 20% y luego con 10 ml de TFA 0,05%. Pasar los 50 ml de sobrenadante por la minicolumna. Lavar con 20 ml de TFA 0,05% y luego con 10 ml de metanol 20%. El complejo sideróforo-férrico se eluye con metanol 100%.

### **Cuantificación de sideróforos de *Sinorhizobium meliloti*: método del perclorato férrico**

Agregar 400  $\mu\text{l}$  de una solución de  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$  10 mM en  $\text{HClO}_4$  0,2 M a 800  $\mu\text{l}$  de sobrenadante de cultivo. Dejar 10 min a temperatura ambiente y medir la absorbancia a 450 nm. Determinar la concentración a partir de una curva patrón realizada con una solución de concentración conocida de Desferal (sideróforo tipo hidroxamato).

### **Bioensayos para evaluar los sideróforos como fuentes de hierro**

Crece las cepas a ensayar (*Sinorhizobium meliloti* 242, *Sinorhizobium meliloti* H21, *Sinorhizobium meliloti* H38, *Sinorhizobium meliloti* 1.3, *Herbaspirillum seropedicae* Z67, *Pseudomonas fluorescens* P190) con agitación durante 48 horas a 30°C en tubos conteniendo 5 ml de medio de cultivo (TY). Preparar 50 ml medio TY semisólido (1,5% de agar), autoclavar y termostatar a 50-60°C aproximadamente. Agregar EDDHA hasta una concentración final de 500  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{l}$  del cultivo bacteriano a ensayar. Volcar el medio en dos placas Petri y dejar gelificar. Una vez frío hacer cinco pocillos en el medio (con tip estéril) y agregar en cada pocillo las posibles fuentes de hierro: sideróforos obtenidos anteriormente, hemoglobina, hemina, citrato férrico. Incubar en estufa a 30°C durante dos días.