

## RESUMEN

Estudios previos realizados en el Laboratorio de Ecología Microbiana-IIBCE demostraron que diferentes bacterias no patógenas de animales, entre ellas los rizobios, eran capaces de utilizar compuestos hemínicos (hemina, hemoglobina y leghemoglobina) como fuentes de hierro.

El objetivo general del presente trabajo de tesis fue el de caracterizar los mecanismos de adquisición de hierro mediados por compuestos hemínicos presentes en *Sinorhizobium meliloti* 242.

Los objetivos particulares fueron: a) estudiar la función de la L-metionina en la adquisición de hierro a partir de compuestos hemínicos y b) detectar y purificar las posibles proteínas de membrana externa con capacidad para unirse a hemina, hemoglobina y leghemoglobina.

A partir de ensayos de crecimiento bacteriano en medio líquido y bioensayos, se determinó que es necesario suplementar al medio mínimo de cultivo, MV, con L-metionina 300 $\mu$ M para que la cepa Sm 242 sea capaz de crecer en medios limitados en hierro con el agregado de diferentes fuentes de este metal (compuestos hemínicos o sideróforos). Cuando se utilizó glutamato en lugar de amonio como fuente de nitrógeno y se agregó L-metionina al medio de cultivo, se obtuvo una mayor producción de sideróforos y mayores rendimientos celulares. A partir de la información disponible, una posible interpretación de los resultados obtenidos es que en condiciones de baja disponibilidad de hierro, la vía de asimilación del azufre a partir del sulfato, esté afectada probablemente a nivel de la sulfito reductasa. La L-metionina en estas condiciones sería una mejor fuente de azufre para la cepa Sm 242.

Se purificó leghemoglobina a partir de nódulos de soja y se obtuvieron anticuerpos de conejo anti-leghemoglobina. Estos anticuerpos se caracterizaron por *Western blot* comprobándose que no presentan reactividad cruzada con otros compuestos hemínicos ni con las demás proteínas presentes en el macerado nodular. A su vez, por ELISA, se determinó la dilución de trabajo de los anticuerpos, los cuales serán empleados en experimentos futuros.

Por último, mediante análisis por SDS-PAGE de fracciones enriquecidas en proteínas de membrana externa, se detectó la presencia de 3 proteínas reguladas por hierro de 80, 82 y 90 kDa. De las 3 proteínas identificadas, la de 90 kDa presentó la capacidad de unirse a hemina inmovilizada en agarosa. Análisis por espectrometría de masas (EM-MALDI-TOF) determinaron que la proteína de 90 kDa es homóloga o aún idéntica a una posible proteína involucrada en el transporte de hierro (Smc02726) deducida a partir del genoma secuenciado de Sm 1021. Análisis bioinformáticos mostraron que la secuencia aminoacídica de esta proteína presenta dominios altamente conservados con otras proteínas de membrana externa receptoras para la hemina. A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que se ha identificado en Sm 242 un receptor de hemina.