



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Estudio sobre formación de biofilms en bacterias del suelo

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área Química Biológica

Lic. Alicia Beatriz Supanitsky

Directora de Tesis: Dra. Ángeles Zorreguieta

Directora Adjunta: Dra. Daniela Marta Russo

Consejera de estudios: Dra. Nancy López

Lugar de trabajo:

Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) e Instituto de
Investigaciones Bioquímicas Buenos Aires (IIBBA) - Fundación Instituto
Leloir.

Buenos Aires, 2022

**A Ian, Ema y Esteban ...
“mi nido”**

AGRADECIMIENTOS

Seguramente, este debería ser el capítulo mas extenso de la tesis... tengo mucho que agradecer... sobre todo a dos grandes instituciones: el INTI y el Instituto Leloir.

En especial en el INTI:

Agradezco a Ángeles Cappa, por darme la libertad y el apoyo para iniciar este camino...el pilar en INTI sin el que nada hubiese sido posible...

A Celulosa y Papel (a Marcelo, Adrián y Hugo), por abrirme sus puertas y apoyarme en todo ... por buscar cualquier alternativa posible para que pudiera trabajar en la tesis... por haber sido mi familia del INTI cuando los necesité...

A dos grandes amigos que me acompañaron y estuvieron siempre al pie del cañón: Faby y Angie... dos pilares que me bancaron todo!!! En las buenas y en las malas... sepan que no hubiese podido sin ustedes...

Gracias Faby! por ser un hermano más que un amigo (...obvio hermano mayor!), por pensar siempre en ayudarme en lo que sea, por malcriar a Ian y Ema con películas y asesoramiento tecnológico!... por estar siempre en mis momentos de crisis... por bajarme a tierra...

Gracias Angie! por tu empuje para trabajar y aprender conmigo... gracias por elegirme! Fue un honor! ... pero sobre todo gracias por dormir en los pastos bajo el mástil de la bandera en INTI y acompañarme en uno de los peores momentos de mi vida, cuando muchos dieron la espalda...

A Facu, que más allá de las fronteras internacionales, siempre estuvo en la "búsqueda" del biofilm! Gracias Facu! Por tus búsquedas y apoyo de siempre!... pero sobre todo por tu amistad...

A "las chicas de micro"... por hacerme un lugar en el laboratorio y ayudarme desinteresadamente en todo lo que estuvo a su alcance! GRACIAS Marce, Clari, Lore, Mari, Lis, Andre, Renata y Cris...por ser mis compañeras...

A los chicos de Biotecnología por facilitarme los equipos de su Centro, en especial a Ezequiel y Juan Pablo... gracias por las mil lecturas!!!

A la Dra. Estela Planes, una grande en el INTI, por su apoyo y ayuda para instalar la temática de Biofilms en nuestro instituto...

Al jardín del INTI... por cuidar y mimar a mis más preciados tesoros... por hacer más liviana "la culpa" de ser madre trabajadora... GRACIAS seños!

A todos los que fueron mis compañeros en Leloir y colaboraron en mi formación: Nico, Alf, Walter, Pato, Maga y en especial Piku, excelente compañera quien nunca mezquinó su tiempo y experiencia cuando le consultaba algún problema experimental... gracias!!! Atesoro tus mails plagados de fotos y aliento para seguir en la lucha del "pipeteo"...

A Betina Agarás, por su ayuda y predisposición ... por todo el tiempo y dedicación, por los mails super explicativos ... gracias por tus *Pseudomonas*! ... y por todo lo que me diste con ellas !!!

A mi familia, Esteban, Ian y Ema, por estar, por ser mi aliciente en la vida... Agradezco en especial a la abuela Norma, que mientras pudo estuvo pendiente de sus nietos para que yo pudiera trabajar ... gracias por salvar tantos experimentos! ... gracias por ser una madre más que una suegra!

A mi abuela Yaya, mi inspiración y ejemplo de vida... de quien heredé la tozudez asturiana... gracias por siempre!!!

A mi amiga Vero... por tantas horas de escuchar lamentos, por tantos momentos compartidos... en las buenas y en las malas... siempre...

A mis directoras Ángeles Zorreguieta, Daniela Russo y Viviana Lepek:
Gracias Vivi, por guiarme en el mundo de *Mesorhizobium* y enseñarme con tu experiencia! Gracias por abrirme las puertas del IIB!
Gracias Dani, por haberme adoptado en el labo, por estar en mi mesada de trabajo aún a la distancia, por enseñarme todo lo que necesité sin egoísmo, por ser mi compañera y maestra! Gracias por dedicarle a mis temas el tiempo que no tenías, por tus miles de mails dónde discutíamos cada problema experimental, por las corridas en la noche de Leloir con las panzas de Dino y Ema! ...y por tanto mas!
Gracias Ángeles, por ser quien sostuvo todo e hizo posible esta tesis... por abrirme las puertas de Leloir, por incluirme en tu labo, por el Biospas...por nunca soltarme la mano...
¡GRACIAS ÁNGELES!

...Sin duda alguna esta tesis cambió mi vida profesional y personal, con casi todo en contra no hubiese podido sin ustedes!!!!

...GRACIAS! ... a todos los que me apoyaron en este largo camino!

Con todo amor

Ali

ESTUDIO SOBRE FORMACIÓN DE BIOFILMS EN BACTERIAS DEL SUELO

RESUMEN

El estilo de vida en forma de biofilms desarrollados sobre diferentes sustratos podría ofrecer una ventaja adaptativa a los microorganismos del suelo frente a condiciones de estrés ambiental, por lo que resulta de interés contribuir a su conocimiento en especies autóctonas de Argentina. En esta Tesis se estudió la capacidad formadora de biofilms de una colección de aislamientos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia* spp., provenientes de suelos de diferentes localidades de Argentina. Estos microorganismos de vida libre presentan características deseables para el desarrollo agrícola sustentable como biocontroladores o promotores del crecimiento vegetal (PGPR). Se establecieron las condiciones de cultivo *in vitro* en las que es posible evaluar la biomasa adherida a soportes abióticos o bióticos y se analizaron las propiedades asociadas a componentes de la superficie bacteriana, la producción de polisacáridos extracelulares como posibles constituyentes de la matriz del biofilm y la tolerancia intrínseca de estos microorganismos a factores de estrés frecuentes en el suelo, como la salinidad y la presencia de arsénico. Los aislamientos pertenecientes a *Pseudomonas* spp. mostraron mayor diversidad de fenotipos asociados a componentes de superficie y mejor desempeño como formadores de biofilms *in vitro* sobre poliestireno (PE) o raíces de trigo en comparación con los aislamientos de *Burkholderia* spp. En presencia de factores de stress, observamos que el desarrollo de biofilms pudo dispararse como mecanismo de supervivencia en el caso de los aislamientos *P. fluorescens* P18 expuesto a 1 mM de arsénico o *P. protegens* P11 y *Pseudomonas* sp. P14 cultivados en presencia de 200 mM de cloruro de sodio donde el incremento de la biomasa adherida al PE fue significativo. Por otra parte, el aislamiento *B. ambifaria* B12 fue el que mostró mayor tolerancia a la salinidad, exacerbando el desarrollo del biofilm significativamente en presencia de 300 mM de cloruro de sodio.

Finalmente, mediante un enfoque genético, se estudió el rol de los polisacáridos en la formación de biofilm en el simbionte modelo *Mesorhizobium japonicum* MAFF303099. Se interrumpieron genes localizados en dos locus involucrados en la síntesis del exopolisacárido I (EPS I) que fueron identificados en el genoma de MAFF303099. Una mutante afectada en el gen *mll5252*, que codifica la enzima galactosiltransferasa ExoY y otra en *mll6756*, que codificaría una proteína putativamente involucrada en su biosíntesis y transporte, fueron estudiadas en cuanto a su capacidad de producción de exopolisacáridos, adhesión a diferentes sustratos y nodulación de *Lotus tenuis*. Nuestros resultados sugieren que el EPS I producido por *M. japonicum* MAFF303099 es requerido como constituyente de la matriz del biofilm desarrollado *in vitro* y durante la nodulación de las raíces de la planta hospedadora. Este trabajo aporta evidencias de la importancia de los polisacáridos extracelulares durante el ciclo de vida de *M. japonicum* MAFF303099, de manera similar a lo que fue propuesto en otros simbiontes de plantas como *Rhizobium leguminosarum* y *Ensifer meliloti*.

PALABRAS CLAVE: biofilms, bacterias del suelo, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Mesorhizobium japonicum*, exopolisacáridos, EPS I, supervivencia.

STUDY OF THE BIOFILM DEVELOPMENT IN SOIL BACTERIA

ABSTRACT

The biofilm-lifestyle on different substrates could offer an adaptative advantage to soil microorganisms against environmental stress conditions, so it is of interest to contribute to its knowledge in native species of Argentina. In this Thesis, the biofilm-forming abilities of a collection of *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. soil-isolates from different locations of Argentina were studied. These free-living microorganisms have desirable characteristics for sustainable agricultural development as biocontrollers or plant growth promoter (PGPR). The in vitro culture conditions to evaluate the adhered biomass to abiotic or biotic substrates were established. Several components of the bacterial surface and exopolysaccharides production, which could constitute the biofilm matrix, were studied. Since the high salinity and arsenic presence in soils are frequent environmental stress factors, we have analyzed the tolerance to them. Our results suggest that isolates belonging to *Pseudomonas* spp. showed greater diversity of phenotypes associated with surface components and better performance as in vitro biofilm developers on polystyrene (PE) or wheat roots compared to *Burkholderia* spp. In the presence of stress factors, we observed that the development of biofilms could be triggered as a survival mechanism in the case of *P. fluorescens* P18 exposed to 1 mM of arsenic or *P. protegens* P11 and *Pseudomonas* sp. P14 isolates cultured in the presence of 200 mM sodium chloride, where the biomass attached to PE was significantly increased. On the other hand, the *B. ambifaria* B12 isolate was the one that showed the highest tolerance to salinity, exacerbating biofilm development significantly in the presence of 300 mM sodium chloride.

Finally, using a genetic approach, the role of polysaccharides in the model symbiont *Mesorhizobium japonicum* MAFF303099 was studied. For this, genes located in two loci involved in the biosynthesis of exopolysaccharide I (EPS I) that were identified in the genome of MAFF303099 were interrupted. One mutant strain was affected in *mll5252* gene, which encodes the ExoY galactosyltransferase, and the other in *mll6756* gene, which would encode a protein putatively involved in its synthesis and transport, were studied for their ability to produce exopolysaccharides, adhesion to different substrates and nodulation of *Lotus tenuis*. Taken together, these results suggest that EPS I produced by *M. japonicum* MAFF303099 is required as a constituent of the biofilm matrix developed in vitro and during host plant nodulation. This work provides evidence of the importance of extracellular polysaccharides during the life cycle of *M. japonicum* MAFF303099, similarly to what was proposed in other plant symbionts such as *Rhizobium leguminosarum* and *Ensifer meliloti*.

KEYWORDS: Biofilms, soil bacteria, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Mesorhizobium japonicum*, exopolysaccharides, EPS I, survival.

ABREVIATURAS

ABC, (*ATP binding cassette*) Cassette de unión al ATP
ADN, ácido desoxirribonucleico
AHL, homoserina lactonas aciladas
AIA, ácido indolacético
AMP, ampicilina
ATP, adenosina trifosfato
BCA, (*Biological Control Agent*), agentes de control biológico
bv., biovariedad
CPS, polisacárido capsular
C-term, Carboxiterminal
dTDP deoxitimidina difosfato
EP, (*extracellular protein*) proteína extracelular
ePGPR, (*extracellular Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), bacteria extracelular promotora del crecimiento de plantas
EPS, exopolisacárido
FC, fibrosis quística
Gal galactosa
GalA, ácido galacturónico
GluA, ácido glucurónico
GlcN, glucosamina
HCs, hidrocarburos
HMW, (*high molecular mass*), alto peso molecular
iPGPR, (*intracellular Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), bacteria intracelular promotora del crecimiento de plantas
Kb, kilo bases
KDa, kilo Dalton
KDO, ácido 2-ceto 3-deoxioctanoico
KPS, antígeno-K polisacárido
LMW, (*low molecular mass*), bajo peso molecular
LPS, lipopolisacárido
Man manosa
MDR, resistencia a múltiples drogas
ME, membrana externa
MI, membrana interna
mM, milimolar
mg, miligramos
Mpb, megapares de bases
NF, factores Nod
NFR, receptor del factor de nodulación
NP, polisacáridos neutros de alto peso molecular
OD, (*optical density*) densidad óptica
OMP, (*outer membrane protein*), proteína de la membrana externa

ON, (*overnight*) de la noche a la mañana
PAGE, (*polyacrilamide gel electrophoresis*) electroforesis en gel de poliacrilamida
PAHs, hidrocarburos policíclicos aromáticos
Pb, pares de bases
PCBs, bifenilos policlorados
PCE, percloroetileno
PCP, pentaclorofenol
PCR, (*polimerase chain reaction*) reacción en cadena de la polimerasa
PE, poliestireno
GPBs, (*Plant Growth Promoting bacteria*), bacterias promotoras del crecimiento de plantas
PGPMs, (*Plant Growth Promoting Microorganism*), microorganismos promotores del crecimiento en plantas
PM, peso molecular
QS, (*Quorum Sensing*), percepción de quórum
rpm, revoluciones por minuto
SDS, dodecil sulfato de sodio
Sist., Sistema
Spp., especies
TCA, ácido tricloroacético
TCE, tricloroetano
TCP, triclorofenol
3-D tridimensional
UDP, uridina trifosfato
UPP, polisacárido unipolar
UV, radiación ultravioleta

Glosario:

Buffer: solución de pH constante o tampón.

Cluster: grupo

Core: núcleo

Pellet: precipitado obtenido después de centrifugación de una solución.

INDICE

INTRODUCCION	1
1. MICROORGANISMOS DEL SUELO	1
1.1 El suelo como hábitat	1
1.2 Bacterias del suelo	2
1.2.1 Bacterias promotoras del crecimiento de plantas	2
1.2.2 Bacterias del suelo y degradación de compuestos tóxicos	3
1.2.3 Dos grupos bacterianos de interés: <i>Pseudomonas</i> y <i>Burkholderia</i>	5
<i>Pseudomonas</i>	5
<i>Burkholderia</i>	6
2. BIOFILMS	8
2.1 Desarrollo y etapas del biofilm	8
2.2 Ventajas de la vida en biofilm	10
2.3 Componentes de la matriz del biofilm	11
2.3.1 Polisacáridos extracelulares o asociados a la superficie de la bacteria	11
Polisacáridos involucrados en la matriz del biofilm de <i>Pseudomonas</i>	12
Polisacáridos involucrados en la matriz del biofilm de <i>Burkholderia</i>	13
Polisacáridos producidos por rizobios	13
Exopolisacáridos (EPS) de rizobios	14
Exopolisacáridos producidos por <i>Ensifer meliloti</i> : Succinoglicano y galactoglucano	16
Biosíntesis del EPS I (succinoglicano) en <i>E. meliloti</i> . Cluster de <i>exo</i> genes	17
Funciones asociadas a los exopolisacáridos en rizobios	19
Celulosa	20
Lipopolisacáridos (LPS)	21
2.3.2 Proteínas extracelulares, funciones asociadas a biofilm	22
2.3.3 ADN, funciones asociadas a biofilm	22
2.4 Componentes de la superficie bacteriana y otros factores extracelulares asociados a la formación de biofilms	23
2.4.1 Producción y sensado de moléculas señal: Quorum Sensing (QS)	23
2.4.2 Flagelo y motilidad asociada	24
<i>Swarming</i>	25
<i>Swimming</i>	26
2.4.3 Agregación celular, asociada a proteínas y polisacáridos	26
3. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN EL SUELO, LA RIZOSFERA Y SOBRE LAS PLANTAS	26
3.1 Importancia del estudio de Biofilms del suelo	27
3.1.1 Propiedades de los biofilms del suelo	28
3.1.2 Interacciones microbianas en biofilms del suelo	29

Cooperación	29
Competencia	29
3.2 Importancia del estudio de los Biofilms asociados a plantas y a la rizósfera	29
Rhizobios y su importancia en la simbiosis con plantas leguminosas	30
3.3 Consecuencias de la formación de biofilms en el ambiente:	
Aplicaciones en bacterias del suelo	32
Bioinoculantes	32
Biorremediación	33
Rizorremediación	34
3.3.1 Consecuencias ambientales de la formación de biofilms: Supervivencia al Stress Ambiental	35
Halotolerancia	35
Toxicidad: la problemática del Arsénico	36
 OBJETIVOS	 40
 RESULTADOS	 41
 CAPITULO I: Análisis de la capacidad formadora de biofilms en bacterias del suelo	 41
1. Condiciones óptimas de formación <i>in vitro</i> en especies de referencia	41
1.1.a Estudio del biofilm desarrollado sobre PE en bacterias simbiotes de plantas	42
Biofilm de <i>Mesorhizobium spp.</i>	42
Biofilm de <i>Rhizobium leguminosarum</i>	43
Biofilm de <i>Ensifer meliloti</i>	45
1.1.b Estudio del biofilm desarrollado sobre PE en bacterias de vida libre	47
Biofilm de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	47
Biofilm de <i>Burkholderia cepacia</i>	48
1.2 Evaluación de la capacidad formadora de biofilm en aislamientos autóctonos del suelo pertenecientes a los géneros <i>Pseudomonas</i> y <i>Burkholderia spp.</i>	51
1.2.a Adhesión a soporte abiótico de poliestireno (PE)	51
Capacidad de adhesión al PE de aislamientos autóctonos de <i>Pseudomonas spp.</i>	51
Capacidad de adhesión al PE de aislamientos autóctonos de <i>Burkholderia spp</i>	54
1.2.b Evaluación de la capacidad formadora de biofilm sobre un soporte biótico (raíz de trigo)	58
Capacidad de adhesión a raíz de trigo de los aislamientos autóctonos de <i>Pseudomonas spp.</i>	58
Capacidad de adhesión a raíz de trigo de los aislamientos autóctonos de <i>Burkholderia spp.</i>	60
2. Estudio de los componentes de la superficie bacteriana y factores	

extracelulares asociados a formación de biofilm en microorganismos del suelo	62
2.1 Evaluación de características asociadas a la superficie y componentes extracelulares en <i>Pseudomonas</i> spp.	62
A-Producción de Exopolisacáridos en <i>Pseudomonas</i> spp.	63
B-Agregación celular en <i>Pseudomonas</i> spp.	65
C-Motilidad flagelar en <i>Pseudomonas</i> spp.	66
D-Producción de β (1,4) -D glucopiranosidos (como la celulosa) en <i>Pseudomonas</i> spp.	68
E-Producción de moléculas señal de QS en <i>Pseudomonas</i> spp.	69
2.2 Evaluación de características asociadas a la superficie y componentes extracelulares en <i>Burkholderia</i> spp.	69
A-Producción de Exopolisacáridos en <i>Burkholderia</i> spp.	70
B-Agregación celular en <i>Burkholderia</i> spp.	71
C-Motilidad flagelar en <i>Burkholderia</i> spp.	72
D-Producción de β (1,4) -D glucopiranosidos en <i>Burkholderia</i> spp.	74
E-Producción de moléculas señal de QS en <i>Burkholderia</i> spp.	74
3. Evaluación de la respuesta adaptativa de microorganismos del suelo a condiciones ambientales adversas: resistencia a sustancias tóxicas y formación de biofilm.	75
3.1 Respuesta adaptativa a condiciones adversas en <i>Pseudomonas</i> spp.	77
A-Tolerancia a arsénico en aislamientos de <i>Pseudomonas</i> spp.	77
B-Resistencia al estrés salino en aislamientos de <i>Pseudomonas</i> spp.	79
3.2 Respuesta adaptativa a condiciones adversas en <i>Burkholderia</i> spp.	79
A-Tolerancia al arsénico en aislamientos de <i>Burkholderia</i> spp.	79
B-Resistencia al estrés salino en aislamientos de <i>Burkholderia</i> spp.	81
3.3 Evaluación de la capacidad de formación de biofilm en condiciones adversas.	82
A-Efecto del arsénico sobre el desarrollo de biofilm <i>in vitro</i> sobre PE en <i>Pseudomonas</i> spp.	82
B-Efecto de la salinidad sobre el desarrollo de biofilm <i>in vitro</i> sobre PE en <i>Pseudomonas</i> spp.	84
C-Efecto del arsénico sobre el desarrollo de biofilm <i>in vitro</i> sobre PE en <i>Burkholderia</i> spp.	85
D-Efecto de la salinidad sobre el desarrollo de biofilm <i>in vitro</i> sobre PE en <i>Burkholderia</i> spp.	86
4. Análisis Estadístico Multivariado	87
 CAPITULO II: Componentes extracelulares polisacáridicos y su rol en la formación de biofilm en el simbiote <i>Mesorhizobium japonicum</i>	 92
1. Estudio del rol de polisacáridos extracelulares en la formación del biofilm en <i>Mesorhizobium</i> sp.	92
2. Análisis <i>in silico</i> de regiones implicadas en la biosíntesis de	

polisacáridos extracelulares en <i>Mesorhizobium japonicum</i> MAFF303099	94
3. Generación de mutantes afectadas en la biosíntesis de polisacáridos extracelulares en <i>Mesorhizobium</i> spp.	97
4. Caracterización de las mutantes MAFFexoY (mlr5252) y MAFFmlr6756 derivadas de <i>Mesorhizobium japonicum</i> MAFF 3030399	101
4.1 Cuantificación de exopolisacáridos	102
4.2 Análisis del lipopolisacárido en la mutante MAFFmlr6756	104
4.3 Estudio de la autogregación en <i>M. japonicum</i> MAFF303099 y mutantes derivadas	105
4.4 Estudio de la motilidad de <i>M. japonicum</i> MAFF303099 y mutantes derivadas	108
5. Estudio sobre la capacidad de formación de biofilm en las mutantes MAFF exoY y MAFF mlr6756	111
5.1 Adhesión al Poliestireno (PE)	111
5.2 Adhesión al Policloruro de vinilo (PVC)	112
5.3 Adhesión al Polipropileno (PP)	113
5.4 Adhesión al Vidrio	114
6. Ensayos de nodulación	116
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	118
ANEXO	127
MATERIALES Y MÉTODOS	128
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	153

INTRODUCCION

1. MICROORGANISMOS DEL SUELO

1.1 El suelo como hábitat

El suelo constituye un ambiente heterogéneo en constante fluctuación que afecta el crecimiento y supervivencia de las bacterias. Como muchos ambientes naturales, resulta pobre en nutrientes, sometiendo a la microflora autóctona a una constante carencia donde las bacterias colonizan microhábitats ocupando menos del 1 % del volumen total (Young *et al.*, 2008). El microbioma del suelo, que incluye a todos los microorganismos y genomas encontrados, lleva a cabo los ciclos biogeoquímicos clave, mantiene la recirculación de nutrientes, la fertilidad y almacenamiento de carbono en el suelo, influyendo directa e indirectamente en la salud de plantas y animales del ecosistema terrestre (Fierer, 2017).

A su vez, las plantas influyen el entorno generando compuestos orgánicos a partir de sustancias inorgánicas y luz solar. Una porción de estos compuestos es liberada al suelo ofreciendo un rango de nichos para otros organismos, incluyendo una gran diversidad de microorganismos. En un ambiente natural, las plantas viven en asociación íntima con diversas bacterias, que constituyen complejas comunidades microbianas estructuradas taxonómicamente, conocidas como microbiota de la planta.

El 40 % del carbono del aire fijado por las plantas terrestres es liberado al suelo como exudados radiculares en un proceso denominado rizodeposición. Esta porción de suelo que rodea las raíces de las plantas y que se extiende hasta unos pocos milímetros de la superficie de la raíz se denomina rizósfera. En este sector abundan compuestos ricos en nitrógeno y fósforo e incluye exudados tales como: i) aminoácidos, azúcares simples y ácidos orgánicos que son liberados en forma pasiva; ii) carbohidratos y enzimas secretados activamente; iii) mucílago, que comprende lisados y desprendimientos celulares incluyendo polisacáridos y iv) gases, tales como dióxido de carbono y etileno (Whipps, 1990). La rizodeposición mejora el crecimiento microbiano y lleva a la estructuración de la comunidad en la rizósfera, aunque son diversos los factores que pueden influir sobre las bacterias, incluyendo el genotipo de las especies, el estado fisiológico, los factores ambientales como el pH, minerales, agua y el estado de la planta. Se calcula que el suministro de compuestos orgánicos en esta zona es de entre 50 y 100 mg de materia orgánica por gramo de raíz (Bach *et al.*, 2007) y este lleva a un aumento del crecimiento bacteriano que resulta en una densidad de células de entre 10 y 1000 veces mayor que en la zona no rizosférica.

Los microorganismos más abundantes en el suelo son las bacterias, hongos y virus asociados generalmente a enfermedades de los cultivos y en menor número se encuentran los protozoos y algas. Sin embargo, en la asociación planta – microorganismo – suelo, predominan los microorganismos benéficos que modulan el ambiente y en consecuencia el sistema productivo agrícola.

Las bacterias se consideran el grupo más diverso de microorganismos en el suelo y desempeñan un papel esencial en agricultura participando de diferentes procesos de importancia en la salud, calidad y fertilidad de los cultivos ya que están directamente relacionados con la disponibilidad y movilidad de nutrientes. De esta forma las bacterias del suelo se adaptan a cada ecosistema e intervienen en: i) la recuperación y rehabilitación de suelos, ii) proporcionar estructura, aireación, porosidad, retención de humedad y en la reducción del lixiviado de nutrientes, iii) el control de plagas y enfermedades, iv) la degradación de contaminantes orgánicos, v) la promoción del crecimiento de plantas y vi) enfermedades de plantas, como atributo perjudicial.

1.2 Bacterias del suelo

Entre los *phyla* más abundantes que comúnmente habitan el suelo encontramos a: *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (α y β) (Fierer *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2020). Las Proteobacterias representan el *phylum* dominante en suelo, la rizósfera y sobre raíces de plantas. Análisis de la microbiota asociada a las raíces de *Hordeum vulgare* (cebada) mostraron tres familias principales: *Comamonadaceae* (β -*Proteobacteria*), *Flavobacteriaceae* (*Bacteroidetes*) y *Rhizobiaceae* (α -*Proteobacteria*). Esta dominancia de grupos varía con la planta relacionada, como en el caso de estudios realizados sobre la microbiota de raíces de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, dónde predominaron bacterias de las familias *Pseudomonadaceae* (γ -*Proteobacteria*) y *Streptomycetaceae* (*Actinobacteria*) y en menor medida *Thermomonosporaceae* (*Actinobacteria*) a diferencia de las familias encontradas en la microbiota de las raíces de cebada (Bulgarelli *et al.*, 2015).

Las Proteobacterias también son el *phylum* dominante dentro de las comunidades de la hifosfera (porción de suelo adyacente a las hifas de hongos); los géneros *Delftia* (β -*Proteobacteria* de la familia, *Comamonadaceae*) y *Pseudomonas* (γ -*Proteobacteria* de la familia, *Pseudomonadaceae*) fueron identificados como el core, colonizando hifas de *Penicillium canescens*, hongo del suelo utilizado como biofertilizante en agricultura. Las bacterias de dichos géneros podrían jugar un rol crucial en la provisión de nutrientes para los hongos, en particular las especies de fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fósforo encontradas frecuentemente en asociación con hifas (Zhang *et al.*, 2020).

1.2.1 Bacterias promotoras del crecimiento de plantas

Los bioproductos para uso agrícola resultan una alternativa de interés para una agricultura sustentable debido a que reducen el uso de agroquímicos sin pérdida del rendimiento de la cosecha. Estos bioproductos se basan en microorganismos que promueven el crecimiento de plantas, PGPMs (del inglés: *Plant Growth Promoting Microorganism*) ó en metabolitos producidos por estos (Arora and Mishra, 2016; Gopalakrishnan *et al.*, 2014). Los microorganismos pueden ser clasificados según su mecanismo de promoción de crecimiento en plantas como: biofertilizantes (facilitan la adquisición de nutrientes), fitoestimuladores (producen hormonas de plantas) y agentes

de control biológico (BCAs, del inglés: *Biological Control Agent*; supresores de enfermedades) (Martínez-Viveros *et al.*, 2010).

Si en particular nos referimos a las bacterias que habitan la rizósfera, las rizobacterias, podemos clasificarlas en dos tipos principales: Rizobacterias extracelulares Promotoras del crecimiento de Plantas (ePGPR, del inglés: *extracellular Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) y Rizobacterias intracelulares Promotoras del crecimiento de Plantas (iPGPR, del inglés: *intracellular Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). Las ePGPR habitan la rizósfera o los espacios entre las células del córtex de la raíz, mientras que las iPGPR habitan principalmente dentro de estructuras nodulares especializadas de las células de la raíz. Los géneros de bacterias ePGPR son *Azotobacter*, *Serratia*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Burkholderia*. Las bacterias pertenecientes a las iPGPR incluyen los géneros *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* y *Rhizobium*, además de especies del género *Frankia* (Vedamurthy *et al.*, 2021).

1.2.2 Bacterias del suelo y degradación de compuestos tóxicos

Un amplio rango de compuestos tóxicos provenientes de la industria y la actividad agrícola pueden contaminar el suelo. El incremento de dichos compuestos orgánicos tóxicos en el ambiente se ha asociado con alto riesgo de enfermedades en humanos; algunos de ellos incluyen bifenilos policlorados (PCBs), pesticidas, solventes industriales, productos del petróleo, dioxinas y furanos, explosivos y compuestos brominados.

Se caracterizaron cepas bacterianas con enzimas capaces de degradar compuestos orgánicos tóxicos en una amplia variedad de suelos de ambientes contaminados. Se han identificado bacterias anaeróbicas que pueden convertir bifenilos policlorados (PCB) en especies menos cloradas por dechlorinación reductiva. Bacterias aeróbicas como *Burkholderia xenovorans* LB400 y *Rhodococcus* sp. cepa RHA1 pueden luego clivar los anillos de estos bifenilos menos clorados para obtener benzoatos y ácido pentanoico, productos frecuentemente degradados por otras bacterias. Bacterias como *Dehalococcoides ethenogenes*, *Dehalobacter restrictus*, *Desulfitobacterium dehalogenans*, *Dehalospirillum multivorans*, *Desulfuromonas chloroethenica* y *Desulfomonile tiedjei*, intervienen en la dechlorinación de compuestos y son capaces de deshalogenar PCE (percloroetileno) y otros compuestos aromáticos clorados. (Adams *et al.*, 2015).

En la biodegradación de productos derivados del petróleo se han aislado bacterias de diferentes tipos de suelo. Aislamientos de bacterias involucrados en la degradación de hidrocarburos, provenientes de suelos contaminados con estiércol de aves de corral, incluyeron bacterias de los géneros: *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp., *Rhodococcus* spp., *Alcanivorax* spp., *Alcaligenes* spp., *Serratia* spp., *Arthrobacter* spp., *Nocardia* spp., *Flavobacterium* spp., *Escherichia* sp., *Acinetobacter* sp. y *Proteus* sp. Estas bacterias fueron utilizadas luego en estudios de biorremediación (Adams *et al.*, 2015).

Las bacterias asociadas a plantas, tanto endofíticas (bacterias no patógenas que habitan el interior de plantas) como rizosféricas (bacterias que viven sobre y en las cercanías de las raíces de plantas), han mostrado contribuir en la biodegradación de compuestos orgánicos tóxicos en suelos contaminados y podrían tener potencial para aumentar la fitorremediación (uso de plantas para degradar compuestos tóxicos). Entre las bacterias endofíticas aisladas de plantas se incluye *Acetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum* y *Pseudomonas* (McGuinness and Dowling, 2009). Mientras que, las bacterias rizosféricas, forman complejas comunidades con alta diversidad que ofrecen un amplio rango de capacidades. En las tablas 1 y 2 se listan algunos casos reportados de biorremediación exitosa empleando bacterias rizosféricas (tabla 1) y endofíticas (tabla 2) asociadas a plantas.

Compuesto	Planta	Bacteria
PCBs	Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) Remolacha azucarera (<i>Beta vulgaris</i> L.) <i>Arabidopsis</i> Pasto varilla (<i>Panicum virogatum</i> L.)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas putida</i> Flav1-1 <i>Pseudomonas putida</i> PML2 Degradadores autóctonos
Plaguicidas Ácido 2,4-D (diclorofenoxiacético) PCP	Cebada (<i>Hordeum sativum</i> L.) Trébol rojo (<i>Trifolium pratense</i>) Lolium (<i>Lolium perenne</i> L.) Lolium (<i>Lolium perenne</i> L.)	<i>Burkholderia cepacia</i> Degradadores autóctonos Degradadores autóctonos
VOCs TCE	Trigo (<i>Triticum</i> spp.)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
HCs Productos del petróleo Petróleo PAHs Naftaleno	Mostaza Blanca (<i>Sinapsis alba</i> L.) Trigo (<i>Triticum</i> spp.) Festuca alta (<i>Festuca arundinacea</i>) Hierba Barmultra (<i>Lolium multiflorum</i>)	Degradadores autóctonos <i>Azospirillum lipoferum</i> spp <i>Azospirillum brasilense</i> Cd <i>Enterobacter cloacae</i> CAL 2 <i>Pseudomonas putida</i> UW3 <i>Pseudomonas putida</i> PCL1444
Fenantraceno Criseno (PAH)	Cebada (<i>Hordeum sativum</i> L.) Trébol blanco (<i>Trifolium repens</i> L.)	<i>Pseudomonas</i> degradadoras colonizadoras de la rizósfera <i>Rhizobium leguminosarum</i> tolerante a PAHs

Tabla 1: Casos de biorremediación exitosa utilizando bacterias rizosféricas asociadas a plantas. Abreviaturas: PCBs, bifenilos policlorados; PCP, pentaclorofenol; VOCs, compuestos orgánicos volátiles; TCE, tricloroetileno; HCs, hidrocarburos; PAHs, hidrocarburos policíclicos aromáticos. Tabla basada en McGuinness y Dowling, 2009.

Compuesto	Planta	Bacteria
PCBs, TCP	Trigo (<i>Triticum</i> spp.)	<i>Herbaspirillum</i> sp. K1
Ácidos Clorobenzoicos	Centeno silvestre (<i>Elymus dauricus</i>)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> R75 <i>Pseudomonas savastanoi</i> CB35
Plaguicidas Ácido 2,4-D (diclorofenoxiacético)	Arveja (<i>Pisum sativum</i>)	<i>Pseudomonas putida</i> VM1450
VOCs y tolueno	Lupin amarillo (<i>Lupinus luteus</i> L.) Árbol de álamo (<i>Populus</i>)	<i>Burkholderia cepacia</i> G4
Tolueno	Álamo (<i>Populus</i> cv. <i>Hazendans</i> y cv. <i>Hoogvorst</i>)	<i>Burkholderia cepacia</i> Bu61 (pTOM-Bu61) <i>Pseudomonas</i> sp.
MTBE, BTEX, TCE		
HCs Naftaleno	Arveja (<i>Pisum sativum</i>)	<i>Pseudomonas putida</i> VM1441 (pNAH7)
Explosivos TNT, RDX, HMX	Álamo (<i>Populus deltoidesnigra</i> DN34)	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001

Tabla 2: Casos de biorremediación exitosa utilizando bacterias asociadas a plantas, endofíticas. Abreviaturas: PCBs, bifenilos policlorados; TCP, triclorofenol; VOCs, compuestos orgánicos volátiles; MTBE, Metil ter-butil éter; BTEX, acrónimo que significa benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos; TCE, tricloroetileno; HCs, hidrocarburos; TNT, trinitrotolueno; RDX, ciclotrimetilentrinitramina; HMX, ciclotetramethylenetetranitramine. Tabla basada en McGuinness y Dowling, 2009.

1.2.3 Dos grupos bacterianos de interés: *Pseudomonas* y *Burkholderia*

Pseudomonas

Las bacterias del género *Pseudomonas*, de gran diversidad taxonómica y amplia distribución en los distintos ambientes, son capaces de colonizar la rizosfera de diferentes plantas y manifestar diversas características probióticas que las hacen candidatas para promover el desarrollo y salud de éstas e incrementar el rendimiento de la cosecha, además de los potenciales usos en biorremediación.

Pseudomonas putida, una especie asociada a plantas y comúnmente con capacidad para formar biofilm, puede promover el crecimiento en plantas además de poseer gran potencial en biorremediación (Danhorn and Fuqua, 2007). *P. fluorescens*, es una ePGPR que posee reconocida capacidad de colonización radicular y variados mecanismos probióticos, como el biocontrol de fitopatógenos mediado por la producción de antibióticos, enzimas extracelulares, la inducción de resistencia sistémica adquirida y el incremento de la biodisponibilidad de fosfatos orgánicos e inorgánicos. Variedades hipermucoideas de *P. fluorescens* CHAO, una ePGPR con incrementada capacidad de adhesión a superficies bióticas, pueden tener importancia comercial como inoculante agrícola (Banciotta *et al.*, 2001).

Agaras y colaboradores, obtuvieron una colección de 19 aislamientos de *Pseudomonas* sp. provenientes del suelo y la rizosfera de localidades de Argentina, que seleccionaron por sus capacidades de biocontrol, promoción del crecimiento de plantas, antagonismo

con diversos hongos patógenos y otras ventajas relativas a la capacidad de colonizar raíces. Mediante el cálculo de índices, determinaron que el mayor potencial antagonista de hongos junto con el más alto potencial de promoción del crecimiento de plantas, raramente convergen en un único aislamiento de *Pseudomonas*. Por otro lado, observaron que el potencial de biocontrol y de PGPR en aislamientos de *Pseudomonas* estarían asociados a su propia taxonomía (Agaras *et al.*, 2015).

En estudios realizados con *Pseudomonas* PGPRs, expuestas a zinc ó plomo, se encontró que en comparación con el experimento control, la totalidad de las cepas estudiadas produjeron un biofilm de apariencia grasosa y de importante biomasa. Estos resultados ponen énfasis en la fortaleza de los biofilms bajo condiciones de stress y su potencial para mantener un nicho favorable en un ambiente adverso con alta concentración de metales pesados (Meliani *and* Bensoltane, 2016). Así se suma en este género además de la promoción del crecimiento en plantas la capacidad para tolerar contaminantes y eventualmente disminuir el impacto sobre el entorno beneficiando la actividad agrícola.

Burkholderia

La capacidad de formar biofilms es uno de los factores que determinan la virulencia y persistencia en *Burkholderia*, debido a que confiere características que aumentan la tolerancia a antibióticos y la resistencia a las defensas del huésped. *B. cepacea* forma biofilms sobre superficies abióticas como vidrio y plástico y bióticas como por ejemplo células epiteliales de pulmón y cáscara de cebolla. Los exopolisacáridos son el principal componente del biofilm; recientemente se caracterizó un exopolisacárido insoluble en agua compuesto de ramnosa y manosa producido por *B. cenocepacia* H11 involucrado en el biofilm de dicha cepa (Coenye, 2010; Ferreira *et al.*, 2011; Bellich *et al.*, 2020). La habilidad de distintas cepas de *Burkholderia* para resistir la desecación y al stress producido por iones metálicos, reside en el EPS que cumple un rol en la supervivencia de la bacteria en ambientes adversos (Potts, 1994; Ferreira *et al.*, 2010). Estudios mostraron que el exopolisacárido producido por *Burkholderia caribensis* MWAP71 conecta capas de arcillas formando una red que contribuyen al incremento de las propiedades de hidratación del suelo (Vanhaverbeke *et al.*, 2003).

El género *Burkholderia* presenta una gran versatilidad metabólica, que se considera importante para habitar el suelo, el agua y las plantas. Recientemente se descubrió que también pueden formar nódulos en la leguminosa *Stylosanthes* spp. del Amazonas (Da Silva *et al.*, 2016), aunque la presencia del complejo *B. cepacia* en nódulos de otras leguminosas es considerada como un contaminante asociado al nódulo (nodule associated bacteria) (Martínez-Hidalgo *and* Hirsch, 2017). Se ha reportado la presencia de especies del complejo asociadas a plantas de interés agrícola y a suelos destinados a agricultura (Zhang *and* Xie, 2007; Draghi *et al.*, 2018), aunque el complejo *B. cepacia* se ha identificado originalmente en ambientes hospitalarios, en infecciones nosocomiales, como patógeno oportunista de personas inmunocomprometidas que presentan Fibrosis Quística y como patógeno de plantas y animales. Algunas especies del complejo *B. cepacia* exhiben actividades benéficas, como biorremediación, biocontrol y promoción

del crecimiento de plantas. *B. vietnamiensis*, *B. lata* y *B. contaminans* son especies fijadoras de nitrógeno; otras especies del complejo poseen capacidad de solubilizar fosfatos y de biocontrol de fitopatógenos (Trân et al., 2000; Ghosh et al., 2016).

Como parte de la versatilidad metabólica que le permite a *Burkholderia* sp. adaptarse a variados ambientes, se ha reportado la producción de compuestos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de diversos patógenos de plantas y humanos. Se han descrito distintos péptidos con actividad antifúngica, como las cepacidinas, glidobactinas y altericidinas producidas por *B. cepacia* (Lee et al., 1994; Schellenberg et al., 2007), un oligopéptido no ribosomal y la occidiofungina, producida por *B. contaminans* (Gu et al., 2009; Cheng et al., 2013). Adicionalmente, se reportó la producción de compuestos del tipo de los sideróforos y pigmentos de la familia de las fenazinas con actividad contra hongos fitopatógenos (Cartwright et al., 1995; De los Santos-Villalobos et al., 2012). El compuesto CF66I, del que solo se sabe que contiene enlaces amida, un ácido graso α -metil, bromina y unas unidades estructurales como el óxido de etileno ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), es producido por *B. cepacia* y presenta propiedades inhibitorias contra hongos filamentosos y levaduras (Quan et al., 2006; Li et al., 2007).

Los compuestos con actividad antibacteriana reportados en *Burkholderia* corresponden a moléculas de diferente naturaleza. Las cepacinas A y B son antibióticos acetilénicos producidos por *B. cepacia* que inhiben el crecimiento de bacterias Gram negativas y positivas (Parker et al., 1984). Los policétidos llamados enaciloxinas producidos por *B. ambifaria* presentan actividad contra especies del complejo *B. cepacia*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* (Mahenthiralingam et al., 2011). Además, se ha reportado actividad inhibitoria de *Xanthomonas campestris* mediada por sideróforos producidos por *B. cepacia* (De la Rosa-García et al., 2007). Un ejemplo de la versatilidad del género es la endofítica *Burkholderia* sp. WYAT7 aislada de la planta medicinal *Artemisia nilagirica* (Clarke). Este aislamiento fue capaz de producir biosurfactantes con actividad antibacteriana contra bacterias patógenas tales como *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 2453), *Escherichia coli* (MTCC 1610), *Salmonella paratyphi* y *Bacillus subtilis*. El glicolípido surfactante también mostró actividad antibiofilm (Ashitha et al., 2020). No obstante, debido a su naturaleza patogénica, el empleo de este género en agricultura está restringido.

Otro aspecto importante en el complejo *B. cepacia* es su actividad para degradar compuestos contaminantes persistentes y el uso potencial en biorremediación. En experimentos *in vitro* se ha observado que algunas especies pueden crecer en cianuro, polihidroxialcanoatos, cristal violeta, metil-paratión, tricloro-etileno, α y β endosulfanos o ácido 2,4-diclorofenoxiacético, entre otros (Hussain et al., 2007; Sebastianelli and Bruce, 2007; Cheng et al., 2012; Ekkhunnatham et al., 2012; Azami et al., 2017).

Análisis filogenéticos condujeron a la propuesta de separar el género en *Burkholderia*, *Paraburkholderia* y *Caballeronia* (Dobritsa and Samadpour, 2016), con el fin de poder utilizar en agrobiotecnología a los nuevos géneros separados del complejo cepacea.

En 2016, Eberl y Vandamme, propusieron como alternativa la posibilidad de reemplazar al complejo *B. cepacia* por especies del recientemente propuesto género *Paraburkholderia*, en particular por *Paraburkholderia phenazinium*, *Paraburkholderia megapolitana* y *Paraburkholderia bryophila*, debido a que éstas muestran actividad

antifúngica. No obstante, e independientemente de la posibilidad de utilizar a este grupo de bacterias con fines biotecnológicos, los autores enfatizan la importancia de llevar a cabo una caracterización exhaustiva de cada microorganismo, en la que se incluyan pruebas con líneas celulares o en ratones, para determinar el potencial patogénico de las cepas. Como otra alternativa surge la utilización de ingeniería genética, para transferir los genes que codifican las rutas biosintéticas de los compuestos antimicrobianos a organismos que los expresen para poder aplicarse en procesos biotecnológicos.

La aplicación de este nuevo género aún es un camino con diversos obstáculos ya que se necesita avanzar y seguir estudiando al grupo para una implementación segura, y así erradicar cualquier posibilidad de patogenicidad en mamíferos y transferencia de genes de virulencia.

2. BIOFILMS

2.1. Desarrollo y etapas del biofilm

En una gran variedad de ambientes naturales, las bacterias raramente se encuentran como microorganismos unicelulares en estado libre ó planctónico, sino que se hallan adheridas a superficies y en íntimo contacto con otras células microbianas formando biofilms, estructuras complejas definidas como comunidades asociadas a una superficie viva ó inerte, inmersos en una matriz extracelular (Costerton *et al.*, 1995). Esta matriz extracelular puede contener polisacáridos, proteínas y DNA (Branda *et al.*, 2005). La matriz de un biofilm conecta a las células entre sí y le confiere características claves incluyendo la habilidad para proteger a las células de la desecación y de otros factores de stress. El agua es el principal componente del biofilm, superior al 97 %, mientras que el 3 % del peso seco está constituido por las bacterias (Costerton *et al.*, 1999).

Los biofilms pueden constar de una sola especie microbiana ó múltiples especies y formarse sobre un amplio rango de superficies bióticas y abióticas. Los constituidos por multiespecie predominan en la mayoría de los ambientes, funcionando como un consorcio cooperativo en forma coordinada (Costerton *et al.*, 1995), mientras que los monoespecie intervienen en variedad de infecciones e implantes médicos (Adal *and* Farr, 1996).

El desarrollo de un biofilm es un proceso complejo que requiere comportamiento colectivo dentro de la comunidad. Así, su consolidación implica coordinación, interacción y comunicación entre múltiples especies bacterianas en un proceso secuencial que comprende varios pasos, iniciando con la adhesión bacteriana a una superficie, seguido de la formación de microcolonias (crecimiento) y maduración en una estructura tridimensional encerrada y estabilizada por una sustancia extrapolimérica que constituye la matriz (Figura 1). Mientras se dan condiciones de disponibilidad de nutrientes, el desarrollo del biofilm continúa, pero cuando los nutrientes escasean las bacterias se desprenden del biofilm retornando al modo planctónico. Así, esta respuesta a la hambruna permite a las bacterias buscar una nueva fuente de nutrientes iniciando un nuevo ciclo de desarrollo de biofilm.

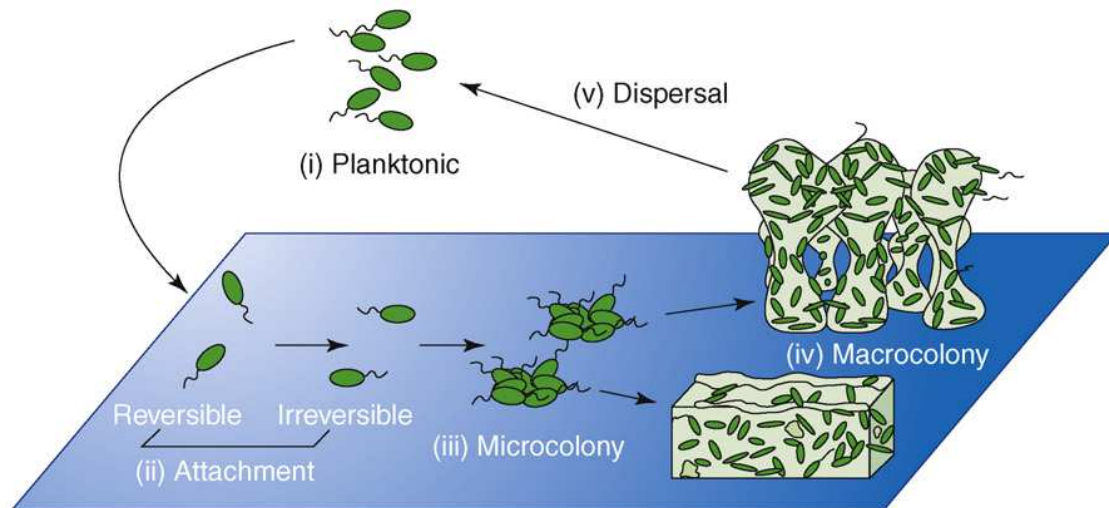


Figura 1: Modelo de desarrollo de la formación de biofilm. La formación de biofilm es un proceso temporal que involucra la transición a través de distintos estadios de organización multicelular. Operativamente distinguimos en el ciclo de formación (i) células planctónicas (*planktonic*), (ii) adhesión (*attachment*), (iii) formación de microcolonias (*microcolony*), (iv) macrocolonias (*macrocolony*) y (v) dispersión (*dispersal*). La fase de adhesión puede dividirse en los estadios reversible e irreversible. Las microcolonias son grupos de células originados de la expansión clonal de las células adheridas ó por activo traslado a través de la superficie. Cuando las microcolonias crecen en tamaño y se fusionan, forman macrocolonias de estructura parecida a torres en forma de hongos ó también de forma aplanada, en ambos casos las células se mantienen en la estructura por una matriz de exopolisacárido que contiene células muertas, detritos, proteínas y ADN extracelular. Finalmente, las macrocolonias pueden liberar células del biofilm, que se dispersan y retoman la vida planctónica y así eventualmente pueden entrar en un nuevo ciclo (Extraído de Monds y O’Toole, 2009).

La formación de un biofilm comienza cuando la bacteria sensa las condiciones ambientales que disparan la transición a la vida en superficie. Estas señales varían entre los distintos microorganismos. Por ejemplo, tanto *Pseudomonas aeruginosa* como *Pseudomonas fluorescens* forman biofilm bajo casi cualquier condición que permita su crecimiento (O’Toole and Kolter, 1998b) mientras que *Escherichia coli* O157:H7 sólo lo establece en condiciones nutricionales particulares como medios mínimos (Dewanti and Wong, 1995). En otros casos, la disponibilidad de un nutriente clave como el fósforo, que controla la adhesión y agregación a superficies, resulta un factor importante para la adaptación de las bacterias asociadas a plantas. El impacto de la limitación de fósforo sobre la formación de biofilms, sin embargo, depende del organismo y su rol en el ecosistema, por ejemplo, el sistema de dos componentes PhoR-PhoB activa la respuesta a la escasez de fósforo en diversas bacterias. En *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2 se reportó la inhibición de la formación de biofilm dependiente de *phoB* frente a la deficiencia de fósforo, mientras que en *Agrobacterium tumefaciens* la limitación llevó a un aumento en la densidad del biofilm ocasionado por la sobreexpresión de *phoB* (Monds *et al.*, 2001; Danhorn *et al.*, 2004).

En adición al factor nutricional, otras señales ambientales tales como, temperatura, osmolaridad, pH, hierro y oxígeno pueden influenciar el desarrollo del biofilm (O’Toole *et al.*, 2000) además de las características de la superficie soporte tales como estructura, morfología y composición, que impactan en todas las etapas del desarrollo de un biofilm. La rugosidad, por ejemplo, promueve la colonización, llevando a la formación de biofilm

en sitios reparados en forma de “bolsillos” que disminuyen el stress ambiental. Adicionalmente, las células son más adhesivas a las superficies hidrofóbicas ó no polares que a las superficies hidrofílicas. Los materiales porosos, permeables, propician la formación de biofilms en comparación con materiales densos (Kim *et al.*, 2012).

La adherencia es un complejo proceso de múltiples pasos que puede ser subdividido en estadios: atracción, adhesión y agregación (O’Toole *et al.*, 2000; Davey *et al.*, 2000; Kokare *et al.*, 2000). Análisis de biofilms mostraron que estructuras de la superficie celular tales como pili, flagelo, fimbrias, proteínas de la membrana externa (OMPs) y EPS (exopolisacáridos) juegan un rol integral en la capacidad de los microorganismos para adherirse a una superficie y desarrollar un biofilm. Muchos de estos componentes son estructuras importantes en la motilidad bacteriana, siendo que mutantes no motiles mostraron incapacidad para formar biofilm comparadas con la cepa salvaje. En *P. aeruginosa* flagelo, pili de tipo IV y LPS, mostraron cumplir un rol en la interacción y adhesión a superficies mientras que en *P. fluorescens* el pili de tipo IV no parece intervenir en este paso. En *Vibrio cholerae* mutantes defectivas en la síntesis de EPS mostraron reducida su capacidad de adhesión y desarrollo en la arquitectura del biofilm maduro característico de a cepa silvestre (O’Toole *et al.*, 2000). Cada estructura de la superficie bacteriana involucrada en la adhesión puede ser específica para el pegado a una superficie de propiedades particulares, además de que la expresión de dichas estructuras puede cambiar dependiendo del ambiente al que estén expuestas las bacterias.

2.2 Ventajas de la vida en biofilm.

Se estima que el 99 % de los microorganismos en ecosistemas abiertos, viven en biofilms adheridos a una superficie, consiguiendo en esta forma de vida varias ventajas. Algunas de ellas incluyen protección ante pH extremos, deficiencia de oxígeno, shock osmótico, exposición a variaciones de temperatura, radiación UV, predadores y antibióticos (Jefferson, 2004).

En la resistencia a agentes antimicrobianos, pueden actuar diferentes mecanismos que dependen de la población y ubicación de las células dentro del biofilm y de la química del compuesto. Dentro del biofilm las células pueden sufrir cambios fisiológicos que le confieren resistencia a biocidas. Así, podrían inducirse: incremento de la expresión de bombas de resistencia a múltiples drogas (MDR); activación del sistema de *quorum sensing*; cambios en la composición de las proteínas de la membrana externa (OMP) y respuesta al stress mediada por el factor σ rpoS en Gram negativas (Mah and O’Toole, 2001). En biofilms de *P. aeruginosa* los factores σ RpoS y AlgT, actuarían en forma concertada en el control de la respuesta al stress provocado por biocidas oxidativos (Cochran *et al.*, 2000). Las bombas de eflujo median la resistencia al glutaraldehído en *P. fluorescens* y *P. aeruginosa*; adicionalmente, la inducción de moduladores de la formación de biofilm que incluyen las vías de degradación de fosfonato, biosíntesis de lípidos y de poliaminas, podrían contribuir en dicha resistencia (Vikram *et al.*, 2015).

Los exopolisacáridos (EPSs) bacterianos que constituyen la matriz del biofilm incrementan la captación del agua, ayudando a evitar la desecación de las células. La alta densidad celular permite además el rápido intercambio de nutrientes, metabolitos y

material genético, que sumado a la diversidad de especies dentro del biofilm, aumenta la posibilidad de transferencia horizontal de genes que frecuentemente codifican para características que confieren ventajas selectivas (Burmølle *et al.*, 2008; Sørensen *et al.*, 2005). Estas facultades en su conjunto aumentan la supervivencia de las células en biofilm y contribuyen en la capacidad de adaptación al medio ambiente en constante cambio. Por lo tanto, está ampliamente aceptado que los biofilms constituyen el estilo de vida predominante de los microorganismos en ecosistemas naturales y de ingeniería (Douterelo *et al.*, 2014).

2.3. Componentes de la matriz del biofilm

La matriz del biofilm conecta las células y otorga características clave a la estructura. Así, su composición puede variar para adaptarse a las condiciones cambiantes del ambiente. Aunque usualmente está compuesta de polisacáridos extracelulares, puede incluir proteínas y ADN en diferentes proporciones, dependiendo la/s especie/s bacterianas que constituyan el biofilm.

2.3.1 Polisacáridos extracelulares o asociados a la superficie de las bacterias

Una elevada producción de polisacáridos extracelulares, pueden incrementar la formación de biofilm y promover la colonización de plantas. En algunas cepas de *P. fluorescens* la producción de exopolisacáridos juega un importante rol tanto en la interacción con plantas como con micorrizas arbusculares (Bianciotto *et al.*, 2001; Turnbull *et al.*, 2001). Una mutante regulatoria de *P. fluorescens* CHAO hipermucoide, mostró incrementada su capacidad de adhesión a raíces de zanahoria, así como a micelios de micorrizas arbusculares (Bianciotto *et al.*, 2001). Sin embargo, la elevada producción de un polisacárido no siempre correlaciona con la formación de biofilm. En el patógeno *P. aeruginosa*, el alginato, principal exopolisacárido producido por esta especie, puede influir en la arquitectura del biofilm cuando se sobreproduce, pero no es requerido y no siempre puede ser detectado en la matriz del biofilm en la cepa silvestre (Wozniak *et al.*, 2003). Los polisacáridos juegan además un rol central en respuesta a la desecación; por ejemplo, bajo condiciones de deshidratación el fitopatógeno *P. putida* formó un biofilm más espeso y poroso, con una gruesa capa polisacarídica en la interfase con el aire (Chang and Halverson, 2003). Entre los genes activados en respuesta a la desecación se encontraron aquellos involucrados en la síntesis del alginato que constituiría la matriz de estos biofilms (Van de Mortel and Halverson, 2004).

En el simbiote *Ensifer meliloti*, el principal exopolisacárido es el succinoglicano que es requerido para la colonización y formación del nódulo. Una mutante deficiente en la producción del succinoglicano, afectada en el gen *exoY*, formó un biofilm inmaduro, mientras que la sobreproducción del polisacárido llevó a un biofilm más denso, pero menos estable (Fujishige *et al.*, 2006). En contraste, mutantes del fitopatógeno *Agrobacterium tumefaciens* incapaces de sintetizar succinoglicano, logran adherirse eficientemente a plantas y fueron capaces de formar biofilm (Tomlinson *et al.*, 2010). En cambio, el polisacárido unipolar (UPP) producido por *A. tumefaciens* es un

exopolisacárido similar al glucomanano de *Rhizobium leguminosarum* y cumple un rol esencial en la adhesión y formación de biofilm sobre superficies abióticas, pudiendo ser requerido para una unión eficiente a la planta hospedadora (Xu *et al.*, 2013). Por otra parte, en el simbiote de leguminosas *R. leguminosarum*, una mutante afectada en la glicosiltransferasa *pssA* fue incapaz de producir el exopolisacárido ácido que constituye el principal componente de la matriz y por lo tanto no desarrolló el biofilm típico (Russo *et al.*, 2006). Asimismo, mutaciones en el sistema de secreción de proteínas de tipo I PrsDE, afectaron la exportación de las glicanasas PlyA y PlyB que modularían el tamaño del exopolisacárido ácido, alterando la estructura de la matriz y maduración del biofilm (Russo *et al.*, 2006). En *Azospirillum brasilense*, durante el proceso de adhesión – agregación intervendrían polisacáridos y lectinas específicas. El propio flagelo polar glicosilado se uniría a la raíz de trigo como una adhesina facilitando las etapas iniciales de formación del biofilm (Danhorn *and* Fuqua, 2007).

Rhizobium spp. es capaz de producir grandes cantidades de EPS en cultivo. La utilización de diferentes fuentes de carbono para el crecimiento y producción de exopolisacárido fue reportado tempranamente y el manitol resultó ser el más efectivo promotor (Breedveld *et al.*, 1993). Para muchas especies de rizobacterias el crecimiento y la producción de EPS ocurren simultáneamente, así la cantidad de EPS producido varía con la fase de crecimiento del cultivo, mientras que la composición de este permanece constante durante el período de crecimiento (Breedveld *et al.*, 1993; Ghosh *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta que la agitación favorece la disponibilidad de oxígeno de los cultivos, la velocidad de agitación controla el crecimiento bacteriano y consecuentemente la producción de EPS. Así, dicho crecimiento tiende a incrementarse a alta velocidad de agitación (Ghosh *and* Maiti, 2016). Con respecto a la temperatura, estudios sugieren que en rizobios la mejor condición para la producción de EPS es la temperatura óptima de crecimiento (Ghosh *et al.*, 2015).

Polisacáridos involucrados en la matriz del biofilm de *Pseudomonas*

Varias especies de *Pseudomonas* han sido estudiadas en cuanto a los polisacáridos involucrados en la matriz del biofilm, entre las cuales encontramos al patógeno oportunista *P. aeruginosa* y especies asociadas a plantas como *P. fluorescens*, *P. putida*, y *P. syringae*. Entre los polisacáridos involucrados en la formación de biofilms en *P. aeruginosa* el alginato, el Psl y el Pel fueron estudiados ampliamente. Las *Pseudomonas* que interactúan con plantas pueden producir diferentes tipos de EPSs durante la formación de biofilm. El genoma de *P. protegens* contiene el *cluster* de genes *psl* y *pel*, mientras que el genoma de *P. syringae* contiene solo los genes *pel*. En *P. putida*, los exopolisacáridos A y B (Pea y Peb, respectivamente) son componentes importantes de la matriz del biofilm y en *P. fluorescens* la celulosa y la poli- N-acetil-glucosamina (PNAG) (en las especies no productoras de celulosa) han sido descritos como componentes clave en el biofilm. Finalmente, el levano (un polisacárido polifructano neutro) fue descrito en *P. syringae* y algunas cepas de *P. fluorescens*. Recientemente se han identificado en *P. fluorescens* F113 genes ó *cluster* de genes que codifican proteínas involucradas en la biosíntesis de los polisacáridos: PNAG, Pap (polisacárido ácido de *Pseudomonas*),

alginate y levano (Blanco-Romero *et al.*, 2020).

Polisacáridos involucrados en la matriz del biofilm de *Burkholderia*

En el género *Burkholderia*, fueron caracterizados varios polisacáridos, el EPS más común dentro del grupo es el cepaciano, que se ha identificado en diferentes especies incluyendo aislamientos ambientales asociados con plantas y aislamientos clínicos y ambientales del complejo cepacia (Ferreira *et al.*, 2011). Estudios estructurales de especies del complejo cepacia mostraron que pueden producir al menos cinco diferentes EPSs y que algunas veces el tipo de polisacárido depende del medio utilizado. El cepaciano está compuesto por una unidad repetitiva ramificada y acetilada heptasacáridica de D-glucosa, D-ramnosa, D-manosa, D-galactosa y ácido glucurónico en relación 1:1:1:3:1; el número de grupos acetilo es dependiente de cada cepa. Algunas cepas producen un solo tipo de EPS, mientras que otras producen una mezcla, por ejemplo, *Burkholderia cepacia* IST408 produce solo el polisacárido cepaciano, pero *Burkholderia cepacia* C9343 produce simultáneamente PS-I (unidades compuestas de una glucosa y una galactosa sustituida por un carboxietilideno), PS-II (cepaciano) y α -1,6-glucano. En aislamientos clínicos del complejo cepacia también se encontró PS-I y mezclas de EPSs que incluyen levano. *B. kururiensis* una especie diazotrófica, produce EPS A (compuesto por 3 glucosas, 2 ramnosas y 2 sustituyentes acetilo) y EPS B, compuesto por una mezcla de dos polímeros: el cepaciano y un octasacárido que difiere del anterior en la presencia de un residuo glicosilo terminal.

Estudios sobre mutantes en los genes *bce* involucrados en la síntesis del EPS cepaciano, mostraron un biofilm mucho más delgado comparado con la cepa parental tanto en mutantes incapaces de producirlo como en aquellas capaces de sintetizar sólo la forma de bajo peso molecular (Ferreira *et al.*, 2011).

Polisacáridos producidos por rizobios

En los primeros estadios durante la iniciación y elongación del tubo de infección en la simbiosis con la planta, los polisacáridos producidos por los rizobios presentes en la superficie microbiana tienen un rol central. En diversos rizobios, se han descrito varios polisacáridos que intervienen en la formación de biofilms y participan en la simbiosis con la planta hospedadora. Los polisacáridos pueden estar asociados a la bacteria de distintas formas; los polisacáridos capsulares (CPS) y antígeno-K polisacárido (KPS) se encuentran en una capa unida covalentemente a la superficie, como los CPS neutros que forman una matriz polisacáridica firmemente asociada a la superficie celular (Zevenhuizen *et al.*, 1986). Los lipopolisacáridos (LPS) se encuentran anclados en la membrana externa y su estructura consta de un lípido A, un core oligosacárido y un antígeno-O polisacárido. En otros casos, los polisacáridos pueden estar débilmente asociados a la superficie celular, como ocurre con los exopolisacáridos (EPS) y polisacáridos neutros de alto peso molecular (NP) ó el glucomanano. En *Rhizobium leguminosum* bv. *trifolii* y *R.l. viciae* el glucomanano es requerido para una colonización eficiente de la superficie de la raíz. Este polisacárido se encuentra localizado

exclusivamente en uno de los polos de la bacteria y se une a lectinas en raíces de arveja y algarroba y participa en la unión inicial y polar de las bacterias a lo largo de la superficie del pelo radicular y en la inducción de la síntesis de celulosa que es requerida para la formación del capuchón sobre dicha superficie (Laus *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2008). Mutantes incapaces de producir glucomanano resultan deficientes en adhesión e invasión simbiótica bajo condiciones levemente ácidas (Laus *et al.*, 2006).

Por otra parte, en el espacio periplásmico de los rizobios podemos encontrar glucanos cíclicos β (1-2), que cumplen una función importante en osmoregulación e infección de la planta (Lepek *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1986; Breedvel and Miller, 1994).

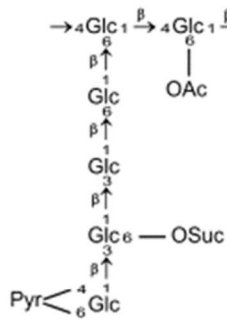
Exopolisacáridos (EPS) de rizobios

En rizobios, los exopolisacáridos son heteropolisacáridos formados por unidades repetitivas, especie ó cepa específicos. Estos pueden secretarse al medio ambiente (EPS), quedando débilmente unidos a la superficie bacteriana o pueden estar retenidos sobre la misma como un polisacárido capsular (CPS). La producción de EPS es ubicua entre rizobios, aunque su composición varía ampliamente en las distintas especies (Skorupska *et al.*, 2006; Janczarek *et al.*, 2014; Muszynski *et al.*, 2016) (figura 2). Existe una amplia diversidad en la estructura química de los EPSs en rizobios, concerniente a la composición de los azúcares, la unión de las subunidades, el tamaño de la unidad repetitiva, el grado de polimerización y a las decoraciones no hidrocarbonadas (Ghosh and Maiti, 2016).

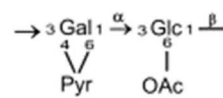
Rhizobium leguminosarum abarca tres biovariedades que nodulan diferentes plantas hospedadoras, aunque la unidad repetitiva de los EPSs se encuentra conservada. Esta unidad está integrada por glucosa, ácido glucurónico y galactosa en relación molar 5:2:1 (Robertson *et al.*, 1981) (figura 2-c, Skorupska *et al.*, 2006). Sin embargo, en ciertas cepas de *R. leguminosarum* existen variaciones en la unidad repetitiva en el contenido de azúcares, largo de la cadena y el patrón de los sustituyentes no azúcares (figura 2-h, i, Skorupska *et al.*, 2006).

En *Mesorhizobium japonicum* R7A, se ha caracterizado un EPS ácido formado por una unidad repetitiva octamérica O-acetilada y compuesta de un residuo de ácido D-riburónico, un ácido glucurónico, cinco glucosas y una galactosa, sustituidos con 1 a 3 grupos O-acetilo. La O-acetilación puede ocurrir en cuatro residuos azúcar posibles en proporción no estequiométrica y cada octasacárido es un promedio de 3 sustituciones O-acetilo (figura 2-j, Muszynski *et al.*, 2016). El EPS de bajo peso molecular (LMW-*low molecular mass*) producido por esta cepa es un monómero correspondiente a la unidad del octasacárido mencionado, mientras que el EPS de alto peso molecular (HMW-*high molecular mass*) corresponde a la estructura derivada de la polimerización de dicho monómero. La estructura del EPS de *M. japonicum*, del succinoglicano de *E. meliloti* 1021 y del EPS de *Rhizobium tropici* CIAT 899, comparten una alta similitud, la organización genética y los genes correspondientes se encuentran conservados en las tres especies (Muszynski *et al.*, 2016).

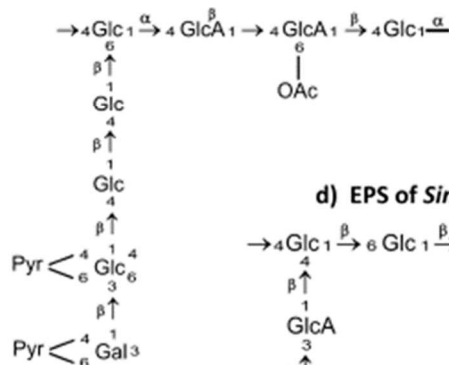
a) Succinoglycan (EPS I) of *S. meliloti* Rm1021



b) Galactoglucan (EPS II) of *S. meliloti* Rm1021



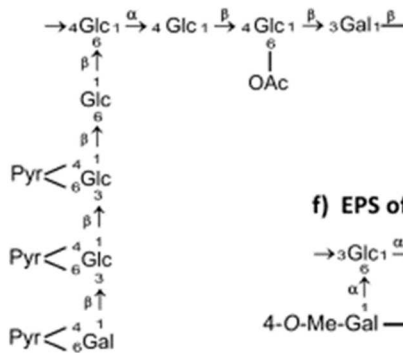
c) EPS of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* RBL5599



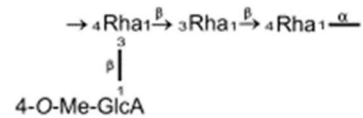
d) EPS of *Sinorhizobium* sp. NGR234



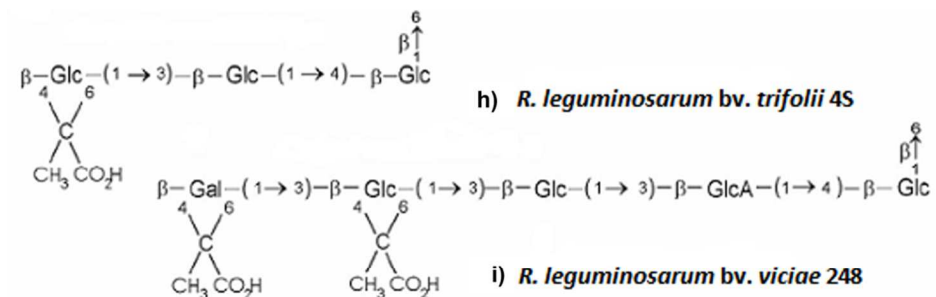
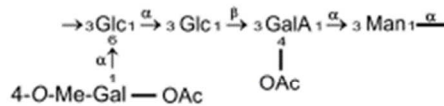
e) EPS of *R. tropici* CIAT899



g) EPS of *B. elkanii* USDA76



f) EPS of *B. japonicum* USDA110



j) *M. japonicum* R7A

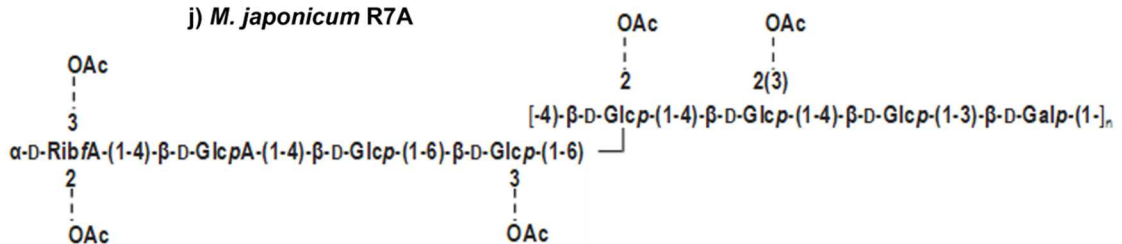


Figura 2. Estructura química de la unidad repetitiva de los exopolisacáridos de rizobios. Abreviaturas: Glc, glucosa; Gal, galactosa; Rha, ramnosa, Suc, succinato; GlcA, ácido glucurónico, Ac, acetil, Pyr, piruvato y D-Rib, ácido D-riburónico (basado en Skorupska *et al.*, 2006; Janczarek *et al.*, 2014; Muszynski *et al.*, 2016).

Exopolisacáridos producidos por *Ensifer meliloti*: Succinoglicano y galactoglucano

Diversos estudios sobre el rol de los polisacáridos de superficie han sido realizados sobre el modelo de interacción simbiótica *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti*–alfalfa, siendo el succinoglicano (EPS I) uno de los exopolisacáridos mejor conocidos producido por varias cepas (Reinhold *et al.*, 1994). Este polisacárido está formado por unidades repetidas de un octosacárido formado por galactosa y glucosa en relación 1:7 y cada unidad está sustituida por grupos acetilo, piruvilo y succinilo (figura 2-a). El EPS I es secretado en dos fracciones principales según el grado de polimerización, una de alto peso molecular (HMW-*high molecular mass*) formada por polímeros de cientos a miles unidades (entre 10^6 - 10^7 Da) y otra de bajo peso molecular (LMW- *low molecular mass*) formada por monómeros, dímeros y trímeros (Her *et al.*, 1990).

En condiciones de bajo fosfato *E. meliloti* produce además otro exopolisacárido, el galactoglucano (EPS II), cuya biosíntesis está dirigida por los genes *exp*. Este polisacárido está compuesto de unidades disacarídicas de glucosa y galactosa sustituidas por un grupo acetilo y un piruvilo respectivamente (Her *et al.*, 1990; Zhan *et al.*, 1991) (figura 2-b). El grupo de genes *exp* está localizado en el plásmido pSymB y se encuentra a 200 kb del *cluster* de los *exo/exs* genes (Skorupska *et al.*, 2006). El EPS II también es secretado en dos fracciones principales de alto y bajo peso molecular, esta última integrada por oligómeros de entre 15 y 20 unidades (Wang *et al.*, 1999). El patrón de los sustituyentes no hidrocarbonados puede ser diferente en varias cepas de la misma especie y dependiente de la fase de crecimiento y el medio de cultivo. Estas modificaciones resultan ser muy importantes para la función del EPS como señal en la simbiosis (Janczarek *et al.*, 2014).

La síntesis de los exopolisacáridos está controlada genéticamente por los genes *exo/exs* y *pss*, que integran grandes *clusters* localizados en el megaplásmido (*E. meliloti*) (Finan *et al.*, 2001) ó en el cromosoma bacteriano como en el caso de *Mesorhizobium japonicum* (Kaneko *et al.*, 2000), *R. leguminosarum*, *R. etli* y *Bradyrhizobium japonicum* (Janczarek, 2011). Las enzimas codificadas en estas regiones incluyen transferasas involucradas en el ensamblaje de la unidad repetitiva, enzimas de la biosíntesis de los precursores nucleótido azúcar, enzimas que catalizan modificaciones del EPS con sustituciones no hidrocarbonadas y proteínas responsables de la polimerización y exportación de la cadena creciente del EPS hacia la superficie celular (Skorupska *et al.*, 2006).

La biosíntesis del exopolisacárido representa un proceso de múltiples pasos y depende de la actividad de un complejo proteico localizado en las membranas interna (MI) y externa (ME) de la bacteria. Los nucleótido-difosfo-azúcares son transferidos secuencialmente a la cadena polisacarídica creciente por las glicosiltransferasas. El polisacárido nascente se encuentra anclado a un aceptor lipídico, el undecaprenol difosfato y la unidad repetitiva se forma en la cara interna de la membrana plasmática. El EPS es sintetizado por la vía dependiente de dos proteínas clave de las familias Wzx/Wzy, involucradas en la translocación del lípido *carrier* con la unidad repetitiva desde el citoplasma al espacio periplásmico a través de la membrana interna (Wzx) y en la polimerización de la unidad repetitiva (Wzy).

El transporte a través del espacio periplásmico y exportación por la membrana externa

esta mediado por proteínas de las familias Wzz/Wzc (proteínas copolimerasas del polisacárido-PCP) y Wza (proteínas de la membrana externa transportadoras del polisacárido-OPX) (Becker, 2015).

Biosíntesis del EPS I (succinoglicano) en *E. meliloti*. Cluster de *exo* genes

E. meliloti posee un genoma multipartito compuesto por tres replicones: un cromosoma de 3.65 Mb y dos megaplásmidos: pSymA de 1.35 Mb y pSymB de 1.68 Mb. El *cluster* de los *exo/exs* genes que dirigen la biosíntesis del EPS I se encuentra localizado en el pSymB organizados en varios operones (Charles *and* Finan, 1991). Además, existen algunos otros genes importantes para la biosíntesis y regulación del succinoglicano en el cromosoma: *exoC*, *exoR*, *exoS*, *exoD* y *mucR*.

Como primer paso en la biosíntesis son sintetizados los precursores nucleótido azúcar (figura 3). El gen *exoB* codifica para la UDP-glucosa-4-epimerasa que convierte UDP-glucosa en UDP-galactosa. El gen *exoC* codifica para una fosfoglucomutasa que cataliza la transformación de glucosa-6-fosfato en glucosa-1-fosfato. Mutaciones en *exoB* y en *exoC* causan la pérdida de producción del EPS I, aunque también afectan la síntesis de otros polímeros como el EPS II, LPS y β -glucanos.

El ensamble de la unidad repetitiva se inicia con una ExoY galactosiltransferasa (figura 3), mutantes *exoY* resultan incapaces de producir succinoglicano y son simbióticamente defectivas debido a su incapacidad de iniciar la formación del tubo de infección. El *exoF* codifica para una proteína necesaria para la adición de galactosa al lípido carrier y un complejo de glucosiltransferasas codificadas por los genes *exoA*, *exoL*, *expM*, *exoO*, *exoU* y *exoW*, adicionan subsecuentemente residuos de glucosa. Mutaciones en los genes *exoF*, *exoA*, *exoL* y *exoM*, ocasionan la falta de producción de EPS I y formación de nódulos fijadores. Mutantes en el *exoO* producen grandes cantidades de carbohidratos insolubles que consisten en un polímero de cuatro subunidades de azúcares. Mutantes *exoU* y *exoW* no producen succinoglicano y no son capaces de infectar nódulos en alfalfa (Skorupska *et al.*, 2006).

Durante el ensamblaje de la unidad repetitiva del EPS I se incorporan los sustituyentes no azúcares. El *exoH* codifica para una succiniltransferasa responsable del agregado del grupo succinilo. Mutantes en este gen producen un EPS I de alto peso molecular carentes de este grupo y simbióticamente no funcional. Los grupos acetilo son incorporados por una transferasa codificada por el gen *exoZ* y mutantes en este gen producen succinoglicano sin grupos acetilo, forman nódulos fijadores en la planta hospedadora, pero presenta una reducida eficiencia en la iniciación y elongación del tubo de infección. Mutantes en el gen *exoV* resultan defectivas en la síntesis del EPS I y acumulan unidades desprovistas del grupo piruvilo, indicando que esta modificación es necesaria para la polimerización y secreción del succinoglicano (Skorupska *et al.*, 2006).

La polimerización y exportación del EPS I es realizada por proteínas codificadas por los genes *exoPQT*. La proteína ExoP, homóloga a proteínas de la familia Wzc, es una tirosina quinasa autofosforilante que cumple un rol crucial en este proceso; mutaciones del *exoP* impiden la polimerización de la unidad repetitiva (Jofre *and* Becker, 2009; Becker, 2015). Otras dos proteínas involucradas en la polimerización del succinoglicano

son ExoQ, homóloga a proteínas de la familia Wzy y responsable de la producción del EPS I de alto peso molecular (HMW) y ExoT, homóloga a Wzx, que participa en la biosíntesis del EPS I de bajo peso molecular (LMW) formando trímeros y tetrameros de la unidad repetitiva (González *et al.*, 1998).

Aunque el EPS I de bajo peso molecular es producido por una vía biosintética específica, también es generado a través del clivaje del succinoglicano de HMW por acción de las endoglucanasas ExoK y ExsH, que generan un trímero simbióticamente activo. Las modificaciones acetilo y succinilo del EPS I influyen la susceptibilidad del polisacárido de ser clivado por estas enzimas (York *and* Walker, 1998).

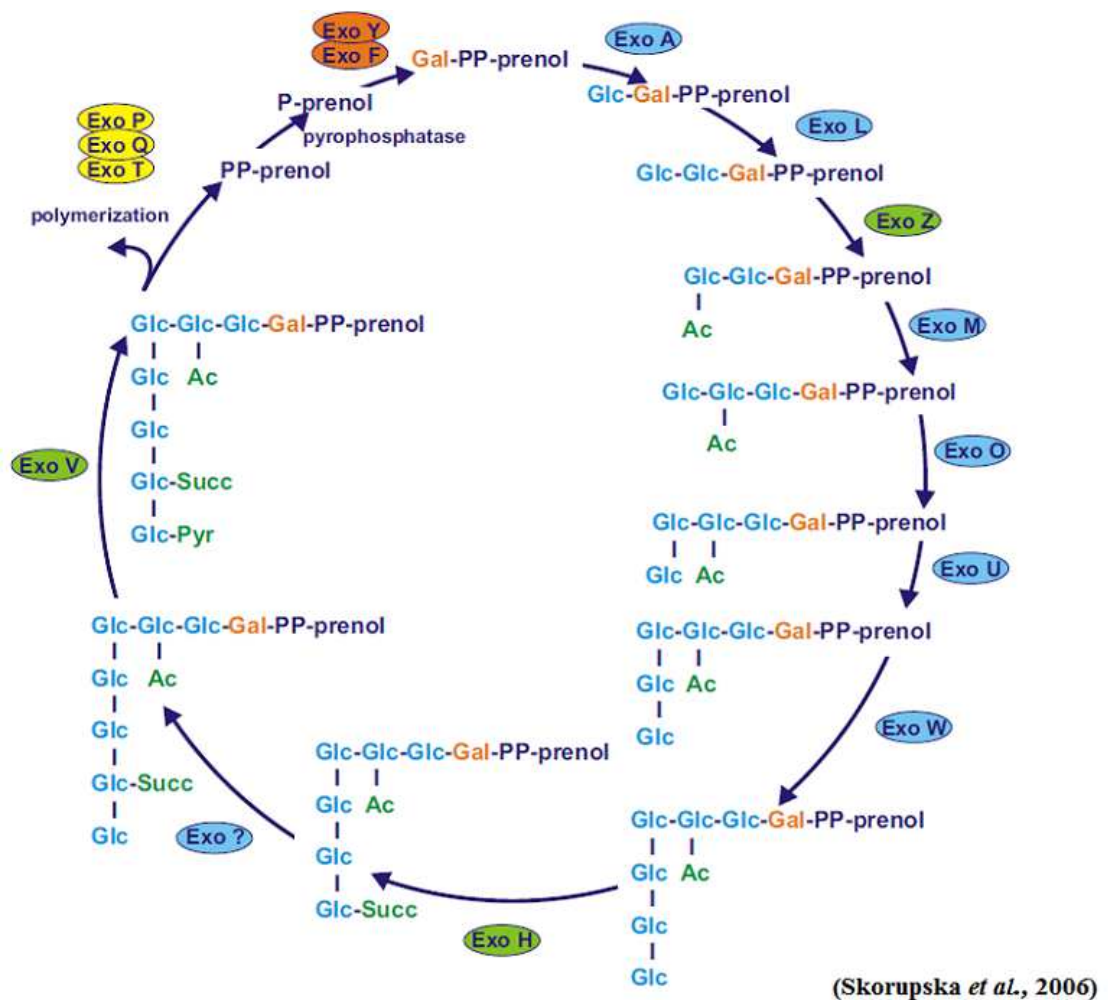


Figura 3. Vía metabólica para el ensamblaje de la unidad repetitiva del EPS I en *Sinorhizobium meliloti*. La figura muestra en naranja y celeste a las enzimas encargadas de transferir precursores sobre el lípido carrier (azúcar transferasas). En verde se indican las enzimas involucradas en el agregado de decoraciones no glucosídicas y en amarillo a aquellas ocupadas de la polimerización y exportación del EPS. Abreviaturas: Glc, glucosa; Ac, acetato; Pyr, piruvato; Succ, succinato. Gráfico extraído de Skorupska *et al.*, 2006.

Funciones asociadas a los exopolisacáridos en rizobios

Se han postulado diversas posibles funciones biológicas para el EPS en rizobios. Estas incluyen:

a) Protección mecánica ante factores de stress ambiental.

El EPS I (HMW) de *E. meliloti* podría estar involucrado en la protección ante la desecación de la bacteria (Gharzouli *et al.*, 2013).

b) Intervención en estadios tempranos de la infección de la planta (adhesión de la bacteria a la raíz)

Inicialmente, las lectinas de los pelos radiculares de las raíces de la planta reconocen los polisacáridos de superficie del rizobio y en este vínculo inicial el EPS podría favorecer la adhesión de la bacteria a la punta del pelo radicular en desarrollo. Sin embargo, mutantes deficientes en la producción del EPS en *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* no fueron significativamente afectadas en adhesión a raíces de alfalfa y trébol respectivamente (Ghosh *and* Maiti, 2016).

c) Supresión de la respuesta defensiva de la planta y protección ante compuestos antimicrobianos vegetales.

El succinoglicano de alto peso molecular tiene la capacidad de proteger a *E. meliloti* de la acción antimicrobiana del péptido NCR247 (cuando su concentración aumenta a 20 μ M). Esta función protectora no solo puede ser crítica durante estadios tempranos de la invasión, sino también protegería a la bacteria contra la acción antimicrobiana de péptidos NCR catiónicos, esenciales para los estadios tardíos de la simbiosis (Arnold *et al.*, 2018). Dichos péptidos NCR son esenciales para la diferenciación de la bacteria en bacteroide fijador de nitrógeno y más aún, podrían estar optimizando el proceso de fijación de nitrógeno (Van de Velde *et al.*, 2010; Maróti *et al.*, 2015).

d) Iniciación y extensión del hilo de infección y desarrollo de nódulos.

Ha sido ampliamente postulado que el EPS es importante para la eficiente infección del nódulo en *E. meliloti* y en *R. leguminosarum* (Battisti *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1999). Por otra parte, estudios realizados en *E. meliloti* mostraron que mutantes incapaces de producir succinoglicano de bajo peso molecular establecieron una simbiosis productiva con *Medicago truncatula*, aunque con baja eficiencia con respecto a la cepa wt (Mendis *et al.*, 2016) concluyendo que el succinoglicano EPS I HMW, es necesario para la simbiosis eficiente de *E. meliloti* con la planta modelo *M. truncatula*.

Diversos datos experimentales mostraron evidencias de que el EPS es especialmente importante en la simbiosis de rizobios con leguminosas que forman nódulos indeterminados tales como *Sinorhizobium meliloti* con *M. sativa*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* con *Vicia sativa*, *R. l.* bv. *trifolii* con *Trifolium* ssp., y *R. l.* NGR234 con *Leucaena*, donde el polisacárido resulta indispensable para la iniciación y propagación del largo tubo de infección, liberación de las bacterias del tubo, desarrollo de bacteroides y una nodulación efectiva (Skorupska *et al.*, 2006).

e) Como molécula señal

Uno de los roles más importantes y controvertidos propuestos para el EPS es el de molécula señal. El EPS de *Mesorhizobium japonicum* R7A participaría como molécula señal en la simbiosis con plantas de *Lotus* formando nódulos determinados. Así dicha molécula actuaría como señal con su hospedador compatible modulando la respuesta defensiva de la planta y permitiendo el desarrollo completo del tubo de infección y liberación de las bacterias (Kelly *et al.*, 2013). Se ha identificado un receptor del exopolisacárido en *L. japonicus* denominado EPR3 y existe fuerte evidencia de que el EPR3 distingue entre estructuras de EPS y responde negativamente al EPS incompatible y positivamente al compatible regulando el pasaje de bacterias beneficiosas a través de la capa de células epidermales de la planta (Kawaharada *et al.*, 2015, 2017; Muszynski *et al.*, 2016).

f) Formación de biofilm y adhesión a superficies

En *M. tianshanense*, el EPS está involucrado en la formación de biofilms. Mutantes defectivas en la producción de EPS mostraron disminuida su capacidad de formar biofilm sobre vidrio comparadas con la cepa *wt* que desarrolló una significativa cantidad de dicha estructura. Estas mutantes además resultaron profundamente defectivas en nodulación (Wang *et al.*, 2008).

El EPS I de *E. meliloti* es requerido para la formación de biofilms: una mutante *exoY* formó un biofilm inmaduro, mientras que la sobreproducción de este polisacárido llevó a la formación de un biofilm mas denso, pero menos estable (Fujishige *et al.*, 2006).

Como mencionamos anteriormente, mutaciones que afectaron la exportación de las glicanasas PlyA y PlyB que modularían el tamaño del exopolisacárido ácido, alteraron la estructura de la matriz de EPS y la maduración del biofilm en *R. leguminosarum* (Russo *et al.*, 2006).

Celulosa

La celulosa bacteriana es producida como un exopolisacárido por diversos microorganismos, principalmente por especies de bacterias Gran-negativas. Dentro de los géneros de bacterias con capacidad de producir este polisacárido encontramos a: *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Acetobacter*, *Aerobactea*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Sarcina*, *Cyanobacter* y *Rhizobium*. La celulosa producida por bacterias es un producto de alto valor de interés industrial (Raghavendran *et al.*, 2020).

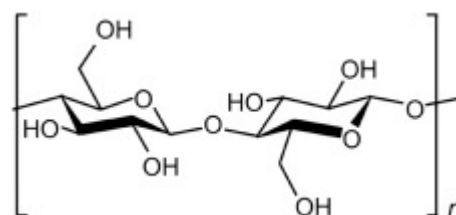


Figura 4: Estructura química de la celulosa bacteriana.

La celulosa ha sido implicada en adhesión a plantas y formación de biofilms en varios tipos bacterianos diferentes (Römling, 2002). Diversos aislamientos ambientales de *Pseudomonas* asociadas a plantas (*P. asplenii*, *P. corrugata*, *P. fluorescens*, *P. marginalis*, *P. putida*, *P. savastanoi* y *P. syringae*) mostraron capacidad de formar biofilm con amplia variedad de estructuras, entre las cuales se encontró producción de celulosa formando parte de la matriz del biofilm (Ude *et al.*, 2006). Una celulosa acetilada es también un componente de matriz esencial en el biofilm formado por una mutante de *P. fluorescens* SBW25. Comparada con la cepa salvaje, la mutante sobreproduce celulosa la cual interactuaría con lipopolisacáridos en la formación de biofilms. Esta mutación elevó la producción de celulosa, la adhesión a superficies y la formación de biofilms (Spiers and Rainey, 2005).

En *Agrobacterium tumefaciens*, un patógeno de plantas que persiste asociado a la superficie de éstas ó en partículas del suelo, la sobreproducción de celulosa resulta en un incremento de la formación de biofilm sobre raíces (Matthysse *et al.*, 2005). La celulosa también se encuentra frecuentemente en la matriz de los biofilms de los miembros de la familia *Rhizobiaceae*; luego del contacto con la planta hospedadora, *R. leguminosarum*, agrega sobre la superficie de las raíces utilizando microfibrillas de celulosa (Flemming and Wingender, 2010; Bogino *et al.*, 2013).

Lipopolisacáridos (LPS)

El lipopolisacárido juega un importante rol en estadios tardíos de la simbiosis, como componente estructural y como molécula señal, siendo uno de los componentes principales de la membrana externa de rizobios (Frayse *et al.*, 2003).

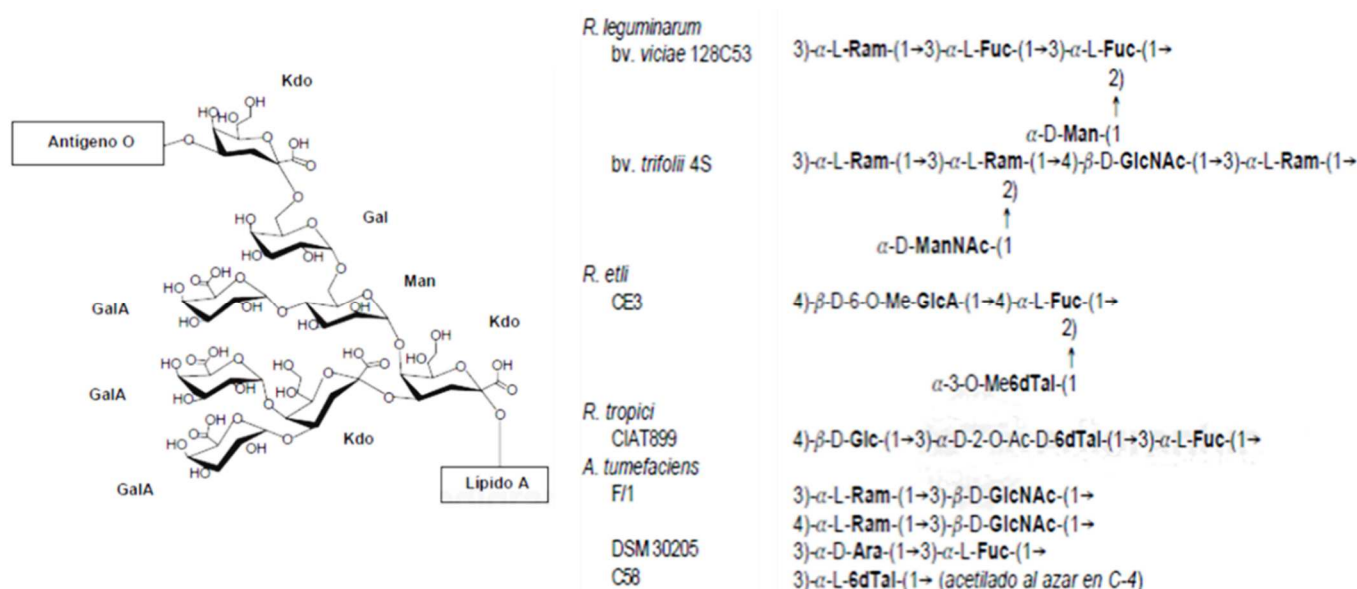


Figura 5: Izquierda, Estructura del núcleo oligosacárido del LPS de *Rhizobium leguminosarum* y *R. etli*. Derecha, Estructura de la unidad repetitiva del antígeno -O en *Rhizobiaceae*. Abreviaturas: Glc, glucosa; Gal, galactosa; Ram, ramnosa; Man, manosa; Fuc, fucosa; Ara, arabinosa; GlcA, ácido glucurónico; GalA, ácido galacturónico; GlcNAc, acetilglucosamina; ManNAc, acetilmanosamina; GalAN, amida de GalA; GlcAN, amida de GlcA; Kdo, ácido 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosónico; 6dTal, 6-desoxi-talosa. Figuras basadas en Ormeño-Orrillo, 2005.

Además, participaría en las interacciones laterales durante la formación de biofilm sobre la leguminosa y superficies abióticas en *Rhizobium leguminosarum*, interviniendo en el pegado inicial y en la formación de agregados bacterianos compactos en estadios tardíos del biofilm (Russo *et al.*, 2015).

La estructura del LPS consiste en un lípido A, anclado a la membrana externa y conectado a través de un núcleo oligosacárido a la superficie expuesta de la cadena polisacárida-O (Figura 5). Las propiedades del polisacárido-O y la estructura del núcleo parecen ser importantes para la simbiosis y para la modificación estructural durante la diferenciación a bacteroide (Fraysse *et al.*, 2003).

En el suelo, el LPS junto con el EPS, mantienen la estabilidad de los agregados necesaria para el crecimiento óptimo de los cultivos (Cania *et al.*, 2019).

2.3.2 Proteínas extracelulares, funciones asociadas a biofilm

En ciertas especies de *Pseudomonas*, como *P. putida*, LapA (*large adhesion protein*) es una adhesina involucrada en la adhesión a superficies abióticas y a semillas (Espinosa *et al.*, 2000) mientras que en *P. fluorescens*, esta proteína interviene en la transición de la unión reversible a irreversible durante la formación de biofilms sobre soporte abiótico (Hinsa *et al.*, 2003). Como mencionamos anteriormente, en *Azospirillum brasilense*, durante el proceso de adhesión – agregación intervendrían polisacáridos y lectinas específicas además de proteínas de la membrana externa bacteriana. (Danhorn and Fuqua, 2007).

En Rhizobiales, las proteínas involucradas en adhesión son conocidas como Rap, RapA1 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* promueve la autoagregación a través de los polos de las células (Ausmees *et al.*, 2001), se une a calcio y al EPS y está involucrada en la adhesión y colonización en la rizosfera, pero no intervendría en la unión a soportes abióticos (Mongiardini *et al.*, 2008). La lectina RapA2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* se une específicamente al exopolisacárido ácido en una unión dependiente de calcio y estaría contribuyendo en el desarrollo de la matriz del biofilm (Abdian *et al.*, 2013).

2.3.3 ADN, funciones asociadas a biofilm

El ADN extracelular (eDNA) es un importante componente de la matriz del biofilm. Su rol en la integridad de la estructura del biofilm es central y ubicuo, convirtiendo a esta molécula en un blanco promisorio en el control de biofilms. El tratamiento con DNasas puede dispersar al biofilm; se encontraron diversas especies bacterianas susceptibles a la digestión por DNasas, entre las cuales se encuentran *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*, *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Campylobacter jejuni*, *Comamonas denitrificans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shewanella oneidensis*, *Vibrio cholera* entre las Gram negativas y *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Streptococcus*

anginosus, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* entre las bacterias Gram positivas (Okshevsky *et al.*, 2015).

El eDNA es liberado comúnmente por autólisis. En *P. aeruginosa* el eDNA se genera por lisis de una subpoblación bacteriana bajo el control del sistema de quorum sensing. En *E. faecalis* la autólisis se origina por un mecanismo similar a la necrosis en células eucariotas. En cambio, en *Staphylococcus aureus* la autólisis se origina mediante un mecanismo suicida altruista, una muerte celular programada similar a la apoptosis de células eucariotas. El eDNA representa un mecanismo importante para la transferencia horizontal de genes en bacterias (Montanaro *et al.*, 2011).

2.4. Componentes de la superficie bacteriana y otros factores extracelulares asociados a la formación de biofilms

La producción y secreción de compuestos al medio extracelular, así como la presencia de componentes en la superficie que afectan las interacciones bacterianas, pueden resultar cruciales para la agregación, anclaje y el desarrollo de biofilms en diversos microorganismos (Costerton *et al.*, 1995; Schembri *et al.*, 2001).

2.4.1 Producción y sensado de moléculas señal: *Quorum Sensing* (QS)

El *Quorum Sensing* (QS) ó percepción de la densidad poblacional, es un mecanismo de comunicación entre las bacterias de una población mediante el cual se regula la expresión genética a través de la producción, liberación y detección de la concentración de moléculas señal extracelulares llamadas autoinductores (Fuqua *and* Greenberg, 2002). Un amplio rango de procesos bacterianos, están regulados por QS incluyendo bioluminiscencia, control de la densidad celular, producción de toxinas, diferenciación celular, producción de exopolisacáridos, motilidad, producción de factores de virulencia y formación de biofilms (Wu *et al.*, 2004). Las moléculas autoinductoras son liberadas por las células productoras y difunden a través del entorno extracelular para ser detectadas por las células vecinas, resultando en cambios en la expresión genética dependientes de la concentración de autoinductor que derivan en un comportamiento de grupo en forma coordinada.

Las bacterias asociadas a plantas frecuentemente emplean este mecanismo de señalización de *quorum sensing* para modular y coordinar la interacción con plantas, incluyendo producción de antibióticos, liberación de toxinas, transferencia horizontal de genes y formación de biofilms. Diversas moléculas señal intervienen en dicha comunicación: i) homoserina lactonas aciladas (AHLs) entre las proteobacterias, ii) oligopéptidos entre las bacterias Gram- positivas iii) gama-butirolactonas en especies de *Streptomyces* y iv) ácido cis-11- metil-2-dodecanoico en *Xanthomonas*, *Xylella* y especies relacionadas. Algunas de las señales mejor estudiadas, las N-acil homoserina lactonas (AHLs) son utilizadas por la mayoría de las especies bacterianas Gram negativas (Miller *and* Bassler, 2001; Waters *and* Bassler, 2005). Las AHLs pueden variar en la longitud de

la cadena carbonada en un rango de entre 4 y 18 átomos de carbono y la sustitución química de la molécula también es altamente variable.

En *Pseudomonas* fueron identificados varios sistemas de QS que controlan funciones biológicas mediante la producción de moléculas señal del tipo HSLs. *P. aeruginosa* PAO1, produce 3-oxododecanoyl C12-HSL y C4-HSL que regulan entre otras funciones la formación de biofilm y la producción de elastasa, piocianinas y ramnolípidos. *Pseudomonas* sp. M18, produce C4-HSL que regula la síntesis de fenazina (inhibidor de hongos fitopatógenos) y del antibiótico pioluteorina. Se reportó en *P. chlororaphis* (*aureofaciens*) cepa 30–84 la producción de C6-HSL, molécula involucrada en la regulación de la síntesis de fenazina y formación de biofilms. Dentro de las *Pseudomonas* patógenas se encontró la producción HSLs regulando la expresión de factores de virulencia: 3-oxododecanoyl C10 / C12-HSL y C10 / C12-HSL en *P. fuscovaginae*, C6-HSL producida por *P. corrugata* y 3-oxododecanoyl C6-HSL producida por *P. syringae* que regula la síntesis de exopolisacáridos, motilidad además de virulencia. Por otra parte, *P. putida* IsoF, produce 3-oxododecanoyl C8 / 10 / 12-HSL, que regulan la formación de biofilms (Yong *et al.*, 2014).

La producción de acil- homoserina lactonas entre *Pseudomonas* spp. asociadas a plantas es más común que entre *Pseudomonas* spp. aisladas del suelo (Elasri *et al.*, 2001). Dentro de este género se encontró que *P. fluorescens* 2P24, un microorganismo asociado a las raíces del trigo requiere AHLs (3O-C6 / C8 HSL) para formar biofilm y para ejercer su efecto biocontrolador de enfermedades de esta planta (Wei *and* Zhang, 2006). Especies del complejo *Burkholderia cepacia* (Bcc) son capaces de liberar AHLs como molécula señal, principalmente octanoyl-homoserina lactona (C8-HSL). *Burkholderia ambifaria* es una especie del complejo con bajo grado de virulencia, frecuentemente aislada de la rizosfera, donde promueve el crecimiento de plantas. Sin embargo, se reportó en aislamientos clínicos de alto grado de virulencia, específicamente en *B. ambifaria* HSJ1, la producción de C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, 3OH C8-HSL, 3OH C10-HSL y 3OH C12-HSL.

Por otra parte, diferentes estudios revelaron que las bacterias que habitan el suelo y la rizosfera pueden degradar AHLs en forma significativa y de esta forma afectar la señalización. Este mecanismo que se denomina *quorum quenching*, podría actuar limitando la comunicación a sitios específicos (Wang *and* Leadbetter, 2005).

2.4.2 Flagelo y motilidad asociada: *Swarming* y *Swimming*

Las bacterias pueden moverse por diferentes mecanismos incluyendo la motilidad mediante flagelo *swimming*, *swarming* y *twitching*. La motilidad flagelar posibilita acceso a sitios de adhesión y lleva al inicio de la unión a la superficie además de participar en estadios de maduración del biofilm. Mutantes flagelares en *E. meliloti* mostraron reducida formación de biofilms y retraso en la formación de nódulos (Fujishige *et al.*, 2006).

Swarming

Bajo determinadas condiciones, las bacterias asociadas a superficies pueden volverse altamente móviles y migrar sobre el sustrato en un proceso conocido como *swarming*. Esta forma de motilidad se define como un rápido movimiento multicelular de las bacterias sobre una superficie impulsado por la rotación flagelar por lo que constituye un comportamiento en comunidad (Kearns, 2010).

En el *swarming*, las bacterias se mueven una al lado de la otra en grupos denominados “rafts”. La formación de *rafts* es dinámica: las células reclutadas en el *raft* se mueven con el grupo, mientras que las que se pierden se vuelven rápidamente no móviles. La dinámica del reclutamiento y pérdida de células del *raft* sugiere que la matriz no sería requerida para la estabilidad de éste (Jones *et al.*, 2004).

Si bien este tipo de motilidad se encuentra frecuentemente inhibida debido a los medios de cultivo standard utilizados en el laboratorio y genéticamente abolida durante el proceso de domesticación en cepas de laboratorio (Patrick *and* Kearns, 2009), asociado a la motilidad *swarming* se puede observar a las bacterias formar patrones de colonias macroscópicos sobre un medio sólido como el agar (figura 6), (Kearns, 2010).

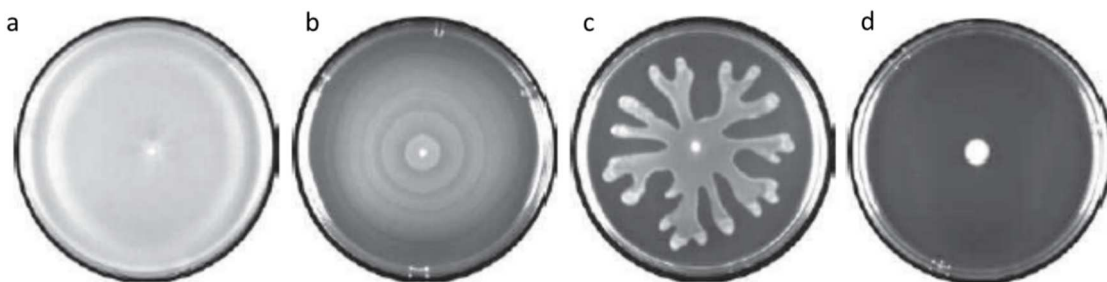


Figura 6. Patrones de colonias de swarming: el agar no colonizado se visualiza negro y la biomasa en blanco. a) swarming uniforme, formado por *Bacillus subtilis* str.3610. b) Patrón ojo de buey, formado por *Proteus mirabilis* str.PM7002. c) Dendritas formadas por *Pseudomonas aeruginosa* str.PA14. d) Una mutante no swarming de *B. subtilis* str. 3610. (Kearns, 2010).

En *P. aeruginosa* la formación de biofilm y la motilidad *swarming* están inversamente reguladas en la transición hacia la vida en superficie mediante la participación de la proteína SadB y SadC. Estudios en estadios tempranos de la formación de biofilm indican un control flagelar reverso y producción de un EPS como factores involucrados en el establecimiento de una asociación estable con el sustrato (Caiazza *et al.*, 2007; Merrit, *et al.*, 2007). El *swarming* esta regulado por *Quorum sensing* e influencia la formación de biofilms; una motilidad reducida determina la formación de agregados de bacterias y origina un biofilm estructurado mientras que células con alta motilidad distribuidas sobre la extensión de una superficie producen un biofilm plano (Singh *and* Singh Chauhan, 2017).

Swimming

La motilidad *swimming* es una forma de movimiento bacteriano impulsado por rotación del flagelo al igual que el *swarming*, pero a diferencia de este las células se mueven en forma individual en un ambiente líquido (Kearns *et al.*, 2010). El *swimming* esta involucrado en la dispersión de las células desde un biofilm y colonización de nuevos hábitats (Sauer *et al.*, 2002). Observaciones en *P. aeruginosa* mostraron que antes del anclaje a una superficie, la bacteria nada a lo largo de la misma casi como si estuviera escaneandola para una apropiada ubicación antes de iniciar el contacto (O'Toole *et al.*, 2000). En biofilms formados por *Pseudomonas putida* el *Quorum sensing* dispara el escape de las células individuales fuera de dicha estructura. Mutantes en el *isoF*, gen involucrado en la producción del flagelo, mostraron una mayor compactación de las células dentro de los agregados cuando se observaron al microscopio, sugiriendo que éste también juega un rol de importancia en la posición de las células dentro del biofilm (Cárcamo Oyarce *et al.*, 2015).

2.4.3. Agregación celular, asociada a proteínas y polisacáridos

La autoagregación y/o coagregación celular juegan un importante rol en el desarrollo de diversos biofilms multiespecies mediando en la aproximación de especies afines para una asociación favorable dentro de la diversidad taxonómica del biofilm (Kolenbrander, 2000). La autoagregación bacteriana es un proceso por el cual las bacterias interactúan físicamente unas con otras y se depositan en el fondo de una suspensión líquida y estática (Sorroche *et al.*, 2012), es un mecanismo “egoísta” mediante el cual una misma cepa dentro de un biofilm, se aglutina por autorreconocimiento de estructuras de superficie tales como proteínas y polisacáridos, para aumentar la integración de cepas genéticamente idénticas (Rickard, *et al.*, 2003) y puede estar modulada por la regulación de la síntesis del EPS al igual que la adhesión de las células a las superficies (Rinaudi *et al.*, 2010). La coagregación es un proceso por el cual bacterias genéticamente distintas se adhieren unas a otras via moléculas específicas. Dicho fenómeno entre pares bacterianos es altamente específico y está mediado por una proteína “adhesina” de un tipo celular y un “receptor” sacarídico complementario en el otro tipo celular (Rickard *et al.*, 2003).

La hidrofobicidad celular y la habilidad de autoagregar y coagregar aumentan la capacidad de adhesión bacteriana (Richard *et al.*, 2004). Así, la hidrofobicidad celular está directamente relacionada con la adhesividad bacteriana y varía de organismo en organismo, de cepa en cepa y está influenciada por el medio de crecimiento, la edad de la bacteria y las estructuras de la superficie bacteriana (Sorongon *et al.*, 1991).

3. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN EL SUELO, LA RIZOSFERA Y SOBRE LAS PLANTAS

En la naturaleza las comunidades bacterianas juegan un rol clave en la producción y degradación de materia orgánica, de contaminantes ambientales y en los ciclos del

nitrógeno, azufre y diversos metales. La mayoría de estas complejas vías requieren del trabajo concertado de bacterias con distintas capacidades metabólicas, es por esto que las condiciones dentro de una comunidad en biofilm posibilitan muchos de estos procesos en forma coordinada. Los biofilms microbianos fueron reportados en los tres dominios taxonómicos, arquea, bacteria y eucaria en diferentes *phylum* que incluyen *Actinobacteria*, *Ascomycota*, *Bacteroidetes*, *Basidiomycota*, *Chloroflexi*, *Crenarchaeota*, *Cyanobacteria*, *Euryarchaeota*, *Firmicutes*, *Oomycetes* y *Proteobacteria*. Los géneros dominantes involucrados en la formación de biofilms son: *Agrobacterium*, *Anabaena*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Trichoderma*, *Xanthomonas* y *Xylella* (Rana *et al.*, 2020).

3.1 Importancia del estudio de Biofilms del suelo

Como mencionamos anteriormente, el suelo constituye un ambiente heterogéneo, pobre en nutrientes y en constante cambio que afecta el crecimiento y supervivencia de los microorganismos que lo habitan. La vida en biofilm puede estabilizar las condiciones fluctuantes del suelo otorgando a las bacterias protección ante predación, desecación y exposición a antibióticos, y a su vez aumenta la disponibilidad de nutrientes y oxígeno proveyendo un nicho propicio para la transferencia horizontal de genes (Madsen *et al.*, 2012). Los biofilms generalmente colonizan superficies ricas en carbono como las raíces de plantas e hifas de hongos, materia orgánica en descomposición y arcillas minerales (Burmølle *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2018) y existen en forma de microagregados individuales que ocupan microhábitats de nichos contrastantes. Estos microagregados son pequeños en tamaño y pueden contener algunos cientos de células y un limitado número de especies y se encuentran separados entre ellos por unas decenas de micrometros (Nunan, 2017). Así, constituyen centros de actividad biológica que coexisten con la biota planctónica.

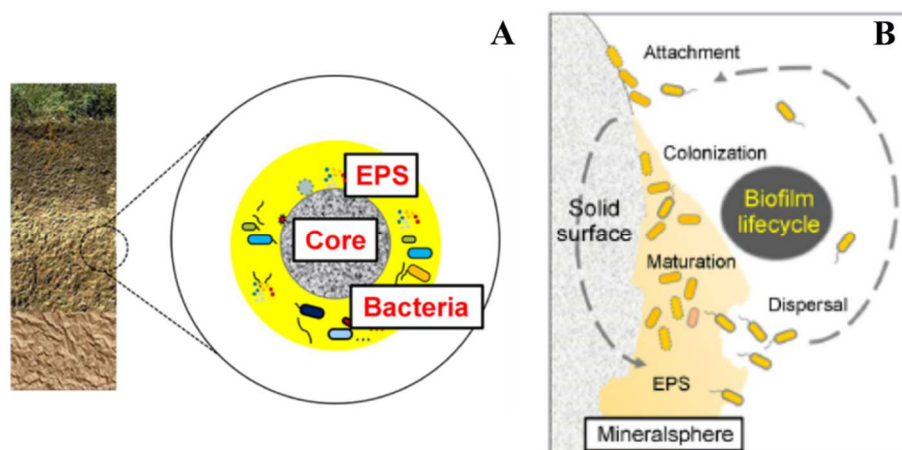


Figura 7. Biofilms en el suelo. (A) Organización de los biofilms en el suelo formando microagregados de bacterias adheridas a un core ó núcleo rico en carbono e integrados por EPS. (B) Fases. El ciclo de vida de un biofilm (*biofilm life cycle*) en el suelo consta de cuatro fases: adhesión (*attachment*), colonización (*colonization*), maduración (*maturation*) y dispersión (*dispersal*). (Figura extraída de Cai *et al.*, 2019).

Estas comunidades microbianas carecen de conexión y contribuyen a la heterogeneidad espacial y bioquímica en una microescala; su formación y estabilidad dependen de las características del EPS del biofilm y de las propiedades físico - químicas del suelo. En adición, el EPS aporta el 80 % de la masa seca del biofilm, otorgando en el suelo beneficios tales como protección al stress biótico y abiótico, en particular reteniendo entre 15 y 20 veces su peso en agua e incrementando de esta manera la capacidad de almacenamiento y retención en el suelo (Chenu, 1993; Chenu *and* Cosentino, 2011; Adessi *et al.*, 2018). Los exopolisacáridos, además influyen la estabilidad de agregados celulares interactuando con partículas arcillosas y contribuyendo en el mantenimiento de las propiedades físicas del suelo (Vanhaverbeke *et al.*, 2003).

Las comunidades microbianas sésiles y planctónicas pueden constituir diferentes grupos funcionales de organismos con diferentes roles en su interacción con la materia orgánica y las plantas. Se observó en estudios previos, que existen diferencias significativas entre la composición de las comunidades planctónicas y en biofilm; algunos microorganismos son detectables casi exclusivamente en comunidades planctónicas, indicando que la vida fuera del biofilm es posible para microorganismos del suelo y que una porción significativa de ésta microbiota produce formas móviles. Un 13.9 % de los géneros de procariotas encontrados en estos estudios, mostraron una asociación significativa con el modo de vida en biofilm, mientras un 7.8 % resultaron significativamente asociados a la vida planctónica; los grupos más abundantes asociados a la vida en biofilm pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Arthrobacter* y *Bosea*, mientras que el género más abundante asociado a la vida planctónica fue *Legionella*. En el caso de los grupos de eucariotas y hongos el número de géneros asociados a la vida sésil también fue mayor que los relacionados a la vida planctónica (Bystrianský *et al.*, 2019).

3.1.1 Propiedades de los biofilms del suelo

Las bacterias en biofilm poseen fuertes ventajas adaptativas comparadas con su contraparte planctónica, así los procesos biogeoquímicos de importancia ecológica ocurren en un pequeño volumen de estos biofilms formando centros activos del suelo. Un biofilm mixto de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5019–*Penicillium* spp. incrementó la mineralización de nitrógeno y fósforo orgánicos en suelo, bajo altas concentraciones de NO₃⁻ comparados con las mismas especies viviendo en forma planctónica en el suelo.

La estabilidad de los agregados del suelo es esencial para un óptimo crecimiento de los cultivos y prevención de la erosión. La interacción de especies dentro del biofilm mostró un impacto positivo en la agregación del suelo, sumado a esto, el rol de los EPSs producidos por las bacterias viviendo en biofilm puede proveer numerosas funciones beneficiosas, entre algunas, protección ante el stress biótico y abiótico como mencionamos anteriormente (Cai *et al.*, 2019). Un experimento a largo plazo demostró que tanto la práctica de la labranza convencional como la labranza reducida, que perturban la estructura del suelo, promovieron el potencial bacteriano para producir

agentes estabilizantes de la agregación, tales como exopolisacáridos y lipopolisacáridos (Cania *et al.*, 2019).

3.1.2 Interacciones microbianas en biofilms del suelo

Cooperación

Los microorganismos en la naturaleza pueden cooperar para formar un biofilm multiespecies y así superar las condiciones de vida desfavorables. Burmølle y colaboradores (2007), encontraron que *Pseudomonas putida* SB5 promueve la formación de biofilm junto a *Chryseobacterium* sp. SB9, originando un biofilm que puede manifestar propiedades específicas de cada especie. Un consorcio compuesto de cuatro especies, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Xanthomonas retroflexus*, *Microbacterium oxydans* y *Paenibacillus amylolyticus* aislado de un ambiente natural, mostró un fuerte sinergismo en la formación de biofilm. El número de células de cada variedad en este biofilm multiespecie se vió significativamente aumentado cuando se lo comparó con el biofilm monoespecie, indicando que todas las cepas se beneficiaron en esta asociación. Estos resultados mostraron una alta prevalencia de sinergismo en la formación de biofilms en consorcios multiespecies aislados de un hábitat natural bacteriano, sugiriendo la cooperación interespecífica (Ren *et al.*, 2015).

Competencia

La competencia por nutrientes es particularmente alta entre cepas filogenéticamente similares, en el suelo y en otros ambientes naturales. Se estudiaron las interacciones entre 64 cepas de *Streptomyces* aisladas de diversos grumos individuales de suelo y se encontró reciprocidad entre cepas, es decir, si una cepa promueve o inhibe el crecimiento de una segunda cepa, ésta probablemente afecte a la primera de manera similar. Dicha reciprocidad es mayor en cepas provenientes de un mismo grumo de suelo, sugiriendo que ésta puede ser una propiedad de comunidades que coexisten. Otros estudios entre pares ensayaron la interacción de 67 especies bacterianas y mostraron que el antagonismo es mas probable entre especies relacionadas y que cuanto más metabólicamente similares son, mayor es la probabilidad de antagonismo. Sumado, se encontró que un incremento en la formación de biofilm es una respuesta adaptativa común en la coexistencia a largo plazo. Además, como estrategias para ganar competitividad las bacterias de un grupo pueden inhibir el crecimiento de otros grupos por competición de nutrientes a través de la secreción de sideróforos ó por liberación de antibióticos de amplio espectro (Cai *et al.*, 2019).

3.2 Importancia del estudio de los Biofilms asociados a plantas y a la rizósfera

Los biofilms bacterianos crecen sobre y alrededor de los tejidos de plantas y numerosos estudios mostraron la importancia de esta interacción. *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas* relacionadas, son bacterias comúnmente

asociadas a plantas que pueden encontrarse en hojas, raíces y en el suelo y la mayoría de los aislamientos naturales forman biofilm (Danhorn *and* Fuqua, 2007). Se observó que en raíces de plantines de arveja el patrón de colonización por *P. fluorescens* fue heterogéneo ubicándose el mayor número de células en las zonas adyacentes a la semilla, con unas pocas bacterias en las puntas de la raíz. También se la encuentra con frecuencia en fisuras de la raíz entre células epiteliales y en asociación con otras bacterias rizosféricas (Normander *et al.*, 1999).

Las bacterias pueden colonizar los espacios intercelulares en el interior de varios tejidos de plantas sin causar daños, pudiéndose clasificar en endofíticas obligadas, que nunca se encuentran en vida libre en el suelo y endofíticas facultativas, que habitan la rizósfera y ocasionalmente pueden acceder a través de una herida o aberturas en la base de las raíces laterales al interior de los tejidos, entre las células epidérmicas y los pelos radiculares.

Estudios mediante fluorescencia por FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) del biofilm formado por *Azospirillum brasilense* en raíces de trigo en suelo, mostraron que esta especie fijadora de nitrógeno de vida libre que además estimula la proliferación de raíces a través de la producción de fitohormonas y es considerada una ePGPR, tiene capacidad de formar agregados ó microcolonias preferentemente en los pelos radiculares, en las zonas de elongación de la raíz, dentro de los pelos radiculares y en algunos espacios intercelulares de la raíz (Assmus *et al.*, 1995).

Entre las bacterias endofíticas los diazotrofos son los más estudiados por su potencial como biofertilizantes fijadores de nitrógeno (Cocking, 2003), siendo de gran importancia biológica y económica las bacterias simbiotes de leguminosas por su capacidad como iPGPR. Las bacterias del orden de los *Rhizobiales* (α - proteobacterias), uno de los grupos mas abundantes del suelo (Yeoh *et al.*, 2017) incluye especies de las mas estudiadas como *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* y *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti*. Ambas forman biofilm sobre superficies abióticas y sobre raíces de plantas leguminosas. La colonización de la rizosfera y el proceso de nodulación requieren de la adhesión de dichas bacterias a partículas del suelo y a las raíces de la planta huésped, así la capacidad para formar un biofilm sobre la planta y en la rizosfera es prácticamente un requisito. *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* es capaz de formar grupos en los pelos radiculares dónde pueden quedar atrapados durante el enrulamiento del pelo radicular en el inicio de la nodulación (Fujishige *et al.*, 2006).

La interacción entre los grupos microbianos y la raíz de las plantas resulta un factor determinante para colonizar y prevalecer en la rizósfera. Así, la comunidad bacteriana fuertemente asociada a las raíces de la planta, la “microbiota central de la raíz”, es ubicada a lo largo de un amplio rango de ambientes y especies hospedadoras (Yeoh *et al.*, 2017). En este sentido, la capacidad de adhesión a la raíz resultaría un aspecto central para la competencia, colonización y supervivencia en este ambiente.

Rizobios y su importancia en la simbiosis con plantas leguminosas

Los rizobios residen y se multiplican en el suelo y representan un grupo de bacterias capaces de establecer una relación simbiótica con plantas de la familia *Fabaceae* y de

fijar nitrógeno atmosférico dentro de estructuras formadas en las raíces de las plantas llamadas nódulos. Son bacterias Gram negativas pertenecientes a las α - y β -proteobacterias y comprenden 61 especies provenientes de los 13 géneros siguientes: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Methylobacterium*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Cuprivaidus* y *Devosia* (Ikbal *et al.*, 2020). Bajo condiciones limitantes de nitrógeno, pueden inducir la formación de nódulos en las raíces de su planta hospedadora, invadir y colonizar dichos nódulos y allí reducir N_2 a amonio que es utilizado por la planta.

Los nódulos formados en las raíces de las leguminosas pertenecientes a la familia *Fabaceae* son de dos tipos, indeterminados y determinados. Los nódulos indeterminados son formados por leguminosas pertenecientes al clado galegoide de la subfamilia *Papilionoideae* (ej: *Medicago*, *Trifolium*, *Vicia*, *Pisum* y *Astragalus*) tienen un meristema persistente que permanece activo durante todo el desarrollo del nódulo y son de forma elongada. En el nódulo, nuevas generaciones de células de la planta son infectadas por los rizobios originando un gradiente de estadios de desarrollo distinguibles morfológicamente, el meristema apical del nódulo representa la zona de invasión, mientras que hacia el interior se suceden los distintos estadios hacia las células en senescencia más cercanas a la raíz. Los nódulos determinados carecen de meristema persistente, generalmente son redondeados y no muestran un gradiente de desarrollo como los indeterminados. Esta clase de nódulos son formados por leguminosas de los géneros *Phaseolus*, *Lotus* y *Glycina*, las cuales son típicamente de origen tropical (Gage *et al.*, 2004).

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es específica y depende del intercambio de moléculas señal tales como flavonoides secretados por plantas, los cuales reclutan al rizobio compatible (Cooper, 2004). Mediante la interacción con la proteína reguladora transcripcional NodD, los flavonoides inducen la expresión de genes rizobiales (*nod*) que codifican para enzimas necesarias para la síntesis de lipoquito-oligosacáridos específicos llamados factores Nod (NF) (Perret *et al.*, 2000; Gibson *et al.*, 2008). Estas moléculas son reconocidas por un receptor en la leguminosa (NFR) que dispara el enrulamiento de los pelos radiculares donde los rizobios son atrapados (Broghammer *et al.*, 2012). Las bacterias atrapadas como microcolonias invaden y colonizan las raíces a través de una estructura tubular llamada hilo de infección, el cual crece progresivamente y contiene una matriz compuesta por material de la pared celular de las células de la planta. Dentro de los pelos radiculares, las bacterias proliferan e inducen división en las células del córtex radicular llevando a la formación de un primordio de nódulo (Gage, 2004). Allí los rizobios son liberados por endocitosis quedando rodeados por membrana derivada de la planta en una estructura denominada simbiosoma, donde las bacterias se diferencian en bacteroides, rizobios fijadores de nitrógeno atmosférico que producen amonio y lo transfieren a la planta hospedadora (Perret *et al.*, 2000). Como contraparte, las bacterias reciben carbono y energía de la planta consiguiendo un nicho para su crecimiento y multiplicación dentro del nódulo de la leguminosa (Prell and Poole, 2006). Los distintos pasos en la simbiosis rizobios-planta están controlados a través de una compleja red de señales que se suceden en cascada en la planta (Oldroyd *et al.*, 2011). Recientemente se demostró que la respuesta de la planta ante la infección rizobial en células de epidermis y córtex, está coordinada mediante fitohormonas de la planta del tipo

auxinas y citoquinas (Breakspear *et al.*, 2014; Reid *et al.*, 2017).

3.3 Consecuencias de la formación de biofilms en el ambiente: Aplicaciones en bacterias del suelo

Las comunidades de microorganismos de importancia en agricultura y sus interacciones, pueden tener diversas implicancias sobre el cambio climático, nutrición de las plantas, biofertilización y biorremediación. Estudios en biorreactores mostraron el gran potencial de los biofilms en la depuración de aguas residuales y el tratamiento de aguas subterráneas contaminadas con productos del petróleo y en nitrificación (de Boer *et al.*, 1991; Massol Deya *et al.*, 1995). Además, los biofilms resultan de gran importancia a nivel industrial, en medicina y en agricultura, tanto por su actividad perjudicial como por los beneficios que representan. De interés en salud e inocuidad alimentaria resultan los biofilms formados sobre semillas y brotes para consumo humano por su potencial para albergar patógenos. Estudios realizados sobre una amplia variedad de brotes comerciales, detectaron agregados de microorganismos nativos formando biofilms de gran dimensión (Feet *and* Cooke, 2005).

Bioinoculantes

Diversas aplicaciones fueron investigadas en biofilms formados por bacterias del suelo que interactúan con plantas. De importancia en agricultura resultan los biofilms formados por PGPBs (del inglés: *Plant Growth Promoting bacteria*) por su aplicación como biofertilizantes, agentes de control biológico y fitoestimuladores. Como mencionamos en la sección 1.2.1, los inoculantes utilizados en las prácticas agrícolas pueden ser: Biofertilizantes (promueven el crecimiento en plantas directamente) ó Agentes de control biológico (promueven indirectamente el crecimiento de plantas). Dentro de los biofertilizantes encontramos: i) Fijadores de nitrógeno como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* sp., *Beijerinckia*, *Clostridium* y *Azotobacter* sp.; ii) Solubilizadores de fósforo inorgánico entre los que encontramos *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Achromobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Aerobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp.; iii) Productores de fitohormonas como la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico deaminasa (ACC) que regula la concentración de etileno en plantas, auxinas como el ácido indolacético (AIA), giberelinas y citoquininas producidas por *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp. Los agentes de control biológico suprimen ó controlan las enfermedades en plantas actuando como antifúngicos ó agentes antimicrobianos. Estas bacterias pueden producir sideróforos, antibióticos, ácido cianhídrico (HCN), exoproteasas ó fosfolipasas y pueden pertenecer a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, entre otros (Kumar *and* Singh, 2020).

En la obtención de PGPMs, la estrategia es aislar microorganismos autóctonos del ambiente dónde se aplicarán luego como inoculantes, resultando una ventaja para

sobrellevar las dificultades que implica la adaptación de los aislamientos de bacterias no nativas a condiciones ambientales nuevas (Agaras *et al.*, 2020).

El uso de inoculantes microbianos resulta una alternativa viable para el incremento de la producción de los cultivos sustituyendo agroquímicos tales como insecticidas, pesticidas y fertilizantes inorgánicos que pueden contaminar el suelo. La capacidad de formar biofilms puede además promover la colonización de estas bacterias benéficas en el suelo, la rizosfera y las plantas posibilitando una producción agrícola sostenible.

Biorremediación

Como mencionamos en la sección 1.2.2, diversos compuestos orgánicos sintéticos son ubicuos en nuestro ambiente actual y pueden pasar al suelo, aire y agua distribuyendo la potencial contaminación lejos de su fuente de origen. Las fuentes de contaminación pueden ser residuos industriales, agrícolas ó cloacales. La mayoría de estos compuestos orgánicos sintéticos no son peligrosos, pero algunos son tóxicos y riesgosos para la salud y el medio ambiente ya que la contaminación de los suelos lleva al envenenamiento de animales y plantas alterando el ecosistema y la salud de las personas. Estos compuestos pueden ser persistentes y se acumulan en tejido adiposo debido a su naturaleza hidrofóbica.

Biorremediación se define como todo proceso mediante el cual compuestos contaminantes son degradados biológicamente bajo condiciones controladas a un estado inocuo ó de menor toxicidad. La degradación biológica la realizan comúnmente microorganismos que pueden ser bacterias u hongos, pero también pueden intervenir plantas. Éstos pueden estar ya presentes en el mismo sitio dónde ejercen su acción (microorganismos autóctonos), o pueden aislarse de otro lugar y agregarse al material ó sitio a tratar en forma exógena como por ejemplo a un biorreactor.

La degradación biológica puede tratar un amplio rango de compuestos, pudiendo ser aplicada tanto en el tratamiento de aguas cloacales como en la degradación de pesticidas, químicos provenientes de la industria, compuestos del petróleo crudo e incluso compuestos orgánicos sintéticos nunca expuestos a microorganismos en la naturaleza (denominados xenobióticos), tales como solventes clorados y clorofluorocarbonados.

Así, las técnicas utilizadas en biorremediación pueden ser clasificadas en dos grandes categorías: *ex situ* e *in situ*. Las tecnologías *ex situ* requieren de remoción física del material contaminado y transporte al área de tratamiento final en biorreactores, landfarming o compostaje, mientras que en las tecnologías *in situ* el tratamiento del material contaminado se realiza en el mismo lugar mediante bioestimulación ó bioventeo. En la tabla 1 se resumen las técnicas más utilizadas (Zouboulis *et al.*, 2019).

Por su naturaleza polianiónica y capacidad de biosorción, los biofilms poseen un elevado potencial para acumular compuestos tóxicos del ambiente que los rodea e incrementar su biodisponibilidad. La acumulación de compuestos consiste en un rápido y reversible *binding* (adsorción), seguido de un lento e irreversible secuestro de iones (absorción). Entre el amplio rango de potenciales tóxicos que pueden encontrarse en el ambiente susceptibles de sorción por biofilms, se pueden incluir a los metales pesados tales como: cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), mercurio (Hg), plomo (Pb), níquel (Ni), zinc

(Zn) y metaloides como arsénico (Cu y Zn, son esenciales como elementos traza para muchos organismos, pero pueden resultar tóxicos en niveles excesivos).

Los microorganismos en biofilm son sensibles a las condiciones fisicoquímicas del ambiente que los rodea. La composición bacteriana, estructura y función pueden cambiar rápidamente para resistir ó adaptarse a los distintos niveles de contaminación ambiental debido a su corto ciclo de vida.

Los biofilms han sido utilizados exitosamente como rápidos indicadores de stress ambiental y de compuestos tóxicos. Por ejemplo, en ambientes acuáticos, la concentración de tóxicos en biofilms aumenta cuando las aguas están contaminadas. Así, la detección de compuestos es más sencilla y puede resultar en un indicador sensible y temprano de contaminación por metales. En este sentido, las plantas acuáticas y biofilms asociados a éstas, pueden desempeñar además un importante rol en sistemas acuáticos ayudando a mitigar la polución de las aguas (Nan Geng *et al.*, 2019).

Tecnologías comunes en biorremediación	
Bioaumentación	Adición de cultivos bacterianos a un medio contaminado, frecuentemente utilizado en biorreactores (sistema <i>ex situ</i> o <i>in situ</i>)
Biofiltros	Uso de columnas microbianas para remoción y tratamiento de emisiones de aire u olores (compuestos volatiles)
Biosparging	Es una tecnología <i>in situ</i> que promueve la degradación biológica mediante la inyección de aire bajo presión (no invasiva)
Biostimulation	Estimulación de la población microbiana autóctona en el suelo ó en aguas subterráneas mediante el agregado de fósforo y nitrógeno; puede ser <i>in situ</i> o <i>ex situ</i> .
Biorreactores	Biodegradacion en un contenedor ó reactor que puede ser usado para el tratamiento de diversos residuos líquidos ó lodos.
Bioventeo	Se utiliza en suelos contaminados para estimular la actividad y crecimiento microbiano mediante cañerías para la inyección de nutrientes y aire (<i>in situ</i>)
Compostaje	Es un proceso aerobico y termofilico que puede realizarse mediante pilas de material estáticas ó pilas aireadas.
Land farming	Se utiliza en suelos contaminados. Puede ser utilizado <i>in situ</i> o <i>ex situ</i> . Los microorganismos autóctonos degradan el material contaminante en un proceso monitoreado.

Tabla 3: Tecnologías más utilizadas en biorremediación. Basado en Zouboulis y colaboradores, 2019.

Rizorremediación

El uso de plantas junto a bacterias que se asocian a éstas en la degradación de contaminantes ofrece un mayor potencial para biorremediación que utilizando plantas ó

bacterias por separado. Los exudados radiculares proveen nutrientes para el crecimiento bacteriano, siendo la rizosfera un punto central para la formación de biofilms. En general los biofilms en la rizosfera se inician por quimiotaxis hacia los exudados de las raíces y dicha migración está altamente correlacionada con las especies bacterianas y el tipo de “atractante” secretado. Una vez adherido a la superficie de la raíz, las bacterias forman microcolonias en forma gradual y desarrollan un biofilm maduro. Estas comunidades en biofilm de la rizosfera tienen fuertes interacciones con compuestos potencialmente tóxicos más que en la zona del suelo (Danhorn *and* Fuqua, 2007) y pueden acumularse por biosorción, bioprecipitación, acumulación intracelular e inmovilización redox y posteriormente pueden ser transportados hacia las raíces y hojas de la planta.

Los biofilms asociados a la rizosfera pueden además promover la acumulación de compuestos tóxicos en plantas en forma indirecta, promoviendo el crecimiento de éstas y acelerando en consecuencia la acumulación de tóxicos (Nan Geng *et al.*, 2019).

El empleo de bacterias capaces de degradar ó secuestrar compuestos tóxicos, sumado a la capacidad de formar biofilms en asociación con las plantas específicas, puede ofrecer una tecnología eficiente y más económica para una biorremediación sostenible.

3.3.1 Consecuencias ambientales de la formación de biofilms: Supervivencia al Stress Ambiental

Las bacterias en el suelo, además de ser competentes en ambientes habitados por comunidades diversas como la rizosfera, debe tener la capacidad para tolerar condiciones ambientales hostiles como la sequía, el calor, la salinidad y los metales tóxicos.

Halotolerancia

La sal tiene un efecto nocivo sobre las plantas provocando daño a la maquinaria fotosintética, retardo en el crecimiento y pérdida de la cosecha. En el área de la raíz, la salinidad del suelo alcanza 40 mM de NaCl y la cosecha de muchos cultivos decrece a esta concentración de sal; las sales solubles clave en el suelo son: K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} y los aniones Cl^- , HCO_3^- , y NO_3^- (Rengasamy, 2006; Abbas *et al.*, 2019).

Globalmente, el 22 % del total de las áreas cultivadas están sujetas a stress salino, el cual se está incrementando rápidamente en un promedio del 10% anual. Debido a esto el 50% de las áreas cultivables se verán afectadas por la salinidad en los próximos años. El efecto nocivo de la sal depende de diversos factores, como el tipo de planta, las condiciones climáticas y la regulación del agua en el suelo (Abbas *et al.*, 2019).

La rizosfera alberga una diversa comunidad de microorganismos PGPR, halotolerantes, los cuales tienen el potencial para superar el problema de la sal. Estas PGPRs ayudan a las plantas a resistir la incrementada concentración de sales mediante la producción de diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos tales como Ácido indol acético (IAA), etileno, antioxidantes, 1-Amino ciclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa, compuestos volátiles orgánicos (COV), etc. Algunos géneros reportados con tal función son *Microbacterium*, *Pantoea*, *Achromobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*,

Bacillus, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Azospirillum* y *Variovorax* (Abbas *et al.*, 2019).

Las PGPRs que producen EPSs, muestran un rol importante en el crecimiento de las plantas durante condiciones de stress salino debido a la formación de biofilms con características hidrofílicas (Rossi *and* De Philippis, 2015). Los EPS producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PF23 mostraron efectos mitigantes contra la salinidad cuando cationes Na⁺ quedaron retenidos en el EPS producido por esta bacteria, resultando así inaccesibles para la planta; la inoculación de *P. aeruginosa* PF23 a *Helianthus annuus* (girasol) redujo el stress salino resultando en un aumento de la cosecha, desarrollo y crecimiento de la planta (Tewari y Arora, 2014).

Estudios sobre 20 aislamientos de PGPR mostraron que todos fueron capaces de formar biofilms bajo stress salino a concentraciones de 250, 500 o 1000 mM de NaCl, además la formación de biofilm se vio incrementada con el aumento de la concentración de la sal hasta 500 mM. Los aumentos de biomasa mas significativos se obtuvieron en las cepas de *Bacillus circulans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus megatherium* y *Azotobacter chroococcum* (Kasim *et al.*, 2016). Estos resultados se apoyan en estudios previos que reportaron el aumento de la formación de biofilms ante el stress ambiental nutricional y elevada salinidad como una forma de protección de las bacterias. Estas condiciones incrementan la competición bacteriana por la disponibilidad de nutrientes y se revierte la forma planctónica de crecimiento al estado sésil en biofilm como una forma de protección de la rizosfera. Sumado, el aumento en la producción de exopolisacáridos ante la alta salinidad favorecería la formación de biofilms y protección reteniendo agua alrededor de las células (Qurashi *and* Sabri, 2012).

Toxicidad: la problemática del Arsénico

El arsénico (As) es uno de los metaloides más tóxicos presentes en el medio ambiente y la especiación de éste depende de diversos factores químicos, físicos y biológicos. La distribución y contaminación del arsénico se debe a procesos naturales y a un amplio rango de actividades antropogénicas como la minería, el uso de combustibles fósiles, de pesticidas orgánicos, herbicidas y desecantes agrícolas (Campos *et al.*, 2007; Garelick *et al.*, 2008; Shankar *et al.*, 2014). Cuando hay mayor presencia geológica natural de arsénico, se pueden encontrar altos niveles en aguas subterráneas (figura 8), como en el caso de la Region Chaco- Pampeana de nuestro país. Las altas concentraciones de arsénico en agua y suelo se han convertido en un problema global, ya que las exposiciones prolongadas a este metaloide pueden causar daños crónicos a la salud (Montoya *et al.*, 2016).

El arsénico se puede encontrar en diferentes estados de oxidación: arseniato As (V), arsenito As (III), As elemental (0) y arseniuro As (-III) (Tsai *et al.*, 2009), aunque se halla con mayor frecuencia como arsenito ó arseniato. El As (III) es 70 veces más tóxico que las especies metiladas y 10 veces más tóxico que el As (V), el cual es poco soluble en agua y menos biodisponible (Kumaresan *and* Riyazuddin, 2001). Debido a su toxicidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera perjudicial para el ser humano el consumo de agua con una concentración de arsénico superior a 10 µg/L. Este metaloide

también ocupa el primer lugar en la lista de productos contaminantes de agua de la Agencia de Protección Ambiental (EPA), por lo que en 2006 se redujo en Estados Unidos la concentración de arsénico en agua potable de 50 $\mu\text{g/L}$ a 10 $\mu\text{g/L}$ (WHO, 2003; EPA, 2006). En nuestro país el Código Alimentario Argentino (CAA) establece los límites de 10 $\mu\text{g/l}$ y 50 $\mu\text{g/l}$ para aguas potables (Resolución Conjunta SRYGR y SAB N°34/2019, art. 982, Cap XII, CAA) y aguas minerales (Resolución Conjunta SCS y SAByDR N° 2/2021, art. 982, cap. XII, CAA) respectivamente.

El As (III) entra en las células a un pH neutro por acuagliceroporinas (proteínas de transporte de glicerol) en bacterias, levaduras y mamíferos, y su toxicidad reside en su capacidad para unirse a los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína en las proteínas, lo que las inactiva haciéndolo altamente tóxico. También actúa como disruptor endócrino mediante la unión a receptores hormonales interfiriendo con la señalización de las células (Santini *and* vanden Hoven, 2004; Krumova *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2009).



Figura 8: Distribución de acuíferos con problemas de Arsénico (As) en el mundo (Smedley *and* Kinniburgh, 2002). Referencias: Zonas en rojo, acuíferos afectados con Arsénico; Círculos rojos, Arsénico relacionado a operaciones mineras; Círculos verdes, aguas geotermales.

La supervivencia bacteriana frente a compuestos tóxicos depende de mecanismos de resistencia y tolerancia que incluyen: i) exclusión (Paez-Espino *et al.*, 2009), ii) quelación (Nawrocki *et al.*, 2014), iii) transformación enzimática (Flemming *et al.*, 2016), iv) precipitación (Luo *et al.*, 2014), v) óxido-reducción (Yamamura *et al.*, 2014) y vi) formación de biofilms (Gambino *and* Cappitelli, 2016). Un gran número de microorganismos posee la capacidad de transformar el arsénico a pesar de su toxicidad, debido a que poseen algunos de estos mecanismos que les permiten metabolizarlo, ya sea en su forma reducida de arsenito, o en su forma oxidada de arseniato (Rangel Montoya *et al.*, 2015).

La oxidación microbiana del As (III), representa una estrategia alternativa a los tratamientos tradicionales que puede ayudar en la preservación del medio ambiente por la eliminación de contaminación secundaria (Dastidar *and* Wang, 2009; Bahar *et al.*, 2013; Huang, 2014). Bacterias de la especie *Ensifer adhaerens*, fueron utilizadas para tratar agua residual sintética. Se obtuvo una eficiencia máxima de oxidación de As de 92%, manteniendo un influente de 1 mg/l de As (III) con un tiempo de retención de 1 hora (Ito *et al.*, 2012).

En otro estudio, fueron aisladas de suelos contaminados con As 7 cepas de bacterias oxidadoras de As (III); se encontró que cinco de ellas de los géneros *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Ensifer* sp. y *Shinella* sp., fueron formadoras de biofilms con diferentes capacidades, mientras que los otros dos aislamientos de los géneros *Shinella* sp. y *Variovorax* sp. no fueron capaces de crecer en biofilm en presencia ó ausencia de As. El As (III) mostró tanto promoción como inhibición en la formación de biofilms sobre las cepas formadoras antes mencionadas. Los aislamientos formadores de biofilms de los géneros *Ensifer* sp. y *Shinella* sp. cambiaron significativamente su forma de crecimiento a biofilm por sobre el crecimiento planctónico, a concentraciones subinhibitorias de As (III). Esto sugiere que el As (III) indujo la formación de biofilms en estas dos cepas en un proceso adaptativo; en contraste, el As (III) inhibió significativamente la formación de biofilms de los aislamientos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* sp. y *Rhizobium* sp. mostrando que posiblemente la formación de biofilms en bacterias oxidantes del As (III) no es la principal estrategia de resistencia al As en el ambiente (Zeng *et al.*, 2018).

Estudios avanzados en rizorremediación, involucraron dos aislamientos de bacterias halofílicas y resistentes a arsénico que además mostraron capacidad de promover el crecimiento de plantas mediante la producción de sideróforos y AIA. Los aislamientos de *Kocuria flava* AB402 y *Bacillus vietnamensis* AB403 provenientes de la rizosfera de manglares de India, fueron evaluados en su capacidad de formación de biofilms y asociación con raíces de arroz. Ambos aislamientos mostraron capacidad de adsorber arsénico en la superficie y de acumularlo intracelularmente además de formar biofilm *in vitro* bajo diferentes concentraciones de arsénico (hasta 4 mM para AsIII y 100 mM para As (IV). Cuando las cepas fueron inoculadas en la rizosfera de plántulas de arroz, promovieron el crecimiento y redujeron la adsorción y acumulación de arsénico en las plantas aún bajo condiciones de stress salino. Estos resultados son promisorios en la utilización de PGPR en biorremediación y supervivencia de ambientes extremos (Mallick *et al.*, 2018).

En suma, debido a las condiciones ambientales actuales que incluyen cambios repentinos en el clima y contaminación, la mayoría de los campos destinados a la agricultura se encuentran sometidos a factores de stress tales como la salinidad, metales pesados, sequía y desbalance de nutrientes. Así, una PGPR exitosa incluye en simultáneo las capacidades de promoción de crecimiento tanto como su tolerancia y eficacia en presencia de los mencionados factores de stress ya que la mayoría de los estudios indicaron que estas bacterias disminuyen los efectos del stress en plantas. Para un buen desempeño en campo las cepas deben ser capaces de sobrevivir, colonizar y competir con la comunidad autóctona en la rizosfera; en este aspecto la capacidad de formar biofilms

y las condiciones ambientales que llevan a la formación estable de dicha estructura cobran central importancia para una agricultura sostenible.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Nos proponemos estudiar la capacidad de formación de biofilms en bacterias ambientales autóctonas del suelo y establecer su relación con la producción de componentes bacterianos extracelulares para contribuir al entendimiento del rol de esta forma de vida comunitaria sobre la supervivencia y desempeño bacteriano en el medio ambiente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar distintas condiciones de cultivo in vitro que influyen en la formación de biofilms empleando especies de referencia y de interés agrícola pertenecientes a bacterias simbiotes fijadoras de nitrógeno, bacterias de vida libre promotoras del crecimiento vegetal y biocontroladoras.
- Analizar la capacidad formadora de biofilms de aislamientos autóctonos provenientes de suelos sometidos a distintas prácticas agrícolas.
- Estudiar características asociadas a factores de superficie o extracelulares bacterianos y tolerancia en presencia de factores de stress para correlacionarlos con la capacidad de formar biofilms de aislamientos autóctonos.
- Analizar el rol que cumplen componentes extracelulares polisacáridicos en la formación del biofilm en el simbiote *Mesorhizobium japonicum* como modelo de estudio.

RESULTADOS

CAPITULO I

Análisis de la capacidad formadora de biofilms en bacterias del suelo

1. Condiciones óptimas de formación de biofilm *in vitro* en especies de referencia

Como primera aproximación al estudio de la capacidad formadora de biofilms de bacterias del suelo, se emplearon cepas de referencia disponibles en el laboratorio pertenecientes a bacterias de vida libre o simbioses de plantas (tabla 1) y fueron evaluadas las condiciones de cultivo *in vitro* óptimas para el establecimiento de una población bacteriana adherida a una superficie abiótica como el poliestireno (PE) que denominamos biofilm.

Cepas de referencia	Nicho
<i>Mesorhizobium loti</i> Ayac 1BII	Rizobio simbiote de <i>Lotus</i> spp.
<i>Mesorhizobium japonicum</i> MAFF303099	Rizobio simbiote de <i>Lotus</i> spp.
<i>Rhizobium leguminosarum</i> 8401/pRL1JI (A34)	Rizobio simbiote de arveja y vicia (<i>Pisum sativum</i> / <i>Vicia</i> spp.)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	Rizobio simbiote de arveja (<i>Pisum sativum</i>)
<i>Ensifer meliloti</i> Rm 1021	Rizobio simbiote de alfalfa (<i>Medicago</i> spp.)
<i>Ensifer meliloti</i> Rm 2011	Rizobio simbiote de alfalfa (<i>Medicago</i> spp.)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1 (PGPR)	Vida libre- aislamiento ambiental- Promotora del crecimiento vegetal (PGPR)
<i>Burkholderia cepacia</i> Genomovar I (ATCC25416)	Aislamiento de plantas de cebolla (<i>Allium cepa</i>)
<i>Burkholderia vietnamensis</i> (BCC) GV (LMG10929)	Aislamiento de la rizosfera de plantas de arroz (<i>Oryza sativa</i>)

Tabla 1: Cepas de referencia empleadas en el estudio. En la tabla se indica la procedencia de cada cepa. Las cepas del género *Burkholderia* fueron encontradas además de suelo y rizosfera de diferentes cultivos, en agua y como patógeno oportunista en aislamientos clínicos de pacientes con fibrosis quística. En particular *B. cepacia* Genomovar I también fue aislada de pacientes con infecciones nosocomiales y en soluciones de uso médico y *B. vietnamensis* además fue aislada de animales (Rojas-Rojas *et al.*, 2018).

Para ello, se ensayaron condiciones de cultivo *in vitro* empleando medios nutricionales completos o ricos (como TY y LB) y sintéticos o mínimos (como los medios Y, AB y M63) que fueron adicionados con diferentes fuentes de carbono o suplementos. Además,

se modificaron parámetros como el tiempo de incubación, dosis inicial de inóculo de los cultivos y agitación. Como resultado de estos ensayos, se determinaron las condiciones y factores que afectan la adhesión a una superficie abiótica y por ende se definió una condición óptima del desarrollo del biofilm en los diferentes grupos bacterianos de referencia. En todos los casos, se evaluó la biomasa adherida (que corresponde a un tipo de biofilm) a las placas multipocillo de poliestireno (PE) luego del tiempo de cultivo para cada caso mediante tinción con cristal violeta de las células adheridas al soporte de estudio y cuantificación por medición de la absorbancia del colorante a 595 nm ($A_{595\text{ nm}}$).

1.1.a Estudio del biofilm desarrollado sobre PE en bacterias simbiotas de plantas

Biofilm sobre PE en *Mesorhizobium spp.*

Se estudió la capacidad de formar biofilm *in vitro* de dos cepas de interés pertenecientes al género *Mesorhizobium*, el aislamiento autóctono *Mesorhizobium loti* AYAC 1BII y la cepa de referencia *M. japonicum* MAFF303099, cuyo genoma ha sido secuenciado. Estos rizobios son capaces de establecer simbiosis con *Lotus spp.* y se desconocen las condiciones que favorecen el desarrollo de biofilms *in vitro*. Se evaluó la adhesión a placas multipocillo de poliestireno (PE) luego de 2, 3 y 4 días de cultivo bajo distintas condiciones de aireación y nutricionales, a partir de diferentes inóculos. En las figuras 1 y 2 se muestran los resultados obtenidos de un ensayo representativo de tres independientes a los cuatro días de cultivo, tiempo óptimo para la formación de biofilm en estas cepas. En el caso de *M. loti* AYAC 1BII, el medio mínimo AB suplementado con sacarosa 0,5 % fue la condición en la que se observó mayor desarrollo de biofilm ($A_{595\text{ nm}} = 0,50 \pm 0,04$, figura 1).

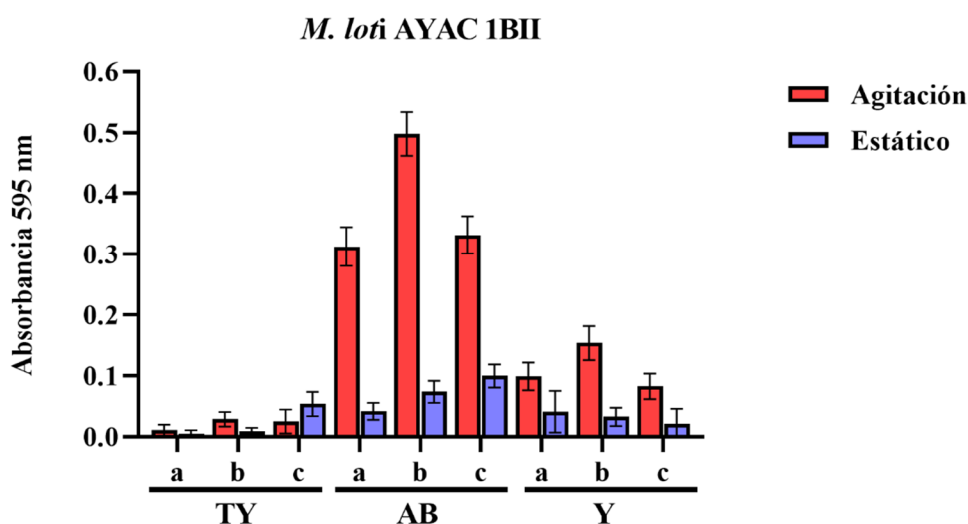


Figura 1: Cuantificación del biofilm desarrollado por *M. loti* AYAC 1BII sobre poliestireno bajo diferentes condiciones de cultivo luego de 4 días a 28°C. El medio Y fue suplementado con manitol 0.2 %, glutamato de sodio 0.11 % y vitaminas mientras que el medio AB fue adicionado con sacarosa 0.5 %. La población bacteriana inoculada inicialmente fue de densidad óptica (600nm): a, 0.001; b, 0.01 y c, 0.1. La agitación mecánica fue de 200 rpm. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

En cambio, en *M. japonicum* MAFF303099, el medio Y adicionado con manitol 0,2 % ($A_{595\text{nm}} = 0,56 \pm 0,03$) fue el que favoreció el desarrollo del biofilm *in vitro* (figura 2).

M. japonicum MAFF303099

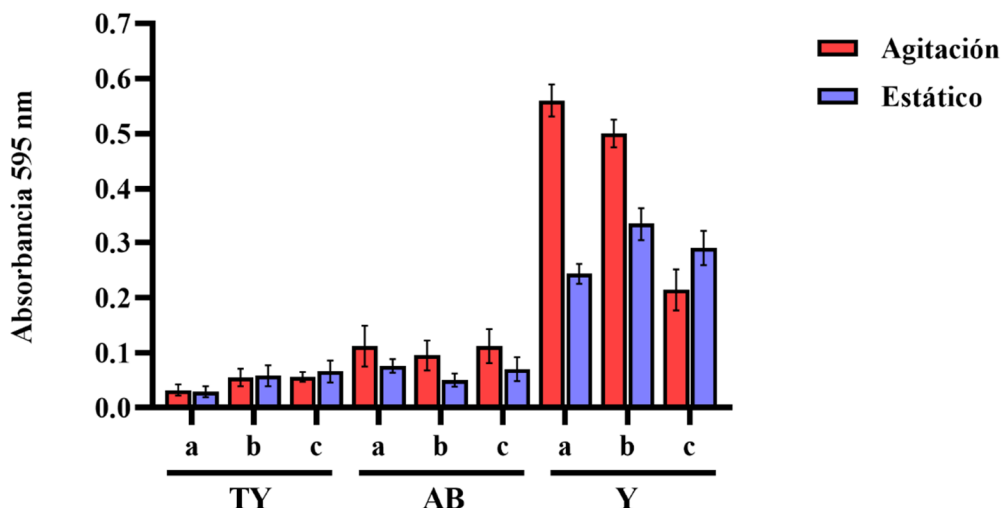


Figura 2: Cuantificación del biofilm desarrollado por *M. japonicum* MAFF303099 sobre poliestireno en diferentes condiciones nutricionales luego de 4 días. El medio Y fue suplementado con manitol 0.2 %, glutamato de sodio 0.11 % y vitaminas y el medio AB con sacarosa 0.5 %. Los cultivos fueron incubados a 28°C y a 200 rpm cuando se requirió agitación mecánica. La población bacteriana inoculada inicialmente fue a: 0.001, b: 0.01 y c: 0.1 (densidad óptica 600 nm). Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

En ambas cepas pudimos observar que la adhesión al PE es deficiente en medio rico TY, mientras que los medios mínimos AB ó Y presentaron mayor desarrollo que además se vio favorecido por la aireación mecánica del cultivo (figuras 1 y 2).

En cuanto a las diferencias observadas en el desarrollo de biofilm a partir de distintos inóculos iniciales y dentro de una misma condición nutricional, observamos que la población bacteriana inicial requerida para la formación del biofilm dependerá de cada especie. En el caso de *M. loti* AYAC 1BII, se alcanzó un máximo desarrollo a una ODi del orden de 0.01, luego de 4 días de incubación (0.50 ± 0.04) mientras que en *M. japonicum* MAFF303099 la ODi preferencial fue del orden de 0.001, luego de 4 días de incubación (0.56 ± 0.03) (figuras 1 y 2 respectivamente). Se corroboró que el crecimiento planctónico de las cepas en todos medios de cultivo ensayados no se vio afectado.

Estos ensayos en conjunto sugieren que *M. japonicum* MAFF303099 y *M. loti* AYAC 1BII presentan diferentes capacidades de formación de biofilm en las condiciones nutricionales ensayadas que se resumen en la tabla 2.

Biofilm sobre PE en *Rhizobium leguminosarum*

Estudios similares se realizaron en *Rhizobium leguminosarum*, empleando dos cepas de referencia, *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (Young 2006) y la cepa 8401 de *R. leguminosarum* portadora del plásmido simbiótico pRL1JI (A34) (Downie 1983 – secuenciada en Green 2019). Estas cepas son capaces de establecer simbiosis con plantas

leguminosas como la arveja (*Pisum sativum*) y *Vicia* sp. Las condiciones de desarrollo de biofilm *in vitro* e *in vivo* fueron descritas previamente (Russo 2006 y Williams 2008). Corroboramos que *Rhizobium leguminosarum* A34 no es capaz de formar biofilm sobre PE ($A_{595nm} < 0.10$) cuando es cultivada en medio rico TY, mientras que en medio Y suplementado con manitol 0.2 % y con agitación mecánica se registraron los valores más altos de adhesión luego de tres días de incubación a 28 °C, a partir de una ODi de 0.01 (0.57 ± 0.06) (figura 3). Se observó que a partir de un inóculo inicial de 0.001 la formación de biofilm fue menor, probablemente debido a que la menor población celular requiere de un tiempo mayor de cultivo para alcanzar el mismo desarrollo (No se muestra en la figura). Cuando el inóculo inicial fue de 0.1, los valores de biofilm fueron menores e invariables durante el tiempo de incubación, sugiriendo que la limitación de nutrientes disponibles para la población de bacterias afecta su desarrollo ($A_{595nm} < 0.2$) (no se muestra la figura).

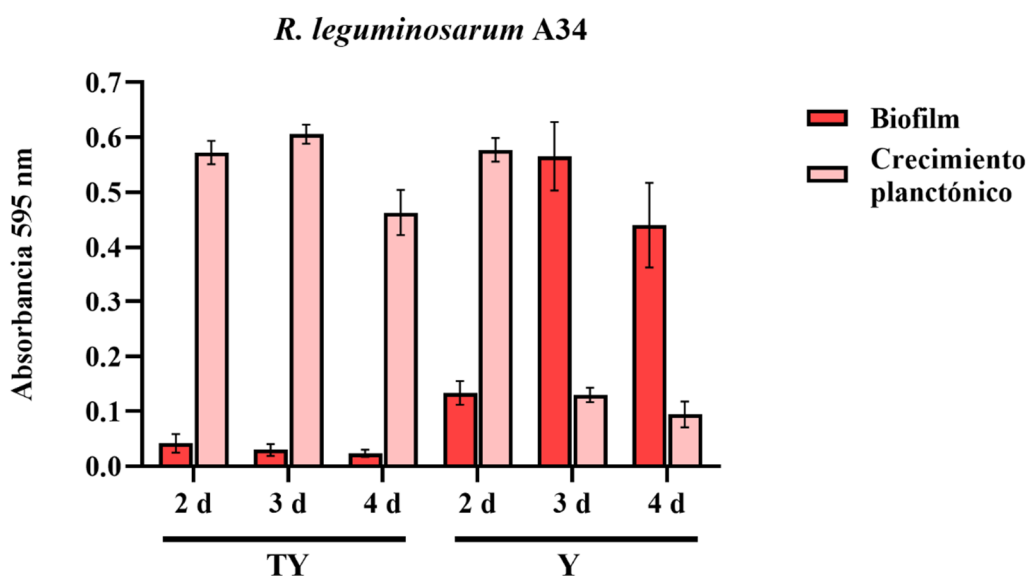


Figura 3: Cuantificación del biofilm desarrollado por *R. leguminosarum* A34 sobre PE en diferentes condiciones nutricionales y tiempos de incubación, a partir de un inóculo inicial de $OD_{600nm} = 0.01$. El medio Y fue suplementado con manitol 0.2 %, glutamato de sodio 0.11 % y vitaminas. Los cultivos fueron incubados a 28 °C y a 200 rpm durante 2 días (2d); 3 días (3d) y 4 días (4d). Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

Cuando *R. leguminosarum* A34 fue cultivada en medio Y suplementado con manitol 0.2 % sin agitación mecánica, la formación de biofilm fue menor que con agitación, registrándose un máximo de adhesión luego de tres días de incubación a 28 °C, a partir de una ODi de 0.001 (0.43 ± 0.08), mientras que en el mismo medio a los 2 y 4 días a ODi mayores (0.01 y 0.1), los valores de A_{595nm} fueron inferiores a < 0.2 .

Por otra parte, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 mostró menor capacidad de adhesión al PE en comparación con la cepa A34 en el medio mínimo Y adicionado con manitol 0.2 % ($A_{595nm} < 0.10$) y cultivada bajo agitación mecánica (figura 4). En medio TY tampoco fue capaz de formar biofilm sobre PE ($A_{595nm} < 0.10$) al igual que la cepa A34. Se analizó su comportamiento suplementando el medio Y con sacarosa 0.38 % (concentración molar de uso del manitol en medio Y) como fuente de carbono.

Encontramos que, en esta nueva condición nutricional, hubo mayor desarrollo de biofilm en la cepa 3841 cultivada a partir de ODi 0.1 bajo agitación mecánica. La biomasa adherida fue en aumento desde el día dos hasta alcanzar un pico el día 4 ($A_{595nm} = 0.42 \pm 0.08$) (figura 4). La formación de biofilm bajo las mismas condiciones de ensayo a partir de una ODi de 0.01 y de 0.001 fue deficiente. Se corroboró que el crecimiento planctónico en todos medios de cultivo empleados no se vio afectado.

En conjunto, estos resultados evidencian la capacidad de formación de biofilm de dos cepas de *R. leguminosarum* en medio mínimo Y adicionado con diferentes fuentes de carbono (tabla 2).

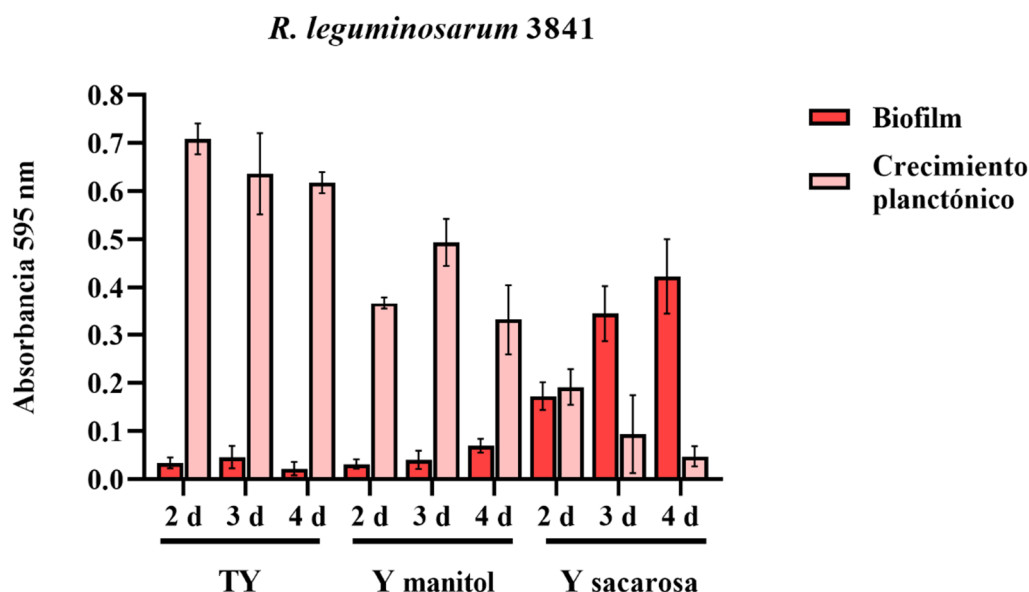


Figura 4: Cuantificación del biofilm desarrollado por *R. leguminosarum* 3841 sobre PE en diferentes condiciones nutricionales y tiempos de cultivo a partir de una población bacteriana inoculada inicialmente de $OD_{600nm} = 0.1$. El medio Y fue suplementado con manitol 0.2 % ó con sacarosa 0.38 % cuando se indica. Los cultivos fueron incubados a 28°C y a 200 rpm durante 2 días (2d); 3 días (3d) y 4 días (4d). Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

Biofilm sobre PE en *Ensifer meliloti*

Se estudió la capacidad de formar biofilm sobre PE en dos cepas del género *Ensifer* (*Sinorhizobium*), Rm1021 y Rm2011. Ambas son simbiotes de *Medicago* spp. y en particular Rm1021 es capaz de desarrollar biofilm sobre superficies abióticas (PVC) en medios mínimos (Fujishige *et al.*, 2005). Nuestros estudios indican que *Ensifer meliloti* Rm1021 fue incapaz de formar biofilm sobre poliestireno en medio mínimo Y suplementado con manitol 0,2 % ó medio RDM adicionado con sacarosa 0,5 % a pesar de ser capaz de crecer en forma planctónica en ambas condiciones (Figura 5). Sin embargo, cuando las bacterias fueron cultivadas en medio rico TY, se observó mayor adhesión al poliestireno tanto bajo agitación ($A_{595nm} = 2.48 \pm 0.09$) como en cultivos estáticos ($A_{595nm} = 1.98 \pm 0.08$) a partir de un inóculo inicial de 0.1. En ambos casos el máximo desarrollo del biofilm se alcanzó luego de 2 días de cultivo (la figura 5, muestra los ensayos bajo agitación a una $OD_i = 0.1$). Llamativamente en este medio de cultivo no hubo crecimiento en biofilm cuando las OD iniciales fueron menores a 0.1 (aunque si

hubo alto crecimiento planctónico a ODi 0.001, $A_{595nm} = 0.90 \pm 0.03$ y a ODi 0.01, $A_{595nm} = 0.87 \pm 0.05$ a los 4 días a 200 rpm), lo que sugiere que se requiere una población mínima para desarrollar el biofilm.

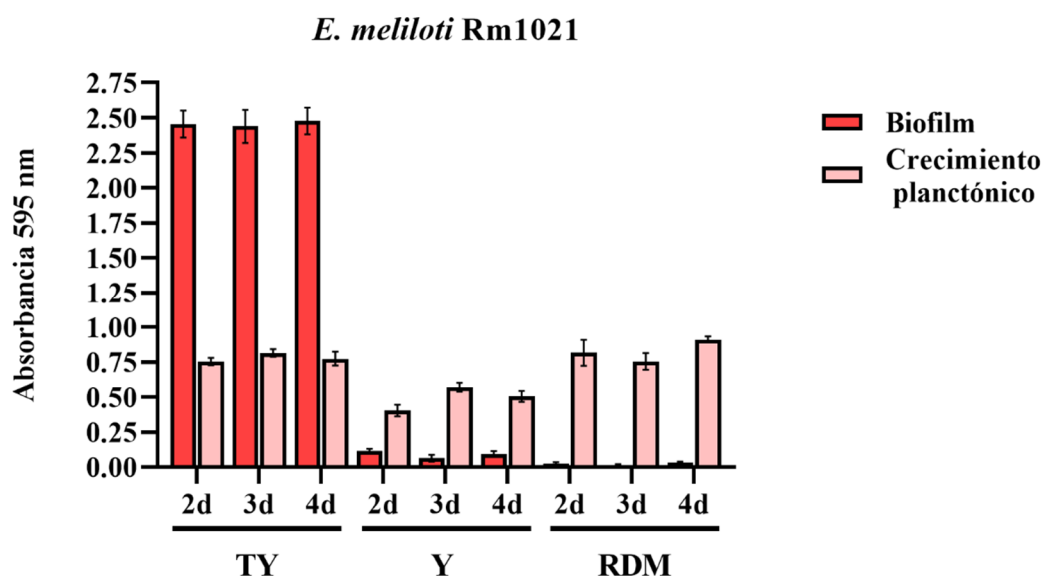


Figura 5: Cuantificación del biofilm desarrollado por *Ensifer meliloti* Rm1021 sobre PE en diferentes condiciones nutricionales y tiempos de incubación con una población bacteriana inoculada inicialmente de $OD_{600nm} = 0.1$. El medio Y fue suplementado con manitol 0.2 %, y el medio RDM con sacarosa 0.5%. Los cultivos fueron incubados a 28°C, a 200 rpm durante 2 días (2d); 3 días (3d) y 4 días (4d). Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

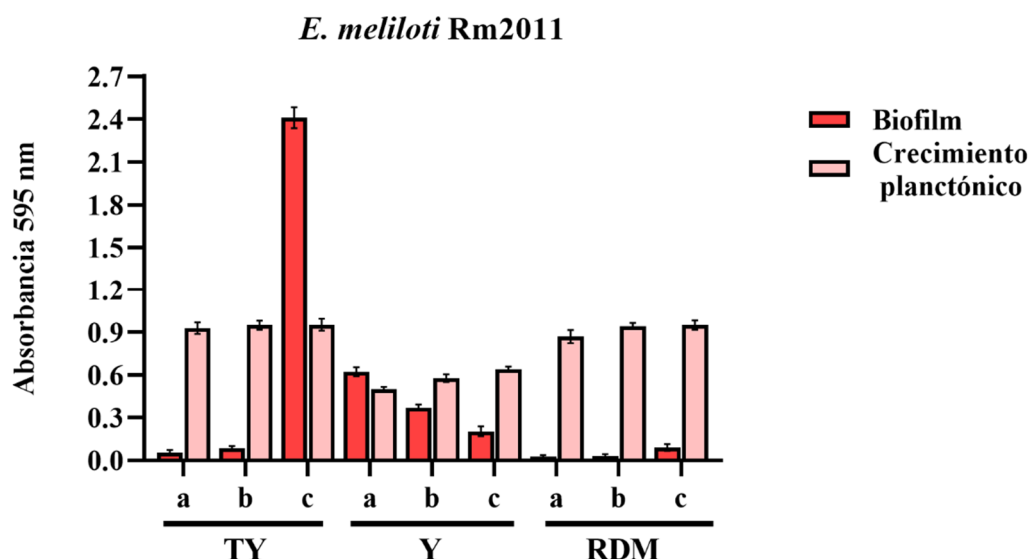


Figura 6: Cuantificación del biofilm desarrollado por *Ensifer meliloti* Rm2011 sobre PE a los dos días de incubación en diferentes condiciones nutricionales y ODs iniciales. El medio Y fue suplementado con manitol 0.2 % y el medio RDM con sacarosa 0.5%. Los cultivos fueron incubados a 28°C y a 200 rpm. La población bacteriana inoculada inicialmente fue a: 0.001, b: 0.01 y c: 0.1 (densidad óptica 600nm). Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

En cuanto a la cepa *Ensifer meliloti* Rm2011, no fue capaz de desarrollar biofilm en medio mínimo RDM sacarosa 0,5 %, en cambio se observó su formación cuando las

bacterias fueron cultivadas en medio mínimo Y suplementado con manitol 0,2 % a partir de una OD inicial de 0.001, durante dos días y a 200 rpm, con un máximo de $A_{595\text{nm}} = 0.62 \pm 0.31$ (figura 6).

Sin embargo, el mayor desarrollo de biofilm se alcanzó cuando las bacterias fueron cultivadas en medio rico TY a partir de una OD inicial de 0.1 durante dos días bajo agitación ($A_{595\text{nm}} = 2.41 \pm 0.07$) (Figura 6) y a los 3 días en medio estático ($A_{595\text{nm}} = 2.09 \pm 0.06$, no se muestra en la figura). Al igual que la cepa Rm1021, no hubo desarrollo de biofilm cuando las OD iniciales fueron menores a 0.1 tanto en agitación como en cultivos estáticos, aunque si se alcanzó mayor crecimiento planctónico (a ODi 0.001, $A_{595\text{nm}} = 0.93 \pm 0.04$ y a ODi 0.01, $A_{595\text{nm}} = 0.95 \pm 0.03$ a los 2 días y a 200 rpm).

El comportamiento de ambas cepas de referencia de este género de rizobios fue similar en cuanto a los requerimientos para establecer biofilm *in vitro* sobre PE. Sin embargo, la cepa Rm2011 adicionalmente formó biofilm en un medio mínimo (medio Y suplementado con manitol 0.2 %).

En suma, los resultados obtenidos con los rizobios pertenecientes a los 3 géneros estudiados sugieren que las condiciones de desarrollo de biofilm *in vitro* sobre PE dependen de la especie analizada y condiciones nutricionales del cultivo, observándose una tendencia a formar biofilm en medios mínimos en el caso de *Rhizobium leguminosarum* (medio mínimo Y) y *Mesorhizobium* (medios Y o AB) mientras que en *Ensifer* (*Sinorhizobium*) el medio rico TY favoreció su desarrollo.

1.1.b Estudio del biofilm desarrollado sobre PE en bacterias de vida libre

Biofilm sobre PE en *Pseudomonas fluorescens*

Se estudió la capacidad de formación de biofilm de la cepa de referencia *Pseudomonas fluorescens* P1 (PR1), un aislamiento empleado como bioinoculante comercial que promueve el crecimiento vegetal. Esta cepa fue la mejor formadora de biofilm sobre poliestireno, observándose adhesión en todos los medios ensayados en el presente estudio (figura 7). El medio de cultivo que presentó el mayor desarrollo fue M63 suplementado con glucosa 0.2 % y casaminoácidos 0.5 % en condiciones de agitación mecánica luego de 48 hs de incubación a partir de una OD inicial de 0.1 ($A_{595\text{nm}} = 8.54 \pm 0.69$). Por otra parte, en medio M63 adicionado con citrato 0.4 %, la formación de biofilm fue mayor en cultivos estáticos por sobre cultivos bajo agitación (figura 7) siendo máxima en dicho medio a partir de una OD inicial de 0.001 luego de 24 hs ($A_{595\text{nm}} = 2.21 \pm 0.05$) y 48 hs ($A_{595\text{nm}} = 2.20 \pm 0.56$) (Figura 7, se muestra la ODi 0.001). En términos generales, a partir de un inóculo inicial de 0.01, la formación de biofilm aumenta cuando los cultivos se mantienen en agitación, continuando en valores similares a partir de un inóculo inicial de 0.1 tal vez debido al agotamiento de nutrientes a esta densidad poblacional. En cambio, en cultivos estáticos, la formación de biofilm llega a valores máximos a partir de un inóculo de 0.01, disminuyendo a partir de inóculos iniciales de 0.1, posiblemente por disminución de nutrientes y falta de aireación.

El desarrollo del biofilm en el mismo medio nutricional M63 y suplementos con o sin agitación fue progresivo, observándose un incremento en la adhesión con el tiempo de cultivo entre 24 y 48 hs. Los resultados obtenidos en el medio rico en nutrientes LB muestran que, si bien existe adhesión y los valores de $A_{595\text{nm}}$ oscilan entre $0,47 \pm 0,15$ (24 hs, bajo agitación, ODinicial 0.01) y $1,56 \pm 0,34$ (48 hs, bajo agitación, ODinicial 0.001, figura 7), en medio M63 la formación de biofilm se vió favorecida con respecto al medio rico, alcanzando absorbancias $_{595\text{nm}}$ que varían entre $0,43 \pm 0,09$ (17hs, bajo agitación, ODinicial 0.001, suplementado con citrato, figura 7) y $8,54 \pm 0,69$ (48 hs, bajo agitación, ODinicial 0.1, suplementado con glucosa y casaminoácidos, no se muestra la figura).

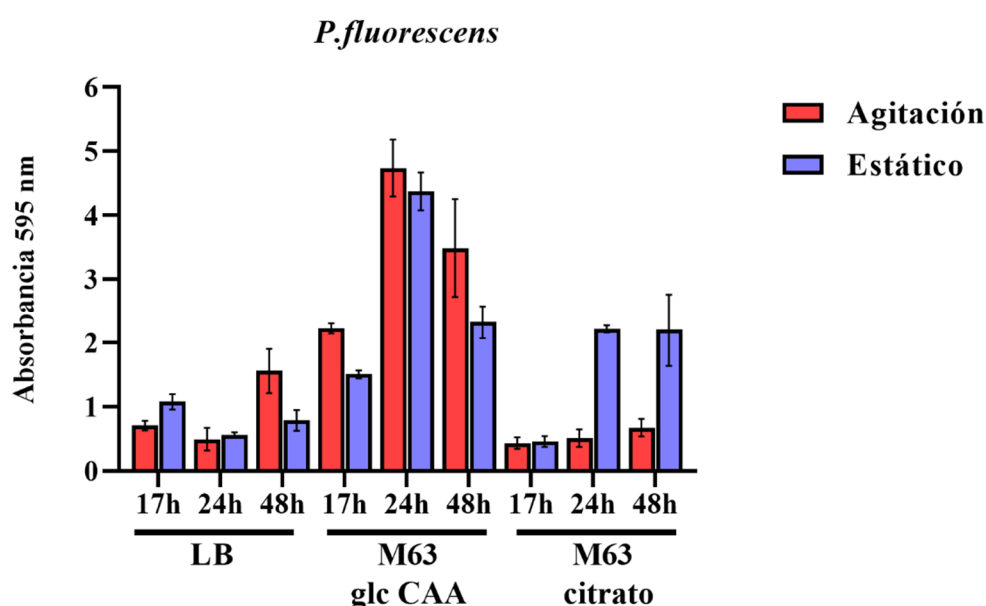


Figura 7: Cuantificación de la formación de biofilm en la cepa de referencia *Pseudomonas fluorescens* P1 (PR1) sobre PE en diferentes condiciones nutricionales y tiempos de incubación a una población bacteriana inoculada inicialmente fue de $OD_{600\text{nm}} = 0.001$. El medio M63 fue suplementado con glucosa 0.2 % y casaminoácidos 0.5 % ó citrato 0.4 %. Los cultivos fueron incubados a 28°C y a 200 rpm cuando se indica agitación. Abreviaturas: glc, glucosa; CAA, casaminoácidos. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

Biofilm sobre PE en *Burkholderia cepacia*

En cuanto al género *Burkholderia*, se estudiaron dos cepas de referencia disponibles en el laboratorio, *Burkholderia cepacia* Genomovar I y *Burkholderia vietnamensis* (BCC) GV. Estas cepas fueron aisladas de la rizosfera de plantas de arroz (GV) y de plantas de cebolla (GI), aunque pueden ser patógenos oportunistas en pacientes con fibrosis quística. Nuestros estudios indican que *Burkholderia cepacia* Genomovar I fue capaz de formar biofilm preferentemente en cultivos estáticos, tanto en medio mínimo M63 suplementado con glucosa 0.2 % y casaminoácidos 0.5 %, como en medio rico LB. En cambio, cuando el medio M63 se suplementó con citrato no se observó dicha preferencia (figura 8). Este comportamiento se mantuvo en las tres poblaciones iniciales ensayadas (ODi 0.001, 0.01, 0.1) aunque a partir de inóculos iniciales altos se alcanzaron los mayores valores de biofilm (figura 8). El mayor desarrollo de biomasa adherida se dió luego de 24 hs de

incubación en medio mínimo M63 suplementado con glucosa 0.2 % y casaminoácidos 0.5 % a partir de una OD inicial de 0.1 ($A_{595\text{nm}} = 0.79 \pm 0.07$) (figura 8, muestra la ODi 0.1).

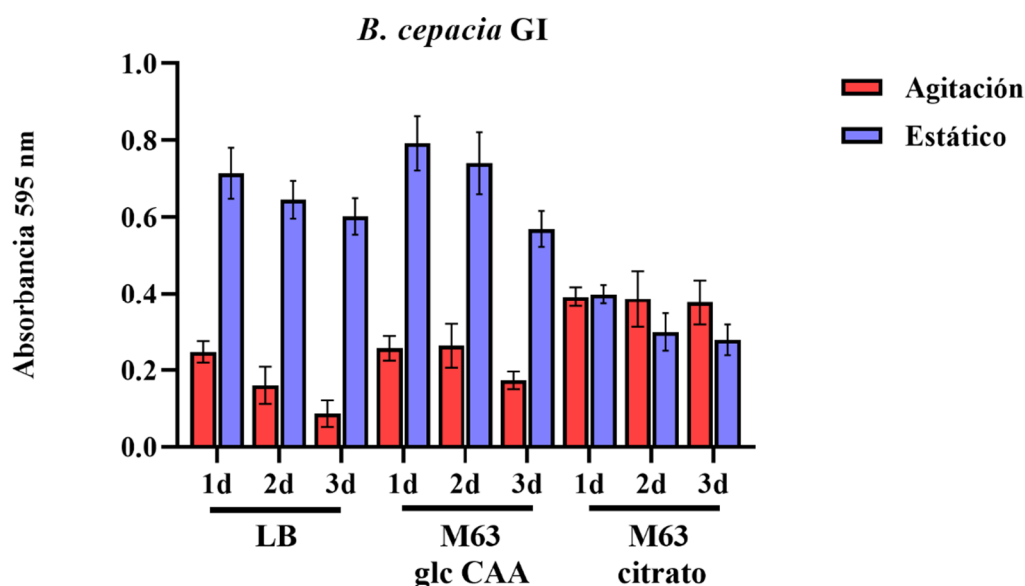


Figura 8: Cuantificación del biofilm desarrollado por *Burkholderia cepacia* Genomovar I sobre PE en diferentes condiciones nutricionales y tiempos de incubación a una población bacteriana inoculada inicialmente de $OD_{600\text{nm}} = 0.1$. El medio M63 fue suplementado con glucosa 0.2 % y casaminoácidos 0.5 % ó citrato 0.4 %. Los cultivos fueron incubados a 28°C y a 200 rpm cuando se indica agitación. Abreviaturas: glc, glucosa; CAA, casaminoácidos. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

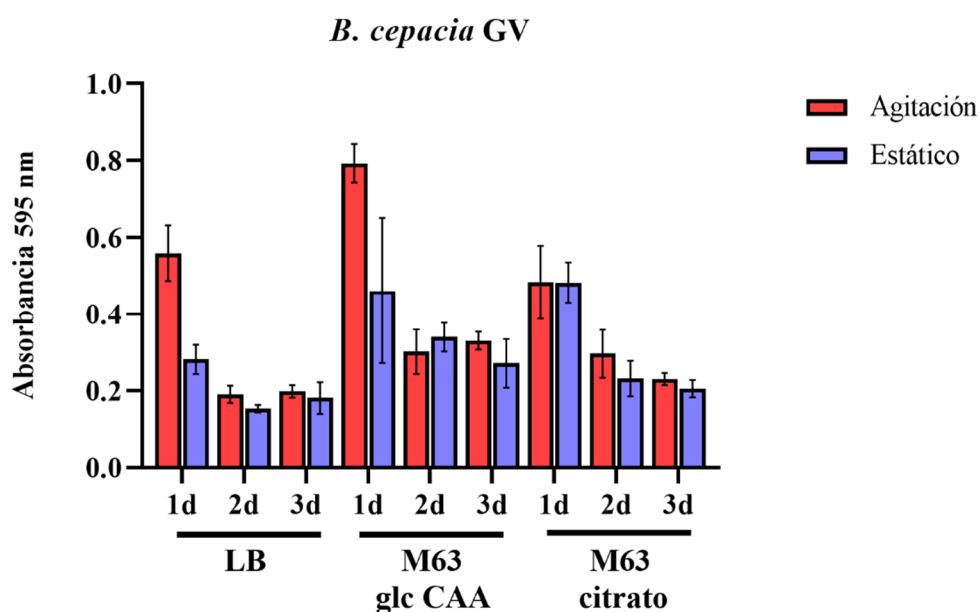


Figura 9: Cuantificación del biofilm desarrollado por *Burkholderia cepacea* Genomovar V sobre PE en diferentes condiciones nutricionales y tiempos de incubación a una población bacteriana inoculada inicialmente de $OD_{600\text{nm}} = 0.001$. El medio M63 fue suplementado con glucosa 0.2 % y casaminoácidos 0.5 % ó citrato 0.4 %. Los cultivos fueron incubados a 28°C y a 200 rpm cuando se indica agitación. Abreviaturas: glc, glucosa; CAA, casaminoácidos. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

Por otra parte, *Burkholderia cepacia* Genomovar V fue capaz de formar biofilm en los tres medios ensayados, pero a diferencia del GI, el mayor desarrollo se alcanzó a partir de inóculos iniciales menores, llegando a un máximo en medio mínimo M63 con glucosa 0.2 % y suplementado con casaminoácidos 0.5% luego de 1 día de incubación a partir de una OD inicial de 0.001 ($A_{595nm} = 0.79 \pm 0.05$) (figura 9).

El tiempo óptimo para la formación de biofilm fue a las 24 hs de incubación para todos los medios e inóculos ensayados y con agitación mecánica se produjo la mayor adhesión al soporte en cultivos en los medios M63 suplementado con glucosa 0.2 % y casaminoácidos 0.5 % y LB. En cultivos incubados durante tiempos más prolongados, observamos que la agitación mecánica no afectó la formación de biofilm con respecto a cultivos estáticos (figura 9), lo que sugiere que se alcanzó el máximo desarrollo posible en las condiciones ensayadas.

Microorganismo	Variables de cultivo ensayadas				Biomasa adherida al PE (biofilm) (A_{595nm})
	Medio	Agitación 200 rpm	Inóculo OD _i 600nm	Tiempo de incubación a 28°C	
<i>Mesorhizobium loti</i> Ayac 1BII	AB sacarosa 0.5%	Si	0.01	4 días	0.50 ± 0.04
<i>Mesorhizobium japonicum</i> MAFF 303099	Y manitol 0.2%	Si	0.001	4 días	0.56 ± 0.03
<i>Rhizobium leguminosarum</i> A34	Y manitol 0.2%	Si	0.01	3 días	0.57 ± 0.06
<i>Rhizobium leguminosarum</i> 3841	Y sacarosa 0.38%	Si	0.1	4 días	0.42 ± 0.08
<i>Ensifer meliloti</i> Rm1021	TY	Si	0.1	2 días 3 días 4 días	2.46 ± 0.10 2.44 ± 0.12 2.48 ± 0.10
<i>Ensifer meliloti</i> Rm2011	TY	Si	0.1	2 días	2.41 ± 0.07
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1	M63 glucosa 0,2 % CAA 0,5 %	Si	0,1	2 días	8.54 ± 0.69
<i>Burkholderia Cepacia</i> Genomovar I	M63 glucosa 0,2% CAA 0,5%	No	0.1	1 día	0.79 ± 0.07
<i>Burkholderia vietnamensis</i> (BCC) GV	M63 glucosa 0,2% CAA 0,5%	Si	0.001	1 día	0.79 ± 0.05

Tabla 2: Condiciones de cultivo que favorecen la formación de biofilm en cada microorganismo de referencia. El biofilm desarrollado en las placas multipocillo de PE por cada microorganismo fue cuantificado por tinción con cristal violeta y la medición de la absorbancia a 595 nm (A_{595nm}). Las OD iniciales de los cultivos fueron realizadas a partir de un cultivo inicial de $OD \approx 1$ y sucesivas diluciones seriadas de 1:10. En cada caso se realizaron 3 ensayos independientes de entre 6 y 8 réplicas cada uno. El valor informado corresponde al promedio de las réplicas de uno de los tres ensayos representativo.

Los resultados obtenidos con las bacterias de vida libre estudiadas mostraron que las condiciones de desarrollo de biofilm *in vitro* sobre PE dependen de la especie analizada y condiciones nutricionales del cultivo. Aunque en medio rico LB hubo buen desarrollo de biomasa adherida en ambos géneros, se observó una tendencia a desarrollar mayor biomasa en medio mínimo suplementado con casaminoácidos como fue reportado previamente en *Pseudomonas fluorescens* WCS365 (O'Toole and Kolter, 1998). Observamos que las cepas de vida libre mostraron mayor capacidad de formar biofilm que las especies simbiotes.

En la tabla 2 se resumen las condiciones de cultivo en las que se estableció el mayor desarrollo de biofilm *in vitro* sobre poliestireno en las cepas de referencia estudiadas.

1.2 Evaluación de la capacidad formadora de biofilm en aislamientos autóctonos del suelo pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia* spp.

El laboratorio de la Dra. Zorreguieta integró un grupo multidisciplinario de investigadores que en el marco del Proyecto de Área Estratégica plurianual: “Biología del suelo y producción agraria sustentable” (BIOSPAS), obtuvieron aislamientos de microorganismos provenientes de suelos de nuestro país sometidos a distintas prácticas agrícolas. En particular, empleamos aislamientos autóctonos de *Pseudomonas* spp. cedidos por el grupo del Dr. Claudio Valverde y la Dra Betina Agarás de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) y de *Burkholderia* spp. obtenidos por el Dr. Walter Draghi y la Dra. Zorreguieta del IIBBA - Fundación Instituto Leloir. En esta sección, evaluamos la capacidad de formación de biofilm sobre el poliestireno de dichos aislamientos en las condiciones de cultivo que fueron definidas en el estudio de las cepas de referencia de los géneros correspondientes.

1.2.a Adhesión a soporte abiótico de poliestireno (PE)

Capacidad de adhesión al PE de aislamientos autóctonos de *Pseudomonas* spp.

Fueron analizados 17 aislamientos autóctonos de *Pseudomonas* spp. (Agarás *et al.*, 2012) provenientes de suelo y rizosfera de diferentes localidades de nuestro país. Agarás y colaboradores realizaron la caracterización e identificación de los aislamientos nombrados en el presente trabajo como P2 a P18. El aislamiento P14 no fue clasificado.

Brevemente, para evaluar la capacidad de desarrollo de biofilm de los aislamientos de *Pseudomonas*, se inocularon placas multipocillo de PE en las mismas condiciones definidas para la cepa de referencia *Pseudomonas fluorescens* P1R. Así, las bacterias fueron cultivadas durante 17 horas a 28°C con agitación a partir de un inóculo inicial de OD_{600 nm} de 0.001 en medio M63 con glucosa 0.2 % suplementado con casaminoácidos 0.5 %; condición en la cual la cepa de referencia mostró un valor de absorbancia₅₉₅ del cristal violeta de 2.22 ± 0.08 (figura 7) y un crecimiento planctónico de OD₆₀₀ 0.99 ± 0.13. En la figura 10 y tabla 3 se muestra la cuantificación de los biofilms desarrollados por los 17 aislamientos y la cepa de referencia pertenecientes al género *Pseudomonas*

correspondiente a un experimento representativo de tres realizados, de entre 6 y 8 réplicas por muestra.

Considerando el mayor valor de absorbancia $_{595\text{nm}}$ del cristal violeta dentro del grupo de aislamientos como el 100 % de capacidad de formación de biofilm (desarrollado por la cepa P12, $A_{595\text{nm}} = 2.48 \pm 0.03$), clasificamos a los aislamientos de *Pseudomonas* en tres grupos: Alta (adhesión superior al 55 %), Moderada (entre 55 y 25 %) y Baja (inferior al 25 %) capacidad de adhesión al PE en las condiciones ensayadas (tabla 3, figura 11).

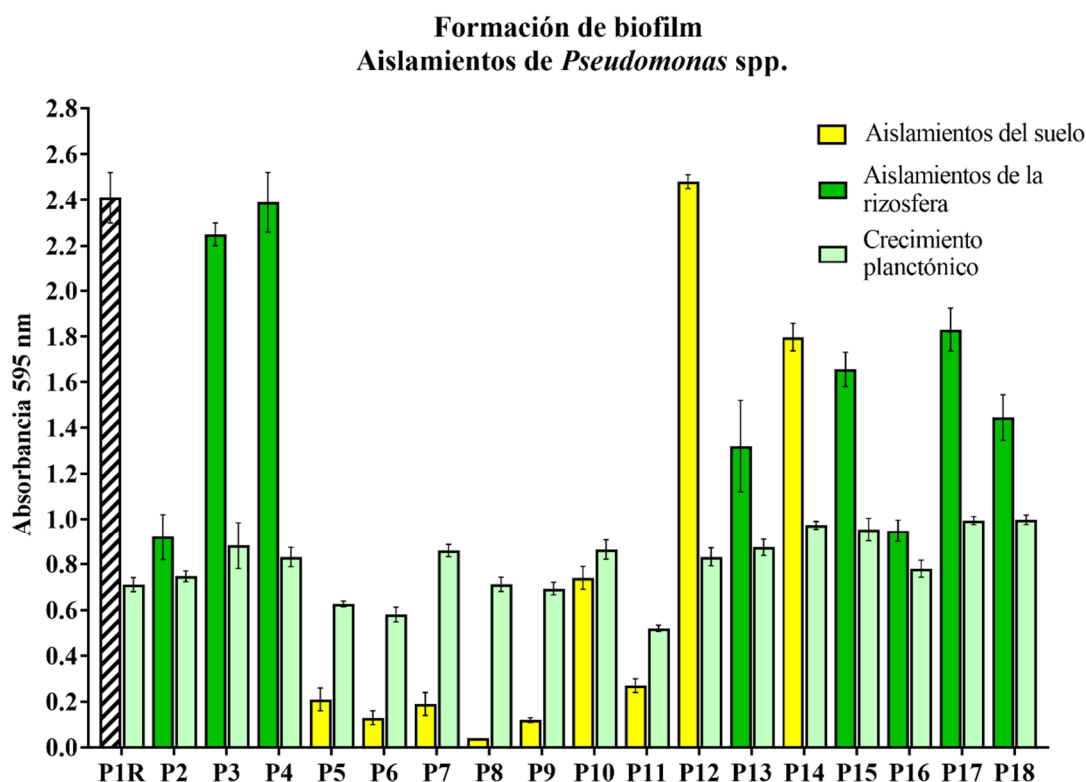


Figura 10: Cuantificación del biofilm sobre PE y el crecimiento planctónico de los 17 aislamientos de *Pseudomonas* spp. (P2 a P18). Condiciones de cultivo: 28 °C, 17 horas de incubación, agitación a 200 rpm, medio M63 glucosa 0.2 % y casaminoácidos 0.5 %, OD inicial 1×10^{-3} . P1R corresponde a la cepa de referencia *Pseudomonas fluorescens* P1 utilizada como bioinoculante y se indica como una barra rayada. El biofilm formado por los aislamientos provenientes de la rizosfera P2, P3, P4, P13, P15, P16, P17 y P18 se indica en verde oscuro y el formado por los aislamientos del suelo P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12 y P14 se muestra en color amarillo. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

De esta forma, los aislamientos con mayor capacidad de adhesión al PE y mejores formadores de biofilm *in vitro* fueron P3, P4, P12, P13, P14, P15, P17 y P18, los de moderada adhesión fueron P2, P10 y P16 y los de menor capacidad correspondieron a P5, P6, P7, P8, P9 y P11. Así, dentro de los 17 aislamientos autóctonos de *Pseudomonas* estudiados, podemos observar que el 65 % posee entre alta y moderada capacidad de establecer un biofilm *in vitro* sobre PE.

En cuanto a la procedencia de los aislamientos, observamos que el 100 % de los aislamientos de la rizosfera fueron muy buenos formadores de biofilm sobre el soporte abiótico (tomando como mejor *performance*, alta y moderada capacidad *in vitro* sobre PE) mientras que, los aislados del “suelo” (provenientes de suelo libre de raíces) fueron

en su mayoría (67 %), menos capaces de desarrollarlos en las mismas condiciones de ensayo (6 de 9 aislamientos mostraron baja capacidad P5, P6, P7, P8, P9 y P11).

I	Especie	Origen	Procedencia	CV A 595nm	Adhesión a PE
P1R	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Referencia	Inoculante comercial	2.41 ± 0.11	A
P2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rizosfera	Monte Buey, Córdoba, Argentina.	0.92 ± 0.10	M
P3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rizosfera	Monte Buey, Córdoba, Argentina	2.25 ± 0.05	A
P4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rizosfera	Monte Buey, Córdoba, Argentina	2.39 ± 0.13	A
P5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Suelo	Bengolea, Córdoba, Argentina	0.21 ± 0.05	B
P6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Suelo	Bengolea, Córdoba, Argentina	0.13 ± 0.03	B
P7	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Suelo	Bengolea, Córdoba, Argentina	0.19 ± 0.05	B
P8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Suelo	Bengolea, Córdoba, Argentina	0.04 ± 0.00	B
P9	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Suelo	Pergamino, Bs. As., Argentina	0.12 ± 0.01	B
P10	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i>	Suelo	Pergamino, Bs. As., Argentina	0.74 ± 0.05	M
P11	<i>Pseudomonas protegens</i>	Suelo	Pergamino, Bs. As., Argentina	0.27 ± 0.03	B
P12	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Suelo	Pergamino, Bs. As., Argentina	2.48 ± 0.03	A
P13	<i>Pseudomonas asplenii</i>	Rizosfera	Pergamino, Bs. As., Argentina	1.32 ± 0.20	A
P14	<i>Pseudomonas</i> sp.	Suelo	Pergamino, Bs. As., Argentina	1.80 ± 0.06	A
P15	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rizosfera	Monte Buey, Córdoba, Argentina	1.66 ± 0.08	A
P16	<i>Pseudomonas gessardii</i>	Rizosfera	Monte Buey, Córdoba, Argentina	0.95 ± 0.05	M
P17	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rizosfera	Monte Buey, Córdoba, Argentina	1.83 ± 0.09	A
P18	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rizosfera	Monte Buey, Córdoba, Argentina	1.45 ± 0.10	A

Tabla 3: Procedencia de los aislamientos de *Pseudomonas* cedidos por el Dr. Valverde - Dra. Agarás (Agarás et al., 2012) y descripción de su identificación genética. I, Identificación de los aislamientos; CV, absorbancia del cristal violeta; PE, poliestireno; Clasificación según se menciona en el texto en: A, alta capacidad de adhesión al PE; M, moderada capacidad de adhesión al PE y B, baja capacidad de adhesión al PE. Los aislamientos provenientes de la rizosfera fueron obtenidos a partir de la superficie de raíces de plantas (de maíz, soja y pastura) y de partículas del suelo firmemente adheridas a dichas raíces. Los aislamientos provenientes del suelo fueron obtenidos a partir de tierra tamizada libre de raíces y detritos.

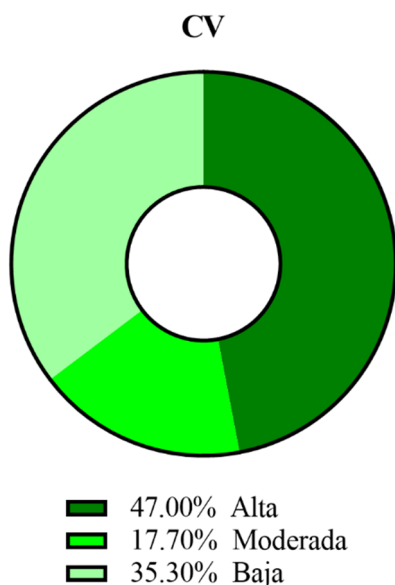


Figura 11: Clasificación de los aislamientos de *Pseudomonas* según su capacidad de adhesión al poliestireno en medio M63 glucosa 0.2 % y casaminoácidos 0.5 %. Tomando como 100 % al mayor valor de adhesión observado (P12), clasificamos a los aislamientos en tres grupos: Alta (adhesión superior al 55 %), Moderada (entre 55 y 25 %) y Baja adhesión (inferior al 25 %). Dentro de los 17 aislamientos autóctonos de *Pseudomonas* estudiados, el 65 % posee la mejor *performance* con alta y moderada capacidad de establecer un biofilm *in vitro* sobre PE.

Dentro de los aislamientos de *P. chlororaphis* originarios de muestras de suelo, encontramos variaciones en la capacidad de formar biofilm *in vitro* con Alta, Moderada y Baja capacidad de adhesión (P12= 2.48 ± 0.03 ; P10= 0.74 ± 0.05 y P9= 0.12 ± 0.01 ; One-way ANOVA, **** $p < 0.0001$). En el caso de las *P. fluorescens* provenientes de la rizosfera (P2, P3, P4, P15, P17 y P18) fueron muy buenas formadoras de biofilm en su totalidad, con la mejor *performance*, en cambio, las originarias del suelo resultaron de baja capacidad para formar biofilm (P5, P6, P7 y P8).

Capacidad de adhesión al PE de aislamientos autóctonos de *Burkholderia* spp.

Se analizaron 22 aislamientos autóctonos de *Burkholderia* spp. (Draghi *et al.*, 2018) provenientes de suelos de diferentes localidades de nuestro país. Draghi y colaboradores realizaron la caracterización e identificación de 19 aislamientos de *Burkholderia* spp. mientras que B3, B7 y B12 no fueron clasificadas. En este trabajo se clasificaron los aislamientos de nuestro interés B7 y B12 en cuanto a su especie, mediante secuenciación de porciones del gen *recA* empleando los primers específicos Bur3 y Bur4 (Payne *et al.*, 2005). El aislamiento B7, mostró una identidad del 98.81 % (cobertura del 93%) con *Paraburkholderia atlántica* y B12 un 98.57 % de identidad (cobertura del 95%) con *Burkholderia ambifaria*. De los 22 aislamientos, 19 pertenecen al nuevo género *Paraburkholderia* y 3 de ellos al género *Burkholderia* (B11 y B12, *Burkholderia ambifaria* y B3, *Burkholderia* sp.) (tabla 4). En este trabajo nos referiremos en general a este grupo como *Burkholderia* spp.

Se estudió la capacidad de formar biofilms *in vitro* sobre PE de los aislamientos de *Burkholderia* spp. en las condiciones definidas previamente utilizando las cepas de referencia de este género, es decir en el medio M63 con glucosa 0.2 % suplementado con casaminoácidos 0.5 %, con incubación durante 24 horas en agitación a 28°C, a partir de una OD inicial de 0.01. En estos ensayos, se observó que el crecimiento planctónico de la mayoría de los aislamientos fue menor al de las cepas de referencia por lo que se aumentó el tiempo de incubación a 48 horas. A pesar de alcanzar mayores niveles de crecimiento, no se observó desarrollo de biomasa adherida sobre el PE en este medio de cultivo ($A_{595nm} \leq 0.10$) en la mayoría de los aislamientos de *Burkholderia* spp. a excepción del identificado como B14 ($A_{595nm} = 0.32 \pm 0.07$) (tabla 5 y figura 12). Cuando cultivamos los aislamientos en este mismo medio durante 48 hs a 28°C, pero en forma estática, tampoco hubo formación de biofilm y el crecimiento planctónico de las cepas fue entre un 21 % y un 56 % menor que en agitación (no se muestra). Por lo tanto, se analizaron otras condiciones nutricionales que pudieran propiciar el desarrollo de biofilm *in vitro* en los aislamientos autóctonos de este género. Para esto, se probaron diferentes medios de cultivo y aditivos como el M63 con glucosa 0.2 % suplementado con extracto de levadura 0.05 %, el medio M63 con citrato 0.4 % y adicionado con extracto de levadura, el medio M9 con glucosa 0.4 %, el medio TSB (Tryptona de soja), LB y PCAT (Pallud *et al.*, 2001). A pesar de la amplia variedad de opciones de medios ensayados, el desarrollo de biofilm fue deficiente en la mayoría de los casos. En la tabla 5 se muestra la cuantificación del biofilm formado con cada medio utilizado en un experimento representativo (de tres experimentos independientes) realizado por sextuplicado, para los

21 aislamientos pertenecientes al género *Burkholderia*.

I	Especie	Origen	Procedencia	Adhesión a PE
B1	<i>Paraburkholderia caledonica</i> LMG 19076	Suelo	Bengolea, Córdoba, Argentina	N
B2	<i>Paraburkholderia caledonica</i> LMG 19076	Suelo	Pergamino, Buenos Aires, Argentina	M
B3	<i>Burkholderia sp.</i>	Suelo	Bengolea, Córdoba, Argentina	N
B4	<i>Paraburkholderia caledonica</i> LMG 19076	Suelo	Monte Buey, Córdoba, Argentina	B
B5	<i>Paraburkholderia tuberum</i> LMG 21944	Suelo	Monte Buey, Córdoba, Argentina	B
B6	<i>Paraburkholderia caledonica</i> LMG 19076	Suelo	Bengolea, Córdoba, Argentina	B
B7*	<i>Paraburkholderia atlántica</i>	Suelo	Monte Buey, Córdoba, Argentina	N
B8	<i>Paraburkholderia tuberum</i> LMG 21944	Suelo	Monte Buey, Córdoba, Argentina	B
B9	<i>Paraburkholderia caledonica</i> LMG 19076	Suelo	Bengolea, Córdoba, Argentina	M
B10	<i>Paraburkholderia caledonica</i> LMG 19076	Suelo	Monte Buey, Córdoba, Argentina	M
B11	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD	Suelo	Pergamino, Buenos Aires, Argentina	B
B12*	<i>Burkholderia ambifaria</i>	Suelo	Pergamino, Buenos Aires, Argentina	A
B13	<i>Paraburkholderia caledonica</i> LMG 19076	Suelo	Bengolea, Córdoba, Argentina	M
B14	<i>Paraburkholderia graminis</i> LMG 18924	Suelo	Monte Buey, Córdoba, Argentina	A
B15	<i>Paraburkholderia terricola</i> LMG 20594	Suelo	Monte Buey, Córdoba, Argentina	N
B16	<i>Paraburkholderia terricola</i> LMG 20594	Suelo	Monte Buey, Córdoba, Argentina	N
B17	<i>Paraburkholderia caledonica</i> LMG 19076	Suelo	Pergamino, Buenos Aires, Argentina	B
B18	<i>Burkholderia sp.</i>	Suelo	Bengolea, Córdoba, Argentina	B
B19	<i>Paraburkholderia terricola</i> LMG 20594	Suelo	Monte Buey, Córdoba, Argentina	No aplica
B20	<i>Paraburkholderia caledonica</i> LMG 19076	Suelo	Bengolea, Córdoba, Argentina	B
B21	<i>Paraburkholderia caledonica</i> LMG 19076	Suelo	Monte Buey, Córdoba, Argentina	B
B22	<i>Paraburkholderia terricola</i> LMG 20594	Suelo	Monte Buey, Córdoba, Argentina	B

Tabla 4: Procedencia de cada aislamiento de *Burkholderia* spp. identificados según Draghi y colaboradores (Draghi et al., 2018). Los indicados con asterisco (B7 y B12), corresponden a identificaciones realizadas en el presente trabajo mediante secuenciación empleando los primers específicos Bur3 y Bur4 (Payne et al., 2005). El aislamiento B19 no sobrevivió en glicerol 20 % a -20° ni a -70° y tampoco pudo ser conservado en placas de agar PCAT a 4°C, por lo cual quedó fuera del estudio. I, identificación del aislamiento; A, alta capacidad de adhesión, M, moderada capacidad de adhesión; B, baja capacidad de adhesión. Con sombreado se indican los aislamientos que fueron seleccionados para estudios posteriores (B1, B2, B5, B7, B8, B10, B12, B14, B15, B16).

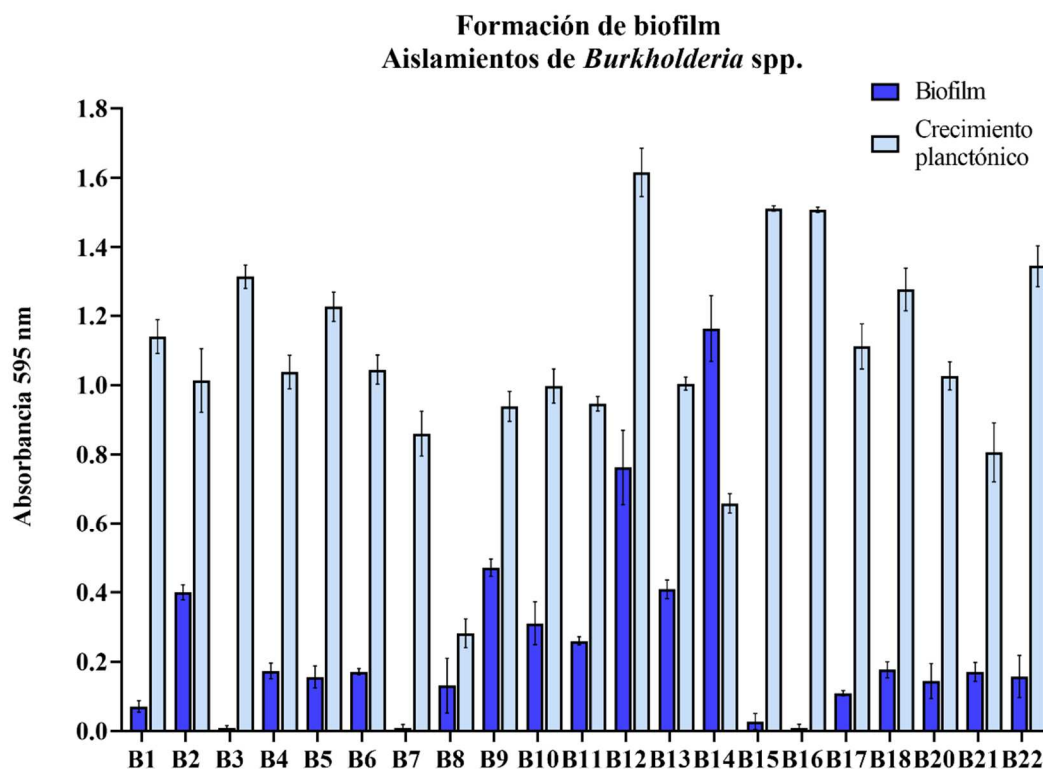


Figura 12: Cuantificación de la adhesión a PE (Biofilm) y del crecimiento planctónico de los 21 aislamientos de *Burkholderia* spp. Condiciones de cultivo: 28 °C, 48 horas de incubación, agitación a 200 rpm, OD inicial 1×10^{-2} . Los medios de cultivo utilizados fueron los que propiciaron el mayor desarrollo de biomasa adherida: M9 con glucosa 0.4 % (para los aislamientos B2, B4, B6, B9, B10, B11, B13, B14, B17, B18, B20 y B21), el medio M63 con glucosa 0.2 % y casaminoácidos 0.5 % (para los aislamientos B1, B3, B5, B7, B8, B15, B16 y B22) y TSB (para el aislamiento B12). Los valores de absorbancia 595 nm menores a 0.10 fueron considerados nulos en cuanto a la capacidad de formar biofilm (B1, B3, B7, B15, B16). Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

En conjunto estos ensayos evidencian que el medio de cultivo que favoreció la adhesión y formación de biofilm sobre PE en los aislamientos autóctonos de *Burkholderia* spp., fue M9 con glucosa 0.4 % luego de 48 hs de incubación con agitación. El aislamiento B14 mostró la mayor adhesión al poliestireno ($A_{595\text{nm}} = 1.16 \pm 0.09$, tabla 5) en esta condición de cultivo que consideramos como el 100 %. Tomando el valor más alto de biomasa adherida para cada aislamiento, podemos clasificar a cada uno de ellos dentro de tres grupos: de Alta (A) adhesión (mayor al 55 %) donde incluimos a los aislamientos B12 y B14, de Moderada (M) adhesión (entre 55 y 25 % de adhesión), representado por los aislamientos B2, B9, B10 y B13 y de Baja adhesión (B) (menor al 25 %) grupo integrado por B4, B5, B6, B8, B11, B17, B18, B20, B21 y B22 (tabla 5). Por otra parte, cinco aislamientos fueron incapaces de adherir al PE (N) en todos los medios ensayados (B1, B3, B7, B15 y B16) aunque pudieron crecer en forma planctónica en las mismas condiciones de cultivo (figuras 12 y 13). Así, sólo el 29 % de los aislamientos de *Burkholderia* estudiados mostró la mejor *performance* (con alta y moderada capacidad de adhesión al PE) en el desarrollo de biofilm *in vitro*, mientras que la mayoría de estos fue deficiente o incapaz de formarlo en las condiciones ensayadas (baja y nula capacidad). En cuanto a las especies de *Burkholderia* que tuvieron mayor capacidad de formación de biofilm *in vitro* predominaron los aislamientos pertenecientes a *Paraburkholderia*

caledonica (B2, B9, B10 y B13 del grupo M), además de *Paraburkholderia graminis* (B14) y *Burkholderia ambifaria* (B12). Dentro de los aislamientos de menor desempeño, con baja y nula adhesión *in vitro*, encontramos los pertenecientes a *Paraburkholderia caledonica* (B1, B4, B17, B20, B21), *Paraburkholderia tuberum* (B5, B6, B8), *Paraburkholderia terricola* (B15, B16, B22), *Burkholderia ambifaria* (B11) y *Paraburkholderia atlántica* (B7) (tabla 4). En cada caso corroboramos que el crecimiento planctónico no se vio afectado en las condiciones ensayadas (Figura 12).

A	Biofilm A 595 nm (Adhesión a PE) evaluado en los medios de cultivo indicados							
	M63 con glucosa 0.2 % y CAA 0.5 %	M63 con glucosa 0.2 % y ext.lev. 0.05 %	M63 con Citrato 0.4 %	M63 con Citrato 0.4 % y ext.lev. 0.05 %	M9 con glucosa 0.4 %	LB	TSB	PCAT
B1	-	-	-	-	-	-	-	-
B2	-	0.13±0.05	-	-	0.40±0.02	-	-	-
B3	-	-	-	-	-	-	-	-
B4	-	-	-	-	0.17±0.02	-	-	-
B5	0.16±0.03	-	-	-	-	-	-	-
B6	-	-	-	-	0.17±0.01	-	-	-
B7	-	-	-	-	-	-	-	-
B8	0.13±0.08	-	-	-	-	-	-	-
B9	-	-	-	-	0.47±0.02	-	-	-
B10	-	0.20±0.08	-	-	0.31±0.06	-	-	-
B11	-	-	-	-	0.26±0.01	-	-	-
B12	-	-	-	0.12±0.01	-	0.12±0.03	0.76±0.1	-
B13	-	-	-	-	0.41±0.03	-	-	-
B14	0.32±0.08	0.14±0.03	0.19±0.05	-	1.16±0.09	-	0.20±0.03	-
B15	-	-	-	-	-	-	-	-
B16	-	-	-	-	-	-	-	-
B17	-	-	-	-	0.11±0.01	-	-	-
B18	-	-	-	-	0.18±0.02	-	-	-
B20	-	-	-	-	0.14±0.05	-	-	-
B21	-	-	-	-	0.17±0.03	-	-	-
B22	0.16±0.06	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 5: Estudio de la capacidad de formación de biofilm sobre PE de 21 aislamientos autóctonos de *Burkholderia* spp. En la tabla se muestran los valores de absorbancia del cristal violeta (595 nm) obtenidos a partir de cultivos de *Burkholderia* spp inoculados en placas multipocillo de poliestireno con diferentes medios de cultivo durante 48hs a 28 °C con agitación. Los valores de absorbancia 595 nm menores a 0.10 fueron considerados nulos y se muestran en la tabla como negativos. A, aislamiento.

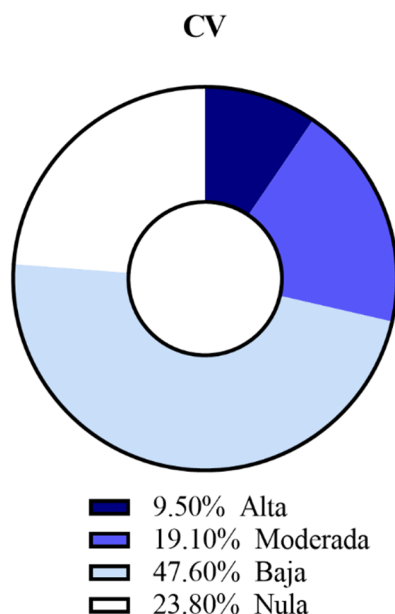


Figura 13: Clasificación de los aislamientos de *Burkholderia* según su capacidad de adhesión al poliestireno en el medio de cultivo que propició el mayor valor de biomasa adherida: M9 con glucosa 0.4 % (para los aislamientos B2, B4, B6, B9, B10, B11, B13, B14, B17, B18, B20 y B21), el medio M63 con glucosa 0.2 % y casaminoácidos 0.5 % (para los aislamientos B1, B3, B5, B7, B8, B15, B16 y B22) y TSB (para el aislamiento B12). Tomando como 100 % al mayor valor de adhesión observado (B 14), clasificamos a los aislamientos en cuatro grupos: Alta (adhesión superior al 55 %), Moderada (entre 55 y 25 %), Baja (inferior al 25 %) y Nula adhesión (valores de absorbancia 595 nm menores a 0.10). Dentro de los 21 aislamientos autóctonos de *Burkholderia* estudiados, el 29 % posee la mejor *performance* con alta y moderada capacidad de establecer un biofilm *in vitro* sobre PE.

1.2.b Evaluación de la capacidad formadora de biofilm sobre un soporte biótico (raíz de trigo)

Por otra parte, analizamos la capacidad de adhesión de los aislamientos a raíces de trigo como modelo de superficie biótica perteneciente a un cultivo de interés agrícola. Las raíces de plántulas de trigo variedad BW26 INTA fueron inoculadas con los aislamientos de *Pseudomonas* spp. ó *Burkholderia* spp. según se describe en la metodología. Se realizó el recuento de las bacterias que permanecieron adheridas a las raíces luego de lavarlas y macerarlas. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes de tres réplicas cada uno para cada aislamiento.

Capacidad de adhesión a raíz de trigo de los aislamientos autóctonos de *Pseudomonas* spp.

Los ensayos de adhesión a soporte biótico fueron evaluados luego de 17 hs de inoculadas las raíces de trigo con una suspensión bacteriana de un cultivo de OD = 0.001 para cada aislamiento de *Pseudomonas* spp. Los resultados obtenidos muestran la capacidad de adhesión de los aislamientos a raíces de trigo con respecto a la cepa de referencia *Pseudomonas fluorescens* P1R utilizada como inoculante comercial (figura 14). Teniendo en cuenta como el 100 % de adhesión al logaritmo de las ufc/g de raíz de esta cepa (8.11×10^7 ufc/g de raíz) podemos clasificar a los aislamientos en 3 grupos: de Alta (mayor al 55 %), Moderada (entre 55 y 25 %) y Baja (menor al 25 %) capacidad de adhesión a raíces de trigo (tabla 6). El 76 % de los aislamientos de *Pseudomonas* presentaron Alta capacidad de adhesión a raíces de trigo (P2, P3, P5, P8, P9, P10, P11, P13, P14, P15, P16, P17 y P18) mientras que las restantes lo hicieron de manera Moderada (P4, P6, P7 y P12) (Figuras 14 y 15, tabla 6).

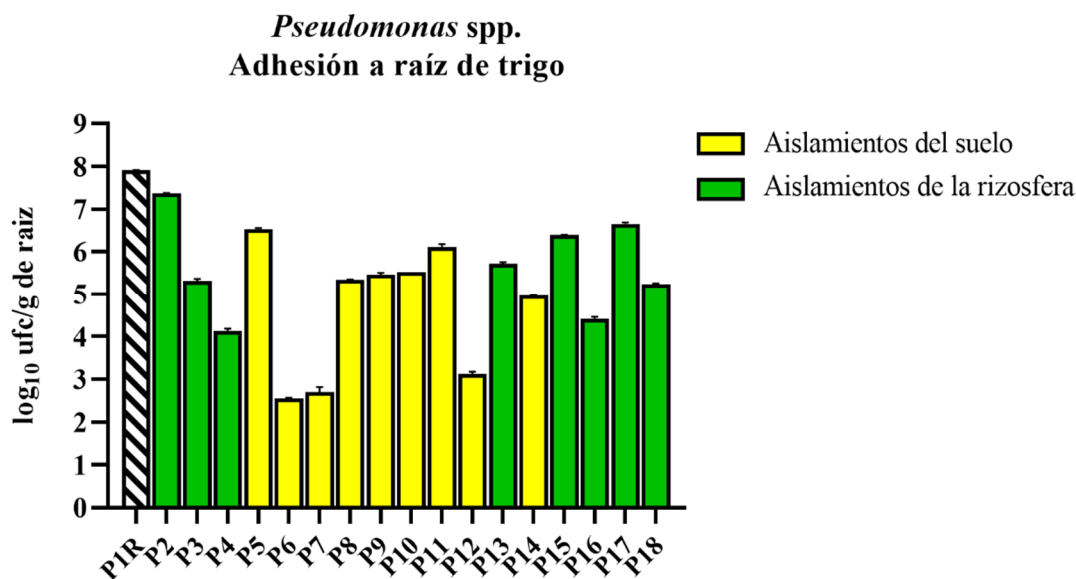


Figura 14: Capacidad de adhesión a raíces de trigo variedad INTA BW26, en *Pseudomonas* spp. La adhesión se expresó como ufc/g de raíz luego de 17 hs de inoculadas las raíces realizando el recuento de las bacterias viables según se indica en M y M. Se grafica el logaritmo de dicho recuento con respecto al peso húmedo de las raíces previamente enjuagadas y maceradas. Este ensayo fue realizado a partir de 200 μ l de un inóculo de OD = 1×10^{-3} .

Adhesión raíz			
Identificación del Aislamiento	Capacidad de adhesión	% de adhesión con respecto a P1R	ufc/g de raíz (promedio)
P1R	A	100%	8.11×10^7
P2	A	93%	2.33×10^7
P3	A	67%	2.10×10^5
P4	M	52%	1.30×10^4
P5	A	83%	3.45×10^6
P6	M	32%	358
P7	M	34%	494
P8	A	68%	2.19×10^5
P9	A	69%	2.91×10^5
P10	A	70%	3.37×10^5
P11	A	77%	1.31×10^6
P12	M	39%	1×10^3
P13	A	72%	5.26×10^5
P14	A	63%	9.30×10^4
P15	A	81%	2.46×10^6
P16	A	56%	2.60×10^4
P17	A	84%	4.51×10^6
P18	A	66%	1.78×10^5

Tabla 6: Adhesión a raíces de trigo de los aislamientos de *Pseudomonas* spp. Los porcentajes fueron calculados con respecto al log ufc/g de raíz de la cepa de referencia P1R *Pseudomonas fluorescens*. A, Alta capacidad de adhesión (mayor al 55%); M, Moderada capacidad de adhesión (entre 55 y 25%).

Adhesión a raíz

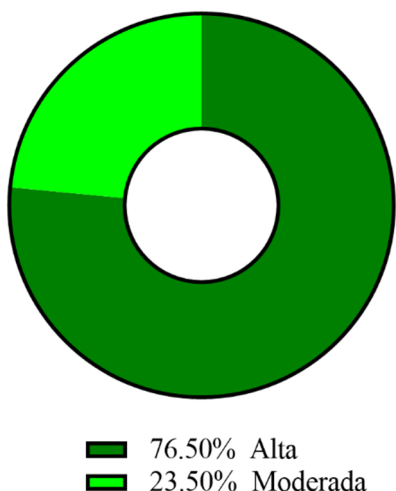


Figura 15: Clasificación de los aislamientos de *Pseudomonas* según su capacidad de adhesión a raíces de trigo. Tomando como 100 % al mayor valor de adhesión observado (P1R), clasificamos a los aislamientos en tres grupos: Alta (adhesión superior al 55 %), Moderada (entre 55 y 25 %) y Baja adhesión (inferior al 25 %). Dentro de los 17 aislamientos autóctonos de *Pseudomonas* estudiados, el 100 % posee la mejor *performance* con alta y moderada capacidad de adhesión a raíces de trigo.

Según la procedencia, encontramos que 7 de 8 aislamientos provenientes de rizosfera presentan alta adhesión al sustrato biótico (figura 14, tabla 6).

En conjunto los estudios efectuados sobre soportes abióticos y bióticos muestran que, dentro de los aislamientos de *Pseudomonas* analizados, el 65 % manifestó la mejor *performance* para formación de biofilm con alta y moderada capacidad de adhesión a PE y a raíces de trigo (P2, P3, P4, P10, P12, P13, P14, P15, P16, P17 y P18). Sin embargo, no encontramos correlación estadísticamente significativa entre adhesión a soporte biótico y abiótico en los aislamientos de *Pseudomonas*.

Por otra parte, destacamos que dentro de este grupo de alta *performance* para formación de biofilms, encontramos que el 55 % pertenece a *Pseudomonas fluorescens* aisladas de la rizosfera (6 de 11: P2, P3, P4, P15, P17 y P18).

Capacidad de adhesión a raíz de trigo de los aislamientos autóctonos de *Burkholderia* spp.

Dada la respuesta observada en *Burkholderia* en cuanto a la interacción con el soporte abiótico, decidimos evaluar el desempeño de los aislamientos de este género frente a una superficie biótica eligiendo aquellos que representarían a cada uno de los cuatro grupos descriptos en la sección 1.2.a de resultados. Así, seleccionamos 10 aislamientos de *Burkholderia* spp. con diferentes capacidades de adhesión al poliestireno (PE): cuatro aislamientos incapaces de formar biofilm en todos los medios ensayados (grupo N: B1, B7, B15 y B16), los dos mejores formadores de biofilm (grupo A: B12 y B14), dos aislamientos de moderada (grupo M: B2 y B10) y dos de baja capacidad de adhesión al PE (grupo B: B5 y B8) (tablas 4 y 7). Se evaluó la capacidad de adhesión a raíz de trigo de los aislamientos de *Burkholderia* luego de 48 hs de incubación a 23°C, dispensando 200 µl de una suspensión bacteriana de un cultivo de OD = 0.01. Se realizaron tres experimentos independientes de tres réplicas por cepa. Los resultados mostraron que sólo 3 de los 10 aislamientos estudiados fueron capaces de persistir adheridos a las raíces del trigo en las condiciones ensayadas, siendo B10 el de mejor *performance* (1.89×10^7 ufc/g

de raíz) frente a B12 (7.6×10^4 ufc/g raíz) y B14 (4.9×10^4 ufc/g raíz) (Figura 16, tabla 7). Estos aislamientos corresponden a *Paraburkholderia caledonica* (B10), *Burkholderia ambifaria* (B12) y *Paraburkholderia graminis* (B14) y su capacidad de adhesión al PE también mostró la mejor *performance*, siendo alta (B12 y B14) y moderada (B10), como se mencionó en la sección 1.2.a (Tabla 4).

I	Especie	Medio de cultivo en el que se favorece la formación de biofilm sobre PE	Capacidad de adhesión al PE	% de adhesión a raíz	Adhesión raíz ufc/g de raíz (Promedio)
B1	<i>Paraburkholderia caledonica</i> LMG 19076	-	0 (N)	-	-
B2	<i>Paraburkholderia caledonica</i> LMG 19076	M9, glucosa 0.4 %	0.40 ± 0.02 (M)	-	-
B5	<i>Paraburkholderia tuberum</i> LMG 21944	M63, glucosa 0.2 %, CAA 0.5 %	0.16 ± 0.03 (B)	-	-
B7	<i>Paraburkholderia atlántica</i>	-	0 (N)	-	-
B8	<i>Paraburkholderia tuberum</i> LMG 21944	M63, glucosa 0.2 %, CAA 0.5 %	0.13 ± 0.08 (B)	-	-
B10	<i>Paraburkholderia caledonica</i> LMG 19076	M9, glucosa 0.4 %	0.31 ± 0.06 (M)	100 %	1.9×10^7
B12	<i>Burkholderia ambifaria</i>	TSB	0.76 ± 0.1 (A)	67 %	7.6×10^4
B14	<i>Paraburkholderia graminis</i> LMG 18924	M9, glucosa 0.4 %	1.16 ± 0.09 (A)	65 %	4.9×10^4
B15	<i>Paraburkholderia terricola</i> LMG 20594	-	0 (N)	-	-
B16	<i>Paraburkholderia terricola</i> LMG 20594	-	0 (N)	-	-

Tabla 7: Adhesión a raíces de trigo y a poliestireno en los aislamientos de *Burkholderia spp.* A, aislamiento. I, identificación del aislamiento; A, alta capacidad de adhesión a poliestireno (PE); M, moderada capacidad de capacidad de adhesión a PE y B, baja capacidad de adhesión a PE. El porcentaje de adhesión a raíz de los aislamientos B12 y B14, fue calculado con respecto a la cepa B10 (100%) sobre el logaritmo de las ufc/g de peso húmedo de las raíces previamente enjuagadas y maceradas. El ensayo se realizó a partir de un inóculo de 200 μ l de OD = 0.01.

Cuando analizamos estadísticamente la relación entre la capacidad de adhesión a PE y a las raíces de trigo, encontramos una correlación de *Spearman* positiva y moderada, en la condición de cultivo ensayada ($r_s = 0.68$, $\alpha 0.05$ $p = 0.029$; número de pares XY = 10).

Adhesión a raíz

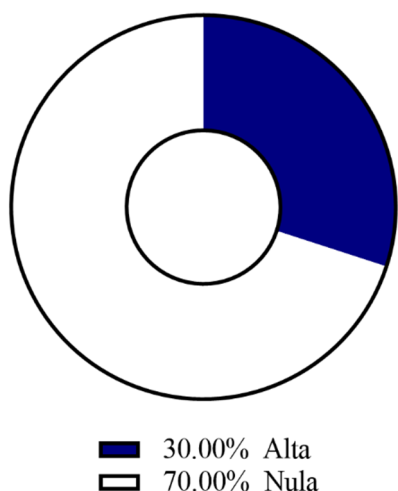


Figura 16: Clasificación de los aislamientos de *Burkholderia* según su capacidad de adhesión a raíces de trigo. Tomando como 100 % al mayor valor de adhesión observado (B 10), clasificamos a los aislamientos en cuatro grupos: Alta (adhesión superior al 55 %), Moderada (entre 55 y 25 %), Baja (inferior al 25 %) y Nula adhesión (valores de absorbancia 595 nm menores a 0.10). Dentro de los 10 aislamientos autóctonos de *Burkholderia* seleccionados, el 30 % posee la mejor *performance* con alta capacidad de adhesión a raíces, mientras que el 70 % restante fue incapaz de permanecer adherido bajo las condiciones de ensayo.

2. Estudio de los componentes de la superficie bacteriana y factores extracelulares asociados a formación de biofilm en microorganismos del suelo

Con la idea de comprender qué factores influyen en la capacidad de formación del biofilm en los microorganismos del suelo, se estudió la producción de componentes extracelulares como los exopolisacáridos (EPS), la celulosa y moléculas señal de la densidad poblacional (*quorum-sensing*) además de algunas características asociadas a componentes de la superficie bacteriana, como la motilidad dependiente de flagelo y la autoagregación celular. Se ha propuesto que la producción y secreción de compuestos al medio extracelular, así como la presencia de componentes en la superficie, afectan las interacciones bacterianas y pueden resultar cruciales para la agregación, anclaje y el desarrollo de biofilms en diversos microorganismos (Costerton *et al.*, 1995; Schembri *et al.*, 2001).

2.1 Evaluación de características asociadas a la superficie y componentes extracelulares en *Pseudomonas spp.*

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos realizados sobre los aislamientos de *Pseudomonas spp.* Los valores informados corresponden a tres experimentos independientes de tres réplicas cada uno para cada aislamiento. Todos los ensayos fueron realizados bajo la mejor condición de formación de biofilm (OD inicial = 0.001, 17 horas de cultivo) en medio M63 con glucosa 0.2 % suplementado con casaminoácidos 0.5 %. En el caso de los ensayos cuantitativos y siguiendo el mismo criterio que para los ensayos de biofilm, clasificamos a los aislamientos en tres grupos: Alta, Moderada y Baja capacidad para manifestar un fenotipo determinado. Un nivel de producción mayor al 55 % con respecto al valor más alto del grupo es considerado de Alta capacidad, Moderada entre el 55 y 25 % y Baja para valores inferiores al 25 %.

I	EPS	Agregación	Motilidad (cm)		Rojo	Quorum Sensing	
	ug/ml	%	Swimming	Swarming	Congo	HSL-C4/8	HSL-C10/16
P1R	0.36 ± 0.03	< 1	8.5*	8.5	+	-	-
P2	7.59 ± 0.73	36.87 ± 0.11	3.47 ± 0.38	1.17 ± 0.20	+	-	-
P3	3.01 ± 0.25	90.42 ± 5.12	8.5	8.5	+	-	-
P4	2.34 ± 0.40	22.28 ± 1.42	2.78 ± 0.32	1.0 ± 0	+	+	-
P5	7.02 ± 0.78	47.52 ± 0.13	2.27 ± 0.10	0.78 ± 0.08	+	-	-
P6	1.26 ± 0.14	40.60 ± 2.50	2.65 ± 0.13	1.02 ± 0.13	+	-	-
P7	10.83 ± 0.78	67.60 ± 3.13	3.00 ± 0.21	1.12 ± 0.18	+	-	-
P8	3.22 ± 0.75	80.91 ± 1.86	3.20 ± 0.07	1.02 ± 0.06	+	-	-
P9	0.70 ± 0.02	12.10 ± 1.87	2.52 ± 0.42	0.42 ± 0.10	+	-	-
P10	2.61 ± 0.31	14.18 ± 0.98	0.65 ± 0.09	3.1 ± 0.32	+	+	+
P11	2.42 ± 0.02	3.63 ± 1.35	4.33 ± 0.03	0.55 ± 0.04	+	-	-
P12	3.79 ± 0.13	25.67 ± 4.90	8.5	5.3 ± 0.47	+	+	+
P13	2.17 ± 0.29	< 1	1.10 ± 0	0.38 ± 0.06	+	-	+
P14	1.53 ± 0.86	1.22 ± 1.92	0.63 ± 0.11	0.23 ± 0.06	-	-	+
P15	2.84 ± 0.10	6.79 ± 0.02	0.50 ± 0.07	0.35 ± 0	+	-	-
P16	1.22 ± 0.04	5.91 ± 0.72	0.63 ± 0.11	0.35 ± 0	+	-	-
P17	2.37 ± 0.23	10.58 ± 2.70	0.68 ± 0.04	0.33 ± 0.04	+	-	-
P18	1.72 ± 0.47	3.64 ± 2.96	0.70 ± 0.05	0.33 ± 0.06	+	-	-

Tabla 8: Evaluación de las características asociadas a componentes de superficie y extracelulares de los aislamientos autóctonos de *Pseudomonas spp.* Se muestran las características en los diferentes aislamientos valoradas en cuanto a producción de polisacáridos extracelulares (EPS), agregación celular (% de agregación), motilidad mediada por flagelo (diámetro del desplazamiento en medio agar al 0.3 % para swimming ó agar al 0.5 % para swarming), producción de beta 1,4 glucósidos como la celulosa (Rojo Congo) y producción de homoserina lactonas señal de Quorum sensing (HSL) de cadena corta (HSL C4/6) y larga (HSL C10/16). Cuando las bacterias se desplazaron hasta el borde de la placa de Petri en los ensayos de motilidad se registró el valor como 8.5 cm, diámetro de la placa (*). Los resultados corresponden a tres experimentos independientes de al menos tres réplicas cada uno. I, identificación del aislamiento.

A-Producción de Exopolisacáridos en *Pseudomonas spp.*

Se cuantificó la producción de exopolisacáridos (EPS) en los 17 aislamientos de *Pseudomonas spp.* a partir del sobrenadante de cultivos de 20 horas con agitación a 200 rpm en el medio nutritivo previamente indicado como propicio para la formación de biofilm en este género. Observamos un amplio rango de producción y secreción de exopolisacáridos entre los diferentes aislamientos, que comprendió entre $0.70 \pm 0.02 \mu\text{g}$ y $10.83 \pm 0.78 \mu\text{g}$ de EPS/ml de cultivo, superando todos los aislamientos a la cepa de referencia P1R ($0,36 \pm 0,03 \mu\text{g}$ de EPS/ml de cultivo) (Tabla 8). Teniendo en cuenta el valor de producción de polisacáridos extracelulares de P7 como el máximo (100 %: $10.83 \pm 0.78 \mu\text{g/ml}$), clasificamos a los aislamientos en 3 grupos: de Alta capacidad de producción de EPS (A) cuando superaron los $5.96 \mu\text{g}$ de EPS/ml de cultivo (valores mayores al 55 %), de Moderada capacidad (M) entre 5.96 y $2.71 \mu\text{g}$ de EPS/ml de cultivo

(correspondiendo a valores entre 55 y 25 %), y de Baja capacidad (B) cuando produjeron menos de 2.71 μg EPS/ml de cultivo (menor al 25 %). En base a estos resultados, observamos que el 59 % de los aislamientos de *Pseudomonas* manifestaron una baja producción de exopolisacáridos (grupo B: P10, P11, P17, P4, P13, P14, P18, P6, P16 y P9), mientras que los mejores productores de EPS representaron el 41 % restante entre los grupos A y M (grupo A: P7, P2 y P5; grupo M: P3, P8, P12 y P15, tabla 8) (figura 17). Entre estos últimos de alta *performance* 6 de 7 pertenecen a *P. fluorescens* (86 %).

Teniendo en cuenta los estudios realizados en cuanto a la capacidad de formar biofilm sobre PE y raíces de trigo en *Pseudomonas*, encontramos que todos los aislamientos fueron capaces de interactuar con ambos soportes. En el caso de la cepa de referencia P1R utilizada como inoculante, observamos que presentó alta capacidad de adhesión en ambos casos (tablas 3 y 6) aunque su rendimiento de producción de EPS fue el menor de los cuantificados. Analizando en conjunto todos los aislamientos de *Pseudomonas* encontramos que un 41 % mostró baja producción de EPS y destacó por su capacidad de adhesión a PE comportándose de forma similar a la cepa P1R (7 de los 17 aislamientos con alta (P17, P13, P14, P18, P16) y moderada adhesión a PE (P10 y P4). El 18 % restante de los aislamientos de baja producción de EPS manifestó bajo desempeño en la adhesión a PE (3 de 17 aislamientos: P11, P9 y P6).

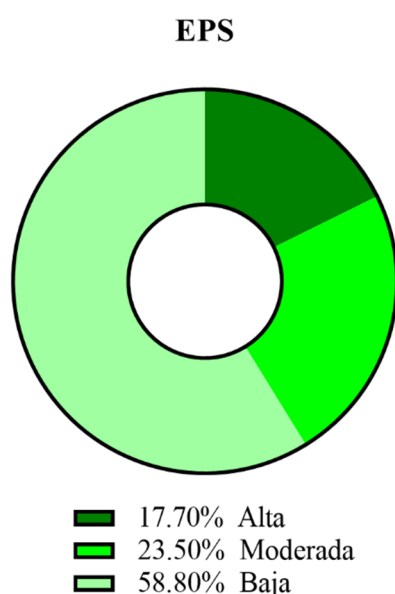


Figura 17: Clasificación de los aislamientos de *Pseudomonas* según su capacidad de producción de exopolisacáridos (EPS) en medio M63 glucosa 0.2 % y casaminoácidos 0.5 %. Tomando como 100 % al mayor valor de producción de EPS observado (P7), clasificamos a los aislamientos en tres grupos: Alta (producción superior al 55 %), Moderada (entre 55 y 25 %) y Baja producción (inferior al 25 %). Dentro de los 17 aislamientos autóctonos de *Pseudomonas* estudiados, el 41 % posee la mejor *performance* con alta y moderada capacidad de producción de EPS.

En cuanto a los aislamientos que produjeron los mayores rendimientos de EPS, encontramos que el 23.5 % mostró la mejor *performance* en adhesión al PE (4 de 17 aislamientos: P2, P3, P12 y P15) mientras que el 17.5 % restante lo hizo en forma reducida (3 de 17 aislamientos: P7, P5, P8). Mediante el análisis de los coeficientes de correlación de *Pearson* y *Spearman* corroboramos que no hubo una correlación estadísticamente significativa entre formación de biofilm sobre ambos soportes ensayados y producción de EPS en los aislamientos de *Pseudomonas*.

B-Agregación celular en *Pseudomonas spp.*

Se calculó el porcentaje de autoagregación de cada aislamiento de *Pseudomonas* mediante el monitoreo del tiempo en el que se produce la sedimentación de un cultivo líquido, crecido durante 17 horas bajo agitación. Luego de 4 hs de reposo, observamos que la cepa de referencia *Pseudomonas fluorescens* P1R y el aislamiento de *Pseudomonas asplenii* P13 no fueron capaces de sedimentar (porcentaje inferior al 1 %, N: nula) mientras que la mayoría de los aislamientos (16 de 17) autoagregaron con variable capacidad en las mismas condiciones. Dentro de los aislamientos que sedimentaron, el 53 % manifestó baja capacidad (grupo B: menos del 25 % de autoagregación; P4, P9, P10, P11, P14, P15, P16, P17, P18), el 23 % sedimentó en forma moderada (grupo M, entre el 55 y 25 %; P2, P5, P6, P12) y el 18 % con alta capacidad de autoagregación (grupo A, mayor al 55 %; P3, P7, P8) (Figura 18, tabla 8).

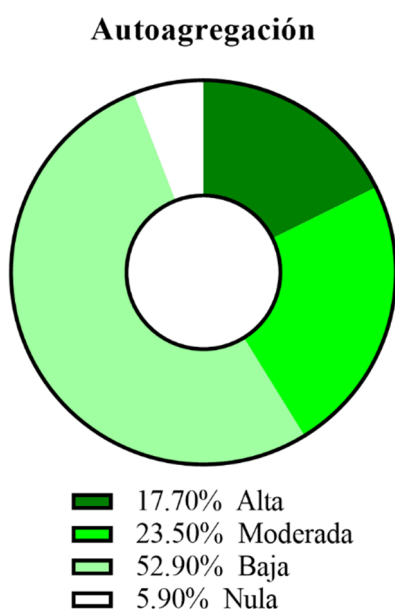


Figura 18: Clasificación de los aislamientos de *Pseudomonas* según su porcentaje de autoagregación en medio M63 glucosa 0.2 % y casaminoácidos 0.5 %. Clasificamos a los aislamientos en cuatro grupos: Alta (porcentaje de autoagregación superior al 55 %), Moderada (entre 55 y 25 %), Baja (inferior al 25 %) y Nula autoagregación (porcentaje inferior al 1 %). Dentro de los 17 aislamientos autóctonos de *Pseudomonas* estudiados, el 41 % posee la mejor *performance* con alto y moderado porcentaje de autoagregación.

Si analizamos los aislamientos de mayor capacidad de sedimentación, es decir, los que mostraron la mejor *performance* de autoagregación (grupos M y A) observamos que 6 de los 7 presentaron muy buena producción de EPS (P2, P3, P5, P7, P8 y P12) mientras que, los que sedimentaron con bajo porcentaje (grupo B, 9 de 10 aislamientos) mostraron baja producción de EPS. En este sentido, encontramos una correlación positiva moderada entre producción de EPS y autoagregación en los aislamientos de *Pseudomonas* ($r = 0.54$, $\alpha 0.05$, $p = 0.0216$; número de pares XY = 18).

El análisis de los resultados mediante los coeficientes de correlación de *Pearson* (r) y *Spearman* (r_s) mostró que no existe correlación estadísticamente significativa entre formación de biofilm sobre ambos soportes ensayados y agregación celular en los aislamientos de *Pseudomonas spp.*

C-Motilidad flagelar en *Pseudomonas spp.*

Se evaluó la motilidad dependiente de flagelo en los aislamientos de *Pseudomonas spp.* cuantificando la capacidad de “nadar” o *swimming* y de desplazarse en bloque ó *swarming* de las bacterias en medio de cultivo M63 con glucosa 0.2 % suplementado con casaminoácidos 0.5 % con agar semisólido 0.3 % (*swimming*) y 0.5 % (*swarming*). En ambos ensayos se midió el diámetro del halo de migración concéntrico a la zona de inoculación de cada cepa a testear (tabla 8). La máxima motilidad de tipo *swimming* y *swarming* correspondió a la cepa de referencia P1R y los aislamientos P3 y P12, que alcanzaron el límite de migración correspondiente al diámetro de la placa de petri de 8,5 cm (tabla 8 y figura 13). Por lo tanto, se definió este valor como 100 % del desplazamiento para *swimming* y *swarming*. De esta forma, los desplazamientos mayores de 55 % corresponden a alta motilidad (grupo A: mayor a 4,7 cm), entre 55 y 25 % a moderada (grupo M: entre 4,7 y 2,1 cm), menores de 25 % a baja (grupo B: menor a 2,1 cm) y a nula motilidad cuando fue inferior al 5 % (grupo N: menor a 0.4 cm) para cada tipo de migración dependiente de flagelo. Del análisis de los resultados observamos que todos los aislamientos manifestaron motilidad tipo *swimming* en las condiciones evaluadas, siendo un 59 % los de mejor *performance* (grupo A *swimming*: P3, P12; grupo M *swimming*: P2, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P11) frente al 41 % de aislamientos con menor desempeño (grupo B *swimming*: P10, P13, P14, P15, P16, P17, P18) (Figuras 19, 20 y tabla 8).

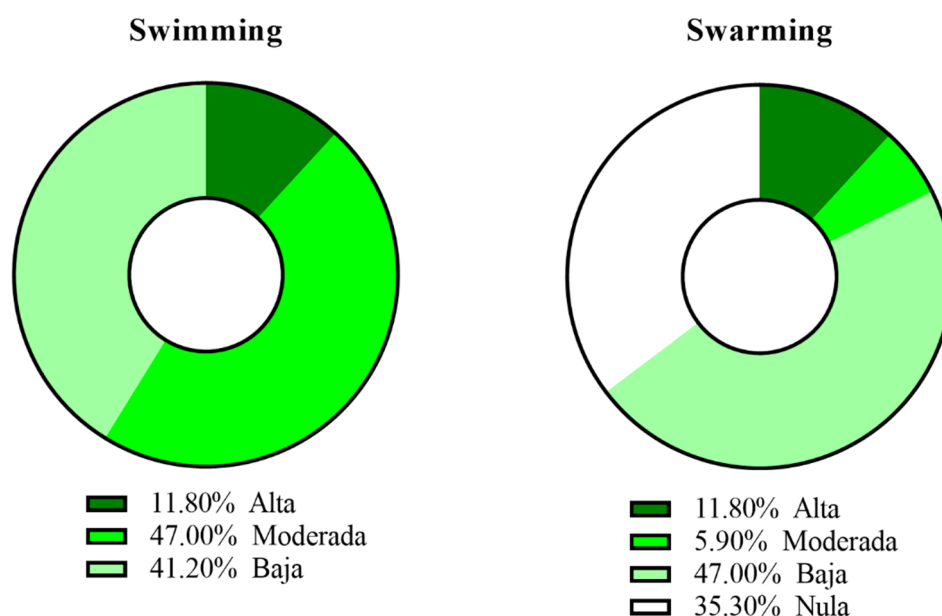


Figura 19: Clasificación de los aislamientos de *Pseudomonas* según su motilidad flagelar en medio M63 glucosa 0.2 % y casaminoácidos 0.5 % suplementado con casaminoácidos 0.5 % con agar semisólido 0.3 % (*swimming*) y 0.5 % (*swarming*). Tomando como 100 % al mayor valor de desplazamiento observado (P1R), clasificamos a los aislamientos en cuatro grupos: Alta (porcentaje de migración superior al 55 %), Moderada (entre 55 y 25 %), Baja (inferior al 25 %) y Nula capacidad de migración (porcentaje inferior al 5 %). Dentro de los 17 aislamientos autóctonos de *Pseudomonas* estudiados, el 59 % y el 18 % posee la mejor *performance* con alta y moderada motilidad de tipo *swimming* y *swarming* respectivamente.

En cuanto al *swarming*, el 65 % de los aislamientos manifestaron este tipo de motilidad siendo el 47 % de baja capacidad y el 18 % entre moderada y alta (grupos A, M y B de *swarming*: grupo A: P3, P12; grupo M: P10; grupo B: P2, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P11), mientras que los restantes fueron incapaces de desplazarse mediante *swarming* en las condiciones estudiadas (35 %) (grupo N de *swarming*: P13, P14, P15, P16, P17, P18, tabla 8) (Figuras 19 y 20).

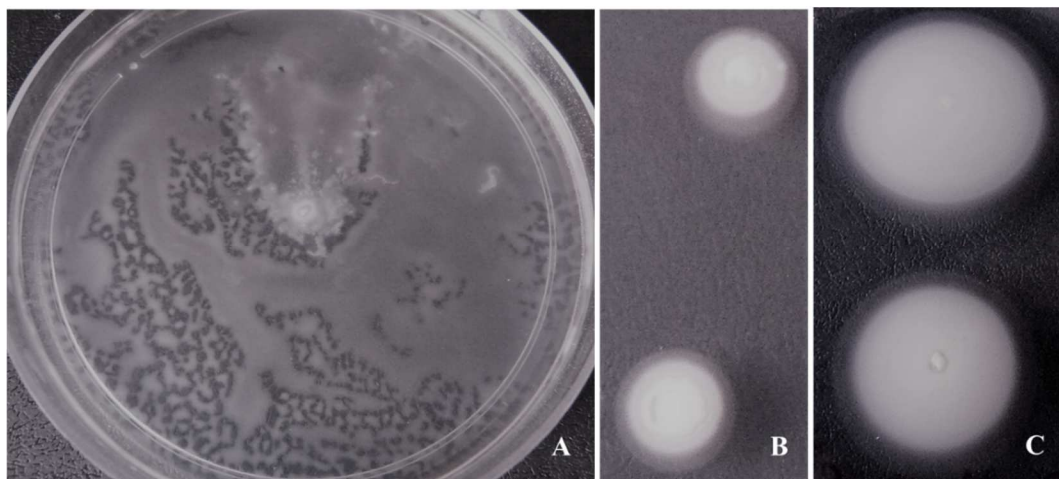


Figura 20: Motilidad *swarming* (agar 0.5 %): en la foto A se muestra la cepa de referencia P1R con proyecciones dendríticas que abarcan la totalidad de la placa de Petri; la foto B muestra una placa de las cepas P6 (arriba) y P7 (abajo) de *swarming* uniforme. Motilidad *swimming* (en agar 0.3 %): en la foto C se muestran las cepas P2 (arriba) y P5 (abajo).

Mediante el análisis del coeficiente de *Pearson* (r) encontramos que existe una fuerte correlación entre motilidad *swimming* y *swarming* ($r = 0.86$, $\alpha 0.05$, $p < 0.0001$; número de pares XY = 18), sugiriendo que ambos tipos de motilidad estarían limitados por las condiciones nutricionales de ensayo.

Teniendo en cuenta el tipo de motilidad y la producción de EPS, podemos destacar que dentro de los aislamientos que se movilizaron mediante *swimming* con mejor *performance* (10 de 17 aislamientos, grupos A y M) encontramos 6 de ellos (60 %) con los mejores rendimientos de producción de polisacáridos extracelulares (P3, P12, P2, P5, P7 y P8, tabla 8). Entre los que mostraron *swimming* deficiente (7 de 17 aislamientos), observamos que 6 de ellos (86 %) fueron también de baja producción de EPS (P10, P13, P14, P16, P17, P18). Sin embargo, no encontramos correlaciones estadísticamente significativas entre *swimming* y producción de EPSs.

Por otro lado, observamos que dentro del grupo de aislamientos con nula capacidad para desplazarse mediante *swarming* (grupo N), 5 de un total de 6 aislamientos (83 %) produjeron bajas cantidades de EPS (P13, P14, P16, P17, P18). Tampoco encontramos correlaciones estadísticamente significativas entre *swarming* y producción de EPSs.

En cuanto a la relación de la motilidad flagelar con autoagregación celular observamos una correlación de *Spearman* moderada con respecto al *swarming* ($r_s = 0.51$, $\alpha 0.05$, $p = 0.0292$; número de pares XY = 18).

Finalmente, con relación a la formación de biofilm, notamos que todos los aislamientos que presentaron bajo *swimming* mostraron mayor capacidad de formar biofilm sobre PE

(grupos A y M de adhesión PE y grupo B *swimming*) (P10, P13, P14, P15, P16, P17, P18), mientras que entre los de mayor *swimming* predominaron los que formaron menos biofilm sobre PE (grupos A y M de *swimming* y grupo B de adhesión al PE: P5, P6, P7, P8, P9, P11). Sin embargo, no encontramos correlaciones estadísticamente significativas entre adhesión a PE y *swimming*. En cuanto a la motilidad *swarming* en relación con el soporte poliestireno, encontramos una correlación positiva moderada ($r = 0.53$, $\alpha 0.05$, $p = 0.024$, número de pares XY = 18).

Cuando analizamos la relación entre adhesión a raíz y motilidad *swimming* hallamos una correlación lineal positiva débil a moderada ($r = 0.48$, $\alpha 0.05$, $p = 0.046$) y con *swarming* una correlación lineal positiva moderada ($r = 0.57$, $\alpha 0.05$, $p = 0.0014$) (Número de pares XY = 18).

D-Producción de β (1,4) -D glucopiranosidos en *Pseudomonas* spp.

La celulosa es un homopolisacárido lineal formado por residuos de D-glucosa unidas por enlaces β -1,4 que es producido y secretado por numerosos microorganismos del suelo. Con el fin de valorar la producción de celulosa, empleamos el ensayo de tinción con rojo Congo (Ausmees et al., 1999; Spiers et al., 2003). La intensidad de la tinción observada en las colonias cultivadas en un medio adicionado con rojo congo al 0.001 %, evidencia la presencia de β (1,4) -D glucopiranosidos, como la celulosa. Por lo tanto, cuando no se detectó coloración (macrocolonias blanquecinas), se indicó como negativo (-) para la producción de celulosa y en los casos en que se detectó coloración rosada ó roja se asignó positiva (+). En la tabla 8 se muestran los resultados correspondientes a tres experimentos independientes de al menos tres réplicas cada uno para cada aislamiento. A excepción del aislamiento P14, que no presentó coloración con rojo congo (-), todos los aislamientos de *Pseudomonas* estudiados fueron capaces de producir β (1,4) -D glucopiranosidos detectables con esta tinción, incluyendo la cepa de referencia P1R. La diferencia de tonalidades sugiere un rango variable de producción de polisacáridos con uniones β -1,4 D-glucosídicas entre las *Pseudomonas* analizadas. En el caso de P10 y P12, dos *P. chlororaphis* productoras de fenazinas (Agarás et al., 2015), observamos además una pigmentación naranja característica de estos metabolitos secundarios (figura 21).

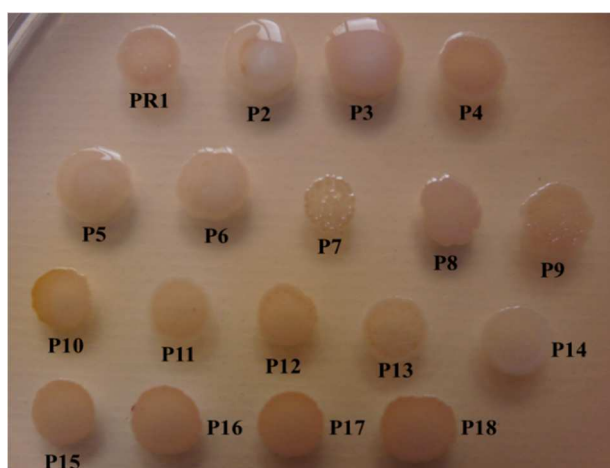


Figura 21: Producción de β (1,4) -D glucopiranosidos en los aislamientos de *Pseudomonas* spp. En la imagen se muestran las macrocolonias formadas por los aislamientos en medio agar Rojo Congo 0.001 %, M63 suplementado con glucosa 0.2 %, casaminoácidos 0.5 %. El aislamiento P14 fue el único que mostró coloración blanquecina (negativo para producción de celulosa).

Estos resultados sugieren que los aislamientos pertenecientes a *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas protegens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas asplenii* y *Pseudomonas gessardii* producirían algún polisacárido del tipo β (1,4) -D glucopiranosidos, como la celulosa, en las condiciones de ensayo (tabla 8).

E-Producción de moléculas señal de QS en *Pseudomonas*

La producción de moléculas autoinductoras que sensan la densidad poblacional (*Quorum Sensing*) fue determinada en forma cualitativa mediante el empleo de una cepa biosensora de señales del tipo acilhomoserinalactonas (HSL). La presencia de estas señales en los sobrenadantes libres de células provenientes de aislamientos de *Pseudomonas* se evidenció mediante el uso de un biosensor con el cual se detecta la producción de un pigmento violeta (violaceína) alrededor y sobre un disco de papel de filtro dónde se inoculó el sobrenadante de un cultivo del aislamiento en estudio. La síntesis de violaceína es dependiente de HSL y se induce en la cepa biosensora sólo en presencia de señal exógena específica ya que esta cepa no es capaz de producir el autoinductor endógeno. Se utilizaron como biosensoras, las cepas de *Chromobacterium violaceum* CV026 y Vir07, que permiten la detección de acilhomoserinalactonas de cadena entre 4 y 8 carbonos (corta) ó de cadena entre 10 y 16 carbonos (larga) respectivamente (Mc. Clean *et al.*, 1997; Morohoshi *et al.*, 2008). Se utilizaron sobrenadantes de cultivos de 24 horas provenientes de los aislamientos. Se indica con el signo (+) la detección y (-) la ausencia del pigmento violeta (Tabla 8, figura 22).

Observamos que, tanto en la cepa de referencia PR1, como en la mayoría de los aislamientos de *Pseudomonas* (76 %), no fue posible detectar moléculas señal del tipo HSL en el sobrenadante de cultivos con la metodología empleada (13 de 17 aislamientos, tabla 8). Por otra parte, en los aislamientos P4, P10 y P12 se verificó la producción de HSL de cadena corta (detectables con el biosensor CV026) mientras que en P10, P12, P13 y P14 se detectaron HSLs de cadena larga (con el biosensor VIR07). Sólo en los aislamientos P10 y P12 pertenecientes a *Pseudomonas chlororaphis* fue posible detectar ambos tipos de HSLs.

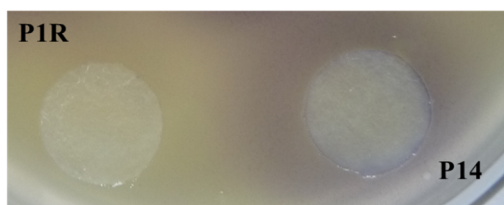


Figura 22: En la foto se muestran ejemplos de moléculas señal detectadas mediante biosensores. El sobrenadante de un cultivo de *Pseudomonas* fue inoculado sobre discos de papel de filtro e incubado sobre un césped de la cepa biosensora *Chromobacterium violaceum* VIR07. La cepa de referencia P1R no indujo la producción de violaceína en el biosensor (-) mientras que el aislamiento P14 fue capaz de inducir la expresión del pigmento sugiriendo la producción de HSLs de cadena larga (+)

2.2 Evaluación de características asociadas a la superficie y componentes extracelulares en *Burkholderia* spp.

Como mencionamos anteriormente en la sección 1.2.b, se seleccionaron 10 aislamientos de *Burkholderia* spp. con diferentes capacidades de adhesión, sobre los

cuales evaluamos los diferentes componentes extracelulares y de superficie en la condición y medio de cultivo que favoreció la adhesión al PE en cada caso: en medio M63 suplementado con glucosa 0.2 %, y CAA 0.5 % para B1, B5, B7, B8, B15 y B16, en medio M9 glucosa 0.4 % para los aislamientos B2, B10 y B14 y en TSB al aislamiento B12 (tablas 7, figura 11). Aquellos aislamientos que no formaron biofilm en ninguno de los medios utilizados en este estudio, fueron evaluados en el medio M63 con glucosa 0.2 % y casaminoácidos 0.5 %. La tabla 9 muestra los resultados obtenidos sobre tres experimentos de tres réplicas cada uno en los 10 aislamientos de *Burkholderia* spp. ensayados.

I	EPS ug/ml	% A	Motilidad (cm)		Rojo Congo	Quorum Sensing	
			Swimming	Swarming		HSL C4/8	HSL C10/16
B1	1.11 ± 0.12	< 1	1.70 ± 0	< 0.4	+	-	+
B2	0.66 ± 0.02	< 1	< 0.4	< 0.4	+	-	-
B5	0.53 ± 0.11	< 1	1.37 ± 0.06	< 0.4	+	-	+
B7	0.48 ± 0.04	3.34 ± 0.90	2.55 ± 0.21	< 0.4	+	-	-
B8	0.76 ± 0.05	2.45 ± 1.10	0.50 ± 0	< 0.4	+	-	+
B10	0.55 ± 0.03	< 1	< 0.4	< 0.4	+	-	+
B12	0.65 ± 0.11	6.64 ± 0.23	8.5	2.95 ± 0.07	-	+	+
B14	0.56 ± 0.06	< 1	< 0.4	< 0.4	+	-	-
B15	6.63 ± 0.50	< 1	2.0 ± 0	< 0.4	-	-	+
B16	8.19 ± 1.8	< 1	2.25 ± 0.07	< 0.4	-	-	+

Tabla 9: Evaluación de las características asociadas a componentes de superficie y extracelulares de los aislamientos autóctonos de *Burkholderia* spp en medios seleccionados como propicios para formación de biofilm. En la tabla se muestran las características valoradas en los diferentes aislamientos autóctonos en cuanto a producción de polisacáridos extracelulares (EPS), agregación celular (% A), motilidad mediada por flagelo (diámetro del desplazamiento en medio agar 0.3 % para el *swimming* ó agar 0.5 % para el *swarming*), producción de β - 1,4 glucósidos como la celulosa (Rojo Congo) y producción de homoserina lactonas señal de Quorum sensing (HSL), de cadena corta (HSL C4/6) y larga (HSL C10/16). Cada característica fue ensayada en un medio de cultivo seleccionado según mejor desarrollo de biomasa adherida para cada aislamiento referenciados en tablas 4 y 7: B1, B5, B7, B8, B15 y B16 fueron ensayados con M63 suplementado con glucosa 0.2 %, y CAA 0.5 %, B2, B10 y B14 en M9 glucosa 0.4 % y el aislamiento B12 fue ensayado en TSB. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes de al menos tres réplicas cada uno. I, identificación del aislamiento.

A-Producción de Exopolisacáridos en *Burkholderia* spp.

Se cuantificó la producción de exopolisacáridos (EPS) en los 10 aislamientos seleccionados de *Burkholderia* spp. a partir de un sobrenadante de cultivo de 48 horas en los medios que propiciaron el mejor desarrollo de biofilm para cada caso, mencionados al inicio de la sección. Se observó un amplio rango de producción de exopolisacáridos entre los diferentes aislamientos en las condiciones nutricionales estudiadas, que comprenden entre $0,48 \pm 0,04$ y $8,19 \pm 1,8$ μg de EPS/ml, para B7 y B16 respectivamente,

cultivados en medio M63 suplementado con glucosa 0.2 %, y CAA 0.5 %. Los aislamientos que se destacaron como mayores productores de EPS fueron B15 y B16 ($6.63 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$ y $8.19 \pm 1.8 \mu\text{g/ml}$ respectivamente) caracterizados como *Paraburkholderia terricola*. El resto de los aislamientos produjeron entre 1,11 y $0.48 \mu\text{g EPS/ml}$ de cultivo.

Si consideramos como 100 % al valor máximo correspondiente al aislamiento B16 ($8,19 \mu\text{g EPS/ml}$ de cultivo) podemos clasificar la producción de EPS de los aislamientos en: grupo A (alta producción, mayor al 55 %) cuando supera los $4,5 \mu\text{g/ml}$, grupo M (moderada, entre 55 y 25 %) entre $4,5$ y $2,05 \mu\text{g EPS/ml}$ y grupo B (baja, menor al 25 %) si es inferior $2,05 \mu\text{g EPS/ml}$. Así, B15 y B16 se ubican en el grupo (A) de alta producción y el resto de los aislamientos (80 %) abarca el grupo de baja producción de EPS (B), (Figura 23, tabla 9).

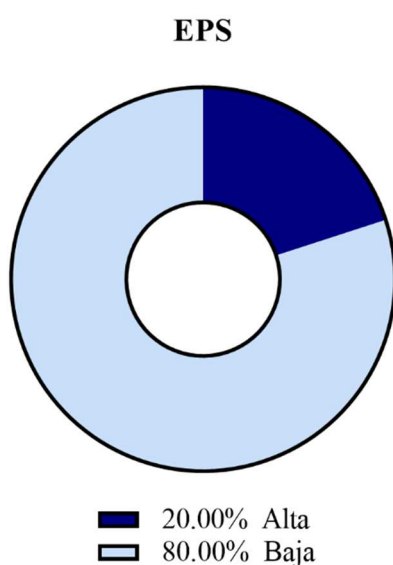


Figura 23: Clasificación de los aislamientos de *Burkholderia* según su capacidad de producción de exopolisacáridos (EPS) en el mejor medio para el desarrollo de biofilm. Tomando como 100 % al mayor valor de producción de EPS observado (B16), clasificamos a los aislamientos en tres grupos: Alta (producción superior al 55 %), Moderada (entre 55 y 25 %) y Baja producción (inferior al 25 %). Dentro de los 10 aislamientos autóctonos de *Burkholderia* estudiados, el 20 % posee la mejor *performance* con alta capacidad de producción de EPS.

Notamos que un alto nivel de producción de polisacáridos no se asocia con incremento en la adhesión y formación de biofilm en el grupo de aislamientos seleccionados (no encontramos correlación estadísticamente significativa).

B-Agregación celular en *Burkholderia spp.*

Al igual que para *Pseudomonas*, se calculó el porcentaje de autoagregación de los 10 aislamientos seleccionados de *Burkholderia* mediante el monitoreo del tiempo en el que se produce la sedimentación de un cultivo líquido en reposo durante 4 horas. Observamos que solo tres aislamientos sedimentaron luego de 4 horas de reposo, aunque en porcentajes inferiores al 7% (B12 = $6.64 \pm 0.23 \%$, B7 = $3.35 \pm 0.90 \%$ y B8 = $2.45 \pm 1.10 \%$) agrupando la totalidad de los aislamientos como de baja capacidad de autoagregación (B) (Figura 24, tabla 9).

Autoagregación

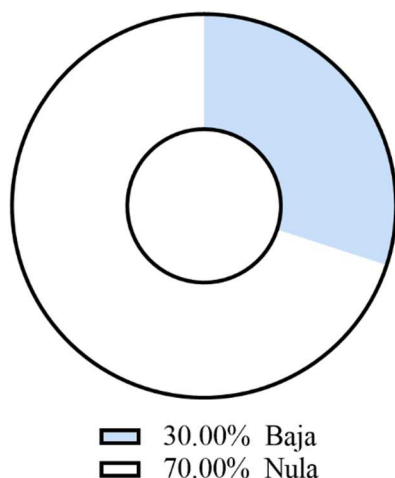


Figura 24: Clasificación de los aislamientos de *Burkholderia* según su porcentaje de autoagregación en el mejor medio para el desarrollo de biofilm. Clasificamos a los aislamientos en dos grupos: Baja (inferior al 25 %) y Nula autoagregación (porcentaje inferior al 1 %). Dentro de los 10 aislamientos autóctonos de *Burkholderia* estudiados, sólo el 30 % sedimentó bajo las condiciones de ensayo con baja *performance*.

C-Motilidad flagelar en *Burkholderia* spp.

Se evaluó la motilidad dependiente de flagelo en los aislamientos de *Burkholderia* spp. al igual que en *Pseudomonas*, cuantificando la capacidad de natación en medio semisólido con agar al 0.3 % (*swimming*) y el desplazamiento denominado *swarming* en medio agar al 0.5 %. En ambos ensayos se midió el diámetro del halo de migración concéntrico a la zona de inoculación de la cepa a testear. El aislamiento B12 fue el único que mostró motilidad del tipo *swarming* (2.95 ± 0.07 cm) y el que manifestó el mayor desplazamiento *swimming* del grupo alcanzando el límite de migración correspondiente al diámetro de la placa de petri de 8.5 cm (tabla 9). Por lo tanto, se definió este valor como 100 % del desplazamiento para *swimming* y se clasificaron los desplazamientos mayores al 55 % de este valor en el grupo (A), de alta motilidad (superior al 55 %: mayor a 4.7 cm), el (M) de moderada (entre 55 y 25 %: es decir 4.7 y 2.1 cm), (B) de baja (menor al 25 %: inferior a 2,1 cm) y (N) de nula migración (incapaces de desplazarse ó desplazamiento inferior a 0.43 cm, 0.5 %). Así, clasificamos con alta motilidad *swimming* (A) al aislamiento B12, en el grupo (M) a los aislamientos B7 y B16, en el grupo (B) de baja motilidad, a B1, B5, 15 y B8, mientras que los restantes aislamientos fueron incapaces de migrar en las condiciones estudiadas (grupo (N): B2, B10 y B14) (Tabla 9, figura 25).

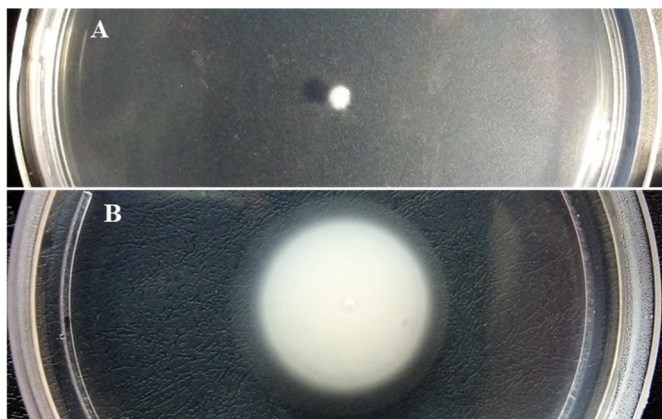


Figura 25: Evaluación del *swimming* en las condiciones de formación de biofilm sobre soporte abiótico. En la fotografía A se muestra a modo de ejemplo, el *swimming* negativo del aislamiento B1 en medio M9 glucosa 0.4 % y en la foto B *swimming* positivo del aislamiento B7 en medio M63 glucosa 0.2 %, CAA 0.5 %.

Del análisis de los resultados observamos que el 70 % de los aislamientos presentaron motilidad tipo *swimming* en las condiciones mencionadas, siendo un 30 % los de mejor *performance* (grupo (A) *swimming*: B12; grupo (M) *swimming*: B7 y B16; 3 de 10 aislamientos) (figura 26, tabla 9).

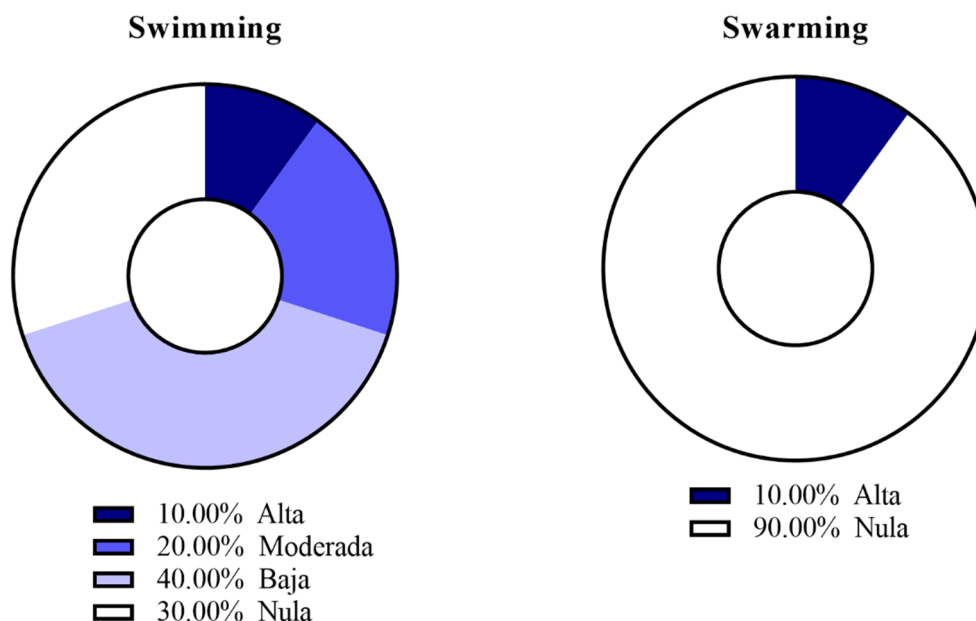


Figura 26: Clasificación de los aislamientos de *Burkholderia* según su motilidad flagelar en el medio de cultivo para el mejor desarrollo de biofilm, con agar semisólido 0.3 % (*swimming*) y 0.5 % (*swarming*). Tomando como 100 % al mayor valor de desplazamiento observado para el *swimming* (B12), clasificamos a los aislamientos en cuatro grupos: Alta (porcentaje de migración superior al 55 %), Moderada (entre 55 y 25 %), Baja (inferior al 25 %) y Nula capacidad de migración (porcentaje inferior al 5 %). Dentro de los 10 aislamientos autóctonos de *Burkholderia* estudiados solo B12 se desplazó mediante *swarming*, mientras que un 30 % migró mediante *swimming* con la mejor *performance* del grupo (alta y moderada motilidad).

Estos ensayos mostraron que los aislamientos de *Burkholderia* presentan como característica predominante la capacidad de *swimming* frente a la de *swarming* en las condiciones ensayadas y en el medio de cultivo óptimo para el desarrollo de biofilm en cada caso.

Teniendo en cuenta motilidad y autoagregación celular, encontramos una correlación lineal positiva fuerte con el desplazamiento en *swarming* ($r = 0.84$, $\alpha 0.05$, $p = 0.0023$; número de pares XY = 10) y en *swimming* ($r = 0.83$, $\alpha 0.05$, $p = 0.0027$; número de pares XY = 10). No encontramos correlaciones estadísticamente significativas entre formación de biofilm y fenotipos asociados.

Dentro de este género, al igual que en *Pseudomonas*, hubo una fuerte correlación entre motilidad *swimming* y *swarming* ($r = 0.92$, $\alpha 0.05$, $p = 0.0002$; número de pares XY = 10). Este resultado sugiere que ambos tipos de motilidad varían en forma conjunta en la condición nutricional estudiada.

D-Producción de (1-4) β -D glucopiranosidos (celulosa) en *Burkholderia* spp.

Evaluamos la producción de (1, 4) β -D glucopiranosidos en los aislamientos de *Burkholderia* mediante la tinción con rojo congo al 0.001 % en placas de cultivos de los medios indicados indicados de la misma forma que se realizó en las *Pseudomonas*. Una coloración de las macrocolonias rosada ó roja se asignó como (+) para la producción de (1, 4) β -D glucopiranosidos, mientras que cuando no se observó coloración (blanca ó blanquecina), se indicó como (-) (tabla 9).

Observamos que la mayoría de los aislamientos (7 de 10) produjeron (1-4) β -D glucopiranosidos detectables en las condiciones ensayadas, mientras que las cepas B12, B15 y B16 fueron negativas (blanquecinas), (figura 27). Los aislamientos que resultaron negativos para esta tinción pertenecen a *Paraburkholderia terricola* (B15 y B16) y *Burkholderia ambifaria* (B12).

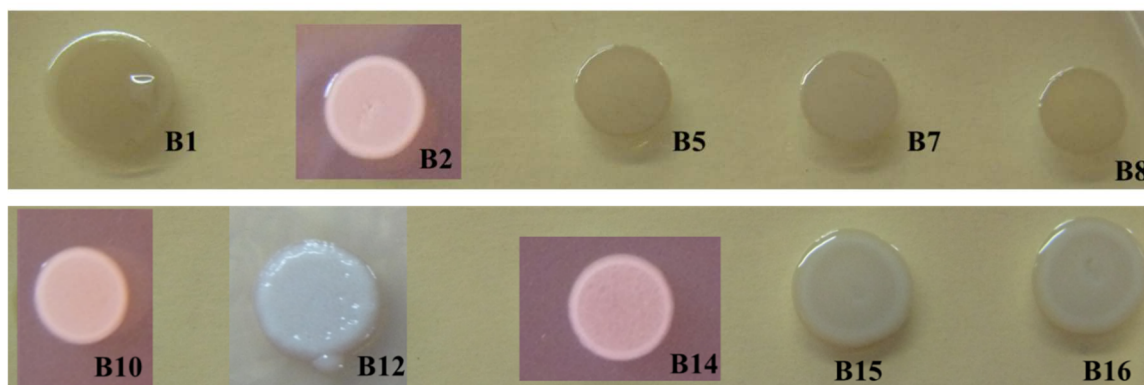


Figura 27: Aspecto de las macrocolonias de los aislamientos de *Burkholderia* en el medio de cultivo seleccionado para cada uno referenciados en tablas 4 y 7. Brevemente, los aislamientos B1, B5, B7, B8, B15 y B16 fueron ensayados en M63 suplementado con glucosa 0.2 %, y CAA 0.5 %, B2, B10 y B14 en M9 glucosa 0.4 % y el aislamiento B12 fue ensayado en TSB. Todos los medios fueron suplementados con Rojo Congo 0.001 %.

E-Producción de moléculas señal de QS en *Burkholderia*

Se determinó la producción de moléculas autoinducidas que sensan la densidad poblacional (*Quorum Sensing*) en forma cualitativa mediante el empleo de cepas biosensoras de acilhomoserinalactonas (HSL), al igual que con los aislamientos de *Pseudomonas*. Como control positivo de estos bioensayos se emplearon sobrenadantes de cultivos de la cepa *Burkholderia vietnamiensis*, miembro del complejo *Burkholderia cepacia* que comúnmente producen acil-homoserina lactonas. *B. vietnamiensis* es capaz de producir hexanoil-HSL (cadena de 6 C), octanoil-HSL (cadena de 8C) y decanoil-HSL (cadena de 10 C) (Conway and Greenberg, 2002; Vial *et al.*, 2007) por lo cual fue capaz de inducir la producción de violaceína en ambos biosensores (*C. violaceum* CV026 y VIR07) con la metodología y medios de cultivo utilizados.

La presencia de estas señales en los sobrenadantes libres de células provenientes de cultivos de 48 horas de los aislamientos de *Burkholderia* en los medios de cultivo seleccionados, se evidenció mediante la inducción de la producción de un pigmento

violeta en la cepa biosensora. En la tabla 9 se indica como positivo (+) la presencia y como negativo (-) la ausencia del pigmento violeta (figura 28).

En la mayoría de los aislamientos de *Burkholderia* estudiados (9 de 10) (B1, B2, B5, B7, B8, B10, B14, B15, B16), no fue posible detectar moléculas señal del tipo HSL de cadena corta en los sobrenadantes de cultivo utilizando el biosensor CV026 en las condiciones ensayadas, siendo B12 el único capaz de inducir la producción del pigmento (+) en esta cepa biosensora. En cambio, en un 70 % de los aislamientos (7 de 10; B1, B5, B8, B10, B12, B15 y B16) fue posible detectar la producción de moléculas señal del tipo HSL de cadena larga en los sobrenadantes de cultivos utilizando el biosensor Vir07 en las condiciones ensayadas. Así, estos estudios permitieron determinar que *Paraburkholderia caledonica* (B1 y B10), *Paraburkholderia tuberum* (B5 y B8), *Burkholderia ambifaria* (B12) y *Paraburkholderia terricola* (B15 y B16), producen HSLs de cadena carbonada entre 10 y 16 C.

Por otra parte, en los aislamientos B2, B7 y B14 caracterizados respectivamente como *Paraburkholderia caledónica*, *Paraburkholderia atlántica* y *Paraburkholderia graminis* no fue posible detectar ninguna de las moléculas señal con ambos biosensores en las condiciones de ensayo (tabla 9).

El aislamiento B12 caracterizado como *Burkholderia ambifaria* fue el único capaz de producir ambos tipos de HSL (de cadena carbonada corta y larga).

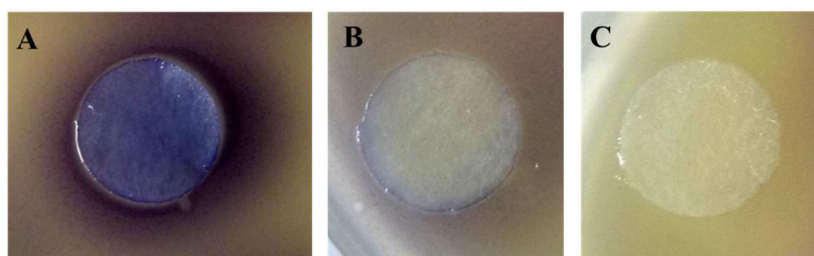


Figura 28: En la foto se muestran discos de papel de filtro que fueron embebidos con sobrenadantes de cultivo de las cepas de *Burkholderia* e incubados sobre la cepa sensora *Chromobacterium violaceum* CV026 (biosensor de HSL de cadena corta). A: Control positivo (sobrenadante de *Burkholderia vietnamensis* GV cultivada en medio M9); B: Aislamiento B12 (+), en medio TSB y C: Aislamiento B14 (-), en medio M9.

3. Evaluación de la respuesta adaptativa de microorganismos del suelo a condiciones ambientales adversas: tolerancia a sustancias tóxicas y formación de biofilm.

En esta sección se evaluó la capacidad de adaptación de los aislamientos del suelo a factores adversos del medio ambiente, en particular resultó de interés determinar la sensibilidad a sustancias tóxicas presentes en el suelo y el agua, como el arsénico (As III) y la alta concentración de sales que genera estrés salino en plantas. El arsénico está presente en forma natural en suelos de nuestro país y puede alcanzar niveles altos en las aguas subterráneas resultando altamente tóxico por incorporarse fácilmente en la cadena alimenticia. Es importante destacar la problemática que implica la presencia natural de arsénico en aguas y suelos de la llanura Chaco-Pampeana de nuestro país, con la consecuente toxicidad sobre la biota local. El valor más extremo medido, fue de 14969 µg/ L (15 mg/L= 0.1155 mM) en la provincia de Santiago del Estero, mientras que el

límite de As (III) permitido en aguas de consumo en Argentina es de 0,05 mg/L (equivalente a 3.9×10^{-4} mM). Los aislamientos autóctonos pertenecientes a *Pseudomonas* y *Burkholderia* spp. que estudiamos en esta Tesis provienen de dicha región de las provincias de Córdoba y Buenos Aires.

Por otro lado, la salinidad del suelo altera la asimilación de nutrientes en las plantas y la actividad microbiana, afectando así la productividad agropecuaria. La salinidad del suelo se mide a través de la conductividad eléctrica (CE) (tabla 10). En suelos moderadamente salinos el rendimiento de casi todos los cultivos se ve afectado, en el caso del trigo, una CE de 13 dS/m causa una disminución de la productividad en un 50 % (Castellanos, 2004). La salinidad del suelo depende de factores naturales, aunque el mal manejo de la agricultura es la principal causa de la elevada salinidad.

Rango de CE (dS/m)	Rango de concentración (mM)	Tipo de suelo
< 2	< 22	No salino
2 - 4	22 - 44	Ligeramente salino
4 - 8	44 - 109	Moderadamente salino
8 - 16	109 - 218	Salino
> 16	> 218	Extremadamente salinos

Tabla 10: Clasificación de los suelos a partir de la conductividad eléctrica (CE) y concentración mM.

Determinamos la capacidad de tolerancia a estos factores en los aislamientos autóctonos de *Pseudomonas* y *Burkholderia* mediante ensayos de toxicidad aguda exponiendo a los microorganismos a distintas concentraciones de arsenito de sodio (NaAsO_2) (entre 0 y 2,5 mM) y de cloruro de sodio (NaCl) (entre 0 y 750 mM) para estimar la concentración letal media (CL_{50}) por el método gráfico (Finney, 1978; Hubert, 1995, ejemplificado en la figura 29).

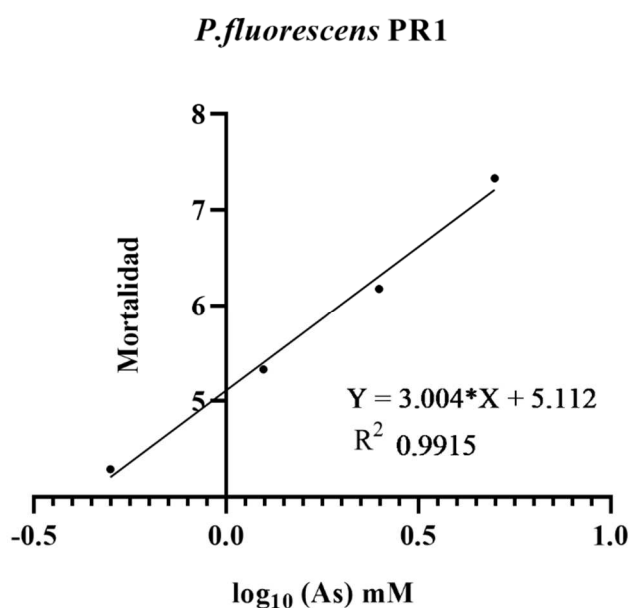


Figura 29: Mortalidad vs. concentración de Arsénico (As) en la cepa P1R. La determinación de la concentración letal 50 se realizó por el método gráfico. Para un mejor ajuste se utilizó la transformación de Probit, graficando las concentraciones en logaritmo de base 10 y los porcentajes de mortalidad en unidades Probit. La concentración letal media se calculó a partir de la ecuación de la recta obtenida. De igual forma se procedió para la determinación de la CL_{50} de NaCl para cada uno de los aislamientos.

Dicha concentración equivale a la cantidad de sustancia necesaria para provocar la muerte del 50 % de las bacterias expuestas con respecto al control, sin exposición a la sustancia a testear (ejemplificado en la figura 30). Así, cuanto menor sea la cantidad del principio activo requerida para alcanzar la CL_{50} , mayor será la toxicidad de este.

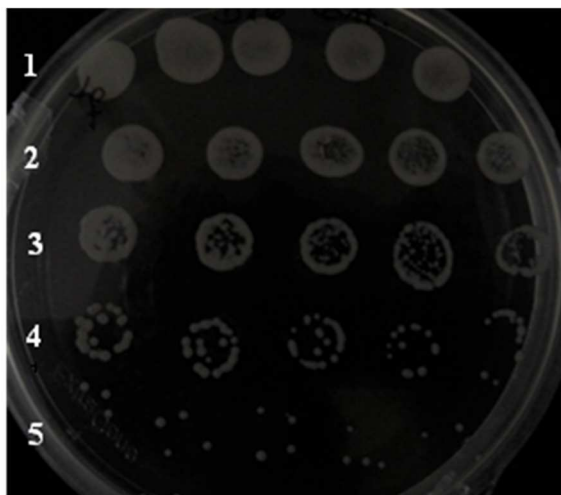


Figura 30: En la figura se muestra el recuento control del número de bacterias de la cepa B16 de *Burkholderia* spp. por el método de dilución por gota. Cada fila corresponde a 5 alícuotas de 10 μ l, de cada dilución de bacterias luego de finalizado el período de incubación en presencia del tóxico (en este caso el tóxico fue reemplazado por PBS, por tratarse del experimento control de referencia). La fila 1 corresponde a la suspensión bacteriana sin diluir, la fila 2 a la dilución 10^{-1} , la fila 3 a la dilución 10^{-2} , la fila 4 a la dilución 10^{-3} y la fila 5 corresponde a la dilución 10^{-4} .

3.1 Respuesta adaptativa a condiciones adversas en *Pseudomonas*

A-Tolerancia a arsénico en aislamientos de *Pseudomonas* spp.

Se estimó la tolerancia al arsénico exponiendo los aislamientos autóctonos de *Pseudomonas* a concentraciones crecientes de arsenito de sodio entre 0 y 2.5 mM, en PBS durante 17 hs (ON) a 28°C. El aislamiento P9 presentó la menor sensibilidad (mayor tolerancia) al tóxico (CL_{50} =1.82 mM), mientras que la cepa de referencia P1R fue 2 veces menos tolerante (CL_{50} = 0.92 mM, figura 29, tabla 11).

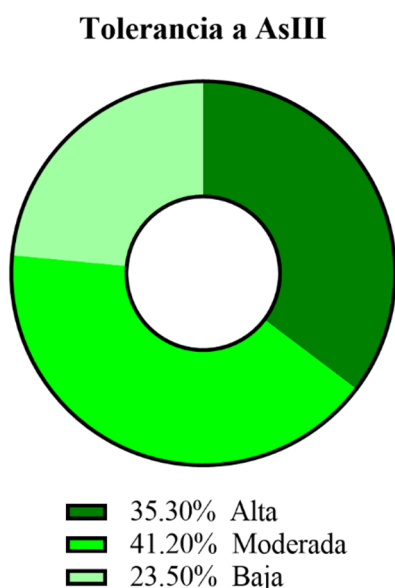


Figura 31: Clasificación de los aislamientos de *Pseudomonas* según su tolerancia a arsénico III. Tomando como 100 % al mayor valor de CL_{50} observado (P9), clasificamos a los aislamientos en tres grupos: Alta (tolerancia superior al 55 %), Moderada (entre 55 y 25 %) y Baja tolerancia a As (III) (inferior al 25 %). Dentro de los 17 aislamientos autóctonos de *Pseudomonas* estudiados el 77 % posee la mejor *performance* con alta y moderada tolerancia a arsénico III.

Teniendo en cuenta el máximo valor de la CL_{50} observado como 100 % (P9, CL_{50} =1.82 mM), clasificamos a los aislamientos dentro del grupo A, cuando superaron el 55 % (alta tolerancia, CL_{50} mayor a 1.00 mM), en el grupo M si se encuentran entre el 55 y 25 % (moderada tolerancia, CL_{50} entre 1.00 y 0.46 mM) y en el grupo B si el valor fue inferior al 25 % (baja tolerancia, CL_{50} menor a 0.46 mM).

De esta forma determinamos que la mayoría de los aislamientos presentaron muy buena *performance* en cuanto a la tolerancia al arsénico (13 de 17 aislamientos, con alta y moderada tolerancia; grupo A: P5, P6, P9, P11, P12, P13 y grupo M: P3, P4, P10, P14, P15, P16, P17). Por otra parte, los que manifestaron menor tolerancia fueron P2, P7, P8 y P18 (grupo B). En el caso de los aislamientos P2, P7 y P8, no fue determinada la CL_{50} debido a que, en la mínima concentración de arsenito de sodio empleada para los ensayos, 0.25 mM, la mortalidad fue del 100 % (Figura 31, tabla 11).

Aislamientos <i>Pseudomonas</i> spp.	CL ₅₀					
	AsIII mM	Tolerancia	Intervalo de confianza (95%)	NaCl mM	Tolerancia	Intervalo de confianza (95%)
P1R	0.92	M	(0.64 - 1.19)	105	M	(73 - 134)
P2	ND (<0,25)	B	-	157	M	(108 - 208)
P3	0.68	M	(0.50 - 1.06)	105	M	(45 - 154)
P4	0.70	M	(0.33 - 0.98)	175	M	(115 - 250)
P5	1.02	A	(0.66 - 1.42)	146	M	(80 - 211)
P6	1.02	A	(0.80 - 1.25)	155	M	(99 - 214)
P7	ND <0.25	B	-	130	M	(85 - 171)
P8	ND <0.25	B	-	131	M	(70 - 182)
P9	1.82	A	(1.39 - 2.88)	154	M	(120 - 209)
P10	0.69	M	(0.28 - 1.08)	39	B	(10 - 74)
P11	1.27	A	(0.82 - 1.76)	98	M	(83 - 109)
P12	1.09	A	(0.53 - 1.67)	149	M	(74 - 226)
P13	1.20	A	(0.76 - 1.69)	175	M	(126 - 275)
P14	0.58	M	(0.11 - 1.19)	98	M	(61 - 130)
P15	0.76	M	(0.42 - 1.08)	144	M	(123 - 164)
P16	0.78	M	(0.22 - 1.29)	382	A	(321 - 429)
P17	0.90	M	(0.26 - 1.51)	255	A	(223 - 279)
P18	0.27	B	(0.12 - 0.54)	206	M	(187 - 226)

Tabla 11: Evaluación de la tolerancia a arsénico y a la salinidad en aislamientos de *Pseudomonas*. En la tabla se muestra la CL_{50} de arsénico y NaCl para cada aislamiento con sus respectivos intervalos de confianza. La concentración letal media aguda (CL_{50}), es la cantidad de sustancia necesaria para provocar la muerte del 50 % de bacterias expuestas. Se indica ND cuando no fue posible determinar la CL_{50} con una concentración mínima de 0.25 mM de arsenito de sodio y una mortalidad correspondiente del 100 %. Los aislamientos fueron clasificados en grupo A (alta tolerancia al arsénico o alta tolerancia al cloruro de sodio según corresponda) a aquellos aislamientos que presentan valores superiores al 55 % del valor máximo obtenido, grupo M (moderada tolerancia al arsénico o al cloruro de sodio) si los valores comprenden entre el 55 y 25 % del valor máximo observado y grupo B (baja tolerancia o los que presentaron valores inferiores al 25 %). Una concentración 1 % de NaCl equivale a 170 mM.

B-Tolerancia al estrés salino en aislamientos de *Pseudomonas* spp.

Se estudió la tolerancia al estrés salino en los aislamientos autóctonos de *Pseudomonas* expuestos a concentraciones crecientes de cloruro de sodio entre 0 y 750 mM durante 17 hs (ON) a 28°C. Los resultados mostraron que P16 fue el aislamiento más tolerante ($CL_{50} = 382$ mM), por lo tanto, teniendo en cuenta este valor máximo de CL_{50} como 100 %, definimos al grupo A (alta tolerancia), cuando superaron el 55 % del máximo (CL_{50} mayor a 210 mM), M (moderada tolerancia) si se encuentran entre el 55 y 25 % del valor máximo (CL_{50} entre 210 y 95 mM) y B (baja tolerancia) inferior al 25 % (CL_{50} menor a 95 mM). De esta forma determinamos que la mayoría de los aislamientos de *Pseudomonas* estudiados presentaron muy buena *performance* en cuanto a la tolerancia al cloruro de sodio (16 de 17 aislamientos, con alta y moderada tolerancia; grupo A: P16 y P17 y grupo M: P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P11, P12, P13, P14, P15 y P18) incluyendo a la cepa PR1, mientras que sólo P10 fue de baja tolerancia (B), y por lo tanto el más sensible al estrés salino ($CL_{50} = 39$ mM) (Figura 32).

Teniendo en cuenta que la salinidad de un suelo normal, entre no salino y ligeramente salino, es menor a 44 mM (equivalente a 4 dS/m de conductividad eléctrica – CE), todos los aislamientos a excepción de P10 resultaron tolerantes a suelos entre moderadamente salinos y netamente salinos, mientras que los aislamientos rizosféricos de *P. gessardii* P16 y *P. fluorescens* P17 fueron los más tolerantes, con $CL_{50} = 382$ y 255 mM respectivamente, concentraciones encontradas en suelos extremadamente salinos (por arriba de 218 mM - con una CE equivalente a 16). En la tabla 11 se muestran las CL_{50} con sus respectivos intervalos de confianza.

Tolerancia a la salinidad

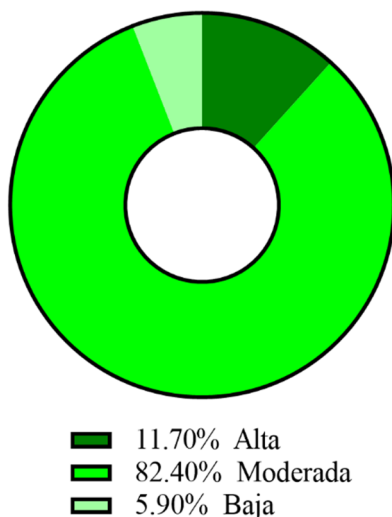


Figura 32: Clasificación de los aislamientos de *Pseudomonas* según su tolerancia a la salinidad. Tomando como 100 % al mayor valor de CL_{50} observado (P16) clasificamos a los aislamientos en tres grupos: Alta (tolerancia superior al 55 %), Moderada (entre 55 y 25 %) y Baja tolerancia al NaCl (inferior al 25 %). Dentro de los 17 aislamientos autóctonos de *Pseudomonas* estudiados el 94 % posee la mejor *performance* con alta y moderada tolerancia a la salinidad.

3.2 Respuesta adaptativa a condiciones adversas en *Burkholderia*

A-Tolerancia al arsénico en aislamientos de *Burkholderia* spp.

Se estudió la tolerancia a arsénico en *Burkholderia*, exponiendo cultivos de los

aislamientos autóctonos a concentraciones crecientes de arsenito de sodio (entre 0 y 2.5 mM) durante 48 hs a 28°C.

La mayoría de los aislamientos (8 de 10) mostraron alta sensibilidad a arsénico, evidenciada por una mortalidad del 100 % cuando las células fueron incubadas en presencia de la mínima concentración de arsenito de sodio ensayada (0.25 mM). Debido a esto no se determinó la dosis letal 50 (CL₅₀) para B1, B2, B5, B7, B10, B12, B14, B16. Sin embargo, en las mismas condiciones, los aislamientos B8 y B15 mostraron mayor tolerancia a este tóxico, siendo sus CL₅₀ = 0.73 mM y 0.40 mM respectivamente (Tabla 12). Así, consideramos ambos aislamientos como de alta tolerancia (A) (CL₅₀ mayor ó igual al 55 % con respecto a la CL₅₀ = 0.73 mM, correspondiente a B8) mientras que los restantes, cuyas CL₅₀ no fueron determinadas, se clasificaron en el grupo de baja tolerancia (B) (tabla 12, figura 33).

Aislamientos <i>Burkholderia</i> spp.	CL ₅₀					
	AsIII mM	Tolerancia	Intervalo de confianza (95%)	NaCl mM	Tolerancia	Intervalo de confianza (95%)
B1	ND <0.25	B	-	125	M	(70 - 175)
B2	ND <0.25	B	-	123	M	(79 - 148)
B5	ND <0.25	B	-	138	M	(120 - 158)
B7	ND <0.25	B	-	153	M	(95 - 187)
B8	0,73	A	(0.19 - 1.10)	151	M	(137 - 166)
B10	ND <0.25	B	-	175	A	(115 - 239)
B12	ND <0.25	B	-	281	A	(195 - 340)
B14	ND <0.25	B	-	80	M	(67 - 93)
B15	0,40	A	(0.18 - 0.57)	154	M	(119 - 189)
B16	ND <0.25	B	-	84	M	(69 - 100)

Tabla 12: Evaluación de la tolerancia a arsénico y a la salinidad en aislamientos de *Burkholderia* spp. En la tabla se muestra la CL₅₀ de arsénico y NaCl con sus respectivos intervalos de confianza. La concentración letal media aguda, es la cantidad de sustancia necesaria para provocar la muerte del 50 % de bacterias expuestas. Se indica ND cuando no fue posible determinar la CL₅₀ con una concentración mínima de 0.25 mM de arsenito de sodio y una mortalidad correspondiente del 100 %. Los aislamientos se clasificaron en grupo A (alta tolerancia al arsénico o alta tolerancia al cloruro de sodio según corresponda) a aquellos aislamientos que presentan valores superiores al 55 % del valor máximo obtenido, grupo M (moderada tolerancia al arsénico o al cloruro de sodio) si los valores comprenden entre el 55 y 25 % del valor máximo observado y grupo B (baja tolerancia o los que presentaron valores inferiores al 25 %). Para NaCl: una concentración 1 % equivale a 170 mM.

Tolerancia a As III

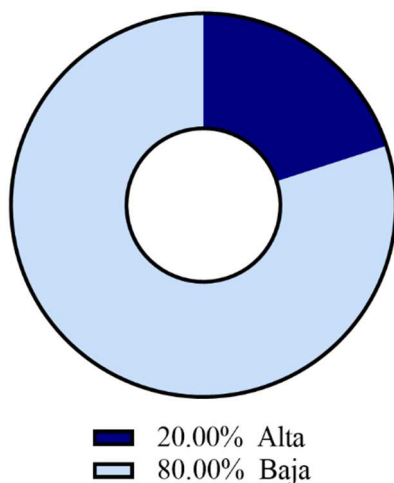


Figura 33: Clasificación de los aislamientos de *Burkholderia* según su tolerancia a arsénico III. El 80 % de los aislamientos mostró alta sensibilidad a arsénico, evidenciada por una mortalidad del 100 % cuando las células fueron incubadas en presencia de la mínima concentración de arsenito de sodio ensayada (0.25 mM). Los aislamientos B8 y B15 mostraron mayor tolerancia a este tóxico y fueron clasificados como de Alta tolerancia, mientras que el resto fue considerado de Baja tolerancia a AsIII.

B-Tolerancia al estrés salino en aislamientos de *Burkholderia* spp.

La tolerancia a la salinidad se estudió enfrentando los aislamientos de *Burkholderia* a concentraciones entre 0 y 500 mM de cloruro de sodio, durante 48 hs a 28°C. Teniendo en cuenta el valor máximo observado de CL_{50} en el aislamiento B12 como 100 % (CL_{50} = 281 mM), encontramos que sólo 2 de los 10 aislamientos (B10 y B12) presentaron alta tolerancia al cloruro de sodio (grupo A: tolerancia mayor al 55 %, 155 mM), mientras que, el resto de los aislamientos de *Burkholderia* (8 de 10) mostraron una moderada tolerancia (M) al estrés salino: B1, B2, B5, B7, B8, B14, B15 y B16 (CL_{50} entre 55 y 25 %, correspondiente a valores entre 155 y 70 mM, figura 34). En la tabla 12 se muestran las CL_{50} con los respectivos intervalos de confianza.

Tolerancia a la salinidad

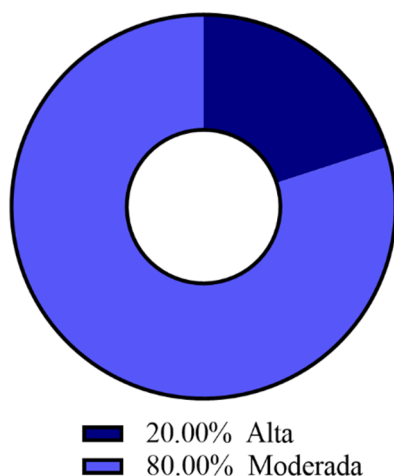


Figura 34: Clasificación de los aislamientos de *Burkholderia* según su tolerancia a la salinidad. Tomando como 100 % al mayor valor de CL_{50} observado (B12) clasificamos a los aislamientos en dos grupos: Alta (tolerancia superior al 55 %) y Moderada tolerancia al NaCl (entre 55 y 25 %). Dentro de los 10 aislamientos autóctonos de *Burkholderia* estudiados el 100 % mostró la mejor *performance* con alta y moderada tolerancia a la salinidad.

Al igual que en *Pseudomonas*, encontramos que todos los aislamientos resultaron tolerantes a suelos entre moderadamente salinos y netamente salinos (la salinidad de un suelo normal es menor a 44 mM), siendo B12 con una CL_{50} = 281 mM, el único

aislamiento tolerante a concentraciones encontradas en suelos extremadamente salinos (superior a 218 mM).

En resumen, se observó que los aislamientos de *Pseudomonas* spp., manifestaron una alta tolerancia a la exposición a As (III) con CL_{50} que superan al valor más extremo medido en nuestro país (0.1155 mM de arsénico), mientras que los aislamientos de *Burkholderia* spp., que mostraron menor capacidad de formar biofilms que los aislamientos de *Pseudomonas*, resultaron más sensibles ante la exposición al metaloide (Tablas 11 y 12).

El efecto de la salinidad sobre ambos géneros fue similar. El 76 % de los aislamientos de *Pseudomonas* y el 80 % de los de *Burkholderia*, resultaron tolerantes a suelos salinos o extremadamente salinos ($CL_{50} > 109$ mM).

3.3 Evaluación de la capacidad de formación de biofilm en condiciones adversas.

En secciones previas se analizó la capacidad de los aislamientos autóctonos de establecer biofilms *in vitro* sobre soportes abióticos y bióticos, por otra parte, se estudió su tolerancia a sustancias tóxicas como el arsénico y la salinidad. Nos propusimos evaluar el efecto de estas sustancias sobre la formación de biofilms *in vitro* sobre PE en *Pseudomonas* y *Burkholderia*. Para esto se seleccionaron aislamientos que incluyeran la mayor variedad de fenotipos: alta capacidad de formar biofilm combinada con alta y baja tolerancia a cada sustancia tóxica, baja capacidad de formar biofilm con alta y baja tolerancia a ambos elementos. Cabe recordar que los ensayos previos para determinar la CL_{50} , fueron realizados en PBS con el fin de estimar la sensibilidad intrínseca de cada aislamiento. En estos ensayos fue posible determinar la ecuación de la recta obtenida mediante el método gráfico. Dicha ecuación fue utilizada para estimar el efecto de las distintas concentraciones del tóxico empleadas en una condición de cultivo con medio nutritivo que favoreció la formación de biofilms en cada aislamiento seleccionado.

Así, en cada caso el arsénico ó el cloruro de sodio, se agregaron desde el inicio del ensayo para evaluar su efecto sobre el establecimiento del biofilm y la población planctónica acompañante.

A-Efecto del arsénico sobre el desarrollo de biofilm *in vitro* sobre PE en *Pseudomonas* spp.

Para realizar estos ensayos se seleccionaron aislamientos de *Pseudomonas* de alta (P3, P12, P13 y P18) y baja (P7 y P11) capacidad de formación de biofilm sobre PE empleando la condición de cultivo más propicia para desarrollarlo, medio M63 glucosa 0.2 %, CAA 0.5 % bajo agitación. Con respecto a su desempeño frente a arsénico, estos aislamientos presentaron alta (P11, P12 y P13), moderada (P3) y baja (P18 y P7) tolerancia al tóxico. Los ensayos fueron realizados en presencia de 1 mM de arsenito de sodio para todos los aislamientos mencionados: *P. protegens* (P11), *P. chlororaphis* (P12), *P. asplenii* (P13) y *P. fluorescens* (P3, P18 y P7). En la figura 35 se muestran los resultados del efecto del As (III) sobre el crecimiento en forma de biofilm sobre el PE y sobre las bacterias libres

(crecimiento planctónico).

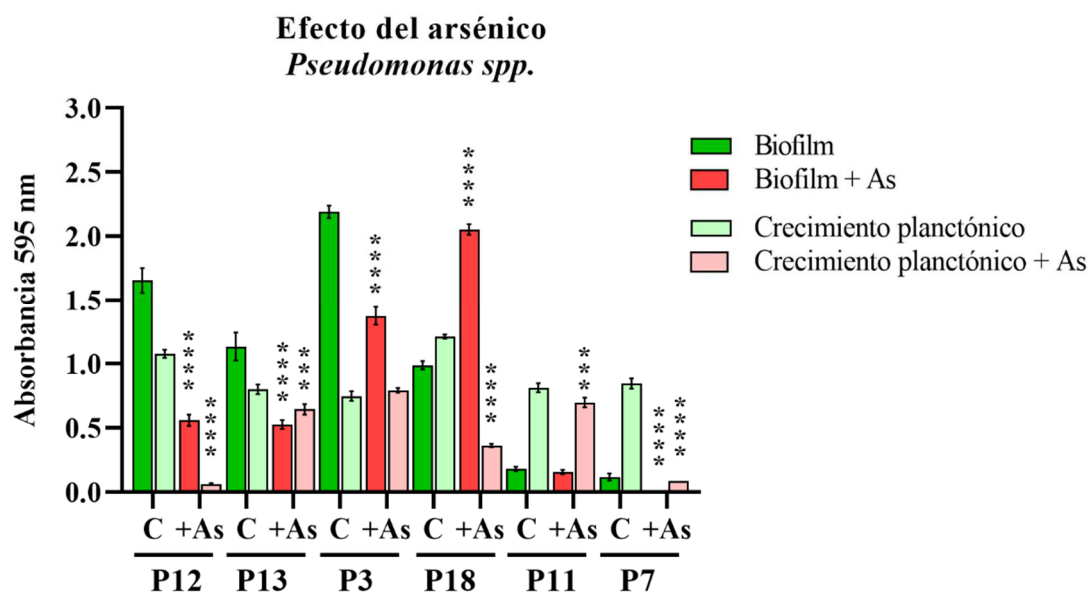


Figura 35: Efecto del As III sobre la formación de biofilm en aislamientos de *Pseudomonas*. En la figura se muestra la formación de biofilm sobre poliestireno sin agregado de As III en verde (C) y con As III (1mM) en rojo (+As) mientras que la población planctónica que acompaña al biofilm se muestra en verde claro para los ensayos control sin As III (C) y en rosa para los ensayos con agregado del tóxico (+As). Los experimentos fueron realizados al menos tres veces por 6 réplicas cada uno. T- test, significación estadística: **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, para biofilm y biofilm en presencia de arsénico.

Considerando los aislamientos que mostraron ser mejores formadores de biofilm sobre el PE (P3, P12, P13, P18), encontramos que P12, P13 y P3 mostraron una reducción significativa con respecto al control sin el tóxico, en su capacidad de desarrollar biofilm cuando fueron expuestos a 1 mM de arsénico. Así, P12 fue el más afectado con una disminución del 66 %, seguido de P13 con un 53 % y P3 con una baja del 37 % (T- test, **** $p < 0.0001$ para las tres comparaciones).

En cuanto al efecto del arsénico sobre el crecimiento planctónico, observamos que también fue más severo sobre el aislamiento P12 (con una reducción del 94 %) seguido por el P13 (con 19 % menos de crecimiento) (T- test, **** $p < 0.0001$ y *** $p < 0.001$ respectivamente). El aislamiento P3 no mostró diferencias significativas en el crecimiento planctónico cuando fue expuesto a 1 mM (Figura 35). En estos aislamientos de *P. chlororaphis* (P12) y *P. fluorescens* (P3) expuestos a 1 mM de arsénico, prevaleció el crecimiento sésil formando un biofilm adherido al PE, por sobre la forma libre planctónica en suspensión. Esto sugiere que el estilo de vida en biofilm ofrecería una ventaja adaptativa frente a un entorno “hostil” que contiene al compuesto tóxico.

En cambio, el aislamiento P18 (*P. fluorescens*) mostró un comportamiento diferente: en presencia de 1 mM de arsénico duplicó la formación del biofilm con respecto al control (207 %), mientras que el crecimiento planctónico disminuyó un 70 % (figura 35). Este aislamiento de alta capacidad para formar biofilm en PE y baja tolerancia al arsénico, a pesar de haber sufrido un efecto perjudicial sobre la población planctónica, logró establecer un biofilm como forma de crecimiento preferencial en presencia del metaloide.

En cuanto a los aislamientos de baja capacidad para formar biofilm sobre PE, P11 y P7 con alta y baja tolerancia a arsénico respectivamente, observamos que P11 (*P. protegens*) ($CL_{50} = 1.27$) no manifestó alteración en el crecimiento en forma de biofilm aunque sí sufrió una reducción del 14 % en su forma planctónica, mientras que P7 (*P. fluorescens*, cuya CL_{50} no se determinó) fue incapaz de crecer en forma de biofilm manteniendo una población planctónica residual de solo el 10 % ante la exposición al tóxico.

B-Efecto de la salinidad sobre el desarrollo de biofilm *in vitro* sobre PE en *Pseudomonas* spp.

Para evaluar el efecto del estrés salino sobre el desarrollo de biofilm, se seleccionaron aislamientos de *Pseudomonas* de alta (P14, P17 y P18), moderada (P16) y baja (P6 y P11) capacidad de formación de biofilm sobre PE y alta (P16 y P17) y moderada (P6, P11, P14 y P18) tolerancia al estrés salino. Teniendo en cuenta las CL_{50} observadas, los aislamientos fueron expuestos a altas concentraciones de cloruro de sodio: P6, P11 y P14 a 200 mM y P16, P17 y P18 a 400 mM. En la figura 36 se muestran los resultados del efecto de la salinidad sobre el crecimiento planctónico y en biofilm.

Los aislamientos con alta *performance* para formación de biofilm y tolerancia a la salinidad, que fueron expuestos a una salinidad extrema (400 mM de cloruro de sodio), mostraron una reducción significativa en el desarrollo del biofilm: P16 (*P. gessardi*) disminuyó un 80 % y los aislamientos de *P. fluorescens* P17 y P18 mostraron una baja del 65 % y 70 % respectivamente (T- test, **** $p < 0.0001$ para las tres comparaciones), mientras que las bacterias planctónicas acompañantes en cada caso sufrieron un efecto menor con una disminución del 38 % en P16, del 49 % para P17 y del 51 % para P18 (T- test, *** $p < 0.001$ para P16 y **** $p < 0.0001$ para P17 y P18) (Figura 36).

Con respecto a los aislamientos expuestos a 200 mM de cloruro de sodio (salinidad equivalente a suelos salinos), de moderada tolerancia a la sal, encontramos que P14 una *Pseudomonas* sp. de alta capacidad para formar biofilm, mostró un comportamiento particular ya que su población en biofilm aumentó 3 veces en presencia de cloruro de sodio, mientras que las células planctónicas disminuyeron un 8 % con respecto al control (T- test, ** $p < 0.01$). En cambio, dentro los aislamientos de baja capacidad para formar biofilms, P6 (*P. fluorescens*) mostró una disminución en el crecimiento en biofilm del 47 % y un 30 % en el crecimiento planctónico (T- test, **** $p < 0.0001$), mientras que P11 (*P. protegens*) aumentó 4 veces y media la formación de biofilm (450 % con respecto al control) y la población planctónica no se vio afectada cuando fue expuesta al cloruro de sodio. Así, los aislamientos P11 y P14, se adaptaron al tóxico promoviendo el desarrollo del biofilm de manera similar a lo descrito por Kasim y colaboradores (2016) en cepas de *Bacillus circulans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus megatherium* y *Azotobacter chroococcum*.

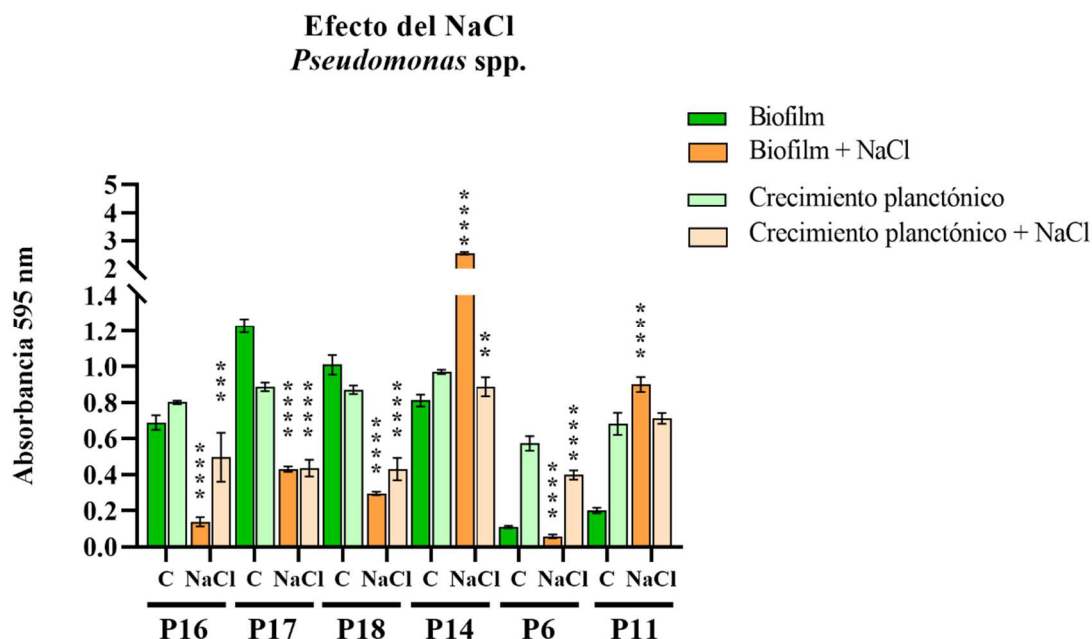


Figura 36: Efecto del NaCl sobre la formación de biofilm en *Pseudomonas*. En la figura se muestra la formación de biofilm sobre poliestireno sin agregado de cloruro de sodio en verde (C) y con cloruro de sodio en naranja. La población planctónica que acompaña al biofilm se muestra en verde claro para los ensayos control sin sal (C) y en rosa para los ensayos con agregado de NaCl. Los aislamientos P16, P17 y P18 fueron expuestos a una concentración de 400 mM de NaCl, mientras que P14, P6 y P11 a 200 mM. Los experimentos fueron realizados al menos tres veces por 6 réplicas cada uno. T- test, significación estadística: **** $p < 0.0001$ *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, para biofilm y biofilm en presencia de arsénico.

C-Efecto del arsénico sobre el desarrollo de biofilm *in vitro* sobre PE en *Burkholderia* spp.

Los ensayos fueron realizados en las condiciones de cultivo que favorecieron la formación de biofilm sobre PE en aislamientos de *Burkholderia* spp. seleccionados según su alta (B12 y B14) o baja (B8) capacidad para desarrollarlos. Así, B8 fue cultivado en medio M63 glucosa 0.2% CAA 0.5%, B12 en medio TSB y B14 en medio M9 glucosa 0.4 %. Estas cepas fueron expuestas a 1 mM de arsenito de sodio para estudiar su efecto sobre el desarrollo del biofilm y las bacterias planctónicas acompañantes. Los resultados se muestran en la figura 37.

Observamos que la cepa B8 (*Paraburkholderia tuberum*), caracterizada por su bajo desempeño en cuanto a la formación de biofilm y alta tolerancia a arsénico, mostró una disminución significativa en presencia de 1 mM de arsénico, tanto en el crecimiento planctónico como en el biofilm (29 % de reducción, T- test, **** $p < 0.0001$ y 24 %, T- test, *** $p < 0.001$ respectivamente) (figura 37).

En cuanto a los aislamientos que presentaron alta capacidad de desarrollo de biofilm y muy baja tolerancia a arsénico, B12 (*Burkholderia ambifaria*) manifestó una disminución en el crecimiento planctónico del 44 % (T- test, **** $p < 0.0001$), mientras que el crecimiento en biofilm no sufrió alteraciones significativas en presencia de 1 mM de arsénico.

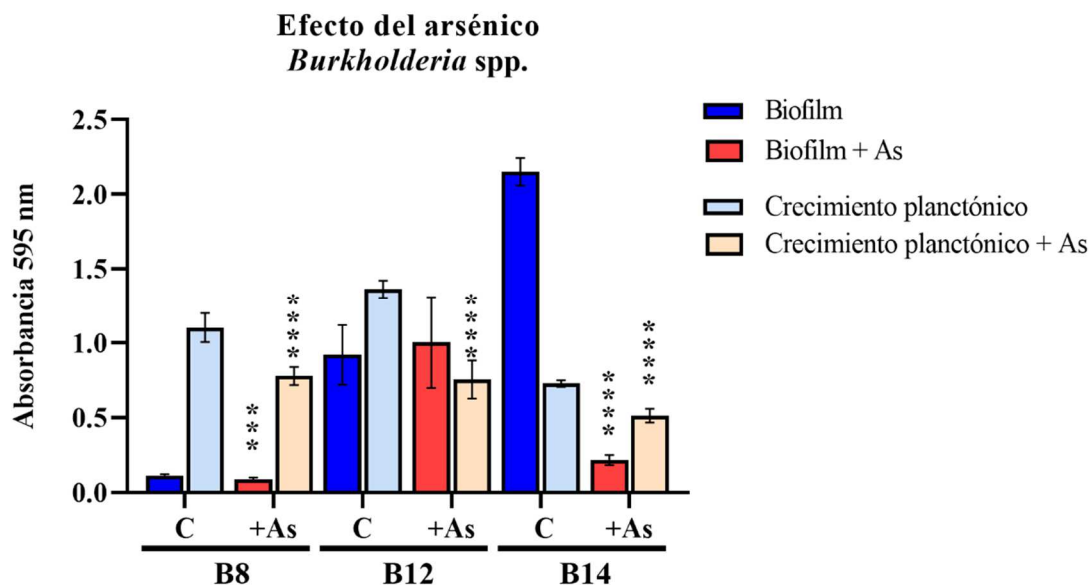


Figura 37: Efecto del As III sobre la formación de biofilm en *Burkholderia* spp. En la figura se muestra la formación de biofilm del experimento control sobre poliestireno sin agregado de As (III) en azul (C) y con 1 mM de As (III) en rojo (+As). La población planctónica que acompaña al biofilm se muestra en celeste para los ensayos control sin As (III) (C) y en rosa para los ensayos con agregado del tóxico (+As). Los experimentos fueron realizados al menos tres veces por 6 réplicas cada uno. T test, significación estadística: **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, para biofilm y biofilm en presencia de arsénico.

En cambio, la cepa B14 (*Paraburkholderia graminis*) manifestó un marcado descenso del biofilm (90 %) frente a una reducción del 29 % en el crecimiento planctónico cuando fueron cultivadas en presencia del tóxico (T- test, **** $p < 0.0001$, para ambas comparaciones) (figura 37).

D-Efecto de la salinidad en el desarrollo de biofilm *in vitro* sobre PE en *Burkholderia* spp.

El efecto del estrés salino sobre el desarrollo del biofilm fue ensayado sobre aislamientos de *Burkholderia* que mostraron alta (B12 y B14) y deficiente (B16) capacidad de formación de biofilm y alta (B12) y moderada (B14 y B16) tolerancia a cloruro de sodio. Las cepas se cultivaron en condiciones propicias para el desarrollo de biofilm: medio M63 glucosa 0.2 % CAA 0.5 % (B16), medio TSB (B12) ó M9 glucosa 0.4 % (B14) bajo agitación. Basados en las CL_{50} de NaCl obtenidas (tabla 12) los aislamientos fueron expuestos a 100 mM (B14 y B16) y 300 mM (B12) de cloruro de sodio. Los resultados del efecto de la salinidad sobre el desarrollo del biofilm y el crecimiento planctónico se muestran en la figura 38.

Los aislamientos de *Burkholderia ambifaria*, B12 y *Paraburkholderia graminis* B14, de alta capacidad de formación de biofilm y de tolerancia alta y moderada a la sal respectivamente, mostraron un comportamiento opuesto. Mientras que la cepa B12 presentó un aumento significativo del crecimiento en biofilm (147 % con respecto al control) y una reducción en el crecimiento planctónico del 15 % (T- test, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$ para el biofilm y crecimiento planctónico respectivamente) en

condiciones de salinidad extrema, el aislamiento B14 manifestó una marcada disminución del biofilm (55 %, T- test, **** $p < 0.0001$) y un incremento de las bacterias en suspensión (155 % con respecto al control sin sal; T- test, **** $p < 0.0001$) en una concentración salina moderada (figura 38).

En cambio, el aislamiento de *Paraburkholderia terricola* B16 de moderada tolerancia a la salinidad y muy escasa ó nula capacidad de formar biofilms, no presentó cambios significativos en ninguna de las dos formas de crecimiento evaluadas cuando se expuso a una concentración de sal equivalente a la de suelos moderadamente salinos (figura 38).

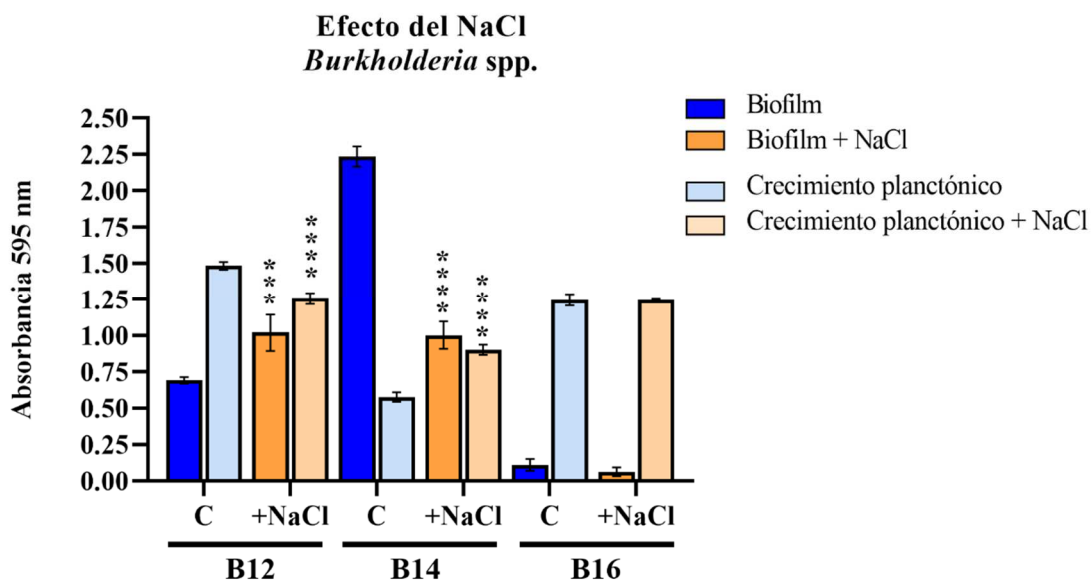


Figura 38: Efecto del NaCl sobre la formación de biofilm sobre poliestireno en *Burkholderia* spp. En la figura se muestra la formación de biofilm del experimento control sin agregado de NaCl en azul (C) y con NaCl en naranja. La población planctónica que acompaña al biofilm se muestra en celeste para los ensayos control sin sal (C) y en rosa para los ensayos con agregado de NaCl. Los aislamientos B14 y B16 fueron enfrentados a una concentración 100 mM de NaCl y B12 a 300 mM. Los experimentos fueron realizados al menos tres veces por 6 réplicas cada uno. T test, significación estadística: **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, para biofilm y biofilm en presencia de arsénico.

4. Análisis Estadístico Multivariado

Con el fin de integrar los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la variabilidad en la expresión de fenotipos relacionados a biofilms, capacidad para formarlos y tolerancia a los factores de stress estudiados, realizamos un análisis estadístico multivariado. Mediante componentes principales, el objetivo de dicho análisis es explicar la estructura de la variación con la pérdida mínima de información, agrupando en conjuntos las variables estudiadas (Infostat software, Di Rienzo *et al.*, 2013). Para incluir en el análisis a las variables cualitativas como producción de (1, 4) β -D glucopiranosidos (RC) y de moléculas autoinductoras del QS (HSLC y HSL), adjudicamos valor '1' cuando fueron positivas y valor '0' al valor negativo (o no producción).

El análisis de componentes principales (PCA) para los aislamientos de *Pseudomonas* spp. se muestra en la figura 39. Observamos el gráfico de dispersión que tiene como ejes principales al CP1 y CP2. El PCA explicó el 47.4 % de la varianza total en los dos

componentes principales. La componente 1 explicó el 25.9 % de la varianza y agrupó las variables relacionadas a la capacidad de colonización (motilidad, adhesión a superficies, producción de moléculas involucradas en quorum sensing) hacia la derecha del gráfico donde se ubicaron los aislamientos más competentes. La componente 2 explicó el 21.5% de la varianza y distinguió a los aislamientos con alta producción de exopolisacáridos, alta autoagregación y capacidad de producir (1-4) β -D glucopiranosidos, en la parte superior del gráfico. Así, en nuestro análisis, la producción de EPSs y autoagregación celular, variables relacionadas a componentes extracelulares y de la matriz extracelular del biofilm, resultan independientes de la capacidad de adhesión a superficies y demás variables relativas a colonización y comportamiento colectivo.

En cuanto a la capacidad de adaptación a ambientes sometidos a estrés, se observó que la tolerancia a la salinidad y a arsénico, contribuyen negativamente en la CP1 y CP2 respectivamente (figura 39) y no correlacionan en forma significativa con el resto de las variables.

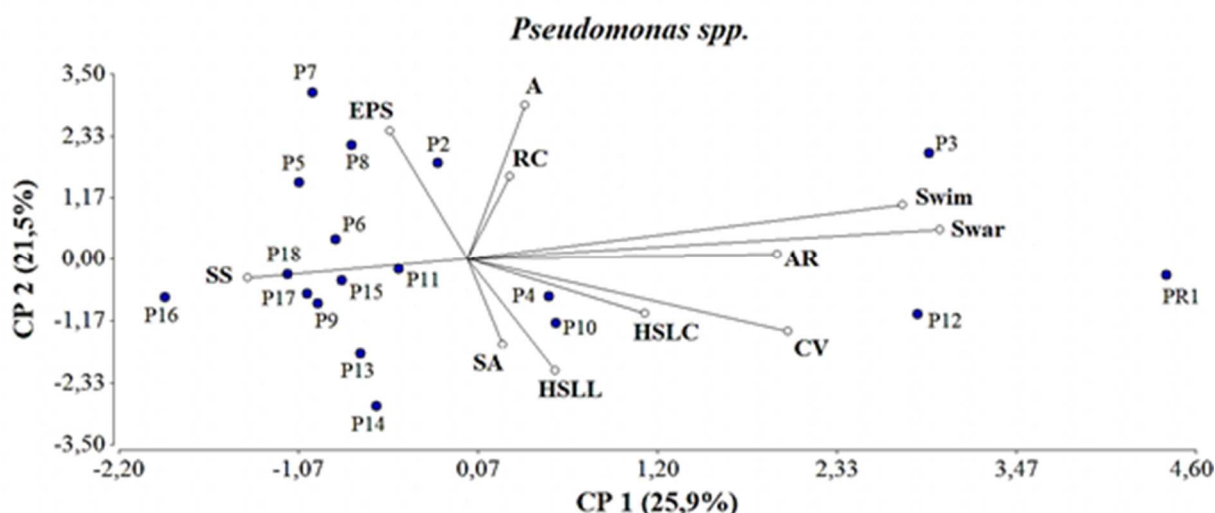


Figura 39. Análisis de componentes principales para las características asociadas a la superficie bacteriana, biofilm y supervivencia en *Pseudomonas* spp. Los componentes 1 y 2 explican el 47.4 % de la varianza total. La componente 1 (CP1) separa a las variables relacionadas con la colonización del resto, nucleando de esta manera a los aislamientos con mayor potencial de colonización a la derecha del gráfico. La componente 2 (CP2) separa las variables EPS, A y RC (componentes extracelulares) del resto, agrupando así a los aislamientos con alta producción de exopolisacáridos en la parte superior del gráfico. **Abreviaturas:** A, Agregación célula-célula; AR, Adhesión a raíz de trigo; CV, Adhesión a soporte abiótico; EPS, Producción de exopolisacáridos; HSLC, Producción de acil homoserina lactonas de cadena corta; HSL, producción de acil homoserina lactonas de cadena larga; RC, Producción de celulosa, SA: Adaptación a la presencia de a As (III); SS, Adaptación en presencia de altas concentraciones salinas; Motilidad mediada por flagelo: Swar (swarming), Swim (swimming).

En el extremo derecho del gráfico se ubicaron los aislamientos P3, P10 y P12 (además de la cepa de referencia), como de potencial aptitud en sus capacidades de colonización. El aislamiento P3 pertenece a *P. fluorescens* y fue aislada de la rizosfera, mientras que P10 y P12 son *Pseudomonas chlororaphis* provenientes del suelo, que mostraron previamente un elevado índice de potencial biocontrol (BPI) e índice integrador de promoción del crecimiento en plantas (DGPI) (Agaras *et al.*, 2015).

La mayoría de los aislamientos se agruparon a la izquierda del gráfico, siendo P16 el

más alejado del resto por su elevada tolerancia a la salinidad dentro del grupo. Sobre la componente 2 se ubicaron en la parte superior del gráfico los aislamientos con alto nivel de producción de EPS y alta capacidad de autoagregación (P2, P5, P7 y P8) destacando el aislamiento P7 por ser el mayor productor de EPS del grupo (figura 39).

Realizamos el mismo análisis sobre los aislamientos de *Burkholderia* spp. (figura 40). El PCA explicó el 65.9 % de la varianza total en las dos componentes principales. La componente 1 explicó el 44.8 % de la varianza total, agrupando características relacionadas con la motilidad (swimming y swarming), agregación celular, tolerancia a la salinidad y producción de HSLC hacia la derecha del gráfico, siendo dichas variables las de mayor aporte en la componente. La componente principal 2, explicó el 21.1 % de la varianza y separó hacia la parte superior del gráfico la capacidad de producción de exopolisacáridos EPS y la producción de HSLL, mientras que en la parte inferior se ubicaron la adhesión a soporte abiótico y la producción de celulosa. En este grupo, la adhesión a soporte biótico y la tolerancia a arsénico no contribuyeron en forma destacable en el análisis.

En función de estas correlaciones, la CP1 separa al aislamiento B12 del resto, siendo éste destacado en características relacionadas con la motilidad, capacidad de colonización y tolerancia a la salinidad. En la componente 2 se diferencian en la parte superior del gráfico, los aislamientos con alta capacidad de producción de exopolisacáridos y acilhomoserina lactonas de cadena larga (B15 y B16), frente al resto que se ubicaron en la parte inferior izquierda y manifestaron capacidad de producir celulosa (figura 40).

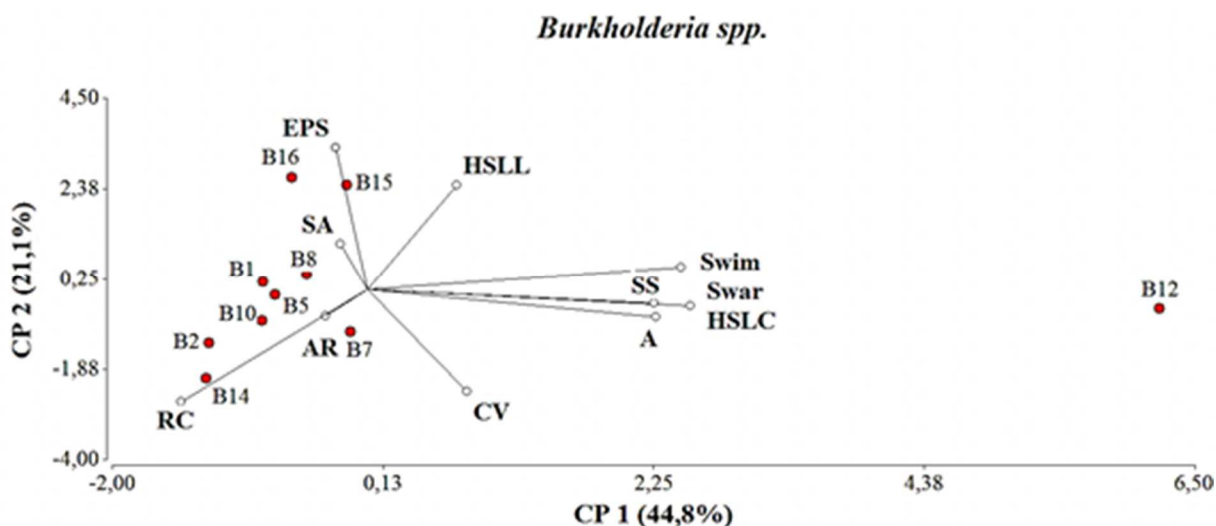


Figura 40. Análisis de componentes principales para las características asociadas a la superficie bacteriana, biofilm y supervivencia en *Burkholderia* spp. Los componentes 1 y 2 explican el 65,9 % de la varianza total. La componente 1 (CP1) separa al aislamiento B12 con alta capacidad de colonización del resto de los aislamientos. La componente 2 (CP2) separa los aislamientos que producen EPS en la parte superior del gráfico de los que producen celulosa (u otro (1-4) β -D glucopiranosidos) en la parte inferior. Abreviaturas: A, Agregación célula-célula; AR, Adhesión a raíz de trigo; CV, Adhesión a soporte abiótico; EPS, Producción de exopolisacáridos; HSLC, Producción de acil homoserina lactonas de cadena corta; HSSL, producción de acil homoserina lactonas de cadena larga; RC, Producción de celulosa, SA: Adaptación a la presencia de arsénico III; SS, Adaptación en presencia de altas concentraciones salinas; Motilidad mediada por flagelo: Swar (swarming), Swim (swimming).

Posteriormente, se incluyeron en el Biplot los aislamientos de ambos géneros para analizar la población total (figura 41). El PCA explicó el 43.6 % de la varianza total en los dos componentes principales. La componente 1 explicó el 26.6 % de la varianza y agrupó las variables relacionadas a la capacidad de colonización como motilidad y adhesión a superficies hacia la derecha del gráfico, dónde se ubicaron los aislamientos más competentes P3, P12 y PR1. Hacia la izquierda del gráfico se ubicaron la mayor parte de los aislamientos, siendo los del género *Burkholderia* los que manifestaron menores capacidades en las características analizadas y agruparon separados del resto (figura 41). Las *Pseudomonas* se ubicaron en forma dispersa debido a la amplia variabilidad de fenotipos existentes. Un subgrupo de 6 aislamientos (P5, P6, P7, P8, P9, P11 y P17) se ubicó cerca del centro del gráfico, siendo destacados en: producción de EPS (P5 y P7), agregación celular (P6 y P8), tolerancia a arsénico (P9 y P11) y tolerancia a la salinidad (P17) (figura 41).

En la componente 2, que explicó el 17 % de la varianza, se distinguieron aislamientos que produjeron acilhomoserina lactonas de cadena larga de aquellos que produjeron celulosa hacia la parte inferior del gráfico en los valores negativos. La cepa B12 se ubicó separada de los dos grupos principales, hacia la parte superior media del gráfico, diferenciándose del resto de las burkholderias. La producción de exopolisacáridos y la capacidad de adaptación al stress salino no aportaron variación en este análisis.

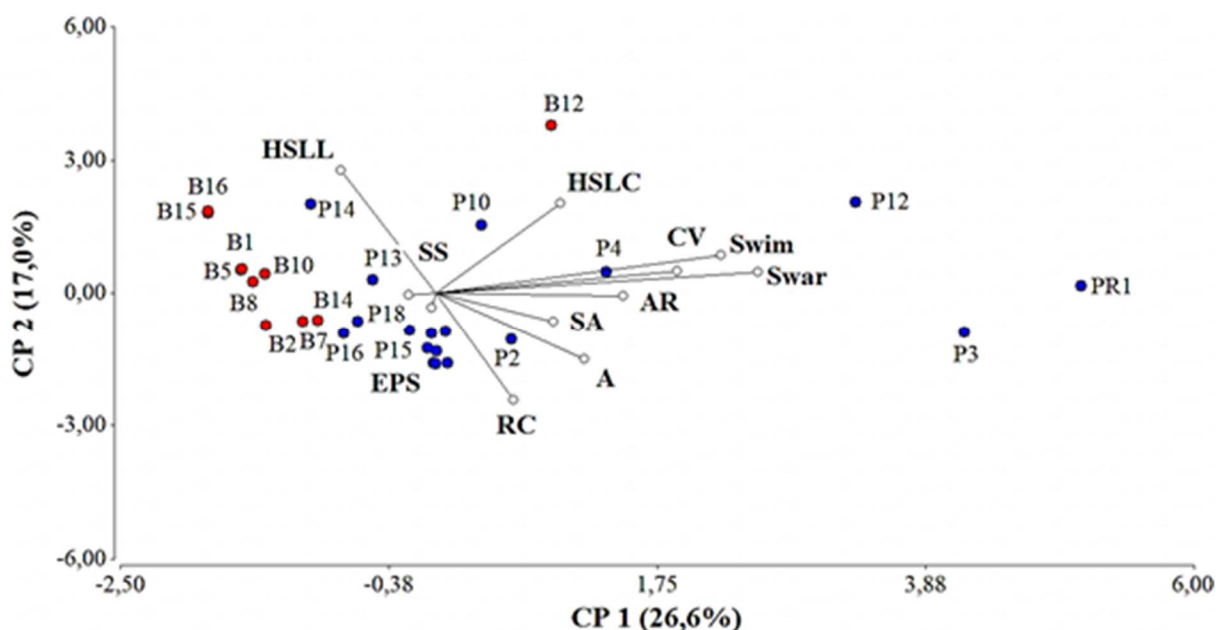


Figura 41: Análisis de componentes principales para las características asociadas a la superficie bacteriana, biofilm y supervivencia en los aislamientos analizados de *Burkholderia spp.* y *Pseudomonas spp.* Los componentes 1 y 2 explican el 43,6% de la varianza total. La componente 1 (CP1) separa a la mayoría de las variables hacia la derecha del gráfico, nucleando de esta manera a los aislamientos con mayor potencial de colonización en este sector. La componente 2 (CP2) separa las variables EPS y HSLL de RC y SS, agrupando así a los aislamientos con alta producción de exopolisacáridos en la parte inferior del gráfico. Abreviaturas: A, Agregación célula-célula; AR, Adhesión a raíz de trigo; CV, Adhesión a soporte abiótico; EPS, Producción de exopolisacáridos; HSLC, Producción de acil homoserina lactonas de cadena corta; HSLL, producción de acil homoserina lactonas de cadena larga; RC, Producción de celulosa, SA: Adaptación a la presencia de arsénico III; SS, Adaptación en presencia de altas concentraciones salinas; Motilidad mediada por flagelo: Swar (swarming), Swim (swimming).

Si bien estos análisis proporcionaron una visión integradora del desempeño de los géneros estudiados acerca de la capacidad de formar biofilms, la expresión de fenotipos asociados y la adaptación en ambientes adversos, deben analizarse los casos particulares separadamente para no perder información de interés.

CAPITULO II

Componentes extracelulares polisacáridicos y su rol en la formación de biofilm en el simbiote *Mesorhizobium japonicum*

En el capítulo I se analizó la capacidad de formar biofilms sobre poliestireno en diversos rizobios de referencia pertenecientes a *Rhizobium leguminosarum*, *Ensifer* y *Mesorhizobium*, pudiéndose definir condiciones nutricionales y tiempos de cultivo en los que se favoreció su desarrollo. Estudios previos realizados en *Rhizobium leguminosarum* y *Ensifer meliloti* evidenciaron la importancia de los polisacáridos extracelulares (EPS) en la constitución de la matriz del biofilm, afectando la capacidad de adhesión a la superficie, la estructura y el establecimiento de una conformación madura sobre soportes abióticos y bióticos (Russo *et al.*, 2006; Fujishige *et al.*, 2006 y Williams *et al.*, 2008). Por otra parte, estudios de mutantes de *E. meliloti* afectadas en la producción del succinoglicano ó EPS I, evidenciaron su importancia en la constitución de un biofilm maduro sobre superficies abióticas y la nodulación en alfalfa (Fujishige *et al.*, 2006). En cuanto al género *Mesorhizobium*, se han descrito mutantes no mucoides defectivas en la producción de EPS en *Mesorhizobium thianshanense*, que se vieron afectadas en la formación de biofilm sobre superficies abióticas y la nodulación en *Glycyrrhiza uralensis* (Asian licorice) (Wang *et al.*, 2008). En la actualidad, se desconoce la naturaleza de la matriz y el papel que cumplen los polisacáridos extracelulares en el desarrollo del biofilm en *Mesorhizobium* spp. por lo cual mediante un enfoque genético y empleando como modelo de estudio la cepa *M. japonicum* MAFF303099, estudiamos diferentes polisacáridos producidos por estos rizobios y su contribución en el establecimiento de biofilms.

1. Estudio del rol de polisacáridos extracelulares en la formación del biofilm en *Mesorhizobium* sp.

M. japonicum es un simbiote de interés agrícola, que interactúa con *Lotus* spp., una leguminosa de muy alto valor nutritivo y agropecuario, que posee elevados porcentajes de digestibilidad y capacidad de crecer en ambientes bajos inundables, salinos y alcalinos, donde son muy pocas las especies vegetales cultivables que logran sobrevivir y producir una buena cantidad de forraje de calidad. Es por esto que resulta de interés contribuir con el conocimiento de los componentes que participan en la formación de biofilms en *Mesorhizobium* sobre superficies abióticas y bióticas. En la Introducción (sección 2.3.1) se mencionó que la producción de polisacáridos extracelulares es ubicua entre rizobios, aunque su composición varía ampliamente en las distintas especies (Skorupska *et al.*, 2006; Janczarek *et al.*, 2014). *Mesorhizobium* es capaz de sintetizar distintos polisacáridos como EPS, LPS y glucanos cíclicos. Se ha caracterizado un EPS ácido en *Mesorhizobium japonicum* R7A, formado por una unidad repetitiva octamérica O-acetilada y compuesta de un residuo de ácido D-riburónico, seis glucosas y una galactosa (Muszynski *et al.*, 2016). Además, en *M. loti* Ayac 1 BII, una cepa autóctona de nuestro país, se caracterizaron otros polisacáridos extracelulares como el LPS cuyo antígeno O está compuesto principalmente por rhamnosa (D'Antuono *et al.*, 2005), y un β (1-2)

glucano cíclico, que es similar al sintetizado por *E. meliloti* y los patógenos *A. tumefaciens* y *Brucella* spp. (Lepek *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1986; Breedvel and Miller, 1994).

En el capítulo I (sección 1.1.a) presentamos resultados de estudios del biofilm desarrollado *in vitro* por rizobios, que nos permitieron determinar las condiciones que favorecen su formación en las cepas de referencia *Mesorhizobium loti* AYAC 1 BII, (aislamiento autóctono cedido por la Dra. Lepek de UNSAM - Lepek. *et al.* 1990) y *M. japonicum* MAFF303099 (cepa de referencia cuyo genoma ha sido secuenciado). En esos ensayos observamos que luego de 4 días de cultivo a 28°C con agitación, se alcanzó el mayor desarrollo de biofilm en el medio mínimo AB suplementado con sacarosa 0,5 % en *M. loti* AYAC 1BII ($0,50 \pm 0,04$), mientras que en *M. japonicum* MAFF303099 el medio óptimo fue el Y con manitol 0,2 % ($A_{595nm} 0,56 \pm 0,03$).

Gracias a una colaboración con la Dra. Viviana Lepek de UNSAM, disponíamos de mutantes de *M. loti* AYAC 1BII afectadas en la síntesis de diferentes polisacáridos: dos mutantes afectadas en el antígeno O del LPS, *lpsβ2* y *lpsβ1*; la mutante *cgs*, incapaz de sintetizar glucanos cíclicos β (1-2) y *pgm*, cepa que contiene una forma alterada del lipopolisacárido (LPS), carece del EPS, el glucano cíclico y el glucógeno, por encontrarse mutado el gen de la fosfoglucomutasa (D'Antuono *et al.*, 2005; Lepek *et al.*, 2002). Se estudió la capacidad de desarrollar biofilm *in vitro* sobre PE de estas mutantes con respecto a la cepa parental *M. loti* AYAC 1BII en las condiciones definidas previamente (figura 42).

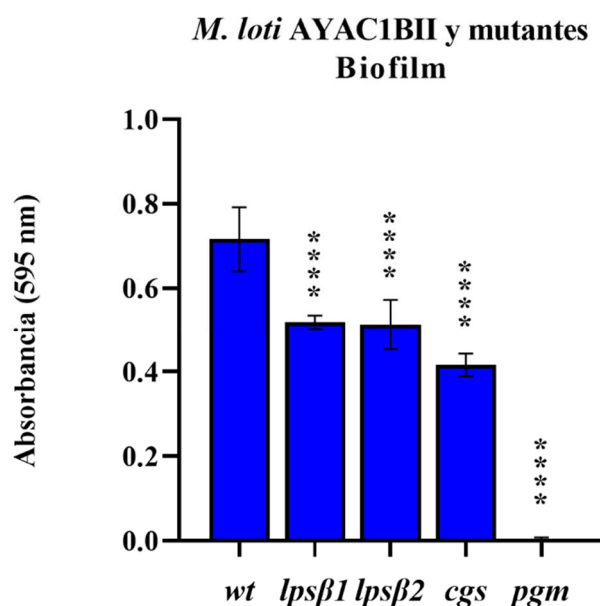


Figura 42: Formación de biofilm *in vitro* sobre PE en *M. loti* AYAC 1 BII y mutantes derivadas de diversos polisacáridos. Condiciones de ensayo: cultivos de 4 días en medio AB sacarosa 0.5 %, OD inicial $_{600} = 0.01$, con agitación (200 rpm). Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes con al menos 6 réplicas por cepa. T test, significación estadística: ****p < 0.0001.

En la figura 42 se puede observar que las mutantes *lpsβ1* y *β2*, mostraron una reducción del 28 % del biofilm que fue significativa con respecto a la desarrollada por la cepa parental (A_{595nm} : cepa *wt* = 0.72 ± 0.08 ; *lpsβ1* = 0.52 ± 0.02 y *lpsβ2* = 0.51 ± 0.06 ; One-way ANOVA, **** $p < 0.0001$ para ambas comparaciones). Esto sugiere que el antígeno O del LPS, ausente en la mutante *lpsβ1* y defectuoso en *lpsβ2* participaría en la adhesión sobre el poliestireno en *Mesorhizobium loti* AYAC 1 BII. En cuanto a la cepa mutante *cgs*, ésta mostró una disminución significativa del 42 % (cepa *wt* = 0.72 ± 0.08 ; *cgs* = 0.42 ± 0.03 ; One-way ANOVA, **** $p < 0.0001$) en la capacidad de formación de biofilm sobre el mismo soporte abiótico, indicando que los glucanos cíclicos también estarían involucrados en este proceso.

Por otra parte, la mutante *pgm* afectada en la enzima fosfoglucomutasa, fue incapaz de desarrollar biofilm sobre el soporte abiótico viéndose drásticamente alterada en su adhesión (One-way ANOVA, **** $p < 0.0001$). Esta cepa presenta deficiencias en la producción de diversos polisacáridos, por lo cual la mutación tiene un efecto pleiotrópico. Tanto en esta mutante como en el resto de las cepas, se constató que luego de 6 días el crecimiento planctónico alcanzó un nivel similar al de la *wt*, aunque el biofilm continuó afectado (no se muestra).

Nuestros resultados en conjunto sugieren que el antígeno O del LPS, los glucanos cíclicos y posiblemente el exopolisacárido, estarían involucrados en la formación de biofilms *in vitro* en *Mesorhizobium loti* AYAC 1 BII.

2. Análisis *in silico* de regiones implicadas en la biosíntesis de polisacáridos extracelulares en *Mesorhizobium japonicum* MAFF303099

En la cepa *M. japonicum* MAFF303099 cuyo genoma fue secuenciado, se identificaron genes que estarían involucrados en la biosíntesis, polimerización, transporte y procesamiento post - producción de exopolisacáridos, pertenecientes al grupo *exo*, en una región de aproximadamente 30 kb (figura 43) (Kaneko *et al.*, 2000). Aunque *M. japonicum* MAFF303099 comparte los genes *exo* con los de la ruta biosintética del succinoglicano ó EPS I de *E. meliloti* hasta el paso catalizado por ExoU, enzima que origina el hexasacárido Gal-(Glc)₅, los pasos siguientes requeridos en la síntesis de la subunidad repetitiva del exopolisacárido no estarían conservados (Streit *et al.*, 2004) (figura 3, Sección 2.3.1, INTRODUCCIÓN).

Tanto en la cepa MAFF303099 como en la R7A de *Mesorhizobium japonicum*, han sido estudiadas sus secuencias genómicas (Kaneko *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 2014) y se observó que el *cluster* de genes *exo* identificado en MAFF303099 tiene idéntica disposición (sintenia) en R7A y comparten un 98% de identidad en su secuencia nucleotídica, lo que permite inferir que esta ruta biosintética estaría conservada. Por otra parte, ambas cepas poseen idéntica secuencia genética para rRNA 16S y en diversos genes se mostró que pertenecen a especies filogenéticamente divergentes de *M. loti* y distinguibles de las restantes especies del género *Mesorhizobium*, por tanto, se ha propuesto renombrarlas como *Mesorhizobium japonicum* sp. nov. (Martínez-Hidalgo *et al.*, 2016). Se sabe que mutantes de la cepa R7A de *M. japonicum* afectadas en etapas intermedias y tardías de la polimerización del EPS, indujeron la formación de primordios

de nódulos no infectados y ocasionalmente tuvieron un retraso en la nodulación en *L. japonicus* (Ronson *et al.*, 2013). Originalmente, MAFF303099 y R7A se denominaron *Mesorhizobium loti* porque fueron aisladas de *Lotus japonicus* en Japón y de *Lotus Corniculatus* en Nueva Zelanda (Saeki and Kouchi, 2000) (Sullivan *et al.*, 1995), aunque actualmente se conocen otras especies que nodulan esta leguminosa, como las recientemente descritas *M. jarvisii* y *M. erdmanii* (Martínez-Hidalgo *et al.*, 2015). En conjunto estas evidencias nos llevaron a elegir a la cepa MAFF303099 como modelo de estudios genéticos.

Teniendo en cuenta que en *M. japonicum* MAFF303099 y *M. loti* AYAC 1 BII se desconoce el rol de los exopolisacáridos en la formación del biofilm y habiendo definido las condiciones en las que se favorece su desarrollo en las cepas silvestres, nos propusimos profundizar el estudio generando mutantes afectadas en su biosíntesis. En primer lugar, se eligió mutagenizar el gen *mll5252* (MAFF_RS21505, de 678 nt) que se encuentra dentro del *cluster* de genes *exo* de 30 kb descrito en *Mesorhizobium japonicum* MAFF 303099 (NC_002678.2, 4179000 - 4210000) (Kaneko 2000). Este gen codifica una putativa galactosiltransferasa de 225 aminoácidos que está altamente conservada ya que tiene 65 % de identidad y 80 % de similitud aminoacídica (100 % de cobertura) con ExoY de *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* (226 aminoácidos; WP_010975907.1). ExoY es la enzima clave en la biosíntesis del EPS I en *E. meliloti* porque inicia el ensamblaje de la unidad repetitiva del succinoglicano (figura 43 y figura 3, Sección 2.3.1, INTRODUCCIÓN).

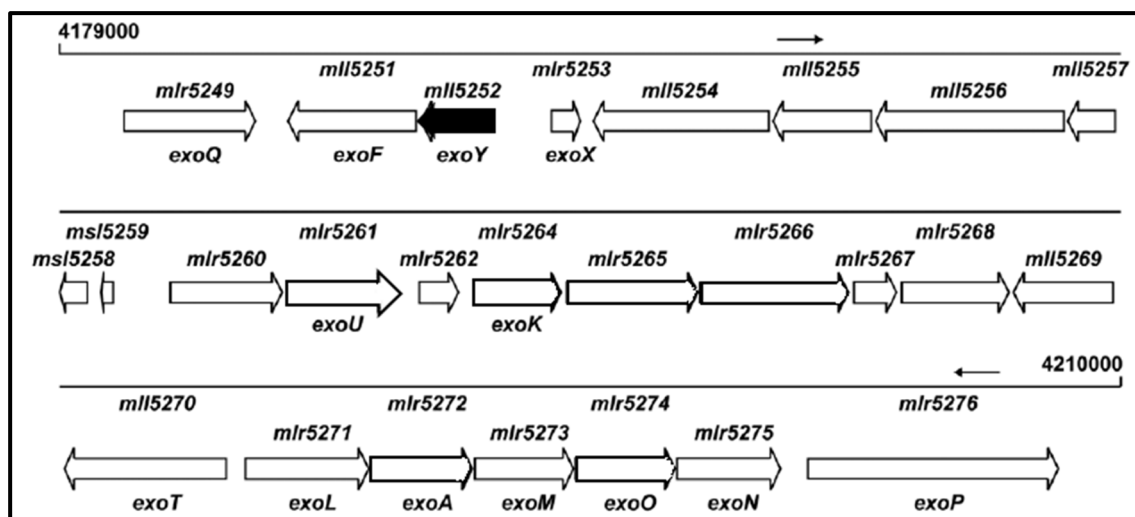


Figura 43: Cluster de genes *exo* identificados en *M. japonicum* MAFF303099 (NC_002678.2, 4179000-4210000). En negro se indica el gen *mll5252* (*exoY*) (NC_002678.2, 4182614 - 4183291) que forma parte de un *cluster* de genes homólogos a los que intervienen en la producción del exopolisacárido EPS I en *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti*. Cercano a *exoY* se encuentran *exoF* y *exoQ*, cuyos productos son enzimas de la ruta biosintética que participan en la polimerización del exopolisacárido y *exoX* que reprime su producción (extraído de Ronson *et al.*, 2013; con modificaciones personales).

El análisis bioinformático del genoma de MAFF303099 nos permitió identificar una nueva región de 22 kb (NC_002678.2; posición 5547924 - 5570189) (figura 44), no caracterizada previamente, que contiene genes cuyos hipotéticos productos presentan

homología con proteínas que intervienen en el transporte y síntesis del polisacárido EPS I en *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti*. En particular, tres genes de este locus tienen similitud aminoacídica cercana al 40 % con proteínas involucradas en la síntesis del succinoglicano en *Ensifer meliloti*. El gen *mlr6756* mostró 23 % de identidad y 39 % de similitud aminoacídica con la proteína de transporte y biosíntesis del succinoglicano ExoP (786 aminoácidos, WP_018098377) de *E. meliloti* (87 % de cobertura). El producto de *mlr6758* evidenció un 32 % de identidad y 48 % de similitud aminoacídica (86 % de cobertura) con la transferasa codificada por el gen *exoZ* de *E. meliloti* involucrada en la adición de residuos acetilo (335 aminoácidos, WP_088202669.1). Finalmente, el gen *mlr6769* codificaría una proteína que presentó un 25 % de identidad y 45 % de similitud de aminoácidos con la enzima ExoF de *S. meliloti* (de 421 aminoácidos, WP_010975906.1) que es responsable de agregar galactosa al lípido carrier (94 % de cobertura) (figura 44).

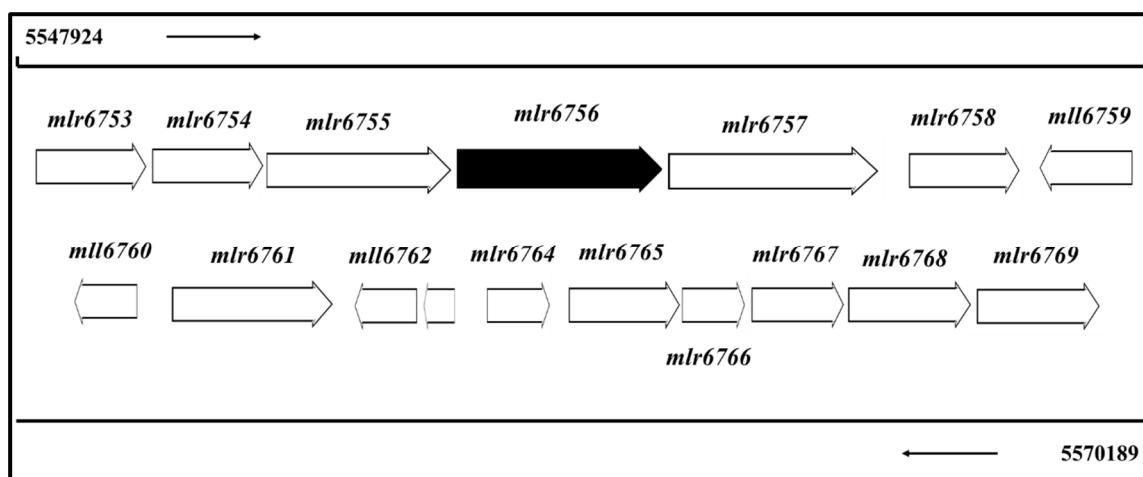


Figura 44: Locus que contiene una región de 22kb putativamente involucrada en la biosíntesis de polisacáridos en *Mesorhizobium japonicum* MAFF303099. Se muestra el contexto genómico del gen *mlr6756* (NC_002678.2; 5547924 - 5570189) seleccionado para mutagenizar (color negro). Los genes que codificarían proteínas relacionadas con la síntesis y transporte de polisacáridos extracelulares son: *mlr6753*, cuyo producto pertenece a la familia 4 de las glicosiltransferasas, *mlr6756* que codificaría una putativa proteína de la familia de transportadores del exopolisacáridos; *mlr6757* que correspondería a una proteína cuyo extremo C- terminal contiene un dominio conservado de nucleótido/nucleósido kinasas (NK) involucradas en el metabolismo de azúcares y otro dominio perteneciente a proteínas transportadoras multidrogas y del LPS (Wzx subfamilia MATE-like); *mlr6758* cuyo producto tiene homología con una aciltransferasa; *mlr6764* que codificaría una NDP-azúcar sintasa con homología con proteínas de la familia A de glicosiltransferasas; *mlr6765* cuyo producto presenta homología con proteínas de la familia de las aminotransferasas que intervendrían en la glicosilación de productos celulares; *mlr6766* con homología a una transferasa de azúcares y *mlr6769* cuyo producto estaría involucrado en la biosíntesis y exportación de polisacáridos.

Se ha propuesto que ExoP (786 aminoácidos) formaría un complejo con ExoQ y ExoT que es responsable de la secreción del succinoglicano ó EPS I en *E. meliloti* (Glucksmann et al., 1993). Del análisis bioinformático del genoma de *Mesorhizobium japonicum* MAFF 303099 pudimos determinar que el locus de genes *exo* de 30 kb de contiene el gen *mlr5276* cuya proteína de 795 aminoácidos (WP_010913094.1) sería homóloga a ExoP de (46.11 % de identidad y 65 % de similitud aminoacídica y 98 % de cobertura) y que el gen *mlr6756*, codificado en el nuevo locus de 22kb de *Mesorhizobium japonicum*

MAFF303099 (MAFF_RS27625) codificaría una putativa proteína de 734 aminoácidos (WP_010914299.1) perteneciente a la familia de transportadores de polisacáridos extracelulares con 23.24 % de identidad y 39 % de similitud con ExoP *E. meliloti*.

Además, el análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína Mlr6756 mostró 3 dominios conservados: el dominio GumC (COG3206) característico de proteínas involucradas en la biosíntesis de exopolisacáridos, el dominio Mrp (COG0489) relativo al control del ciclo celular, división celular y partición del cromosoma y un dominio perteneciente a la superfamilia P-loop NTPasa (cl21455), involucrado en diversas funciones celulares, entre las cuales se encuentran los transportadores ABC de gran variedad de compuestos que contienen un motivo de unión a nucleótido fosfato conservado (ATPasa Binding Cassette) (figura 45).

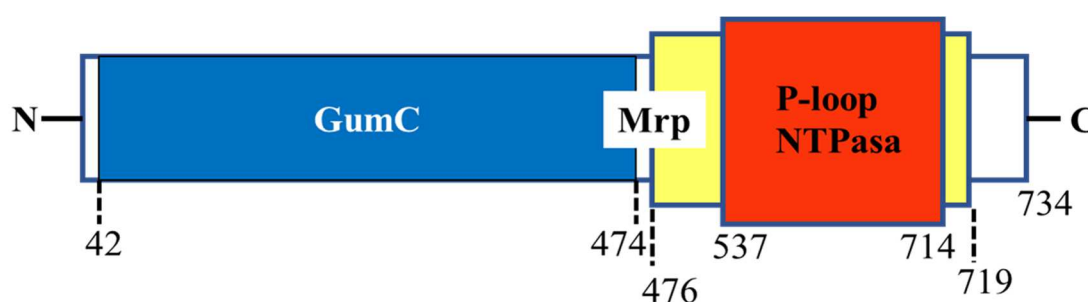


Figura 45: Dominios conservados presentes en la proteína Mlr6756 (WP_010914299.1) de 734 aminoácidos codificada por el gen *mlr6756* que estaría involucrada en la biosíntesis del EPS, afectando su transporte. En la figura se muestran los tres dominios conservados identificados: GumC (COG3206), Mrp (COG0489) y P-loop NTPasa (cl21455).

3. Generación de mutantes afectadas en la biosíntesis de polisacáridos extracelulares en *Mesorhizobium* spp.

Mediante mutagénesis dirigida se buscó interrumpir los genes candidatos *mll5252* y *mlr6756* de *M. japonicum* MAFF303099. En primer lugar, se generaron las construcciones *pK18mob::mll5252::Gm^r* y *pK18mob::mlr6756::Gm^r* que contienen un fragmento del gen de interés interrumpido por un cassette de resistencia a antibiótico Gentamicina (Gm) (Schäfer *et al.*, 1994). Estas construcciones permitieron obtener las mutantes que denominamos MAFFexoY y MAFFmlr6756 derivadas de la cepa MAFF303099 por recombinación homóloga con los genes silvestres correspondientes (figura 46). En la cepa *M. loti* AYAC 1 BII, no fue posible obtener mutantes con esta estrategia; si bien el gen homólogo al *mll5252* fue amplificado y clonado, no obtuvimos mutantes en AYAC 1 II por recombinación homóloga y en el caso del homólogo del gen *mlr6756* no pudo ser clonado.

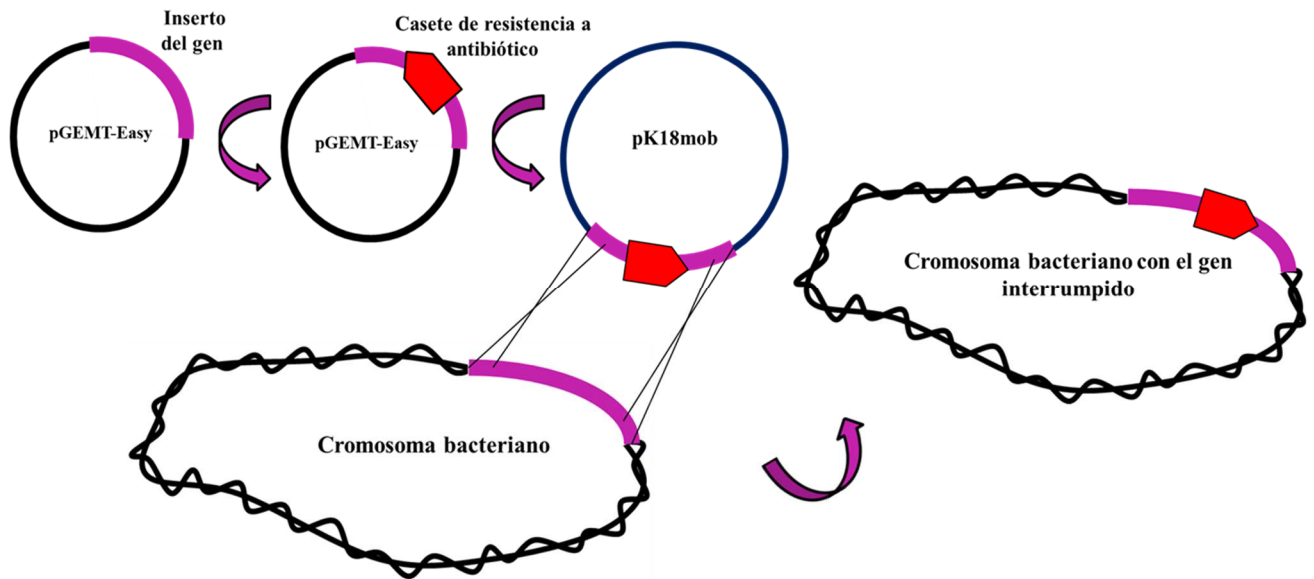


Figura 46: Mutagénesis dirigida por recombinación homóloga. Esquema de la estrategia de mutagénesis para obtener las mutantes MAFFexoY y MAFFmlr6756 en *M. japonicum* MAFF303099. Los genes de interés *mll5252* y *mlr6756*, fueron amplificados por PCR empleando primers específicos: 5252U (5'GTAAGCTTCGGTTCCTGCTGGTTC3') y 5252D (5'GTAAGCTTCCGTGTATTCCGCGTTCA3') para el gen *mll5252*; 6756U (5'GTAAGCTTCCGTCTCCCCTCCACCAG3') y 6756D (5'GTAAGCTTGGCTCGTTGTAGTGCTGTG3') para el gen *mlr6756*. El fragmento de PCR esperado fue clonado en el vector pGemT easy para luego ser interrumpido por inserción de un cassette de resistencia al antibiótico Gentamicina (Gm^R). El gen interrumpido fue subclonado en el vector pK18mob. Los vectores pK18mob::*mll5252*:: Gm^R y pK18mob::*mlr6756*:: Gm^R derivados permitieron generar las mutantes correspondientes por recombinación homóloga del gen interrumpido con el gen silvestre en la cepa parental *M. japonicum* MAFF303099.

Para verificar la interrupción del gen de interés por inserción del cassette de resistencia a Gentamicina (Gm^R) en *M. japonicum* MAFF303099, se amplificó el ADN genómico de las cepas candidatas mediante PCR, utilizando primers específicos (Figura 47, 48 y 49). La cepa MAFFexoY presentó dos productos de amplificación, un fragmento de 873 pb, correspondiente a la región del gen silvestre *mll5252*, y otro de 1573 pb que pertenece al gen interrumpido con Gm^R de 700 pb. Inferimos que se produjo un evento de recombinación homóloga simple y se incorporó el plásmido derivado de *pK18^{Tc}* en un único sitio del cromosoma, conservando una copia del gen *mll5252* trunco sin promotor y otra del gen interrumpido con el cassette de gentamicina manteniendo la resistencia a tetraciclina conferida por el *pK18^{Tc}* (Figura 47 derecha y figura 48 B). No fue posible obtener una mutante por recombinación homóloga doble en este gen.

Analizamos la región comprendida entre las posiciones 4181170 y 4183591 del genoma de *M. loti* MAFF 303099 (2421 pb) que abarcaría 170 nucleótidos río abajo del gen *mll5251* (es decir, 170 nt del stop del *mll5251*) y 300 nucleótidos más río arriba del gen *mll5252* (300 nt más del inicio AUG del *mll5252*) e identificamos dos posibles secuencias promotoras mediante el predictor de promotores bacterianos Softberry/BPROM. Encontramos un primer sitio de *binding* para factores de transcripción conocidos en la posición 4182551 correspondiente a metR (TTTTTCA Score -8) que correspondería al promotor del gen *mll5251* y otro sitio en la posición 4183434

correspondiente al promotor del gen *mll5252*, que contiene putativos sitios de binding de factores: rpoD15 (CTAAATAA Score – 12); gcvA (ATAAGCTA Score – 13) y crp (ATTTGTGA Score – 6). En base a estos resultados, el producto del gen *mll5251* se expresaría a partir del promotor que se encuentra río arriba de la región codificante y en la mutante estaría intacto por lo cual inferimos que el fenotipo observado correspondería a la interrupción del gen *mll5252* con el cassette de gentamicina (figura 48 B, correspondiendo a la opción 2).

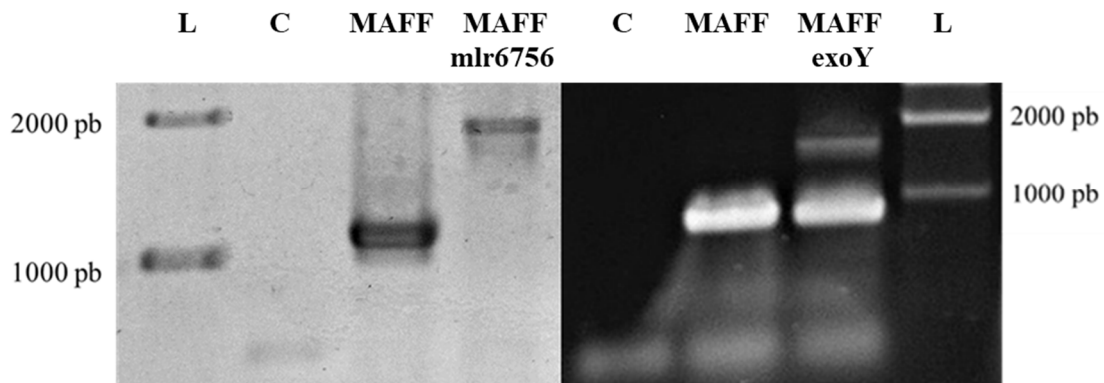
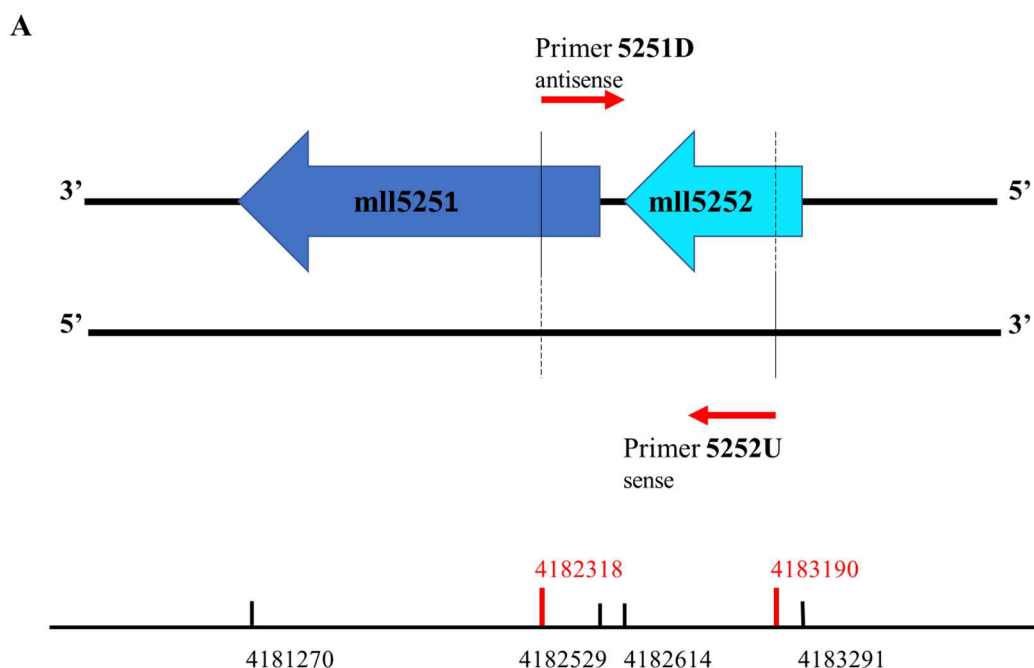


Figura 47: Análisis de las mutantes MAFFmlr6756 y MAFFexoY por PCR. Gel de agarosa 1 % de los productos de PCR obtenidos a partir de la amplificación del ADN genómico con primers específicos de cada gen de *M. japonicum* MAFF303099. Foto izquierda: marcador de peso molecular ladder 1kb (L), control negativo de reacción sin ADN molde (C); control positivo amplificación del gen *mll6756* a partir de ADN genómico de la cepa parental *M. japonicum* MAFF303099 (MAFF); productos de PCR empleando el ADN de la cepa mutante como molde y los primers específicos 6756U y 6756D (MAFFmlr6756). Foto derecha: control negativo de la reacción sin ADN molde (C); control positivo de amplificación a partir del ADN de la cepa *wt* *M. japonicum* MAFF303099 como molde con los primers específicos 5252U y 5251D (MAFF); reacción de amplificación del ADN genómico de la cepa MAFFexoY con los mismos primers (MAFFexoY); marcador de PM ladder 1kb (L).



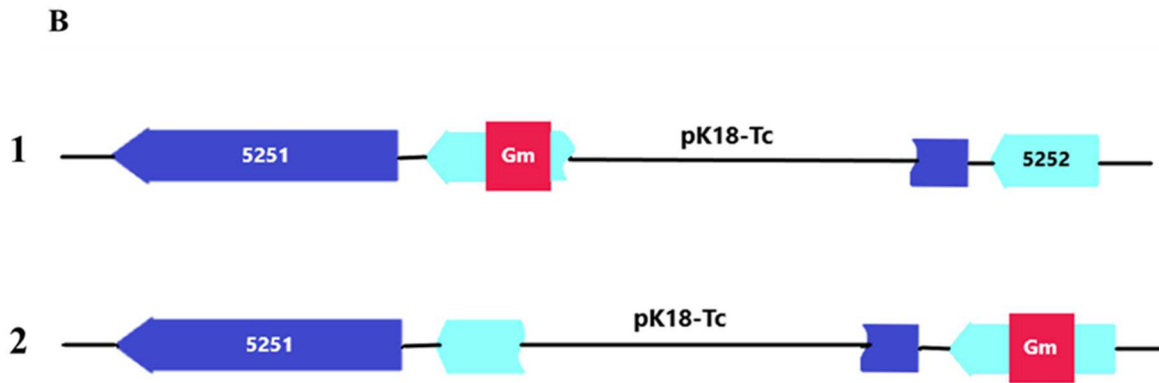


Figura 48: Mutagenesis del gen *mll5252*. **A.** Esquema de la región del cromosoma amplificada por los primers 5252U y 5251D de 872 pb. La región amplificada contiene gran parte del gen *mll5252* (576 pb), la región intergénica (85 pb) y 211 pb correspondientes al gen *mll5251*. **B.** Esquema de los dos eventos posibles de recombinación simple. En el caso 1 existen copias de los genes *mll5251* y *mll5252* con su región promotora completa. En el caso 2 el gen *mll5251* se conserva íntegro con su región promotora, mientras que el gen *mll5252* quedó interrumpido por el cassette de gentamicina, confiriendo el fenotipo mutante.

En cambio, en el caso de la mutante MAFF*mlr6756*, corroboramos que se produjo una doble recombinación homóloga que reemplazó el gen silvestre por el gen interrumpido, presentando un producto único de amplificación de 1808 pb correspondiente al gen *mlr6756* (1108 pb) con el cassette de gentamicina de 700 pb (Figura 47, izquierda). Esta mutante fue sensible a tetraciclina, confirmando la pérdida del *pK18^{Tc}* al resolverse la recombinación.

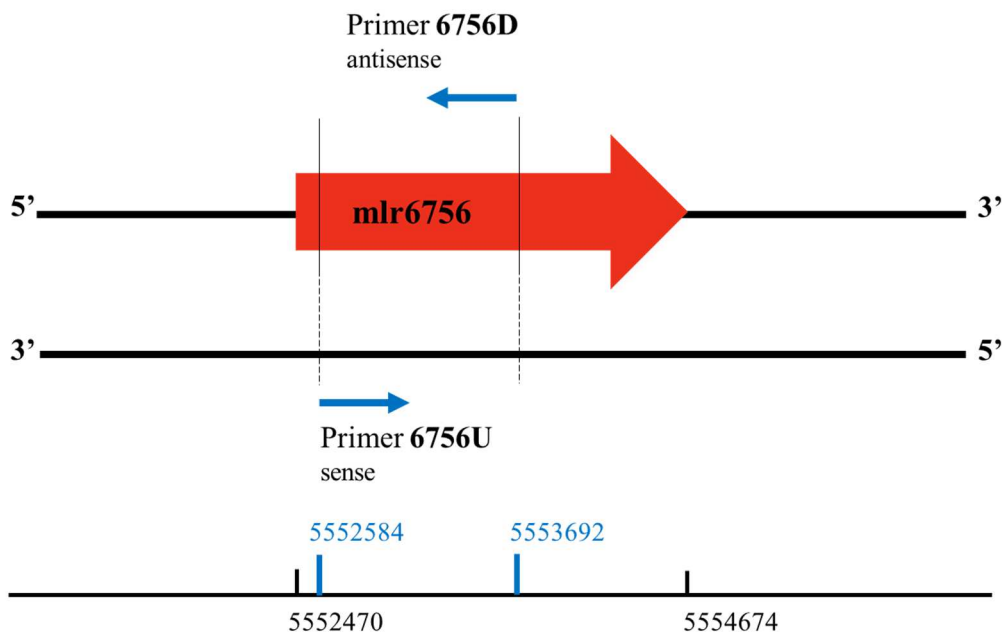


Figura 49: Esquema de la región del cromosoma amplificada por los primers 6756U y 6756D. La región amplificada contiene gran parte del gen *mlr6756* (1108 pb).

4. Caracterización de las mutantes MAFFexoY (mll5252) y MAFFmlr6756 derivadas de *Mesorhizobium japonicum* MAFF 3030399

En primer lugar, se analizó la capacidad de crecimiento de las cepas mutantes MAFFexoY y MAFFmlr6756 en cultivos planctónicos de 2 y 4 días, empleando diferentes condiciones nutricionales. Tanto en el medio rico TY como en el medio AB sacarosa 0.5 %, ambas mutantes crecieron sin diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre. En cambio, en medio Y adicionado con manitol 0.2 %, MAFFmlr6756 formó agregados visibles macroscópicamente mientras que la mutante MAFFexoY no presentó diferencias con respecto a la cepa *wt* (figura 50). Los agregados observados en MAFFmlr6756 persistieron aún sometiendo los cultivos líquidos a agitación fuerte (250 rpm) y extendiendo el período de incubación a 6 días. En medio Y semisólido, MAFFmlr6756 no mostró alteraciones en el crecimiento con respecto a la cepa *wt*. Dado que la composición de sales del medio AB contiene cloruro de amonio (NH₄Cl) como fuente de nitrógeno y que el medio Y carece del mismo, se suplementó este medio con NH₄Cl al 0.1 % (concentración equivalente a la del medio AB). De esta forma, observamos que los cultivos líquidos de la mutante MAFFmlr6756 restablecieron el crecimiento, independientemente de la fuente de carbono utilizada (sacarosa 0.5 % ó manitol 0.2 %).

En cuanto al fenotipo macroscópico de las colonias de las mutantes en medio semisólido AB sacarosa 0.5 %, luego de 5 días, la cepa MAFFexoY presentó colonias de menor tamaño, aspecto seco y sin brillo con respecto a la cepa parental, mientras que la mutante MAFFmlr6756 mostró un aspecto más mucoso y brillante que la silvestre en las mismas condiciones (figura 50, derecha).

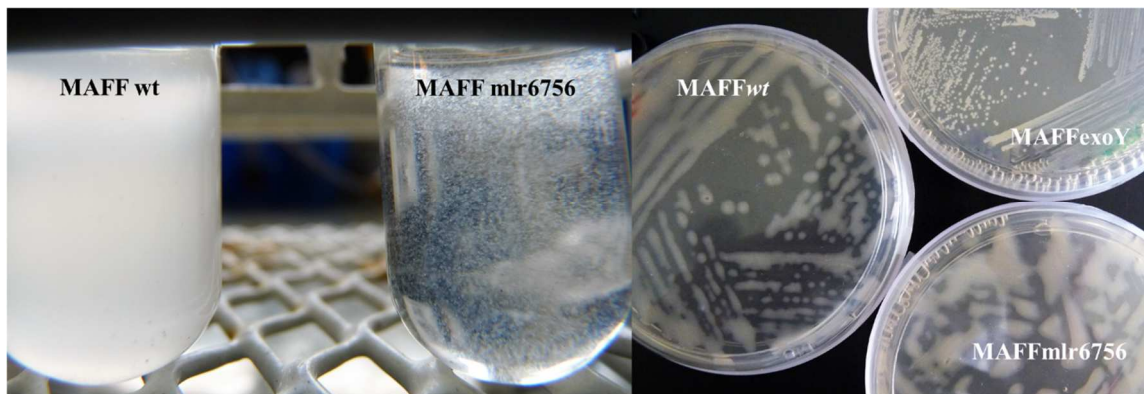


Figura 50: Caracterización fenotípica de las cepas derivadas de *M. japonicum* MAFF303099. Foto izquierda: Cultivos de 48 hs en medio líquido Y con manitol 0,2%, glutamato de sodio 0.11% y vitaminas de las cepas *M. japonicum* MAFF303099 silvestre ($OD_{600nm} \approx 1$) y MAFFmlr6756 ($OD_{600nm} \approx 0.05$). Foto derecha: Aspecto macroscópico de estriados y colonias de las cepas parental y mutantes derivadas MAFFexoY y MAFF mlr6756 en medio mínimo AB - agar con sacarosa 0.5 % luego de 5 días.

Debido a estas diferencias, estudiamos cualitativamente la producción de polisacáridos en las mutantes MAFFexoY y MAFFmlr6756 con respecto a la cepa parental *M. japonicum* MAFF303099 empleando colorantes. En presencia del calcofluor *white*, un fluorocromo que interacciona con β (1-3) y β (1-4) glucopiranosidos como la quitina y el

succinoglicano, es posible evidenciar estos polisacáridos por la emisión de fluorescencia luego de la exposición a luz UV. Así, luego de 5 días de cultivo en medio mínimo AB con 0.5 % sacarosa y 0.02 % de calcofluor, la cepa silvestre mostró fluorescencia, indicando la producción de exopolisacáridos con este tipo de enlaces como el succinoglicano (figura 51, izquierda). En cambio, la mutante MAFFexoY no presentó fluorescencia mientras que en MAFFmlr6756 fue más brillante que en la cepa silvestre. Esto sugiere que la cepa MAFFexoY sería incapaz de producir este tipo de exopolisacáridos en comparación con la cepa MAFFmlr6756 que resultó similar a la parental.

Por otra parte, utilizamos el colorante rojo congo, que se une a β (1-4) D-glucopiranosidos como la celulosa, y permite distinguir las colonias productoras de color rojo-rosado. Luego de 5 días de cultivo en las placas AB agar sacarosa 0.5 % con rojo congo 0,001%, la cepa MAFFexoY mostró una intensa coloración rosada, aspecto seco y morfología chata en sus macrocolonias, mientras que la mutante MAFFmlr6756 no se diferenció de la cepa silvestre en cuanto a la coloración con rojo congo, aspecto mucoso y morfología convexa de sus macrocolonias (figura 51, derecha).

Estos ensayos en conjunto sugieren que la mutación del gen *mlr5252* en MAFFexoY afectó la producción de polisacáridos extracelulares, evidenciable mediante los dos colorantes empleados, el calcofluor que interacciona con uniones glucosídicas del tipo β (1-3) y el rojo Congo con las β (1-4). Estos enlaces están presentes en el succinoglicano y la celulosa respectivamente. En el caso de la mutante del gen *mlr6756*, no fue posible evidenciar alteraciones notorias en dichos polisacáridos con ambos colorantes.

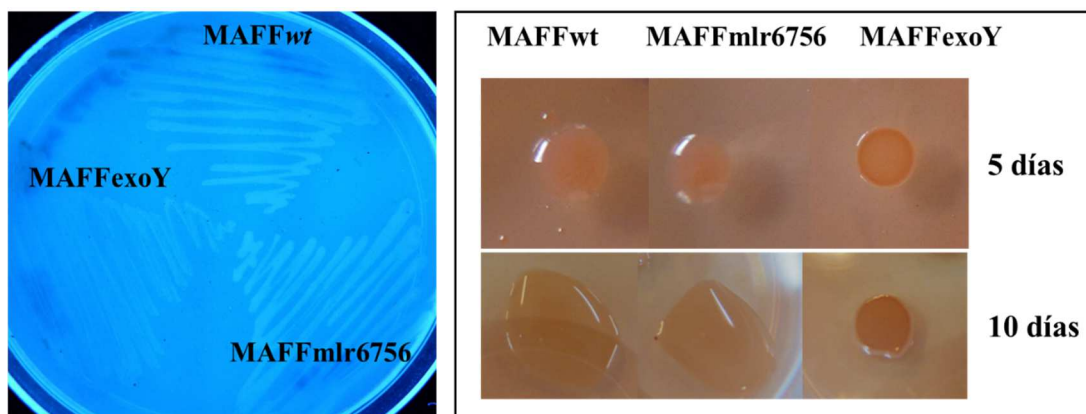


Figura 51: Tinción de polisacáridos extracelulares producidos por *M. japonicum* MAFF303099 y mutantes MAFFexoY y MAFFmlr6756. Foto izquierda: Se muestra la tinción con calcofluor 0.02% de la cepa silvestre y mutantes luego de 5 días de cultivo en medio AB- agar sacarosa 0.5%. Foto derecha: Aspecto de las macrocolonias de las cepas silvestre y mutantes teñidas con rojo congo 0,001 % luego de 5 y 10 días de cultivo en medio AB- agar sacarosa 0.5%.

4.1 Cuantificación de exopolisacáridos

Se evaluó cuantitativamente la producción de polisacáridos extracelulares en *M. japonicum* MAFF303099 y las mutantes MAFFexoY y MAFFmlr6756, analizando los sobrenadantes de cultivos de dichas cepas en diferentes condiciones nutricionales. Las cepas fueron cultivadas en el medio rico TY, en medio mínimo AB con sacarosa 0.5 % y

con manitol 0.2 % como fuentes de carbono, en medio Y adicionado con manitol 0.2 % ó alternativamente sacarosa 0.5 % como fuente de carbono y también en medio Y con agregado de NH_4Cl además de los suplementos anteriores.

La cepa *wt M. japonicum* MAFF303099 produjo EPS en todos los medios utilizados, mostrando la mayor producción en medio mínimo Y adicionado con sacarosa 0.5 % ($110,89 \pm 8,01 \mu\text{g}$ EPS/ml de cultivo) y superando en un 32 % a la producción alcanzada en el mismo medio con manitol 0.2 % como fuente de carbono ($74.82 \pm 5.04 \mu\text{g}$ de EPS/ml de cultivo) (T test, *** $p < 0.001$). Cuando se adicionó cloruro de amonio al medio Y, la producción de EPS disminuyó con respecto al mismo medio sin esta fuente de nitrógeno, aunque se mantuvo la preferencia por la sacarosa 0.5 % como fuente de carbono siendo dicha producción un 46 % mayor que con manitol 0.2 % ($67.71 \pm 7,46 \mu\text{g}$ EPS/ml de cultivo en el medio Y (NH_4Cl) sacarosa 0.5 % y $36.87 \pm 5.75 \mu\text{g}$ de EPS/ml de cultivo en el medio Y (NH_4Cl) manitol 0.2 %) (T test, *** $p < 0.001$). En cambio, en el medio AB, no se observaron diferencias significativas en la producción de EPS con respecto a las fuentes de carbono ensayadas (figura 52). En estos ensayos, observamos además que los medios mínimos favorecieron la producción de polisacáridos extracelulares por sobre el medio rico TY ($14.47 \pm 2.18 \mu\text{g}$ de EPS/ml de cultivo), siendo dicha producción 8 veces mayor en medio Y adicionado con sacarosa 0.5 % ($110,89 \pm 8,01 \mu\text{g}$ EPS/ml de cultivo) y 5 veces superior cuando se adicionó cloruro de amonio al medio Y sacarosa 0.5 % ($67,71 \pm 7.46 \mu\text{g}$ de EPS/ml de cultivo). En medio AB manitol 0.2 % ($44.10 \pm 6.77 \mu\text{g}$ de EPS/ml de cultivo) la producción de EPS resultó 3 veces mayor que en medio TY (figura 52).

Cabe mencionar, que la cepa *M. japonicum* MAFF303099 desarrolla biofilm *in vitro* sobre PE en el medio Y (Capítulo 1, sección 1.1.a de Resultados) por lo cual este resultado sugiere que esta mayor producción de polisacáridos extracelulares con respecto al resto de los medios de cultivo estudiados podría influir en el establecimiento de la matriz del biofilm, como se observó en otros rizobios pertenecientes a *Rhizobium leguminosarum*.

Cuando analizamos la producción de polisacáridos extracelulares en las mutantes, observamos diferencias significativas con respecto a la cepa parental (Figura 52). La cepa MAFFexoY se vió severamente afectada en todos los medios ensayados, mostrando una reducción del 72 % (Two-way ANOVA, ** $p = 0.0017$) en medio TY ($4.05 \pm 0.15 \mu\text{g}$ de EPS/ml de cultivo) y del 99 % ($0.49 \pm 0.20 \mu\text{g}$ de EPS/ml de cultivo) y 98 % ($0.61 \pm 0.03 \mu\text{g}$ de EPS/ml de cultivo) en AB con manitol 0.2 % y sacarosa 0.5 % respectivamente (Two-way ANOVA, **** $p < 0.0001$, para ambas comparaciones). En medio Y resultó incapaz de secretar EPSs, aún suplementando con ambas fuentes de carbono y en medio Y con agregado de NH_4Cl la producción fue significativamente más baja que en la cepa *wt* siendo: 95 % menor cuando se utilizó sacarosa 0.5 % ($3.27 \pm 0.85 \mu\text{g}$ de EPS/ml de cultivo) y 97 % menor cuando se empleó manitol 0.2 % ($1.00 \pm 0.17 \mu\text{g}$ de EPS/ml de cultivo), (Two-way ANOVA, **** $p < 0.0001$ para ambas comparaciones) (figura 52).

En cambio, la mutante MAFFmlr6756 no mostró diferencias significativas en la producción de polisacáridos extracelulares con respecto a la cepa silvestre tanto en medio TY ($12.02 \pm 1.80 \mu\text{g}$ de EPS/ml de cultivo) como en medio Y adicionado con NH_4Cl , (62.05 ± 3.93 y $39.41 \pm 4.19 \mu\text{g}$ de EPS/ml de cultivo cuando se suplementó con sacarosa

0.5 % y manitol 0.2 % respectivamente) y en medio AB ($41,21 \pm 1.85$ y 52.67 ± 6.34 μg de EPS/ml de cultivo cuando se utilizó como fuente de carbono sacarosa 0.5 % y manitol 0.2 % respectivamente) (figura 52). Cabe recordar que la mutante MAFFmlr6756 en cultivos líquidos de 4 días en medio Y desarrolló agregados por lo cual no se pudo determinar la producción de polisacáridos en dicha condición.

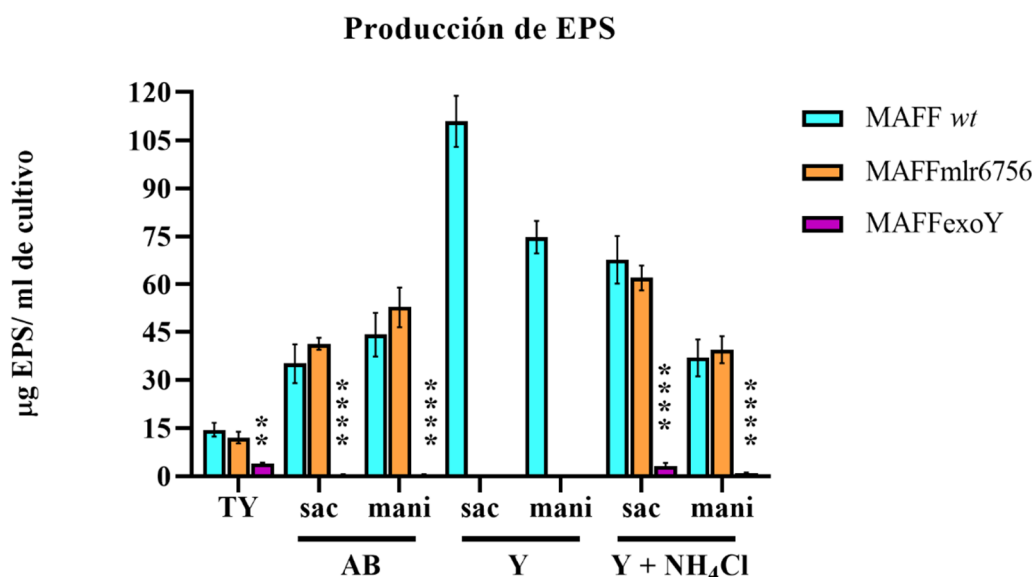


Figura 52: Producción de exopolisacáridos en cultivos de las cepas derivadas de *M. japonicum* MAF303099. Las bacterias fueron incubadas a 28°C bajo agitación a 200 rpm durante 4 días en los medios AB y Y suplementados con sacarosa 0.5 % (sac) y manitol 0.2 % (mani) como fuentes de carbono y con cloruro de amonio 0.1 % en el caso del medio Y+ NH₄Cl. Significación estadística: **** p < 0.0001, ** p < 0.01.

4.2 Análisis del lipopolisacárido en la mutante MAFFmlr6756

Debido a que la mutante MAFFmlr6756 no presentó disminución en cuanto a la secreción de polisacáridos extracelulares con respecto a la cepa silvestre, analizamos un polisacárido extracelular que se encuentra asociado a la membrana bacteriana, el lipopolisacárido (LPS). El LPS bacteriano está constituido por tres componentes, uno lipídico, denominado lípido A, que está anclado a la membrana y se conecta mediante un oligosacárido, ó core, con un componente polisacáridico complejo y ramificado también conocido como antígeno O, que se expone en la superficie bacteriana. La biosíntesis de este polisacárido requiere del agregado secuencial de sus componentes polisacáridicos y el lipídico y en etapas posteriores su transporte a la superficie celular. A partir de lisados bacterianos tratados con proteinasa K, visualizamos el LPS extraído de la superficie de las bacterias mediante SDS-PAGE 15 % teñido con plata y oxidación de sus carbohidratos con periodato (Hitchcock *and* Brown, 1983 y modificaciones de Russo *et al.*, 2015). La comparación de las preparaciones crudas del LPS obtenido de la cepa mutante MAFFmlr6756 y la silvestre MAFF 303099 luego de 48 hs de cultivo en medio AB sacarosa 0.5 % se muestra en la figura 53. La mutante MAFF mlr6756 no presentó alteraciones en el perfil electroforético del LPS con respecto a la cepa silvestre, mostrando

los componentes de baja y alta movilidad correspondientes a la porción del lípido A junto con el core oligosacárido denominado LPS-1 y al del antígeno O, correspondiente al LPS- 2 respectivamente (figura 53). Este resultado sugiere que el gen afectado en la mutante MAFFmlr6756 no alteraría la biosíntesis del LPS, su estructura o su transporte a la membrana bacteriana en las condiciones ensayadas. No se realizaron estudios adicionales del LPS producido en diferentes condiciones nutricionales.

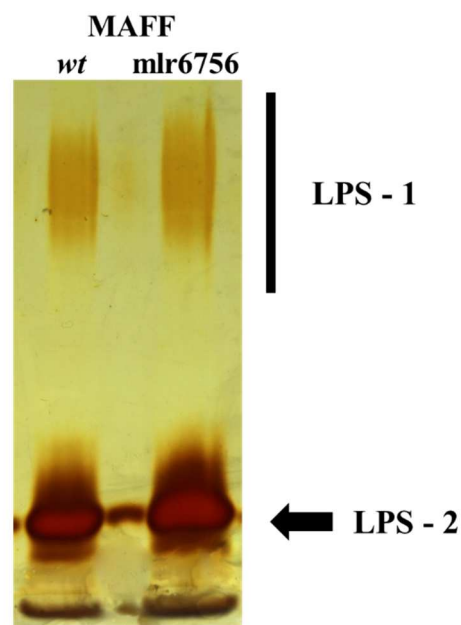


Figura 53: SDS-PAGE 15 % teñido con plata y oxidación de carbohidratos con periodato. Se sembraron 10 μ l del lisado de células (tal cual) correspondiente a la cepa parental ó la mutante MAFFmlr6756 de *Mesorhizobium japonicum* MAFF 3030399. Se indican los componentes del LPS de mayor (LPS-2) y menor (LPS-1) movilidad que son visualizados mediante la tinción específica de carbohidratos por oxidación con periodato (marrón).

4.3 Estudio de la autogregación en *M. japonicum* MAFF303099 y mutantes derivadas

En un cultivo bacteriano, la autoagregación de las células lleva a un aumento de la sedimentación que resulta en un agrupamiento de éstas en el fondo del recipiente de cultivo y clarificación del sobrenadante (Dorken *et al.*, 2012).

Estudios realizados en diferentes microorganismos que interaccionan con plantas como los fitopatógenos *Agrobacterium tumefaciens* (Tomlinson *et al.*, 2010) y *Xanthomonas campestris* (Dow *et al.*, 2003) o los simbioses *Rhizobium leguminosarum* (Russo *et al.*, 2006) y *Sinorhizobium meliloti* (Sorroche *et al.*, 2010) demostraron que mutantes afectadas en la producción de polisacáridos extracelulares manifiestan alteraciones en la agregación celular y en la capacidad de formación de biofilms. En el caso de *S. meliloti*, el EPS II ó galactoglucano, es el polisacárido involucrado de la autoagregación celular en cultivos planctónicos. Además, se encontró correlación positiva entre autoagregación y formación de biofilm en aislamientos autóctonos de *S. meliloti* que indicarían que ambos procesos dependen de las mismas fuerzas físicas adhesivas (Sorroche *et al.*, 2010; Sorroche *et al.* 2012).

Debido a la importancia de los polisacáridos de superficie en la agregación celular, se analizó en *M. japonicum* MAFF303099 y las mutantes de polisacáridos MAFFexoY y MAFFmlr6756 la capacidad de autoagregar mediante el monitoreo de la sedimentación

de los cultivos planctónicos en diferentes condiciones nutricionales y tiempos de reposo. En la figura 54 se muestran los resultados comparativos del porcentaje de agregación de las tres cepas luego de 18 hs de permanencia en reposo a temperatura ambiente, cuando se observa que la cepa *wt* alcanza entre un 80 y 96 % de agregación en las condiciones estudiadas. Encontramos que la cepa *wt* alcanza los mayores valores de autoagregación en medio Y (96.2 ± 2.7 % para Y manitol 0.2 % y 93.3 ± 1.4 % para Y sacarosa 0.5 %) y no mostró diferencias significativas en la agregación con respecto a la fuente de carbono en ningún medio utilizado.

La agregación en MAFFexoY resultó drásticamente afectada con respecto a la cepa *wt* en todas las condiciones estudiadas, alcanzando porcentajes entre 0 % y 28 % (en el caso de los cultivos en medio Y, figura 54).

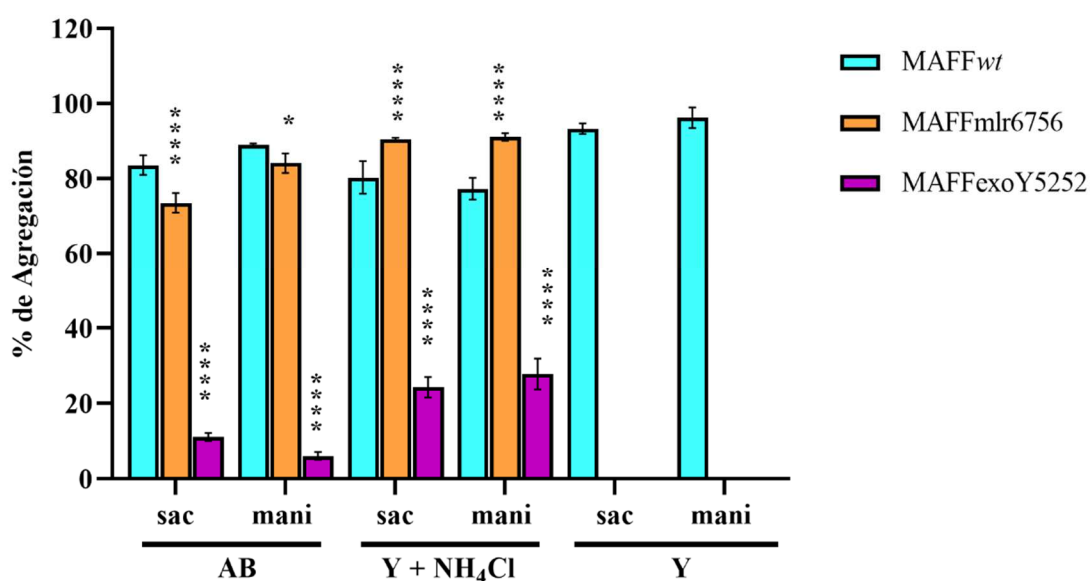


Figura 54: Porcentaje de agregación de *M. japonicum* MAFF303099 y sus derivadas MAFFmlr6756 y MAFFexoY en diferentes condiciones nutricionales. Se cuantificó el porcentaje de agregación de los cultivos que permanecieron en reposo durante 18hs a temperatura ambiente. Los ensayos se realizaron a partir de cultivos de 48 hs en agitación (200 rpm) de OD inicial $600\text{nm} = 1$, en los medios AB y Y suplementados con sacarosa 0.5% (sac) y manitol 0.2% (mani) como fuentes de carbono y con cloruro de amonio 0.1 % en el caso del medio Y+ NH₄Cl. Significación estadística: * $p < 0.05$ como se indica en el gráfico y **** $p < 0.0001$ para las comparaciones restantes. No se informan los porcentajes de agregación en la mutante MAFFmlr6756 debido a su imposibilidad de crecer en forma planctónica en los niveles de la cepa *wt* en las condiciones del experimento. Las mediciones fueron realizadas por triplicado en tres experimentos independientes.

En el medio AB sacarosa 0.5 %, la disminución de la agregación fue del 87 % (con un % de agregación celular = 11.1 ± 1.1) y en AB manitol 0.2 % el descenso fue del 94 % (con un % de agregación celular = 6.1 ± 1.0), en tanto que en el medio Y adicionado con cloruro de amonio, la disminución fue del 70 % cuando se utilizó sacarosa 0.5 % como fuente de carbono (con un % de agregación celular = 24.3 ± 2.7) y del 64 % cuando se suplementó con manitol 0.2 % (con un % de agregación celular = 27.8 ± 4.1) (Two-way ANOVA, **** $p < 0.0001$, para todos los medios analizados).

La mutante MAFFmlr6756 mostró porcentajes de agregación en un rango de entre 74

y 91 % en las condiciones de estudio. Los valores máximos de agregación de esta mutante superaron a la cepa *wt* en un 13 y 18 % cuando fue cultivada en medio Y con cloruro de amonio suplementado con sacarosa 0.5 % y manitol 0.2 % respectivamente (% de agregación celular = 90.4 ± 0.4 para Y NH_4Cl sacarosa 0.5 % y 91.1 ± 1.0 para Y NH_4Cl manitol 0.2 %). En cambio, cuando se analizaron cultivos en medio AB, el porcentaje de autoagregación fue inferior al de la cepa *wt*, con una disminución del 12 % cuando los cultivos fueron suplementados con sacarosa 0.5 % y del 6 % cuando la fuente de carbono fue manitol 0.2 % (% de agregación celular = 73.5 ± 2.6 para AB sacarosa 0.5 % y 84.1 ± 2).

En un ANOVA de dos factores, encontramos que las diferencias entre dicha mutante y la cepa *wt* resultan significativas (Two-way ANOVA, * $p < 0.05$ para el medio AB manitol 0.2 % y **** $p < 0.0001$ para las restantes comparaciones, figura 54).

Para profundizar el análisis de la capacidad de agregación de la mutante MAFFmlr6756 con respecto a la *wt*, monitoreamos cultivos planctónicos en tiempos menores a 18 horas (6 y 9 horas). En la figura 55 se muestra la evolución en el tiempo de la agregación porcentual en medio Y con cloruro de amonio 0.1 %. Observamos que esta mutante manifestó un mayor porcentaje de agregación entre las 9 y 18 horas, mientras que a las 6 horas no hubo diferencias entre ambas cepas. Cuando la fuente de carbono fue sacarosa 0.5 % la diferencia entre ambas cepas fue del 27 % a las 9 horas (T-test, *** $p < 0.001$) y del 11 % a las 18 horas (T-test, * $p < 0.05$), mientras que con manitol 0.2 % la diferencia fue del 16 % a las 9 horas (T-test, * $p < 0.05$) y del 15 % a las 18 horas (T-test, ** $p < 0.01$). Tanto la mutante como la cepa *wt* no mostraron diferencias significativas en la agregación en cuanto a la variación de la fuente de carbono empleada (figura 55).

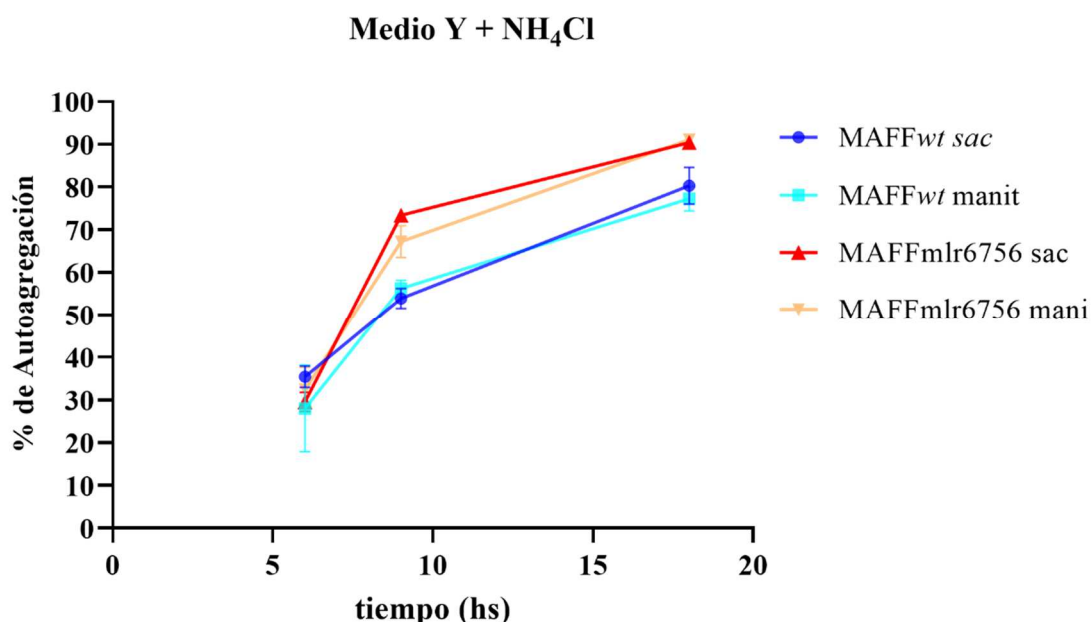


Figura 55: Porcentaje de autoagregación en *Mesorhizobium japonicum* MAFF303099 y la mutante MAFFmlr6756 en diferentes tiempos en medio Y + NH_4Cl . Las cepas fueron cultivadas en agitación (200 rpm) en medio Y adicionado con cloruro de amonio 0.1 % y sacarosa 0.5 % ó manitol 0.2 % hasta una $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1$ y luego se dejaron en reposo durante 6, 9 y 18 horas.

En cambio, en el medio AB la cepa *wt* fue la que mostró mayor porcentaje de agregación

cuando la fuente de carbono fue manitol 0.2 %, siendo un 19 % menor la autoagregación en la mutante a las 6 horas de sedimentación (T-test, $**p < 0.01$) y 39 % menor a las 9 horas (T-test, $**p < 0.01$) evidenciando una marcada deficiencia para autoagregar en la cepa MAFFmlr6756 en este medio y a tiempos menores a 18 horas. Cuando se utilizó sacarosa 0.5 % como fuente de carbono no hubo diferencias significativas hasta las 18 horas de sedimentación, momento en el que la mutante manifestó un 12 % menos de agregación que la cepa *wt* (T-test, $**p < 0.01$) (figura 56).

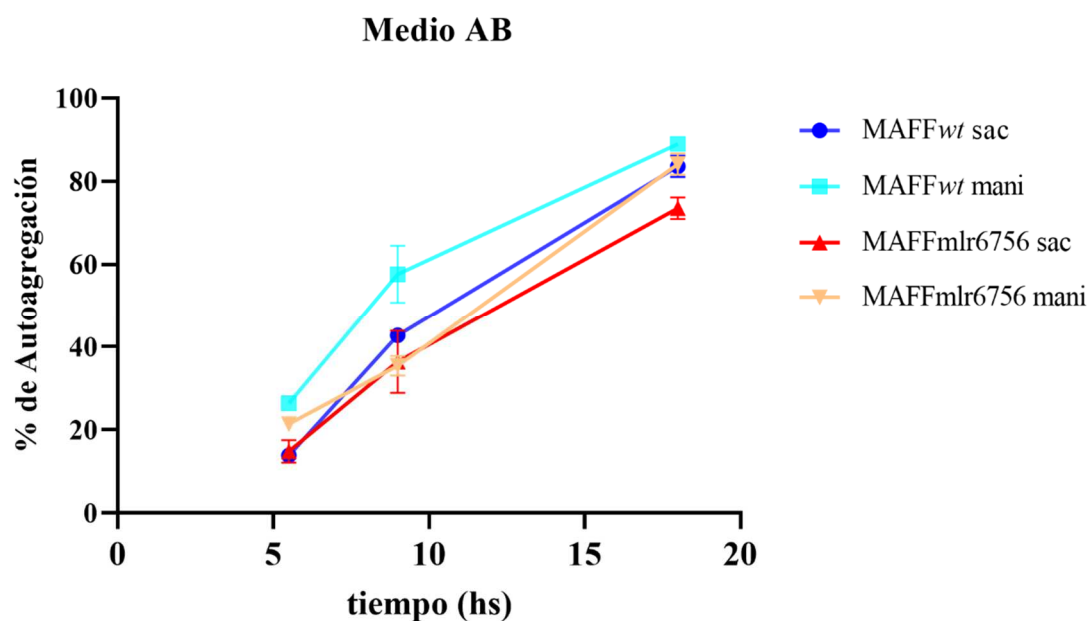


Figura 56: Porcentaje de autoagregación en *Mesorhizobium japonicum* MAFF303099 y la mutante MAFFmlr6756 en diferentes tiempos en medio AB. Las cepas fueron cultivadas en agitación (200 rpm) en medio AB adicionado con sacarosa 0.5 % ó manitol 0.2 % hasta una $OD_{600nm} = 1$ y luego se dejaron en reposo durante 6, 9 y 18 horas

Cuando cultivamos las distintas cepas en medio rico TY, las células fueron incapaces de autoagregar (aun extendiendo el período de medición a 24 horas la agregación fue menor al 0.5%) posiblemente, debido a la menor producción de polisacáridos extracelulares en este medio de cultivo.

4.4 Estudio de la motilidad de *M. japonicum* MAFF303099 y mutantes derivadas

Con el objeto de estudiar el alcance de las mutaciones sobre comportamientos asociados a la formación de biofilms, analizamos la motilidad mediada por flagelo en las mutantes MAFFexoY y MAFFmlr6756. Empleando placas de agar 0.3 %, se evaluó la motilidad tipo *swimming* y en placas 0.5 % el *swarming*. Las mediciones de los diámetros del desplazamiento de cada cepa fueron registradas luego de 7 días de incubación (D'Antuono *et al.*, 2005).

El análisis de ANOVA de dos factores para la motilidad *swarming* mostró diferencias significativas en los resultados obtenidos ($**** p < 0.0001$) dónde la mayor varianza (63 %) fue aportada por la diferencia entre cepas. La mutante MAFFexoY fue la mas afectada,

mostrando disminuida significativamente su capacidad de *swarming* con respecto a la cepa *wt*, en todas las condiciones nutricionales estudiadas. Así, MAFFexoY no logró desplazarse mediante *swarming* en medio AB (100 % de reducción), mientras que esta migración se redujo un 73 % con respecto a la cepa silvestre (Two-way ANOVA, **** $p < 0.0001$) en medio Y suplementado con sacarosa 0.5 % y 71 % (Two-way ANOVA, **** $p < 0.0001$) si la fuente de carbono fue manitol 0.2 %. Cuando el medio Y fue adicionado con cloruro de amonio, el *swarming* se redujo un 48 % con respecto a la cepa silvestre (Two-way ANOVA, ** $p < 0.01$) con sacarosa 0.5 % y 42 % (Two-way ANOVA, ** $p < 0.01$) si la fuente de carbono fue manitol 0.2 % (figura 57).

En cuanto a la mutante MAFFmlr6756, observamos un comportamiento diferencial frente a las condiciones nutricionales ensayadas. En el medio AB manitol 0.2 %, la motilidad *swarming* aumentó un 134% con respecto a la cepa salvaje (Two-way ANOVA, **** $p < 0.0001$) mientras que permaneció invariable en AB sacarosa 0.5 %. En cambio, en medio Y presentó una disminución del *swarming* del 25 % cuando la fuente de carbono fue sacarosa 0.5 % (Two-way ANOVA, ** $p < 0.01$) mientras que no sufrió alteraciones en Y manitol 0.2 %. Cuando el medio Y fue adicionado con cloruro de amonio, tanto con sacarosa 0.5 % como con manitol 0.2 % como fuente de carbono, la motilidad *swarming* de esta mutante no mostró diferencias significativas con respecto a la cepa parental (figura 57). En estos ensayos de motilidad, fue posible evaluar a la mutante MAFFmlr6756 en medio Y semisólido.

En cuanto a la motilidad tipo *swimming*, el análisis de ANOVA de dos factores mostró diferencias significativas en los resultados obtenidos (**** $p < 0.0001$), aunque la mayor varianza en este caso (90.73 %) fue aportada por las condiciones nutricionales de los diferentes medios de cultivo y sus aditivos (figura 57).

Encontramos una disminución significativa en la capacidad de *swimming* en ambas mutantes en medio Y con sacarosa 0.5 %, siendo del 40 % en la mutante MAFFexoY y del 29 % en la cepa MAFFmlr6756 (Two-way ANOVA, **** $p < 0.0001$). En cambio, cuando el medio Y fue suplementado con manitol 0.2 %, la diferencia fue menor (31 % y 26 % para MAFFexoY y MAFFmlr6756 respectivamente -Two-way ANOVA, **** $p < 0.0001$) (figura 41). Finalmente, la mutante MAFFmlr6756 sufrió una disminución en el *swimming* del 10%, cuando fue ensayada en medio Y con cloruro de amonio y manitol 0.2 % (Two-way ANOVA, ** $p < 0.01$) (figura 57).

En conjunto, los estudios efectuados sobre la mutante MAFFexoY mostraron que dicha mutante es incapaz de producir EPS y que dicho polisacárido está involucrado en la autoagregación y motilidad *swarming*. La mutante MAFFmlr6756 no mostró alterada la producción del EPS, aunque si su capacidad de autoagregación y motilidad *swarming*, sugiriendo que la mutación del gen *mlr6756* no afectaría la biosíntesis del exopolisacárido, mientras que no se descarta que fueran alteradas etapas posteriores a su síntesis que determinan localización y/o estructura final.

Motilidad

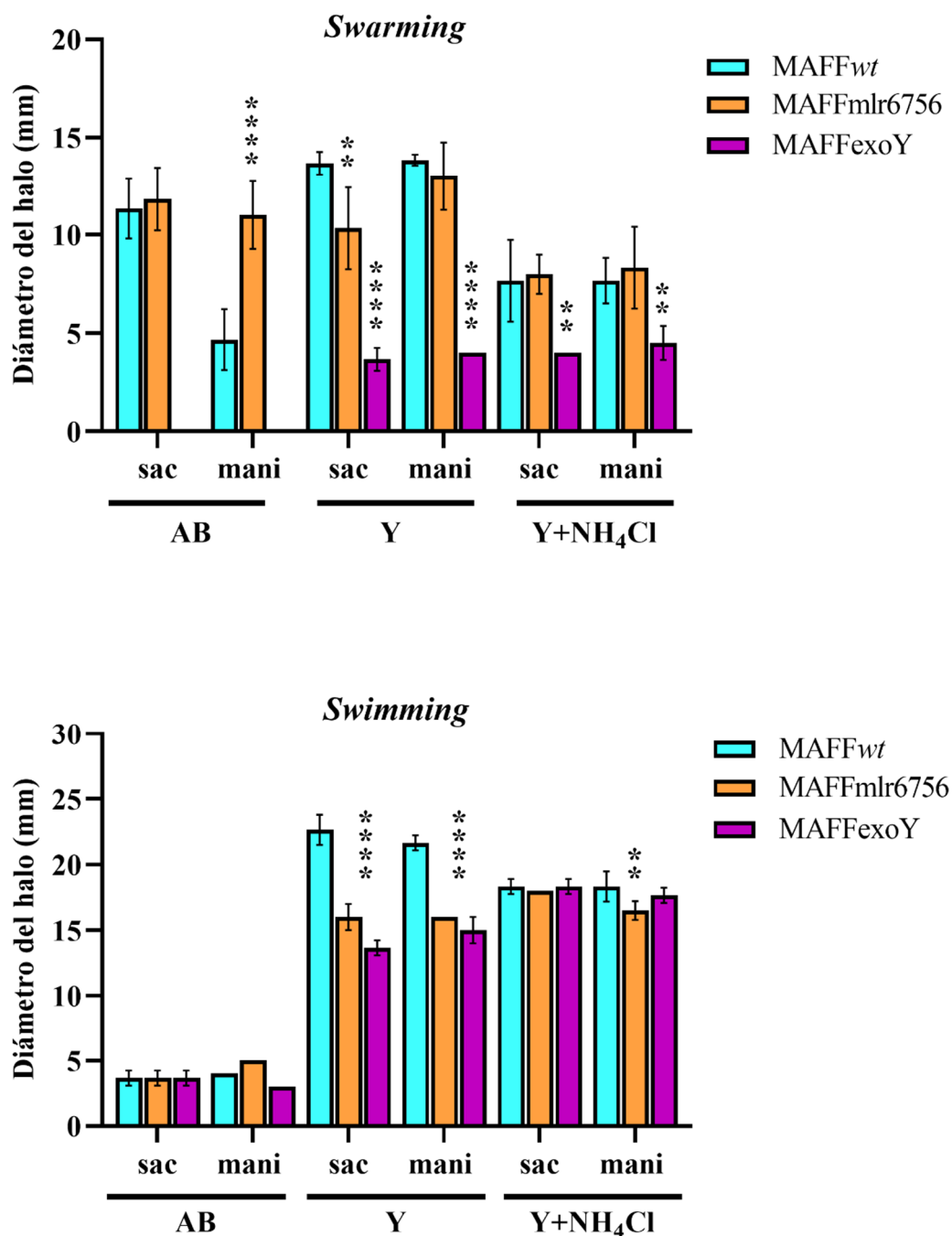


Figura 57: Análisis de la motilidad dependiente de flagelo en *M. japonicum* MAFF303099 y sus derivadas MAFF_{mlr6756} y MAFF_{exoY} en diferentes condiciones nutricionales. Se cuantificó el desplazamiento *swarming* (en placas agar 0.5 %, panel superior) o el *swimming* (en agar 0.3 %, panel inferior) midiendo el diámetro alcanzado por la cepa luego de 7 días de incubación en el medio indicado. Los medios AB y Y fueron suplementados con sacarosa 0.5 % (sac) y manitol 0.2 % (mani) como fuentes de carbono o con cloruro de amonio 0.1 % (Y+ NH₄Cl). Significación estadística: ****p < 0.0001 y **p < 0.01.

5. Estudio sobre la capacidad de formación de biofilm en las mutantes MAFF *exoY* y MAFF *mlr6756*

Nuestro interés se centró en estudiar el comportamiento de las mutantes MAFF*exoY* y MAFF*mlr6756* con respecto a la cepa parental *M. japonicum* MAFF303099 durante la formación de biofilms sobre distintos soportes abióticos en las condiciones nutricionales en las que se cuantificó la producción de polisacáridos extracelulares. Para una mejor caracterización de la capacidad de adhesión utilizamos como soportes: placas multiwell de poliestireno (PE) y de policloruro de vinilo (PVC), tubos cónicos de polipropileno (PP), cubreobjetos y tubos de vidrio (borosilicato).

5.1 Adhesión al Poliestireno (PE)

Se evaluó la capacidad de formación de biofilm sobre PE en las tres cepas de *Mesorhizobium* mediante la cuantificación de la biomasa adherida empleando cristal violeta (figura 42). La máxima adhesión observada en la cepa silvestre fue en medio mínimo Y adicionado con manitol 0.2 % ($A_{595 \text{ nm}}$: 0.92 ± 0.11) y con sacarosa al 0.5 % ($A_{595 \text{ nm}}$: 0.88 ± 0.13) mientras que en el medio AB con sacarosa 0.5 % fue menor ($A_{595 \text{ nm}}$: 0.36 ± 0.035). En cambio, esta cepa mostró muy baja adhesión al PE en medio TY ($A_{595 \text{ nm}}$: 0.15 ± 0.06), así como en AB manitol 0.2 % ($A_{595 \text{ nm}}$: 0.18 ± 0.02) y en el medio Y con cloruro de amonio ($A_{595 \text{ nm}}$: 0.15 ± 0.03 con sacarosa y 0.08 ± 0.02 con manitol), siendo la adhesión en estos medios de cultivo entre 80 % y 91 % menor que en medio Y manitol 0.2 % (figura 58).

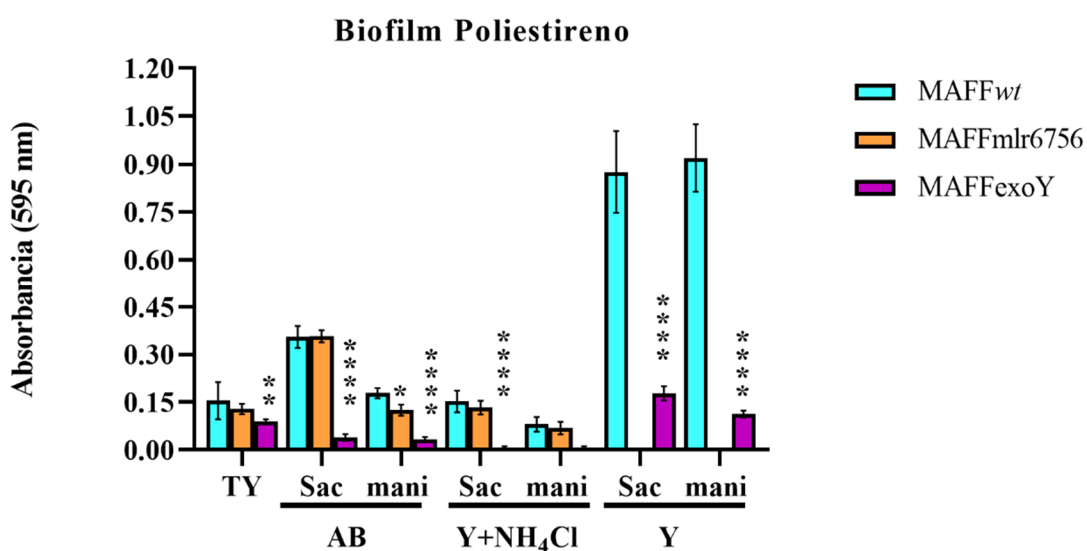


Figura 58: Formación de biofilm en placas multiwell de poliestireno en *M. japonicum* MAFF303099 y mutantes. Las cepas fueron incubadas a 28°C durante 4 días a 200 rpm, partiendo de una $OD_{600 \text{ nm}}$ inicial del orden de 0.001. Two-way ANOVA, significación estadística: **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

En cuanto a la mutante MAFFmlr6756 en las condiciones ensayadas, la adhesión al PE fue similar a la cepa silvestre en los medios TY, Y con cloruro de amonio y AB sacarosa 0.5 %, en cambio en medio AB manitol 0.2% su capacidad de adhesión fue 28 % menor con respecto a la cepa silvestre (Two-way ANOVA, * $p < 0.05$).

La mutante MAFFexoY mostró una severa disminución en la adhesión con respecto a la cepa *wt* en todos los medios ensayados (Two-way ANOVA ** $p < 0.01$ para el medio TY y **** $p < 0.0001$ para el resto de los medios) (figura 58).

Cabe recordar que la mutante MAFFmlr6756 desarrolla agregados en medio líquido Y a los cuatro días de ensayo, tiempo en el que se evaluó el biofilm (mencionado en la sección 4). Estos agregados no se observan cuando el medio es adicionado con cloruro de amonio. Por lo tanto, se suplementó el medio Y con cloruro de amonio 0.1 % y se evaluó la capacidad de MAFFmlr6756 de establecer biofilm en estas condiciones. Observamos que tanto la cepa silvestre como la mutante MAFFmlr6756 se comportaron de forma similar, aunque la adhesión resultó disminuida con respecto al mismo medio sin agregado de cloruro de amonio (83 % y 91 % cuando se adicionó sacarosa 0.5 % y manitol 0.2 % respectivamente).

5.2 Adhesión al Policloruro de vinilo (PVC)

Con el fin de caracterizar el efecto de la mutación en el gen *mlr6756* sobre la formación de biofilm in vitro, evaluamos la adhesión sobre placas multiwell de policloruro de vinilo (PVC) como una superficie alternativa al PE (figura 59).

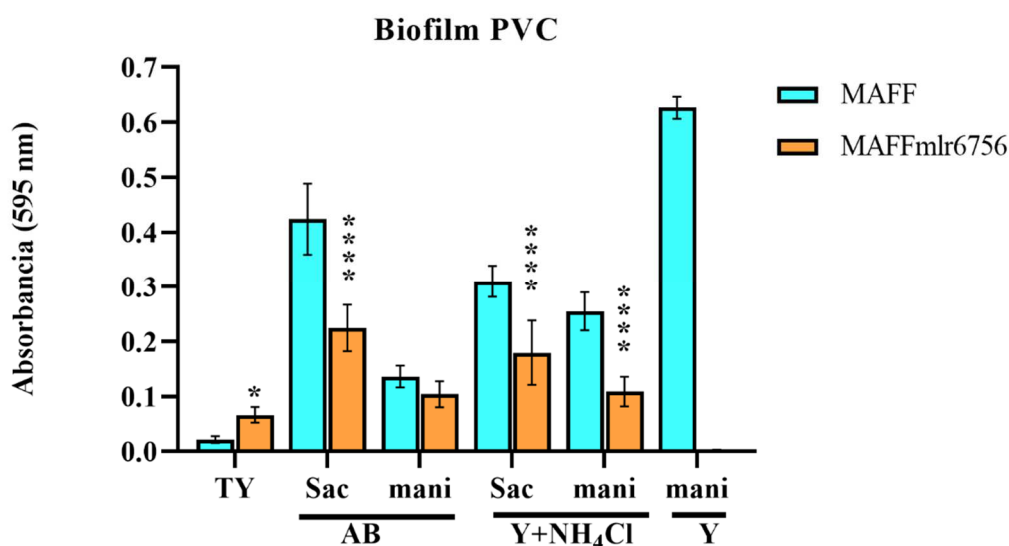


Figura 59: Formación de biofilm en *M. japonicum* MAFF303099 y MAFFmlr6756 sobre placas multiwell de Policloruro de vinilo (PVC). La mutante MAFFexoY no fue analizada sobre este soporte. Las células fueron incubadas a 28°C durante 4 días a 200 rpm, partiendo de una OD_{600nm} inicial 0.001. Multiple t test, Significación estadística: **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

La cepa silvestre *M. japonicum* MAFF303099 presentó una adhesión máxima al PVC en medio Y con manitol ($A_{595 \text{ nm}}: 0.63 \pm 0.02$), seguida por el medio AB con sacarosa (A_{595

$nm: 0.42 \pm 0.06$) y por el medio Y con cloruro de amonio y sacarosa ($A_{595 nm}: 0.31 \pm 0.03$) ó manitol ($A_{595 nm}: 0.25 \pm 0.03$) como fuentes de carbono. En los medios mínimos ensayados, a excepción de AB manitol 0.2 % (medio en el que no mostró diferencias significativas), la mutante MAFFmlr6756 resultó significativamente deficiente en su capacidad de formar biofilm sobre PVC, presentando una disminución con respecto a la cepa parental del 57 % para el medio Y (NH_4) manitol ($A_{595 nm}: 0.11 \pm 0.03$, T test, **** $p < 0.0001$), del 42 % para el medio Y(NH_4) sacarosa ($A_{595 nm}: 0.18 \pm 0.06$, T test, **** $p < 0.0001$) y del 47 % en medio AB sacarosa ($A_{595 nm}: 0.22 \pm 0.04$, T test, **** $p < 0.0001$).

En el medio rico TY, contrariamente al resto de las condiciones, la mutante MAFFmlr6756 mostró tres veces mayor adhesión al PVC que la cepa parental (T test, * $p < 0.05$), aunque la formación de biofilm en este medio fue muy baja en ambas ($A_{595 nm}: 0.022 \pm 0,006$ para la cepa wt; $A_{595 nm}: 0.066 \pm 0,0144$ para la mutante, figura 59). Debido a que esta mutante desarrolló agregados en cultivos planctónicos en medio Y, no fue posible evaluar la formación de biofilm en esta condición.

5.3 Adhesión al Polipropileno (PP)

Se estudió la adhesión otro soporte abiótico hidrofóbico, empleando tubos cónicos de polipropileno (PP). *M. japonicum* MAFF303099 presentó la mayor adhesión en la interfase aire - líquido sobre la pared del tubo, cuando se incubó con agitación en medio Y suplementado con cloruro de amonio y sacarosa 0.5 % ($A_{595} = 0.19 \pm 0.03$) y con manitol 0.2 % ($A_{595} = 0.11 \pm 0.01$), tanto como en medio Y con sacarosa 0.5 % ($A_{595} = 0.17 \pm 0.06$) y con manitol 0.2 % ($A_{595} = 0.09 \pm 0.03$). En este soporte las diferencias entre el medio Y suplementado con cloruro de amonio 1 % y sin suplementar no resultaron significativas (figura 60).

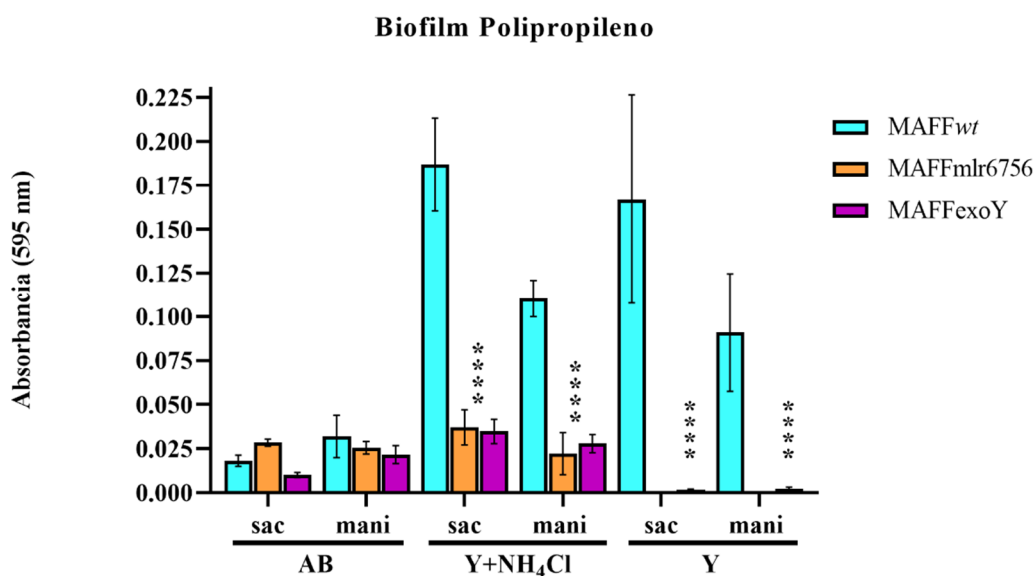


Figura 60: Formación de Biofilm en tubos de Polipropileno en *M. japonicum* MAFF303099 y mutantes derivadas sobre tubos de polipropileno. Las células fueron incubadas a 28°C durante 4 días a 200 rpm, partiendo de una OD_{600nm} inicial del orden de 0.001. (Two- way ANOVA, Significación estadística: **** $p < 0.0001$).

Cuando la cepa silvestre fue cultivada en medio AB, la formación de biofilm fue menor que cuando se la cultivó en medio Y (10 veces menor con sacarosa 0.5 % y 3.5 veces menor en cultivos con manitol 0.2 % como fuentes de carbono).

En cuanto a las mutantes, pudimos observar que en medio Y con cloruro de amonio, ambas mostraron una deficiencia similar y significativa con respecto a la cepa *wt* en su capacidad de adhesión a este soporte, en la mutante MAFFmlr6756 fue del 80 % con ambas fuentes de carbono, mientras que en la mutante MAFFexoY la disminución fue del 81 % cuando se utilizó sacarosa y del 75 % cuando se adicionó manitol (Two-way ANOVA, **** $p < 0.0001$, para las cuatro comparaciones). No se observaron diferencias significativas entre la cepa *wt* y mutantes en medio AB con ambas fuentes de carbono. La mutante MAFFexoY fue incapaz de adherirse al polipropileno en medio Y con ambas fuentes de carbono (figura 60).

5.4 Adhesión al Vidrio

Se cuantificó el biofilm formado sobre vidrio en inmersión, empleando cubreobjetos sumergidos en los distintos medios de cultivo inoculados con las cepas derivadas de *M. japonicum* MAFF303099. Bajo esta condición, los valores de adhesión fueron muy cercanos a los blancos y no se apreciaron diferencias entre las cepas en los medios estudiados, a excepción del medio Y suplementado con sacarosa 0.5 % como fuente de carbono, en el cual la cepa *wt* mostró gran capacidad de adhesión al soporte mientras que la mutante MAFFexoY manifestó disminuida dicha capacidad en un 92% (T test, ** $p < 0.01$, figura 61). Cuando las bacterias fueron cultivadas en medio Y con manitol 0.2 % como fuente de carbono, la capacidad de adhesión fue menor que con sacarosa y la mutante MAFFexoY manifestó una disminución del 57% con respecto a la cepa *wt*, haciendo menos significativa la diferencia entre ambas (T test, * $p < 0.05$, figura 61).

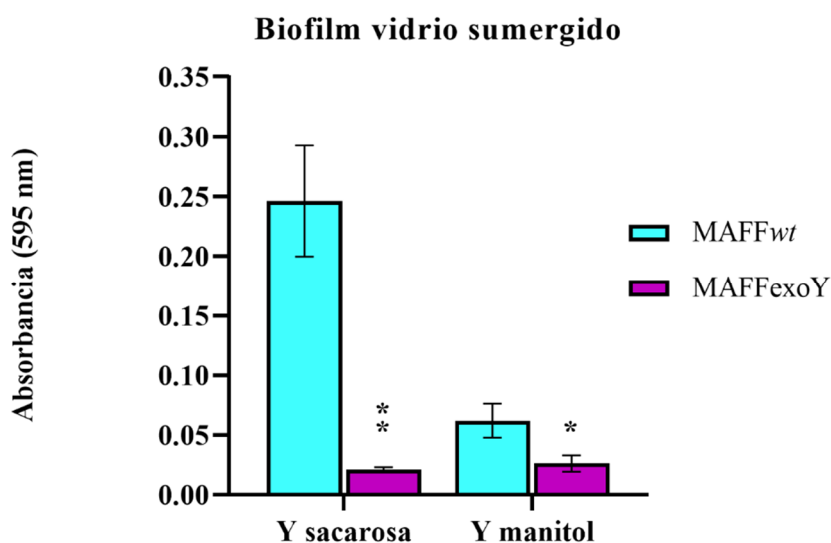


Figura 61: Formación de Biofilm sobre cubreobjetos de vidrio en *M. japonicum* MAFF303099 y mutante MAFFexoY. Las células fueron incubadas a 28°C durante 4 días a 200 rpm, partiendo de una OD_{600nm} inicial del orden de 0.001. T test, significación estadística: ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Con el fin de evaluar el comportamiento de las bacterias en cuanto a la formación del anillo de biofilm en la interfase aire - líquido en cultivos bajo agitación en tubos de vidrio, se observó macroscópicamente el anillo formado sobre el borosilicato en las distintas cepas en diferentes condiciones nutricionales. En medio mínimo Y luego de 8 y 10 días de cultivo, la cepa *wt* creció en la interfase aire – líquido en forma discontinua, adherida por sectores (parches) que se desprendieron cuando fueron agitados manualmente con ambas fuentes de carbono. En cambio, la mutante MAFFmlr6756 formó abundantes agregados pequeños fuertemente adheridos cuando la fuente de carbono fue manitol 0.2% (figura 62.A), mientras que el anillo desarrollado en sacarosa 0.5 % fue de similar apariencia, pero con agregados de menor tamaño (figura 62.B). Se observó que esta mutante que forma agregados planctónicos en medio líquido Y, luego de entre 8 y 10 días éstos agregados se disipan y el cultivo adquiere turbidez (figura 62). En los restantes medios de cultivo no se observó adhesión al vidrio en ninguna cepa. La mutante MAFFexoY no formó agregados en la interfase aire-liquido bajo ninguna condición nutricional.

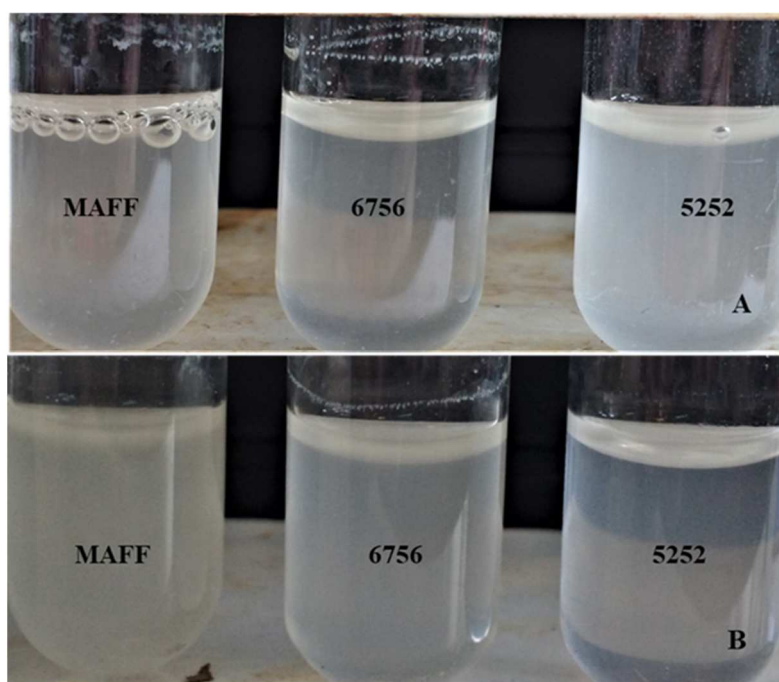


Figura 62: Biofilm formado en forma de anillo en la interfase aire-líquido sobre tubos de borosilicato en *M. japonicum* MAFF303099 y mutantes derivadas MAFFexoY y MAFF mlr6756. Las cepas fueron incubadas a 28°C durante 8 días a 200 rpm. **A.** Cultivos en medio Y manitol 0.2% como fuente de carbono. **B.** Cultivos en medio Y suplementado con sacarosa 0.5% como fuente de carbono.

Nuestros resultados muestran que la mutante *exoY* de *M. japonicum* MAFF303099 es incapaz de producir exopolisacáridos y que su capacidad de formar biofilm sobre los soportes abióticos estudiados se vió significativamente afectada, por lo cual podemos inferir que el polisacárido extracelular del tipo succinoglicano participaría en la adhesión a diferentes sustratos hidrofóbicos y al vidrio. Por otra parte, la mutante afectada en el gen *mlr6756* mostró alteraciones en la capacidad de adhesión a soportes en condiciones particulares sugiriendo que, la mutación en *mlr6756* afecta las interacciones entre las

células y con superficies abióticas, pudiendo deberse a alteraciones/ modificaciones en el exopolisacárido que afectan su transporte hacia la superficie extracelular y/o sus cualidades como componente de la matriz del biofilm, ya que no se observaron diferencias significativas en los niveles de producción de EPSs con respecto a la cepa *wt.*

6. Ensayos de nodulación

Se estudió el efecto de las mutaciones en los genes *mlr5252* (*exoY*) y *mlr6756* sobre la interacción rizobio- leguminosa, mediante experimentos de nodulación. *Mesorhizobium japonicum* es capaz de inducir la formación de nódulos determinados en las raíces de *Lotus tenuis*, *L. corniculatus* y *L. japonicus*. Se inocularon por cepa al menos 40 plántulas de *Lotus tenuis* variedad Esmeralda como planta huésped. Los resultados de estos experimentos muestran que, tanto *M. japonicum* MAFF303099 silvestre como las mutantes MAFF*exoY* y MAFF*mlr6756* fueron capaces de desarrollar nódulos maduros luego de 10 días post inoculación (figura 63).



Figura 63: Desarrollo de nódulos en las raíces de *L. tenuis* variedad *Esmeralda* inoculadas con cepas derivadas de *Mesorhizobium japonicum* MAFF 303099. A. Se observan los nódulos desarrollados en las raíces de *Lotus tenuis* luego de 42 días de inoculación con *M. japonicum* MAFF303099 *wt.* B. Plantas inoculadas con las cepas mutantes MAFF*mlr6756* (izquierda) y MAFF *exoY* (derecha). C. Detalle de los nódulos esféricos desarrollados en las raíces de una planta inoculada con *M. japonicum* MAFF303099 *wt.*

Sin embargo, se observó una diferencia en la velocidad de aparición de estos nódulos y en el número de nódulos por planta. Las plantas inoculadas con la cepa silvestre formaron los primeros nódulos a los 10 días mientras que la mutante MAFF*mlr6756* los desarrolló a los 7 días y la mutante MAFF *exoY* desarrolló un solo nódulo en el día 10 post inoculación (figura 64). El promedio de nódulos desarrollados por planta luego de 42 días fue de 2.73 ± 0.16 para la cepa parental (131 nódulos en 48 plantas totales), de 2.86 ± 0.25 para MAFF*mlr6756* (140 nódulos en 49 plantas totales) y de 1.95 ± 0.18 para

MAFFexoY (80 nódulos en 41 plantas totales). La mutante MAFFmlr6756 logró inducir el desarrollo de un mayor número de nódulos a lo largo del experimento, aunque las diferencias con la cepa parental no fueron significativas. Por otra parte, la mutante MAFFexoY mostró una disminución en su capacidad de inducir la formación de nódulos con respecto a la *wt*, desde el inicio del experimento, que fue significativa a partir del día 33 hasta el día 42 (Multiple T test, * $p < 0.05$ para el día 33, ** $p < 0.01$ para el día 38 y * $p < 0.05$ para el día 42) (figura 64).

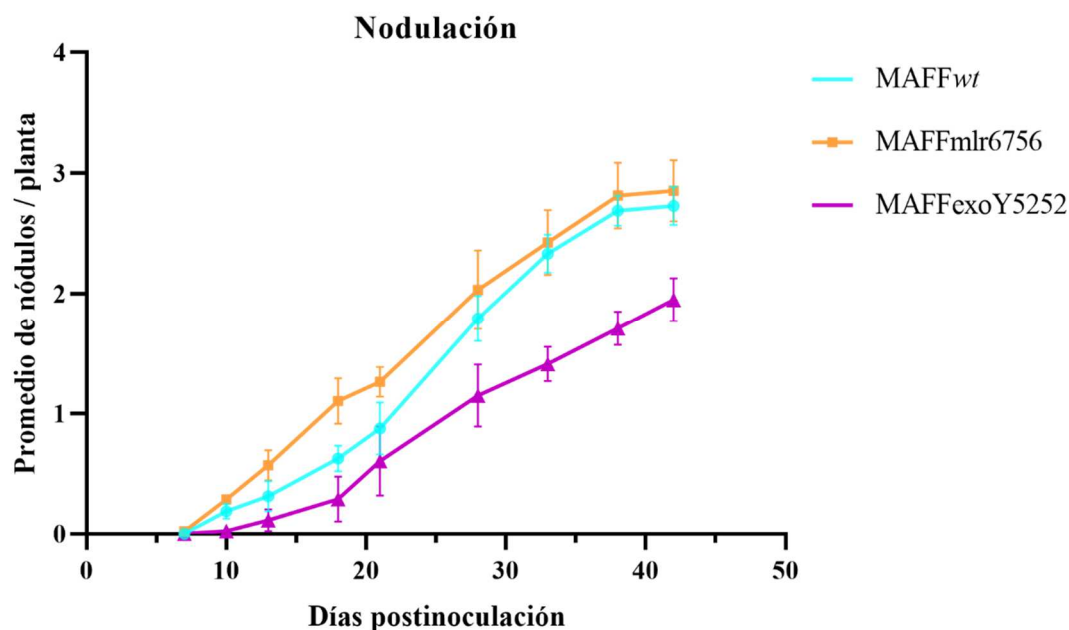


Figura 64: Promedio de nódulos por planta de tres experimentos independientes. Se utilizaron 17 plantas por cepa en cada experimento. Como control, 7 plantas por experimento fueron inoculadas con medio B&D ¼ estéril libre de bacterias. Las plantas fueron crecidas verticalmente con el área radical protegida de la luz en ciclos de 16/8 horas día/ noche a 22°C.

Se observó además que el crecimiento y desarrollo de las plantas inoculadas con dicha mutante fue deficiente presentando menor tamaño folicular y longitud de tallo (figura 63).

Estos resultados en conjunto evidencian la importancia del EPS producido por *Mesorhizobium japonicum* MAFF303099 en la inducción de la nodulación en la planta hospedadora *Lotus tenuis*.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Capítulo I

En esta Tesis se presentan los estudios realizados con cepas de referencia representativas de diferentes géneros de microorganismos del suelo como *Rhizobium leguminosarum*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Pseudomonas* y *Burkholderia* que evidencian los requerimientos nutricionales y de cultivo, que influyen en la capacidad de formar biofilm sobre PE de cada especie, afectando la capacidad de adhesión a una superficie y las interacciones celulares. En todos los casos analizados encontramos alguna condición en la cual se favoreció su desarrollo, apoyando la idea de que esta forma de vida es una propiedad universal. En los géneros representativos del grupo de simbioses de plantas, promotores del crecimiento vegetal y biofertilizantes de suelos, como *Mesorhizobium* y *Rhizobium leguminosarum*, determinamos que el desarrollo de biofilm *in vitro* se vio favorecido en medios de cultivo sintéticos mínimos, mientras que en *Ensifer* requirió de medios ricos en nutrientes. En los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas*, representantes de microorganismos del suelo promotores del crecimiento vegetal, biocontroladores y biorremediadores, se observó que la formación de biofilm predominó en cultivos con mínimos nutrientes y suplementados con casaminoácidos. Observamos una asociación entre la densidad poblacional y los recursos nutricionales que determinarían el establecimiento de un biofilm con características particulares en cada especie estudiada. Por otra parte, la oxigenación de los cultivos mediante agitación, afectó en forma positiva la capacidad de formar comunidades en la mayoría de las cepas de referencia analizadas, mientras que los tiempos de incubación que propiciaron el mayor desarrollo de la biomasa adherida dependieron de la especie en estudio y características propias de su crecimiento. Así, los rizobios requirieron de tres a cuatro días de incubación, mientras que las cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia* fueron cultivadas entre uno y dos días para alcanzar mayor desarrollo de biofilms (Capítulo I sección 1.1, tabla 2).

En cuanto a los aislamientos autóctonos provenientes de suelos de Argentina, los pertenecientes a *Pseudomonas* mostraron mayor capacidad de formar biofilms que los de *Burkholderia* en las condiciones ensayadas sobre los dos soportes estudiados. El poliestireno (PE), ofrece a las bacterias una superficie homogénea hidrofóbica, muy diferente a las raíces del trigo que como tejido vivo presentan “parches” con diferente grado de hidrofobicidad. En cuanto a las condiciones nutricionales empleadas en los ensayos de adhesión en placa multipocillo de PE y sobre raíces de trigo, en el primer caso se trató de medios sintéticos como M63 adicionado con glucosa 0.2 % y casaminoácidos 5 %, M9 glucosa 0.4 % y TSB, mientras que en el otro incluyó exudados radiculares en un entorno isotónico de PBS. Estos exudados contienen factores secretados por la planta que juegan un rol determinante en la comunicación planta bacteria y la consecuente colonización selectiva de las raíces (Thokchom *et al.*, 2017).

Por otra parte, el 65 % de los aislamientos de *Pseudomonas* presentó la mejor *performance* en la formación de biofilms sobre PE y raíces de trigo, entre los que se destacaron los aislamientos de *Pseudomonas fluorescens* P3, P15, P17 y P18 provenientes

de la rizosfera y los aislamientos de *P. asplenii* P13 y *Pseudomonas* sp. P14 del suelo no asociado a raíces. Además, observamos que todos los aislamientos de *Pseudomonas* obtenidos de la rizosfera mostraron la mejor *performance* en cuanto a la adhesión a soporte biótico y abiótico. Es posible que estos aislamientos provenientes de un nicho altamente competitivo como la rizosfera, hayan sido seleccionados por su mayor capacidad de formar biofilms como respuesta adaptativa a la coexistencia a largo plazo (Cai *et al* 2019). Esta característica prevaleció incluso entre bacterias de una misma especie pertenecientes a *P. fluorescens*.

En cuanto a los aislamientos de *Burkholderia*, observamos que su capacidad de adhesión a los soportes abiótico y biótico fue deficiente, siendo los aislamientos *B. ambifaria* B12 y *Paraburkholderia graminis* B14 los que tuvieron mejor desempeño en adhesión a las superficies ensayadas.

En este trabajo se buscó contribuir al conocimiento de los factores que influyen en la capacidad de formación del biofilm de microorganismos del suelo estudiando la producción de componentes extracelulares como los polisacáridos extracelulares (EPS) y la celulosa o moléculas que sensan la densidad poblacional (*quorum-sensing*, QS), y otras características asociadas a componentes de la superficie bacteriana, como la motilidad dependiente de flagelo y la autoagregación celular. En diversos microorganismos se ha propuesto que estos componentes extracelulares y de superficie afectan las interacciones bacterianas e influyen en la agregación, anclaje y el desarrollo de biofilms (Costerton *et al.*, 1995; Schembri *et al.*, 2001). El estudio de los fenotipos asociados a estos componentes mostró mayor diversidad entre los aislamientos de *Pseudomonas* que entre los de *Burkholderia*, como se observó en el análisis de componentes principales de las figuras 39, 40 y 41. Este análisis multivariado proporcionó una visión integradora del desempeño de los aislamientos de los dos géneros representados, acerca de la capacidad de formar biofilms, la expresión de fenotipos asociados y la adaptación en ambientes adversos, sin embargo, deben analizarse los casos particulares separadamente para no perder información de interés. Así, encontramos que la capacidad de formación de biofilm, fenotipos asociados y supervivencia a factores de stress convergen en baja frecuencia en un mismo aislamiento (ej. P12).

Adicionalmente, en el grupo de *Burkholderia* ensayamos las características asociadas a la superficie y componentes extracelulares en medio M9 glucosa 0.4% y medio M63 (ó TSB para B12) en forma comparativa. Observamos que el medio M63 favoreció la motilidad *swimming* en todos los aislamientos del grupo y la agregación celular en B7, B8, B12 y B14. Los aislamientos que formaron biofilm en M9 mostraron un leve incremento en la producción de EPS en este medio, mientras que el resto de los aislamientos produjo más EPS en medio M63 ó TSB en los que fueron formadores de biofilm, sugiriendo que este leve incremento podría estar favoreciendo la formación de biofilm. Por otra parte, nuestros resultados permitieron determinar que *Paraburkholderia caledonica* (B1, B2 y B10), *Paraburkholderia tuberum* (B5 y B8), *Burkholderia ambifaria* (B12), *Paraburkholderia terricola* (B15 y B16) y *Paraburkholderia atlántica* (B7), producen moléculas autoinductoras del tipo HSLs, aunque la cepa B12, perteneciente al complejo *cepacia* fue la única capaz de producir HSLC en las condiciones de ensayados (TSB y M9 glucosa 0.4 %). Debemos tener en cuenta que la

metodología empleada en la detección de HSLs estaría evidenciando solo moléculas producidas en alta concentración. En este sentido podemos agregar que solo en el caso de la cepa B14 no pudimos detectar moléculas del tipo HSLs en las condiciones de ensayo, mientras que en los restantes aislamientos si fue posible (ANEXO, tabla 1).

El análisis del comportamiento frente a condiciones de *stress* mostró que los aislamientos de *Pseudomonas* spp., exhibieron mayor tolerancia que los de *Burkholderia* spp a la exposición al arsénico, en cambio el rango de tolerancia y el efecto de la salinidad sobre ambos géneros fue similar. En estos estudios, se evaluó la tolerancia intrínseca de los aislamientos a la sustancia tóxica exponiendo bacterias provenientes de un cultivo planctónico en un medio isotónico (PBS). Además, se evaluó el efecto de estos factores de *stress* sobre el desarrollo del biofilm empleando medios de cultivo en los que se favoreció su formación. En estas condiciones observamos diferentes respuestas en los aislamientos de *Pseudomonas* y *Burkholderia* que clasificamos según su impacto sobre la formación del biofilm en: negativa, neutra o positiva.

Manifestaron una respuesta que afectó en forma **negativa** la formación de biofilms disminuyendo significativamente la biomasa adherida en presencia de las sustancias testeadas, los aislamientos pertenecientes a *P. fluorescens* P3, P6, P17 y P18, *P. chloraphis* P12, *P. asplenii* P13, *P. gessardi* P16 y del grupo de *Burkholderia* los aislamientos de *Paraburkholderia tuberum* B8 y *Paraburkholderia graminis* B14. Esta reducción del biofilm fue acompañada de una disminución del crecimiento planctónico en presencia de 1 mM de arsénico en los aislamientos *P. chloraphis* P12, *P. asplenii* P13, *Paraburkholderia tuberum* B8 y *Paraburkholderia graminis* B14. Se observó un comportamiento similar frente a la salinidad en los aislamientos de *P. fluorescens* P6, P17 y P18 y en *P. gessardi* P16. La disminución ó inhibición en la formación de biofilm podría atribuirse a una respuesta de escape desde la población sésil ante el ambiente desfavorable, siendo el biofilm superviviente un reservorio de la población. La reducción de bacterias planctónicas acompañantes, posiblemente se deba a la mayor sensibilidad a los factores de *stress* de las células fuera de la protección del biofilm.

Se observó una respuesta sin efecto evidente de la sustancia tóxica sobre el biofilm, que clasificamos como **neutra** en los aislamientos *P. protegens* P11 y *B. ambifaria* B12 expuestos a 1 mM de arsénico y *Paraburkholderia terrícola* B16 en presencia de alta salinidad. Esta respuesta fue acompañada de una disminución del cultivo planctónico en los aislamientos P11 y B12 mientras que esta población permaneció invariable en B16.

Encontramos una respuesta **positiva** cuando se incrementó la formación del biofilm en presencia de la sustancia tóxica en los aislamientos de *P. protegens* P11, *Pseudomonas* sp. P14 y *B. ambifaria* B12 expuestos a altas concentraciones salinas, y en *P. fluorescens* P18 en presencia de 1 mM de arsénico. Este aumento en el desarrollo del biofilm fue 4.5 veces superior con respecto al control en P11, 3 veces en P14, 1.5 veces en B12 y de 2 veces en P18 y fue acompañado de una disminución en el cultivo planctónico en todos los casos a excepción del aislamiento P11 que no sufrió diferencias con respecto al control sin NaCl en esta forma de crecimiento.

Teniendo en cuenta la capacidad de desarrollo de biofilms sobre PE, P14, P18 y B12 mostraron alta capacidad de adhesión, mientras que en P11 fue baja. Posiblemente, la exposición a la alta salinidad en el caso de P11, P14 y B12 y al arsénico en P18, indujo el acopio de células en biofilm como forma de defensa o barrera física otorgando así protección ante el entorno hostil. El aumento del biofilm observado se produciría como una estrategia de supervivencia, tanto en aislamientos con alta capacidad de formación de biofilms como en aquellos con baja capacidad para desarrollarlos como fue el caso de P11. Estos resultados acuerdan con informes previos de Kasim y colaboradores (2016), quienes encontraron incrementada la formación de biofilm con el aumento de la concentración de NaCl en cepas de bacterias PGPRs. Por otra parte, Qurashi y Sabri (2012) reportaron que el desarrollo de biofilms protege a las células bacterianas del *stress* salino y nutricional y que este *stress* ambiental incrementa la competencia de las bacterias que revierten del estado planctónico al sésil para protegerse en la rizosfera. Además, el incremento en la producción de exopolisacáridos ante el estrés salino favorece la formación de biofilms y retención de agua alrededor de las células.

En el caso de la respuesta al arsénico, Zeng y colaboradores (2018) reportaron que el As (III) promueve la formación de biofilm de manera dependiente de la concentración en bacterias autótrofas oxidantes de arsenito y que además el biofilm aumenta significativamente la resistencia a su efecto tóxico posibilitando una mayor eficiencia de la enzima As (III) oxidasa. Siendo el aislamiento de *P. fluorescens* P18 de baja tolerancia intrínseca a arsénico, el aumento en la formación de biofilm manifestado por esta cepa ante la exposición a 1 mM de arsénico, sugiere que tendría la capacidad de oxidar arsénico. Así en el biofilm, el EPS puede proteger a la As (III) oxidasa promoviendo la actividad de oxidación bacteriana del As (Zeng *et al.*, 2008). De igual manera se explicaría la mayor tolerancia al tóxico manifestada por el aislamiento B12 cuando no mostró alteración en la formación de biofilm ante la exposición de 1 mM de As (III). Otra explicación posible sería que el biofilm se comporta como barrera física limitando el acceso del arsénico al interior de las células, respondiendo de forma similar que en la situación de *stress* salino. La búsqueda de los marcadores de la As (III) oxidasa completaría el entendimiento de esta respuesta al tóxico.

Cabe mencionar que estos dos aislamientos fueron obtenidos de suelos provenientes de la localidad de Monte Buey, Provincia de Córdoba (P18), y de Pergamino, Provincia de Buenos Aires (B12), dónde existen registros de arsénico en aguas de entre 0.1 y 0.5 mg/L (Blarasin *et al.*, 2014), condición que ejercería presión de selección en la biota local.

En términos generales, encontramos que en las condiciones de cultivo que favorecen la formación de biofilm, los aislamientos resultaron más tolerantes al As (III) que en *buffer* PBS, en el cual se determinó la tolerancia intrínseca a la salinidad y al As (III). Es posible que en esta condición nutricional la producción de factores extracelulares, como exopolisacáridos, proteínas o enzimas contribuyan disminuyendo el efecto de las sustancias tóxicas e incrementen la supervivencia en condiciones adversas.

El Código Alimentario Argentino establece el límite permitido de 0,05 mg/L de As (III) (equivalente a 3.9×10^{-4} mM) en aguas de consumo, siendo el valor más extremo

medido en Argentina en la provincia de Santiago del Estero de 14969 µg/ L (15 mg/L= 0.1155 mM) (Bhattacharya *et al.*, 2006). Por lo tanto, la mayoría de las cepas de *Pseudomonas* estudiadas resultaron altamente tolerantes *in vitro* a estas concentraciones de arsénico mientras que en *Burkholderia* solo los aislamientos *Paraburkholderia tuberum* B8 y *Paraburkholderia terrícola* B15 tuvieron esa característica.

La salinidad del suelo puede ocurrir por efectos naturales, sin embargo, la principal causa es el mal manejo de la agricultura en cuestiones como: uso incorrecto del riego, falta de drenaje en los suelos, aplicación inadecuada de estiércoles y otros residuos animales, mal empleo de los fertilizantes y utilización de aguas residuales. En cuanto a la tolerancia a la salinidad, encontramos que los aislamientos de *Pseudomonas* que mostraron porcentajes de CL₅₀ mayores ó iguales al 1 % fueron *P. asplenii* P13, *P. fluorescens* P4, P18, P17 y P16 y dentro de los aislamientos de *Burkholderia*, *Paraburkholderia caledonica* B10 y *B. ambifaria* B12 destacaron por ser tolerantes al cloruro de sodio. En este sentido, si bien las cepas que manifestaron tolerancia a la sal por encima de un 1 % no se consideran halófilas débiles (microorganismos que toleran un 3 % de cloruro de sodio, como la mayoría de los organismos marinos), su alta tolerancia les permitiría sobrevivir y colonizar un mayor rango de suelos (Kushner *et al.*, 1978). Una salinidad del 1 % (equivalente a 170 mM de cloruro de sodio), lleva a un notorio perjuicio en plantas, por ejemplo, en el caso del trigo, esta concentración de sal provoca una reducción en el rendimiento de las espigas de un 50 % (Argente *et al.*, 2008), mientras que en la planta de tomate se manifiesta una reducción de la densidad estomática a concentraciones de 35 mM de cloruro de sodio (Goykovic Cortés *and* Saavedra del Real, 2007).

Estos estudios requieren de profundización para permitir la selección de cepas que tengan características deseadas según su modo de empleo como biocontroladores, fitoestimuladores ó biofertilizantes. Como aporte, en cada sección de los resultados correspondientes se describen las características observadas en cada aislamiento estudiado. Destacamos entre estos a las *Pseudomonas chlororaphis* P10 y P12 aisladas del suelo, por su aptitud en las capacidades de colonización, supervivencia y formación de biofilm (figuras 39 y 41), además de su competencia como microorganismos promotores del crecimiento de plantas manifestada en los Índices de potencial biocontrol (BPI) y de promoción del crecimiento directo (DGPI) determinados por Agaras y colaboradores (2015). Los aislamientos de *P. fluorescens* P16, P17 y P18 y *P. asplenii* P13 provenientes de la rizosfera, también mostraron capacidad de promoción de crecimiento directo (Agaras *et al.*, 2015) y alta capacidad para formar biofilms, destacando además en tolerancia intrínseca a la salinidad (P16 y P17), alta capacidad de formar biofilms en presencia de arsénico (P18) y tolerancia intrínseca a arsénico (P13).

El aislamiento identificado como *Burkholderia ambifaria* B12, fue el único perteneciente al complejo cepacia analizado en este estudio que además agrupó en el análisis multivariado cerca de las *Pseudomonas* con la mejor performance para formación de biofilms y características asociadas, separado del resto de las *Burkholderias*. Este aislamiento aumentó la formación de biofilm cuando fue expuesto a NaCl y mantuvo la

biomasa adherida sobre PE en el mismo nivel que el control cuando se cultivó en presencia de arsénico III, sugiriendo que la formación de biofilm en este aislamiento es una estrategia de resistencia al *stress* ambiental. Como es sabido, las especies del complejo *Burkholderia cepacia*, son altamente persistentes y formadoras de biofilm, en particular *B. ambifaria* es un patógeno oportunista en enfermos de fibrosis quística que en el ambiente natural puede encontrarse en suelo y rizosfera y actuar como agente de biocontrol antagonista de hongos. Estudios de aislamientos de esta especie provenientes de pacientes con fibrosis quística, mostraron que *B. ambifaria* utiliza el mecanismo de variación de fase para adaptarse a dos ambientes drásticamente diferentes: el pulmón de pacientes con FC y la rizosfera. La variante más competente en la rizosfera y de baja expresión de factores de virulencia, no mostró reversión a la forma *wt* encontrada en pulmón (Vial *et al.*, 2010), aunque su empleo como bioinoculante es discutible.

Los biofilms multiespecie, comparados con aquellos formados por una sola especie, muestran ventajas como el aumento de la resistencia a compuestos antibacterianos, mayor protección frente a la desecación y a la predación por protozoos y mayor velocidad de transferencia horizontal de genes, siendo además esenciales en el mantenimiento del balance ecológico en el suelo. En un biofilm formado por múltiples especies, cada especie en forma individual produce su propio biofilm, pero se complementan entre ellos; así un metabolito producido por una especie es utilizado por otra especie dentro de la comunidad posibilitando una mayor resistencia en un entorno desfavorable (Velmourougane *et al.*, 2017). En este sentido, las asociaciones de bacterias con hongos pueden aumentar el sinergismo en la degradación de sustratos complejos. El establecimiento de las bacterias sobre las hifas de hongos es un proceso complejo que puede considerarse como una interacción simbiótica. *Pseudomonas* y *Burkholderia* fueron encontradas frecuentemente como colonizadores de hongos en el suelo, siendo su capacidad mótil central en la colonización de las superficies fúngicas. Entre las distintas variantes fenotípicas de *P. fluorescens*, se observó que los hongos reclutan solamente células altamente móviles (Velmourougane *et al.*, 2017). Nos resta abordar el estudio de biofilm mixtos con especial interés en combinaciones de variantes tolerantes a la salinidad y arsénico con el fin de caracterizar su desarrollo ó efecto en las distintas combinaciones de poblaciones bacterianas. Sería de interés profundizar los estudios de la influencia de los diferentes factores como polisacáridos, moléculas QS y flagelo en la formación de biofilms según las posibles estrategias de adaptación al entorno en poblaciones mixtas de diferentes especies de microorganismos del suelo.

Así, nuestros estudios son un aporte para un aprovechamiento óptimo del suelo y sugieren que un adecuado manejo en la variedad de los cultivos y biofilm multiespecie con potencial bioinoculante, permitirá el mejor comportamiento agrícola para futuros establecimientos en áreas afectadas por el estrés, con vistas a lograr seguridad en las cosechas y un acercamiento a la rentabilidad de los suelos salinos y con arsénico, siendo la capacidad de formar biofilms un requisito imprescindible para el éxito y supervivencia de bacterias de interés agrícola.

Capítulo II

Con respecto al Capítulo II de esta Tesis, aportamos evidencias del rol de los polisacáridos extracelulares en el ciclo de vida de *Mesorhizobium*, simbiote de interés agrícola que interactúa con *Lotus* spp. Nuestros resultados sugieren que el antígeno O del LPS, los glucanos cíclicos y posiblemente el exopolisacárido producidos por la cepa *Mesorhizobium loti* AYAC 1 BII estarían involucrados en la formación de biofilms *in vitro*. Por otra parte, mediante un enfoque genético, empleando como modelo a la cepa *Mesorhizobium japonicum* MAFF303099, se contribuyó al conocimiento de los factores polisacáridicos que afectan la formación del biofilm y su rol en la simbiosis con la planta hospedadora *Lotus tenuis* variedad Esmeralda. La interrupción del gen *mll5252* de *M. japonicum* MAFF303099, que codificaría la enzima homóloga a la galactosiltransferasa ExoY de *E. meliloti* responsable del ensamblaje de la unidad repetitiva del succinoglicano o EPS I, afectó la biosíntesis del polisacárido extracelular. Se determinó la presencia de polisacáridos con enlaces glucosídicos β 1-4 mediante coloración con rojo congo en las colonias mutantes de este gen, lo que indicaría la producción de polisacáridos como la celulosa en su superficie. Apoyando esta observación, en ciertos contextos mutantes, se ha descrito una respuesta compensatoria de la ausencia de un polisacárido, incrementando la producción de otro (Russo et al 2015). Por otra parte, la mutante MAFFexoY fue la que manifestó el mayor grado de alteración en el porcentaje de agregación y en la motilidad dependiente de flagelo de tipo *swarming* en todos los medios utilizados, sugiriendo que el EPS de *M. japonicum* MAFF303099 es un componente esencial involucrado en la autoagregación en cultivos planctónicos y en la motilidad de tipo *swarming*. En cuanto a la motilidad *swimming*, se vio disminuida solo en medio mínimo Y, posiblemente respondiendo a un fenómeno nutricional quimiotáctico más que a alguna alteración en la capacidad motil originada por la mutación. En cuanto a la capacidad de formar biofilm de la mutante MAFFexoY, encontramos que se vio significativamente afectada en todos los medios y condiciones ensayados, por lo cual podemos inferir que el polisacárido extracelular del tipo succinoglicano participa en la adhesión a diferentes sustratos hidrofóbicos y al vidrio y es fundamental para su formación. En la interacción simbiótica de esta mutante con la leguminosa *Lotus tenuis* encontramos que, aunque fue capaz de inducir la nodulación en las raíces, se produjo un retraso en la aparición de nódulos. Esto sugiere la importancia de la participación del EPS en etapas tardías del proceso simbiótico en *Mesorhizobium japonicum* MAFF303099. Se ha propuesto que el EPS de *M. japonicum* R7A cumpliría un rol como señal, modulando la respuesta de defensa de la planta y posibilitando el desarrollo de nódulos. Mutantes de la cepa *M. japonicum* R7A afectadas en genes involucrados en etapas iniciales de la biosíntesis de la unidad repetitiva del EPS (*exoB* y *exoA*), formaron nódulos fijadores de nitrógeno en *Lotus corniculatus* y *Lotus japonicus* Gifu, pero con un retraso en su aparición comparados con la cepa *wild type*. Se ha propuesto que la capacidad simbiótica puede haberse mantenido en estas mutantes por un polisacárido señal alternativo ó por ausencia de moléculas de superficie que la planta percibe habitualmente para activar la respuesta de defensa ó por ambas circunstancias (Kelly et al., 2012). Encontramos un fenotipo similar en la nodulación de *Lotus tenuis* variedad Esmeralda, cuando fue

inoculada con la mutante MAFFexoY, lo que sugiere el rol del EPS como molécula señal en *M. japonicum* MAFF303099 por la cercanía filogenética de ambas cepas.

Los estudios efectuados en la mutante afectada en el gen *mlr6756*, localizado en un nuevo locus identificado en el genoma de *M. japonicum* MAFF303099 sugieren que dicha mutación no afectaría la biosíntesis del polisacárido similar al succinoglicano. Sin embargo, no se descarta que fueran alteradas etapas posteriores a su síntesis que determinan su localización y/o estructura final y que explicarían la agregación y *swarming* diferencial observadas en la mutante MAFFmlr6756. Si bien la dinámica de las células *swarmers* en los *raft* sugiere que la matriz no sería requerida para la estabilidad de éstos (Jones *et al.*, 2004), el comportamiento de las mutantes MAFFexoY y MAFFmlr6756 sugiere que el EPS estaría involucrado indirectamente en la motilidad *swarming* colaborando en forma positiva posiblemente como molécula surfactante. En la mutante MAFFmlr6756, al igual que en MAFFexoY, la motilidad *swimming* se vio disminuida solo en medio Y, lo que sugiere que se trataría de un efecto pleiotrópico “nutricional” en vez de una alteración en la motilidad originada por la mutación. En cuanto a la formación de biofilms en la mutante MAFFmlr6756, encontramos que mostró alteraciones en la capacidad de adhesión a soportes en condiciones particulares. En el caso de superficies hidrofóbicas la adhesión de esta cepa se vio disminuida cuando fue cultivada en medio AB (adicionado con manitol en el PE o con sacarosa en PVC) ó en medio Y con cloruro de amonio (adicionado con ambas fuentes de carbono tanto sobre PVC como sobre PP). En cambio, se observó una fuerte adhesión a tubos de borosilicato cuando esta mutante fue cultivada en medio Y manitol 0.2 % luego de 8 días, mientras que la cepa *wt* no fue capaz hacerlo en las mismas condiciones. En conjunto estas evidencias sugieren que, en determinadas condiciones nutricionales y sobre diferentes soportes, la mutación en *mlr6756* afecta las interacciones entre las células y con las superficies abióticas.

Nuestros estudios *in silico* determinaron que el gen *mlr6756* está localizado en un nuevo locus de 22 kb del genoma de *Mesorhizobium japonicum* MAFF303099 (MAFF_RS27625) y codifica una putativa proteína de 734 aminoácidos (WP_010914299.1) perteneciente a la familia de transportadores de polisacáridos extracelulares, presentando un 23 % de identidad y 39 % de similitud con ExoP de *E. meliloti* que forma un complejo proteico ExoPQT e interviene en la polimerización de la unidad repetitiva y exportación del EPS I.

Por otra parte, del análisis bioinformático del genoma de *M. japonicum* MAFF 303099 pudimos determinar que el locus de genes *exo* de 30 kb, contiene el gen *mlr5276* que codifica una proteína de 795 aminoácidos, ExoP (WP_010913094.1), que posee 46 % de identidad y 65 % de similitud aminoacídica y 98 % de cobertura con ExoP de *E. meliloti*. Esta similitud podría implicar redundancia funcional con *mlr6756*, por lo cual no podemos descartar que ambos genes participen en la polimerización/transporte del EPS y tengan roles complementarios. El hecho de que no se observaran alteraciones significativas en la producción de exopolisacáridos y durante la nodulación inducida por la mutante MAFFmlr6756, sugiere que existiría algún mecanismo compensatorio de la

mutación de este gen, como la sustitución de su función por parte del producto del *mlr5276*.

Por otro lado, debido a que la mutante MAFFmlr6756 fue capaz de producir EPS en los mismos niveles que la cepa *wt* y su capacidad de adhesión, agregación y *swarming* se mostraron afectadas, proponemos que el producto del gen podría intervenir en la polimerización de la unidad repetitiva del EPS, alterando en la mutante la longitud de la cadena polisacáridica que modificaría así su capacidad de adhesión, agregación y *swarming*.

La proteína codificada por el gen *mlr6756* posee, un dominio conservado GumC y otro dominio Mrp en el extremo C-terminal. GumC es una proteína copolimerasa del polisacárido (PCP) de *Xanthomonas campestris*, anclada en la membrana interna por dos dominios transmembrana que flanquean un extenso dominio periplásmico y está involucrada junto con la proteína GumB, en la modulación de la longitud de la cadena del Xantano, polisacárido que contiene unidades repetitivas pentaméricas (Galván *et al.*, 2012). GumC, ExoP y Wzc, son productos homólogos (Becker, 2015). Proponemos que la proteína codificada por el gen *mlr6756*, podría cumplir una función regulatoria en la biosíntesis/exportación del EPS modulando el largo de la cadena del EPS. Observamos que la mutante mostró un incremento de la mucosidad con respecto a la cepa *wt* en placas de cultivo AB sacarosa 0.5 %, mayor intensidad de fluorescencia en placas suplementadas con calcofluor que interacciona con uniones β 1-3 y un aumento de la viscosidad en medios de cultivo líquido. Por otra parte, las plantas inoculadas con la mutante MAFFmlr6756 presentaron un mayor número de nódulos en sus raíces en los primeros días de la nodulación. En *R. leguminosarum* se ha propuesto que el EPS de alto peso molecular podría ser beneficioso en el estadio de infección porque se observó que mutantes que producen un EPS con mayor grado de polimerización que la cepa *wt* promovieron la producción de mayor masa verde en plantas de trébol (Marczak *et al.*, 2017). Por lo tanto, la mutante MAFFmlr6756 estaría expresando un desbalance en la relación EPS-LMW/EPS-HMW, debido a la desregulación en el grado de polimerización de la cadena del EPS.

Finalmente, este trabajo aporta al conocimiento de los biofilms desarrollados por un género como *Mesorhizobium* del que poco se sabe en este aspecto y del rol de polisacáridos extracelulares en su constitución. Estos análisis genéticos requieren de ensayos de complementación de las mutantes estudiadas para corroborar que los genes interrumpidos sean responsables de las funciones afectadas. Además, estudios futuros de caracterización del exopolisacárido producido *M. japonicum* MAFF303099 y la mutante MAFFmlr6756 contribuirán al conocimiento de su estructura y a un acercamiento en la determinación de la función del producto del gen *mlr6756*.

ANEXO

Tabla I

I	EPS ug/ml		% Autoag.		Motilidad (cm)				Rojo Congo		Quorum Sensing			
					Swimming		Swarming				HSL C4/8		HSL C10/16	
	M alt	M9	M alt	M9	M alt	M9	M alt	M9	M alt	M9	M alt	M9	M alt	M9
B1	1,11 ± 0,12	0,23 ± 0,01	0	0	1,70 ± 0,0	-	-	-	+	+	-	-	+	-
B2	0,66 ± 0,14	0,66 ± 0,02	0	0	2,97 ± 0,06	-	-	-	+	+	-	-	+	-
B5	0,53 ± 0,11	0,50 ± 0,02	0	0	1,37 ± 0,06	-	-	-	+	+	-	-	+	+
B7	0,48 ± 0,04	0,42 ± 0,02	3,35 ± 0,90	0	2,55 ± 0,21	-	-	-	+	+	-	-	-	+
B8	0,76 ± 0,05	0,78 ± 0,15	2,45 ± 1,10	0	0,50 ± 0,0	-	-	-	+	+	-	-	+	+
B10	0,21 ± 0,0	0,55 ± 0,03	0	0	2,7 ± 0,0	-	-	-	+	+	-	-	-	+
B12	0,65 ± 0,11	0,31 ± 0,02	6,64 ± 0,23	0	>8,5	1,10 ± 0,10	2,95 ± 0,07	-	-	-	+	+	+	+
B14	0,24 ± 0,15	0,56 ± 0,06	18,56 ± 1,11	0	2,70 ± 0,0	-	-	-	+	+	-	-	-	-
B15	6,63 ± 0,50	1,17 ± 0,21	0	0	2,00 ± 0,0	-	-	-	-	-	-	-	+	+
B16	8,19 ± 1,8	1,34 ± 0,00	0	0	2,25 ± 0,07	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Tabla I: Evaluación de las características asociadas a componentes de superficie y extracelulares de los aislamientos autóctonos de *Burkholderia* spp. En la tabla se muestran las características valoradas en los diferentes aislamientos autóctonos en cuanto a producción de polisacáridos extracelulares (EPS), agregación celular (% Autoag.), motilidad mediada por flagelo (diámetro del desplazamiento en medio agar 0.3%, swimming ó agar 0.5%, swarming), producción de β - 1,4 glucosidos como la celulosa (Rojo Congo) y producción de homoserina lactonas señal de Quorum sensing (HSL), de cadena corta (HSL C4/6) y larga (HSL C10/16). Cada característica fue ensayada bajo dos medios de cultivo: M9 glucosa 0.4% y un medio alternativo (M alt) según mejor desarrollo de biomasa adherida para cada aislamiento: B2 y B10 fueron ensayados con M63 suplementado con glucosa 0.2%, Ext. de levadura 0.05%, el aislamiento B12 fue ensayado en TSB y el resto de los aislamientos en M63 glucosa 0.2%, CAA 0.5% (tabla 9 de resultados). Los resultados corresponden a tres experimentos independientes de al menos tres réplicas cada uno. I, identificación del aislamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

1-Condicion de cultivo, medios y antibióticos empleados

Las cepas derivadas de *Mesorhizobium japonicum* fueron cultivadas en medio mínimo (AB) (Chilton *et al.*, 1974) suplementado con sacarosa 0.5%, mientras que las pertenecientes a *Rhizobium leguminosarum* en medio (TY) (Beringer, 1974), *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* en medio (RDM) (Vincent, 1970), *Pseudomonas* y *Burkholderia* en medio mínimo M63 (Pardee, 1959) suplementado con glucosa 0.2% y casaminoácidos 0.5%.

Todas las cepas provenientes de microorganismos del suelo fueron incubadas a 28° C en agitación (200 rpm).

Las cepas de *E. coli* utilizadas en la mutagénesis fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) a 37° C en agitación (200 rpm).

Se midió absorbancia de las suspensiones bacterianas a 600 nm con espectrofotómetro (PerkinElmer instruments - Lambda 25- UV/VIS spectrometer)

Medios de cultivo para bacterias

<u>Medio AB</u>	por litro de medio
K ₂ HPO ₄	3 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1.14 g
<u>NH₄Cl</u>	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3 g
KCl	0.15 g
CaCl ₂	0.01 g
<u>Suplementos:</u>	
Cl ₃ Fe (solución saturada)	100 µl
Sacarosa 0.5%	
<u>Medio LB</u>	gramos por litro de medio
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
<u>Medio M63</u>	por litro de medio
KH ₂ PO ₄	13.6g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.5 mg
Ajustar el pH a 7 y autoclavar	
<u>Suplementos:</u>	
MgSO ₄ .7H ₂ O 1M	1 ml
Glucosa 0.2%	
Casaminoácidos 0.5%	

<u>Medio M9</u>	gramos por litro de medio
<u>Sales</u>	
Na ₂ HPO ₄ anhidro	33.9 g
KH ₂ PO ₄	15 g
NaCl	2.5 g
NH ₄ Cl	5 g
<u>Suplementos</u>	cada 100 ml de medio
MgSO ₄ 1M	200 ul
CaCl ₂ 1M	10 ul
Glucosa 0.4%	

Cada 100 ml de medio se agregaron 20 ml de sales M9, y los suplementos indicados. Se llevó a volumen con agua destilada.

<u>Medio PCAT</u>	gramos por litro de medio
Cristal violeta	0.002 g
Ác. Acelaico	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
KH ₂ PO ₄	4 g
K ₂ HPO ₄	4 g
Extracto de levadura	0.02 g
Llevar a pH 5.7 y autoclavar	
Citrulina	0.2 g

(Se preparó una solución madre 100X que fue esterilizada por filtración. De esta solución se agregaron 10 ml por litro de medio)

<u>Medio RDM</u>	
<u>Stock A</u>	gramos por litro de medio
KNO ₃	6 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.5 g
<u>Stock B</u>	
K ₂ HPO ₄	10 g
KH ₂ PO ₄	10 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.1 g
<u>Suplementos</u>	
Sacarosa 0.5 %	
Extracto de levadura 0.05 %	

Por cada litro de medio fueron agregados 100 ml de cada solución stock y se adicionaron los suplementos en las concentraciones indicadas. Estos últimos fueron esterilizados por autoclave separados de las sales.

<u>Medio TSB</u>	gramos por litro de medio
Digerido papaínico de soja	3 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	2.5 g
Glucosa	2.5 g

<u>TY</u>	gramos por litro de medio
Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.3 g

Medio Mínimo Y

Se prepararon los siguientes stocks:

	gramos cada 100 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	10 g
CaCl ₂ .5H ₂ O	22 g
K ₂ HPO ₄	22 g
FeCl ₃	2 g (preparado en 0.1 M de HCl)

Suplementos

Se agrega cada 200 ml de medio Y

Glutamato de sodio 4.4 %(p/v) *	5 ml
Manitol 10 % (p/v) *	4 ml
Vitaminas Mix: **	1 ml

(en 50mM Buffer fosfato pH 7)

biotina	0.1 g/l
tiamina	0.1 g/l
D/L ácido pantoténico	0.1 g/l

Se agregó 1ml de cada stock por litro de agua destilada y se ajustó el pH a 6.8. Se esterilizó con autoclave y se adicionaron las cantidades indicadas de cada suplemento esterilizado (por filtración (**)) o autoclave (*) previamente). Para preparar el medio Y sólido se agregaron 3 g de agar por cada 200 ml de medio.

Cuando los medios fueron preparados en placas de petri, el agar se utilizó a una concentración del 1.5 %.

Antibióticos:

De ser necesario, los medios de crecimiento se suplementaron con las siguientes concentraciones de antibióticos: Ampicilina (Amp) 100µg/ml, Gentamicina (Gm) 15µg/ml, Tetraciclina (Tc) 1 µg/ml (para *Mesorhizobium*) y 10 µg/ml (para *Escherichia coli*), Cloramfenicol (Cm) 20µg /ml, Kanamicina (Km) 50µg /ml y Streptomycin 20 µg/ml.

2-Cepas y plásmidos utilizados

Cepas	Genotipo, características relevantes	Referencia
<i>Burkholderia vietnamensis</i> GV	BCC LMG 10929	Heulin <i>and</i> Fernandez, 1995
<i>Burkholderia cepacia</i> GI	BCC ATCC 25416	Palleroni <i>and</i> Holmes, 1948
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	Derivada de la cepa ATCC 31532 con mutación en <i>cviI</i> por inserción del transposón Tn5 (<i>cviI</i> ::Tn5)	Mc. Clean <i>et al.</i> , 1997
<i>Chromobacterium violaceum</i> VIR07	Derivada de la cepa ATCC 12472 con mutación en <i>cviI</i> por inserción de casete de resistencia a Kanamicina (<i>cviI</i> ::Km ^r)	Morohoshi <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhizobium. leguminosarum</i> A34	Derivado de la cepa silvestre 8401 con el plásmido simbiótico pRL1JI Sm ^R	(Downie <i>et al.</i> , 1983)
<i>Rhizobium. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	Cepa silvestre 3841 derivada de 300 <i>R. leguminosarum</i> Sm ^R	(Poole <i>et al.</i> , 1994)
<i>E. meliloti</i> Rm 1021	SU47 <i>str-21</i>	(Leigh <i>et al.</i> , 1985), Young 2003, comb. nov.
<i>E. meliloti</i> Rm 2011		(Dangeard 1926), Young 2003, comb. nov
<i>M. loti</i> Ayac 1 BII	Cepa silvestre, Nod ⁺	Lepek. <i>et al.</i> , 1990
<i>M. loti</i> <i>pgm</i>	<i>M loti</i> AYAC 1BII <i>pgm</i> :: <i>Tn3HoHoI</i> , <i>Amp^r</i>	Lepek. <i>et al.</i> , 2002
<i>M. loti</i> <i>cgs</i>	<i>M. loti</i> AYAC 1BII <i>cgs</i> :: <i>Gm^r</i>	D'Antuono <i>et al.</i> , 2005
<i>M. loti</i> <i>lpsβ1</i>	<i>M. loti</i> AYAC 1BII <i>lpsβ1</i> :: <i>Gm^r</i>	D'Antuono <i>et al.</i> , 2005
<i>M. loti</i> <i>lpsβ2</i>	<i>M. loti</i> AYAC 1BII <i>lpsβ2</i> :: <i>Gm^r</i>	D'Antuono <i>et al.</i> , 2005
<i>M. japonicum</i> MAFF303099	Cepa silvestre, Nod ⁺	Kaneko <i>et al.</i> , 2000
<i>M. japonicum</i> MAFFmlr6756	<i>M. japonicum</i> MAFFmlr6756:: <i>Gm^r</i>	Este estudio
<i>M. japonicum</i> MAFFexoY	<i>M. japonicum</i> MAFFml15252:: <i>Gm^r</i>	Este estudio
<i>E. coli</i> DH5α	F φ80dlacZΔM15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR, recA1, endA1 hsdR17(rk ⁻ mk ⁺ phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1.	New England
<i>E. coli</i> S17-1	TpR SmR recA, thi, pro, hsdR-M+RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7	New England
<i>E. coli</i> pRK2013	Cepa <i>helper</i> conjugación, plásmido movilizante, supE44, lacU169 (N80lacZ) M15, recA1, endA1, hsdR17, thi-1, gyrA96, relA1, pRK2013 (Km ^R oriColE1 RK2-Mob+ RK2-Tra+)	(Figurski <i>and</i> Helinski, 1979)

<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1	Cepa de vida libre- aislamiento ambiental-Promotora del crecimiento vegetal (PGPR)	Bioinoculante comercial
<i>Pseudomonas</i> sp.	P2: RMBP1-1, P3: RMAN1-1, P4: RMAN1-2, P5: SBAN2-2, P6: SBAN2-1, P7: SBAN2-3, P8: SBAN2-4, P9: SPSA1.109, P10: SPSA2, P11: SPSA5, P12: SPAN5, P13: RPBP2, P14: SPSA6.109, P15: RMAN3, P16: RMAN4, P17: RMAN5, P18: RMAN6	Agaras <i>et al.</i> , 2012
<i>Burkholderia</i> sp.	B1: BMP45, B2: PBP8, B3: BBP105, B4: MMP60, B5: MAN53, B6: BAN40, B7: MAN117, B8: MAN54, B9: BMP39, B10: MMP47, B11: PMP53, B12: PBP51, B13: BMP53, B14: MBP35, B15: MMP83, B16: MBP31, B17: PBP36, B18: BMP33, B20: BAN42, B21: MMP66, B22: MMP72	Draghi <i>et al.</i> , 2018
Plásmidos		
pGEMT- <i>Easy</i>	Vector de clonado de productos de PCR	Promega Corporation
pBluescript	Vector de clonado	Michelle <i>et al.</i> , 1995
pK18mobTc ^r	Vector de clonado movilizable	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pGEMT- <i>Easy-mlr6756</i>	pGEMT- <i>Easy</i> conteniendo un fragmento del gen <i>mlr6756</i> de 1100 pb amplificado por PCR	Este estudio
pBluescript- <i>mll5252</i>	pBluescript conteniendo un fragmento que contiene 577pb del gen <i>mll5252</i> , 211 pb del <i>mll5251</i> y 85 pb de la secuencia intergénica (900 pb), amplificado por PCR	Este estudio
pGEMT- <i>Easy-mlr6756::Gm^r</i>	pGEMT <i>Easy- mlr6756</i> conteniendo un marcador de resistencia a Gm sin terminador transcripcional	Este estudio
pBluescript- <i>mll5252::Gm^r</i>	pBluescript- <i>mll5252</i> conteniendo un marcador de resistencia a Gm sin terminador transcripcional	Este estudio
pK18mobTc <i>mlr6756::Gm^r</i>	pK18mobTc conteniendo el fragmento del <i>mlr6756</i> interrumpido por el marcador de resistencia a Gm	Este estudio
pK18mobTc <i>mll5252::Gm^r</i>	pK18mobTc conteniendo el fragmento del <i>mll5252</i> de 900 pb interrumpido por el marcador de resistencia a Gm	Este estudio

Conservación de las cepas bacterianas

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas fue realizada por congelamiento rápido de cultivos en fase logarítmica tardía en criotubos, suplementados con glicerol

estéril a una concentración final de 20% (v/v). Estos stocks se conservaron por duplicado a -20°C y a -70°C .

TECNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA

3- Mutagénesis de genes de interés de *M. japonicum* MAFF303099

La estrategia de mutagénesis consistió en interrumpir el gen silvestre de interés de *Mesorhizobium japonicum* MAFF 303099 con un cassette no polar de resistencia a gentamicina (Gm^r) mediante recombinación homóloga y empleando un vector movilizable denominado pK18mob (Schäfer *et al.*, 1994). Para obtener las construcciones que permitieran realizar esta recombinación se realizaron diferentes subclonados previamente.

En primer lugar, se amplificaron fragmentos de los genes *mll5252* y *mlr6756* por PCR, a partir de ADN genómico de *M. japonicum* MAFF303099 y primers específicos diseñados empleando sus secuencias genómicas disponibles en la Rhizobase (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>) (sección 3.1). Se obtuvieron los fragmentos esperados de 1108 pb y 873 pb correspondientes a los genes *mlr6756* y *mll5252* respectivamente. El fragmento correspondiente al gen *mll5252* contiene 577pb del gen *mll5252*, 211 pb del *mll5251* y 85 pb de la secuencia intergénica. Los fragmentos obtenidos fueron clonados en dos vectores, pBluescript (para el producto del gen *mll5252*) y pGEM-T easy (para el producto del gen *mlr6756*). Las construcciones obtenidas pBluescript-*mll5252* y pGEM-T Easy *mlr6756* fueron utilizadas para interrumpir los genes de interés con un cassette de resistencia a Gm^r que fue insertado en un sitio de restricción único dentro de cada gen. El pBluescript-*mll5252* y el cassette fueron digeridos con la enzima *Pst*I y ligados para obtener la construcción pBluescript-*mll5252::Gm^r*. En el caso del pGEM-T Easy-*mlr6756* se digirió con la enzima *Bgl*II con corte único dentro del gen y se ligó con el cassette de resistencia previamente digerido con la enzima *Bam*HI, que genera extremos cohesivos compatibles con los extremos *Bgl*II, generando la construcción pGEM-T easy-*mlr6756::Gm^r*. Posteriormente los fragmentos *Hind*III de *mll5252::Gm^r* y *mlr6756::Gm^r* fueron subclonados en el sitio homónimo del vector movilizable *pK18mob::Tc^r* que confiere resistencia a Tetraciclina. La identidad de dichos fragmentos fue confirmada por secuenciación utilizando los primers de la sección 4.1 y los vectores *pK18mobTc-mlr6756::Gm^r* y *pK18mobTc-mll5252::Gm^r*.

Mediante transformación de *E. coli* S17-1 por electroporación, fueron incorporados *pK18mobTc-mlr6756::Gm^r* y *pK18mobTc-mll5252::Gm^r*. Las células de *E. coli* S17-1 resistentes a tetraciclina y gentamicina conteniendo los plásmidos fueron empleadas como cepas dadoras para transferir por conjugación biparental los plásmidos a la cepa receptora *M. japonicum* MAFF303099. Las transconjugantes fueron cultivadas en medio AB en presencia de Gentamicina para seleccionar las recombinantes que contienen el cassette de gentamicina incorporado en *M. japonicum* MAFF303099 por recombinación homóloga. La búsqueda de clones que sufrieron eventos de doble recombinación se realizó por PCR con los primers 6756U y 6756D, esperando un producto de amplificación de 1800 pb para el *mlr6756* y con los primers 5252U y 5251D, esperando un fragmento

amplificado de 1600 pb para el *mll5252*.

3.1 Amplificación de secuencias nucleotídicas mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Por cada reacción de amplificación se utilizó la siguiente mezcla:

Buffer Taq 10X libre de Mg ⁺⁺	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1.5 µl
dNTPs (40 mM)	1 µl
oligonucleótido 1 (50 µM)	0.5 µl
oligonucleótido 2 (50 µM)	0.5 µl
Taq polimerasa	0.5 µl
ADN molde	1-10 µl
H ₂ O (miliQ)	A volumen final 50µl

Ciclos de PCR:

T° C	Tiempo	Nº de Ciclos
94	5 minutos	1
94	45 segundos (desnaturalización)	35
56	45 segundos (hibridización del oligonucleótido)	
72	2 minutos (elongación)	
72	10 minutos	1

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa 1%, utilizando buffer TBE.

Oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia de 5' a 3'
6756U (sense)	GTAAGCTTCCGTCTCCCCTCCACCAG
6756D (antisense)	GTAAGCTTGCTCGTTGTAGTGCTGTG
5252U (sense)	GTAAGCTTCGGTTCCTGGTTGGTC
5251D (antisense)	GTAAGCTTCCGTGTATTCGCCGTTCA

3.2 Preparación del ADN molde a partir de *M. japonicum* MAFF303099 y mutantes candidatas

Las cepas fueron cultivadas en medio líquido AB sacarosa 0.5% durante 48 horas y centrifugadas a 10000 rpm durante 4 minutos (Hanil Science Industrial Smart R17, micro Refrigerated Centrifuge). El medio de cultivo fue removido y el pellet de células se resuspendió en agua milliQ estéril para su centrifugación. Nuevamente se descartó el agua

del enjuague y las células se resuspendieron en 100 µl de agua milliQ y fueron sometidas a 7 ciclos de congelación –descongelación y pasadas a un baño a 100 °C durante 5 minutos para su disrupción. Finalmente, el ADN molde se obtuvo del sobrenadante producto de un nuevo ciclo de centrifugación.

3.3 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa. Ligación y clonado de fragmentos de ADN en vectores de interés.

Los productos de PCR fueron purificados a partir de geles de agarosa al 1% con el kit de Promega, Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Luego fueron clonados en los vectores *pGEM Teasy* y *pBluescript* usando una relación inserto : vector de 3:1. Para la reacción de ligación fueron utilizados reactivos de Promega®:

Buffer ligasa 10X	1 µl
Vector pGEM Teasy (50ng/ml)	1 µl
Producto de PCR (inserto)	X µl
T4 AND ligase (3U Weiss/µl)	1 µl
H ₂ O milliQ	a 10 µl

Para los subsiguientes subclonados en el vector movilizable *pK18mob::Tc^r* se utilizaron las mismas condiciones.

3.4 Preparación de bacterias *E. coli* competentes de alta eficiencia para transformación (método simple y eficiente -SEM) (Gene 96: 23-28, 1990)

Se inocularon 250 ml de medio SOB (en Erlenmeyer de 1 litro) con 10-12 colonias frescas de bacterias DH5 α y se cultivaron a 18 °C hasta alcanzar una OD₆₀₀ = 0.6, con agitación vigorosa (200-250 rpm). Alcanzada esta OD, las células fueron enfriadas en hielo durante 10 minutos y centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. Luego el pellet fue resuspendido en 80 ml de TB e incubado durante 10 minutos en hielo. Nuevamente las células fueron centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos, a 4 °C y el pellet resuspendido en 20 ml de TB en hielo. Se agregó DMSO lentamente, agitando suavemente hasta alcanzar una concentración final de 7 % y se incubó en hielo 10 minutos. Las células fueron alicuotadas en un volumen de 200 µl y congeladas en nitrógeno líquido. Posteriormente se almacenaron a -70 °C.

Soluciones:

SOB:

Triptona		2%
Extracto	de	0.5 %
levadura		
NaCl		10 mM
KCl		2.5 mM

MgCl ₂	10 mM.
MgSO ₄	10 mM

Se preparó una solución de triptona, extracto de levadura, NaCl, KCl y se autoclavó 30 minutos. Separadamente se hizo un stock 2 M de Mg²⁺, con 1 M de MgCl₂ y 1 M de MgSO₄ que fue esterilizado por filtración y combinado con el medio antes de usar (pH final entre 6.8 - 7.0).

TB

Pipes (ó HEPES)	10 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM pH 6.7
MnCl ₂	55 mM.

Se mezclaron todos los componentes excepto el MnCl₂. Se ajustó el pH a 6.7 con KOH. Luego se agregó MnCl₂ y se esterilizó por filtración.

3.5 Transformación de células competentes

Se emplearon 200 µl de células competentes para las transformaciones descriptas previamente. Brevemente, las células (*E. coli* DH5α ó *E. coli* S17-1) fueron preincubadas en hielo y luego con el ADN (5 µl de mezcla de ligación) y 100 µl de buffer TMC durante 20 - 30 minutos. Seguidamente, se incubó a 42° C durante 3 minutos (*heat shock*) y se dejaron en el hielo. Inmediatamente se agregaron 800 µl de medio SOC y se incubaron durante 1 hora a 37° C sin agitación. Posteriormente, se plaquearon 100 µl en medio agar selectivo y se cultivó ON a 37° C.

En el caso de las transformaciones con pGEM T Easy-*mlr6756* y pBluescript-*ml5252*, la selección se hizo en placas LB conteniendo X-gal, IPTG y Ampicilina dado que ambos plásmidos contienen un sitio múltiple de clonado dentro de la región que codifica a la enzima β-galactosidasa (ó el α-péptido), permitiendo identificar a los clones recombinantes directamente por su coloración blanca cuando el gen fue interrumpido por el inserto, frente a una coloración azul en las colonias conteniendo las construcciones sin inserto y por lo tanto con el gen sin interrumpir.

Cuando se transformaron células *E. coli* S17-1 con el *pK18mob::Tc^r* conteniendo el inserto de interés, el medio de selección fue LB con Tetraciclina y Gentamicina. e pasaron a hielo 200 µl de células competentes (*E. coli* DH5α ó *E. coli* S17-1) conservadas en ultrafreezer de -70° C. Inmediatamente se agregó el ADN (5 µl de mezcla de ligación) y luego 100 µl de buffer TMC. Se dejó incubando en hielo entre 20 - 30 minutos. Las células se pasaron a 42° C durante 3 minutos. Luego se pasaron a hielo y se agregaron 800 µl de medio SOC. Finalmente las células se incubaron durante 1 hora a 37° C sin agitación. Se plaquearon 100 µl de la mezcla tal cual en medio selectivo y se cultivó ON a 37° C. En el caso de las transformaciones con *pGEM Teasy* y *pBluescript*,

la selección se hizo en placas LB conteniendo X-gal, IPTG y Ampicilina como medio selectivo. Estos plásmidos contienen un MCR dentro de la región que codifica para la enzima β -galactosidasa (ó el α -péptido), permitiendo identificar a los clones recombinantes directamente por su coloración blanca cuando el gen fue interrumpido por el inserto, frente a una coloración azul en las colonias conteniendo las construcciones con el gen sin interrumpir.

Cuando se transformaron células *E. Coli* S17-1 con el *pK18mob::Tc^r* conteniendo el inserto de interés, el medio de selección fue LB, Tetraciclina, Gentamicina.

Buffer TMC:

CaCl ₂	10 mM
MgCl ₂	10 mM.
Tris pH 7.5	10 mM

3.6 Conjugación biparental

Se realizó la transferencia del plásmido movilizable *pK18mll5252::Gm^r* y del *pK18mob::mlr6756::Gm^r* empleando en ambos casos la misma metodología. Se utilizó la cepa dadora *E. coli S-17 (pK18 mob::Tc^r mll5252::Gm^r ó pK18mob::Tc^r mlr6756::Gm^r)* para transferir el plásmido de interés a la cepa receptora *M.japonicum* MAFF303099 con el fin de interrumpir los respectivos genes por recombinación homóloga entre el plásmido y el cromosoma de la cepa *wt*. Para ello se crecieron cultivos líquidos de la cepa dadora en medio LB Gentamicina, Streptomycin y de la cepa receptora en medio AB sacarosa 0.5%, se centrifugaron a 10000 rpm durante 4 minutos y se realizaron lavados sucesivos de los pellets celulares con medio TY sin antibiótico resuspendiendo la mezcla de conjugación en un mínimo volumen. Se sembró esta gota en placa con medio rico TY-agar sin antibióticos y cada cepa por separado como control de crecimiento. Esta placa se incubó over night a 28 °C, luego la gota de conjugación se resuspendió en 1 ml de medio AB sacarosa 0.5 % y se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta 1:1000 que fueron sembradas incluyendo el cultivo tal cual en placas con medio selectivo (medio AB sacarosa 0.5%, gentamicina) para la obtención de las transconjugantes de interés. Estas placas fueron incubadas a 28 °C durante un mínimo de 5 días. El mismo procedimiento se realizó con las cepas control para verificar que no existiera crecimiento bacteriano en la placa de selección. Finalmente, se aislaron las colonias transconjugantes y se conservaron en stocks de glicerol 20% a – 20° C.

4- Preparación de LPS

El lipopolisacárido de las bacterias fue extraído por lisis celular y digestión con proteinasa K (Hitchcock *and* Brown, 1983). *M. japonicum* MAFF303099 y la mutante 6756 fueron cultivadas en 3 ml de medio AB sacarosa 0.5% durante 48 hs a 28 °C con agitación. Luego fueron centrifugados 1.5 ml de cada cultivo a 10000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, el sobrenadante libre de células fue descartado. El pellet conteniendo las

bacterias fue resuspendido en 100 µl de buffer de lisis y sometido a un baño de 100° C durante 10 minutos. Posteriormente fueron agregados 50 µg de proteinasa K en cada mezcla de lisis (50 µg/100 µl) para luego incubar en un baño a 60°C durante 60 minutos.

Buffer de lisis:

- SDS 2%
- β-mercaptoetanol 4%
- Glicerol 10%
- Tris 1M (pH 6.8)
- Azul de Bromofenol 0.002%

El producto de digestión se diluyó 100 veces en el buffer de lisis para sembrar 10 µl de esta dilución conteniendo el LPS en un gel de poliacrilamida Tricina-SDS-PAGE 12% teñido con plata y periodato para su análisis (Reuhs *et al.*, 1993).

4.1 Análisis del LPS mediante SDS-PAGE teñido con plata y oxidación de carbohidratos con periodato

Preparación del gel:

<u>Solución stock</u>	<u>Resolving Gel</u>	<u>Stacking Gel</u>
	<u>15%</u>	<u>5%</u>
H ₂ O _d	3.3 ml	1.56 ml
Tris HCl, 1.5 M pH 8.8	2.5 ml	-
Tris HCl, 0.25 M pH 6.8	-	5 ml
Acrilamida 30% (p/v)	4 ml	0.85 ml
SDS 20%	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	3 µl
Persulfato de amonio 10%	100 µl	40 µl
Volumen final	10 ml	5 ml

Running Buffer (10X)

- Tris base 0.25 M
- Glicina 1.92 M
- SDS 1%

Este buffer se utilizó 1X para la corrida electroforética y se agregó SDS 0.1 % final.

4.2 Tinción con plata y oxidación con periodato

Se enjuagaron los geles con agua milliQ con agitación a temperatura ambiente, 5 cambios, durante 30 minutos. El gel se fijó sumergiéndolo en solución fijadora en agitación a temperatura ambiente (al menos 1h). Se lavó con agitación con agua a temperatura ambiente durante 40 minutos (4 cambios). La oxidación de los carbohidratos fue realizada con periodato de sodio 0.7 % en agitación a temperatura ambiente por 10 a

15 minutos. Luego se enjuagó con agua agitando a temperatura ambiente durante 2 hs (8 cambios). La tinción con plata fue realizada por agregado de solución con plata amoniacal (Solucion Colorante) agitando a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se lavó con H₂O mQ durante 25 minutos a temperatura ambiente con 3 cambios. El revelado se realizó por agregado de solución reveladora (se agita gota a gota, y se observa la aparición de bandas para frenar la reacción). Frenar la reacción con Solucion STOP por 2 minutos a temperatura ambiente con agitación. Enjuague con agua durante 1 min a temperatura ambiente.

Solución fijadora EtOH 40% y 5% acético: mezclar 400ml etanol y 50 ml ac acético glacial, llevar a 1000ml con agua.

Periodato de sodio 0.7%: 0,7 g metaperiodato de sodio (SIGMA) en 100 ml agua. Preparar en el momento.

Solución de tinción con plata amoniacal (en el momento la mezcla) Mezclar 3.5 ml hidróxido de amonio concentrado 28-30 % con 44.8 ml hidróxido sodio 0.36 %. Agitar y llevar a 210 ml con agua. Luego agregarle lentamente 8.4 ml nitrato de plata 19.8 % quedando final a 0.75 % w/v. Agitar a medida que se agrega el nitrato se hace un precipitado marron que desaparece enseguida. Esta solución es explosiva al secarse, descartar con agua corriente el sobrante.

Nitrato de plata 19.8%: 1.2g nitrato plata en 6 ml agua.

NaOH 0.36% (para 50 ml): 0.18g NaOH con 50 ml agua.

Hidróxido de amonio concentrado (28-30%)

Solución Stop (5% acético) (para 400ml): 20 ml ac acético glacial en 380 ml agua.

Solución reveladora de carbonato de sodio y formaldehido (no amoniacal). Se mezclan 0.5 ml de formaldehido 37 % (v/v) con 30 g de carbonato de sodio (3 % w/v) llevar a 1000 ml con agua. Preparar en el momento.

5- Identificación de aislamientos ambientales pertenecientes a especies de *Burkholderia*

Los aislamientos fueron incubados en agar Triptona de Soja (TSA) durante 48 horas a 28°C. Las células de una colonia de cada aislamiento fueron suspendidas en 50 µl de agua mQ estéril y luego calentadas en baño a 95°C durante 15 minutos. Estas muestras fueron conservadas a -20°C hasta la amplificación por PCR.

Se realizó la PCR de fragmentos del gen *recA* específicas para el género, usando los primers Bur3 y Bur4 (Bur3: GA(AG) AAG CAG TTC GGC AA; Bur4: GAG TCG ATG ACG ATC AT) (Payne *et al.*, 2005).

Cada mezcla de reacción incluyó los siguientes reactivos:

Buffer Taq 10X libre de Mg ⁺⁺	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1.5 µl
dNTPs (40 mM)	1 µl
oligonucleótido 1 (50 µM)	2.5 µl
oligonucleótido 2 (50 µM)	2.5 µl
Taq polimerasa	0.5 µl
ADN molde	3 µl
H ₂ O (miliQ)	34 (A volumen final 50µl)

Ciclos de PCR:

T° C	Tiempo	N° de Ciclos
94	5 minutos	1
94	30 segundos (desnaturalización)	30
60	30 segundos (hibridización del oligonucleótido)	
72	45 segundos (elongación)	
72	5 minutos (extensión final)	1

Las PCR fueron realizadas en Termociclador Eppendorf, Mastercycler ep "gradient". Los productos de PCR (2µl del producto de reacción) fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa 1.2%, buffer TAE.

Los fragmentos de ADN amplificados con los primers Bur3 y Bur4 de 385 pb, fueron purificados con el kit de Promega, Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System para su secuenciación por el método de terminación de cadena por incorporación de dideoxinucleótidos de Sanger (<http://www.macrogen.com>). Fueron secuenciadas ambas hebras con el mismo par de primers utilizados en la PCR. Las secuencias de ambas hebras fueron alineadas usando Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los resultados de las homologías arrojados por Blast fueron considerados para identificar los aislamientos B7 y B12. Para mayor precisión taxonómica haremos un análisis de MLST (Tipificación de secuencias multilocus) en trabajos posteriores que no se incluyen en esta tesis.

6- Análisis de biofilms

6.1 Ensayo de adhesión en policubetas mediante tinción con Cristal violeta

Con el fin de cuantificar la biomasa adherida a las distintas superficies abióticas bajo diferentes condiciones, se incubaron starters de cada cepa a estudiar a 28° C en agitación (200 rpm) hasta DO_{600nm} = 1-1.5. Se realizaron diluciones seriadas de 1:10 hasta 1:1000 de los precultivos en los distintos medios de estudio para el desarrollo de biofilm. Fueron sembrados por sextuplicado 200 ul de estas diluciones en placas multipocillo de poliestireno (Cellstar®Greiner bio-one, 96 well cell culture plate, F-botton) e incubados a 28° C sin y con agitación (200 rpm), durante tres tiempos diferentes de acuerdo a la cepa ensayada (17, 26 y 44 horas, las *Pseudomonas* spp., uno, dos y tres días las *Burkholderia*

spp y dos, tres y cuatro días, las *Mesorhizobium* spp, *Rhizobium* spp y *Sinorhizobium* spp. de crecimiento medio). Se realizaron seis controles de cada medio de interés sin inocular.

Finalizado el tiempo de ensayo se midió la OD_{595nm} en lector de placas (espectrofotómetro de microplacas, BioTek Instruments - Epoch2) como control de crecimiento planctónico. Para ello el cultivo fue removido por aspiración con pipeta automática y trasvasado a una placa nueva.

Para cuantificar las células adheridas, cada pocillo fue enjuagado una vez con 250 µl de NaCl 0.9% con el fin de eliminar las bacterias planctónicas y los restos de medio de cultivo. Posteriormente se agregaron 250 µl de cristal violeta 0.1 % (Acros Organics, Geel, Belgium) en cada pocillo y se dejó la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. Luego se aspiró el exceso de colorante y los pocillos fueron enjuagados dos veces con solución fisiológica (NaCl 0.9%). El cristal violeta que penetró en las bacterias adheridas al well fue extraído por agregado de 250 µl de etanol 96 % en cada pocillo y posteriormente fue trasvasado a una placa nueva para cuantificar la formación de biofilm por medición de absorbancia a 595 nm (O'Toole *et al.*, 1999). Cuando fue necesario se realizaron diluciones en etanol 96% para cuantificar dentro del rango de medición. Así la absorbancia del cristal violeta resulta proporcional a la biomasa adherida.

Cuando los ensayos se realizaron en placas multipocillo de policloruro de vinilo (PVC) (BD Falcon™, Flexible plate, 96 well, U-Bottom, Non-Tissue Culture Treated, nonsterile, Polyvinyl Chloride), el volumen de siembra utilizado fue de 100 µl y los volúmenes de enjuague y tinción de 130 µl acorde a la capacidad de dichas placas. Las placas fueron esterilizadas por exposición a luz UV.

Los medios de cultivo utilizados para el ensayo de biofilm en *Mesorhizobium* fueron el medio mínimo AB (Chilton *et al.*, 1974) suplementado con sacarosa 0.5%, el medio mínimo Y (Sherwood, 1970) en presencia de 0.2 % manitol y el medio rico de triptona y extracto de levadura TY (Beringer, 1974). Los *Rhizobium leguminosarum* se cultivaron en medio (Y) suplementado con manito 0.2% y con sacarosa 0.38% y en medio rico (TY). Las cepas de *Sinorhizobium meliloti* fueron cultivadas en los medios (RDM) (Vincent, 1970), (Y) manitol 0.2% y (TY).

Los aislamientos de *Pseudomonas* spp. fueron ensayados en medio mínimo M63 (Pardee, 1959) suplementado con glucosa 0.2% y casaminoácidos 0.5% ó en el mismo medio suplementado con citrato 0.4% además del medio rico (LB). Para *Burkholderia* los medios elegidos fueron los mismos que para *Pseudomonas* spp., y en el estudio de los aislamientos autóctonos además se incluyeron: M63 suplementado con glucosa 0.2% y extracto de levadura 0.05%, M63 suplementado con citrato 0.4% y extracto de levadura 0.05%, (TSB) (McCullough, 1949) y (PCAT) (Burbage, 1982) y M9 (Miller, 1972) suplementado con glucosa 0.4%.

6.2 Ensayo de adhesión en tubos de centrifugación de polipropileno mediante tinción con Cristal violeta

Se incubaron starters de cada cepa a estudiar a 28° C en agitación (200 rpm) hasta DO

$600_{nm} = 1-1.5$. Se realizaron diluciones seriadas de 1:10 hasta 1:1000 de los precultivos en los distintos medios para el estudio del desarrollo de biofilm. Fueron sembrados por triplicado 10 ml de la dilución 1:1000 en tubos de centrifugación (tubos de 50 ml ExtraGene®, polypropylene) e incubados a 28° C bajo agitación mecánica (200 rpm) (incubador shaker orbital, mrc lom-150) durante 4 días. Se realizaron tres controles de cada medio de interés sin inocular.

Finalizado el tiempo de ensayo se midió la OD_{595nm} en espectrofotómetro como control de crecimiento planctónico.

Para cuantificar las células adheridas, cada tubo fue enjuagado una vez con 17.5 ml de NaCl 0.9% con el fin de eliminar las bacterias planctónicas y los restos de medio de cultivo. Posteriormente se agregaron 17.5 ml de cristal violeta 0.1 % (Acros Organics, Geel Belgium) en cada tubo y se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se descartó el exceso de colorante y los tubos fueron enjuagados dos veces con 17.5 ml de solución fisiológica (NaCl 0.9%). El cristal violeta que penetró en las bacterias adheridas al tubo fue extraído por agregado de 17.5 ml de etanol 96 % para luego medir absorbancia a 595 nm en cubetas para espectrofotómetro.

6.3 Ensayo de adhesión sobre cubreobjetos de vidrio sumergido

Se incubaron starters de cada cepa a estudiar a 28° C en agitación (200 rpm) hasta $DO_{600nm} = 1-1.5$. Como soporte de vidrio para la adhesión de las bacterias se utilizaron cubreobjetos de 20 X 20 mm ubicados en tubos de centrifugación de 50 ml y sumergidos en medio de cultivo. Se realizaron diluciones seriadas de 1:10 hasta 1:1000 de los precultivos en los distintos medios de estudio para el desarrollo de biofilm. De la dilución 1:1000 de cada medio fueron dispensados 15 ml en los tubos conteniendo los cubreobjetos por triplicado, luego fueron incubados a 28° C bajo agitación mecánica (200 rpm) (incubador shaker orbital, mrc lom-150) durante 4 días. Se realizaron tres controles de cada medio de interés sin inocular.

Finalizado el tiempo de ensayo se midió la OD_{595nm} en espectrofotómetro como control de crecimiento planctónico.

Para cuantificar las células adheridas, cada tubo conteniendo al cubreobjetos fue enjuagado una vez con 20 ml de NaCl 0.9% con el fin de eliminar las bacterias planctónicas y los restos de medio de cultivo. Posteriormente se agregaron 12.5 ml de cristal violeta 0.1 % (Acros Organics, Geel Belgium) en cada tubo y se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se descartó el exceso de colorante y los tubos fueron enjuagados dos veces con 20 ml de solución fisiológica (NaCl 0.9%). El cristal violeta que penetró en las bacterias adheridas al tubo fue extraído por agregado de 10 ml de etanol 96 % para luego medir absorbancia a 595 nm en cubetas para espectrofotómetro.

7- Preparación y cuantificación del exopolisacárido (EPS)

7.1 Extracción del EPS

El exopolisacárido es excretado por las bacterias al medio extracelular quedando débilmente unido a las células. Para cuantificar su producción las bacterias fueron cultivadas en 10 ml del mismo medio que fue seleccionado previamente para el mejor desarrollo de biofilm en cada caso, a partir de una OD inicial del orden de 10^{-3} durante 4 días en el caso de *M. japonicum*, OD inicial de 10^{-2} durante 2 días en *Burkholderia* y OD inicial de 10^{-3} durante 20 hs cuando se trató de *Pseudomonas*, a 28° C con agitación a 200 rpm, por triplicado en tres experimentos independientes. Luego los cultivos fueron centrifugados durante 5 minutos a 10000 rpm (centrífuga Heraeus Sepatech, Biofuge 22R) a temperatura ambiente. El sobrenadante libre de células obtenido por centrifugación fue transferido a tubos Falcon de 50 ml. Se adicionaron 30 ml de etanol previamente enfriado (proporción de etanol/sobrenadante 3:1) para luego centrifugar durante 15 minutos, a 4° C a 7000 rpm y precipitar el EPS (Breedveld *et al.*, 1990a). El sobrenadante fue descartado y el nuevo precipitado se dejó a temperatura ambiente ON para evaporar los restos de etanol. La precipitación con el solvente consigue una purificación parcial del polímero eliminando los componentes solubles del medio de cultivo. El EPS cosechado se solubilizó en la mínima y necesaria cantidad de agua ultrapura para luego cuantificar.

7.2 Cuantificación del EPS por el método de Antrona -Acido sulfúrico

El ensayo de antrona mide la concentración total de carbohidratos ó monosacáridos equivalentes en una muestra. Diferentes monosacáridos poseen diferente actividad de antrona. Se eligió glucosa como monosacárido patrón y se preparó una curva standard desde 0 a 50 µg/ml (Breedveld *et al.*, 1990b). Todo el material utilizado para esta determinación fue nuevo en su uso debido a que tanto el polvo como el detergente residual, reaccionan positivamente con el reactivo de Antrona. Las muestras fueron analizadas según la siguiente mezcla de reacción:

A 1 ml de muestra (EPS solubilizado en agua ultrapura, ó dilución de éste)
Se adicionaron 250 µl de reactivo de antrona 2% (en acetato de etilo), vortex suave
Se adicionaron luego 2.5 ml de ácido sulfúrico de a poco, vortex suave hasta la disolución del reactivo.

Las muestras se dejaron enfriar durante 10 minutos. Las lecturas se realizaron a 620 nm en espectrofotómetro contra blancos de agua destilada. Las muestras blanco se visualizan amarillas y con el incremento de la concentración de carbohidratos el color se torna verde a azul. Cuando fue necesario se realizaron diluciones de las muestras para poder leer las absorbancias dentro del rango de la curva standard. Tanto diluciones como lecturas se realizaron por triplicado.

La concentración de EPS se calculó según el siguiente cálculo:

$$\text{EPS } (\mu\text{g/ ml de cultivo}) = \frac{C (\mu\text{g/ml}) \times Fd \times V}{Vc}$$

Donde:

C: Concentración leída en espectrofotómetro ($\mu\text{g/ml}$)

Fd: Factor de dilución del EPS

V: Volumen de EPS utilizado en la colorimetría (ml)

Vc: Volumen del cultivo utilizado para el desarrollo microbiano/producción del polisacárido

8- Ensayos de motilidad

8.1 Swimming

Una colonia proveniente de una placa fresca de cada aislamiento de *Pseudomonas* fue incubada en 3 ml de medio M63 glucosa 0.2%, CAA 0.5% ON a RT para utilizarse como cultivo iniciador. De este cultivo se realizó una dilución 10^{-3} como inóculo para el ensayo de *swimming* ($\text{ODi} \approx 0.001$). Los starters de los aislamientos de *Burkholderia* fueron preparados de igual forma se incubaron ON a 28°C , pero bajo agitación, agregándose además un set paralelo de cultivos en medio M9 glucosa 0.4%. De cada uno de estos cultivos se realizó una dilución 10^{-2} para ser utilizada como inóculo en el ensayo ($\text{ODi} \approx 0.01$). El ensayo de *swimming* se realizó en placas M63 (glucosa 0.2%, CAA 0.5%) -agar 0.3% para los aislamientos de *Pseudomonas* y *Burkholderia* y en medio M9 (glucosa 0.4%) - agar 0.3% sólo para los aislamientos de *Burkholderia*. Cada cepa fue inoculada en su correspondiente placa de *swimming* (agar 0.3%) por triplicado. Para ello se colocaron 10 μl de cada dilución de los starters en un well fondo “U” de una placa multiwell de 96 pocillos en dónde se cargó un escarbadietes de madera con esta dilución sumergiéndolo 3 veces, luego se picó tres veces muy suavemente el centro de la placa de *swimming* con este escarbadietes. Se repitió dicha operación para cada réplica. Finalmente, las placas se sellaron con parafilm y se incubaron sin invertir a 28°C durante 24 horas en el caso de *Pseudomonas*, durante 48 horas cuando se trató de aislamientos de *Burkholderia* y por 7 días cuando se trató de *Mesorhizobium*.

Se espera que las bacterias capaces de nadar (*swimming*) generen un halo de crecimiento concéntrico al sitio de inoculación. Por cada placa inoculada, se genera una circunferencia a la que se le midieron 1 y 2 diámetros en el caso que los hubiere (estos se promedian y constituyen el diámetro de *swimming* de cada réplica).

8.2 Swarming

En este ensayo se utilizó la misma metodología que en el ensayo de *swimming*, cambiando sólo el porcentaje de agar de las placas que en este caso fue de 0.5%. Durante el ensayo se observó la forma de “rugosidad” o aspecto que toma la colonia en la superficie, pueden ser formas irregulares con prolongaciones o estrelladas (“ameboide”).

9- Producción de moléculas sensoras del quorum bacteriano (QS)

En los ensayos de detección de acil-homoserín lactonas (AHL) fueron utilizadas dos

cepas biosensoras como indicadoras de la producción de AHLs: *Chromobacterium violaceum* CV026 y *C. violaceum* VIR07. *C. violaceum* CV026 detecta: C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, 3-oxo-C4-HSL, 3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C8-HSL, benzoilacetil-HSL, C4-homocisteín tiolactona, C6-homocisteín tiolactona, 3-oxo-C6-homocisteín tiolactona. Esta cepa es una mutante derivada de *C. violaceum* ATCC 31532 pero imposibilitada de sintetizar AHLs debido a una mutación en el gen *cvil* generada por la inserción del transposon Tn5 (Mc. Clean *et al.*, 1997).

C. violaceum VIR07 detecta: C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL, C14-HSL, C16-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-oxo-C10-HSL, 3-oxo-C12-HSL. Es una mutante derivada de *C. violaceum* ATCC 12472 con una delección en el gen *cvil* generada por la inserción de un casete de resistencia a kanamicina (*cvil::Kmr*), por este motivo no sintetiza AHLs. VIR07 es capaz de detectar en especial AHLs con cadena acilada larga con o sin sustituyente (Morohoshi *et al.*, 2008).

Ambas cepas de *C. violaceum* producen el pigmento violeta Violaceina cuando son inducidas por AHLs exógenas, siendo este proceso un indicador de la presencia de dichas moléculas.

Las cepas biosensoras se crecieron a 28 °C en medio (LB); *C. violaceum* fue cultivada con Kanamicina (50 µg/ml). En cada caso fue crecida una colonia proveniente de una placa de un cultivo fresco en medio líquido (LB) por 4 - 6 horas bajo agitación a 120 rpm (OD = 0.5). De este cultivo se realizó una dilución 1:5 y luego se mezcló con un volumen igual de (LB)-agar 1.5% previamente fundido. Este TOP-agar fue utilizado para cubrir placas (LB)-agar 1.5% para realizar el bioensayo.

En paralelo fueron cultivados los aislamientos de *Pseudomonas* spp. en 1 ml de medio (M63) glucosa 0.2%, CAA 0.5% durante 24 hs bajo agitación mecánica y los aislamientos de *Burkholderia* spp. en 1 ml del mismo medio además de 1 ml de (M9) glucosa 0.4% durante 48 horas bajo agitación. Luego cada cultivo fue centrifugado durante 4 minutos a 10000 rpm y el sobrenadante libre de células fue utilizado en el bioensayo.

Sobre las placas conteniendo el TOP-agar con cada cepa biosensora fueron colocados discos de papel de filtro de 1.4 cm de diámetro (entre 3 y 4 por placa) y sobre ellos se sembraron 50 µl de sobrenadante de cada cultivo proveniente de cada aislamiento. Las placas fueron incubadas a 28° durante 24 horas. Al cabo del período de incubación se realizó la observación de pigmento violeta alrededor del disco de papel. Como control positivo se utilizó *Burkholderia vietnamensis* (BCC) GV.

10- Tinción con rojo congo

El rojo congo al 0.001 % se emplea para detectar (1-4) β-D glucopiranosidos secretados, principalmente la celulosa. Las colonias productoras de fibrillas de celulosa adquieren coloración roja, mientras que las que no producen este polisacárido son de color blanquecino (Ausmees *et al.*, 1999; Spiers *et al.*, 2003).

Para *Mesorhizobium japonicum* se incubaron starters de cada cepa a estudiar a 28° C en agitación (200 rpm) durante dos días. Se sembraron 5 µl de cada cultivo de las distintas cepas a estudiar en placas TY-agar y AB-agar conteniendo 0.001 % de rojo congo. Las placas fueron incubadas durante 4 y 10 días a 28°C.

En el caso de los aislamientos de *Pseudomonas* los starters fueron preparados a partir de una colonia proveniente de una placa de medio M63 suplementado con Glucosa 0.2% y Casaminoácidos (CAA) 0.5% e incubados ON en mesada en tubos conteniendo 3 ml del mismo medio de cultivo, para luego utilizar una dilución 10^{-3} de ODi aproximada de 0.001.

Los starters de los aislamientos de *Burkholderia* se prepararon en 3 ml de medio de cultivo M63 glucosa 0.2%, CAA 0.5% y M9 Glucosa 0.4% y se incubaron ON bajo agitación para luego utilizar una dilución 10^{-2} de ODi aproximada de 0.01. Los ensayos fueron realizados en placas M63-agar y placas M9-agar suplementadas con 0.001% de rojo congo para los aislamientos de *Burkholderia* y sólo en M63 en el caso de los aislamientos de *Pseudomonas*. De cada aislamiento fueron sembrados 2 μ l de las diluciones antes mencionadas para cada medio en su correspondiente placa rojo congo. Las placas sembradas con los aislamientos de *Pseudomonas* y *Burkholderia* fueron incubadas durante 24 horas y 48 horas respectivamente a una temperatura de 28°C.

11- Tinción con Calcofluor

Se estriaron colonias de *Mesorhizobium japonicum* MAFF303099 y derivadas provenientes de cultivos frescos sobre placas conteniendo medio AB- Agar suplementado con sacarosa 0.5% y calcofluor 0.02% con y sin gentamicina dependiendo de la cepa a ensayar. Las placas fueron incubadas durante 4 a 5 días a 28°C. El calcofluor es un fluorocromo que se une a (1-3)- β - y (1-4)- β -D-glucopiranosidos tales como celulosa, quitina y succinoglicano (Weiner *and* Model, 1994). La fluorescencia de las colonias ante la exposición a luz UV, indica binding del calcofluor, en nuestro caso al succinoglicano producido por las bacterias.

12- Agregación celular

Las distintas cepas de *M. japonicum* MAFF 303099 fueron analizadas en su capacidad de agregar mediante monitoreo de la sedimentación de las bacterias en los diferentes medios de cultivo. Para los ensayos se utilizaron medio mínimo (AB) suplementado con sacarosa 0.5% y el mismo medio suplementado con 0.2% de manitol, medio mínimo (Y) suplementado con 0.2% de manitol y con sacarosa 0.5%, medio rico de triptona y extracto de levadura (TY) y alternativamente utilizamos (Y) con agregado de 1 g/l de NH_4Cl , también suplementado con 0.2 % de manitol y sacarosa 0.5%. Las bacterias fueron incubadas en 3 ml de cada medio por triplicado a 28° C en agitación (200 rpm) durante 48 h. Un volumen de 1.5 ml de dichos cultivos fue transferido a cubetas para espectrofotómetro cubiertas con parafilm para ser incubadas a RT (23 °C) durante 24 h en forma estática. La OD_{600} fue medida inicialmente cuando el cultivo se transfirió a la cubeta y al cabo de distintos tiempos (t) 6, 9, 18 y 24 horas. La OD_{0h} de cada cultivo fue de 1 aproximadamente. El porcentaje de agregación se calculó utilizando la siguiente ecuación (Basson *et al.*, 2007):

$$\% \text{ de Agregación} = \frac{OD_{0h} - OD_{t(\text{horas})}}{OD_{0h}} \times 100$$

Los ensayos de agregación celular en *Pseudomonas* spp. y *Burkholderia* spp. fueron realizados en el medio óptimo para el desarrollo de biofilm de cada grupo ó aislamiento. Las bacterias fueron incubadas en tubos de 3 ml a 28° C en agitación (200 rpm) durante 17 horas en el caso de *Pseudomonas* y 48 horas en *Burkholderia*, a partir de una OD inicial de 0.001 y 0.01 respectivamente. Luego de este período de crecimiento cada cultivo fue agitado con vortex durante 15 segundos. A los 0.5 cm de la superficie del líquido se tomaron 150 ul de muestra que fueron transferidos a una placa multiwell mantenida en hielo. Al cabo de 4 horas de reposo a RT se tomó una nueva alícuota de cada cultivo y se midió OD_{600nm} de toda la placa. El porcentaje de agregación se calculó según la ecuación anterior. El período de tiempo de reposo en este caso fue definido para poder evaluar comparativamente los porcentajes de agregación sobre la totalidad de los aislamientos de ambos géneros. Así se encontró que a las 4 horas de reposo la cepa con mayor capacidad de agregación (P3) alcanzó su porcentaje máximo medible (90%).

13- Ensayos de supervivencia

13.1 Tolerancia al Arsénico (III) y a la salinidad

Con el fin de estudiar la tolerancia a Arsénico (III) y a la salinidad (presencia de NaCl) en los aislamientos de *Pseudomonas* spp. y *Burkholderia* spp. se evaluó la supervivencia de las bacterias al incubarlas con distintas concentraciones de cada sustancia. Para ello se utilizaron distintas concentraciones de NaAsO₂ (Arsenito de Sodio) y de NaCl para graficar el % de mortalidad de las bacterias en función de la concentración de la sustancia tóxica (As (III) ó NaCl). Las concentraciones de As (III) utilizadas inicialmente fueron: 0.25, 0.5, 1, 2.5 y 5 mM y las de NaCl: 50, 150, 250, 500 y 750 mM. Cuando fue necesario las concentraciones del tóxico fueron acotadas al rango de tolerancia de cada cepa. Las bacterias del género *Pseudomonas* spp. fueron cultivadas ON y las del género *Burkholderia* spp. durante dos días, en todos los casos se incubaron a 28°C con agitación en medio M63 glucosa 0.2% y CAA 0.5%. Luego las células fueron cosechadas por centrifugación (10000 rpm, 4 min) y posteriormente lavadas con PBS. A partir de estos starters se realizaron diluciones de las bacterias en PBS de modo de obtener 1 x 10⁶ u.f.c/ml. De esta suspensión bacteriana fueron transferidos a pocillos de una placa de 96 wells (CELLSTAR®, Greiner Bio-one) 100 ul de cada suspensión junto con 100 μl de cada una de las concentraciones de As (III) ó NaCl. Como control se transfirieron 100 ul de la suspensión bacteriana junto con 100 ul de PBS. Las placas fueron incubadas sin agitación a 28°C ON cuando se trató de *Pseudomonas* spp. y dos días en el caso de *Burkholderia* spp. (estas placas se realizaron por triplicado). Al término de dichos períodos se realizaron 5 diluciones seriadas (por cinco réplicas) en PBS estéril de cada suspensión incubada con cada concentración de tóxico de modo de lograr un recuento en placa de la cantidad de bacterias viables. Los recuentos fueron realizados en placas con medio rico LB. La mortalidad de las células se calculó tomando como referencia el

número de células viables obtenido en el experimento control con PBS (sin tóxico) de cada cepa como el 100% de viabilidad.

La concentración letal₅₀ se calculó por el método gráfico, que consiste en graficar los porcentajes de mortalidad observados en función de las concentraciones aplicadas. Para un mejor ajuste se utilizó la transformación de Probit, así las concentraciones fueron transformadas a logaritmo de base 10 y los porcentajes de mortalidad a unidades Probit. Por extrapolación la concentración letal media se calculó gráficamente con la ecuación de la recta obtenida (tabla 1) (Finney, 1978; Hubert, 1995).

En cada caso fueron realizados tres experimentos independientes de tres réplicas cada uno.

Tabla 1

Aislamiento	Ecuación de la recta para la determinación de la CL50 de As (III)	Ecuación de la recta para la determinación de la CL50 de NaCl
P1	$Y = 3.004 * X + 5.112$	$Y = 3.529 * X - 2.140$
P2	-	$Y = 3.289 * X - 2.225$
P3	$Y = 0.868 * X + 5.144$	$Y = 3.404 * X - 1.882$
P4	$Y = 3.911 * X + 5.598$	$Y = 4.556 * X - 5.214$
P5	$Y = 5.508 * X + 4.947$	$Y = 4.793 * X - 5.369$
P6	$Y = 7.156 * X + 4.942$	$Y = 5.056 * X - 6.073$
P7	-	$Y = 3.977 * X - 3.404$
P8	-	$Y = 7.016 * X - 9.848$
P9	$Y = 6.817 * X + 3.226$	$Y = 5.710 * X - 7.485$
P10	$Y = 2.562 * X + 5.405$	$Y = 1.288 * X + 2.945$
P11	$Y = 4.319 * X + 4.548$	$Y = 6.401 * X - 7.737$
P12	$Y = 3.801 * X + 4.859$	$Y = 4.360 * X - 4.473$
P13	$Y = 3.834 * X + 4.693$	$Y = 7.662 * X - 12.18$
P14	$Y = 1.493 * X + 5.348$	$Y = 2.632 * X - 0.241$
P15	$Y = 2.683 * X + 5.321$	$Y = 7.749 * X - 11.73$
P16	$Y = 3.051 * X + 5.334$	$Y = 12.25 * X - 26.64$
P17	$Y = 2.625 * X + 5.119$	$Y = 6.521 * X - 10.70$
P18	$Y = 0.304 * X + 5.175$	$Y = 5.380 * X - 7.447$
B1	-	$Y = 4.105 * X - 3.610$
B2	-	$Y = 4.525 * X - 4.456$
B5	-	$Y = 8.423 * X - 13.02$
B7	-	$Y = 16.64 * X - 31.35$
B8	$Y = 4.217 * X + 5.577$	$Y = 12.42 * X - 22.06$
B10	-	$Y = 4.537 * X - 5.182$
B12	-	$Y = 5.363 * X - 8.134$
B14	-	$Y = 4.583 * X - 3.730$
B15	$Y = 4.362 * X + 6.752$	$Y = 8.529 * X - 13.66$
B16	-	$Y = 3.711 * X - 2.141$

13.2 Efecto de la toxicidad sobre la formación de biofilms

Se estudió la capacidad de formar biofilms sobre poliestireno en presencia de factores de stress como el NaAsO₂ (Arsenito de Sodio) y el NaCl cuyo nivel de tolerancia fue estimado en ensayos previos de determinación de la concentración letal₅₀ para cada aislamiento (sección 13.1). Los aislamientos seleccionados fueron cultivados en la mejor condición para el desarrollo de biofilm determinado en este estudio. Cada aislamiento fue expuesto a As (III) y a NaCl desde el inicio del ensayo. En paralelo se realizó el mismo ensayo sin el agregado del tóxico como experimento control y como referencia a partir de la cual se refirieron los resultados.

Las condiciones de cultivo para las cepas de *Pseudomonas* spp. fueron: 17 horas de incubación, bajo agitación a 200 rpm, a una OD inicial del orden de entre 1 y 1,5 x 10⁻³ en medio M63 glucosa 0.2% y casaminoácidos 0.5%. Las cepas de *Burkholderia* fueron incubadas durante 48 horas, bajo agitación a 200 rpm, a una OD inicial del orden de entre 1 y 1,5 x 10⁻² en el medio de cultivo M63 glucosa 0.2%, CAA 0.5% (B8 y B16), en el medio TSB (la cepa B12) y en el medio M9 glucosa 0.4% (cepa B14). Se evaluó el biofilm formado sobre PE (adhesión), mediante tinción con Cristal violeta como se mencionó previamente. La concentración de desafío de arsénico fue de 1 mM en todos los casos, mientras que la de NaCl fue variable de acuerdo a la CL₅₀ de cada aislamiento (100, 200, 300 y 400 mM)

En cada caso fueron realizados tres experimentos independientes de tres réplicas cada uno.

14- Ensayos con Plantas

14.1 Ensayo de adhesión a raíces de *Triticum* spp. (trigo)

Los ensayos de adhesión bacteriana sobre raíz fueron realizados utilizando semillas de trigo cedidas por el INTA, variedad INTA BW26.

Las semillas fueron desinfectadas previamente sumergiendo durante 3 minutos en etanol 70% y enjuagando 3 veces con agua destilada estéril. Luego se sumergieron en lavandina 2% durante 3 minutos y finalmente se realizaron 3 enjuagues con abundante agua destilada estéril.

Para su germinación las semillas se colocaron en una caja de petri con papel de filtro estéril humedecido en agua y se dejaron en oscuridad a temperatura ambiente.

A partir de las 48 – 72 horas de germinadas, las plántulas fueron transplantadas a tubos pico de flauta PBS-agar 1%, con el área radicular cubierta de la luz.

Los cultivos bacterianos de *Pseudomonas* spp. y *Burkholderia* spp. fueron cultivados en medio M63 glucosa 0.2% y CAA 0.5% bajo agitación a 28°C hasta alcanzar una OD= 1. Luego, los cultivos fueron cosechados mediante centrifugación durante 4 minutos a 10000 rpm, lavados y resuspendidos en PBS. A partir de esta suspensión de células se realizaron diluciones seriadas 1:10 en PBS hasta OD = 0.001 (del orden de 1 x 10⁵ bacterias / ml) cuando los aislamientos fueron de *Pseudomonas* spp. y hasta OD = 0.01

(del orden de 1×10^6 bacterias / ml) cuando se trató de *Burkholderia* spp. Se inocularon 200 ul de las respectivas diluciones por plántula.

Cada cepa fue inoculada por triplicado sobre las raíces de las plántulas luego de 6 horas de transplantadas. Los tubos fueron incubados en mesada a 23°C con ciclo de luz natural iniciando a las 4 pm, durante 17 horas en el caso de las *Pseudomonas* spp. y durante 48 hs cuando se trató de *Burkholderia* spp. Los controles se inocularon con 200 ul de PBS por triplicado.

Recuperación de bacterias adheridas a las raíces de trigo

Las raíces fueron cortadas y lavadas en 10 ml de PBS con suave agitación manual durante 10 segundos. Luego se escurrieron en papel de filtro estéril sobre una placa de Petri y se pesaron en microtubos previamente tarados. Las raíces fueron machacadas con varilla de vidrio en 500 ul de glicerol 20% para desprender las bacterias adheridas. Luego se vortexearon durante 30 segundos y se dejó decantar durante 3 minutos para luego tomar entre 50-100 ul de la suspensión sobrenadante y hacer el recuento de células. El resto de la suspensión libre tejido de raíz se conservó a -20°C.

El número de unidades formadoras de colonias (ufc) obtenidas se refirió a los gramos de raíz pesados, expresándose así la adhesión bacteriana en ufc/g de raíz.

14.2 Ensayos de nodulación en *Lotus tenuis*

Semillas de *Lotus tenuis* variedad Esmeralda cedidas por la empresa GENTOS, fueron desinfectadas superficialmente por inmersión en ácido sulfúrico concentrado (98% p/p) durante 3 minutos. A continuación, fueron lavadas con agua destilada estéril cinco veces, y mantenidas en remojo durante 18 horas en oscuridad a temperatura ambiente en agitación suave. Para su germinación las semillas se manipularon en condiciones asépticas y se colocaron sobre placas de petri conteniendo agar-agua 1% ó eventualmente papel de filtro humedecido para ser cultivadas en oscuridad a temperatura ambiente durante tres días.

Para realizar los ensayos de nodulación se prepararon tubos de vidrio pico de flauta con medio para plantas B&D ¼, agar 1% (Broughton and Dilworth, 1971). Luego de 3 días post- germinación fueron transferidas a dichos tubos las plántulas de *L. tenuis* (dos plantas por tubo). Así fueron crecidas verticalmente con el área radical cubierta de la luz en ciclos de 16/8 horas día/ noche a 22°C. Los cultivos bacterianos de cada cepa de *Mesorhizobium japonicum* requeridos para infectar las plantas fueron crecidos en medio AB con su correspondiente antibiótico hasta fase exponencial de la curva de crecimiento (DO_{600nm} 0,6 a 0,8). Una vez alcanzada la densidad poblacional requerida, los cultivos fueron centrifugados durante 4 minutos a 10000 rpm y lavados con medio para plantas B&D ¼ para finalmente ser resuspendidos en el mismo medio para inocular. De esta suspensión de células se utilizaron 10 µl por planta como inóculo. Se reservaron en cada oportunidad 7 tubos control sin inocular a los que se les agregó en lugar de la suspensión bacteriana 10 µl de medio B&D ¼ por planta. Las inoculaciones se realizaron a los 5 días

post-transplante y el conteo de nódulos se realizó hasta el día número 42. Los experimentos de nodulación se realizaron en dos oportunidades separadas en el tiempo. En cada momento se realizaron 3 experimentos de 17 plantas cada uno para cada cepa. Se realizaron 9 recuentos de nódulos espaciados por un mínimo de 3 días.

Medio para plantas Broughton and Dilworth:

	Concentración final
CaCl ₂	1 mM
KH ₂ PO ₄	0.5 mM
Citrato Férrico	10 μM
MgSO ₄	0.25 mM
K ₂ SO ₄	0.25 mM
<u>Elementos traza</u>	
MnSO ₄	1 μM
H ₃ BO ₃	2 μM
ZnSO ₄	0.5 μM
CuSO ₄	0.2 μM
CoSO ₄	0.1 μM
Na ₂ MoO ₄	0.1 μM
CoCl ₂	0.1 μM

De esta solución se utilizaron 250 ml por litro final de medio de cultivo. El medio fue esterilizado por autoclave.

15- Bioinformática y Estadística

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos y gráficos fueron realizados con GraphPad Prism version 9.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

Para comparar dos grupos, la diferencia estadística se determinó con la prueba T de *Student* (T test). Cuando comparamos tres ó más grupos, la prueba utilizada fue ANOVA de una vía seguido del *test* de Tukey o el de Dunnett. Se utilizó ANOVA de dos factores de ajuste completo cuando se compararon más de dos variables.

Con el objetivo de estudiar la relación entre las distintas variables y medir la magnitud ó fuerza de la asociación entre ambas, calculamos los coeficientes de correlación de *Pearson* (r) y de *Spearman* (r_s) para cada caso. Como criterio para interpretar las correlaciones realizadas en el presente trabajo consideramos la siguiente escala (Martínez Ortega *et al.*, 2009):

Valor del coeficiente	Interpretación de la correlación
0 – 0.25	Nula a escasa
0.26 – 0.50	Débil
0.51 – 0.75	Entre moderada y fuerte
0.76 – 1.0	Entre fuerte y perfecta

Los análisis de correlación de *Pearson*, *Spearman* y el análisis estadístico multivariado, fueron realizados con el software InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina (Di Rienzo *et al.*, 2013).

En todos los casos el criterio adoptado para determinar que una diferencia fuera estadísticamente significativa fue que $p < 0.05$.

Análisis *in silico*

Se utilizó el sitio del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para el análisis de secuencias nucleotídicas y de proteínas, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> Para comparar secuencias se utilizó el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tools), <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

Para el análisis de sitios promotores conservados, se utilizó el servidor **Softberry**, <http://sun1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfind>
[b](#)

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abbas R., Rasul S., Aslam K. et al. (2019). Halotolerant PGPR: A hope for cultivation of saline soils. *Journal of King Saud University – Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.02.019>.
- Abdian P.L., Caramelo J.J., Ausmees N. and Zorreguieta A. (2013). RapA2 is a calcium-binding lectin composed of two highly conserved cadherin-like domains that specifically recognize *Rhizobium leguminosarum* acidic exopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* 288: 2893–2904.
- Adal K. and Farr B. (1996). Central venous catheter-related infections: a review. *Nutrition* 12(3):208–13.
- Adams G., Fufeyin P., Okoro S. and Ehinomen I. (2015). Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *Int. J. Environ. Biorem. Biod.* 3, No. 1: 28-39.
- Adessi A., de Carvalho R.C., De Philippis R., Branquinho C. and da Silva J.M. (2018). Microbial extracellular polymeric substances improve water retention in dryland biological soil crusts. *Soil Biology & Biochemistry*. 116: 67–69.
- Agaras B., Wall L. G. and Valverde C. (2012). Specific enumeration and analysis of the community structure of culturable pseudomonads in agricultural soils under no-till management in Argentina. *Applied Soil Ecol.* 61 (2012) 305–319.
- Agaras, B., Scandiani, M., Luque, A., Fernández, L., Farina, F., Carmona, M., Gally, M., Romero, A., Wall, L.G., Valverde, C. (2015). Quantification of the potential biocontrol and direct plant growth promotion abilities based on multiple biological traits distinguish different groups of *Pseudomonas* spp. isolates. *Biol. Control* 90: 173–186.
- Agaras B., Noguera F., González Anta G., Wall L. and Valverde C. (2020). Biocontrol potential index of pseudomonads, instead of their direct-growth promotion traits, is a predictor of seed inoculation effect on crop productivity under field conditions. *Biolog. Cont.* 143: 104209.
- Andersen, J. et al. (2003). Surface motility in *Pseudomonas* sp. DSS73 is required for efficient biological containment of the root-pathogenic microfungi *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Microbiology*. 149, 37–46.
- Argentel C., López C., Fonseca I., Girón R. y González C. (2008). Efecto de la salinidad sobre la fenología, los componentes del rendimiento y su relación con la tolerancia varietal a la salinidad en trigo (*Triticum aestivum* y *T. durum*). *cultrop* v.29 n.3 La Habana jul.-sep.
- Arnold M., Penterman J., Shabab M., Chen E. and Walker G. (2018). Important late-stage symbiotic role of the *Sinorhizobium meliloti* exopolysaccharide succinoglycan. *J Bacteriol.* 200: e00665-17.
- Arora, N.K. and Mishra, J. (2016). Prospecting the roles of metabolites and additives in future bioformulations for sustainable agriculture. *Appl. Soil Ecol.* 3–5.
- Ashitha A., Radhakrishnan E.K., Jyothis M. (2020). Characterization of biosurfactant produced by the endophyte *Burkholderia* sp. WYAT7 and

- evaluation of its antibacterial and antibiofilm potentials. *J Biotechnol.* 313: 1-10.
- Assmus B, Hutzler P, Kirchhof G, Amann R, Lawrence JR, et al. (1995). In-situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, ribosomal-RNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1013–19
- Ausmees, N., Jonsson, H., Hoglund, S., Ljunggren, H., and Lindberg, M. (1999) Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Microbiology.* 145 (Pt 5): 1253-1262.
- Azami N.A., Wirjon I.A., Kannusamy S., The A.H. and Abdullah A.A. (2017). Enhanced degradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by newly isolated *Burkholderia cepacia* DP1 with high depolymerase activity. *3 Biotech.* 7: 75.
- Bach T., Díaz M., Ferreira A. and Laurent, A. (2007). Estudio de las características de promoción del desarrollo vegetal de *Pseudomonas fluorescens* utilizada en el biofertilizante Rizofos. VI Reunión Nacional Científico Técnica de Biología de Suelo. VI Encuentro sobre Fijación Biológica de Nitrógeno, ISBN 978-950-665437-5. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Bahar M., Megharaj M. and Naidu R. (2013). Bioremediation of arsenic-contaminated water: Recent advances and future prospects. *Water Air Soil Pollut.* 224: 1722-1741.
- Basson, A., Flemming, A. and Chenia, H. (2007). Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation and biofilm development of *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates. *Microbial Ecology* 55: 1–14.
- Battisti, L., Lara, J. and Leigh, J. (1992). Specific oligosaccharide form of the *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide promotes nodule invasion in alfalfa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 5625–5629.
- Becker A. (2015). Challenges and perspectives in combinatorial assembly of novel exopolysaccharide biosynthesis pathways. *Front. Microbiol.* 6: 687.
- Bellich B., Jou I., Caterino M., Rizzo R., Ravenscroft N., Fazli M., Tolker-Nielsen T., Brady J and Cescutti P. (2020). *Burkholderia cenocepacia* H111 Produces a Water-Insoluble Exopolysaccharide in Biofilm: Structural Determination and Molecular Modelling. *Int J Mol Sci.* 21(5): 1702.
- Bhattacharya P, Claesson M, Bundschuh J, Sracek O, Fagerberg J, Jacks G, Martin RA, Storniolo AR and Thir JM. (2006). Distribution and mobility of arsenic in the Río Dulce alluvial aquifers in Santiago del Estero Province, Argentina. *Sci. Total Environ.*; 358:97-120.
- Bianciotto, V., Andreotti, S., Balestrini, R., Bonfante, P. and Perotto S. (2001). Mucoïd mutants of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 show increased ability in biofilm formation on mycorrhizal and nonmycorrhizal carrot roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:255–60
- Blanco-Romero E., Garrido-Sanz D., Rivilla R., Redondo-Nieto M. and Martín M. (2020). In Silico Characterization and Phylogenetic Distribution of

- Extracellular Matrix Components in the Model Rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* F113 and Other Pseudomonads. *Microorganisms*. 8: 1740.
- Blarasin M., Cabrera A. y Matteoda E. (2014). Aguas subterráneas de la Provincia de Córdoba. UniRío Editora. ISBN 978-987-688-091-6
- Bogino P., Oliva M., Sorroche F. and Giordano W. (2013). The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 15838-15859.
- Branda S, Vik S, Friedman L and Kolter R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 13:20–26.
- Breakspear, A., Liu, C., Roy, S., Stacey, N, Rogers, C., Trick, M., Morieri, G., Mysore K., Wen, J., Oldroyd, G., et al. (2014) The root hair “infectome” of *Medicago truncatula* uncovers changes in cell cycle genes and reveals a requirement for auxin signaling in rhizobial infection. *Plant Cell.* 26: 4680–4701.
- Breedveld M., Zevenhuizen L., & Zehnder, A. (1990a). Osmotically induced oligo- and polysaccharide synthesis by *Rhizobium meliloti* SU-47. *Journal of General Microbiology* 136: 2511–2519.
- Breedveld M., Zevenhuizen L. and Zehnder A. (1990b). Excessive excretion of cyclic β -(1,2)-glucan by *Rhizobium trifolii* TA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2080–2086.
- Breedveld M., Canters C., Batley M., Posthumus M., Zevenhuizen L., Wijffelman C. and Zevenhuizen A. (1993). Polysaccharides synthesis in relation to nodulation behavior of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 175: 750-757.
- Breedveld M. and Miller K. (1994). Cyclic β -glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. *Microbiol. Rev.* 58: 145–161.
- Broghammer, A., Krusell, L., Blaise, M., Sauer, J., Sullivan, J., Maolanon, N., Vinther, M., Lorentzen, A., Madsen, E.B., Jensen, K.J., et al. (2012). Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109: 13859–13864.
- Broughton W. and M. Dilworth. (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J.* 125(4): 1075-80.
- Bulgarelli D., Garrido-Oter R., Münch P., Weiman A., Dröge J., Pan Y., McHardy A. and Schulze-Lefert P. (2015). Structure and Function of the Bacterial Root Microbiota in Wild and Domesticated Barley. *Cell Host & Microbe.* 17: 392–403.
- Burmølle, M., Bahl, M., Jensen, L., Sørensen, S. and Hansen, L. (2008) Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in Enterobacteriaceae strains. *Microbiol.* 154: 187–195.
- Burmølle M., Kjoller A. and Sorensen S.J. (2012). An invisible workforce: biofilms in the soil. In: Gavin L., Gillian L., (Eds.). *Microbial Biofilm: Current Research and Applications*. Caister Academic Press, 61–71.
- Bystrianský L., Hujšlová M., Hršelová H., Řezáčová V., Němcová L., Šimsová J., Gryndlerová J., Kofroňová O., Benada O. and Gryndler M. (2019).

- Observations on two microbial life strategies in soil: Planktonic and biofilm forming microorganisms are separable. *Soil Biology and Biochemistry*. 136.
- Cai P., Liu X., Ji D., Yang S., Walker S.L., Wu Y., Gao C. and Huang Q. (2018). Impact of soil clay minerals on growth, biofilm formation, and virulence gene expression of *Escherichia coli* O157:H7. *Environmental Pollution*. 243: 953–960.
- Cai P., Sun X., Wu Y., Gao C., Mortimer M., Holden P.A., Redmile-Gordon M. and Huang Q. (2019). Soil biofilms: microbial interactions, challenges, and advanced techniques for ex-situ characterization. *Soil Ecol. Lett.* 1(3-4): 85–93.
- Caiazza N., Merritt J., Brothers K. and O'Toole G. (2007). Inverse Regulation of Biofilm Formation and Swarming Motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* 189(9): 3603–3612.
- Cania, B., Vestergaard, G., Krauss, M. et al. (2019). A long-term field experiment demonstrates the influence of tillage on the bacterial potential to produce soil structure-stabilizing agents such as exopolysaccharides and lipopolysaccharides. *Environmental Microbiome*. 14: 1.
- Cárcamo-Oyarce G., Lumjiaktase P., Kümmerli R. and L. Eberl (2015). Quorum sensing triggers the stochastic escape of individual cells from *Pseudomonas putida* biofilms. *Nat. Commun.* 6: 5945.
- Cartwright DK, Chilton WS and Benson DM. (1995). Pyrrolnitrin and phe-nazine production by *Pseudomonas cepacia*, strain 5.5 B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 43: 211-6.
- Castellanos JZ. (2004). Manual de interpretación de análisis de suelos y aguas. Ed. INTAGRI. 130-140. México
- Chang W and Halverson L. (2003). Reduced water availability influences the dynamics, development, and ultrastructural properties of *Pseudomonas putida* biofilms. *J. Bacteriol.* 185: 6199–204
- Charles T., Finan T. (1991). Analysis of a 1600-kilobase *Rhizobium meliloti* megaplasmid using defined deletions generated in vivo. *Genetics* 127: 5-20.
- Cheng Y, Lin H, Chen Z, Megharaj M and Naidu R. (2012). Biodegradation of crystal violet using *Burkholderia vietnamiensis* C09 V immobilized on PVA–sodium alginate-kaolin gel beads. *Ecotoxicol Environ Saf.* 83: 108-14.
- Chen KC, Ravichandran A, Guerrero A, Deng P, Baird SM, Smith L. and Lu S.E. (2013). The *Burkholderia contaminans* MS14 ocfC gene encodes axylsyltransferase for production of the antifungal occidiofungin. *Appl Environ Microbiol.* 79: 2899-905.
- Chenu C. (1993). Clay polysaccharide or sand polysaccharide associations as models for the interface between microorganisms and soil water related properties and microstructure. *Geoderma*. 56: 143–156.
- Chenu C. and Cosentino D. (2011). Microbial regulation of soil structural dynamics. In: Ritz, K., Young, I., (Eds.), The architecture and biology and soils: life in inner space. *CAB International*, London. 37–70.

- Cochran, W.L. et al. (2000) Role of RpoS and AlgT in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide and monochloramine. *J. Appl. Microbiol.* 88:546–553.
- Cocking E. (2003). Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant Soil* 252:169–75.
- Coenye, T. (2010). Social interactions in the *Burkholderia cepacia* complex: biofilm formation and quorum sensing. *Future Microbiol.* 5:1087-1099.
- Cooper, J.E. (2004). Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. *Adv. Bot. Res.* 41: 1–62.
- Costerton, J.W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D.E.; Korber, D.R.; Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 711–745
- Costerton J.W., Stewart P.S. and E.P. Greenberg (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284: 1318–1322.
- Da Silva Chaves J., Baraúna A.C., Mosqueira C.A., Gianluppi V., Zilli J.E. and Da Silva K. (2016). *Stylosanthes* spp. from Amazon savanna harbour diverse and potentially effective rhizobia. *Appl Soil Ecol.* 108: 54-61.
- Danhorn T, Hentzer M, Givskov M, Parsek M and Fuqua C. (2004). Phosphorous limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR-PhoB regulatory system. *J. Bacteriol.* 186:4492–501
- Danhorn, T. and Fuqua, C. (2007) Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 61:401–22
- D’Antuono, A., Casabuono A., Couto A., Ugalde R. and Lepek V. (2005). Nodule development induced by *Mesorhizobium loti* mutant strains affected in polysaccharide synthesis. *Mol. Plant-Microbe Inter.* 18 (5) 446-457.
- Dastidar, A. and Wang Y. (2009). Arsenite oxidation by batch cultures of *Thiomonas arsenivorans* strain b6. *J. Environ. Eng.* 135: 708-715.
- Davey, M.E., and O’toole, G. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 847–867.
- de Boer, W., Klein Gunnewick, R., Veenhuis, M., Bock, E. and Laanbroeck, H. (1991) Nitrification at low pH by aggregated chemolithotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3600–3604.
- De la Rosa-Garcia S.C., Munoz-Garcia A.A., Barahona-Perez L.F. and Gamboa-Angulo M.M. (2007). Antimicrobial properties of moderately halotolerant bacteria from cenotes of the Yucatan peninsula. *Lett Appl Microbiol.* 45: 289-94.
- De los Santos-Villalobos S., Barrera-Galicia G.C., Miranda-Salcedo M.A. and Peña-Cabriaes J.J. (2012). *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *World J Microbiol Biotechnol.* 28: 2615-23.
- Dewanti, R. and Wong, A. (1995). Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* 0157:H7. *Int. J. Food Microbiol.* 26:147–64.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M., Gonzale, L., Tablada, M. and Robledo C.W. (2013). InfoStat versión 2013.

- Dobritsa AP and Samadpour M. (2016). Transfer of 11 *Burkholderia* species to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov., a new genus to accommodate 12 species of *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 66: 2836---46.
- Dorke, G., Ferguson, G., French, C. and Poon, W. (2012). Aggregation by depletion attraction in cultures of bacteria producing exopolysaccharide. *J. R. Soc. Interface* 9: 3490-3502.
- Douterelo, I., Boxall, J.B., Deines, P., Sekarc, R., Fisha, K.E. and Biggs, C.A. (2014). Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems. *Water Res.* 65: 134–156.
- Dow, J., Crossman, L., Findlay, K., He, Y.-Q., Feng, J.-X. and Tang, J.-L. (2003) Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell–cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 100: 10 995–11 000.
- Draghi WO, Degrossi J, Bialer M, Brelles-Mariño G, Abdian P, Soler-Bistue A, et al. (2018). Biodiversity of cultivable *Burkholderia* species in Argentinean soils under no-till agricultural practices. *PLoS ONE* 13(7): e0200651.
- Eberl LP and Vandamme P. (2016). Members of the genus *Burkholderia*: Good and bad guys. *F1000Research.* 26: 5.
- Ekkhunnatham A, Jongsareejit B, Yamkunthong W. and Wichitwech-karn J. (2012). Purification and characterization of methyl parathionhydrolase from *Burkholderia cepacia* capable of degrading organophosphate insecticides. *World J Microbiol Biotechnol.* 28: 1739-46.
- Elasri M, Delorme S, Lemanceau P, Stewart G, Laue B, et al. (2001). Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1198–209
- Espinosa-Urgel M, Salido A and Ramos J. (2000). Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *J. Bacteriol.* 182: 2363–69
- Fahraeus, G. (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microbiol* 16 (2): 374-81.
- Ferreira A.S., Leitão J.H., Silva I.N., Pinheiro P.F., Sousa S.A., Ramos C. G. and Moreira L.M. (2010). Distribution of cepacian biosynthesis genes among environmental and clinical *Burkholderia* strains and role of cepacian exopolysaccharide in resistance to stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 441–450.
- Ferreira A., Silva I., Oliveira V., Cunha R. and Moreira L. (2011). Insights into the role of extracellular polysaccharides in *Burkholderia* adaptation to different environments. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 1: 16.
- Fett W and Cooke P. (2005). A survey of native microbial aggregates on alfalfa, clover and mung bean sprout cotyledons for thickness as determined by confocal scanning laser microscopy. *Food Microbiol.* 22:253–59.

- Fierer N., Bradford M. and Jackson R. (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecol. ESA.* 88 (6): 1354-1364.
- Fierer N. (2017). Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews. Microbiology.* 15: 579–590.
- Finan T., Weidner S., Wong K., Buhrmester J., Chain P., Vorholter F., Hernandez-Lucas I., Becker A., Cowie A., Gouzy J., Golding B., Pühler A. (2001). The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 9889-9894.
- Finney, D. (1978). *Statistical Method in Biological Assay*, 3rd ed., Charles Griffin & Company Ltd, London and High Wycombe.
- Flemming H.C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A. and Kjelleberg S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14: 563–575.
- Fletcher, M. (1977). The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Can J Microbiol.* 23: 1–6
- Frayse N., Couderc F. and Poinot V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur J Biochem.* 270: 1365-1380.
- Fujishige, N., Kapadia, N., De Hoff, P. and Hirsch, A. (2006). Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56:195–206
- Fuqua, C., and E. P. Greenberg (2002). Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:685–695
- Gage, D. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 280–300.
- Galván E., Ielmini M., Pate Y., Bianco M., Franceschini E., Schneider J., and Ielpi L. (2013). Xanthan chain length is modulated by increasing the availability of the polysaccharide copolymerase protein GumC and the outer membrane polysaccharide export protein GumB. *Glycobiology.* 23 (2): 259-72.
- Gambino, M. and Cappitelli, F. (2016). Mini-review: biofilm responses to oxidative stress. *Biofouling.* 32: 167–178.
- Gharzouli, R., Carpéné, M., Couderc, F., Benguedouar, A., Poinot, V. (2013) Relevance of fucose-rich extracellular polysaccharides produced by *Rhizobium sulae* strains nodulating *Hedysarum coronarium* l. legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 1764–1776.
- Ghosh P., Ganguly J., Maji P. and Maiti T., (2015). Production and composition of extracellular polysaccharide synthesized by *Rhizobium undicola* isolated from aquatic legume, *Neptunia oleracea* Lour. *Proc. Natl. Acad. Sci. India B Biol. Sci.* 85, 581–590.
- Ghosh P. and Maiti T. (2016). Structure of Extracellular Polysaccharides (EPS) Produced by Rhizobia and their Functions in Legume–Bacteria Symbiosis: A Review. *Achiev. Lif. Sci.* 10: 136-143.
- Ghosh R., Barman S., Mukherjee R. and Mandal N.C. (2016). Role of phosphate solubilizing *Burkholderia* spp. for successful colonization and growth

- promotion of *Lycopodium cernuum* L. (*Lycopodiaceae*) in lateritic belt of Birbhum district of West Bengal, India. *MicrobiolRes.* 183: 80-91.
- Gibson K., Kobayashi H. and Walker, G. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu. Rev. Genet.* 42: 413–441.
- Glucksmann MA, Reuber TL, Walker GC (1993). Genes needed for the modification, polymerization, export, and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: a model for succinoglycan biosynthesis. *J Bacteriol.* 175: 7045-7055.
- Gonzalez JE., Semino CE., Wang LX., Castellano-Torres LE. And Walker GC. (1998). Biosynthetic control of molecular weight in the polymerization of the octasaccharide subunits of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 13477-13482.
- Gopalakrishnan S., Sathya A., Vijayabharathi R., Varshney R.K., Gowda C.L.L. and Krishnamurthy L. (2014). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *Biotech.* 5: 355–377
- Goykovic Cortés V. y Saavedra del Real G. (2007). Some effects of salinity on the tomato cultivars and agronomic practices in its managing. *Idesia* v.25 n.3: 47-58.
- Gu G., Smith L., Wang N., Wang H. and Lu S.E. (2009) Biosynthesis of an antifungal oligopeptide in *Burkholderia contaminans* strain MS14. *Biochem Biophys Res Commun.* 380: 328-32.
- Her GR., Glazebrook J., Walker GC. and Reinhold VN. (1990). Structural studies of a novel exopolysaccharide produced by a mutant of *Rhizobium meliloti* strain Rm 1021. *Carbohydr Res.* 198: 305-312.
- Hinsa S, Espinosa-Urgel M, Ramos J and O’Toole GA. (2003). Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol. Microbiol.* 49:905–18
- Hiroaki, I., Hiroshi N. and Hiroto O. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *Gene* 96: 23-28.
- Hitchcock P. and Brown T. (1983). Morphological Heterogeneity Among *Salmonella* Lipopolysaccharide Chemotypes in Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Journal of bacteriology* 154(1): 269-277.
- Huang, J. H. (2014). Impact of microorganisms on arsenic biogeochemistry: A review. *Water Air Soil Pollut.* 225: 1848.
- Hubert, J. (1995). Bioassay and its Relation to Agricultural and Environmental Issues. *Simposio Internacional de Estadística*, Santa Marta.
- Hussain S, Arshad M, Saleem M, Khalid A. (2007). Biodegradation of α - and β -endosulfan by soil bacteria. *Biodegradation.* 18: 731-40.
- Ikbal, Passricha N., Saifi S., Sikka V. and Tuteja N. (2020). Chapter 3 - Multilegume biofertilizer: a dream. *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*, Academic Press. 35-45.

- Ito, A., Miura J., Ishikaw N., and Umita T. (2012). Biological oxidation of arsenite in synthetic groundwater using immobilised bacteria. *Water Res.* 46: 4825-4831.
- Jacobs A, Chenia H. (2010). Biofilm-forming capacity, surface hydrophobicity and aggregation characteristics of *Myroides odoratus* isolated from South African *Oreochromis mossambicus* fish. *J. Appl. Microbiol.* 107: 1957–1966.
- Janczarek, M. (2011). Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 7898–7933.
- Janczarek M., Rachwal K., M., Marzec A., Jarosław, G and Palusinska-Szys M. (2014). Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–Rhizobium interactions. *Appl. Soil Ecol.* 85, 94–113.
- Jefferson, K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Letters.* 236: 163–173.
- Jofre E. and Becker A. (2009). Production of succinoglycan polymer in *Sinorhizobium meliloti* is affected by SMb21506 and requires the N-terminal domain of ExoP. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22: 1656–1668.
- Jones B., Young R., Mahenthiralingam E. and Stickler D. (2004). Ultrastructure of *Proteus mirabilis* swarmer cell rafts and role of swarming in catheter associated urinary tract infection. *Infect. Immun.* 72: 3941-3950.
- Jones, K., Kobayashi, H., Davies, B., Taga, M. and Walker, G. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: The *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 619–633.
- Kaneko T., Nakamura Y., Sato S., Asamizu E., Kato T., Sasamoto S., Watanabe A., Idesawa K., Ishikawa A., Kawashima K., Kimura T., Kishida Y., Kiyokawa C., Kohara M., Matsumoto M., Matsuno A., Mochizuki Y., Nakayama S., Nakazaki N., Shimpo S., Sugimoto M., Takeuchi C., Yamada M., Tabata S. (2000). Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium japonicum*. *DNA Res.* 7:331-338.
- Kasim W., Gaafar R., Abou-Ali R., Omar M. and Hewait H. (2016). Effect of biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance in barley. *Annals of Agricultural Science.* 61(2): 217–227.
- Kawaharada, Y., Kelly, S., Nielsen, M., Hjuler, C., Gysel, K., Muszynski, A., Carlson, R., Thygesen, M., Sandal, N., Asmussen, M.H., et al. (2015). Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature.* 523: 308–312.
- Kawaharada, Y., Nielsen, M., Kelly, S., James, E., Andersen, K., Rasmussen, S., Füchtbauer, W., Madsen, L., Heckmann, A., Radutoiu, S., et al. (2017). Differential regulation of the Epr3 receptor coordinates membrane-restricted rhizobial colonization of root nodule primordia. *Nat. Commun.* 8, 14534.
- Kearns D. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Mic.* 8: 634-644.
- Kelly S., Muszynski A., Kawaharada Y., Hubber A., Sullivan J., Sandal N., Carlson R., Stougaard J. and Ronson, C. (2012). Conditional requirement for

- exopolysaccharide in the *Mesorhizobium*–*Lotus* symbiosis. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26: 319–329.
- Kelly, S., Sullivan, J., Ronson, C., Tian, R., Bräu, L., Munk, C., Goodwin, L., Han, C., Woyke, T. and other authors (2014). Genome sequence of the *Lotus spp.* microsymbiont *Mesorhizobium japonicum* strain R7A. *Stand Genomic Sci.* 9: 6.
- Kim J., Park H.D. and Chung S. (2012). Microfluidic approaches to bacterial biofilm formation. *Molecules.* 17: 9818–9834.
- Kokare, C.R., Chakraborty, S., Khobade, A.N., and Mahadik, K.R. (2009). Biofilms: importance and applications. *Indian J. Biotechnol.* 8: 159-168.
- Krumova K., Nikolovska M. and V. Groudeva (2008). Isolation and identification of arsenic-transforming bacteria from arsenic contaminated sites in Bulgaria. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* 22: 721-728.
- Kumaresan M. and Riyazuddin P. (2001). Overview of speciation chemistry of arsenic. *Curr. Sci.* 80: 837-846.
- Laus M, van Brussel A and Kijne W. (2005). Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 533–538
- Laus M., Logman T., Lamers G., Van Brussel A., Carlson R. and Kijne J. (2006). A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Mol. Microbiol.* 59: 1704–1713.
- Le N., Sato A., Inoue D., Sei K., Soda S. and Ike M. (2012). Bacterial community succession during the enrichment of chemolithoautotrophic arsenite oxidizing bacteria at high arsenic concentrations. *J. Environ. Sci.* 24: 2133-2140.
- Lee CH, Kim S, Hyun B, Suh JW, Yon C, Kim C and Lim Y. (1994). Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*. I. Taxonomy, production, isolation and biological activity. *J Antibiot.* 47: 1402-5.
- Lepek V., D’Antuono A., Tomatis P., Ugalde J., Giambiagi S. and Ugalde R. (2002). Analysis of *Mesorhizobium loti* glycogen operon: effect of phosphoglucomutase (*pgm*) and glycogen synthase (*glgA*) null mutants on nodulation of *Lotus tenuis*. *Mol. Plant-Microbe Inter.* 15(4) 368-375.
- Li X., Quan C.S. and Fan S.D. (2007). Antifungal activity of a novel compound from *Burkholderia cepacia* against plant pathogenic fungi. *Lett Appl Microbiol.* 45: 508-14.
- Luo X., Zeng X.C., He Z., Lu X., Yuan J., Shi J., Liu M., Pan Y. and Wang, Y.X. (2014). Isolation and characterization of a radiation-resistant bacterium from Taklamakan desert showing potent ability to accumulate lead (II) and considerable potential for bioremediation of radioactive wastes. *Ecotoxicology.* 23: 1915–1921.
- Madsen J.S., Burmølle M., Hansen L.H. and Sørensen S.J. (2012). The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 65: 183–195.
- Mah T. and O’Toole G. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *TRENDS Microbiol.* 9(1): 34-39.

- Mahenthiralingam E, Song L, Sass A, White J, Wilmot C, March-bank A, Boaisa O, Paine J, Knight D and Challis GL. (2011). Enacyloxins are products of an unusual hybrid modular polyketide synthase encoded by a cryptic *Burkholderia ambifaria* genomic island. *Chem Biol.* 18: 665---77.
- Malik, A., Sakamoto, M., Hanazaki, S., Osawa, M., Susuki, T., Tochigi, M. and Kakii, K. (2003). Coaggregation among nonfloculating bacteria isolated from activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6056–6064.
- Marczak M., Mazur A., Koper P., Zebracki K. and Skorupska A. (2017). Synthesis of Rhizobial Exopolysaccharides and Their Importance for Symbiosis with Legume Plants. *Genes.* 8, 360.
- Maróti G., Downie J. and Kondorosi É. (2015). Plant cysteine-rich peptides that inhibit pathogen growth and control rhizobial differentiation in legume nodules. *Curr Opin Plant Biol.* 26: 57– 63.
- Martínez-Hidalgo, P., Ramírez-Bahena, M., Flores-Felix, J., Rivas, R., Igual, J., Mateos, P., Martínez-Molina, E., León-Barrios, M., Peix, Á. and Velazquez, E. (2015). Revision of the taxonomic status of type strains of *Mesorhizobium japonicum* and reclassification of strain USDA 3471 as *Mesorhizobium erdmanii* sp. nov. and ATCC 33669 *Mesorhizobium jarvisii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 65: 1703–1708.
- Martínez-Hidalgo P., Ramírez-Bahena M., Flores-Felix J., Igual J., Sanjuan J., León-Barrios M., Peix A. and Velazquez E. (2016). Reclassification of strains MAFF 303099 and R7A into *Mesorhizobium japonicum* sp. nov. *Int J Syst Evol. Microbiol.* 66: 4936–4941.
- Martínez-Hidalgo P and Hirsch AM. (2017). The nodule microbiome; N2-fixing rhizobia do not live alone. *Phytobiomes.* 1: 70-82.
- Martínez-Viveros O., Jorquera M.A., Crowley D.E., Gajardo G. and Mora M.L. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by Rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10: 293–319.
- Massol-Deya, A., Whallon, J., Hickey, R. and Tiedje, J. (1995) Channel structure in aerobic biofilms of fixed film reactors treating contaminated groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 769–777.
- Matthysse, A.G.; Marry, M.; Krall, L.; Kaye, M.; Ramey, B.E.; Fuqua, C.; White, A.R. (2005). The effect of cellulose overproduction on binding and biofilm formation on roots by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18: 1002–1010.
- Mc Clean K., Winson M., Fish L., Taylor A., Chhabra S., Camara M., Daykin M., Lamb J., Swift S., Bycroft B., Stewart G. and P. Williams. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143: 3703-3711.
- McGuinness M. and Dowling D. (2009). Plant-Associated Bacterial Degradation of Toxic Organic Compounds in Soil. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 6: 2226-2247.

- Mendis, H., Madzima, T., Queiroux, C. and Jones, K. (2016) Function of succinoglycan polysaccharide in *Sinorhizobium meliloti* host plant invasion depends on succinylation, not molecular weight. *MBio*. 7: e00606-16.
- Merritt J., Brothers K., Kuchma S. and O'Toole G. (2007). SadC Reciprocally Influences Biofilm Formation and Swarming Motility via Modulation of Exopolysaccharide Production and Flagellar Function. *J. Bacteriol.* 189(22): 8154–8164.
- Miller K., Kennedy EP., Reinhold VN. (1986). Osmotic adaptation by Gram-Negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science*. 231: 48-51.
- Miller, M. B., and B. L. Bassler (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu.Rev. Microbiol.* 55:165–199.
- Monds R, Silby M and Mahanty H. (2001). Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2. *Mol. Microbiol.* 42:415–26
- Monds R. and O'Toole G (2009). The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiol.* 17 (2): 73-87.
- Montanaro L., Poggi A., Visai L., Ravaioli S., Campoccia D., Speziale P. and Arciola C. (2011). Extracellular DNA in biofilms. *Int J Artif Organs.* 34 (9): 824-31.
- Morohoshi, T., Kato, M., Fucamachi, K., Kato, N., and T. Ikeda. (2008). N-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiol.* 279: 124-130.
- Morris, C., Monier, J-M. (2003). The Ecological Significance of Biofilm formation by Plant-Associated bacteria. *Annu. Rev.Phytopathol.* 41:429-53
- Muszynski A., Heiss C., Hjuler C., Sullivan J., Kelly S., Thygesen M., Stougaard J., Azadi P., Carlson R., and Ronson C. (2016). Structures of Exopolysaccharides Involved in Receptor-mediated Perception of *Mesorhizobium japonicum* by *Lotus japonicas*. *JBC.* 291 (40): 20946- 20961.
- Nawrocki K.L., Crispell E.K. and McBride S.M. (2014). Antimicrobial peptide resistance mechanisms of gram-positive bacteria. *J. Antibiot.* 3: 461–492.
- Normander, B., Hendriksen, N. and Nybroe, O. (1999). Green fluorescent protein-marked *Pseudomonas fluorescens*: localization, viability, and activity in the natural barley rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4646–51
- Nunan N. (2017). The microbial habitat in soil: scale, heterogeneity and functional consequences. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science.* 180: 425–429.
- Ohmura N., Kitamura K., and Saik, H. (1993) Selective adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite. *Appl Environ. Microbiol.* 59: 4044–4050.
- Okshevsky M., Regina V. and Meyer R. (2015). Extracellular DNA as a target for biofilm control. *Current Opinion in Biotechnology.* 33: 73–80.
- Oldroyd, G., Murray, J., Poole, P. and Downie, J. (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* 45: 119–144.
- Ormeño-Orrillo E. (2005). Lipopolisacáridos de Rhizobiaceae: estructura y biosíntesis. *Rev Latinoam Microbiol.* 47 (3-4): 165-175.

- O' Toole, G. and Kolter, R. (1998a). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28(3): 449–461.
- O'Toole, G. and Kolter, R. (1998b). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30(2):295–304
- O'Toole, G., Kaplan, H., Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54: 49–79.
- Paez-Espino D., Tamames J., de Lorenzo V. and Canovas D. (2009). Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals.* 22: 117–130.
- Pallud C, Viallard V, Balandreau J, Normand P, Grundmann G (2001) Combined use of a specific probe and PCAT medium to study *Burkholderia* in soil. *J Microbiol Methods* 47: 25–34
- Parker W.L., Rathnum M.L., Seiner V., Trejo W.H., Principe P.A. and Sykes R.B. (1984). Cepacin A and cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. *J Antibiot.* 37: 431-40.
- Patrick, J. E. & Kearns, D. B. (2009). Laboratory strains of *Bacillus subtilis* do not exhibit swarming motility. *J. Bacteriol.* 191: 7129–7133.
- Payne G, Vandamme P, Morgan S, LiPuma J, Coenye T, Weightman A, Hefin Jones T. and Mahenthalingam E. (2005) Development of a recA Gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* Genus. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (7): 3917–3927.
- Perret, X., Staehelin, C., Broughton W.J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 180–201.
- Potts M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol.Rev.* 58: 755–805.
- Prell, J. and Poole, P. (2006). Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol.* 14: 161–168.
- Quan C.S., Zheng W., Liu Q., Ohta Y. and Fan S.D. (2006) Isolation and characterization of a novel *Burkholderia cepacia* with strong antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72: 1276-84.
- Qurashi, A.W. and Sabri, A.N. (2012). Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Braz. J. Microbiol.* 11: 83–91.
- Raghavendran V., Asare E. and Roy I. (2020). Chapter Three - Bacterial cellulose: Biosynthesis, production, and applications. *Advances in Microbial Physiology.* 77: 89-138.
- Rangel Montoya E., Montañez Hernández L. E., Luévanos Escareño M. P. and Balagurusamy N. (2015). Impact of Arsenic on the Environment and its Microbial Transformation. *Terra Latinoam.* 33 (2): 103-118.
- Reid, D., Nadzieja, M., Novák, O., Heckmann, A., Sandal, N. and Stougaard, J. (2017) Cytokinin biosynthesis promotes cortical cell responses during nodule development. *Plant Physiol.* 175: 361–375.

- Reinhold B., Chan S., Reuber T., Marra A., Walker G. and Reinhold V. (1994). Structural Characterization of Succinoglycan, the Major Exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* Rm 1021. *J. Bacteriol.* 176:1997-2002
- Ren D., Madsen J.S., Sørensen S.J. and Burmølle M. (2015). High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. *ISME Journal.* 9: 81–89.
- Rengasamy, P. (2006). World salinization with emphasis on Australia. *J. Exp. Bot.* 57(5): 1017–1023.
- Reuhs, B., Carlson, R., and Kim, J. (1993) *Rhizobium fredii* and *Rhizobium meliloti* produce 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid-containing polysaccharides that are structurally analogous to group II K antigens (capsular polysaccharides) found in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175: 3570- 3580.
- Rickard, A., Gilbert, P., High, N., Kolenbrander, P., Handley, P. (2003) Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol* 11: 94–100
- Rickard, A., McBain, A., Stead, A., Gilbert, P. (2004) Shear rate moderates community diversity in freshwater biofilms. *Appl Environ Microbiol* 70: 7426–7435.
- Rinaudi L, Sorroche F, Zorreguieta A and Giordano W. (2010). Analysis of *mucR* gene regulating biosynthesis of exopolysaccharides: implications for biofilm formation in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *FEMS Microbiol. Lett.* 302:15–21.
- Robertson B., Aman P., Darvill A., McNeil M., Albersheim P. (1981). Host-symbiont interactions. V. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiol.* 67: 389-400.
- Rojas-Rojas F, López-Sánchez D, Meza-Radilla G, Méndez-Canarios A, Ibarra J.A. and Estrada-delosSanto P. (2019). The controversial *Burkholderia cepacia* complex, a group of plant growth promoting species and plant, animals and human pathogens. *Rev Argen Microbiol.* 51(1): 84-92
- Römling U. 2002. Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res. Microbiol.* 153:205–12
- Russo, D., Williams, A., Edwards, A., Posadas, D., Finnie, C., Dankert, M., Downie, J. A. and Zorreguieta, A. (2006). Proteins exported via the PrsD–PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 188, 4474–4486.
- Russo D, Abdian P, Posadas D, Williams A, Vozza N, Giordano W, Kannenberg E, Downie J and Zorreguieta A. (2015). Lipopolysaccharide O-chain core region required for cellular cohesion and compaction of in vitro and root biofilms developed by *Rhizobium leguminosarum*. *Appl Environ Microbiol* 81:1013–1023.
- Saeki, K. and Kouchi, H. (2000). The *Lotus* symbiont, *Mesorhizobium japonicum*: molecular genetic techniques and application. *J Plant Res.* 113: 457–465.

- Santini, J. M. and R. N. vanden Hoven (2004). Molybdenum containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. *J. Bacteriol.* 186: 1614-1619.
- Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol.* 184: 1140-1154.
- Schellenberg B, Bigler L and Dudler R. (2007). Identification of genes involved in the biosynthesis of the cytotoxic compound glidobactin from a soil bacterium. *Environ Microbiol.* 9: 1640-50.
- Schembri, M.A.; Christiansen, G.; Klemm, P. (2001). FimH-mediated autoaggregation of *E. coli*. *Mol. Microbiol.* 41: 1419–1430.
- Sebastianelli A and Bruce I.J. (2007). Tn5530 from *Burkholderia cepacia* strain 2 encodes a chloride channel protein essential for the catabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Environ Micro-biol.* 9: 256–65.
- Simsek, S., Wood, K. and Reuhs, B. (2013). Structural analysis of succinoglycan oligosaccharides from *Sinorhizobium meliloti* strains with different host compatibility phenotypes. *J. Bacteriol.* 195: 2032–2038.
- Singh A. and Singh Chauhan P. (2017). Ecological Significance of Soil-Associated Plant Growth–Promoting Biofilm-Forming Microbes. *Biofilms in Plant and Soil Health*. First Edition, Chapter 16, 291-326.
- Skorupska A., Janczarek M., Marczak M., Mazur A. and Król J. (2006). Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microb. Cell Fact.* 5:7.
- Smedley, P. L. and D. G. Kinniburgh. (2002). A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochem.* 17: 517-568.
- Sørensen S., Bailey M., Hansen L., Kroer N. and Wuertz S. (2005). Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature Rev. Microbiol.* 3: 700-710.
- Sorongon, M., Bloodgood, R., Burchard, R. (1991). Hydrophobicity adhesion and surface-exposed proteins of gliding bacteria. *Appl Environ Microbiol* 57: 3193–199
- Sorroche F, Rinaudi L, Zorreguieta A, Giordano W. (2010). EPS II dependent autoaggregation of *Sinorhizobium meliloti* planktonic cells. *Curr. Microbiol.* 61:465– 470.
- Sorroche F., Specia M., Zorreguieta A. and Giordano W. (2012). A positive correlation between autoaggregation and biofilm formation in native *Sinorhizobium meliloti* isolates from Argentina. *Appl Environ Microbiol.* 78 (12): 4092-4101
- Spiers, A., Bohannon, J., Gehrig, S. and Rainey, P. (2003) Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol Microbiol* 50: 15-27.
- Spiers A and Rainey P. (2005). The *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader biofilm requires attachment factor, cellulose fibre and LPS interactions to maintain strength and integrity. *Microbiology* 151:2829–39

- Streit W., Schmit R., Perre, X., Staehelin C., Deakin W., Raasch C., Liesegan, H., and Broughton W. (2004). An evolutionary hot spot: The pNGR234b replicon of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J. Bacteriol.* 186:535-542.
- Sullivan, J., Patrick, H., Lowther, W., Scott, D. and Ronson, C. (1995). Nodulating strains of *Rhizobium japonicum* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 8985–8989.
- Tewari, S., Arora, N.K. (2014). Multifunctional exopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* PF23 involved in plant growth stimulation, biocontrol and stress amelioration in sunflower under saline conditions. *Curr. Microbiol.* 69(4): 484–494.
- Thokchom E, Thakuria D, Kalita M, Sharma C and Talukdar N. (2017). Root colonization by host-specific rhizobacteria alters indigenous root endophyte and rhizosphere soil bacterial communities and promotes the growth of mandarin orange. *European Journal of Soil Biology.* 79: 48-56.
- Tomlinson, A., Ramey-Hartung, B., Day, T., Merritt, P. and Fuqua, C. (2010). *Agrobacterium tumefaciens* ExoR represses succinoglycan biosynthesis and is required for biofilm formation and motility. *Microbiology (UK).* 156, 2670–2681.
- Trần Van V., Berge O., Ngo Ke S., Balandreau J. and Heulin T. (2000). Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant Soil.* 218: 273-84.
- Tsai S., Singh S. and Chen W. (2009). Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 659-667.
- Turnbull, G., Morgan, J., Whipps, J. and Saunders, J. (2001) The role of bacterial motility in the survival and spread of *Pseudomonas fluorescens* in soil and in the attachment in bacterial-plant interactions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 57–65
- Ude S, Arnold D, Moon C, Timms-Wilson T and Spiers A. (2006). Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environ. Microbiol.* 8:1997–2011
- van de Mortel M and Halverson L. (2004). Cell envelope components contributing to biofilm growth and survival of *Pseudomonas putida* in low-water-content habitats. *Mol. Microbiol.* 52:735–50
- Van de Velde, W., Zehirov, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihara, H., Kevei, Z., Farkas, A., Mikulass, K., Nagy A., Tiricz H., et al. (2010). Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science.* 327: 1122–1126.
- Vanhaverbeke, C., Heyraud, A. and Mazeau, K. (2003). Conformational analysis of the exopolysaccharide from *Burkholderia caribensis* strain MWAP71: impact on the interaction with soils. *Biopolymers.* 69: 480–497.
- Vedamurthy A., Bhattacharya S., Das A. and Shruthi S. (2021). 20-Exploring nanomaterials with rhizobacteria in current agricultural scenario. *Advances*

- in Nano-Fertilizers and Nano-Pesticides in Agriculture, *Woodhead Publishing*. 487-503.
- Velmourougane1 K., Prasanna1 R. and Saxena A. K. (2017). Agriculturally important microbial biofilms: Present status and future prospects. *J Basic Microbiol.* 57: 548–573.
- Vikram A., Bomberger J. and Bibby K. (2015). Efflux as a Glutaraldehyde Resistance Mechanism in *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 59: 3433–3440.
- Wang L., Wang Y., Pellock B., Walker G. (1999). Structural characterization of the symbiotically important low-molecular-weight succinoglycan of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* 181: 6788-6796.
- Wang P., Zhong Z., Zhou J., Cai T. and Zhu J. (2008). Exopolysaccharide biosynthesis is important for *Mesorhizobium tianshanense*: plant host interaction. *Arch Microbiol.* 189: 525-530
- Wang Q., Suzuki A., Mariconda S., Powollik S. and Harshey R. (2005). Sensing wetness: a new role for the bacterial flagellum. *EMBO J.* 24: 2034–2042.
- Wang Y. and Leadbetter J. (2005). Rapid acyl-homoserine lactone quorum signal biodegradation in diverse soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1291–99
- Waters C., Bassler B. (2005). Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21: 319–346
- Wei H, and Zhang L. (2006). Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Antonie van Leeuwenhoek* 89:267–80
- Weiner, L., and P. Model. (1994). Role of an *Escherichia coli* stress-response operon in stationary-phase survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 2191–2195.
- Whipps, J. (1990). Carbon economy. p. 59–97. In J. M. Lynch (ed.), *The rhizosphere*. John Wiley & Sons, West Sussex, U.K.
- Williams A., Wilkinson A., Krehenbrink M., Russo D., Zorreguieta A., Downie J.A (2008). Glucomannan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection. *J. Bacteriol.* 190: 4706–4715.
- Wozniak D, Wyckoff T, Starkey M, Keyser R, Azadi P, et al. (2003) Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:7907–12
- Wu, H., Z. Song, N. Hoiby, and M. Givskov (2004). Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Prog. Nat. Sci.* 14:377–387.
- Xu J., Kim J., Koestler B.J., Choi J.H., Waters C.M. and Fuqua C. (2013). Genetic análisis of *Agrobacterium tumefaciens* unipolar polysaccharide production reveals complex integrated control of the motile-to-sessile switch. *Mol. Microbiol.* 89: 929–948.
- Yamamura, S., Watanabe, K., Suda, W., Tsuboi, S. and Watanabe, M. (2014). Effect of antibiotics on redox transformations of arsenic and diversity of arsenite-

- oxidizing bacteria in sediment microbial communities. *Environ. Sci. Technol.* 48: 350–357.
- Yeoh Y., Dennis P., Paungfoo-Lonhienne C., Weber L., Brackin R., Ragan M., Schmidt S. and Hugenholtz P. (2017). Evolutionary conservation of a core root microbiome across plant phyla along a tropical soil chronosequence. *Nat. Commun.* 8: 215.
- York G., Walker G. (1998). The succinyl and acetyl modifications of succinoglycan influence susceptibility of succinoglycan to cleavage by the *Rhizobium meliloti* glycanases ExoK and ExsH. *J Bacteriol.* 180:4184-4191.
- Young, I.M., Crawford, J.W., Nunan, N., Otten, W. and Spiers, A. (2008). Microbial Distribution in Soils. In: *Advances in Agronomy. Elsevier.* Chapter 4: 81–121.
- Zeng X.C., He Z., Chen X., Cao Q.A.D., Li H. and Wang Y. (2018). Effects of arsenic on the biofilm formations of arsenite-oxidizing bacteria. *Ecotox. Environm. Saf.* 165: 1–10.
- Zevenhuizen, L.P.T.M. (1986). Selective synthesis of polysaccharides by *Rhizobium Trifolii*, strain TA1. *FEMS Microbiol.* 35: 43–47.
- Zhan H., Lee CC., Leigh JA. (1991). Induction of second exopolysaccharide (EPS₂) in *Rhizobium meliloti* SU47 by low phosphate concentrations. *J. Bacteriol.* 173: 7391-7394.
- Zhang L and Xie G. (2007). Diversity and distribution of *Burkholderia cepacia* complex in the rhizosphere of rice and maize. *FEMS MicrobiolLett.* 266: 231-5.
- Zhang Y., Hao X., Garcia-Lemos A., Nunes I., Nicolaisen M. and Nybroe O. (2020). Different Effects of Soil Fertilization on Bacterial Community Composition in the *Penicillium canescens* Hyphosphere and in Bulk Soil. *Appl. Environ Microbiol.* 86: e02969-19.
- Zouboulis A., Moussas P. and Psaltou S. (2019). Groundwater and Soil Pollution: Bioremediation. *Encyclopedia of Environmental Health (Second Edition).* 369-381.