

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO



Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales.

Departamento de Biología Molecular



*Comunidades microbianas y sus
interacciones en el ecosistema rizosférico.
Impacto sobre la fertilidad y conservación
de los suelos agrícolas*

TESIS DOCTORAL

Mic. Ayelén S. Abod

Director: Dr. Walter F. Giordano

Co-director: Dr. Pablo C. Bogino

Diciembre 2015

7243

1
Class:
T. 989

Comunidades microbianas y sus interacciones en el ecosistema rizosférico. Impacto sobre la
fertilidad y conservación de los suelos agrícolas

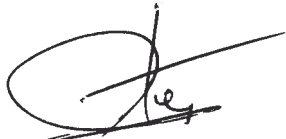
Ayelén S. Abod. UNRC

A mis seres queridos...

Comunidades microbianas y sus interacciones en el ecosistema rizosférico. Impacto sobre la fertilidad y conservación de los suelos agrícolas

Ayelén S. Abod. UNRC

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, bajo la dirección del Dr. Walter Giordano y la co-dirección del Dr. Pablo Bogino, para obtener el título de postgrado de Doctora en Ciencias Biológicas.



Dr. Walter Giordano

Director



Dr. Pablo Bogino

Co-director

Aprobado por el tribunal de Tesis



Dra. Mariana Melchiorre



Dra. Adriana Torres



Dr. Fabricio Cassán

Río Cuarto, Diciembre de 2015

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por permitir mi formación de grado y postgrado.

A CONICET por las becas de postgrado otorgadas.

A Walter Giordano, por unirme a su grupo de investigación, por su paciencia y excelente predisposición en todo momento. Por permitirme desarrollar mi trabajo libremente.

Agradezco a mi Co-director Pablo Bogino, por guiarme en cada momento de estos cinco años, gracias por el apoyo tanto en lo laboral como en lo personal, fue imprescindible para poder llegar a la meta!!!

A mis jurados de Tesis: Mariana Melchiorre, Adriana Torres y Fabricio Cassán, por sus valiosos aportes y sugerencias en los informes de avance de tesis, por comprender cada obstáculo que se me presentó y por estar dispuestos a ayudarme a seguir adelante con este trabajo. Gracias por la excelente predisposición!!

A mis compañeros de trabajo, todos los integrantes del Laboratorio 10:

Fernando Sorroche, eternamente agradecida por cada una de tus enseñanzas y consejos.

Fiorela, Maricel, Lorena, Gracias!

Erika, gracias por la buena onda y predisposición en todo momento!

A Nati Nocelli y Julio Vicario, mis grandes compañeros del 10! GRACIAS!!, por las eternas charlas compartidas, entre risas y llantos muchas veces!, por estar en momentos tan difíciles y darme fuerzas para salir adelante!!, los quiero mucho y lo saben!

A los integrantes de la familia 10E!: julio, Emi, Cristian, Gonzi, Nati!

A Cami y Kati! gracias por su buena onda y compañía!

A mis compañeros de almuerzos, cafes y mates: Cristian, Emi, Mica, Mati gracias por los buenos momentos compartidos. Los quiero!

A Miguel Bueno y Mariela Woelke, los técnicos del departamento, por su excelente predisposición y buena voluntad!

A todos mis amigos de la vida y los que fui haciendo en el camino:

Euge, Lu y Romi!!, por estar todo el tiempo cuando mas las necesité, por ser seres incondicionales queriendo levantarme, por los buenos momentos vividos y por los que vendrán!!! Las quiero mucho chicas!!!

Nico, Franqui, Fabri, Gracias por estar y por las palabras justas. Los quiero!

Maria, Valen, Lolo, Oli, Anita, Agustín, Chinita, Juana y flia, gracias a mi familia postiza!!! LOS QUIERO MUCHO!

Romi M., mi amiga de la vida, te quiero y gracias por estar en cada momento.

A Juancho, Nico, Juan Fernigrini, Juan Pablo, Mati. Gracias por tantos momentos compartidos y por dejarme ser la "mimada" del grupo, los quiero!!

A mi gran amigo incondicional Darío Corral! por estar con cada palabra y cada silencio que me dieron fuerzas cuando mas lo necesité, pero sobre todas las cosas gracias por acompañarme y estar siempre a mi lado!! Te quiero!!!!

Maru, Nico, Bruni, Alva y Pauli!!!, gracias por estar en mi camino en el momento justo y por ser parte de mi vida, los quiero mucho!

A las personas que pasaron por mi vida en todo este tiempo que han sido muy importantes y que hoy ya no están GRACIAS! por haber formado parte de este trayecto!..

A Maxi, Carlita, Alita!!! Gracias por tanto amor y buena energía, eternamente agradecida por haberlos encontrado y por permitirme ser parte de ustedes!!

A Pame Brizzio, GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS por confiar en mi! por enseñarme a creer en mi y ayudarme a superarme cada día y así poder atravesar cada obstáculo que se impuso en mi camino, te quiero mucho. Gracias por todas las herramientas que me brindaste para poder aprender de la vida y crecer como persona y en especial gracias por tu amistad.

Ceci Tonello, Gracias por ayudarme y por creer en mi!

A mi familia: Irma, Karím, Cami, Yamila, Carlitos, Sofi y Clarita, los quiero mucho.

A mi amigo Huguito, gracias por haber compartido todos estos años, por tantas charlas, risas, momentos buenos y no tan buenos, te quiero!

A mis amigos de la vida: Ludito, Ceci Rombolá, Emi Maggi, Cele S.

Y Gracias a todos aquellos que me acompañaron de alguna u otra manera en este largo proceso.

Recursos financieros para la realización de esta tesis doctoral

- 2012-2015. Proyecto FONCYT, PICT 2011-0965. “comunidades microbianas y sus interacciones en el ecosistema rizosférico. Impacto sobre la fertilidad y conservación de los suelos con uso agrícola del centro-sur de la provincia de Córdoba”. Investigador responsable: Dr. Walter Giordano.

- 2012-2014 Proyecto PIP 112-201101-00086, 2012-2014 CONICET. “Aspectos bioquímicos y moleculares de las interacciones bacteria-planta”. Director: Dr. Walter Giordano. Subsidio res. 1672 1672/12.

- 2012-2014 Programa PPI SECYT (UNRC) “Aspectos bioquímicos y moleculares de las interacciones bacteria-planta”. Director: Dr. Walter Giordano.

- 2013-2015. Proyecto FONCYT, PICT 2012-2025. “Comunicación bacteriana en la rizósfera de plantas leguminosas: mecanismos de quorum sensing en bacterias nodulantes de maní”. Investigador responsable: Dr. Pablo César Bogino.

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis han derivado en las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos:

- Water-limiting conditions structure and biofilm forming ability of bacterial multispecies communities in the alfalfa rhizosphere. PLoSOne. Bogino P, **Abod A**, Nievas F, Giordano W. 2013.
- Analysis of Sinorhizobium meliloti native isoates from argentina revealed a positive correlation between biofilm formation and autoaggregation. Sorroche, F.G., Spesia, M., **Abod, A.**, Zorreguetea, A., Giordano, W.F. (2011). VII Congreso Argentino de microbiología genera "SAMIGE del bicentenario". Mayo de 2011, Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.
- Sucesión bacteriana temprana de comunidades establecidas como consorcio multiespecie en la rizófera de alfalfa. Bogino, P., **Abod A.**, Nievas F., Nocelli N y Giordano W. (2014). Segundo Workshop latinoamericano sobre PGPR. 21 al 26 de septiembre de 2014. La Falda, Cordoba. Argentina.
- Supervivencia y capacidad formadora de biofilms por rizobacterias. **Abod, A.**, Bogino, P., Vicario, J. y Giordano, W. "Congreso a realizar del 2 al 6 de septiembre de 2013. II Conferencia Iberoamericana de interacciones beneficiosas microorganismo-planta-ambiente. (IBEMPA). Universidad de Sevilla, Sevilla, España.
- Condiciones de estrés hídrico o salino modifican la composición y capacidad formadora de biofilm de comunidades bacterianas aisladas de rizósfera de alfalfa. Bogino, P; **Abod, A**; Nievas, F; Santoro, V y Giordano, W. (2013). Congreso a realizar del 2 al 6 de septiembre de 2013. II Conferencia Iberoamericana de interacciones beneficiosas microorganismo-planta-ambiente. (IBEMPA). Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

RESÚMEN

En el presente trabajo se utilizó como modelo de estudio a *Sinorhizobium meliloti*, actualmente denominada como *Ensifer meliloti*, una bacteria de importancia agronómica por su capacidad de fijar simbióticamente el nitrógeno atmosférico, en asociación con la raíces de alfalfa. Específicamente se investigó el efecto de de los exopolisacáridos (EPSs), lipopolisacáridos (LPSs) y factores estresantes sobre la supervivencia e interacciones bacteria-bacteria, bacteria-soporte y bacteria-planta. Se demostró que la cepa de *E. meliloti* Rm8530 permaneció viable y además ha sido capaz de aumentar en número frente a condiciones de estrés hídrico, a diferencia de Rm1021 y Rm8530*expA*; lo cual se debería a la capacidad de Rm8530 de producir EPS II. Esta supervivencia fue dependiente de la producción de EPS II en condiciones de estrés con NaCl, ya que Rm1021 disminuyó su viabilidad a diferencia de Rm8530 y Rm8530*expA*. En general la Capacidad Formadora de Biofilm aumentó en todas las rizobacterias utilizadas frente a condiciones de estrés generado por el soluto no permeable. La inhibición en la producción de EPS II tuvo influencia en la autoagregación, ya que la misma se vió afectada en el cultivo de Rm8530*expA* y un cultivo mixto entre Rm8530 y Rm8530*expA*.

Por otra parte se utilizó suelo rizosférico de alfalfa de la localidad de Bulnes, Córdoba, en donde los recuentos obtenidos para los suelos rizosféricos fueron mayores que los obtenidos para suelo entero, lo que refleja la presencia de poblaciones de mayor tamaño asociadas a suelo rizosférico debido a la fuente de nutrientes que representan los exudados radicales. La rizósfera de *M. sativa* de plantas expuestas a distintas condiciones de limitación de agua presentan distintas comunidades microbianas con diferentes capacidades para desarrollar biofilms y establecerse en ese microambiente, presumiblemente para mejorar las condiciones de supervivencia. Los suelos de alfalfa expuestos a condiciones de desecación contienen comunidades bacterianas con mayor capacidad formadora de biofilm en comparación a las expuestas al estrés salino o a condiciones en la cual el agua no es un limitante. Esto nos permite concluir que la limitación de agua lleva a la selección de cepas bacterianas con mayor capacidad formadora de biofilm en la rizósfera de alfalfa, como una forma de protegerse y sobrevivir a la desecación del suelo.

Finalmente, se evaluó la agregación del suelo y se determinó que existe una marcada diferencia en la cantidad de agregados formados frente a distintas

concentraciones de EPSs ensayadas, dado que a mayor concentración de los mismos, mayor fue el tamaño de los agregados. No obstante, esta diferencia no fue tan marcada cuando el suelo fue inoculado con distintas concentraciones de bacterias productoras de EPSs como la cepa de *E. meliloti* Rm8530. La contribución de los EPSs fue acentuada en los ensayos que se incluyeron plantas de alfalfa, lo que permitiría inferir una interacción entre los exopolímeros bacterianos y exudados radicales para la estructuración del suelo.

ABSTRACT

In this work we were used as a case study to *Sinorhizobium meliloti*, a bacterium agronomically important for their ability to fix atmospheric nitrogen symbiotically in association with the roots of alfalfa. Specifically, the effect of exopolysaccharides (EPSs), lipopolysaccharides (LPSs) and stressors on survival and interactions bacteria-bacteria, bacteria-bacteria-plant support and investigated. It was shown that *S. meliloti* strain Rm8530 remained viable and has also been able to increase in numbers against water stress, unlike Rm1021 and Rm8530expA; which is due to the ability to produce EPS Rm8530 II. This survival was dependent on the production of EPS II under stress with NaCl as Rm1021 decreased viability and unlike Rm8530 Rm8530expA. Overall Biofilm forming capacity increased in all rhizobacteria used against stress conditions generated by the non-permeable solute. Inhibition in the production of EPS II influenced the self-aggregation, since it was affected in cultivation and mixed cultivation Rm8530expA between Rm8530 and Rm8530expA.

Moreover alfalfa rhizosphere soil of the town of Bulnes, Córdoba, where the counts obtained for rhizosphere soils used were greater than those obtained for entire floor, reflecting the presence of larger populations associated with rhizosphere soil due to the nutrient source representing root exudates. The rhizosphere of *M. sativa* plants exposed to conditions limiting water have different microbial communities with different capacities to develop biofilms and settle in the microenvironment, presumably to improve conditions for survival. Alfalfa soils exposed to drying conditions contain bacterial communities more biofilm forming capacity compared to exposed to salt stress or conditions in which water is not a limiting. This allows us to conclude that the limitation of water leads to the selection of bacterial strains with biofilm forming capacity increased in the rhizosphere of alfalfa as a way to protect themselves and survive drying soil.

Finally, soil aggregation was evaluated and determined that there is a marked difference in the amount of aggregates formed against different concentrations of tested EPSs, since the higher the concentration of the same, the greater the size of the aggregates. However, this difference was not as pronounced when the soil was inoculated with different concentrations of EPSs producing bacteria such as *S. meliloti* strain Rm8530. The contribution of EPSs was emphasized in trials that included alfalfa

plants, which would infer an interaction between bacterial exopolymers and radicals to soil structure exudates.

Abreviaturas y siglas

μg	Microgramo(s)
μl	Microlitro(s)
μm	Micrómetro(s)
μM	Micromol(es)
Ac	Acetil
AHL	N-acil homoserin lactona
bp	Pares de bases
c.s.p.	Cantidad Suficiente Para
cm	Centímetro(s)
CV	Cristal Violeta
DNA	Deoxyribonucleic Acid ó ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad Óptica
DsRed	Red Fluorescent Protein ó proteína fluorescente roja
EPS	Exopolisacárido
EPS I	Exopolisacárido I o succinoglicano
EPS II	Exopolisacárido II o galactoglucano
g	Gramo(s)
Gal	Galactosa
GFP	Green Fluorescent Protein ó protein fluorescente verde
Glc	Glucosa
HMW	Hight Molecular Weight ó alto peso molecular
hs	Horas
IS	Secuencia de Inserción
kb	Kilobases
KPS	Polisacárido Capsular
l	Litro

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1. Etapas de infección de leguminosas por rizobios	4
1.2. Estructuras químicas simplificadas de las unidades repetitivas de los exopolisacáridos de <i>E. meliloti</i>	6
1.3. Modelos de regulación de la síntesis de EPS II en <i>E. meliloti</i>	8
1.4. Esquema de las etapas en la formación de un biofilm multiespecie	15
1.5. Ilustración de la composición de los agregados en el suelo	23
5.6. Supervivencia de tres cepas de <i>E. meliloti</i> en condiciones de estrés hídrico	48
5.7. Supervivencia de distintas cepas de <i>E. meliloti</i> en condiciones de estrés por desecación y control sin estrés	49
5.8. Electroforesis en gel de agarosa (0.8 % P/V) de los productos de amplificación por PCR del gen <i>expR</i>	52
5.9. Supervivencia de distintas cepas de <i>S. meliloti</i> en condiciones de estrés salino	53
5.10. Supervivencia de las cepas de Rm1021, Rm8530 y Rm8530 <i>expA</i> de <i>E. meliloti</i> en condiciones de estrés salino	55
5.11. Crecimiento y CFB de las cepas WCS417r, Rm8530, Rm1021, Rm8530 <i>psB</i> , Rm8530 <i>expA</i> y Rm8530 <i>expAexoY</i>	59
5.12. Efectos de PEG y NaCl en la autoagregación de diferentes rizobacterias	65
5.13. Comportamiento de un co-cultivo entre <i>P. fluorescens</i> WCS417r y <i>E. meliloti</i> Rm8530	68
5.14. Comportamiento de un co-cultivo entre <i>E. meliloti</i> Rm8530 <i>expA</i> y <i>P. fluorescens</i> WCS417r	70
5.15. Comportamiento de un co-cultivo entre <i>E. meliloti</i> Rm8530 <i>expA</i> y <i>E. meliloti</i> Rm8530 <i>psB</i>	72
5.14. Recuento total de bacterias cultivables en tres tipos de suelos rizosféricos	74
5.15. Crecimiento de células planctónicas, CFBT y relación B/C de comunidades bacterianas en los tres tipos de suelos rizosféricos de alfalfa	78
5.16. CFB de subpoblaciones de bacterias (ACFB y BCFB) aisladas de tres tipos de	



LB	Medio Luria Bertani
LMW	Low Molecular Weight o bajo peso molecular
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
Mb	Megabase
MGM	Minimal Glutamate Mannitol Medium ó medio mínimo glutamato
min	Minuto(s)
ml	Mililitro(s)
mM	Milimolar
mmol	Milimol(es)
MOPS	Ácido3-(N-morfolin)propansulfónico
°C	Grados Celsius
PCR	Polymerase Chain Reaction o reacción en cadena de la polimerasa
QS	quórum sensing

ÍNDICE DE CONTENIDOS

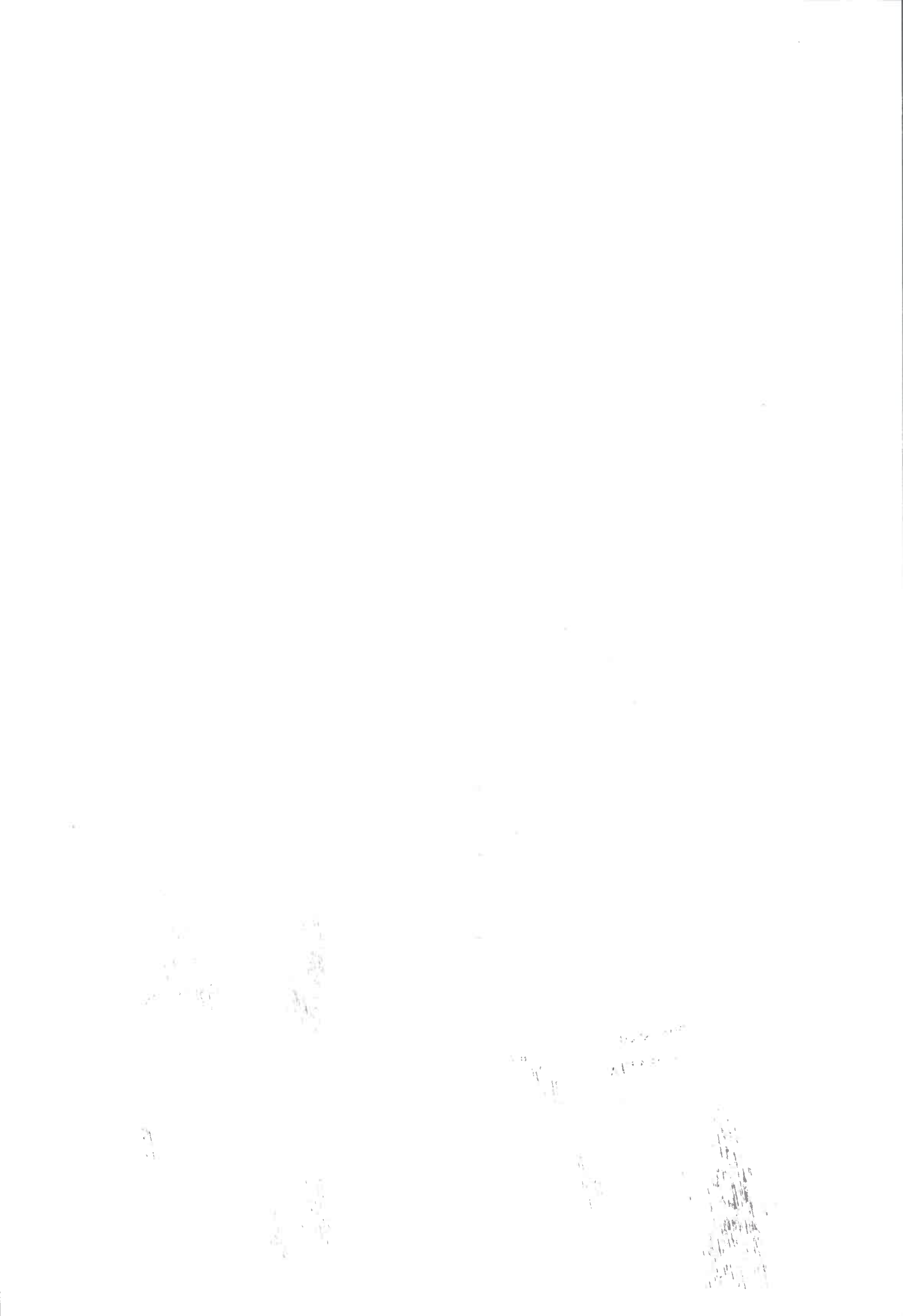
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CAMINO HACIA LA AGRICULTURA SUSTENTABLE	2
1.2. LA SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA	
1.2.1. El modelo: <i>Ensífer meliloti-Medicago</i>	2
1.3. FACTORES EXTRACELULARES Y DE SUPERFICIE DE <i>Ensífer meliloti</i>	
1.3.1. Exopolisacáridos (EPS): Succinoglucano (EPSI) y Galactoglucano (EPSII).	5
1.3.1.1. <i>ExpR</i> y <i>MucR</i> . Reguladores de la síntesis de EPS en <i>E. meliloti</i>	7
1.3.2. LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS)	9
1.3.2.1. El LPS de <i>E. meliloti</i>	10
1.4. BIOFILMS	13
1.4.1. Componentes estructurales involucrados en la formación de biofilms	15
1.4.1.1. Consorcios polimicrobianos	16
1.5. AUTOAGREGACIÓN	18
1.5.1. Factores involucrados en la autoagregación	19
1.5.2. Factores extracelulares involucrados en la autoagregación	20
1.6. Interacciones adhesivas intergenéricas e intragenéricas: coagregación	21
1.7. Relación entre la formación de biofilms y autoagregación	21
1.8. ESTRUCTURA DE LOS SUELOS	22
2. HIPÓTESIS	26
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo general	29
3.2. Objetivos específicos	30
4. MATERIALES Y MÉTODOS	31
4.1. Condiciones de cultivos bacterianos	32
4.2. Conservación de cepas bacterianas	32
4.3. Cepas bacterianas	32
4.4. PCR diagnóstica del gen <i>expR</i>	33
4.4.1. Electroforesis de ADN	33
4.4.2. Extracción de ADN genómico	33

4.5. Material vegetal	34
4.5.1. Esterilización de las semillas	34
4.6. Ensayos de viabilidad bacteriana en condiciones de estrés	34
4.6.1. Estrés hídrico	34
4.6.2. Estrés salino	35
4.7. Ensayo de Capacidad Formadora de Biofilm (CFB)	35
4.8. Cuantificación de la CFB en condiciones de estrés osmótico y mátrico	36
4.9. Cuantificación de la formación de biofilm en cultivos duales	36
4.9.1. Recuento de bacterias viables en biofilm y en estado planctónico	37
4.10. Ensayos de autoagregación macroscópico	37
4.11. Características de biofilms procedentes de rizósfera de alfalfa	38
4.11.1. Obtención de suelo	38
4.11.2. Generación de distintas condiciones de estrés	38
4.11.3. Obtención de suelo rizosférico	38
4.11.4. Aislamiento y recuento bacteriano	39
4.11.5. Caracterización de comunidades rizosféricas de alfalfa mediante ARDRA	40
4.11.6. Análisis de agrupamientos	40
4.11.7. Análisis de secuencias de nucleótidos del gen <i>ARNr 16S</i>	40
4.11.8. Número de acceso de secuencias de nucleótidos	41
4.11.9. Estudio de características relacionadas a la CFB	41
4.11.9.1. Ensayos de autoagregación	41
4.11.9.2. Ensayos de movilidad	42
4.11.9.3. Análisis de producción de EPS	42
4.11.9.4. Análisis de producción de moléculas de Quórum sensing	42
4.12. Evaluación de la estructura de los suelos	43
4.12.1. Obtención de EPS II	44
4.12.1.1. Determinación de carbohidratos totales mediante el Método de Antrona	44
4.13. Análisis estadísticos	45
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
5.1. Ensayos de viabilidad bacteriana en arena	47

suelos rizosféricos de alfalfa	80
5.17. Distribución de ribotipos para ACFB y BCFB de cepas aisladas de tres tipos distintos de suelos rizosféricos de alfalfa	83
5.18. Gráfico de Venn	84
4.19. Dendrograma basado en RFLP del gen <i>ARNr 16S</i>	86
4.20. Análisis estadístico multivariado de componentes principales para integrar la CFB, ribotipos, afiliaciones filogenéticas y tratamientos experimentales	93
4.21. Efecto de bacterias, EPS y plantas sobre la agregación del suelo	96
5.21. Interacción EPS-Suelo-Planta/Bacteria-Suelo-Planta	97
6.24. Modelo Integrador	105

ÍNDICE DE TABLAS

4.1. Cepas de <i>E. meliloti</i> y otras rizobacterias utilizadas	32
5.2. Porcentajes de humedad durante la experiencia del ensayo de viabilidad	49
5.3. Recuento de células en crecimiento y en biofilm de las cepas WCS417r, Rm1021 y Rm8530	62
5.4. Identidades y características relacionadas a CFB de cepas bacterianas aisladas de varios suelos rizosféricos	87



5.1.1. Estrés hídrico	47
5.1.2. Estrés salino	52
5.2. Capacidad de Formar Biofilms (CFB) por rizobacterias en condiciones de estrés hídrico y salino	58
5.3. Autoagregación de células planctónicas de cepas de <i>E. meliloti</i> Rm8530 y <i>Pseudomonas fluorescens</i>	64
5.4. Evaluación de biofilms mixtos entre diferentes rizobacterias	67
5.5. Aislamiento y caracterización de comunidades bacterianas asociadas a suelo rizosférico de alfalfa	73
5.5.1. Tamaño de las comunidades rizosféricas	76
5.5.2. Capacidad Formadora de Biofilm Total (CFBT) de tres comunidades bacterianas rizosféricas	77
5.5.3. Composición y diversidad de las tres comunidades bacterianas rizosféricas	80
5.5.4. Identidades y afiliaciones filogenéticas de cepas bacterianas de tres tipos de suelos rizosféricos de alfalfa	86
5.5.5. Características relacionadas a CFB de las cepas bacterianas de tres tipos de suelos rizosféricos de alfalfa	90
5.6. Estudio del impacto de las bacterias y sus productos orgánicos sobre la agregación de las partículas de suelo	94
6. CONCLUSIONES	101
7. ANEXO	
7.1. Medios de cultivos para bacterias	106
7. BIBLIOGRAFÍA	107



1. INTRODUCCIÓN

1.1. UN CAMINO HACIA LA AGRICULTURA SUSTENTABLE

Se estima que en los próximos cincuenta años un importante aumento del rendimiento de los cultivos será necesario para alimentar a la creciente población mundial. Aunque en las últimas décadas la producción agrícola se ha incrementado, en gran medida debido al uso generalizado de OGM (organismos genéticamente modificados), fertilizantes, pesticidas, riego, etc., esta tasa de aumento no es sostenible a causa del negativo impacto ambiental de las prácticas agrícolas modernas, dentro de las cuales la degradación del suelo representa una de las consecuencias más preocupantes (Foley y col., 2011, Meier y col., 2015).

La agricultura sustentable trata de aumentar el rendimiento de las cosechas y la eficiencia en el uso de nutrientes mediante la aplicación de diferentes herramientas tecnológicas tendientes a reducir los costos ambientales asociados con la intensificación agrícola. El objetivo de estas estrategias es aumentar al máximo la cantidad de producción de cultivos por unidad de agua y disminuir la aplicación de fertilizantes y plaguicidas. Ciertas prácticas agrícolas se han desarrollado para aumentar la eficiencia y la sostenibilidad de la producción agrícola, incluida la gestión integrada de plagas, el mejoramiento de control de drenaje de agua y la adecuada aplicación de fertilizantes químicos y biológicos (Tilman y col., 2002). En particular, dentro de los fertilizantes biológicos adquieren especial relevancia los inoculantes formulados sobre la base de bacterias fijadoras de nitrógeno. La inoculación con este tipo de productos realizados a base de rizobios seleccionados por su alta capacidad de fijación biológica de nitrógeno (FBN), aumenta y mejora la asimilación de compuestos nitrogenados por parte de la planta. También esto hace que la fotosíntesis se vea aumentada, mejorando así la calidad y rendimiento del cultivo (Sanz-Sáez y col., 2015).

1.2. LA SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA.

1.2.1. El modelo *Ensífer meliloti-Medicago*

En condiciones de escasez de nitrógeno, bacterias del suelo conocidas colectivamente como rizobios, pueden abandonar su modo de vida libre, saprofítico, para infectar raíces de leguminosas a fin de establecer una asociación simbiótica, cuyo resultado final es la formación de nuevos órganos radicales llamados nódulos en los que ocurre la fijación biológica del nitrógeno atmosférico. Como resultado de la interacción

simbiótica, el rizobio provee a la planta de nitrógeno en forma de amonio, a cambio de varios nutrientes carbonados, provistos por la leguminosa. El desarrollo de un programa simbiótico exitoso que culmine en la formación de nódulos fijadores incluye varios pasos, e implica el intercambio de señales que motivan la expresión diferencial de genes entre ambos socios simbióticos. En particular, se requieren numerosas adaptaciones de la fisiología bacteriana, así como de la utilización de distintas moléculas estructurales y de señalización durante el desarrollo del proceso de infección. En este sentido, componentes bacterianos extracelulares, periplásmicos y de superficie han recibido mucha atención, debido a que estas moléculas establecen un contacto íntimo con la planta durante la infección. En rizobios, los glucanos cíclicos, lipopolisacáridos (LPS), exopolisacáridos (EPSs) y los factores de nodulación, son sintetizados y exportados al periplasma, membrana externa o medio extracelular. Existen varios modelos que explican de que maneras éstas moléculas podrían dirigir el programa simbiótico actuando ya sea como señales para procesos del desarrollo, supresores de la respuesta de defensa de la planta, o simplemente como contribuyentes a la integridad de la envoltura bacteriana (Lodwig y col., 2003; Fraysse y col., 2003; Gage y col., 2004; Oldroyd y Downie, 2006).

E. meliloti es una alfaproteobacteria particularmente muy atractiva como modelo de estudio debido tanto a su rol como microsimbionte de leguminosas (simbiosis altamente eficiente con la especie *Medicago sativa*), como así también por tratarse de una especie estrechamente relacionada a dos géneros de bacterias que incluyen especies patógenas de vegetales y animales: *Agrobacterium* y *Brucella*, respectivamente. Posee un genoma tripartito constituido por un replicón grande (comúnmente denominado cromosoma) de 3.65 Mb, y dos replicones mas pequeños, los megaplásmidos simbióticos denominados pSymA (1.35 Mb) y pSymB (1.68 Mb) (Galibert y col., 2001).

El modelo simbiótico *E. meliloti-Medicago* establece que la interacción se inicia con un diálogo molecular consistente en señales extracelulares: en ambientes con reducida disponibilidad de nitrógeno, la planta libera flavonoides que gatillan la síntesis de factores Nod bacterianos (lipoquitooligosacáridos), determinantes principales de los distintos eventos que conducen a la formación de nódulos radicales. La infección de la planta se inicia con la adhesión inicial de la bacteria al pelo radicular, el cual sufre un

curvado, hecho que posibilita la internalización de las bacterias en el mismo. Luego, unas invaginaciones tubulares (hilo de infección) derivadas de la pared celular de la leguminosa, dirigen a los rizobios en multiplicación a los primordios de nódulos radicales, ubicados en la corteza radical, donde son liberados de los hilos de infección en vesículas derivadas de la membrana plasmática vegetal. Una vez dentro de una célula del nódulo, las bacterias se multiplican y se diferencian en bacteroides, células especializadas para llevar adelante la FBN (Figura 1) (Jones y col., 2007; Peck y col., 2006; Spaink, 2000).

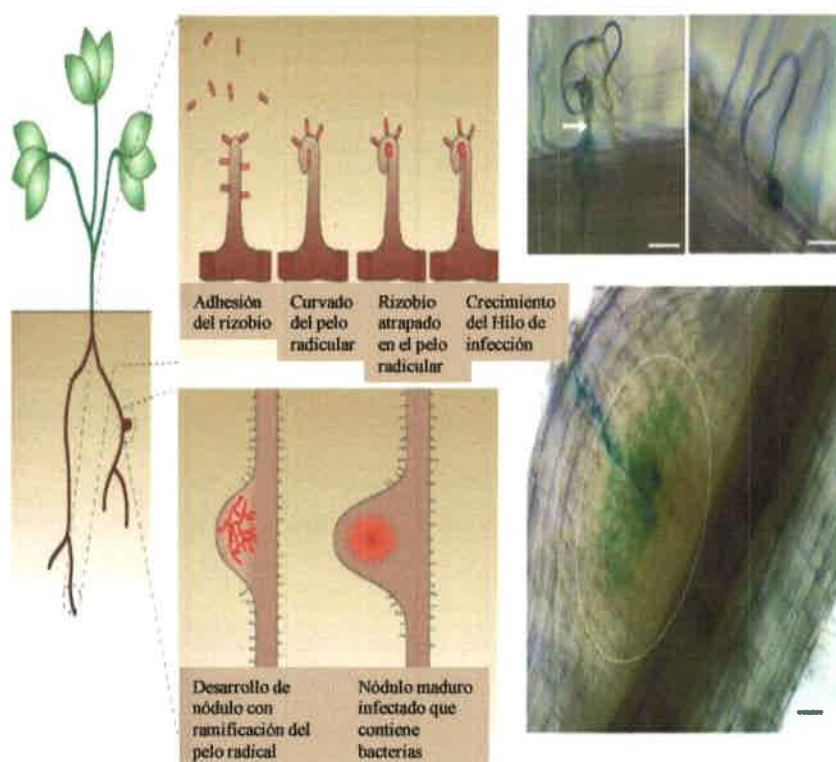


Figura 1. Representación de un modelo de los distintos eventos producidos como resultado de la infección de las raíces de las leguminosas por rizobios y el consecuente desarrollo de los nódulos fijadores de nitrógeno. Además se muestran fotografías de los procesos de invasión generados específicamente por *Rhizobium leguminosarum* (Giles y col., 2004).

1.3. FACTORES EXTRACELULARES Y DE SUPERFICIE DE *E. meliloti*

1.3.1. EXOPOLISACÁRIDOS (EPS): Succinoglucano (EPS I) y galactoglucano (EPS II).

E. meliloti es capaz de sintetizar dos tipos de polisacáridos extracelulares: succinoglucano (EPS I) y galactoglucano (EPS II). Debido a su requerimiento en la infección simbiótica, el succinoglucano ha sido el exopolisacárido más estudiado (Finan y col., 1986; Leigh y col., 1985; Pellock y col., 2000 Wang y col., 1999). Mutantes deficientes en la síntesis del mismo, pueden inducir las etapas tempranas del desarrollo del nódulo, pero son incapaces de invadirlo, originando nódulos pequeños carentes de bacteroides (Cheng y Walker, 1998). Estructuralmente, el succinoglucano está compuesto por unidades repetitivas de un octasacárido formado por residuos de glucosa y galactosa (en una relación molar 7:1, respectivamente) unidos por enlaces β glucosídicos de tipo 1,4; 1,3; y 1,6. Adicionalmente, esta estructura básica está modificada con grupos acetilos, piruvilos y succinilos (Reinhold y col., 1994; Reuber y Walker, 1996; Gonzalez y col., 1996) (Figura 2). Los productos génicos necesarios para la síntesis del succinoglucano están codificados por los genes *exo*, los cuales se hallan ubicados en un grupo o *cluster* génico que ocupa unas 25 Kb del segundo megaplásmido simbiótico (pSymb) (Jones y col., 2007). El nivel de polimerización del succinoglucano da lugar a la existencia de 2 fracciones principales: una de bajo peso molecular o LMW, del inglés Low Molecular Weight, que consiste en monómeros, dímeros y trímeros de la unidad octasacárida básica, y otra de alto peso molecular o HMW, del inglés High Molecular Weight, que comprende a polímeros constituidos por un rango que va desde cientos a miles de unidades repetitivas. La fracción trimérica del succinoglucano es la simbióticamente activa, ya que está involucrada en la señalización que conduce a la formación de los hilos de infección (Wang y col., 1999). Bajo condiciones estándar de cultivo, el succinoglucano es el único exopolisacárido sintetizado por las dos cepas de referencia derivadas de SU47, Rm1021 y Rm2011.

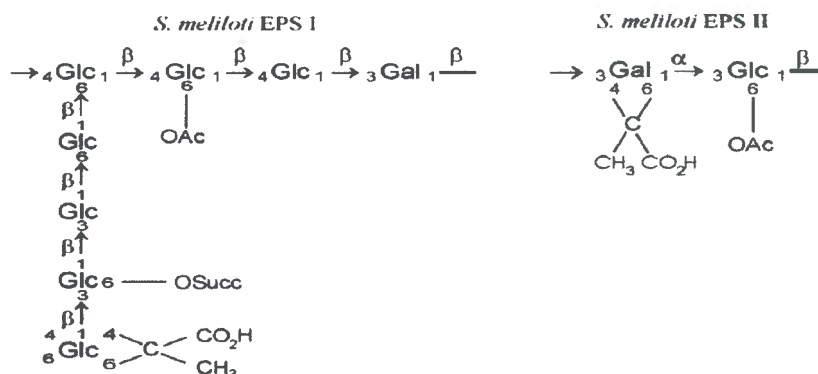


Figura 2. Estructuras químicas simplificadas de las unidades repetitivas de los exopolisacáridos de *E. meliloti*. Abreviaturas: Glc, glucosa; Gal, galactosa; Succ, succinato; Ac, acetilo

Aunque estructuralmente más simple, el galactoglucano (EPS II) es el polisacárido relativamente menos estudiado. Consiste en unidades repetitivas de un disacárido modificado, compuesto por un residuo de glucosa acetilada y uno de galactosa piruvilada, con uniones alternadas tipo α -1, 3 y β -1, 3 (Her y col., 1990) (Figura 2). Los genes relacionados a la biosíntesis de este polisacárido se denominan genes *exp* y, de manera similar a los genes *exo*, se hallan organizados como un grupo de genes de 32 Kb., residentes en pSymB (Glazebrook y Walker, 1989). El galactoglucano, se secreta en 2 fracciones principales: una simbióticamente activa, de bajo peso molecular (LMW) y otra de alto peso molecular (HMW), sin relevancia simbiótica (González y col., 1996). Ambas cepas Rm1021 y Rm2011, tienen la capacidad crítica de sintetizar galactoglucano. Condiciones de bajo fosfato pueden estimular la síntesis del mismo, pero sólo se produce la fracción de alto peso molecular, simbióticamente inactiva (Zhan y col., 1991). Adicionalmente, tres condiciones de índole genética provocan una activación de la producción de EPS II: i) el restablecimiento de la funcionalidad del gen regulador *expR*, el cual se halla interrumpido e inactivado en las cepas de referencia Rm2011 y Rm1021, debido a la presencia del elemento insercional IS*Rm2011-1* (Pellock y col., 2002); ii) una mutación en el gen regulador *mucR* (Keller y col., 1995; Zhan y col., 1999), y iii) la presencia de copias extras de genes del cluster *exp* (Glazebrook y Walker, 1989; Zhan y col., 1989).

En término de procesos que conducen a mecanismos de interacción célula-célula ha sido determinado que el exopolisacárido succinoglucano (EPS I) no estaría

involucrado en los fenómenos de formación de biofilm y autoagregación de *E. meliloti*. En concordancia, la mutante no productora de galactoglucano (EPS II), Rm8530 *expA*, está severamente afectada en la autoagregación y desarrollo de biofilm, indicando que el EPS II sería el exopolisacárido responsable de dichos fenotipos (Rinaudi y González 2009; Sorroche y col., 2010). En particular el exopolisacárido relevante en términos de autoagregación sería el galactoglucano, éstos resultados se demostraron realizando suspensiones de células planctónicas de la cepa Rm8530 (*expR*⁺), las cuales se dejaron 24 h a 4°C y al cabo de ese tiempo se observó floculación en el fondo del tubo; en contraste con esta cepa, las cepas no autoagregativas Rm1021, Rm2011 y 102F34 no mostraron altos porcentajes de autoagregación, las mismas tienen interrumpido o alguna modificación en el gen *expR*, esto sugiere una relación en el estado del locus *expR* y la capacidad de autoagregar. La presencia de una copia funcional de los genes del regulador *expR* es claramente necesario para la autoagregación. *ExpR* controla muchos aspectos de la fisiología de *E. meliloti*, incluyendo la producción de exopolisacáridos. Se realizaron ensayos de autoagregación con mutantes de *E. meliloti* defectivas en la biosíntesis de varios exopolisacáridos para clarificar el rol de estos componentes en la autoagregación. Se utilizó la cepa Rm8530 *exoY210*, mutante incapaz de producir succinoglicano, la cual mostró un 93% de autoagregación, similar a Rm8530. Contrariamente a esto Rm8530*expA* mostró un porcentaje de autoagregación menor al 18%, la cual es una mutante defectiva en la producción de galactoglucano. También se demostró que la mutante Rm8530*expAexoY* tuvo un porcentaje de autoagregación similar al de Rm8530*expA* y Rm1021, las cuales son incapaces de producir galactoglucano en condiciones normales. Estos hallazgos sugieren que el galactoglucano es el factor extracelular mayormente responsable de la autoagregación en *S. meliloti* (Sorroche y col., 2010).

1.3.1.1. *ExpR* y *MucR*: Reguladores de la síntesis de EPS en *E. meliloti*

ExpR, el producto proteico propuesto de *expR*, es un regulador transcripcional involucrado en el mecanismo de *quórum sensing* de *E. meliloti* (Fuqua y col., 2001; Whitehead y col., 2001), que pertenece a la familia de las proteínas LuxR, las cuales son receptoras de moléculas de *N*-acil homoserín lactonas (AHLs). Estudios transcriptómicos revelaron que *ExpR* controla la expresión de genes en *E. meliloti*

(Hoang y col., 2004). La regulación de muchos de ellos requiere la co-participación de moléculas de tipo AHLs producidas por uno de los tres sistemas de *quórum sensing* hasta ahora descritos en *E. meliloti*: el sistema Sin de *E. meliloti* (Marketon y col., 2002).

Dentro de los procesos asociados a la fisiología de *E. meliloti* regulados por el binomio Sin/ExpR son la producción de EPS I de bajo peso molecular y proteínas transportadoras de acilos. (Glenn y col., 2007) Otros aspectos involucrados en la regulación de Sin/ExpR se relacionan con la inhibición de genes relacionados a movilidad y quimiotaxis, fijación de nitrógeno, división celular, transporte de hierro, glucanos cíclicos e incorporación de zinc (Hoang y col., 2004).

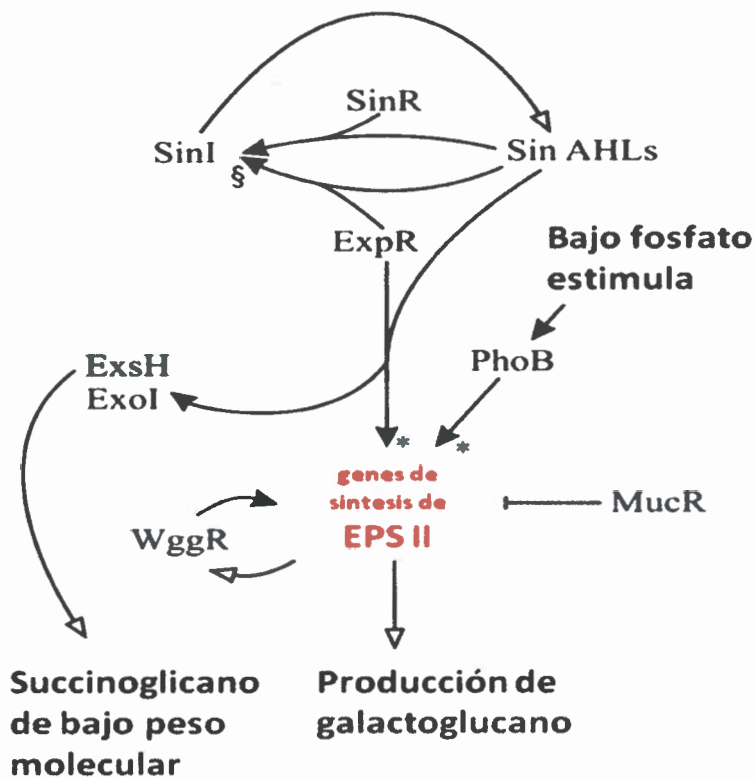


Figura 3. Modelo de regulación de la síntesis de EPS II en *E. meliloti*. Las flechas vacías indican síntesis, mientras que las llenas denotan regulación. La dependencia de *Sin R* en la regulación se indica al lado de la flecha llena, en cuyo caso la regulación positiva de *sinI* por ExpR y las AHLs producidas por el sistema Sin es dependiente de la presencia de SinR, y "*" denota una dependencia de WggR (ExpG), en cuyo caso la regulación positiva de la síntesis de EPS II por ExpR y las AHLs del sistema Sin y PhoB es dependiente de WggR. Tomado de McIntosh y col. (2008).

La restitución del gen *expR* en Rm1021, originó a la cepa Rm8530, capaz de producir ambas fracciones de galactoglucano. Dicha restitución surgió de manera espontánea, y a la mutación responsable se la denominó originalmente como *expR101*, la cual se originó como consecuencia de la escisión precisa del elemento insercional IS*Rm2011*-1. Este hecho restituyó el marco abierto de lectura del gen *expR*. De hecho, la presencia de un marco de lectura funcional de *expR* (ya sea en un plásmido o de manera cromosómica), es una condición suficiente para la activación de la síntesis de EPS II simbióticamente activo, de manera que una mutación del alelo *expR101* inhibe su producción. Pellock y colaboradores (2002) rebautizaron al alelo *expR101* como *expR*⁺. Rm1021 y las cepas directamente relacionadas a ésta (SU47, Rm2011) son portadoras del alelo ahora denominado *expR102::IS*Rm2011*-1* (nótese el cambio *expR101* a *expR102*). En cambio, Rm8530 se denota entonces Rm1021 *expR*⁺ o más formalmente como Rm1021 *expR101*.

MucR es otro importante regulador de la síntesis de EPS en *E. meliloti*. Se trata de una proteína relativamente pequeña, que comparte un 80% de identidad con Ros, un importante regulador de virulencia de la bacteria fitopatógena *Agrobacterium tumefaciens*. MucR juega un papel dual en la síntesis de EPS en *E. meliloti*: reprime fuertemente la producción de EPS II, y a pesar de tener un débil efecto estimulador de algunos genes *exo*, es esencial para la síntesis de EPS I de alto peso molecular. Además, es capaz regular negativamente su propia transcripción (Bertram-Drogatz y col., 1997; Bertram-Drogatz y col., 1998; Keller y col., 1995). Mutantes *mucR* exhiben un fenotipo mucoso, lo cual es indicativo de la desrepresión de la síntesis de EPS II (Keller y col., 1995). Sin embargo, el EPS II sintetizado en este caso es de alto peso molecular (HMW), simbióticamente inactivo (González y col., 1996a). La regulación de la síntesis de EPSII es compleja y aún no se comprende completamente (Figura 3).

1.3.2. LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)

La superficie bacteriana es la primera línea de defensa de las bacterias contra moléculas antimicrobianas y distintos tipos de estrés causados por cambios en el entorno. El lipopolisacárido (LPS) constituye el componente estructural más importante de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Químicamente, son glucoconjugados anfífilos con una masa molecular de aproximadamente 10 KDa, cuya

composición, en términos generales, varía intra e interespecíficamente. El LPS se ubica en la monocapa exterior de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, conjuntamente con fosfolípidos y proteínas y representa alrededor de 10-15% del total de moléculas presentes en la membrana externa, y se ha estimado que ocupa un 75% del área superficial bacteriana. Además de contribuir a las propiedades estructurales de la membrana externa, el LPS representa una barrera de permeabilidad ante moléculas grandes negativamente cargadas y/o moléculas hidrofóbicas (Lerouge y Vanderleyden, 2001). Estructuralmente, el LPS está compuesto por 3 partes: el antígeno O, (AgO), el *core*, y el lípido A. El antígeno O corresponde a la porción más externa, que se proyecta al medio y se compone de subunidades de oligosacáridos repetitivos. En general, gran parte de la heterogeneidad estructural del LPS reside en el AgO, lo cual otorga a la bacteria versatilidad y adaptabilidad a condiciones y entornos cambiantes (Lerouge y Vanderleyden, 2001). El AgO se conecta con una porción más interna, llamada *core*, que se compone de unidades de oligosacáridos no repetitivos. El lípido A, compuesto por azúcares y ácidos grasos, se une al *core* y provee el anclaje de toda la estructura a la membrana externa.

1.3.2.1. El LPS de *E. meliloti*.

Los cultivos de *Sinorhizobium spp.* son capaces de producir una población heterogénea de LPS: LPS-S o liso y LPS-R o rugoso. Luego de los procedimientos de extracción, el LPS-R es la sub-población mayoritariamente aislada en estos rizobios. Por el contrario, se produce muy poco (o nada) del segundo tipo de LPS, el LPS-S. Esta sub-población incluiría además el antígeno O en su estructura. De estar presentes, los antígenos O de los LPS-S de distintas cepas de *Sinorhizobium spp.* muestran niveles de polimerización similares y carecen de heterogeneidad estructural. En este sentido, la falta de variabilidad de ambos, LPS-R y LPS-S en *Sinorhizobium spp.* indicarían que esta molécula carece de información estructural para influenciar la especificidad de huésped (Reuhs y col., 1998). En *E. meliloti* existen dudas respecto de la composición del LPS-S y el LPS-R. No existen evidencias convincentes de que LPS-S contenga el antígeno O. Asimismo, el LPS-R podría autoagregarse y conformar así la banda electroforética correspondiente al LPS-S (Sharypova y col., 2003). Aunque la composición química y algunas propiedades del LPS de *E. meliloti* han sido analizadas en repetidas oportunidades, su estructura química completa aún no ha sido resuelta. Glucosa, ácidos urónicos tales como ácido galacturónico y ácido glucurónico, y ácido-

3-desoxi-D-monooctosulónico (Kdo) representan el 78 % de los azúcares del LPS-R (*core*). (Lagares y col., 1992; Campbell y col., 2002). Una característica muy peculiar del LPS de *E. meliloti*, es que el *core* es la porción inmunodominante de la molécula (Lagares y col., 1992; Rehus y col., 1998; Sharypova y col., 2003) ya que usualmente, la porción más expuesta al entorno (el AgO), es el determinante antigénico más relevante en otras bacterias (Lerouge y Vanderleyden, 2001). Por otra parte, el modelo actual de la estructura del lípido A consistiría en un esqueleto de glucosamina, sustituido con 2 grupos fosfatos y 4 cadenas de acilos. Adicionalmente, un ácido graso hidroxilado de 28 carbonos estaría esterificado a uno de los restos acilo unidos al esqueleto de azúcar (Sharypova y col., 2003). En términos generales, los fenotipos asociados a mutaciones en el LPS de *E. meliloti* están relacionados a la sensibilidad a detergentes y antibióticos catiónicos, lo cual sugiere una alteración de la barrera de permeabilidad de la membrana externa. Además estas mutantes suelen tener un perfil alterado de resistencia/sensibilidad a fagos. En términos simbióticos, la mayoría puede establecer asociaciones con las leguminosas huéspedes, pero en general, son menos eficientes y menos competitivas para nodular que las cepas silvestres (Clover y col., 1989).

El locus *lpsB* es un factor genético involucrado en la biosíntesis del LPS extensamente estudiado en *E. meliloti*. Su producto génico, LpsB, es una glucosiltransferasa de la familia tipo I involucrada en la síntesis del *core*. El LPS de mutantes afectadas en este gen muestran drásticos cambios en la composición del R-LPS: se ha observado un gran incremento relativo en la cantidad de xilosa y la concomitante desaparición de los ácidos urónicos. Por otra parte, anticuerpos dirigidos contra el LPS silvestre, no fueron capaces de reconocer el LPS alterado de la mutante *lpsB* (Lagares y col., 1992). El fenotipo electroforético de estas mutantes es muy interesante, ya que se siguen observando las 2 bandas correspondientes al R-LPS y el S-LPS. Esto podría indicar que, a pesar de los importantes cambios en la composición del *core* en la mutante, el sistema enzimático de *E. meliloti* podría continuar agregando el AgO para constituir el S-LPS (Campbell y col., 2003; Lagares y col., 1992; Lagares y col., 2001;), lo cual representaría un caso excepcional, ya que mutantes en el *core* en varios modelos bacterianos, son incapaces de continuar agregando el AgO sobre un *core* truncado. La especulación de que la banda correspondiente al LPS-1 en realidad corresponda a formas moleculares de LPS-2 agregadas, no contradice el hecho de que se observen 2 bandas de menor movilidad electroforética en la mutante *lpsB* (Sharypova y

col., 2003). La mutación *lpsB* tiene efectos tanto en la fisiología de las bacterias de vida libre, como así también en la simbiosis con las leguminosas huéspedes. Entre los primeros se destacan la sensibilidad a detergentes hidrofóbicos, tales como SDS y DOC, sensibilidad a altas concentraciones de Ca^{++} , patrón de resistencia y sensibilidad diferencial fagos, sensibilidad aumentada a péptidos catiónicos y mayor acumulación de glucanos cíclicos (Campbell y col., 2003; Lagares y col., 1992).

En términos simbióticos, la mutación *lpsB* está asociada a un retraso en la aparición de nódulos en alfalfa, una demorada o reducida habilidad para nodular la raíz principal, con la presencia de un mayor número de nódulos, pero más pequeños, en raíces laterales. Además, esta mutante es menos competitiva para la nodulación, respecto de la cepa silvestre. En su interacción con *Medicago sativa*, el fenotipo de ambas cepas Rm1021 *lpsB* y Rm2011 *lpsB* (Rm6963) es Fix+ (Campbell y col., 2002; Campbell y col., 2003; Lagares y col., 1992). Sin embargo, cuando el huésped es *M. truncatula* el fenotipo de Rm6963 es Fix- y en este caso se encontró evidencia microscópica de signos de una fuerte respuesta de defensa por parte de la leguminosa y un patrón de infección anormal (Niehaus y col., 1998). Si bien mutantes de Rm 1021 *lpsB* pueden curvar efectivamente los pelos radiculares, y formar hilos de infección de un modo similar a la cepa silvestre, se presentan anormalidades del desarrollo apropiado del nódulo, ya que los mismos son pálidos y de menor tamaño. Las bacterias internalizadas muestran morfologías variadas, se observan bacteroides abortivos, atrofiados y bacterias internalizadas con compartimentos membranosos dramáticamente agrandados. El hecho de que se observen bacterias intracelulares dividiéndose y conteniendo granos de poli β -hidroxibuirato (dos características que normalmente no están presentes cuando las bacterias establecen la simbiosis), son indicativos de que la fase de transición de bacteria a bacteroide está comprometida, probablemente debido a la alteración de la membrana externa como consecuencia de un LPS modificado. Las células vegetales también parecen tener dificultades en su rol en el desarrollo del nódulo, ya que los amiloplastos permanecen grandes aún en células de la zona de fijación, y muchas de ellas contienen vacuolas típicas de la zona de senescencia. De esta manera, es evidente que la infección intracelular crónica de los nódulos de alfalfa, requieren un LPS con un *core* silvestre (Campbell y col., 2002).

1.4. BIOFILMS

Las bacterias, fundamentalmente en ambientes naturales, muestran una notable tendencia a adherirse y colonizar superficies bióticas e inertes. Diversas señales del entorno regulan una serie de acontecimientos que motivan el crecimiento de las bacterias inicialmente adheridas, hasta formar comunidades arquitectónicamente complejas y organizadas, denominadas biofilms (Bogino y col., 2013). Actualmente se considera que la habilidad para formar biofilms es un atributo universal en las bacterias (Lopez y col., 2010).

En el contexto de un biofilm, las bacterias adoptan un modo de crecimiento distinto, formando conglomerados multicelulares embebidos por una matriz producida por las mismas bacterias (Branda y col., 2005; Hall Stoodley y Stoodley, 2009). En virtud del grado de especialización, la comunicación intercelular por *quórum sensing* y el comportamiento coordinado que presentan, los biofilms podrían ser considerados como estructuras sociales organizadas y dinámicas (Branda y col., 2005; Lopez y col., 2010; Wentland y col., 1996). Las ventajas derivadas de la adopción de este estilo de vida sésil están relacionadas con la protección contra los agentes nocivos del entorno por ejemplo, presencia de antibióticos, protozoos y factores estresantes como desecación, radiación UV, sustancias tóxicas, sistema de defensa del huésped, etc. Del mismo modo la vida en biofilm provee otras ventajas como una mayor disponibilidad de nutrientes, posibilidad de cooperar metabólicamente con otras especies y adquisición de material genético (Anderson y O'Toole 2008; Davey y O'Toole, 2000; Mah y O'Toole 2001; Matz y Kjelleberg 2005).

La presencia de una interfase (frecuentemente, una de tipo líquido- sólido), en la cual se adsorben moléculas orgánicas formando una capa o film condicionante, constituye el sitio de adhesión. El transporte de los microorganismos a este nicho puede estar mediado por varios mecanismos: el movimiento Browniano, la gravedad, o la convección son los de tipo pasivo, mientras que la movilidad intrínseca de los microorganismos planctónicos constituye un mecanismo de transporte activo. La posterior adhesión a la interfase es bifásica: comprende una etapa de unión reversible, que no es específica y está mediada principalmente por interacciones de tipo electrostáticas e hidrofóbicas, y una etapa irreversible en la cual existe una consolidación de la adhesión y una formación de agregados bacterianos o microcolonias (Dunne, 2002; Van Loosdrecht y col., 1987). Éstas luego se transforman en macroagregados que evolucionan hasta constituir un biofilm maduro. El crecimiento del

biofilm se halla limitado básicamente por la disponibilidad de nutrientes en el entorno inmediato, el acceso de los mismos hacia las células dentro de la estructura del biofilm, y por la capacidad del sistema para remover los desechos. Otros factores que afectan el crecimiento del biofilm son el pH, osmolaridad, difusión de oxígeno, fuente de carbono, etc. (Dunne, 2002; Rinaudi y col., 2006). En algún punto, el biofilm alcanza una masa crítica y se establece un equilibrio dinámico en el cual, las capas exteriores más alejadas de la interfase de adhesión pierden células. Funcionalmente, este hecho representa el desmantelamiento del biofilm y el regreso al modo de vida planctónico (O'Toole y col., 2000; Prosser y col., 1987). Los mecanismos que gobiernan la transición entre el estado de vida sésil al planctónico son los menos comprendidos dentro del estudio de la dinámica de los biofilms. Recientemente, se ha descrito un interesante mecanismo por el cual ciertos D-aminoácidos pueden promover el desmantelamiento de biofilms de *Bacillus subtilis* (Kolodking-Gal y col., 2010). De manera similar, ciertos ácidos grasos de *Pseudomonas aeruginosa* que funcionan como mensajeros, dispersan los biofilms de varias especies bacterianas Gram positivas, Gram negativas, e incluso levaduras (Davies y Marques, 2009).

El establecimiento de un biofilm consta de varias etapas. En la primera fase de la formación del biofilm, las bacterias alcanzan el sustrato por medio de movilidad por flagelos y posteriormente se unen al mismo, en solo cuestión de segundos a través de fimbrias tipo IV (pili) donde se establece la microcolonia. Luego de la adhesión, las bacterias se dividen y diferencian para dar lugar a la formación de estructuras tridimensionales que le dan una forma típica al biofilm maduro. Esta masa celular está rodeada por agua y nutrientes. También se encuentran rodeadas de una matriz extracelular, la cual está compuesta por polisacáridos, especialmente EPS, muchas proteínas y también ADN. La misma ayuda a la retención de agua, para disminuir los efectos nocivos cuando se encuentra frente a un estrés hídrico u otro tipo de situación adversa (Fujishige y col., 2005) (Figura 4).

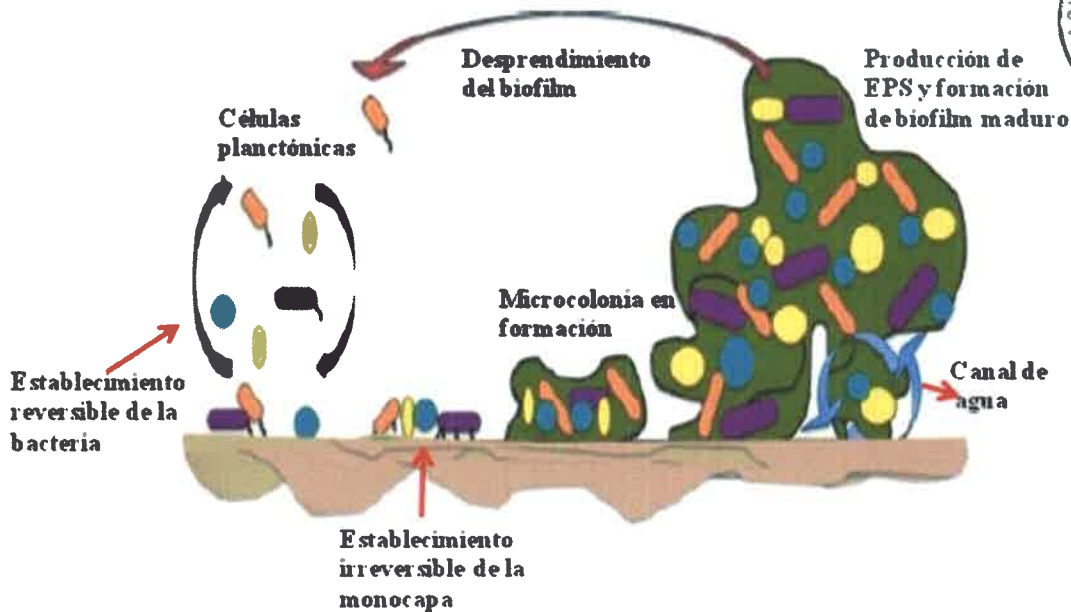


Figura 4. Esquema de las etapas en la formación de un biofilm multiespecie. Cada especie bacteriana está indicada con un color distinto, las flechas indican como se va desarrollando el proceso de formación de biofilm (Fujishige y Hirsch; 2005).

1.4.1. Componentes estructurales involucrados en la formación de biofilms

Se considera que la matriz extracelular es una característica común de los biofilms (Monds y O'Toole, 2009). Se trata de un conjunto de exopolímeros (fundamentalmente EPSs, ADN y proteínas) que mantiene a las bacterias unidas en la estructura (Branda y col., 2005; Hall-Stoodley y Stoodley, 2009). Dos ejemplos notables de la participación de los EPSs en la formación y desarrollo de biofilms de rizobios son el exopolisacárido ácido y el galactoglucano (EPS II) de *Rhizobium leguminosarum* y *Ensifer meliloti*, respectivamente (Rinaudi y González, 2009; Russo y col., 2006). En ambos casos, el bloqueo en la síntesis de los exopolímeros conduce a una drástica pérdida de la arquitectura tridimensional del biofilm maduro. Pili, fimbrias y flagelos son apéndices de superficie que tienen importancia en la formación de biofilms. En *E. coli* las fimbrias Tipo I son importantes para la formación de biofilms en superficies inertes e intervienen en la adhesión a epitelios (Pratt y Kolter, 1998; Wright y col., 2007). Los flagelos y la movilidad mediada por éstos juegan un rol importante en biofilms de por ejemplo, *E. coli* (Pratt y Kolter, 1998) y rizobacterias como *Agrobacterium tumefaciens* (Merritt y col., 2007) y *E. meliloti* (Fujishige y col., 2006). El lipopolisacárido LPS es una parte de la superficie celular de las bacterias Gram negativas que se halla expuesta al medio externo y es por lo tanto potencialmente activo en términos de interacciones adhesivas con interfases, tanto vivas como inertes.

Alteraciones en este polisacárido complejo conlleva a alteraciones en la formación de biofilms en varias especies bacterianas tales como *E. coli* (Puttamreddy y col., 2010) *Pseudomonas aeruginosa* (Lau y col., 2009), *Xantomonas axonopodis* (Li y Wang, 2011), *Klebsiella pneumoniae* (De Araujo y col., 2010) y *Porphyromonas gingivalis* (Yamaguchi y col., 2010).

Las proteínas extracelulares son las que se encuentran en mayor proporción en la matriz extracelular, aunque han sido relativamente poco estudiadas en comparación con otros componentes como los EPSs. Estas cumplen una función estructural y fisiológica. Algunas de ellas son enzimas extracelulares cuya función esta asociada con actividades como la degradación de biopolímeros para transformarlos en nutrientes disponibles para las células y modificación de exopolímeros para la estructura del biofilm. Algunas de estas enzimas son lipasas, hidrolasas y glucanasas. (Bogino y col., 2013). Otras proteínas tienen una función estructural como las lectinas que unen las células bacterianas a la matriz del biofilm.

Los biofilms proveen un lugar ideal para el intercambio de material genético. Se ha demostrado que existen elevados niveles de conjugación en bacterias que viven en forma de consorcios microbianos en comparación con las que lo hacen en forma de vida libre (Bogino y col., 2013). El ADN es un importante componente de esta matriz y juega un rol muy importante en la formación del biofilm en varias especies bacterianas como *P. aeruginosa* y *B. cereus* (Vilain y col., 2009; Yang y col., 2007,). La calidad, localización y origen del ADN varía dependiendo de las especies bacterianas.

1.4.1.1. Consorcios polimicrobianos

En la naturaleza, los biofilms están constituidos por múltiples especies bacterianas, pudiendo contener además hongos, algas y protozoarios, dando lugar a complejos y diversos ensamblajes, tanto a nivel taxonómico como funcional que dificultan las predicciones en los patrones de sucesión dentro de este tipo de estructuras (Graf y Frei, 2013). El conocimiento sobre la composición y funcionalidad de los biofilms presentes en el suelo es escaso. Esto es debido principalmente a las dificultades que genera el estudio de las condiciones de vida bacteriano en los microhábitats del suelo y a la complejidad de interacciones interespecíficas que tienen lugar en los biofilms mixtos (Rickard y col., 2003). Además, el hecho de que menos del 1% de las especies bacterianas presentes en los suelos son cultivables complica el estudio de los biofilms del suelo aún más (Amann y col., 1995).

En muchos casos ha sido determinada la incapacidad de ciertas bacterias para formar biofilms de manera individual pero que en sinergismo con otras cepas pudieron constituir tales estructuras, como así también la influencia de la aplicación de estreses sobre la capacidad de formación de biofilm mixtos y su impacto en la funcionalidad y arquitectura del mismo. La formación de biofilm duales representa un modelo sencillo para el estudio de procesos bacterianos determinantes del establecimiento de tal asociación (Yoshida y col., 2009).

Las comunidades bacterianas terrestres están expuestas a diversos agentes de estrés ambiental, de los cuales la reducida disponibilidad de agua aparece como uno de los más críticos, afectando la supervivencia y actividades de dichas comunidades (Woo-Suk Chang y Larry Halverson, 2003). Es escaso el conocimiento de los mecanismos que utilizan las bacterias para crecer y sobrevivir en ambientes sometidos a desecación, a pesar que la degradación de la calidad de los suelos debido a desecación y salinidad, representa uno de los problemas más severos y ampliamente distribuidos de la agricultura moderna, afectando a un 40% de las tierras aptas para cultivo a nivel mundial (Zahran, 1999).

Estudios llevados a cabo con *Pseudomonas putida* indican que el desarrollo de biofilm en condiciones de baja disponibilidad de agua es un proceso dinámico que afecta las propiedades ultraestructurales del mismo (Chang y Halverson, 2003). Ha sido descrito que en tales situaciones, la producción de mayores cantidades de EPSs genera un microambiente más hidratado en la vecindad inmediata de las células que contribuye a la tolerancia a la desecación (Chang y col., 2007; Schnider-Keel y col., 2001).

La vida desarrollada en un biofilm microbiano presenta varias ventajas para las bacterias del suelo, entre las que se pueden mencionar la protección contra la desecación (Flemming y Wingender, 2010). En los suelos el potencial agua (ψ) incluye el potencial osmótico (por solutos disueltos) y el potencial mátrico (fuerza de retención del agua por el suelo) (Papendick y Campbell, 1980). Ambos potenciales representan formas de privación del agua que posiblemente afecten a la fisiología bacteriana de maneras distintas. De este modo, pueden utilizarse solutos permeables (como por ejemplo NaCl) o solutos de alto peso molecular (como por ejemplo polietilenglicol 8000, PEG), con la finalidad de reducir el potencial agua de los medios de cultivo. PEG (de alto peso molecular) se ha descrito como un mejor deshidratante, no pudiendo atravesar la

membrana externa de las bacterias, simulando de un mejor modo situaciones de hábitats con reducido contenido de agua (efecto tipo mátrico).

1.5. AUTOAGREGACIÓN

La autoagregación es la manifestación de las interacciones adhesivas entre bacterias. Microscópicamente, pueden visualizarse como agregados o *clusters* celulares, mientras que macroscópicamente, puede observarse una floculación y sedimentación bacterianas (Sorroche y col., 2010; Schembri y col., 2001). En la naturaleza, el fenómeno de autoagregación bacteriana podría presentar ventajas competitivas, sobre todo en ambientes y condiciones hostiles, como las normalmente imperantes en el suelo (Neyra y Sadasivan, 1985; Nikitina y col., 2001). Por ejemplo, el estrés por presencia de un detergente tóxico como el SDS, promueve la agregación de *P. aeruginosa* (Klebensberger y col., 2009).

En un contexto aplicado, la autoagregación bacteriana reviste un gran interés. Por ejemplo, en el ámbito del estudio de interacciones benéficas entre bacterias probióticas y mamíferos, se ha propuesto la implementación de ensayos de autoagregación como una estrategia conveniente a los efectos de una selección primaria de aislamientos bacterianos potencialmente capaces de colonizar el intestino (Del Re y col., 1998; Del Re y col., 2000). En microbiología industrial, el fenómeno de autoagregación ofrece ventajas operativas que se traducen en una disminución de los costos. Cuando bacterias libres, no agregadas, son cultivadas en biorreactores de flujo continuo, la biomasa se pierde con relativa facilidad en el efluente. Una alternativa para superar este inconveniente, es la práctica de inmovilización celular mediante el empleo de distintos soportes (Wu y col., 2005; Zang y col., 2007), pero esta práctica resulta económicamente onerosa. En contraste, las células autoagregadas están autoinmovilizadas, no se requieren soportes y, en efecto, quedan más fácilmente retenidas en los biorreactores (Malik y col., 2003). Por otra parte, la separación de biomasa del medio de cultivo, es una operación que se ve facilitada cuando la biomasa está agregada (Nikitina y col., 2001). En el caso particular de la industrialización de inoculantes a base de bacterias para su uso en agricultura, la autoagregación bacteriana ofrece ventajas adicionales en etapas posteriores de producción, tal como en el almacenaje del inoculante (Bahat-Samet y col., 2004).

1.5.1. Factores de superficie involucrados en la autoagregación.

Tal como ocurre con la formación de biofilms, diversos factores, ambientales y estructurales propios de las bacterias, han sido involucrados con el fenómeno de autoagregación. Básicamente, apéndices y otras estructuras superficiales juegan un papel importante en la autoagregación. En *E. coli*, se han descrito varios apéndices y estructuras de superficie que median las interacciones célula-célula. Un autotransportador de superficie, el antígeno 43, ha sido involucrado en el fenómeno de autoagregación de células de *E. coli*, en cultivos líquidos estáticos (Hasman y col., 1999; Owen y col., 1987). A nivel molecular estas interacciones intercelulares han sido atribuidas a la capacidad del Ag43 de establecer interacciones adhesivas homotípicas Ag43-Ag43 (Hasman y col., 1999). Los apéndices fimbriales de ciertas cepas patógenas de esta bacteria, parecen tener relevancia no solo en el comportamiento autoagregativo, sino también en la capacidad de colonización del huésped. En este sentido, Nataro y colaboradores (1992) y Czczulin y colaboradores (1997), estudiaron las AAF I y II (*Aggregative Adherence Fimbriae*), apéndices fimbriales presentes en ciertas cepas patógenas de *E. coli* con capacidad de agregarse (EAEC, *Enterotoxigenic Aggregative E. coli*). De manera similar, la adhesina FimH (Schembri y col., 2001), y el BFP (*bundle-forming pili*) presente en cepas enteropatógenas de *E. coli* (Bieber y col., 1998), son factores relevantes desde el punto de vista de interacciones intercelulares y patología bacteriana. Por otra parte, estudios en bacterias fitopatógenas han puesto de manifiesto la relación entre la capacidad de autoagregación, la presencia de estructuras proteicas de superficie, y el potencial patogénico. Por ejemplo, De la Fuente y colaboradores (2008) demostraron la implicancia de los pili tipo I y IV en la autoagregación de *Xylella fastidiosa*, una bacteria patógena de varios vegetales de importancia económica tales como cítricos, vides, café, almendro, entre otros. En este caso, la formación de agregados bacterianos sería un aspecto crucial para la interrupción del flujo xilemático en las plantas enfermas. La autoagregación no solo representa un aspecto importante en términos de patogenicidad bacteriana, sino que también ha sido estudiada en el contexto de interacciones benéficas, tales como la que establecen cepas probióticas en el ecosistema gastrointestinal de los mamíferos. En este sentido, Kos y colaboradores (2003) demostraron una correlación entre la autoagregación y la capacidad de adherencia de *Lactobacillus acidophilus* M92 a epitelio intestinal porcino. Este fenómeno estuvo mediado por factores de superficie de naturaleza proteica. De manera similar, se han estudiado cepas autoagregativas y no autoagregativas de *Bifidobacterium*

suis (Del Re y col., 1998) y de *Bifidobacterium longum* (Del Re y col., 2000). La relevancia de estos estudios reside en que han puesto de manifiesto una clara conexión entre capacidad autoagregativa y adhesión a epitelios intestinales. En *Azospirillum brasilense*, una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal, se ha descrito una proteína de membrana externa involucrada en la autoagregación y en la interacción con raíces (Burdman y col., 2001). Por otra parte, Nikitina y colaboradores (2000) describieron que lectinas de la superficie de *A. brasilense*, también tienen participación en la agregación, y que determinados haptenos pueden inhibirla parcialmente.

1.5.2. Factores extracelulares involucrados en la autoagregación.

En contraste con los casos anteriormente descritos, en los cuales la autoagregación está mediada por apéndices de naturaleza proteica localizados en la superficie celular, los polisacáridos extracelulares también han sido relacionados con el comportamiento autoagregativo en varios modelos bacterianos. Por ejemplo, *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3, una bacteria muy promisorio desde el punto de vista industrial debido a su capacidad de producir hidrógeno, secreta una matriz extracelular rica en proteínas, carbohidratos y ADN, que le confiere interesantes propiedades autoagregativas. De hecho, cepas de *E. harbinense* moderadamente autoagregativas y no autoagregativas muestran una notable disminución en la cantidad de EPS producido (Ren y col., 2009). Por otra parte, el material extracelular de *Shewanella oneidensis* MR-1, compuesto mayoritariamente por ADN extracelular, proteínas y glucoconjugados, parece contribuir a la estabilidad de los agregados que esta bacteria es capaz de formar (McLean y col., 2008). El EPS producido por *Azospirillum brasilense*, también ha sido estudiado en relación a sus roles en la autoagregación y en las interacciones intercelulares (Bahat-Samet y col., 2004; Neyra y Sadasivan, 1985.). En esta bacteria, la producción de un tipo de EPS rico en arabinosa es fundamental para la autoagregación.

1.6. Interacciones adhesivas intergenéricas e intragenéricas: coagregación

El proceso de coagregación puede ser definido como la adhesión entre bacterias genéticamente diferentes (Rickard y col., 2003) o pertenecientes al mismo género. Este fenómeno fue inicialmente descrito en bacterias habitantes de la cavidad oral del hombre, pero luego se hizo evidente que el proceso estaría extendido en otros escenarios, como en ambientes acuáticos, sistemas de tratamiento de aguas residuales,

entre otros (Bossier y Verstraete, 1996; Malik y col., 2003; Rickard y col., 2000). La importancia de la coagregación radica en que sería un proceso integral en la formación de biofilms mixtos. En este sentido, existen 2 modelos que explican de qué manera la coagregación bacteriana estaría conectada con la génesis de los biofilms mixtos. En uno de ellos, las células planctónicas libres, en suspensión, reconocen específicamente y se adhieren a bacterias genéticamente distintas que se hallan en el contexto de un biofilm. El segundo mecanismo en cambio, establece que existe una coagregación previa de las bacterias planctónicas, y una posterior adhesión e inclusión del coagregado en el biofilm en desarrollo. En ambos casos, el biofilm mixto alberga sub-tipos de bacterias derivadas de la fase planctónica (Rickard y col., 2003). En términos mecanísticos, tanto en bacterias acuáticas como así también en bacterias habitantes de la placa oral y del intestino humano, la coagregación depende de interacciones moleculares entre una lectina en un tipo celular, que interactúa con un receptor complementario de carbohidratos en la otra bacteria (Kolenbrander y col., 1993; Ledder y col., 2008; Rickard y col., 2000).

1.7. Relación entre formación de biofilms y autoagregación.

Las bacterias tienen la capacidad de formar complejos celulares sobre superficies bióticas (tejidos animales y vegetales) y abióticas (sedimentos, partículas de suelo, instrumentos médicos o de laboratorios). El comportamiento autoagregativo ha sido correlacionado con la capacidad para formar biofilm en asociaciones benéficas entre plantas y bacterias. Mutantes fuertemente autoagregativas de rizobacterias como *A. brasilense* muestran una elevada tendencia para formar biofilms en soportes inertes (Neyra y Sadasivan, 1985). En *E. meliloti* la autoagregación (Sorroche y col., 2010) y la formación de biofilm (Sorroche y col., 2012) dependen de una combinación de señales bacterianas, componentes de superficie y EPSs.

Dependiendo de la cantidad de células y de los componentes extracelulares se van a desarrollar estos complejos celulares sobre superficies o como una suspensión líquida. Tal como se mencionó anteriormente, ciertos componentes de superficie y extracelulares están involucrados en dos procesos que dependen, al menos en parte, de las interacciones físicas entre bacterias: la formación de biofilms y la autoagregación. Es lógico entonces que alteraciones en uno de ellos, conduzca a cambios en el otro. Existen varios ejemplos de esta relación en algunos modelos bacterianos. Por ejemplo, la adhesina AIDA (una glicoproteína de la familia de los autotransportadores) de *E. coli*

es capaz de inducir una fuerte autoagregación celular en suspensiones estáticas, debido a interacciones AIDA-AIDA en las superficies celulares. Asimismo esta adhesina es capaz de promover la formación de biofilm e incrementar la adhesión bacteriana *in vitro* a células de humanas y de otros mamíferos (Sherlock y col., 2004). Cepas de *Myroides odoratus* fuertemente adhesivas a soportes inertes muestran una notable tendencia a la autoagregación (Jacobs y Chenia, 2009). De manera similar, cambios en la superficie celular de *Porphyromonas gingivalis* (una bacteria patógena que forma biofilms periodontales) que intensifican las interacciones célula-célula, provocan un significativo aumento en la capacidad formadora de biofilm y en la autoagregación (Yamaguchi y col., 2010). Resultados obtenidos en nuestro laboratorio indicarían que aquellas mutantes de *Azospirillum brasilense* previamente caracterizadas como formadoras de flóculos, presentan una fuerte tendencia a adherirse a soportes inertes (Nievas y col., resultados no publicados).

1.8. ESTRUCTURA DE LOS SUELOS

La porción mineral del suelo consiste en tres distintos tipos de partículas clasificadas como arena, limo y arcilla. La textura del suelo se refiere a las porciones relativas de dichas partículas, mientras que la estructura del suelo indica como se aglomeran o reúnen los tres componentes en unidades llamadas genéricamente como agregados. Un agregado puede definirse como un agrupamiento natural de las partículas primarias para formar unidades secundarias de mayor tamaño, en los que la fuerza de atracción entre ellas es superior a las del medio que las rodea (Figura 5). Varios estudios han demostrado que la formación de agregados estables depende en gran medida de la naturaleza y del contenido de la materia orgánica (Angelrd y col., 2014; Graf y Frei, 2013). En efecto, la estabilidad de agregados del suelo se encuentra estrechamente relacionada a los exudados de raíz (Watt y col., 1993) y a la actividad microbiana del suelo (Dinel y col., 1992; Leifheit y col., 2014). En particular se acepta que la acción microbiana en la agregación del suelo se debe principalmente a la producción de exopolisacáridos (EPS) (Alami y col., 2000; Kaci y col., 2005).

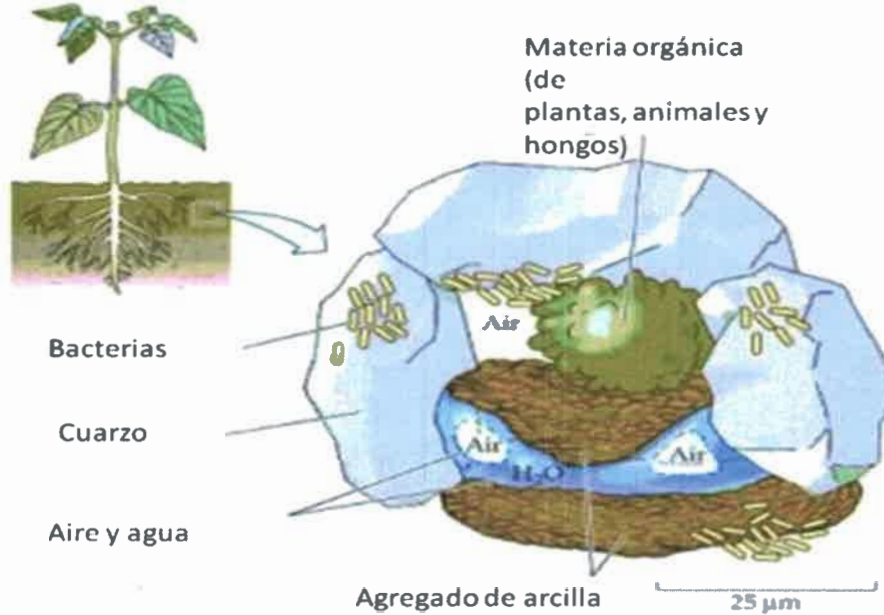


Figura 5. Ilustración de la composición de los agregados en el suelo (Tomado de forsuelo.es).

Los microorganismos del suelo adquieren un especial interés como indicadores de calidad del mismo. La densidad y diversidad microbiana del suelo rizosférico es susceptible a variar dependiendo de la especie vegetal, edad y estado nutricional de la planta, de las características físico-químicas del suelo, de su manejo y de las condiciones ambientales (Marschner y col., 2004).

El término rizósfera se deriva de la palabra griega “rizo” que significa raíz, y de “phere” que denota el entorno de la influencia de dicha raíz, con características específicas. La relación existente entre el suelo y la raíz es de doble vía, mediado por las condiciones ambientales y el sistema planta. Por lo tanto, la rizósfera es el entorno de mayor actividad física, química y principalmente biológica, de gran interés agronómico y ecológico, pues representa una interfase de comunicación entre plantas terrestres y su sustrato: el suelo (Sánchez, 2012).

Se diferencian distintas zonas en la rizósfera. Ésta no es una zona uniforme, es por ello que es posible diferenciar en ella algunas regiones: rizósfera, rizoplano y endorizósfera.

La rizósfera es la región mas externa a la raíz, constituye el área de mayor contacto en la interfase raíz-suelo. Su delimitación no es clara, algunos autores suponen un alcance de 1-2 mm de espesor, otros le calculan hasta 3 mm, y en algunos cultivos como las gramíneas con sistemas radicales fasciculados muy ramificados, constituye prácticamente la mayoría del suelo bajo su influencia.

El rizoplano, esta ubicado sobre la superficie de la raíz. La endorizósfera es la que abarca el tejido cortical (Cardozo y Freites, 1992; Siqueira y Franco, 1988).

Los microorganismos que se establecen en cada una de estas regiones se han especializado en éstos hábitats a través de procesos co-evolutivos y varían dependiendo de las especies de plantas, edad, condiciones sanitarias y ambientales, entre otros factores.

Algunos de los organismos que habitan en la endorizósfera establecen simbiosis mutualistas con la planta hospedera (entran en relación íntima con el hospedero, y mientras usan las fuentes de energía de la raíz, proveen beneficios a la planta, estableciendo complemento en ciclos nutricionales como por ejemplo: Carbono-Nitrógeno y Carbono-Fósforo, que son dos de los casos mas frecuentes en la naturaleza.

Existe un llamado “Efecto rizosférico”. El suelo rizosférico es el que contiene mayor cantidad de microorganismos que el resto del volumen del suelo; así se puede establecer un efecto rizosférico R/S para cada planta que varía según genotipo, especies y condiciones ambientales. Éste último relaciona los organismos presentes en la rizósfera (R) con los organismos presentes en el suelo no rizosférico (S). Todas las poblaciones de microorganismo presentes en la rizósfera, se encuentran en un continuo equilibrio, produciéndose verdaderas cadenas tróficas que de forma directa o indirecta pueden afectar el crecimiento, desarrollo y nutrición vegetal (Sánchez, 2012).

Muchas de las relaciones que establecen los microorganismos del suelo podrían beneficiar a la planta cuando ocurren en la zona próxima a sus raíces (rizósfera) que se caracteriza por poseer una gran cantidad de compuestos que son exudados por la planta. Las densidades microbianas presentes en esta zona de directo intercambio con la planta pueden llegar a ser hasta 50 veces más grandes que en el suelo no rizosférico (Kichein y col., 2013; Reyes y col., 1999). La presencia de microorganismos benéficos alrededor

de la raíz establece y acelera procesos bioquímicos que influyen sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, lo que está asociado con un incremento de elementos químicos disponibles y la producción de compuestos que inducen el crecimiento de la planta o controlan patógenos. De allí que la diversidad y densidad de microorganismos sean indicadores de calidad del suelo (Rilling y col., 2014).



2. HIPÓTESIS

Los mecanismos de interacción entre bacterias, tales como autoagregación y/o formación de biofilms, son procesos cruciales para la supervivencia de tales microorganismos en la rizósfera, la interacción con plantas superiores y el mejoramiento de la calidad del suelo.



3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

En general, se considera que la microbiota del suelo, conformada principalmente por bacterias y hongos, juega un papel importante en la fertilidad, reciclaje de nutrientes, evolución, estructura y conservación del mismo.

A pesar de la importancia de la ecología bacteriana en los ecosistemas terrestres, el conocimiento actual de los mecanismos utilizados por las bacterias para adaptarse a situaciones de estrés que son frecuentes en los suelos es limitado. Considerando la importancia que las rizobacterias tienen sobre el mantenimiento de la calidad de los suelos y la magnitud del problema que la deficiencia de agua tiene sobre las tierras productivas de buena parte de nuestro país, se propone como objetivo general del presente trabajo estudiar el modo de ocurrencia de los procesos de interacción celular entre rizobacterias en suelos sometidos a condiciones de estrés, como parte de un mecanismo crucial para la supervivencia bacteriana y el mantenimiento de la diversidad microbiana en el suelo.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OBJETIVO 1. Estudiar la capacidad de rizobacterias de llevar a cabo los procesos de formación de biofilm y autoagregación bajo condiciones de estrés hídrico y osmótico.

OBJETIVO 2. Evaluar la formación de biofilms mixtos entre diferentes bacterias rizoféricas.

OBJETIVO 3. Caracterizar comunidades bacterianas asociadas a suelo rizosférico de cultivos de importancia agroeconómica para nuestra región.

OBJETIVO 4. Establecer el impacto de bacterias autoagregativas y sus productos orgánicos sobre la agregación de las partículas de suelo.



***4. MATERIALES Y
MÉTODOS***

4.1. Condiciones de cultivos bacterianos

Para los distintos ensayos, todas las cepas bacterianas (excepto las de *E. coli*) fueron cultivadas en agitación en medio LB o TY a 200 rpm a 30°C hasta fase exponencial tardía de crecimiento ($DO_{600nm} \sim 1.0$). Cuando fue necesario se adicionaron los siguientes antibióticos: estreptomina (500 µg/ml); neomicina (200 µg/ml); gentamicina (40 µg/ml); tetraciclina (10 µg/ml); kanamicina (500 µg/ml).

Para la obtención de EPS II, la cepa de *E. meliloti* Rm8530*exoY* fue cultivada en medio MGM durante siete días a 30°C a 200 rpm.

4.2. Conservación de las cepas bacterianas

Las cepas a ser conservadas fueron crecidas en medio LB líquido conteniendo los antibióticos necesarios hasta fase exponencial tardía. Luego del período de incubación, la biomasa fue transferida a microtubos conteniendo una solución de glicerol al 20% (800 µl de cultivo bacteriano en 200 µl de glicerol) y conservada a -80°C.

4.3. Cepas bacterianas

En la tabla 1 se describen las cepas bacterianas empleadas. Las cepas fueron cultivadas en los medios LB, medio mínimo MGM, o en medio TY como ya se han descripto. A los diferentes medios se les agregó cuando fue necesario los antibióticos respectivos para cada cepa.

Tabla 1. Cepas de *E. meliloti* y otras rizobacterias utilizadas.

Cepas y Plásmidos	Propiedades relevantes	Referencia u origen	Fenotipos
<i>E. meliloti</i>			
Rm1021	SU47 <i>str21</i> <i>expR102::ISRm2011-1</i>	Meade y col., 1982	Produce EPSI y no EPS II en condiciones de laboratorio
Rm8530	SU47 <i>str21</i> <i>expR101 (expR⁺)</i>	Glazebrook y Walker, 1989	Produce EPS II (galactoglucano)
Rm 8530 <i>exoY</i>	<i>exoY</i> 210::Tn5, NeoR	Sorroche y col., 2011	No produce EPS I
Rm8530 <i>lpsB</i>	Rm8530 <i>lpsB</i> ::Tn5	Sorroche y col., 2012	Produce un LPS aberrante
Rm8530 <i>expA</i>	<i>expA3</i> ::Tn5-233	Sorroche y col., 2010	No produce EPS II
Rm8530 <i>expA</i> <i>exoY</i>	<i>expA3</i> ::Tn5-233 <i>exoY210</i> ::Tn5	Sorroche y col., 2010	No produce EPS I ni EPS II
Otras rizobacterias			
<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS 417r	PGPR	Van Peer y col; 1991	

4.4. PCR diagnostica del gen *expR*

Se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Pellock y colaboradores (2002), con modificaciones menores. El par de cebadores usados para la amplificación del gen *expR* fueron:

RmndvA5' out (5'-GCGAGGAGATCCTGCCGAG-3') y

Rmpyc5' out (5'-AGATGGCGTGAACATTCGG-3').

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l, y contuvo 2,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen). Los cebadores y los desoxinucleótidos trifosfato se usaron a una concentración final de 1 μ M y 200 μ M, respectivamente. El buffer empleado fue el sugerido por el fabricante. Se emplearon 2 μ l de la preparación de ADN genómico como molde. El ciclo de temperaturas y tiempos del programa para la amplificación fueron:

- 1- 95°C durante 5 minutos
- 2- 94°C durante 30 segundos
- 3- 65°C durante 30 segundos
- 4- 72°C durante 5 minutos
- 5- 72°C durante 5 minutos
- 6- 4°C el tiempo requerido.

Los pasos 2 al 4 fueron repetidos 29 veces.

4.4.1 Electroforesis de ADN

Los productos de amplificación por PCR fueron sembrados en geles de agarosa (0.8% p/v) conteniendo bromuro de etidio (0.05 μ g/ml), y sometidos a un campo eléctrico de 90 v durante 60 m. Posteriormente, el gel fue visualizado en un transiluminador UV y fotografiado.

4.4.2. Extracción de ADN genómico

Se empleó el kit comercial de la firma *Fermentas*, y se procedió de la siguiente manera. Se centrifugó 1ml de cultivo bacteriano en fase exponencial tardía, durante 10 minutos a 7.500 rpm y se resuspendió el *pellet* en 200 μ l de buffer TE (Tris-EDTA pH 8). Se adicionaron 400 μ l de solución de lisis y se incubó a 65°C durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 600 μ l de cloroformo, y mediante suaves inversiones (3-5 veces) se emulsionó la mezcla, la cual fue centrifugada a 10.000 rpm durante 2 minutos. La fase acuosa (conteniendo el ADN) fue transferida a un nuevo tubo y se añadieron

800µl de solución de precipitación recientemente preparada. El tubo conteniendo la mezcla se invirtió varias veces durante 2 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó a 10.000 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante se removió completamente y el *pellet* de ADN se resuspendió en 100 µl de NaCl 1,2 M mediante una suave agitación. Posteriormente se agregaron 300 µl de etano frío, y se dejó precipitar 10 minutos a -20°C. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 4 minutos y se eliminó el etanol. El *pellet* fue lavado con etanol frío al 70%, y se dejó secar, luego fue resuspendido en 50 µl de agua deionizada estéril. Esta preparación fue conservada a -20°C.

4.5. Material Vegetal

Para los ensayos de caracterización de rizósferza de alfalfa y la evaluación de estructuras de los suelos, se emplearon semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) pertenecientes al ecotipo "Pampeano", provistas por INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). Particularmente el ecotipo pampeano proviene de la región pampeana bonaerense y se caracteriza por una baja tasa de crecimiento otoño-invernal, con plantas de corona amplias y folíolos pequeños.

4.5.1. Desinfección de las semillas

Las semillas fueron lavadas 2 veces con agua destilada estéril y posteriormente sumergidas en etanol 70% durante 15 minutos. Luego se enjuagaron 2 veces con agua destilada estéril y fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio (lavandina comercial) diluida con agua (50%) durante 15 minutos. Posteriormente se lavaron profusamente (8-10 veces) con agua destilada estéril.

4.6. Ensayos de viabilidad bacteriana en condiciones de estrés

Se determinó la supervivencia en arena, de bacterias caracterizadas previamente con fenotipos de alta y baja capacidad de formación de biofilms. Para ello, el soporte de arena fue inoculado con las cepas Rm1021, Rm8530 y Rm8530*expA*. Luego de la inoculación se generaron diferentes condiciones de estrés. A diferentes tiempos (0, 7, 20, 30 y 40 días) se registraron el número de células viables por gramo de arena.

4.6.1. Estrés hídrico

Se emplearon 2 gr de arena estéril (granulometría de 0.40 mm de diámetro nominal) como soporte. La misma fue colocada en tubos de ensayo y posteriormente humedecida (a capacidad de campo) con solución fisiológica, conteniendo 1×10^6 UFC/ml de cada cepa de *E. meliloti* a ensayar. Los tubos fueron tapados con tapones de algodón e incubados durante distintos períodos de tiempo, como ya se mencionó anteriormente, en estufa a 30°C, y en condiciones de oscuridad. Se incluyeron controles sin deshidratar, para cada una de las cepas (tapados con parafilm, para evitar la pérdida de agua).

Luego, se evaluó el porcentaje de humedad por gravimetría. Para ello se tomaron 2 gramos de arena de ambos tubos: control y tratados, se los pesó y posteriormente se los llevó a deshidratar a una estufa a 60°C hasta peso constante. Finalmente se obtuvieron los porcentajes de humedad utilizando la siguiente ecuación:

$$\%H: (Psh+T)-(Pss+T)/(Pss+T)-T$$

En donde **Psh**= peso de arena húmeda; **Pss**= peso de arena seca; **T**= tara

Para el recuento del número de bacterias, se procedió al agregado de 2 ml de solución fisiológica estéril conteniendo 0,01% de Tween 80. Luego de 15 min de agitación en el vortex, el fluido sobrenadante fue serialmente diluido en solución fisiológica estéril y posteriormente sembrado en la superficie de placas de petri conteniendo medio TY sólido con el agregado de los antibióticos correspondientes para cada cepa. Después del tiempo de incubación apropiado se registraron las UFC/g de suelo.

Cada ensayo fue repetido 5 veces con tres réplicas cada uno.

4.6.2. Estrés salino

Se emplearon 2 gr de arena estéril (granulometría de 0.40 mm de diámetro nominal) como soporte. La misma fue colocada en tubos de ensayo y posteriormente humedecida (a capacidad de campo) con soluciones salinas de NaCl 430 mM (2.5% ClNa) y 250 mM (1.5% ClNa) respectivamente, conteniendo 1×10^6 UFC/ml de cada cepa de *S. meliloti* a ensayar. Los tubos fueron tapados con tapones de algodón e incubados durante distintos períodos de tiempo en estufa a 30°C, en condiciones de oscuridad. Se incluyeron controles, para cada una de las cepas, los cuales fueron humedecidos con solución fisiológica (0.9% ClNa). Para el recuento del número de bacterias, se procedió tal lo descripto previamente.

Cada ensayo fue repetido 5 veces con 3 réplicas cada uno.

4.7. Ensayo de capacidad formadora de biofilm (CFB)

Para los distintos ensayos que lo requirieron, se determinó la CFB por un análisis cuantitativo utilizando placas de ELISA de 96 pocillos como fue descrito por O'Toole y Kolter (1998). Brevemente, se realizaron preinóculos en 2 ml de medio TY en incubados en agitación por 48 hs a 28°C. Los cultivos fueron diluidos con medio fresco hasta llegar a una DO_{620nm} de 0.01 y luego 150 μ l de cada suspensión fueron agregados a cada pocillo e incubados durante 24 hs a 30°C. El crecimiento bacteriano fue cuantificado midiendo la absorbancia de células planctónicas de cada pocillo a 620 nm con un lector de MicroELISA (Series 700 Microplate Reader; Cambridge Technology). Las células planctónicas fueron removidas, cada pocillo fue lavado tres veces con solución fisiológica y las células adheridas al soporte fueron teñidas con 180 μ l de cristal violeta (0,1%) durante 15 minutos. Los pocillos fueron enjuagados varias veces con agua destilada estéril y la formación de biofilm se midió adicionando 150 μ l de etanol al 95% y midiendo la DO del cristal violeta solubilizado a 570 nm. Paralelamente, se realizaron controles de medio. La CFB relativa fue calculada como DO_{570}/DO_{620} .

Cabe destacar que se realizó el mismo ensayo realizando los cultivos en tubos de vidrio.

4.8. Cuantificación de la CFB en condiciones de estrés osmótico y mátrico.

Se evaluó la formación de biofilms de distintas cepas (*E. meliloti* Rm8530, Rm8530*expAexoY*, Rm8530*exoY*, Rm8530*lpsB*, Rm8530*expA*, Rm1021 y una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* WCS417r) creciendo de forma individual para lo cual se utilizó el medio LB reducido a la mitad (LB/2) para generar un potencial osmótico de -0,25 MPa. A dicho medio se le agregaron cantidades crecientes de NaCl o de PEG 8000 para generar una condición de reducción del potencial agua (estrés salino o mátrico respectivamente) del orden -1,0 MPa.

4.9. Cuantificación de la formación de biofilm en cultivos duales

Se estudió la formación de biofilm mixto entre dos especies rizosféricas (*E. meliloti* y *Pseudomonas fluorescens*). Se utilizaron cepas de referencia Rm1021, Rm8530 y *P. fluorescens* WCS417r y mutantes en EPS y LPS de Rm8530 (Rm8530

expA, Rm8530 *expA* *exoY* y Rm8530 *lpsB*). Como punto de partida fueron evaluadas interacciones positivas o negativas entre las cepas bajo estudio (se realizaron ensayos de sinergismo, antagonismo, pruebas de inhibición en placa). Se evaluó el crecimiento y la formación de biofilm de dichas bacterias en distintas condiciones de potencial agua.

Debido a la mayor velocidad de crecimiento de *P. fluorescens* respecto de *E. meliloti* se probaron distintas condiciones de concentración del inóculo inicial. En conclusión las experiencias se ajustaron al siguiente diseño:

-3 Tratamientos: LB/2 (-0,25 MPa), LB/2 con NaCl (-1,0 MPa) y LB/2 con PEG 8000 (-1,0 MPa).

-Cada tubo conteniendo 0.8 ml de medio se inoculó de modo tal de partir de una DO inicial de 0,01 para *P. fluorescens* y 0,1 para cualquier cepa de *E. meliloti*.

-Cada réplica consistió de 6 tubos de Khan (12 x 75 mm) para cada tratamiento. Un tubo de cada tratamiento fue destinado al recuento de células en crecimiento y en biofilm.

-El revelado de la CFB en cada condición se realizó a las 24 hs de acuerdo al método de tinción con cristal violeta (CV) descrito por O'Toole y Kolter (1998) con modificaciones adaptadas al ensayo en tubo de vidrio.

4.9.1. Recuento de bacterias viables en biofilm y estado planctónico

Se determinaron las UFC en estado planctónico como en biofilm de las cepas rizobianas Rm1021, Rm8530, Rm8530 *expA*, Rm8530 *expAexoY*, Rm8530 *lpsB* y *Pseudomonas fluorescens* WCS417r, tanto en monocultivos como en co-cultivos. Luego del tiempo de incubación, las células libres de cada tubo fueron recolectadas y diluidas apropiadamente para determinar UFC/ml por siembra en los medios selectivos adecuados. Para la determinación del número de bacterias viables en los biofilm, los tubos se lavaron varias veces con solución fisiológica y las células adheridas se cosecharon mediante la adición de 1 ml de solución fisiológica estéril, algunas esferas de vidrio estériles (3mm de diámetro) y agitando con la ayuda de un vortex durante aproximadamente 1 m. Las células fueron transferidas a microtubos estériles, diluidas adecuadamente y sembradas en los medios selectivos apropiados.

4.10. Ensayos de autoagregación macroscópicos

Las bacterias fueron cultivadas en 2 ml de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes, e incubados durante 24 hs a 30°C. Posteriormente 100 µl

de los mismos fueron subcultivados en 100 ml de medio LB, e incubados durante 48 hs en las condiciones antes descriptas. Posteriormente, las suspensiones fueron transferidas a tubos de hemólisis (5ml) y mantenidas en reposo a 4°C durante 24 hs. Luego, de la zona superior de la suspensión cercana a la interfase aire-líquido, se extrajeron cuidadosamente 200 µl de suspensión, y se midió la DO_{600nm}. El porcentaje de autoagregación se calculó como $100 (1-DO_f/DO_i)$, donde DO_i corresponde a la DO₆₀₀ de la suspensión “inicial” y se determinó empleando una alícuota de uno de los tubos, previa agitación vigorosa del mismo; DO_f, es la DO_{600nm} de la alícuota tomada luego del período de sedimentación (sin previa agitación).

4.11. Caracterización de biofilms procedentes de rizósfera de alfalfa

4.11.1. Obtención del suelo

Se recolectaron muestras de suelo de 0-20 cm de diferentes puntos de un lote ubicado en una zona donde típicamente se cultiva alfalfa (localidad de Bulnes, 33°31'41''S, 64°39'00''O). El suelo fue acondicionado mediante homogeneización y tamizado para eliminar restos vegetales. Luego se transportó refrigerado al laboratorio. El mismo se dispuso en macetas (se agregó 2 kg en cada una de ellas), se sembraron semillas de alfalfa variedad Pampeana Córdoba, de forma tal que se refleje la típica densidad con la que se siembra a campo (25 Kg de semillas de alfalfa por hectárea, para ello se realizó el cálculo de la superficie de la maceta).

4.11.2. Generación de distintas condiciones de estrés

Se establecieron tres condiciones experimentales: Control (SRC: regado regularmente, % H final 13,4 %), Estrés por desecación (SRD: escaso riego, % H final 4,2 %) y Estrés Salino (SRS: NaCl 2,5 g por Kg de suelo, correspondiente a un suelo moderadamente salino, regado con una solución 42.7 mM, % H final 12,2 %). Las macetas fueron colocadas en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16/8 hs (luz/oscuridad) y a 24-28 °C.

4.11.3. Obtención de suelo rizosférico

Finalizado el tiempo de incubación, al cabo de 50 días (estadio de crecimiento F2, etapa de prefloración), se descalzaron las plantas y se obtuvo el suelo rizosférico (SR) para cada condición (SRC: Control; SRD: Desecación; SRS: Salino). El mismo se obtuvo por agitación de las raíces de las leguminosas en buffer fosfato pH 7,0 durante 1

hora a 100 rpm de acuerdo a la metodología descrita por Angle y colaboradores (1996). El aislamiento y recuento bacteriano fue realizado sobre las suspensiones de suelo rizosférico. Asumimos que las bacterias en estas suspensiones fueron representativas de las comunidades que forman los biofilms multiespecie en el suelo rizosférico asociado a las raíces de alfalfa. Las suspensiones fueron secadas y pesadas, de esta manera los resultados fueron expresados por gramo de suelo rizosférico seco.

En cada caso se siguió el siguiente esquema:

-Recuento de microorganismos viables asociados a suelo rizosférico en medio rico (Agar Nutritivo). Comparación en función del origen de cada población rizosférica.

-Aislamiento de cepas. De acuerdo al crecimiento en las placas de recuento de mayor dilución se aislaron 95 cepas por condición, representando a las cepas más abundantes de la comunidad.

-Evaluación global de la CFB en cada comunidad y agrupamiento en subpoblaciones de alta CFB (ACFB) y baja CFB (BCFB).

Para los tipos de comunidades bacterianas, provenientes de Suelo Rizosférico Control (SRC), Desecado (SRD) y salino (SRS), cada una consistente de 95 cepas, se obtuvo la CFBT (Capacidad Formadora de Biofilm Total) valor basado en mediciones obtenidas de 5 réplicas, mediante la metodología de microplacas de ELISA descrita por O'Toole y Kolter (1998). De acuerdo a la CFB de cada cepa se seleccionaron 15 cepas con alta CFB (ACFB) y 15 cepas con baja CFB (BCFB) para cada comunidad, para realizar la caracterización genotípica, como se describe a continuación.

4.11.4. Aislamiento y recuento bacteriano

Inmediatamente después de obtener las suspensiones bacterianas, se realizaron una serie de diluciones y se sembraron en placas con medio no selectivo Agar Nutritivo (AN), suplementado con 60 µg/ml de cicloheximida para inhibir el crecimiento fúngico; se realizaron tres réplicas para cada dilución. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 2-7 días, y por último fueron realizados los recuentos. El número de bacterias fueron expresadas en log base 10 de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo de suelo rizosférico seco. Por cada tratamiento, se aislaron un total de 95 colonias, obtenidas al azar de las placas con diluciones más altas, siendo éstas las bacterias más representativas de las comunidades rizosféricas. Las cepas seleccionadas fueron crecidas en medio LB hasta fase exponencial y luego fueron conservados a -80°C en una solución con 20% de glicerol.

4.11.5. Caracterización de comunidades rizosféricas de alfalfa por análisis del gen *ARNr 16S* mediante ARDRA (*Amplified rDNA restriction analysis*)

Un total de 90 cepas, 30 para cada comunidad por cada tratamiento, dividido en subpoblaciones de 15 cepas de ACFB y 15 cepas de BCFB, como se describió anteriormente, fueron caracterizadas por ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*). Se extrajo el DNA genómico de las bacterias utilizando el kit comercial de la firma *Fermentas*, siguiendo las instrucciones del mismo. Se utilizaron los primers fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'') (Weisburg y col; 1991) para la amplificación del gen *ARNr 16S* (condiciones de reacción: 35 ciclos de: 95°C 5 minutos, 95°C 1 minuto y 55°C 1 minuto. Un ciclo final de 72°C 2 minutos y 72°C 10 minutos). Se utilizaron alícuotas de productos de PCR (1500 pb) para ser digeridos con la endonucleasa de restricción *HaeIII* (Thermo Scientific/Fermentas) (Nievas y col., 2012). La digestión de los fragmentos fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 3% (p/v), teñido con bromuro de etidio (0.05 µg/ml), visualizado con luz UV y luego fotografiado. La identificación de cada ribotipo fue asociado con una digestión particular (*fingerprinting*). Se construyeron diagramas de estructura de comunidad basados en los ribotipos encontrados. Se seleccionaron los ribotipos más frecuentes en cada tratamiento y comunes a los tres para caracterizar por identificación filogenética a través del análisis del secuenciamiento del gen *ARNr 16S* y el estudio de características relacionadas a CFB.

4.11.6. Análisis de agrupamientos

Las distancias genéticas entre las subpoblaciones (ACFB y BCFB) de los tres suelos rizosféricos (SRC, SRD, SRS) fueron relacionadas a los ribotipos encontrados para cada condición, y se realizó un dendrograma. Se construyó una matriz binaria bidimensional usando un sistema de puntuación binario: 1 por presencia y 0 por ausencia de un ribotipo para una condición particular. Las distancias entre condiciones fueron evaluadas usando el índice de Jaccard. Los dendrogramas fueron construidos utilizando el *software* Infogen, usando el algoritmo UPGMA (Balzarini y col., 2003).

4.11.7. Análisis de secuencias de nucleótidos del gen *ARNr 16S*.

Se analizó la secuencia de nucleótidos del gen *ARNr 16S* de un total de 13 cepas bacterianas de tres tipos de suelos rizosféricos distintos (C3, C7, C12, C29 y C35

correspondientes a cepas de SRC; D1, D10, D29 y D32 de SRD; S2, S13, S36 y S37 de SRS) (Tabla 4). La PCR fue realizada con 1 µl de molde de DNA en 20µl de mezcla de reacción para PCR que contiene los primers universales 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3"). Los productos de PCR purificados (1400pbs) fueron secuenciados con un secuenciador automatico de DNA (modelo 3730XL, Applied BioSystems, USA) by Macrogen Inc. Laboratories (Seoul, South Korea). Las secuencias del gen 16S de RNA fueron analizadas usando el programa BLAST del NCBI. (*National Center for Biotechnology Information* <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul y col; 1997) para encontrar identidades entre secuencias.

4.11.8. Número de acceso de secuencias de nucleótidos

Las secuencias de nucleótidos de los genes de *ARNr 16S* de las cepas de rizósfera de alfalfa C3, C7, C12, C29, C35, D1, D10, D29, D32, S2, S13, S36 y S37 determinados han sido depositados en la base de datos de secuencias de nucleótidos de GenBank (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) bajo los números de acceso KF261554, KF261555, KF261556, KF261557, KF261558, KF261559, KF261560, KF430812, KF261561, KF261562, KF261564, KF261565, y KF261566, respectivamente. Estas cepas y sus números de acceso a GenBank están listados en la Tabla 4.

4.11.9. Estudio de características relacionadas a la CFB

Varios procesos fisiológicos relacionados a la CFB fueron evaluados en las cepas seleccionadas de los tres tratamientos de suelos rizosféricos de alfalfa.

4.11.9.1. Ensayos de autoagregación

Fueron realizados como fue descripto por Sorroche y colaboradores (2010). Cada cepa fue crecida en medio TY durante 24 hs a 28°C. Cinco ml de suspensión bacteriana fueron transferidos a tubos de vidrio (10x70 mm) y colocados en la heladera a 4°C por 24 hs. Una alícuota de 0,2 ml de la parte superior de la suspensión fue transferida a una microplaca y se midió la DO a 620 nm (DO final), también se realizó un tubo control, el cual fue vortexeado previo a tomar la alícuota (DO inicial). El porcentaje de autoagregación fue calculado como $100 [1 - (DO_{final}/DO_{inicial})]$.

4.11.9.2. Ensayos de movilidad

Se evaluó la movilidad de cada cepa (ensayos de *swimming*), visualizando los halos homogéneos generados por la movilidad de cada bacteria; se hizo por inoculación (punción en el centro) de una placa conteniendo medio TY reducido 1/10 con 0,3 % de agar (Nievas y col., 2012). Las placas fueron incubadas por tres días a 28°C y los diámetros de los halos se midieron en centímetros (indicadores de movilidad).

4.11.9.3. Análisis de la producción de EPS

Se ensayó cualitativamente la producción de EPS basado en el crecimiento de las cepas en medio LB conteniendo 0,2 % de calcoflúor blanco. La emisión de fluorescencia observada cuando se expone la placa con la bacteria crecida bajo luz UV, indica producción de EPS (Leigh y col., 1985).

4.11.9.4. Análisis de producción de moléculas de *quórum sensing*

La producción de moléculas de *quórum sensing* fue estudiada cualitativamente usando el biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026 para la detección de acil homoserin lactonas (AHLs), con cadenas de acilos cortas (McClellan y col., 1997) y el biosensor de *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) para la detección de AHLs con cadenas de acilos largas (Ferrand y col., 2002).

Para la determinación de AHLs de cadena corta se utilizaron placas de petri conteniendo una capa basal de medio LB sólificado con 1.5 % de agar y una capa superior, consistió en LB solidificado con una concentración de agar del 0.6 %, al cual se le adicionaron 50 µl de *C. violaceum* CV026 (crecido ON en LB) cada 5 ml de medio. Utilizando un sacabocados, se realizaron orificios de 6 mm en la capa superior y se sembraron los sobrenadantes de cultivo de las cepas a ensayar. Las placas se incubaron durante toda la noche (ON) a 30°C. Se evaluó como resultado positivo para la presencia de AHLs la difusión de un pigmento rojizo alrededor del pocillo de inoculación (Mc Clean y col., 1997).

Para la detección de AHLs de cadena larga se emplearon placas de petri conteniendo medio AB en dos capas de agar a diferentes concentraciones. La capa base contenía medio AB solidificado con 1.5 % de agar y adicionado con 40 µg/ml de X-Gal. La capa superior consistió de medio AB con 0.7 % de agar y también suplementado con X-Gal 40 µg/ml. A este último se le adicionaron 0.5 ml (cada 3 ml de AB), de un cultivo de la cepa reportera *A. tumefaciens* crecido ON a 45°C en medio AB (Chilton y

col., 1974). Las cepas a ensayar se sembraron sobre la superficie en pequeños puntos o parches y las placas se incubaron durante 24-48 hs a 30°C (Cha y col., 1998). La aparición de un halo azul alrededor de la colonia, debido a la hidrólisis de X-Gal, se interpretó como resultado positivo.

4.12. Evaluación de la estructura de los suelos

Se evaluó la influencia bacteriana sobre las propiedades físicas de los suelos de acuerdo al siguiente diseño: a) suelo control no tratado, b) suelo tratado con bacterias con alto potencial autoagregativo, *E. meliloti* Rm8530, y c) suelo tratado con EPSII purificado, empleado como posible molécula autoagregativa. Este procedimiento se hizo por triplicado y se realizó tanto en suelo sin plantas como en suelo con plantas de alfalfa. El suelo utilizado fue obtenido de un campo con historia previa de cultivos de leguminosas forrajeras (alfalfa), de la localidad de Bulnes, Córdoba. Se distribuyó en recipientes para 100 g de suelo y los tratamientos consistieron en llevarlos a capacidad de campo con agua y posteriormente mantenerlos como suelo control o inoculado con una suspensión bacteriana de Rm8530 lavadas y resuspendidas en agua estéril con 10^4 , 10^6 y 10^8 células/g de suelo o con una solución conteniendo EPS II purificado a 10, 50 y 100 $\mu\text{g/g}$ de suelo. Los recipientes fueron colocados en cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) (Condiciones de la cámara: 16 h con una intensidad de $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$) y a 24-28 °C. Finalizado el tiempo de incubación (40 días) el suelo de cada tratamiento se conservó por separado en oscuridad a temperatura ambiente, para posteriores análisis. Mediante el empleo de técnicas de tamizado del suelo, fueron evaluados y comparados los porcentajes de agregados formados, la distribución de éstos en fracciones y la estabilidad mecánica de los mismos. Los tamices empleados para este ensayo fueron de la marca *Zonytest*, cuyos tamaños de mallas fueron 10, 60 y 270 según norma ASTM (American Society of Testing Methods), que corresponden a 2000, 250 y 53 μm respectivamente. Luego se pasaron los 100 g de cada uno de los recipientes de cada ensayo por estos tamices, pesando las respectivas partes de suelo que fueron quedando en cada uno de ellos. Considerando suelo macro y microagregados según en que tamíz hayan quedado retenidos (macroagregados los que quedaron retenidos en el tamíz de 2000 micras y microagregados los que fueron retenidos en el de 250 y 53 micras) Cabe destacar que no se consideró suelo agregado a todo aquello que fue menor a 53 micrometros. Esa última parte fue desechada y no se consideró su peso.

4.12.1. Obtención de EPS II

Se siguió la metodología descrita por González y colaboradores (1996) con modificaciones. Se cultivaron las bacterias productoras de EPS II, *Ensifer meliloti* Rm 8530*exoY*, en medio TY *over night* (ON), con los antibióticos correspondientes para dicha cepa. Luego se extrajo una alícuota del cultivo para inocular el medio MGM (específicamente utilizado para la producción de EPS II, por parte de *S. meliloti*), se utilizaron 2 litros de medio en un erlenmeyer de 5 litros y se lo llevó a agitación a 200 rpm durante 7 días a 30°C. El cultivo fue centrifugado y luego el sobrenadante fue liofilizado. El producto resultante fue resuspendido en 20 ml de agua y precipitado con tres volúmenes de etanol. El precipitado fue resuspendido en 20 ml de agua y liofilizado nuevamente para remover la misma y por último se resuspendió lo obtenido en 100 ml de agua y se conservó a -20°C.

4.12.1.1. Determinación de carbohidratos totales mediante el Método de Antrona

Los métodos colorimétricos son útiles para estimar la cantidad de azúcares simples y sus polímeros. Los ensayos más convenientes para carbohidratos totales involucran calentamiento de las muestras con H₂SO₄ para hidrolizar los polisacáridos y deshidratar los monosacáridos para obtener las formas furfural e hidroximetilfurfural de las pentosas y hexosas respectivamente. Estas soluciones son luego tratadas con un reactivo aromático (antrona en este caso) para producir un compuesto coloreado que se puede medir espectrofotométricamente. Las pentosas, hexosas, heptosas y sus derivados, excepto aminoazúcares, reaccionan generando un producto coloreado, mientras que las triosas y tetrasas no.

El método de antrona así también como aquellos que utilizan fenol en lugar de antrona son los más utilizados por su simplicidad, rapidez y baja interferencia con otros componentes celulares, lo cual los convierte en los métodos de elección para la determinación de un índice confiable de carbohidratos totales. Para cuantificar la concentración de carbohidratos totales formando parte del EPS II extraído, se utilizó el método de antrona y se siguieron los siguientes pasos:

- Se prepararon soluciones estándares de glucosa de 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml y 80 µg/ml, con las cuales se realizó la curva de calibrado del método.
- Se preparó una solución de H₂SO₄ al 75% v/v, y un reactivo de antrona, para el cual se utilizó el ácido anteriormente nombrado.

➤ La reacción colorimétrica se llevó a cabo utilizando el producto obtenido previamente (EPS II), las soluciones estándares de glucosa y un blanco de reacción el cual contenía agua. Para ello se utilizaron diferentes tubos a los que se colocaron, en baño de hielo, 1 ml de las soluciones testigo, 1 ml de la muestra y 1 ml de agua para el control, luego se agregaron 5 ml de reactivo de Antrona frío a cada tubo y se mezclaron durante 5 minutos en frío. Estos fueron transferidos a un baño de agua a 100°C e incubados exactamente durante 10 minutos, fueron retirados y colocados nuevamente en hielo. Por último se midió la absorción a una DO de 625nm.

➤ Se preparó una curva de calibrado graficando DO corregida de cada patrón en función de la concentración de los mismos. La concentración de los carbohidratos totales de la muestra utilizada de EPS fue calculada usando la curva de calibrado.

4.13. Análisis estadísticos

Las experiencias fueron realizadas usando diseños aleatorizados y los valores obtenidos representan las medias de al menos tres repeticiones, dependiendo de los experimentos. Los datos se analizaron empleando el test de ANOVA con una comparación múltiple de variables por el test de Fisher 5 LSD considerando diferencia significativa un nivel de $P=0,05$. Para evaluar la relación general de los tratamientos, subpoblaciones, ribotipos, afiliaciones filogenéticas y características relacionadas a la CFB, se realizó un estudio multivariado con análisis de componentes principales (PCA) y diagramas de Venn. Todos los análisis estadísticos se evaluaron con el *software* Infostat 1.0 (Group Infostat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).



*5. RESULTADOS Y
DISCUSIÓN*

5.1. Ensayos de viabilidad bacteriana en arena:

5.1.1. Estrés hídrico:

Para estos ensayos, se utilizaron dos cepas silvestres y una mutante de *E. meliloti*, seleccionadas de acuerdo a la presencia del gen *expR* y a la capacidad de producir EPS II, molécula vinculada a la CFB de *E. meliloti* (Rinaudi y González, 2002). La cepa silvestre Rm8530 porta el alelo funcional de *expR* intacto y por lo tanto es capaz de producir EPS II, la mutante Rm8530 *expA* si bien tiene el gen *expR* tiene una mutación en el gen *expA3*, por lo tanto es incapaz de producir EPS II, y por último, la cepa silvestre Rm1021 presenta una copia del gen *expR* la cual está alterada, no es funcional debido a que tiene una inserción en el gen regulador (elemento *ISRm2011-1*), y es incapaz de producir EPS II (Pellock y col., 2002). En resumen, estas cepas fueron seleccionadas para dilucidar si la presencia activa del regulador *expR* contribuye o no a la supervivencia de las bacterias bajo condiciones de estrés. Estas cepas fueron sometidas a condiciones de estrés hídrico y la viabilidad de las mismas fue determinada por recuento en placa al inicio del ensayo, así como cuando transcurrieron 7, 20, 30 y 40 días. Los recuentos al inicio del ensayo fueron de 2×10^6 UFC/ml (0 días) para todas las cepas ensayadas, valor que se correspondió con la carga microbiana que se inoculó. Posteriormente, los recuentos en condiciones de estrés hídrico realizados en las cepas Rm1021, Rm8530 y Rm8530*expA*; mostraron que la cepa Rm8530 tuvo mayor capacidad de supervivencia a lo largo del tiempo respecto a las cepas no productoras de EPS II (Figura 6). Asimismo, la mutante Rm8530*expA* mostró un número significativamente mayor UFC que Rm1021 (Figura 6). Probablemente esta diferencia a lo largo del tiempo se deba a la producción de EPSII por parte de Rm8530, lo cual le daría mayor ventaja para sobrevivir en ambientes hostiles, como es en este caso la exposición al déficit hídrico. Estos resultados estarían en consonancia con la vinculación del EPSII con la capacidad de las cepas de *S. meliloti* de formar biofilms y de autoagregar (Rinaudi y Gonzalez, 2009, Sorroche y col., 2010), fenotipos ambos asociados a la supervivencia bacteriana en el ambiente.

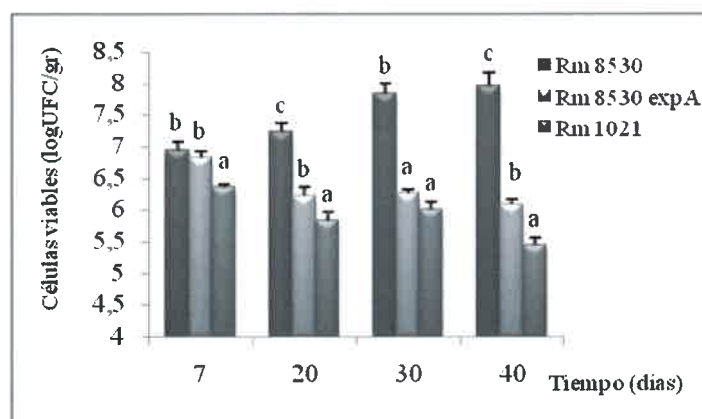


Figura 6. Supervivencia de tres cepas de *E. meliloti* en condiciones de estrés hídrico. Recuentos de células viables (log UFC/ml) a lo largo del tiempo (días), utilizando como matriz arena estéril. Se muestra la viabilidad de las cepas de *E. meliloti* Rm1021, Rm8530 y Rm8530expA, sometida a condiciones de desecación. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de las medias de 5 ensayos independientes con 3 réplicas cada uno. Para cada tiempo letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$), de acuerdo al test de Fisher LSD.

Rm8530 no solo tuvo la mayor capacidad de sobrevivir sino que también fue capaz de crecer en desecación (Figura 7 A), mientras que las cepas no productoras de EPS II, Rm1021 y Rm8530expA disminuyen su viabilidad (Figuras 7 B y 7 C). Como ya se explicó anteriormente tanto Rm8530 como Rm8530expA tiene el gen del regulador ExpR intacto, a diferencia de Rm1021, la cual tiene el gen interrumpido, esta diferencia es la que podría explicar los distintos comportamientos, por lo que podría especularse con que ExpR esté regulando otros procesos además de la síntesis de (Hoang y col., 2004). Tal lo observado en los ensayos de viabilidad en condiciones control vs condiciones de desecación (Figura 6), el efecto es mucho más marcado para la cepa de Rm1021, disminuyendo su viabilidad alrededor de 1 orden de magnitud al final del ensayo (40 días). En general las cepas mantienen su número (ni mueren, ni se duplican), en condiciones no estresantes (Figuras 7 A, 7 B y 7 C).

Las observaciones y resultados obtenidos anteriormente, sumados al antecedente de que ExpR controla la síntesis de ambos exopolisacáridos EPS I y EPS II (Hoang y col., 2004), constituyen una fuerte evidencia de la participación de los EPSs en la supervivencia de *E. meliloti* frente a situaciones de estrés.

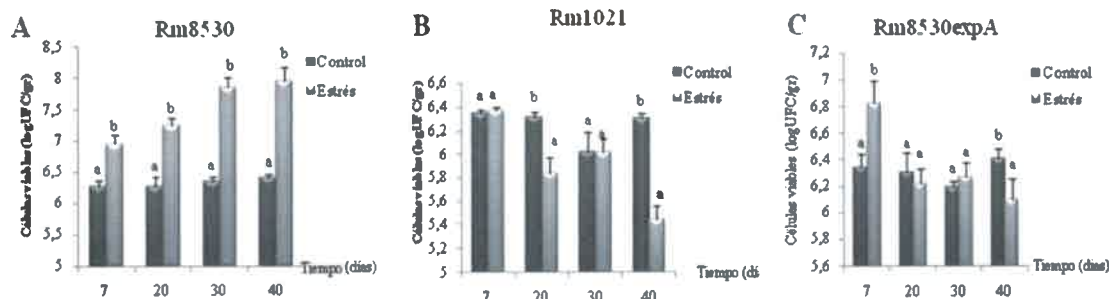


Figura 7. Supervivencia de distintas cepas de *E. meliloti* en condiciones de estrés por desecación y control sin estrés. Recuentos de células viables (log UFC/ml) a lo largo del tiempo (días), utilizando como matriz arena estéril. Se muestra la viabilidad de las cepas de *E. meliloti* Rm8530 (A), Rm1021 (B) y Rm8530expA (C), en condiciones de estrés hídrico y en condiciones control (no estresantes). Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de las medias de 5 ensayos independientes con 3 réplicas cada uno. Para cada tiempo, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$), de acuerdo al test de Fisher LSD.

Las mediciones del contenido de humedad (H) se llevaron a cabo tanto en tubos en los que se realizó el ensayo en estrés como en los tubos control tapados y sellados con parafilm para simular condiciones experimentales. Esto se realizó tanto para comprobar si realmente fue efectiva la forma en la que se llevó a cabo la experiencia, como para valorar la magnitud con la cual se estableció la condición estresante en función del tiempo (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentajes de humedad durante la experiencia del ensayo de viabilidad. Para cada cepa, se indica el % de H en función del tiempo, de los tubos sometidos a estrés y de los tubos control sin deshidratar.

Tiempo (días)	Rm 1021		Rm 8530		Rm8530 expA		Promedio Estrés (%)	Promedio Control (%)	% humedad perdido
	Estrés (%)	Control (%)	Estrés (%)	Control (%)	Estrés (%)	Control (%)			
0	22,10	22,10	23,10	23,10	19,70	19,70	21,63	21,63	0
7	8,16	15	8,60	15,30	8,60	17,70	8,45	16	11,55
20	4,00	15	4	15,50	6	16	4,67	16	11,33
30	3	15	3,50	16	5	15	4	15	12
40	0,40	16	0,30	16,50	0,40	16	0,37	16	15,63

La pérdida de agua lleva a la acumulación de sales y otros compuestos que causan estrés osmótico y salino. Estos compuestos pueden alcanzar niveles tóxicos que llevan a disminuir la viabilidad celular. Asimismo, cuando disminuye la actividad de agua, cesa la actividad de la RNA polimerasa y el metabolismo se detiene (Brown, 1990). Para contrarrestar dichos efectos, la bacteria ajusta su fisiología hacia la acumulación de ciertos compuestos, incluyendo osmoprotectores y solutos compatibles, como así también hacia la síntesis de EPS (Halverson y col., 2004) que le permiten aumentar la supervivencia frente a la desecación. Asimismo, un aumento en la presión osmótica por presencia de sales resulta en un incremento en la producción de succinoglicano (EPS I) de HMW sobre el de LMW (Breedveld y col., 1991). Estas observaciones sugieren que la producción de EPS es dependiente de NaCl en *S.meliloti*, lo cual llevaría a la producción de succinoglicano de HMW y consecuentemente a un incremento de la supervivencia durante la etapa de desecación. Ruberg y colaboradores (2003), demostraron que diferentes genes involucrados en la síntesis de EPS I son regulados positivamente durante el estrés salino. Por otro lado Rinaudo (2004) ha demostrado que la conformación estructural del succinoglicano es independiente de la concentración iónica, lo cual significa que el efecto se corresponde al estrés osmótico generado por la sal y que existiría una posible protección por parte del succinoglicano durante la desecación mediada por NaCl. Dominguez-Ferreras y colaboradores (2007) encontraron que la principal respuesta al NaCl resulta en la inducción de genes productores de succinoglicano y determinaron que los genes involucrados en la producción de succinoglicano de HMW afectarían positivamente la supervivencia, mientras que las enzimas involucradas en la producción de succinoglicano LMW tendrían un efecto negativo sobre la viabilidad.

Muy importante de destacar, es que a medida que progresó la exposición al estrés hídrico (30 y 40 días), las características de algunas colonias de la cepa Rm1021 (las cuales en condiciones normales tienen fenotipo seco debido a su incapacidad para producir EPS II) sufrieron un cambio fenotípico de colonias secas a mucosas.

Tal observación resultó sumamente interesante, tomando en consideración que la aparición de colonias con fenotipo mucoso claramente podría representar una estrategia adaptativa a las condiciones estresantes impuestas por el medio. Por lo tanto se procedió a la identificación de tales colonias, las mismas fueron aisladas y cultivadas en el medio

TY con sus antibióticos correspondientes e incubadas en las mismas condiciones descritas en materiales y métodos. Después de 48 horas, se observó que las mismas retornaron a su fenotipo seco, con lo cual podría inferirse que la aparición del fenotipo mucoso se dio por una situación de exposición al estrés al cual fueron sometidas, posiblemente debido a un fenómeno de reversión de fase.

Los resultados obtenidos confirmaron que, la mayoría de las colonias aisladas con fenotipo mucoso se trataban de Rm1021 y no de algún contaminante, indicando la existencia de mecanismos de adaptación tal lo descrito previamente.

Para descartar posibles contaminantes y para verificar que dichas cepas correspondían a Rm1021 se procedió a amplificar el gen *expR*. En todas las reacciones de PCR llevadas a cabo, se incluyeron como controles a las cepas Rm1021 y Rm8530, que dan productos de amplificación de 2.2 Kb (*expR* interrumpido por un elemento de inserción) y 0.9 Kb (copia intacta), respectivamente (Pellock y col., 2002). Como se puede observar la banda correspondiente a las calle A7 coincide con la de la cepa Rm 1021 (2.2 Kb), por lo tanto esta cepa se habría adaptado a las condiciones estresantes expuestas (Figura 8). Por otro lado a las cepas A2, A3 y A5 les corresponde una sola banda de 0.9 Kb, esto explicaría que se habría eliminado el elemento insercional que interrumpe el gen regulador *expR*, para poder así permitir la sintestis de EPS II, relacionado al fenotipo mucoso y a una mayor supervivencia, y por último para las cepas A1, A4, A8 y A9 se observan dos bandas (0.9Kb y 2.0 Kb), éstas estarían en el inicio de su transformación o adaptación a la situación estresante. Éstos resultados nos brindan elementos suficientes para especular que ciertas colonias de Rm1021 podrían modificar su estructura génica a los fines de cambiar su fenotipo para adaptarse a las condiciones estresantes del medio. Estos resultados quedan pendientes de ser explorados con mayor profundidad para dilucidar el mecanismo de adaptación.

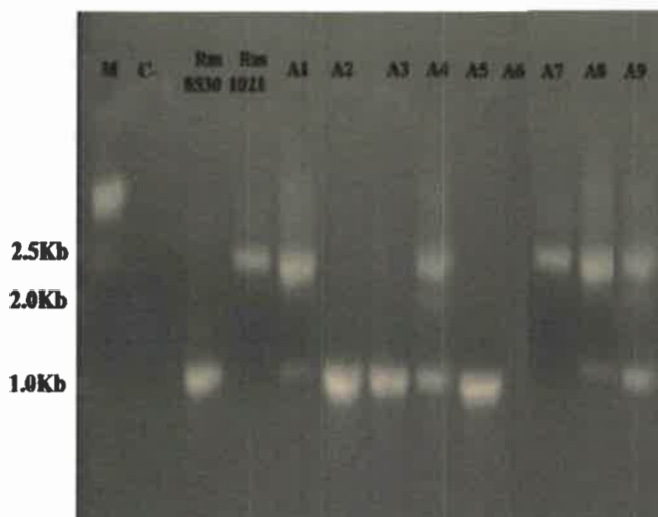


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa (0.8% p/v) de los productos de amplificación por PCR del gen *expR*. Como controles se incluyeron las cepas Rm1021 y Rm8530, cuyos productos de amplificación tiene 2.2 Kb y 0.9 Kb, respectivamente. La calle identificada como “M” contiene un marcador de peso molecular (1-Kb Promega). C corresponde al control negativo. Las calles A1 a A9 corresponden a cepas de Rm1021 con fenotipo mucoso.

5.1.2. Estrés salino:

De manera similar a lo detallado para el ensayo de estrés hídrico, se procedió aplicando un estrés salino y verificando la viabilidad de las cepas Rm1021, Rm8530 y Rm8530*expA* en función del tiempo y de las concentraciones de NaCl.

En otros trabajos se vió que *E. meliloti* es capaz de tolerar mayores concentraciones de NaCl que otros rizobios y puede crecer en un amplio rango de concentraciones, que van desde 0 a 650 mM NaCl (Breedveld y col., 1990, Le Rudulier y Bernard, 1996). En nuestra experiencia se determinó la capacidad de supervivencia de tres cepas de *E. meliloti* en concentraciones de NaCl que oscilaron entre 155 y 430 mM.

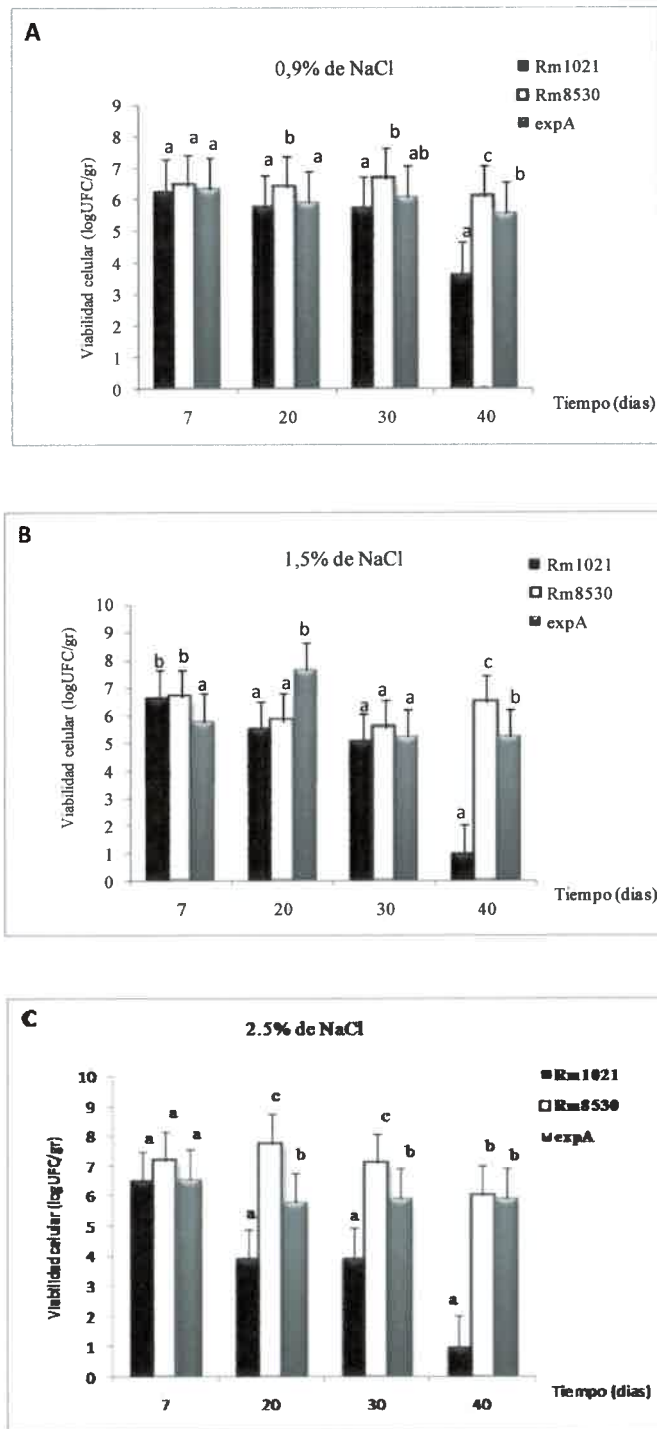


Figura 9. Supervivencia de cepas de *E. meliloti* en condiciones de estrés salino. Recuento de células viables (UFC) de *E. meliloti* Rm1021, Rm8530 y Rm8530expA en condiciones de estrés salino: A 155 mM (0.9%) NaCl B 260 mM (1.5%) NaCl C y 430 mM (2.5%) NaCl, utilizando como matriz arena estéril. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de 5 ensayos independientes con 3 réplicas cada uno. Para cada tiempo letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$), Fisher LSD.

Como se puede observar en la Figura 8, las cepas Rm8530 y Rm8530*expA*, mantuvieron la viabilidad celular, mientras que la cepa Rm1021 redujo su supervivencia en casi dos órdenes de magnitud a tiempos elevados de exposición al estrés salino. Vriezen y colaboradores (2006) observaron que la presencia de NaCl disminuye la supervivencia de rizobacterias durante la desecación en el suelo, en semillas inoculadas y también en ensayos realizados *in vitro*. Cabe destacar que la cepa Rm1021 tuvo una mejor capacidad de supervivencia cuando la concentración de NaCl fue de 155 mM (0.9 %); mientras que la exposición a altas concentraciones de NaCl 260 mM y 430 mM (1.5 % y 2.5 % respectivamente) determinó una marcada disminución de la viabilidad celular (Figuras 9 B y 8 C), siendo el efecto muy marcado al tiempo final del ensayo (40 días), con reducciones de alrededor de 5 órdenes de magnitud (Figura 9). Este resultado contrasta con el observado para Rm8530 y Rm8530*expA* en cuyos casos la exposición al estrés salino no determinó grandes cambios en la viabilidad (Figuras 9 y 10 B y 10 C). Esto se podría explicar por el efecto protector que tiene el EPS II, pero solo cuando se trata de la cepa Rm8530, ya que es la única de las tres capaz de producir este exopolisacárido. Evidentemente existe un efecto independiente del EPS II, regulado posiblemente por algún mecanismo de tipo global del regulador ExpR presente en Rm8530 y Rm8530 *expA*, pero ausente en Rm1021.

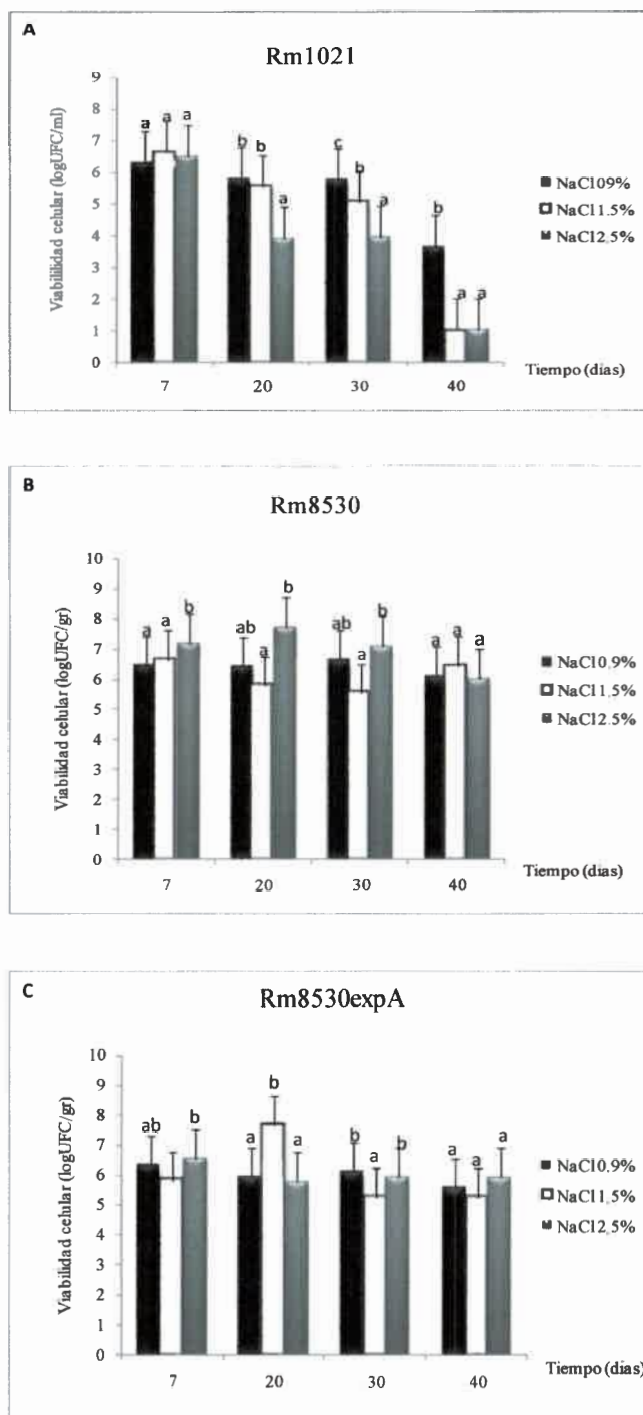


Figura 10. Supervivencia de las cepas Rm1021, Rm8530 y Rm8530expA de *E. meliloti* en condiciones de estrés salino. Recuento de células viables de Rm1021(A), Rm8530 (B) y Rm8530expA (C) en concentraciones de de 155 mM (0.9%), 260 mM (1.5%) NaCl y 430 mM (2.5%), usando como matriz arena estéril. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de las medias de 5 ensayos independientes con 3 réplicas cada uno. Para cada tiempo letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$), Fisher LSD.

Estudios previos determinaron que en condiciones salinas la capacidad formadora de biofilm relativa en Rm8530 disminuyó aproximadamente 4 veces con respecto del control (sin el agregado de NaCl) (Sorroche, 2011). Dicho efecto inhibitorio del NaCl no fue evidente en la cepa no productora de EPS II, Rm8530*expA*.

En el mismo sentido, el efecto del NaCl en la formación de biofilms fue previamente abordado por Rinaudi y colaboradores (2006). En este caso, se emplearon las cepas de *E. meliloti* Rm1021, Rm2011, Rm2011*exoY*, todas ellas incapaces de producir EPS II en condiciones normales. Bajo esas condiciones experimentales, y en presencia de NaCl, se observó disminución de la formación de biofilms en las 3 cepas. En concordancia con esto podemos observar que la cepa Rm1021, sufrió una gran disminución de su capacidad de supervivencia a través del tiempo en casi 5 órdenes de magnitud (Figuras 9 y 10). Esta disminución en la supervivencia de Rm 1021 estaría relacionada con su disminución en la CFB. Podría inferirse que el EPS II sería crucial para ambos procesos, no obstante no se observaron diferencias de supervivencia entre Rm8530 y Rm8530 *expA*, por lo cual el mecanismo sería independiente de la síntesis de EPS II. Lloret y colaboradores (1998), estudiaron la regulación de la producción de EPS II ejercida por NaCl en *E. meliloti* EFB1, una cepa caracterizada como halotolerante, aislada de nódulos de plantas de alfalfa de una ciénaga salinizada. Colonias de EFB1 creciendo en condiciones de 300 mM de NaCl, mostraron una disminución de la mucosidad y de la cantidad de exopolisacáridos, respecto de la cepa cultivada en condiciones control. Por otra parte, la expresión de *expE*, un gen involucrado en la síntesis de EPS II, disminuyó en condiciones salinas. Miller-Williams y col. (2006) informaron que el alelo *expR*⁺ otorga sensibilidad al NaCl, y que iones como Mg⁺⁺ y K⁺, (pero no otros como Li⁺ o Ca⁺⁺, ni tampoco agentes osmóticamente activos como PEG) pueden revertir la mucosidad de una cepa *expR*⁺. Sin embargo y en contraste con estos antecedentes, la mucosidad de la cepa Rm8530 no cambió en ninguno de los ensayos de estrés llevados a cabo en el presente trabajo como tampoco de supervivencia.

El estrés osmótico es generado por la abundancia de solutos, en cambio la desecación resulta de la falta de agua disponible. Sin embargo existe información que indica una relación entre ambos tipos de estrés. Las cepas de *Rhizobium* difieren en su capacidad para responder a un aumento en la presión osmótica, o estrés salino. Después

de un estrés osmótico, en general el metabolismo disminuye (Dominguez-Ferreras y col., 2006). En este sentido ha sido descrito que los genes involucrados en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, en la cadena respiratoria, y los genes ribosomales son reprimidos. Interesantemente, el 25% de todos los genes regulados específicamente por el NaCl son de proteínas ribosomales. El estrés osmótico altera, en las células bacterianas, estructuras macromoleculares, incluyendo largas cadenas como EPS y LPS. En estos ensayos se observó la disminución de la supervivencia en la cepa de *E. meliloti* Rm1021, en este sentido la presencia de ExpR intacto en Rm8530 y Rm8530 *expA* sería responsable de la supervivencia en ambas cepas, y no así en Rm1021, ya que la misma, como ya se ha mencionado anteriormente, tiene el gen regulador interrumpido por una inserción.

Mary y colaboradores (1986) encontraron un aumento de 5.5 veces en la supervivencia de una cepa *E. meliloti* RCR2011, crecida en el medio YMB en 530 mM NaCl. Breedveld y colaboradores (1990) y Le Rudulier y Bernard (1996), observaron que *E. meliloti* es capaz de tolerar mayores concentraciones de NaCl que otros rizobios en rangos que van desde 0 a 650 mM NaCl. Esto concuerda con los resultados observados en este ensayo para las cepas Rm8530 y Rm8530 *expA*, las cuales tienen la capacidad de sobrevivir a lo largo del tiempo en distintas concentraciones de NaCl (Figura 10 B y 10 C).

A diferencia de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se determinó que la exposición a 400 mM de NaCl o KCl incrementó la supervivencia frente a la desecación en *E. meliloti* Rm1021, comparado con el crecimiento en el medio solo (Vriezen y col., 2006), Estas observaciones indican que (i) el estrés con cloruro induce una respuesta en combinación con los nutrientes del medio, (ii) la respuesta es cepa específica, (iii) el incremento de la supervivencia durante el estrés osmótico es poco probable que sea causado por una protección externa por los solutos, y (iv) es fisiológico en origen. No obstante, los resultados aquí mostrados refieren a la capacidad de las cepas de sobrevivir en un soporte inerte como es la arena que se aproxima más a las condiciones ambientales naturales y que pueden generar diferentes mecanismos de adaptación.

5.2. Capacidad de formar biofilms (CFB) por rizobacterias en condiciones de estrés hídrico y salino.

Este ensayo se realizó a los fines de obtener conocimiento sobre distintas bacterias rizosféricas comunes en la microflora. Las bacterias seleccionadas fueron una cepa del género *Pseudomonas* y *E. meliloti* Rm1021 y Rm8530. Como se mencionó antes, la primera tiene una inserción en el gen del regulador ExpR y no es capaz de producir EPS II, mientras que *E. meliloti* Rm8530 tiene el gen del regulador intacto y sintetiza EPS II, molécula excretada por la bacteria crucial para la formación de biofilm (Rinaudi y González 2009), con característica autoagregativa (Sorroche y col., 2011) y posiblemente cumpliría una función protectora frente a las condiciones adversas imperantes en el suelo. Para determinar si la presencia de EPS II y/o del gen regulador ExpR causan algún efecto frente estrés, se utilizó la mutante Rm8530 *expA* que posee el gen *expR* intacto pero debido a una mutación en el gen *expA3* no tiene capacidad de producir EPS II. Otra cepa utilizada fue Rm8530 *lpsB* incapaz de producir LPS. La mutación de *lpsB* impide que se sintetice correctamente el *core* y esta asociada a un retraso en la aparición de nódulos en alfalfa, habilidad demorada o reducida para nodular la raíz principal, y menor competitividad respecto de la cepa silvestre, con lo cual se plantea interesante determinar cuál es su comportamiento frente a las condiciones de estrés planteadas en este ensayo. La doble mutante Rm8530 *expAexoY* es incapaz de producir tanto EPS I como EPS II por lo tanto es relevante tener conocimientos sobre su aptitud frente a las condiciones de estrés expuestas, ya que nos brinda información de la importancia de los EPSs frente a estas condiciones. Por último se ensayó *Pseudomonas fluorescens* WCS417r cuya característica es ser un organismo PGPR que tiene incidencia sobre el crecimiento vegetal (Bhattacharyya, 2012).

Trabajos previos han utilizado solutos no permeables como el PEG y solutos como el NaCl para reducir la actividad agua observándose que los microorganismos utilizan distintos mecanismos de supervivencia en presencia de distintas condiciones de reducción del potencial agua (Cytryn y col., 2007).

En el presente trabajo las tres condiciones elegidas para realizar este ensayo fueron: control, LB/2 sin el agregado de solutos cuyo potencial es -0.25 MPa, o -1.0 MPa por el agregado de xx mM de NaCl o 22.5 % de PEG al medio LB/2. Se determinó que potenciales menores de -1.0 MPa no generan cambios significativos sobre los parámetros evaluados.

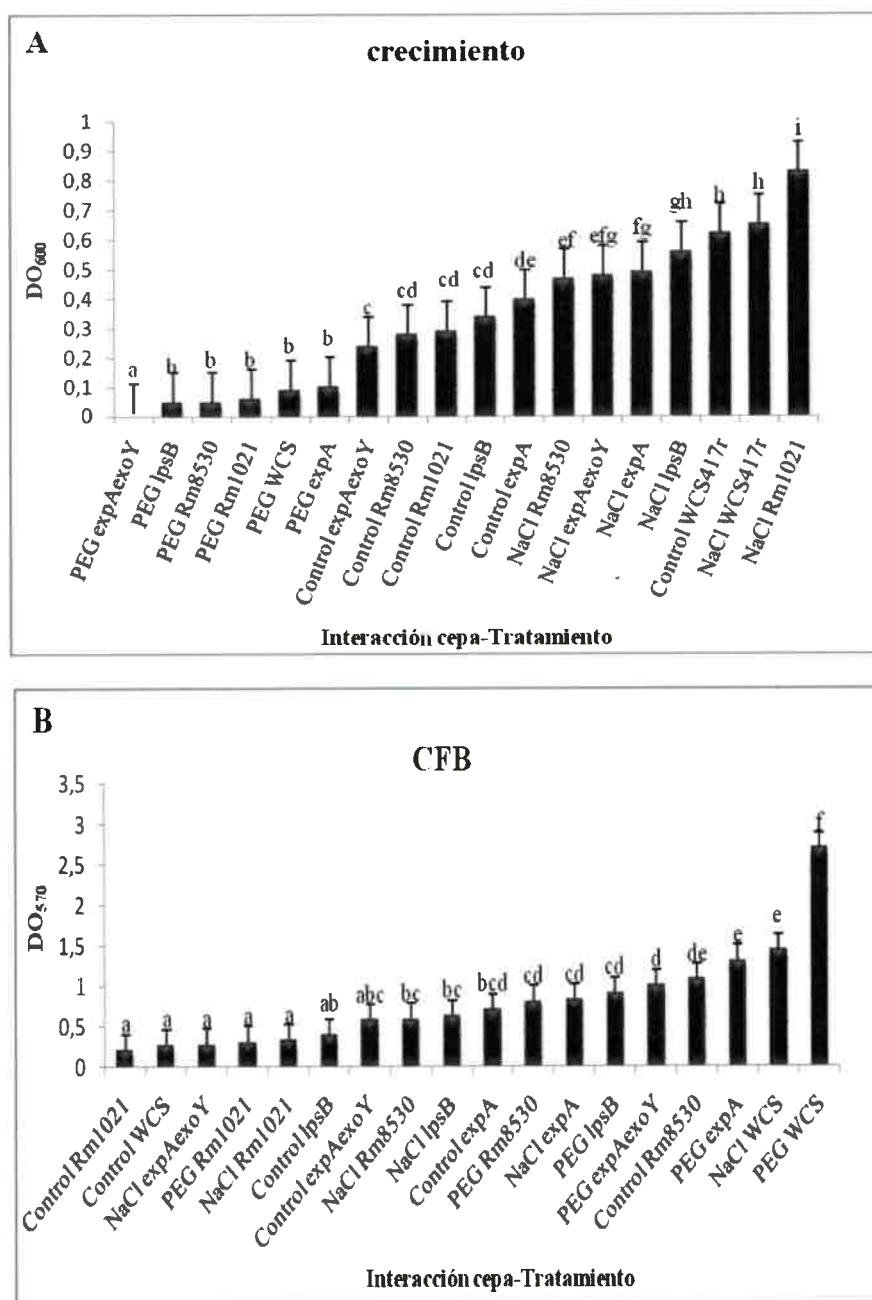


Figura 11. Crecimiento (A) y CFB (B) de las cepas WCS417r, Rm8530, Rm1021, Rm8530 *lpsB*, Rm8530 *expA* y Rm8530 *expAexoY* bajo estrés osmótico de -1.0 MPa inducido por NaCl y PEG. Los resultados representan la media y la desviación estándar de 5 repeticiones por tratamiento (n=5). Para cada barra, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las interacciones cepa-tratamientos. (P<0,05), de acuerdo al Test de Fisher LSD.

En general, se determinó que la adición de NaCl al medio de cultivo no afectó el crecimiento de *P. fluorescens* mientras que promovió el crecimiento de la mayoría de las cepas de *E. meliloti*. El agregado de soluto no permeable afectó severamente la

capacidad de crecer *in vitro* de las seis cepas bajo estudio (Figura 11 A). Esto podría deberse a que las bacterias presentan diferentes mecanismos para combatir la disminución del ψ por presencia de sal como la acumulación de solutos compatibles (estrés osmótico salino) (Zahran, 1999). Estos mecanismos no serían cruciales para permitir el crecimiento en medios osmóticamente equivalentes conteniendo solutos impermeables (estrés osmótico mátrico).

La CFB se incrementó en presencia de solutos para *P. fluorescens* WCS, siendo muy marcado el efecto en presencia de PEG respecto de NaCl y menos notorio para las cepas Rm8530 *expA*, la doble mutante, Rm 8530 y la mutante en LPS.

En otros trabajos se determinó que la formación de biofilm en *Pseudomonas aeruginosa* es el resultado de un crecimiento bajo condiciones limitadas de nutrientes (Piciooreanu y col., 1998; Wimpenny y Colasanti, 1997), y que el desarrollo estructural de los biofilms en esta bacteria es dependiente de la fuente de carbono presente en el medio (Klausen y col., 2003). Woo-Suk Chang y col, (2003) observaron que la formación de biofilms en *Pseudomonas* se ve influenciada por la disponibilidad de agua; en cuyo caso la reducida disponibilidad de la misma afecta la morfología, fisiología celular y la tasa de crecimiento; factores que a su vez influyen en el desarrollo de biofilms y en sus propiedades, indicando que en un medio con reducido potencial agua aumenta la transición del modo de vida planctónica a una vida desarrollada formando biofilm, lo cual podría representar una estrategia de supervivencia, ya que este tipo de vida les provee mayores ventajas en medios adversos (Rinaudi y col., 2006).

Por otra parte, para la cepa Rm8530 se redujo la formación de biofilm en presencia de soluto en relación al control; mientras que para Rm1021 el agregado de soluto no modificó la baja capacidad de adherirse al soporte (Figura 11 B). Para la mutante LpsB la presencia de NaCl no afecta el crecimiento, pero si se observa que PEG disminuye el mismo y aumenta su CFB, esto es debido al rol diferente que tiene el LPS frente a distintas condiciones de estrés. Por otra parte la mutante Rm8530*expA* aumenta su CFB frente a NaCl y PEG, probablemente como resultado de la utilización de un mecanismo independiente del EPS II en presencia de NaCl y de PEG, podría inferirse que el EPS I tiene mayor importancia en estas condiciones. Su crecimiento se vió muy afectado en presencia de PEG, como sucedió en todas las cepas. La doble mutante (Rm8530*expAexoY*) disminuyó su CFB en NaCl y aumentó en PEG respecto

del control, contrariamente el crecimiento se vió favorecido en NaCl y perjudicado en presencia de PEG, podría deberse a la utilización de un mecanismo independiente de EPS I y EPS II, para la formación de biofilm en PEG. Por otra parte para la cepa mutante de *E. meliloti* Rm8530 *lpsB* se redujo casi cinco veces el crecimiento en presencia de PEG respecto del NaCl, mientras que su CFB fue casi el doble en las mismas condiciones (Figura 11 A y 11 B). Evidentemente la mutación en este locus le provoca desventajas para crecer en condiciones estresantes por lo tanto se adopta la supervivencia en forma de biofilm. La mutación en *lpsB* hace particularmente interesante a esta cepa bacteriana para su estudio. En primer lugar como *lpsB* es un gen estructural relativamente bien caracterizado que codifica para una enzima que ha sido involucrada única y exclusivamente en la síntesis de LPS (Lagares y col., 1992; Lagares y col., 2001), los efectos observados podrían ser atribuidos en principio a la presencia de un *lps* aberrante en la envoltura bacteriana.

Lee y colaboradores (2010) describieron una mutante de *B. japonicum* con un LPS sin AgO mostró una mayor formación de biofilms sobre un soporte plástico. Sin embargo, una mutante en el lípido A del LPS en *Rhizobium leguminosarum* no tuvo efecto en la cantidad de biomasa sésil adherida al plástico, pero se verificó un aumento en las interacciones laterales entre los bacilos y la superficie (Vanderlinde y col., 2009).

Finalmente, resulta muy interesante la relación obtenida entre células sésiles (formando parte del biofilm) y células planctónicas (en vida libre) que es útil como parámetro del estilo de vida predominante en una condición dada. En este sentido, adquiere especial relevancia el efecto observado en condiciones de estrés mátrico (PEG), en cuyo caso se observa claramente que la mayor parte de la biomasa se encuentra formando parte de un biofilm en comparación a las células libres. Es decir, la población de bacterias prácticamente no crece, no aumenta en número, sino que se establece como una población asociada bajo un estilo de vida en biofilm, probablemente como estrategia para mejorar la supervivencia en esa situación de estrés.

No obstante, la observación obtenida mediante este resultado es indirecta (mediciones de DO), pudiendo no necesariamente corresponderse con unidades celulares sino que también pueden influir la presencia de otros componentes celulares, principalmente EPSs. En función de esto, se procedió a cuantificar UFC ml⁻¹ en cada fracción celular para arribar a conclusiones más contundentes.

En general, los recuentos de células planctónicas (crecimiento) de cada cepa en cada condición (Tabla 3), se ajustan a los resultados obtenidos por medición de DO, confirmando (i) el efecto en la reducción de la capacidad de crecer en presencia de PEG para *P. fluorescens* WCS, (ii) los mayores valores de UFC ml⁻¹ para WCS respecto de ambas Rm en condiciones control de baja osmolaridad (LB/2, ψ -0,25 MPa) y (iii) el efecto estimulador del NaCl en el crecimiento de ambas Rm. Del mismo modo, los recuentos de células en biofilm confirman los resultados obtenidos por mediciones de DO del CV (cristal violeta); el agregado de soluto (principalmente PEG) aumentó el número de células en biofilm, principalmente en WCS y en menor medida para las cepas de *E. meliloti* (Tabla 3). Los porcentajes de eficiencia (% Ef, Tabla 3) hacen referencia a la fracción de células sésiles respecto de células totales y marcan una elevada tendencia de *P. fluorescens* a optar por el estilo de vida en biofilm en condiciones de estrés mátrico y en menor medida para las cepas de *E. meliloti*. En concordancia con estos resultados, se han utilizado sustratos no permeables como el PEG y solutos permeables como el NaCl para reducir la actividad agua del medio, observándose que los resultados en ambas condiciones es distinto, es decir, que los microorganismos utilizan distintos mecanismos de supervivencia en presencia de distintas condiciones de reducción del potencial agua (Cytryn y col., 2007).

Tabla 3. Recuentos de células en crecimiento (RC) y en biofilm (RB) de las cepas WCS417r, Rm1021 y Rm8530 en medio LB con -1.0 MPa inducido por NaCl o PEG.

	WCS417r			Rm1021			Rm8530		
	RC	RB	% Ef	RC	RB	% Ef	RC	RB	%Ef
LB/2	1,45 x 10 ⁹	1,62 x 10 ⁷	1,11	1,55 x 10 ⁸	4,83 x 10 ^{6*}	2,96	1,65 x 10 ⁸	1,54 x 10 ⁷	4,42
NaCl	5,14 x 10 ⁹	5,07 x 10 ⁷	0,93	2,62 x 10 ^{9*}	1,92 x 10 ⁷	0,90	1,77 x 10 ^{9*}	1,28 x 10 ⁷	0,70
PEG	5,27 x 10 ^{8*}	3,20 x 10 ^{8*}	34,05	4,18 x 10 ⁸	2,47 x 10 ⁷	5,73	4,51 x 10 ⁸	3,32 x 10 ⁷	0,13

Los valores corresponden a UFC ml⁻¹ al cabo de 24 hs de crecimiento y representan la media de 3 repeticiones por tratamiento.

RC: Recuento de células planctónicas. RB: Recuento de células sésiles. % Ef.: (RB x 100) / RT. RT: Recuento total (RC + RB).

Para cada tratamiento (*) indica diferencias estadísticamente significativas, (p<0.005), de acuerdo al Test LSD Fisher.

Es necesario destacar que para el conjunto de cepas silvestres y mutantes en genes reguladores (*expR* y *mucR*) y estructurales (*expA* y *exoY*) involucrados en la síntesis de EPS, existe una clara conexión entre los fenotipos de autoagregación y la formación de biofilms (Rinaudi y González, 2009) y la tendencia a la adsorción a raíces:

las cepas fuertemente autoagregativas, buenas formadoras de biofilms son las que se adsorbieron a las raíces en mayor número (Sorroche y col., 2011). Es claro entonces que los mecanismos de interacción bacteria-planta que resultan en la unión del rizobio a la raíz, no son los mismos que aquellos que operan en las interacciones bacteria-bacteria, ya sea en el contexto de un biofilm o bien en células planctónicas agregadas (Sorroche., 2011)

El gen *expA3* (Rm8530*expA*) ha sido propuesto como una glucosiltransferasa involucrada en la síntesis de EPS II (Becker y col., 1997). Las mutantes *expA* son incapaces de producir este exopolisacárido y muestran un fenotipo de colonias secas cuando son cultivadas en medio sólido (Glazebrook y Walker, 1989). En el caso de la mutante Rm8530 *expA* se observó que el crecimiento aumentó proxímadamente en 7 órdenes en medio con NaCl respecto del medio con el agregado de soluto no permeable, mientras que la CFB fue aproximadamente igual en ambos casos, esto nos indica que la incapacidad para sintetizar EPS II no le permite a la bacteria crecer en condiciones estresantes generadas por el soluto no permeable, con lo cual adopta un modo de vida en biofilm (Figura 11 A y 11 B). Podría decirse que al no excretar EPS II la bacteria no se encuentra “protegida” en presencia de PEG, por ello tiende a formar biofilm, pero utiliza un mecanismo distinto cuando el estrés esta dado por la presencia de NaCl, ya que su crecimiento se vio muy aumentado.

Por último para el caso de la doble mutante Rm8530*expA**exoY* el crecimiento fue mayor en el medio con el agregado de NaCl y disminuyó casi a la mitad en presencia de PEG respecto al control (Figura 11 A). De acuerdo a este resultado se podría decir que la ausencia de EPSs afecta el crecimiento de la bacteria en condiciones estresantes, por lo tanto podríamos caracterizar al mismo como un producto extracelular “protector” que le brinda ventajas a la bacteria en condiciones adversas. La CFB aumentó casi dos veces en PEG y disminuyó con el agregado de NaCl; en el control la CFB fue casi el doble respecto del medio con el agregado de NaCl. De algún modo el soluto permeable afecta al metabolismo de la bacteria y esta no puede protegerse y por lo tanto aumenta su CFB en PEG y en LB solo, pero no así en medio con el agregado de NaCl. Esto podría deberse a que las bacterias presentan diferentes mecanismos para hacer frente a la disminución del ψ por presencia de sal (estrés osmótico salino) (Zahran, 1999), los cuales no serían cruciales para permitir el crecimiento en medios osmóticamente equivalentes pero sí en presencia de solutos impermeables (estrés mátrico). Esto también podría indicar que en un medio con reducido potencial agua aumenta la

transición del modo de vida planctónica a una vida desarrollada formando biofilm, lo cual podría representar una estrategia de supervivencia, ya que este tipo de vida les provee mayores ventajas en medios adversos (Rinaudi y col., 2006). Woo-Suk Chang y col. (2003) observaron que la formación de biofilms en *Pseudomonas* se ve influenciada por la disponibilidad de agua; en cuyo caso la reducida disponibilidad de la misma afecta la morfología, fisiología celular y la tasa de crecimiento; factores que a su vez influyen en el desarrollo de biofilms y en sus propiedades.

5.3. Autoagregación de células planctónicas de cepas de *E. meliloti* Rm8530, Rm8530 *expA*, *Pseudomonas fluorescens* WCS417r y un cultivo mixto de *E. meliloti* y *Pseudomonas*.

Suspensiones de *E. meliloti* Rm8530, Rm8530*expA* y *P. fluorescens* WCS417r fueron crecidas durante 48 hs e incubadas durante 24 hs en reposo en las condiciones descritas en Materiales y Métodos, (Figura 12).

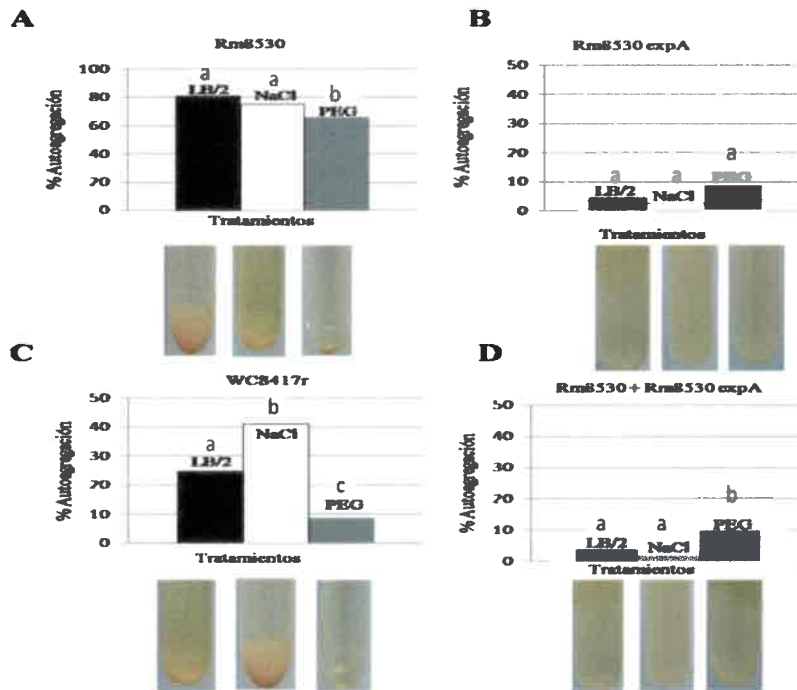


Figura 12. Efectos del estrés osmótico de -1.0 MPa inducido por NaCl y PEG en la autoagregación de rizobacterias. A). Porcentaje de autoagregación de *E. meliloti* Rm8530 en LB/2, NaCl -1.0 MPa y PEG -1.0 MPa. B). Porcentaje de autoagregación de *E. meliloti* Rm8530 *expA* en LB, NaCl -1.0 MPa y PEG -1.0. C). Porcentaje de autoagregación de *P. fluorescens* WCS417r en LB, NaCl -1.0 MPa y PEG -1.0 y D). Porcentaje de autoagregación en un co-cultivo entre dos cepas de *E. meliloti*: Rm8530 y Rm8530*expA* en LB, NaCl -1.0 MPa y PEG -1.0. Para cada tratamiento letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, ($p < 0.005$), de acuerdo al Test LSD Fisher.

La figura 12 A muestra que la cepa de *P. fluorescens* WCS417r autoagregó cuatro veces más en presencia de NaCl que en PEG, y un poco más del doble en el medio sin el agregado de solutos que en presencia del soluto no permeable. Para la cepa de *E. meliloti* Rm8530 *expA* el caso fue totalmente distinto, la misma autoagregó menos del 10% en los tres tratamientos, esto se debió a que la bacteria necesita de la presencia de EPS para poder autoagregarse y como la misma tiene una mutación en el gen *expA3* no produce EPS II, evidentemente necesario para autoagregar. En consonancia con estos resultados Sorroche y colaboradores (2010) observaron que la autoagregación de la mutante no productora de EPS I, Rm8530*exoY*, fue similar a la de la cepa parental (Rm8530), capaz de sintetizar dicho exopolisacárido y los porcentajes de autoagregación de ambas cepas no fueron significativamente diferentes entre sí. Esto evidencia que el EPS I no estaría involucrado en la autoagregación de *E. meliloti*. En contraste, la mutante no productora de EPS II, estuvo severamente afectada en la

autoagregación, poniendo de manifiesto el papel fundamental del EPS II en este proceso. Los resultados obtenidos para la doble mutante (Rm8530*expA**exoY*), mostraron que la cepa bajo ninguna condición autoagregó (datos no mostrados), esto coincide con el trabajo de Sorroche y colaboradores (2010), en el cual se observó que esta doble mutante no tuvo un efecto estadísticamente significativo en la autoagregación respecto a Rm8530*expA*, y mostró diferencias significativas con las cepas autoagregativas Rm8530 y Rm8530*exoY*, descartando nuevamente la influencia de EPS I en la autoagregación. En la figura 12 C se ve que la cepa Rm8530 autoagrega fuertemente bajo las tres condiciones de crecimiento; estos resultados concuerdan con los realizados por Sorroche y colaboradores (2011), quienes observaron que la cepa nativa de *E. meliloti* Rm8530 tiene un fenotipo fuertemente autoagregativo. En tal trabajo se demostró el requerimiento de la presencia de una copia intacta y funcional del gen *expR* los que respaldan los resultados observados en este trabajo para la mutante Rm8530*expA*. Finalmente cuando se realizó un co-cultivo entre las cepas Rm8530 y Rm8530*expA* se determinó que el porcentaje de autoagregación fue de aproximadamente el 10% en presencia del soluto no permeable y menor en presencia de NaCl y en el medio sin el agregado de solutos. Estas observaciones son indicio de que los polisacáridos extracelulares podrían ser los responsables en la determinación del fenotipo autoagregativo diferencial entre las cepas evaluadas. Comparando las tres cepas se observó que Rm8530 aumentó su capacidad autoagregativa tanto en las condiciones de estrés como en el control, contrariamente la cepa Rm8530*expA* disminuyó su capacidad de autoagregar en todas las condiciones, por lo tanto estos resultados determinan que en estas cepas su capacidad para autoagregar es totalmente independiente del soluto; a diferencia de ellas la cepa de *Pseudomonas* autoagregó mucho en presencia de NaCl, disminuyó a la mitad en control y muy poco en presencia de PEG, por lo tanto la capacidad de autoagregar para ella es diferencial según el soluto presente en el medio. Cuando se realizó un cultivo mixto entre las dos cepas de *E. meliloti* se observó que el comportamiento fue similar al de la mutante sola, por lo tanto la cepa salvaje no la rescata y por algún motivo pierde su fenotipo autoagregativo. En consonancia con estas observaciones, en otros trabajos se observó que las interacciones adhesivas que se dan entre bacterias provenientes de ambientes acuáticos pueden ser revertidas o neutralizadas mediante el agregado de azúcares simples (Buswell y col., 1997), debido a que dichas asociaciones serían dependientes de interacciones entre lectinas y carbohidratos presentes en la superficie celular (Rickard y col., 2000). En

Azospirillum brasilense, no solo el EPS parece estar jugando un rol en la autoagregación, sino que además proteínas de superficie tienen relevancia en el mismo (Burdman y col., 1999, Castellanos y col., 1998, Nikitina y col., 2001). De manera muy interesante estos grupos encontraron evidencias de la existencia de interacciones entre lectinas y diversos complejos extracelulares conteniendo polisacáridos. Estas lectinas estarían también involucradas en la adhesión específica a raíces (Nikitina y col., 1996).

Esta es la primera vez que se evalúa la agregación en distintas condiciones de estrés osmótico.

5.4. Evaluación de la formación de biofilms mixtos entre diferentes rizobacterias sometidas a diversas situaciones de déficit hídrico.

En la naturaleza, los biofilms generalmente están constituidos por múltiples especies bacterianas, dando lugar a complejos ensamblajes tanto a nivel taxonómico como funcional (Jackson y col., 2001; Jackson, 2003). En este sentido, Yoshida y colaboradores (2009) demostraron que la formación de biofilms mixtos entre *Burkholderia sp.* NK8 fue sinérgicamente promovida cuando ésta fue co-cultivada con *P. aeruginosa* PAO1. La cantidad de biofilm formado por las dos especies fue significativamente más grande que el formado por cada cepa por separado. Varios informes han descrito las interacciones en biofilm de *Pseudomonas* con otros géneros de bacterias como *Agrobacterium* (An y col., 2006) y *Burkholderia* (Eberl y Tummeler, 2004; Saiman y col., 1990; Tomlin y col., 2001). Ibarra-Trujillo y colaboradores (2012) informaron que la formación de biofilms mixtos entre *Cándida albicans* y *Staphylococcus aureus* aumentó la actividad metabólica de los microorganismos y fue más compleja la arquitectura del biofilm, sugiriendo que existe una posible relación sinérgica entre estos microorganismos al desarrollarse en biopelículas.

Se realizaron estudios de biofilm mixto en condiciones de estrés osmótico, -1.0 MPa inducido por NaCl y PEG utilizando co-cultivos intergenéricos de las cepas *P. fluorescens* WCS417r y *E. meliloti* Rm8530; *P. fluorescens* WCS417r y *E. meliloti* Rm8530 *expA*; y Rm8530 *expA* y Rm8530 *lpsB* (mutantes en EPS y LPS respectivamente). Previo al estudio se verificó la ausencia de interacciones negativas mediante pruebas de inhibición en placa y se determinó que no existieron interferencias en el crecimiento entre cepas (datos no mostrados). Los resultados se evaluaron por

cuantificación de crecimiento mixto (DO_{620}), medición de CFB mixto (por el método del cristal violeta) en tubo y recuentos diferenciales en placas (UFC).

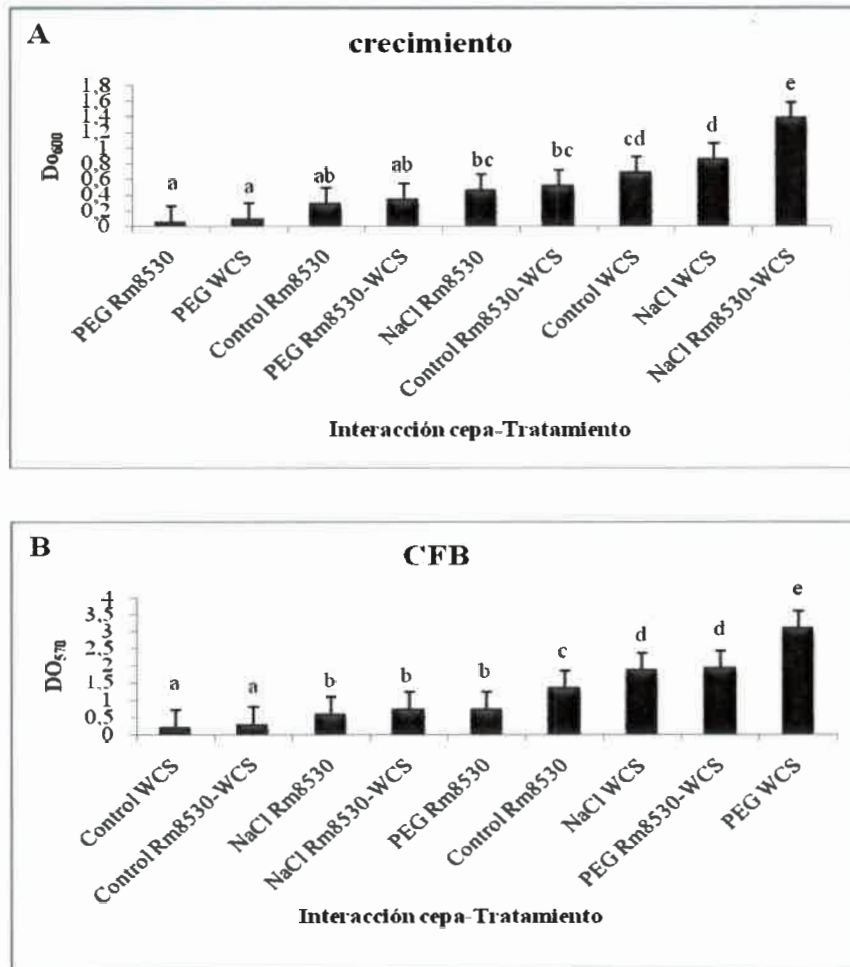


Figura 13. Crecimiento (A) y formación de Biofilm (B) de un co-cultivo entre *P. fluorescens* WCS417r y *E. meliloti* Rm8530, en condiciones de estrés osmótico -1.0 MPa inducido por NaCl y PEG. Letras diferentes indican diferencias significativas para cada condición de interacción cepa-tratamiento ($P < 0,05$) de acuerdo al Test de Fisher LSD.

Los resultados obtenidos con el par de cepas en co-cultivo de *E. meliloti* Rm8530 y *P. fluorescens* WCS417r mostraron que las cepas tuvieron un comportamiento diferente a cada caso individual (Figura 13). La presencia de NaCl (ψ -1,0 MPa) incrementó el crecimiento del cultivo mixto respecto al control y al medio con PEG, en cambio la CFB se vió muy aumentada en presencia de PEG respecto del control y NaCl. La disminución de ψ por adición de PEG (-1,0 MPa) determinó un crecimiento despreciable tanto en cepas individuales como para co-cultivo, aunque éste

último fue un poco más elevado indicando una diferencia significativa respecto a los cultivos individuales y una marcada formación de biofilm por el co-cultivo (Figura 13). Estos resultados, particularmente en el caso de la formación de biofilm, son similares a los observados para la cepa de *Pseudomonas* en cultivo puro (en dos de los tres casos), y para el caso de crecimiento el cultivo mixto tuvo un comportamiento similar al de WCS en cultivo individual en presencia de ambos solutos y en el control se vio favorecido el cultivo mixto respecto de los individuales (Figura 12) con lo cual podría suponerse que la cepa de *Pseudomonas* podría “rescatar” al rizobio que en tales condiciones de reducción del potencial agua por soluto no permeable desarrolló una CFB menor (Figura 13). Coincidentemente con estos resultados, los recuentos diferenciales en placa conteniendo antibióticos selectivos para ambas cepas (datos no mostrados) indicaron que el biofilm formado en medio conteniendo PEG estuvo formado en mayoritariamente por la cepa de *Pseudomonas*, de igual manera que sucedió en condiciones de estrés por NaCl en cuyo caso el biofilm mixto estuvo constituido por ambas cepas pero en mayor proporción por la cepa de WCS417r.

De igual forma se realizó un co-cultivo entre *P. fluorescens* y *E. meliloti* Rm8530 *expA*.

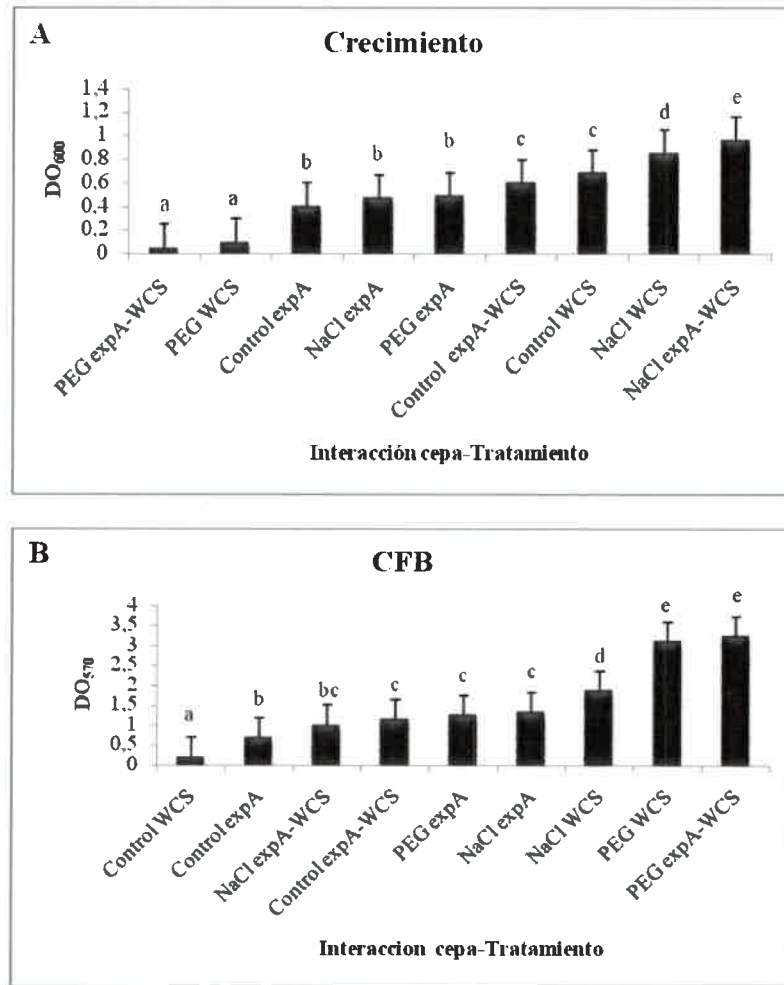


Figura 14. Crecimiento (A) y formación de Biofilm (B) de un co-cultivo entre *E.meliloti* Rm8530 *expA* y *Pseudomonas fluorescens* WCS417r en condiciones de estrés osmótico -1MPa inducido por NaCl y PEG. Estos resultados representan un promedio de 5 repeticiones realizadas en forma individual para cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas en relación a cada tratamiento, de acuerdo al Test de Anova utilizado, LSD Fisher ($P < 0,05$).

Los resultados (Figura 14) muestran que la CFB se incrementó en el cultivo mixto en presencia de soluto, siendo más marcado el efecto en PEG respecto de NaCl. Los gráficos de barra muestran que ambas cepas fueron capaces de formar mucho biofilm en las condiciones de estrés mátrico, lo cual indica una alta relación biofilm/crecimiento (datos no mostrados). A diferencia de lo que sucede con PEG, la presencia de NaCl, disminuye la formación de biofilm en el cultivo mixto respecto a los crecidos en forma individual y en presencia del mismo el crecimiento en co-cultivo se vio muy favorecido, lo cual indicaría una baja relación B/C (datos no mostrados). Este

comportamiento observado en co-cultivo es similar al de *Pseudomonas* creciendo de manera individual, con lo cual podríamos presumir que ella es quien “rescata” al rizobio deficiente en la producción de EPS, el cual tendría disminuida su capacidad de formar biofilms y por lo tanto de subsistir a las condiciones dadas en presencia del soluto no permeable.

Es clara la relación de LMW EPS II en la formación de biofilms y en la autoagregación de *E. meliloti*, en el sentido de que resulta crucial para ambos fenómenos (Sorrcohe, 2011), lo cual se correspondería con los resultados obtenidos. En *Azospirillum brasilense*, no solo el EPS parece estar jugando un rol en la autoagregación sino que además proteínas de superficie tienen relevancia en el mismo (Burdman y col., 1999, Castellanos y col., 1998, Nikitina y col., 2001). De manera muy interesante, estos grupos encontraron evidencia inmunológica de la existencia de interacciones entre lectinas y diversos complejos extracelulares conteniendo polisacáridos. Estas lectinas superficialmente expuestas estarían también involucradas en la adhesión específica a raíces (Nikitina y col., 1996). Mora y colaboradores (2008), demostraron, mediante cromatografía de afinidad, que una lectina de membrana externa se une específicamente al EPS (rico en arabinosa) producido por la bacteria. Podría entonces, proponerse un modelo similar para *E. meliloti* en donde exista una o varias proteínas de superficie que interactúen específicamente con el EPS II, mediando así las interacciones célula-célula.

Paralelamente, se realizaron co-cultivos entre dos cepas intraespecíficas de *E. meliloti*: Rm8530 *expA* y Rm8530 *lpsB*.

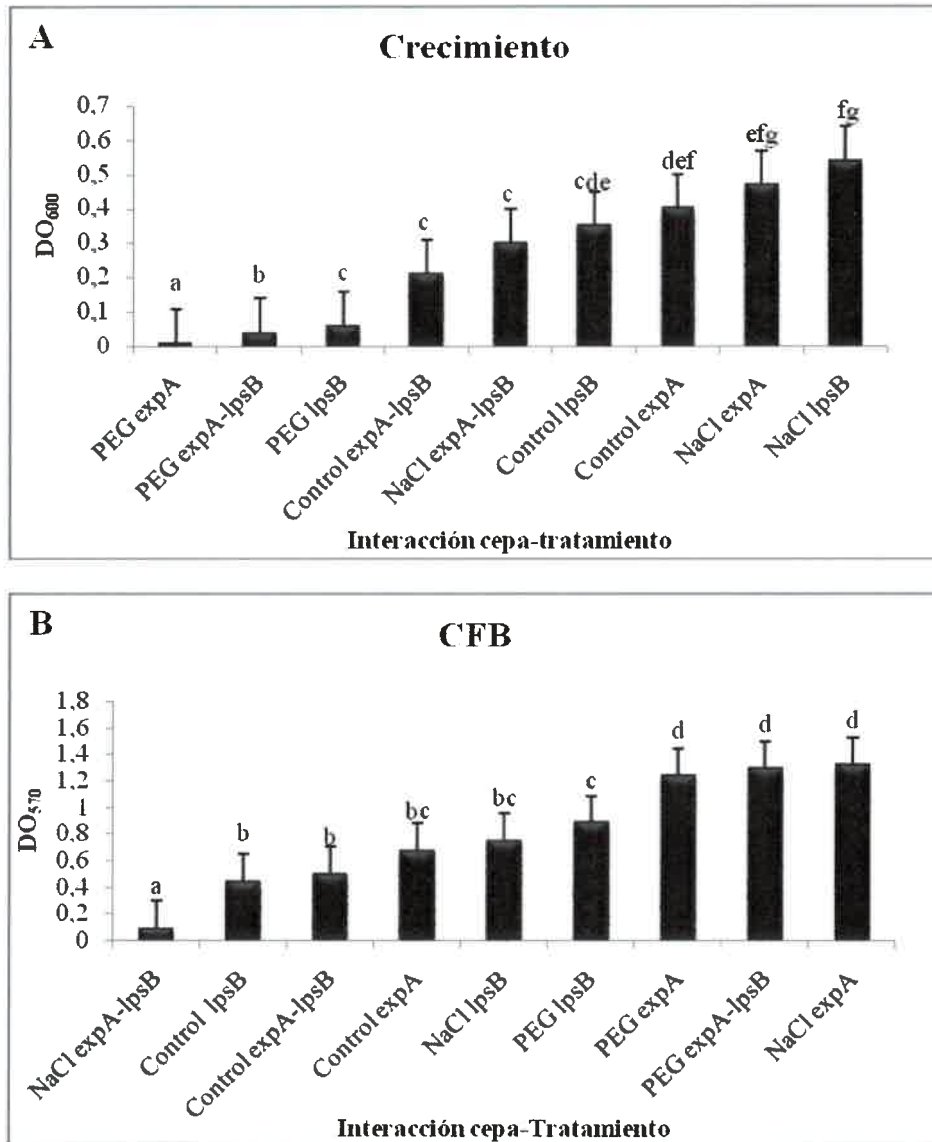


Figura 15. Crecimiento (A) y formación de Biofilm (B) de un co-cultivo entre *E. meliloti* Rm8530 *expA* y *Sm* Rm8530 *lpsB* en condiciones de estrés osmótico, -1MPa inducido por NaCl y PEG. Estos resultados representan un promedio de 5 repeticiones realizadas en forma individual para cada tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las cepas en relación al tratamiento, de acuerdo al Test de Anova utilizado, LSD Fisher ($P < 0,05$).

Los resultados demuestran que ambas cepas fueron capaces de formar gran cantidad de biofilm en las condiciones en las que el estrés fue generado con el soluto no permeable tanto en cultivo mixto como los crecidos en forma individual, contrariamente en el mismo caso el crecimiento celular fue escaso. La presencia de NaCl disminuyó casi diez veces la formación de biofilm del co-cultivo comparado con el medio con PEG (Figura 15 B). Debido a que las cepas son defectuosas en la producción de un LPS

normal y EPS II generaría una desventaja para su crecimiento frente a las condiciones adversas en presencia de PEG, favoreciendo el desarrollo de un estilo de vida baja biofilm, probablemente adaptando su fisiología a otros mecanismos no dependientes de tales moléculas. Estos resultados no concuerdan con los recuentos realizados en medios diferenciales para cada condición (datos no mostrados).

De manera similar a lo observado en *E. meliloti*, mutaciones que impactan en el AgO del LPS de *Rhizobium leguminosarum* perturban el desarrollo de biofilms y las células tienen una mayor tendencia a interactuar por los polos en detrimento de los contactos bacterianos laterales que se encuentran reducidos en gran medida (Russo y col., 2015).

5.5. Aislamiento y caracterización de comunidades bacterianas asociadas a suelo rizosférico de alfalfa.

Ha sido estimado que más del 99% de la actividad bacteriana en los ecosistemas naturales está asociada con bacterias adheridas a las superficies y organizadas en biofilms (Potera, 1996). No obstante, el conocimiento sobre la composición y funcionalidad de los biofilms presentes en el suelo es escaso (Chang y col., 2007). A efectos de aproximar el conocimiento a una situación ambiental, se realizó un estudio que involucró la obtención de un biofilm mixto directamente desde suelo rizosférico. Para ello, se evaluaron las comunidades multibacterianas establecidas en estructuras tipo biofilm asociadas a rizósfera de *M. sativa* (alfalfa, par simbiótico de *S. meliloti*) bajo distintas condiciones de disponibilidad de agua.

Los recuentos obtenidos para los suelos rizosféricos (SRC: suelo rizosférico control, SRS: suelo rizosférico en condiciones salinas y SRD: suelo rizosférico en condiciones de desecación) fueron superiores al recuento obtenido en el suelo entero (SE), esto refleja la presencia de poblaciones de mayor tamaño asociadas a la rizósfera debido a la fuente de nutrientes que representan los exudados radicales existentes en los micronichos rizosféricos. Otro dato interesante fue que en las condiciones de estrés (SRD y SRS) se redujo el número de UFC/ml en la rizósfera de alfalfa en comparación con el suelo rizosférico (SRC) (Figura 16), indicando que el estrés hídrico, independientemente de su origen, reduce el tamaño de la comunidad rizosférica debido a un posible efecto sobre la fisiología bacteriana, de la planta o ambas. De las placas de

recuento de mayor dilución, se aislaron 95 cepas por tratamiento, que representarían a los miembros presentes en mayor número en la comunidad rizosférica y se evaluó por cuadruplicado su CFB. Para cada tratamiento se obtuvo el dato de CFB total (CFBT) de acuerdo al promedio de los valores obtenidos por cada aislamiento ($n=95$). Se puede destacar que la comunidad obtenida del SRD presentó una CFBT mayor que los otros tratamientos y que el suelo entero, lo mismo puede observarse con la relación B/C (Figura 16 B y 16 C). También es llamativo que la comunidad recuperada del SRS fue la que presentó la CFBT más reducida en relación al resto de los sistemas bajo estudio.

Podría especularse que las condiciones de estrés afectan la composición de los exudados radicales y por lo tanto las comunidades bacterianas que se establecen en las proximidades de las raíces. Considerando la fisiología bacteriana, es probable que condiciones de desecación conduzcan a la selección de cepas con mayor CFB para colonizar la superficie de las raíces otorgando ventajas de supervivencia, mientras que otros mecanismos no necesariamente relacionados a la CFB tendrían mayor relevancia en la supervivencia bacteriana en condiciones de estrés salino.

A los fines de conocer la diversidad e identidades de las bacterias establecidas como consorcios múltiples en la rizósfera de alfalfa, se realizó la caracterización de las comunidades asociadas a cada suelo rizosférico.

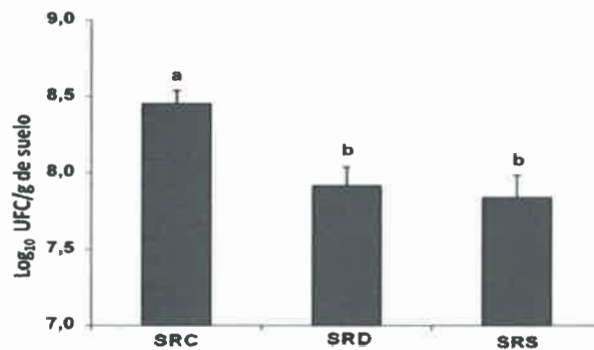


Figura 16. Recuento total de bacterias cultivables en 3 tipos de suelos rizosféricos: Control 13,5% de humedad, (SRC) y condiciones de estrés por desecación 4,2% humedad SRD y salinidad, SRS 42,7 mM NaCl. UFC por gramo de suelo rizosférico seco. Las barras indican promedios de valores de 5 repeticiones independientes para cada tratamiento. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos según el Test LSD Fisher ($p < 0,005$).

Las cepas aisladas de cada tratamiento fueron agrupadas en subpoblaciones de alta y baja CFB (ACFB y BCFB, respectivamente) consistentes en 15 cepas cada una. La capacidad promedio de formar biofilm de cada subpoblación fue comparada y coincidentemente a lo observado para CFBT obtenida para toda la comunidad (Figura 17), los aislamientos procedentes del SRD mostraron valores superiores a los otros tratamientos (Figura 17). La mayoría de los perfiles de ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) obtenidos en los subgrupos de ACFB fueron diferentes a los de BCFB, demostrando que los grupos bacterianos que constituyen cada subpoblación son diferentes y la existencia de cierta correspondencia entre fisiología (CFB) y caracterización genética. En general, las subpoblaciones de ACFB y BCFB procedentes de suelos rizosféricos sometidos a condiciones de estrés (SRM y SRS) presentaron mayores perfiles de restricción respecto de la condición no sometida a estrés (SRC), indicando la posible existencia de procesos de diversificación en tales situaciones (Figura 17). También se destaca la presencia de grupos que posiblemente sean altamente competitivos para establecerse en la rizósfera de alfalfa debido a su presencia en las tres condiciones (R3) o al menos en dos de ellas (P1, P2; P4) (Figura 22). Podría especularse que ante la presencia de estrés, un grupo más variado de bacterias se establece como consorcio mixto en las zonas cercanas a las raíces de alfalfa, probablemente en respuesta a la búsqueda de micronichos menos hostiles. Por el contrario, en condiciones no estresantes, la comunidad mixta se establecería con predominio de los grupos más efectivos para colonizar la zona próxima a las raíces y a que en tal condición otros grupos no necesitarían del microambiente rizosférico para sobrevivir.

En general y en función de su pertenencia a perfiles de ARDRA mayoritarios, se seleccionaron cepas para su identificación mediante secuenciación completa del gen *ARNr 16S*. Se destaca la identidad de las cepas aisladas con cepas típicas encontradas en los suelos, tanto Gram positivas (actinomicetes) como Gram negativas (Tabla 4). La identidad con cepas de *Rhizobium* sp. y *Shinella granulii* resulta interesante debido a la capacidad de estas bacterias para establecer interacciones simbióticas con las leguminosas, aunque a escala de laboratorio los ensayos de nodulación con alfalfa de las cepas C3 y S37 fueron negativos. Sin embargo, la presencia de cepas filogenéticamente vinculadas a los rizobios como parte del biofilm mixto que constituye la comunidad asociada a rizósfera de alfalfa resulta un dato sumamente destacable.

La principal forma de vida de la mayoría de las bacterias es formando parte de un consorcio multiespecie. Los suelos de los ecosistemas proveen varios microambientes, en los cuales las bacterias pueden establecerse como biofilms. La rizósfera es un lugar muy favorable y conveniente para el desarrollo de esta forma de vida ya que es una superficie biótica en donde se encuentran fuentes de nutrientes derivados de las raíces de las plantas, con las cuales los microorganismos pueden interactuar en forma muy activa (Fujishige y col., 2006; Pearce y col., 1995,). En contraste, los suelos proveen micronichos pobres o incluso hostiles, pero las bacterias sobreviven formando biofilms.

5.5.1. Tamaño de las comunidades rizosféricas

En suelo entero, la media de UFC por gramo fue de $7,31 \pm 0,23$ en medio AN (datos nos mostrados), lo cual es razonable teniendo en cuenta el bajo contenido de materia orgánica (1,03 %) de la muestra de suelo y el hecho de que solo fueron contadas las bacterias cultivables del total de microorganismos presentes en el mismo. Los recuentos bacterianos de suelo son comparables con los de otros estudios realizados en varios tipos de suelos sometidos a variadas prácticas agrícolas (Agaras y col., 2012). Interesantemente, los recuentos bacterianos para nuestros tres tipos de suelos rizosféricos (SRC, SRD, SRS) (Figura 17) fueron significativamente más altos que el suelo entero (SE) previo a los tratamientos. Estos hallazgos reflejan el “efecto rizosférico” (Hinsinger y col., 2009; Houlden y col., 2008), en comparación con el suelo entero, los suelos asociados con raíces de plantas proveen un micronicho favorable para el crecimiento y la actividad microbiana, debido a la presencia de nutrientes derivados de los exudados de las raíces de las plantas permitiendo el establecimiento de comunidades bacterianas de mayor tamaño (Hartmann y col., 2008, Smalla y col., 2006).

Estudios previos han demostrado que 1 gramo de suelo rizosférico contiene entre 7,0 y 9,0 \log_{10} UFC de bacterias cultivables (Compant y col., 2010). Los recuentos para suelos rizosféricos no estresados (SRC), tanto para los estresados, SRD, SRS estuvieron en un rango entre 7,7 a 8,5 \log_{10} UFC por gramo de suelo rizosférico seco (Figura 17). Estos valores son similares o más altos que los obtenidos en trabajos previos de recuentos de suelos rizosféricos de plantas leguminosas y no leguminosas (Agaras y col., 2012; Andreote y col., 2008; Dell’Amico y col., 2005). En particular, estos

recuentos son consistentes con los obtenidos para bacterias cultivables de rizósferas de leguminosas como *Glycine max*, *Vigna radiata*, *Arachis hypogaea* y *Acacia mangium* (Kuklinsky-Sobral y col., 2004; Agaras y col., 2012; Pongsilp y col., 2012).

Se encontró que exposiciones a condiciones de privación de agua, resultan en cambios en los recuentos bacterianos de suelos rizosféricos. Interesantemente, el número de UFC por gramo de suelo rizosférico fue más bajo en condiciones estresantes (DRS, SRS) que en condiciones no estresantes (SRC) (Figura 17).

La exposición a condiciones de privación de agua afectó al desarrollo de la planta de alfalfa, aunque el análisis de parámetros de biomasa no fue parte de este diseño de investigación.

5.5.2. Capacidad Formadora de Biofilm Total (CFBT) de tres comunidades bacterianas rizosféricas

El nicho rizosférico es un microambiente muy dinámico que alberga comunidades polimicrobianas afectadas por sus propios procesos metabólicos y la variable composición de los exudados radicales, los cuales dependen de la especie vegetal, de su estadio de crecimiento y del ambiente (Albareda y col., 2006, Xu Y y col., 2009). En el presente trabajo y como resultado de la metodología definimos comunidades bacterianas rizosféricas a los microconsorcios bacterianos que viven en forma de biofilm recuperados de i) suspensiones bacterianas de suelos asociados firmemente a raíces de alfalfa, y ii) bacterias colonizando superficies de raíces. Esta definición está apoyada por estudios previos que indican que la mayoría de las cepas presentes en los biofilms son cultivables (Burmølle y col., 2006).

Muchos estudios previos han evaluado los efectos de estrés salino o desecación en la CFB de cepas bacterianas en particular (Chang y col., 2007; Vanderlinde y col., 2010; Velázquez-Hernández y col., 2011). Sin embargo, los efectos en condiciones de limitación de agua sobre la CFB nunca han sido estudiados utilizando aislados obtenidos de toda una comunidad bacteriana.

Como se describió anteriormente se obtuvieron comunidades bacterianas de suelos rizosféricos sometidos a tres condiciones: SRC (regado regularmente, % H final 13.4%), SRD (escaso riego, % H final, 4.2%) y SRS (regado con una solución salina 42.7mM).

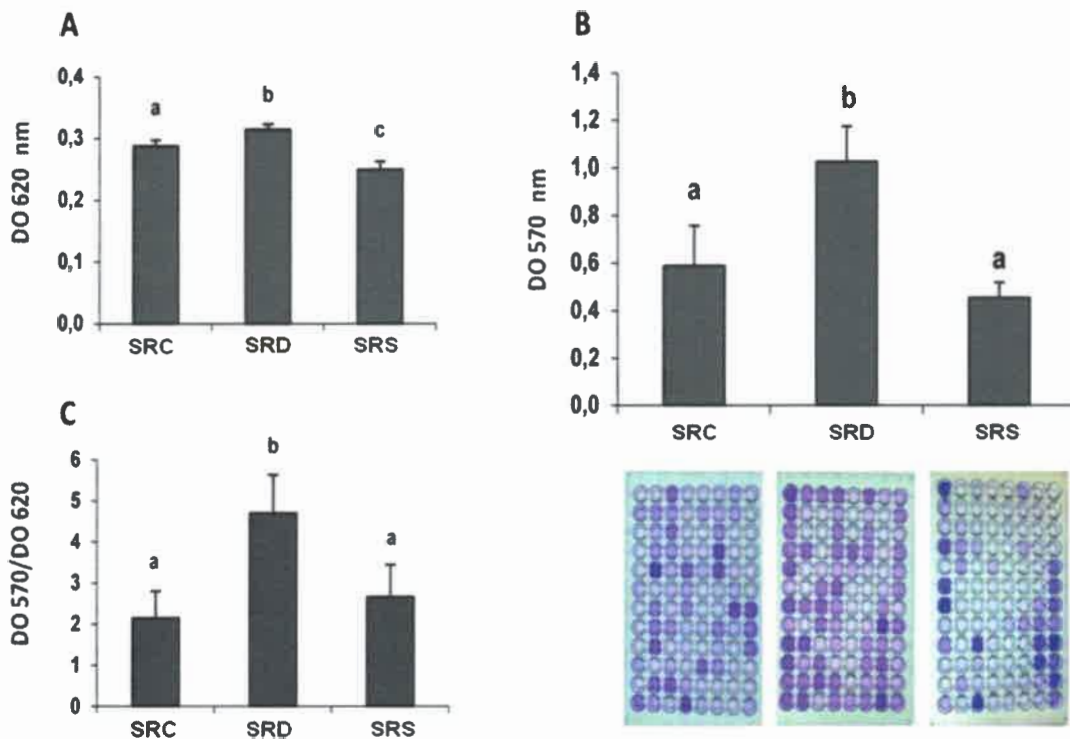


Figura 17. Crecimiento de células planctónicas (A), CFBT (B) y relación B/C de las comunidades bacterianas en los tres tipos de suelos rizosféricos de alfalfa (C). Los valores de DO₆₂₀ (células planctónicas), DO₅₇₀ (cuantificación de biofilm formado por tinción con cristal violeta), o su relación (B/C), obtenidas de cada placa (95 cepas) es un promedio de 5 réplicas independientes para cada tratamiento. La imagen D muestra las placas para cada tratamiento. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al Test LSD de Fisher ($p < 0,05$).

Cada una de esas comunidades consistió de 95 cepas aisladas de las placas de recuentos de mayor dilución, las cuales serían las cepas más representativas de cada comunidad. La CFBT se evaluó para cada comunidad con una cantidad de 5 réplicas por tratamiento. El crecimiento total (Figura 17 A), CFBT (Figura 17 B) y la relación B/C (relación biofilm/crecimiento) (Figura 17 C) fueron mayores para las comunidades de SRD que para las comunidades de SRC o SRS.

La CFBT (Figura 17 B) y la relación B/C (Figura 17 C) fueron casi dos veces más altos para la comunidad de SRD que para SRC o SRS. Coincidentemente y como se puede ver en las imágenes de las microplacas (Figura 17 D), el número de pocillos que están teñidos intensamente de violeta es dos veces más elevado para SRD que para SRC o SRS.

Estos resultados indican que un estrés del tipo mátrico debido a una disminución en el agua del suelo lleva al establecimiento de una comunidad bacteriana en la rizósfera de alfalfa que consiste de miembros que tienen mayor capacidad de crecer en condiciones de estrés por desecación. Este fenómeno podría estar relacionado a la capacidad de explotar las fuentes de nutrientes frente a estas condiciones de estrés. Similarmente, el estrés por desecación lleva a la selección de cepas bacterianas con alta CFB, resultando en un incremento de la supervivencia de estas bacterias. Estudios previos han mostrado la relación entre el efecto y el rol de los EPSs en la matriz del biofilm; tales compuestos podrían reducir los efectos de la desecación incrementando la supervivencia bacteriana y el crecimiento de la planta (Alami y col., 2000, Chan y col., 2006; Flemming y col., 2010; Sutherland y col., 2001). En particular ha sido observado que las colonias bacterianas aisladas de los suelos secos fueron similares en aspecto (Agaras y col., 2012), este hecho tendría cierta consistencia con los resultados obtenidos, según los cuales el estrés por desecación ejerció un efecto selectivo en las poblaciones bacterianas seleccionando cepas de mayor CFB.

Es remarcable que la comunidad de SRS mostró menos crecimiento que las comunidades de CRS o DRS. La reducción del potencial de agua resultado de un incremento de los solutos en el suelo, evidentemente opera de manera diferente al efecto de la desecación por efecto mátrico. Cualquier estrés ya sea osmótico o mátrico han tenido diferentes efectos en la composición de los exudados radicales y esto genera consecuencias en las comunidades bacterianas asociadas a las raíces de las plantas. Por ejemplo la composición de flavonoides en los exudados de *Phaseolus vulgaris* se vio alterado ante el estrés salino (Dardanelli y col., 2008).

Tanto las condiciones del suelo como la cantidad y composición de rizodeposiciones regulan la especificidad de las interacciones planta-bacteria (Dimkpa y col., 2009). En el presente trabajo a pesar del hecho de que el suelo original y la planta bajo estudio fueron los mismos, es posible que los exudados radicales producidos bajo las tres condiciones experimentales fueron diferentes y que los efectos quimiotáticos

sobre las bacterias del suelo hayan seleccionado diferentes comunidades las cuales fueron específicamente adaptadas a cada condición particular (Bais y col., 2006). La exposición a la condición de limitación de agua puede afectar las comunidades bacterianas indirectamente a través de cambios en el metabolismo de la planta, en el desarrollo de la misma, y la composición de los exudados liberados a la rizósfera. Estudios previos han demostrado que, en respuesta a la limitación de agua, la planta sintetiza osmolitos (Farooq y col., 2009) que son liberados en el suelo rizosférico y actúan sinérgicamente con los osmolitos producidos por las bacterias (Dimkpa y col., 2009).

En término de la fisiología de la bacteria, estos microorganismos que viven en condiciones de limitación de agua (estrés mátrico o generado por adición de solutos), deben integrar sus respuestas para crear un microambiente hidratado para protegerse. La asociación de poblaciones bacterianas como biofilms multiespecíficos en el microambiente rizosférico representa un estilo de vida como estrategia para aumentar la supervivencia bajo estas condiciones estresantes. El estrés por desecación lleva a la selección de cepas con alta CFB que le da ventajas de supervivencia debido a su capacidad de colonizar superficies de raíces, mientras que otros mecanismos no necesariamente relacionados con la CFB juegan un rol importante en la supervivencia bacteriana frente a condiciones de estrés salino (Dimkpa y col., 2009; Vriezen y col., 2006; Zahran y col., 1999). Las células osmóticamente estresadas están sometidas a cambios estructurales de moléculas claves requeridas para el establecimiento y desarrollo de un biofilm maduro, incluyendo los EPSs (Billi y col., 2000, Lloret y col., 1998) y lipopolisacáridos (Bhattacharya y col., 2003; Lloret y col., 1995).

5.5.3. Composición y diversidad de las tres comunidades bacterianas rizosféricas

Se estudió la composición de las comunidades bacterianas asociadas a cada uno de los tres suelos rizosféricos con el fin de dilucidar i) la estructura, diversidad e identidades de las bacterias predominantes que conforman los biofilms multiespecies establecidos en la rizósfera de la alfalfa, y ii) los efectos de la exposición a las condiciones de estrés en tales comunidades. Para simplificar el análisis, los aislados de cada tratamiento fueron subdivididos en dos grupos de 15 cepas (subpoblaciones) con la mayor y menor CFB (subpoblaciones de Alta Capacidad Formadora de Biofilm: ACFB

y Baja Capacidad Formadora de Biofilm: BCFB, respectivamente).

Los valores de la CFB para cada subpoblación de cada comunidad fueron comparados (Figura 18). Los valores de la CFB de las subpoblaciones de ACFB y BCFB de las comunidades de SRD fueron más altos que los de las comunidades de SRC o SRS (Figura 18), indicando nuevamente que el estrés por desecación resulta en la selección de cepas con elevada CFB.

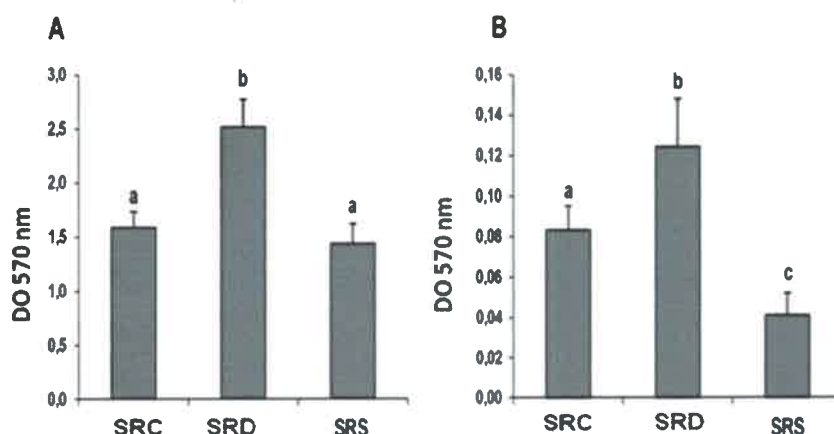


Figura 18. CFB de subpoblaciones de bacterias (ACFB y BCFB) aisladas de tres tipos de suelos rizosféricos de alfalfa. La figura muestra la CFB de las 15 cepas agrupadas en subpoblaciones de ACFB (A) y BCFB (B) de las comunidades de CRS, DRS y SRS. Las barras indican promedios de valores de 5 repeticiones independientes para cada tratamiento. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos según el test de LSD Fisher ($p < 0,05$).

Independientemente del tratamiento, las subpoblaciones de BCFB (Figura 18 B) involucraron un importante grupo de cepas en las comunidades de biofilm multiespecíficos. De este modo, los biofilms multiespecíficos formados en la rizósfera de plantas de alfalfa involucran a miembros de las subpoblaciones de ACFB (Figura 20 A) y permiten que otras bacterias de BCFB obtengan ventajas del biofilm y se puedan establecer protegidamente en el microambiente. Las interacciones sinérgicas como el co-metabolismo (Burmolle y col., 2007), agregación celular (Rickard y col., 2003) y la transferencia de plásmidos por conjugación (Ghigo y col., 2001) parecen jugar un rol importante durante el desarrollo de biofilms (Burmolle y col; 2006; Rickard y col., 2006), aunque la mayoría de los estudios hasta la fecha se han centrado en las

asociaciones simples de dos especies.

La coexistencia de cepas con ACFB y BCFB en una comunidad puede alternativamente explicarse por un mecanismo cooperativo por el que cepas bacterianas con reducida CFB en forma aislada, se establecen como biofilm en presencia de otras cepas de baja CFB, o por un mecanismo de rescate según el cual cepas de ACFB incorporan a la estructura del biofilm a cepas de BCFB. Este escenario podría llevar al establecimiento de biofilms mixtos que permiten la coexistencia de cepas, evitar la competencia (Christensen y col., 2002; Stewart y col., 1997), promover el sinergismo (Sharma y col., 2005) y transferencia genética (Sorensen y col., 2005). Dada la complejidad de los microambientes edáficos, especulamos que una combinación de los mecanismos (el “rescate” de las cepas con ACFB por las cepas con BCFB y una cooperación entre cepas con baja-CFB) sería crucial para el establecimiento de comunidades polimicrobianas en la rizósfera de las plantas.

Para estudiar la composición de las comunidades microbianas se utilizó una técnica basada en la comparación de *fingerprinting* generados por ARDRA con la enzima de restricción *Hae III*. Los genes de *ARNr* son esenciales, y sus secuencias están altamente conservadas en las bacterias. Los genes de *ARNr* también tienen secuencias no conservadas que varían entre especies y familias (Gurtler y col., 1996). ARDRA es una herramienta muy común utilizada para el estudio de la diversidad y comparación de ribotipos comunidades bacterianas en muestras grandes bajo diferentes condiciones y para estudios ecológicos (Kirk y col., 2004., Zhang y col., 2010). Varios trabajos previos se han basado en la amplificación de genes de *ARNr* con posterior digestión del producto amplificado con una enzima de restricción y comparación de los *fingerprinting* obtenidos (Andreote y col., 2008; Kuklinsky-Sobral y col., 2004; Ulrich y col., 2006; Smalla y col., 2007).

La variabilidad ribotípica de las subpoblaciones de ACFB y BCFB presentes en cada tipo de suelo rizosférico fue investigado haciendo una digestión de los productos amplificados por PCR de los genes de *ARNr 16S*, mediante la enzima *Hae III*. Tres a seis fragmentos que variaron en tamaño desde 80 a 750 pb fueron generados entre 35 ribotipos obtenidos de las 90 cepas evaluadas, indicando un cociente de aproximadamente 2,5 entre el número de cepas analizadas y el número de ribotipos obtenidos. Independientemente del tratamiento experimental, el análisis de los resultados obtenidos demostró que las cepas bacterianas que colonizan la rizósfera de

alfalfa fueron altamente diversas; estos resultados son concordantes con los resultados obtenidos para poblaciones aisladas de suelo rizosférico de otra especie vegetal tal como tabaco (Andreote y col., 2008). No obstante, indicaría que la rizósfera define una zona del suelo habitada por comunidades bacterianas de gran tamaño y diversidad.

En cuanto a las relaciones entre las estructuras de las comunidades bacterianas expuestas a condiciones de limitación de agua y CFB de las cepas, fueron detectados diferencias entre las composiciones de ribotipos de las comunidades bacterianas cultivables en los tres tratamientos de los suelos rizosféricos (SRC, SRD, SRS). En general, ambas subpoblaciones de ACFB y BCFB de los suelos rizosféricos sometidos a condiciones de estrés SRD y SRS han tenido más perfiles de restricción (ribotipos) que las subpoblaciones no expuestas a estas condiciones (SRC), sugiriendo la ocurrencia de procesos de diversificación bajo condiciones de estrés.

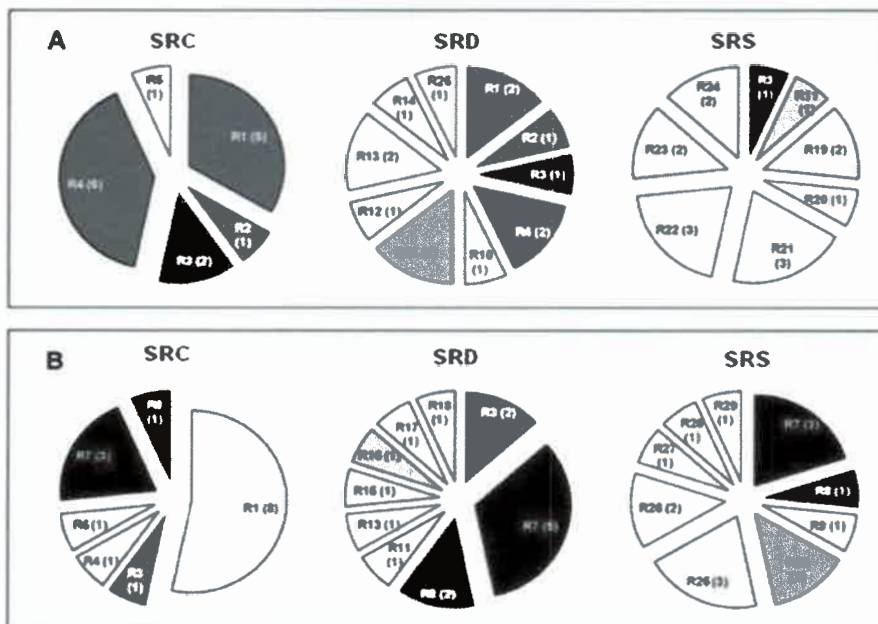


Figura 19. Distribución de ribotipos para ACFB (A) y BCFB (B) de cepas aisladas de tres tipos distintos de suelos rizosféricos de alfalfa. SRC, SRD y SRS hace referencia al tratamiento aplicado a cada suelo rizosférico (Control, Desecación y Salino, respectivamente). Cada “porción” corresponde a un perfil particular de restricción obtenido de una digestión de amplificadores del gen *ARNr 16S* (ribotipo: R) con la endonucleasa de restricción *Hae III*. Los números en paréntesis se corresponden con la cantidad de cepas que comparten el ribotipo para un tratamiento en particular. Los ribotipos únicos están indicados con blanco. Ribotipos compartidos están indicados en gris claro, gris oscuro o negro.

De las 15 cepas de ACFB en cada tratamiento, se obtuvieron 5 ribotipos para SRC, 10 para SRD y 8 para SRS (Figura 19 A). De las 15 cepas de BCFB en cada tratamiento, fueron encontrados 6 ribotipos para SRC, 9 para SRD, y 9 para SRS (Figura 19 B). Estos resultados parecen ser incompatibles con los de un estudio de comunidades bacterianas asociadas a la rizósfera de canola (*Crassica napus*), en el cual se encontró una correlación entre la diversidad bacteriana y la precipitación mensual (Farina y col., 2012). Sin embargo, las comparaciones entre los estudios son complejas debido a las diferencias en el diseño experimental, tipos de suelos y especies de plantas.

Interesantemente, los números de los perfiles de restricción únicos fueron más grandes para los tratamientos en condiciones de estrés SRD y SRS (Figura 19). Dentro de cada tratamiento, la mayoría de los ribotipos obtenidos para la subpoblación de ACFB fueron diferentes de los de la subpoblación de BCFB. Tres de ocho ribotipos (R1, R3 y R4), fueron encontrados en ambas subpoblaciones del grupo de SRC, mientras que 3 de 15 ribotipos (R3, R11 y R13) fueron encontrados en ambas subpoblaciones del tratamiento SRD. No se han compartido ribotipos entre las dos subpoblaciones del suelo con tratamiento SRS. Estos resultados refuerzan el concepto que explica que las condiciones de estrés promueven el incremento en la diversidad de los miembros de las comunidades rizosféricas.

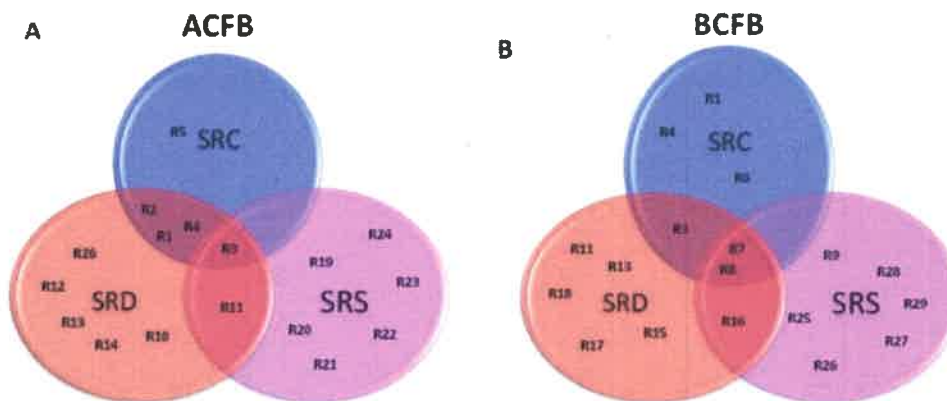


Figura 20. Gráfico de Venn. Distribución de ribotipos para ACFB (A) y BCFB (B) de cepas aisladas de tres tipos distintos de suelos rizosféricos de alfalfa. Explica la distribución de perfiles de restricción para las cepas con mayor CFB (ACFB) y con menor CFB (BCFB) aisladas de suelos rizosféricos de alfalfa en diferentes condiciones de estrés osmótico.

Los análisis de ARDRA revelaron la presencia de grupos que probablemente sean altamente competitivos para el establecimiento en la rizósfera de alfalfa porque están presentes en las tres condiciones experimentales (R3 para ACFB, Figura 20 A; R7 y R8 para BCFB, Figura 20 B). Debido a la mayor presencia de ribotipos únicos bajo condiciones de estrés, podemos especular que el biofilm bacteriano mixto en tales condiciones está formado por una comunidad altamente diversa establecida en las raíces de alfalfa como consecuencia de que las cepas tendrían capacidad para establecerse en microambientes menos hostiles de la búsqueda de microambientes menos hostiles.

En contraste, bajo condiciones no estresantes, las comunidades de biofilm mixto pueden ser menos diversas, debido a que la rizósfera es colonizada a través de especies bacterianas más efectivas o competitivas, reduciendo de esta manera la probabilidad que otras especies se asienten en ese micronicho. Una explicación alternativa es que algunas especies bacterianas son capaces de sobrevivir bajo condiciones no estresantes fuera del microambiente rizosférico.

Muchos trabajos previos han realizado comparaciones de comunidades bacterianas en relación a las prácticas agrícolas (Agaras y col., 2012., Garbeva y col., 2004), tipos de suelos (Garbeva y col., 2004; Shi y col., 2011), historia del suelo (Garbeva y col., 2008) y cultivos o especies de plantas (Appuhn y col., 2006; Berg y col., 2009). El presente estudio es el primer trabajo que describe la aplicación de un tipo de estrés abiótico (limitación de agua) a un suelo particular y los consecuentes cambios estructurales en las comunidades bacterianas asociadas con la rizósfera de una especie particular de planta (*M. sativa*) (Bogino y col., 2013).

Se realizó una evaluación adicional para estudiar la diferenciación entre los tres tratamientos y sus subpoblaciones, para ello se construyó un dendrograma según los ribotipos encontrados (Figura 20). Cuando fueron analizados todos los ribotipos para cada condición considerada, los tratamientos se agruparon a altas distancias (mayor que el 70%) (Figura 21 A), indicando que la composición de las comunidades bacterianas rizosféricas varían dependiendo de la exposición de los suelos a condiciones no estresantes (SRC), o estrés hídrico por deprivación de agua (SRD) o por alta concentración de sal (SRS). Interesantemente el dendrograma basado en el ARDRA de las subpoblaciones de ACFB y BCFB, muestra una separación en una gran distancia de estas subpoblaciones independientemente de la condición dentro de dos grupos (grupos 1 y 2, respectivamente, Figura 21 B). De esta manera se refleja la diferencia de grupos

bacterianos que conforman las dos subpoblaciones. Estos resultados sugieren que hay un enlace entre las características fisiológicas (CFB) y las características genéticas.

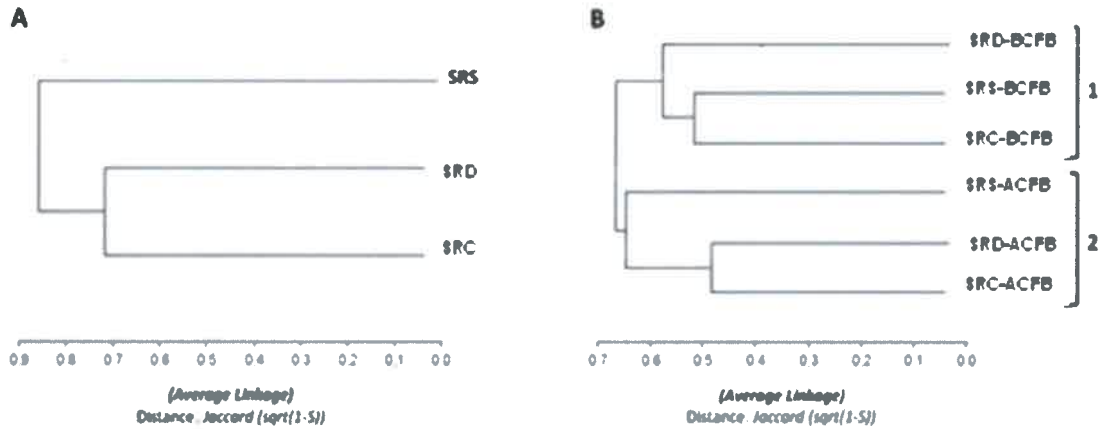


Figura 21. Análisis de conglomerados que muestra el agrupamiento, basado en RFLP del gen *ARNr 16S*, de las cepas aisladas, según la distancia de Jaccard para los tres tipos de suelos rizosféricos (A) y (B) Análisis de conglomerados de los ribotipos en los tres tipos de suelo en combinación con la CFB (BCFB vs. ACFB) según la distancia de Jaccard.

5.5.4. Identidades y afiliaciones filogenéticas de cepas bacterianas de tres tipos de suelos rizosféricos de alfalfa

Las cepas bacterianas representativas de cada tratamiento fueron identificadas por la secuenciación del gen *ARNr 16S*. Las cepas fueron seleccionadas de acuerdo a la mayor cantidad de ribotipos únicos o compartidos teniendo en cuenta los perfiles de ARDRA. Los genes amplificados con primers específicos fueron de tamaño uniforme (aproximadamente 1400pb). Los números de acceso a *GenBank* que identifican las cepas estudiadas se muestran en la Tabla 4. Los ribotipos de ARDRA seleccionados reflejan la identidad de las cepas aisladas y su similitud con bacterias Gram-positivas y Gram-negativas que son típicamente encontradas en los suelos (Tabla 4) e interactúan con plantas. Estos resultados son consistentes con trabajos previos (Andreote y col., 2008; Karagoz y col., 2012; Mering y col., 2009).

Tabla 4. Identidades y características relacionadas a CFB de cepas bacterianas aisladas de varios suelos rizosféricos

Cepa (origen)	Rt	Nº acceso GenBank	Secuencia más relacionada (%id)	Afiliación filogenética	CFB	% Agreg.	Tipo de agreg	Movilidad (cm)	EPS	AHL
C3 (SRC)	1 ^u	KF261554	<i>Agrobacterium sp.</i> AHL7 (AY379979.1)(99)	α-proteobacteria	2.30±0.28	29.6±5.6	LA	2.55±0.49c	-	+
C7 (SRC)	4 [^]	KF261555	<i>Microbacterium sp.</i> S18 (EU747700.1)(99)	Actinobacteria	1.94±0.30	35.4±3.4	MA	0.77±0.21a	-	+
C12 (SRC)	3 [*]	KF261556	<i>Rhizobium sp.</i> R-24658 (AM084043.1)(99)	α-proteobacteria	1.50±0.29	37.2±6.1	MA	1.83±0.22b	-	+
C29 (SRC)	7 [#]	KF261557	<i>Arthrobacter sp.</i> DNS 10 (HQ914648.1)(99)	Actinobacteria	0.11±0.03	23.8±5.8	LA	-	+	-
C35 (SRC)	7 [#]	KF261558	<i>Promicromonospora sp.</i> FFN01 (JN896618.1)(99)	Actinobacteria	0.06±0.02	67.2±2.0	AA	-	-	+
D1 (SRD)	3 [*]	KF261559	<i>Stenotrophomonas sp.</i> CK6 (AJ870967.1 (100))	γ-proteobacteria	3.40±0.38	41.4±5.8	A	2.88±0.50cd	+	-
D10 (SRD)	4 [^]	KF261560	<i>M. hidrocarbonoxydans</i> HNR08 (EU373354.1)(99)	Actinobacteria	2.19±0.37	40.5±7.8	A	0.79±0.19a	-	+
D29 (SRD)	7 [#]	KF430812	<i>Arthrobacter sp.</i> DNS 10 (HQ914648.1)(99)	Actinobacteria	0.09±0.02	45.3±7.7	A	0.87±0.23a	-	+
D32 (SRD)	8 [#]	KF261561	<i>M. testaceum</i> SD9-677 (JQ660317.1)(99)	Actinobacteria	0.06±0.01	24.8±3.5	LA	-	-	-
S2 (SRS)	19 ^u	KF261562	<i>Pseudomonas sp.</i> AF32 (EU680973.1)(99)	γ-proteobacteria	2.34±0.54	37.2±6.0	MA	3.38±0.43d	-	+
S13 (SRS)	3 [*]	KF261564	<i>Rhizobium sp.</i> R-24658 (AM084043.1)(99)	α-proteobacteria	1.02±0.20	43.2±5.7	A	2.95±0.13cd	-	+
S36 (SRS)	7 [#]	KF261565	<i>Arthrobacter pascens</i> H45 (KC934828.1)(99)	Actinobacteria	0.05±0.02	49.6±8.2	A	-	+	+
S37 (SRS)	25 ^u	KF261566	<i>Shinella granuli</i> Ch06 (AY995149.1)(98)	α-proteobacteria	0.05±0.03	9.5±1.7	PA	0.95±0.13a	+	-

Rt: ribotipo. Símbolos superíndices en la columna de ribotipos: u: ribotipo único mayoritario; ^: ribotipos compartidos para cepas de SRC y SRD; * ribotipos compartidos por cepas con ACFB; # ribotipos compartidos por cepas con BCFB. Id. Identidad. Agreg. Autoagregación expresada en %. Categorías de agregación basadas en análisis estadísticos: PA, poco agregativo; LA: ligeramente agregativo; MA: moderadamente agregativo; A: agregativo; AA: altamente agregativo. La movilidad está expresada en diámetro del halo (cm). Diferentes letras indican diferencias significativas. (Test p<0.05 de acuerdo al Test de Fisher LSD) EPS: exopolisacárido. AHL: acil homoserin lactona.

Se puede destacar que la mayoría de las cepas de las subpoblaciones con ACFB fueron identificadas como α -proteobacterias o γ -proteobacterias, mientras que las subpoblaciones de BCFB fueron identificadas principalmente como Actinobacterias. En contraste, algunos estudios previos presentaron que las especies dominantes en los biofilms de suelo fueron Gram-negativas (Burmølle y col., 2007, Lunsdorf y col., 2000., Stach y col., 2002). Sin embargo, estos estudios previos fueron enfocados en una etapa temprana de la formación del biofilm. Se identificaron Proteobacterias como miembros de las subpoblaciones de las bacterias con ACFB, las cuales serían probablemente las primeras en establecerse en el biofilm. En este sentido, se ha observado la presencia en la rizósfera de alfalfa de grupos bacterianos (α y γ -proteobacterias, Actinobacterias), que tienen la capacidad de responder a la rizodeposición de las raíces, incluyendo rizobios (Albareda y col., 2006), *Pseudomonas* (Costa y col., 2006), y varias Actinobacterias (Nimnoi y col., 2011). Estos resultados están en contraste con otros estudios de suelos rizosféricos de plantas no leguminosas, en el cual β -proteobacteria, Actinobacterias fueron los grupos dominantes (Ying y col., 2012). Estas asociaciones presumiblemente dependen de varios factores, incluyendo el tipo de plantas, que determina la composición de la comunidad microbiana que se va a establecer en las raíces de la misma.

El análisis de los ribotipos compartidos demuestra que ciertos miembros de ambas subpoblaciones (ACFB y BCFB) son capaces de colonizar el microambiente rizosférico de alfalfa en condiciones de estrés. El ribotipo 3 estuvo presente en las subpoblaciones de ACFB en las tres condiciones y fue asociado principalmente con α -proteobacterias (cepas C12 y S13, familia Rhizobiaceae) y γ -proteobacterias (cepa M1, familia Xanthomonadaceae). El ribotipo 7 incluyó miembros de la subpoblación de BCFB, pertenecientes a las Actinobacterias, particularmente al género *Arthrobacter*. Estos resultados sugieren que la presencia de ribotipos en común, con identidades similares entre los tres tratamientos se puede atribuir a cepas bacterianas que son capaces de establecer un biofilm mixto en la rizósfera de alfalfa, basado en su capacidad de colonizar el ambiente radicular (en el caso de las cepas ACFB) o la capacidad oportunista que se asocia con microconsorcios mixtos (en el caso de las cepas con BCFB). Las bacterias Gram-negativas pueden ser principalmente responsables de la colonización del nicho para la formación del biofilm, mientras que Actinobacteria simplemente toma ventaja de la estructura de biofilm para vivir en un

ambiente más protegido.

Con respecto a las afiliaciones de la mayoría de los ribotipos únicos, encontramos identidad de C3 (R1) con el género *Agrobacterium* y *Rhizobium*, S2 (R19) con *Pseudomonas*, y S37 (R25) con *Shinella*. Destaca también la afiliación del ribotipo compartido R3 de las cepas C12 y S13 con el género *Rhizobium*. La identidad de las cepas rizosféricas con miembros de la familia *Rhizobiaceae*, géneros *Rhizobium* y *Shinella* (An y col., 2006), es interesante debido a la capacidad de esas bacterias de establecer interacciones simbióticas con plantas leguminosas. La capacidad de nodular de C3, C12, S13 y S37 fue evaluada a través de la inoculación de esas cepas sobre la superficie de semillas esterilizadas de *M. sativa* (Bogino y col., 2006). Los resultados de los tests de nodulación fueron negativos para todas las plantas inoculadas con las cepas mencionadas anteriormente, mientras que los resultados fueron positivos cuando fueron inoculadas con la cepa de *S. meliloti* Rm1021 (control positivo) (datos no mostrados). A pesar de ello, es remarcable que cepas filogenéticamente relacionada a rizobios, estuvieron presentes formando parte de los biofilms mixtos en las comunidades bacterianas asociadas a rizósfera de alfalfa. Estas cepas de rizobio (C12 y S13) se encontraron en los grupos SRC y SRS, sugiriendo una tolerancia a condiciones de limitación de agua resultado de la salinidad pero no de la desecación.

Se ha examinado la identidad de las cepas con el ribotipo R4 (C7 y M10) que es un ribotipo compartido por la subpoblación de ACFB de SRC y SRD. Estas cepas fueron identificadas como miembros del género *Microbacterium*, indicando que algunas Actinobacterias tienen buena CFB.

Comparando nuestros resultados para la identificación de cepas (Tabla 5) y composición de ribotipos (figura 22 y 23) se sugiere que bajo condiciones no estresantes (SRC) las comunidades bacterianas pierden diversidad y está constituida principalmente por miembros del género *Rhizobiaceae* (R1) y Actinobacterias (R4, R7), bajo condiciones limitantes de agua (SRD, SRS), las comunidades presentan mayor diversidad y están constituidas principalmente por ribotipos únicos. Aunque están presentes miembros que comparten ribotipos con similares afiliaciones filogenéticas (R3, R7, R8), no son los ribotipos mayoritarios en la comunidad.

La presencia de miembros de Actinobacterias (particularmente Actinomycetes) en el biofilm ya establecido en la rizósfera de alfalfa es interesante por varias razones:

(i) la formación de biofilms mixtos incluye bacterias Gram-positivas (Actinobacterias) y bacterias Gram-negativas (Proteobacterias) que proveen un modelo atractivo de investigación del desarrollo de biofilm formados por bacterias de diferentes filogenias.; (ii) poco se sabe acerca del rol PGPR de los Actinomicetes (*plant growth-promoting rhizobacteria*) (Compant y col., 2010; Khamna y col., 2009; Merckx y col., 1987) en comparación con otras PGPR, como son *Pseudomonas* y rizobios; (iii) nuestros conocimientos de la estructura de las comunidades y la diversidad de Actinobacterias en la rizósfera de alfalfa es limitado; (iv) las Actinobacterias jugarían un rol importante en el microambiente rizosférico.

Debido al pequeño número de cepas secuenciadas, éstos resultados e interpretaciones representan sólo una limitada parte del entendimiento de la dinámica de estos microambientes. De todas maneras, este estudio es el primero en evaluar las comunidades rizosféricas de alfalfa como biofilms mixtos en condiciones de privación de agua, y por lo tanto estos resultados proveen una base importante para realizar más estudios adicionales en un futuro.

5.5.5. Características relacionadas a CFB de cepas bacterianas de tres tipos de suelos rizosféricos de alfalfa

La formación de biofilm es un proceso que consta de varias etapas que requiere de la integración de varios procesos fisiológicos bacterianos, incluyendo *quorum sensing* (Hooshangi y col., 2008; Parsek y col., 2008), movilidad (Klausen y col., 2003; Verstraeten y col., 2008), autoagregación (Sorroche y col., 2012) y producción de EPS (Sutherland y col., 2001; Rinaudi y col., 2009).

Se evaluaron las características relacionadas a la CFB de las bacterias seleccionadas en relación al ribotipo (Tabla 5). En general, la capacidad de las cepas de producir fenotipos relacionados a CFB fue variable. El fenotipo de autoagregación de las cepas osciló entre poca y alta capacidad de autoagregarse, aunque aparentemente no se relaciona con el origen de la cepa o la afiliación filogenética. Tampoco hubo ninguna correlación obvia entre ribotipo y producción de EPS. Sin embargo, cabe señalar que la fluorescencia de calcoflúor detecta solo la presencia de uniones β entre azúcares, y las cepas “negativas” pueden haber tenido la capacidad de ser productoras de EPS que no fue detectado por la tinción con calcoflúor.

La evaluación de señales de producción de QS muestra que todas las cepas testeadas fueron incapaces de sintetizar AHLs de cadenas cortas (datos no mostrados). Nueve de 13 cepas aisladas fueron capaces de producir AHLs de cadenas largas de acuerdo a la metodología empleada, no encontrando una relación directa de la CFB con la producción de AHL de las cepas testeadas como AHL-negativas.

Tres de cuatro cepas fueron AHL-negativas y pertenecieron al grupo de las cepas con BCFB y la otra (M1) pertenece al grupo de las cepas con ACFB y el resto de las cepas fueron todas productoras de AHLs.

Estos resultados sugieren que puede ocurrir intercambio de información en el microambiente rizosférico, reflejando la complejidad de estas interacciones a nivel del desarrollo de biofilm. Como se ha indicado previamente las señales sintetizadas de QS por ciertos miembros que conforman biofilms multiespecies, pueden coordinar el comportamiento global dentro de la comunidad (Williams y col., 2007).

La evaluación de producción de señales de QS se limitó a la detección de moléculas AHL. Este tipo de señal, que son típicamente producidas por bacterias Gram-negativas, fue sorpresivamente detectada en cepas identificadas como Actinobacteria. Estos resultados son interesantes debido a que los datos encontrados de los mecanismos de QS en Gram-positivas implican la producción de pequeños péptidos. No fue realizado un test para detectar la posible producción de un autoinductor2 (AI-2) señal, el cual ha sido informado que se produce en ambos tipos de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas (Li y col., 2012).

Los ensayos de movilidad (swimming) indican la presencia de tres grupos: (i) cepas no móviles, las cuales fueron asociadas con el grupo de BCFB identificadas como Actinobacterias, (ii) cepas con baja movilidad independientemente de la afiliación filogenética o de la CFB, y (iii) cepas con alta movilidad, las cuales han sido asociadas con cepas con ACFB identificadas como Proteobacterias (Tabla 5).

Para integrar y dar explicaciones de las relaciones entre las características relacionadas a la CFB, ribotipos, afiliaciones filogenéticas y tratamientos experimentales, se realizó un Análisis multivariado de Componentes Principales (PCA= "Principal Components Analysis"). Este análisis permite analizar la interdependencia de un conjunto amplio de variables y proveer una representación gráfica óptima con pérdida mínima de información, un nuevo conjunto de variables no correlacionadas que

expliquen la estructura de variación (Di Rienzo et al., 2014). Para el PCA, las observaciones (casos) fueron los ribotipos (R) y las afiliaciones filogenéticas (Actinobacteria, Proteobacteria) asociadas con diferentes tratamientos (CRS, DRS y SRS) y subpoblaciones (ACFB, BCFB); las variables fueron la CFB, autoagregación, movilidad, producción de AHL y de EPS de cada cepa.

El PCA aplicado a todos los datos en tres dimensiones (PC1, PC2 y PC3), explica aproximadamente el 86% de la variabilidad en este estudio. El gráfico generado desde PC1 y PC2 (que explican el 70% de la variabilidad) (Figura 22) indica que no podrían establecerse correlaciones con el tratamiento aplicado. Por lo tanto, la selección de características fenotípicas no fue afectada por las condiciones de limitación de agua. Se observa una clara separación en dos grupos en función de la afiliación filogenética en la CP2 y de la ACFB vs BCFB: (i) Actinobacteria con BCFB (ribotipos R7 y R8, encontrado para los tres tratamientos), y (ii) Actinobacteria con ACFB (Ribotipo R4, encontrado para SRC y SRD) y la mayoría de las Proteobacterias. El grupo (i) aunque se aproxima al fenotipo autoagregativo se aleja de algunas cepas con capacidad autoagregativa pueden permitir que esas cepas puedan unirse a otras ya adheridas al biofilm y tomen ventajas de las características de otros miembros. El grupo (ii) incluye un subgrupo de cepas que pertenecen a las α -proteobacterias (R3) y Actinobacterias (R4), similares en cuanto a la formación de biofilm. El posicionamiento de los ribotipos únicos como R1 y R19 cercano a estos subgrupos es interesante. Estas asociaciones de cepas con diferentes afiliaciones genéticas reflejan la complejidad de las posibles interacciones en biofilms multiespecies ya establecidos como una comunidad en la rizósfera de alfalfa. . La variabilidad de los aislamientos incluidos en ribotipos 3 y 4 (cuadrante inferior izq) se asocia a la producción de AHL

La ubicación de γ -proteobacterias ribotipo R3 (identificado como cepa M1), la cual no está estrechamente asociada a miembros del grupo (ii), es interesante porque esta cepa no pertenece a las α -proteobacterias y tiene fuertes características relacionadas a la CFB. Otro ribotipo único, R25 (cepa S37), está caracterizado por ser la más distante en relación a ambos grupos y a las características relacionadas a la CFB (Tabla 4; Figura 22).

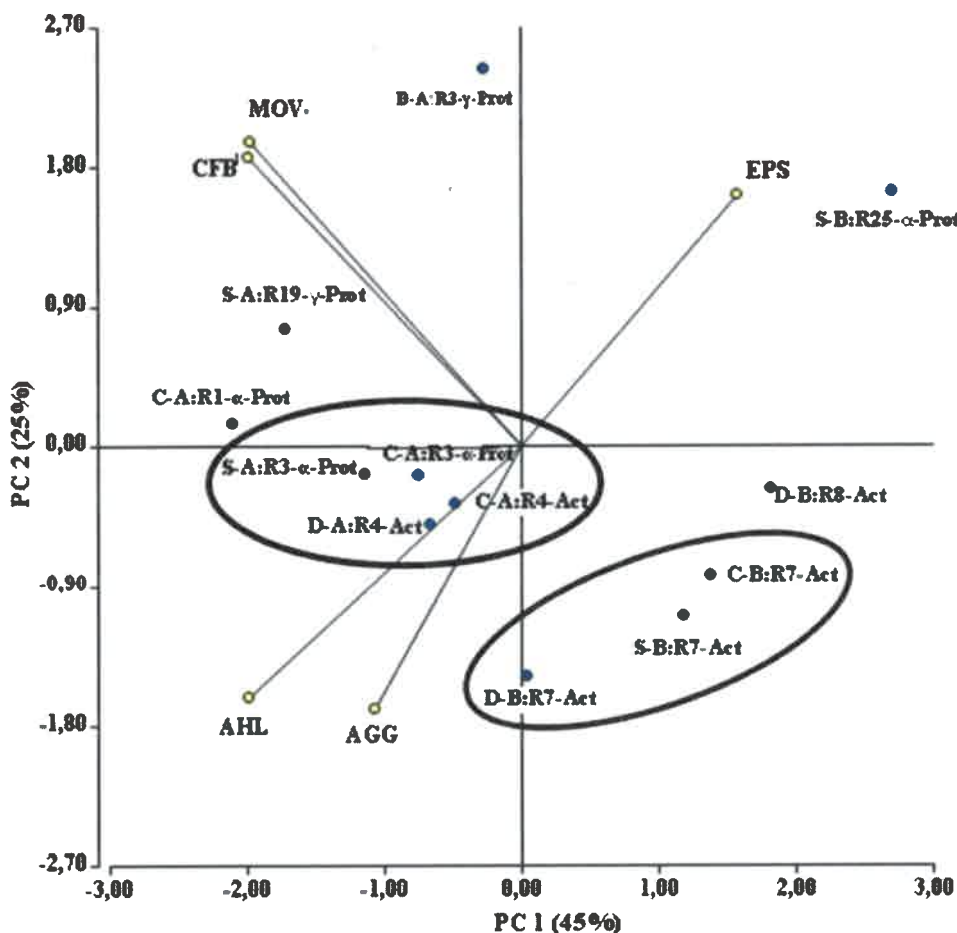


Figura 22. Análisis multivariado de componentes principales para integrar la CFB, ribotipos, afiliaciones filogenéticas y tratamientos experimentales de los aislamientos obtenidos. Los diamantes indican combinaciones de ribotipos, afiliaciones, tratamientos y formación de biofilm. R: ribotipo. Act: Actinobacteria. Prot: Proteobacteria. C: SRC. D: SRD. S: SRS. A: ACFB. B: BCFB. Círculos indican variables biológicas: CFB capacidad de formar biofilm; MOV, movilidad; AGG, autoagregación; AHL, producción de señales QS; EPS, producción de EPS.

Analizando las asociaciones entre las variables, encontramos una fuerte correlación positiva (ángulos agudos, Figura 22) entre las variables de movilidad y formación de biofilm. Estos resultados son consistentes con trabajos previos que evidencian que el paso inicial de la colonización y el subsecuente desarrollo de los otros pasos para la formación del biofilm depende de los diferentes mecanismos bacterianos de movilidad (Conrad y col., 2012). La formación de biofilm muestra una débil

correlación (ángulos más abiertos, Figura 22) con la producción de AHL y autoagregación. Una posible interpretación de estos resultados es que la bacteria, antes del contacto físico para autoagregarse, debe comunicarse, moverse, y luego interactúan entre ellas y con las superficies cercanas.

Sorprendentemente, no encontramos asociaciones (ángulos obtusos, Figura 22) entre la producción de EPS, la formación de biofilm, producción de AHL y la autoagregación, sugiriendo que esos mecanismos bacterianos podrían estar regulados y usados en distintas formas como determinados por el medio ambiente o señales de la planta. También es posible que otros EPSs y /o señales de QS no evaluadas en este estudio jueguen un rol importante en los procesos complejos del desarrollo de una comunidad multiespecífica.

Un mejor conocimiento de las características de las cepas bacterianas que les confieran un aumento en la supervivencia en La zona de íntimo contacto con la planta y frente a condiciones adversas y estresantes, sin duda será importante para gestionar las prácticas agrícolas. Los enfoques morfológicos, fisiológicos y moleculares para dilucidar los mecanismos bacterianos que mejoran la tolerancia a las condiciones de estrés constituyen estrategias claves a ser abordados a los fines de obtener este conocimiento.

5.6. Estudio del impacto de las bacterias y sus productos orgánicos sobre la agregación de las partículas de suelo.

La estructura del suelo es un factor clave en su funcionamiento debido a que de ello depende su capacidad para soportar la vida de los organismos que habitan y también la calidad medioambiental con particular énfasis en la retención del carbono del suelo. La estabilidad de los agregados es utilizada como un indicador de la estructura del suelo (Six y col., 2000). La agregación resulta del reordenamiento de las partículas, floculación y sedimentación (Duiker y col., 2003). La misma está mediada por el carbono orgánico del suelo (COS), la biota, iones, arcilla y carbonatos. El COS actúa como agente cementante y como núcleo en la formación de estos agregados. La biota y sus productos orgánicos contribuyen en el desarrollo de la estructura del suelo, los cuales a su vez ejercen un control significativo sobre la dinámica del COS. La arcilla también actúa como agente cementante, uniendo partículas (Bronick y Lal, 2004).

La estructura del suelo se refiere al tamaño, forma y organización de partículas sólidas combinadas con espacios vacíos, continuidad de poros, su capacidad de retención de agua, fluidos y sustancias orgánicas e inorgánicas, como así también su eficacia para soportar raíces y su desarrollo (Lal, 1991). La estructura más propicia del suelo y la gran estabilidad de sus agregados son importantes para mejorar la fertilidad, incrementando de esta manera la productividad agronómica, mejorando la porosidad y disminuyendo también la erosionabilidad.

Los agregados son partículas secundarias formadas por la combinación de partículas minerales con sustancias orgánicas e inorgánicas. Éstos pueden ser de varios tamaños y formas, los cuales muy a menudo son agrupados por tamaño: macroagregados ($> 250 \mu\text{m}$) y microagregados ($< 250 \mu\text{m}$) (Tisdall y Oades, 1982). Los diferentes grupos varían en las propiedades de aglutinamiento y la distribución de carbono y nitrógeno. El complejo dinámico de agregación es el resultado de la interacción de muchos determinantes. En general los siguientes factores influyen sobre la agregación del suelo: 1) la fauna, 2) los microorganismos, 3) las raíces de las plantas, 4) los agentes aglutinantes inorgánicos y 5) las variables medioambientales del suelo (Six y col., 2004). En particular de los factores estudiados en este trabajo las bacterias en el suelo forman estructuras similares a colonias bacterianas y sus exudados forman una cápsula de polisacáridos alrededor de las mismas cuya función es la de proteger a las bacterias, inhibiendo la descomposición del COS en su interior (Bronick y Lal, 2004).

Así mismo, las plantas influyen en las propiedades del suelo como son la composición mineral, textura, concentración de COS, actividades microbianas, intercambios iónicos, reservas de nutrientes y disponibilidad de humedad (Kay, 1998).

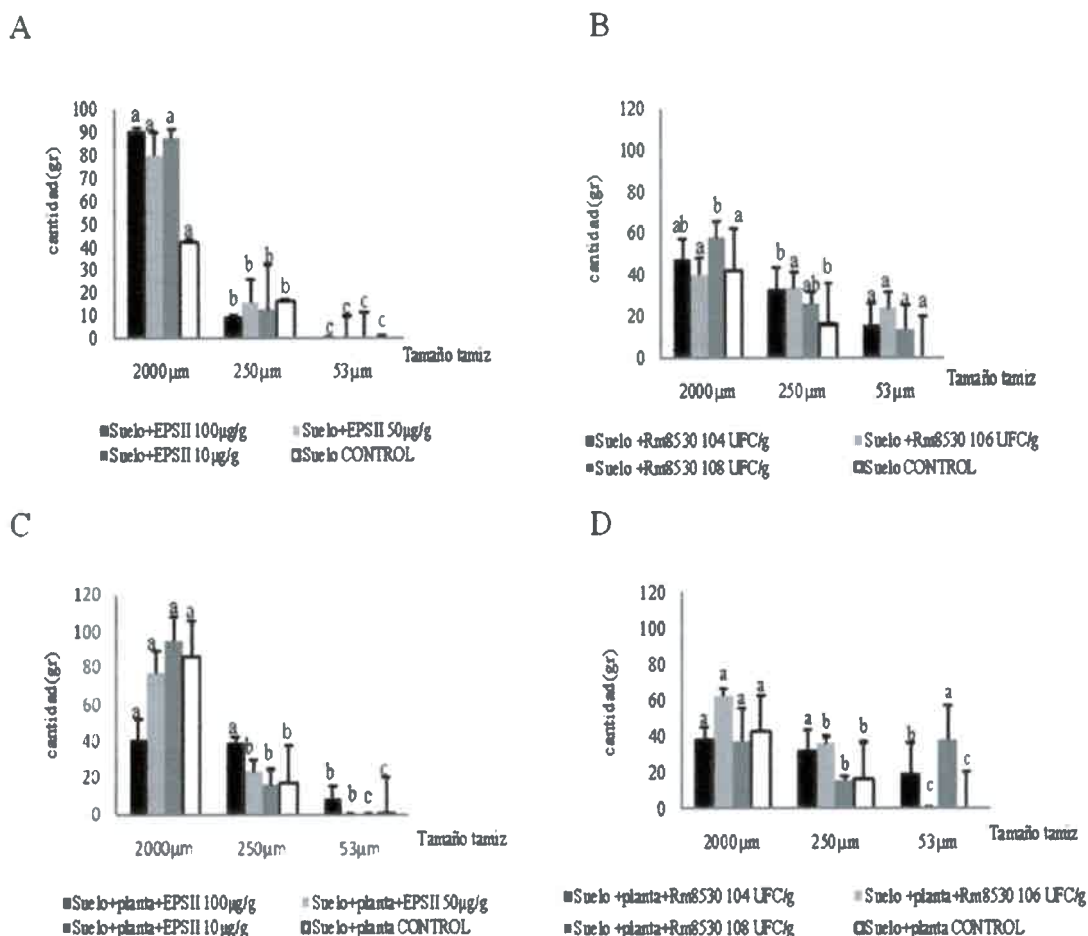


Figura 23. Efecto de bacterias, EPS y presencia de plantas sobre la agregación del suelo. A) Suelo sin plantas y 10, 50 y 100 µg de EPS/g de suelo, B) Suelo sin plantas y 10⁴, 10⁶, o 10⁸ UFC de *E. meliloti* Rm 8530 /gr de suelo C) Suelo con plantas de alfalfa y 10, 50 y 100 µg de EPS/g de suelo D) Suelo con plantas y 10⁴, 10⁶, o 10⁸ UFC *E. meliloti* Rm 8530 /gr de suelo. Las barras indican promedios de valores en gramos de cantidad de agregados, realizado con tres repeticiones independientes para cada tratamiento. Para cada tamiz diferentes letras indican diferencias significativas en la cantidad de agregados, según el test de LSD Fisher (p<0,05).

Tomando en consideración estos aspectos en este ensayo se evaluó la cantidad en g de agregados formados. Se realizó un estudio de la influencia bacteriana sobre las propiedades físicas de los suelos de acuerdo al siguiente diseño: a) suelo control no tratado, b) suelo tratado con bacterias con alto potencial de agregación (*E. meliloti* Rm8530), inoculándose con 10⁴ células/g de suelo, 10⁶ células/g de suelo y 10⁸ células/g de suelo y c) suelo tratado con EPSII purificado, (posible molécula autoagregativa), utilizándose las siguientes concentraciones: 10 µg/g de suelo, 50 µg/g de suelo y 100 µg/g de suelo. Este procedimiento se hizo por quintuplicado y se realizó

tanto en suelo sin plantas como con plantas de alfalfa (Figura 23). Luego en cada caso y mediante el empleo de técnicas de tamizado del suelo fueron evaluados y comparados las cantidades de agregados formados, la distribución de éstos en fracciones y la estabilidad mecánica de los mismos. En la figura 24 se pueden observar las diferencias estadísticamente significativas en cada una de las interacciones que existen entre los distintos tratamientos con el suelo y la planta.

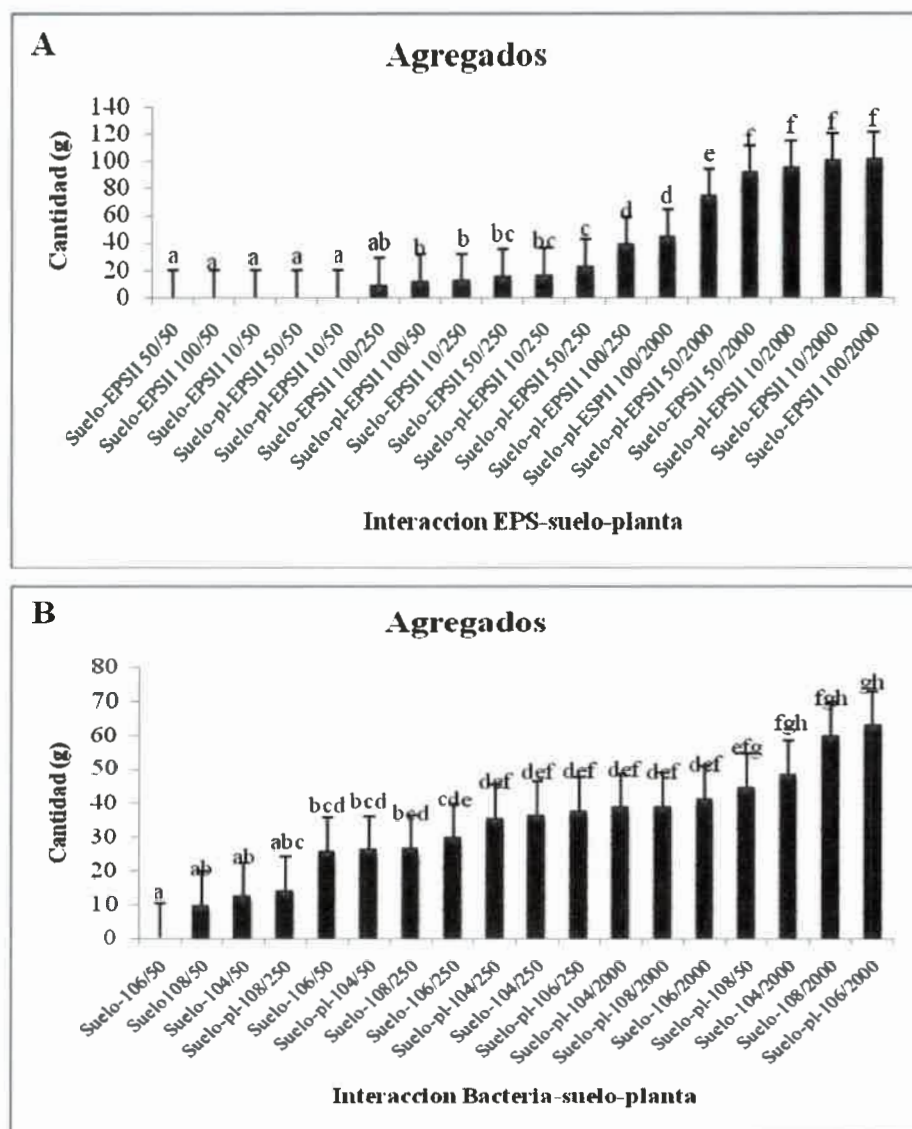


Figura 24. A.) Interacción EPS-Suelo-Planta y B.) Interacción Bacteria potencialmente autoagregativa-Suelo-Planta. Las barras indican promedios de valores en gramos de cantidad de agregados, realizado con tres repeticiones independientes para cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas en las interacciones, según el test de LSD Fisher ($p < 0,05$).

En función de la influencia de bacterias y sus EPSs; y de plantas de alfalfa se observó que existió una diferencia significativa en la cantidad de agregados formados en el tamiz de 2000 μm para el tratamiento realizado con distintas concentraciones de EPS respecto del control, estos resultados nos indican que independientemente de la concentración de EPS utilizado, se forman macroagregados, ya que en este tamiz quedan retenidos los agregados de mayor tamaño (Figura 24 A y 24 B).

En la figura 26 A se puede observar la interacción que existe entre las distintas concentraciones de EPS, el suelo y la planta. En términos generales, los agregados de mayor tamaño se formaron en ausencia de planta e independientemente de la concentración de EPS utilizado. La formación de agregados mas pequeños se vieron en presencia de las menores concentraciones del exopolisacárido, y no se ve influencia por parte de la planta, ya que no se observa diferencias estadísticamente significativas. Por último, los agregados de tamaño intermedio se formaron en la mayoría de los casos en presencia de plantas y en concentraciones elevadas de EPS.

En general se observa que los agregados de mayor tamaño estuvieron influenciados cuando se le adicionó al ensayo EPS y no la bacteria productora del mismo.

En la figura 23 C se observa sorprendentemente que cuando la concentración de EPS fue de 100 $\mu\text{g/g}$ de suelo, refiriéndonos a los resultados obtenidos en el tamiz de 2000 μm , la cantidad de agregados resultó menor, pero es mayor en los tamices de 250 y 53 μm , respecto de las otras concentraciones de EPS y al control (Figura 24 B). En este ensayo además de las distintas concentraciones de EPS debemos contar con la influencia de las raíces de las plantas de alfalfa, ya que han sido adicionadas a cada tratamiento, tales resultados nos podrían estar diciendo que los EPS interaccionan íntimamente con las raíces de las mismas para formar estos macro y microagregados. Curiosamente se observa que cuando la concentración de EPS es de 10 $\mu\text{g/g}$ la cantidad de macroagregados tiene una diferencia significativamente mayor respecto de las otras concentraciones de EPS y del control respectivamente, en la fracción del tamiz de mayor tamaño.

En los tratamientos del suelo inoculado con distintas UFC/g de suelo de bacterias con alto potencial de autoagregación (*E. meliloti* Rm 8530) se pudo determinar que el suelo con el mayor número de bacterias (10^8 células/gr de suelo) fue el que comparado a los otros tratamientos y al control formó agregados de mayor tamaño. Por lo tanto estaríamos en condiciones de decir que estas bacterias colaboran a la formación

de macroagregados. Además se observó que cuando el suelo fue inoculado con las distintas UFC/g de bacterias forma más agregados respecto del control (Figura 23 C).

Finalmente, la inoculación del suelo con bacterias en presencia de plantas de alfalfa (Figura 23 D), produjo resultados diferentes a la inoculación en ausencia de plantas, sin embargo se puede destacar que cuando se inoculó con la mayor concentración de bacterias, los agregados estuvieron en mayor cantidad en la fracción del tamiz de 53 micras, considerándolos microagregados. No obstante el suelo tiende a formar más macroagregados respecto a los otros tratamientos y a su control, indicando que las bacterias estarían en íntima relación con las raíces de las plantas, lo cual sería beneficioso para formar macroagregados.

Cabe destacar que el suelo cuyas partículas tuvieron un tamaño menor a 53 micras no se lo consideró como agregado, dicha fracción fue descartada.

Es sabido que las micorrizas y los hongos saprofitos son los microorganismos que más influyen en la formación de agregados en el suelo y estabilidad de los mismos, pero también las bacterias tienen una gran influencia sobre la agregación. En consonancia con los resultados mostrados (Figura 24), las bacterias pueden mecánicamente romper agregados preexistentes, pero también pueden estabilizar agregados circundantes a través de los exudados de las raíces cuando se encuentran en íntima relación con las mismas y por medio de la producción de exopolisacáridos (Six y col., 2004).

Martin y colaboradores (1955) han descripto en detalle la influencia positiva que tienen los residuos orgánicos, la actividad microbiana, acondicionadores sintéticos del suelo e intercambio de cationes sobre la agregación del mismo. También existen innumerables reacciones químicas que influyen en la formación de estos agregados y las prácticas agrícolas afectan de manera negativa a los mismos (Harris y col., 1966).

La contribución de la actividad microbiana en la formación de agregados, estabilización y eventualmente degradación ha sido muy estudiado (Lynch y Bragg, 1985; Oades, 1993 y Degens, 1997). Los diferentes grados de correlación entre agregación del suelo y biomasa microbiana o productos microbianos (entre ellos polisacáridos) están relacionados a la textura del suelo como así también a su composición mineral. El micelio fúngico ha sido descripto como una "bolsa pegajosa" porque enreda partículas entre sus hifas y libera polisacáridos que también actúan como moléculas "cementantes" (Oades y Waters, 1991).

El rol de los carbohidratos en el mejoramiento de la estructura de los suelos es

variable, relacionado a la fuente y la naturaleza de los mismos, así como en las propiedades de los agregados y los factores ambientales. Los carbohidratos procedentes de las plantas se encuentran en la fracción de la arena, en cambio los carbohidratos generados por la actividad microbiana están presentes en las fracciones de limo y arcilla (Schulten y Leinweber, 2000). Los carbohidratos que derivan de la actividad microbiana son resistentes a la descomposición. La disminución en la labranza del suelo, adición de estiércol, y cultivos de cobertura, están asociados con el aumento de las concentraciones de carbohidratos y por consiguiente en el mejoramiento de la estructura del suelo (Sheperd y col., 2001, Debosz y col., 2002b).

Particularmente, los polisacáridos, son fácilmente mineralizables y actúan como agentes de unión de forma transitoria, iniciando la agregación, pero quizás no tengan un largo período de estabilidad (Kay, 1998, Tisdall y Oades, 1982). Éstos son fácilmente adsorbidos por las superficies minerales, actuando como partículas cementantes para unir las partículas del suelo (Kay, 1998, Martens, 2000). En el mismo sentido, los polisacáridos también pueden comportarse como un gel, actuando como un pegamento capaz de unir partículas dentro de los agregados (Haynes y Beare, 1997).

Raíces, hongos y bacterias mejoran la agregación mezclándose con las partículas del suelo y brindando compuestos extracelulares para que las partículas se mantengan unidas. El efecto que tiene la actividad microbiana sobre el tamaño de los agregados depende de numerosos factores. En algunos casos, la actividad microbiana puede influenciar sobre el tamaño de los agregados (Mendes y col., 1999), mientras que en otros casos quizás no (Schutter y Dick, 2002). Las bacterias y sus polisacáridos se asocian con la fracción de arcilla y conforman los microagregados que luego pasan a ser macroagregados (Tisdall y Oades, 1982; Lupwayi y col., 2001).

La agregación del suelo es un proceso clave en el ecosistema resultando en la formación y estabilización de la estructura del suelo, y resultando en una matriz de poros espaciados. La agregación es importante para el crecimiento de las raíces, el cual es un proceso complejo regulado por factores abióticos y mediado por múltiples grupos de macro y microorganismos y sus interacciones (Six y col., 2004; Rilling y Mummey, 2006; Leifheit y col., 2014).



6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se plantean las siguientes conclusiones:

Se demostró que la cepa de *E. meliloti* Rm8530 permaneció viable frente al estrés hídrico a través del tiempo, pero además ha sido capaz de aumentar su número, en comparación con Rm1021 y Rm8530*expA*, las cuales disminuyeron su viabilidad. Este aumento en la viabilidad podría deberse a la capacidad de Rm8530 de producir EPS II, lo cual le daría ventaja para sobrevivir en ambientes hostiles; en consonancia con la vinculación del EPS II a la capacidad de las cepas de *E. meliloti* de formar biofilms y de autoagregar ambos fenotipos asociados a la supervivencia bacteriana en el ambiente. Si bien no está claro cuál es el papel que cumple el EPS II en el crecimiento de Rm8530, podríamos especular que este exopolisacárido estaría captando nutrientes que favorecerían el crecimiento de dicha bacteria.

Se determinó una marcada disminución de la supervivencia de *E. meliloti* Rm1021, frente a concentraciones crecientes de NaCl. Por lo tanto podemos inferir que la capacidad de supervivencia sería dependiente de la producción de EPS II, ya que la misma es incapaz de sintetizarlo. Por el contrario para las cepas Rm8530 y Rm8530*expA*, la exposición al estrés salino no determinó grandes cambios en la viabilidad.

Se observó un cambio de fenotipo (de seco a mucoso) en algunas colonias de la cepa Rm1021, sometidas a situaciones de estrés, lo cual nos indicaría que las mismas poseen un mecanismo para poder sobrevivir frente a situaciones ambientales adversas. El cambio fenotípico se podría deber a un cambio fisiológico de reversión de fase, o a un cambio genético que involucraría la activación del gen *expR*.

La CFB se incrementó en concentraciones crecientes de soluto para la cepa *Pseudomonas fluorescens* WCS417r, siendo muy marcado el efecto en presencia de PEG respecto de NaCl.

La cepa de Rm8530 redujo la formación de biofilm en presencia de soluto en relación al medio sin soluto extra (LB/2), mientras que para Rm1021 el agregado de soluto no modificó la pobre capacidad de adherirse al soporte. Se determinó que el agregado de soluto no permeable (PEG) al medio, condujo a que la mayor parte de la

biomasa se encuentra formando parte de un biofilm en comparación a las células libres, cuyo efecto es muy marcado para la cepa de *Pseudomonas fluorescens* WCS417r.

Los resultados obtenidos de la CFB para el par de cepas de Rm 8530 y *P. aeruginosa* WCS417r, muestran un comportamiento diferente al de cada cepa por separado. Se determinó que en presencia de NaCl el crecimiento bacteriano aumentó, respecto del control sin agregados de solutos, lo que determinó una relación B/C muy pequeña y la CFB fue muy reducida. La adición de PEG al medio determinó un crecimiento despreciable y una alta CFB, lo cual se ve reflejado en una alta relación B/C.

Con respecto a los co-cultivos realizados con dos cepas de *E. meliloti* Rm8530 *expA* y Rm8530 *lpsB*, se observó que ambas fueron capaces de formar gran cantidad de biofilm en condiciones de estrés generado por la presencia de PEG, así mismo el crecimiento celular en este caso fue escaso

El agregado de NaCl y PEG al medio de cultivo afectó la autoagregación en el cultivo mixto entre Rm8530 y Rm8530*expA*, de igual manera sucedió en el cultivo individual para la cepa Rm8530*expA*, de manera que estos resultados ponen en evidencia que la inhibición en la producción de EPS II tiene influencia en la autoagregación, ya que la cepa Rm8530 bajo las mismas condiciones no se vió afectada en la autoagregación.

Los recuentos obtenidos para los suelos rizosféricos (SRC, SRS y SRD) fueron superiores al recuento obtenido en el suelo entero (SE), lo que estaría evidenciando la presencia de poblaciones de mayor tamaño asociadas a suelo rizosférico debido a la fuente de nutrientes que representan los exudados radicales.

Se destaca que la comunidad obtenida del suelo rizosférico sometido a estrés por desecación (SRM) presentó una CFBT mayor que los otros tratamientos y que el suelo entero. La comunidad recuperada del suelo rizosférico salino (SRS) fue la que presentó la CFBT más reducida. Estos datos nos conducirían a inferir que la condición de estrés modifica la composición de los exudados radicales y en consecuencia afecta la comunidad bacteriana que se establece en las proximidades de las raíces.

La rizósfera de *Medicago sativa* proveniente de ensayos con plantas expuestas a diferentes condiciones de limitación de agua, presentan distintas comunidades microbianas con diferentes capacidades para desarrollar biofilms y establecerse en ese microambiente, presumiblemente para mejorar las condiciones de supervivencia.

Los suelos rizosféricos de alfalfa expuestos a condiciones de desecación (SRD) contienen comunidades bacterianas con más alta CFB en comparación a las expuestas a estrés salino (SRS) o a condiciones en la cual el agua no es un limitante (SRC). Estos resultados nos permitirían concluir que la limitación de agua lleva a la selección de cepas bacterianas con mayor CFB en la rizósfera de alfalfa, como una forma de protegerse y sobrevivir a la desecación del suelo.

El análisis ribotípico basado en la técnica de ARDRA mostró que las comunidades bacterianas presentes en los tres suelos (SRC, SRD, SRS) fueron muy diferentes debido a la posible existencia de procesos de diversificación en situaciones de estrés. En tal circunstancia un grupo más variado de bacterias se establece como consorcio mixto en zonas cercanas a las raíces de alfalfa, probablemente en respuesta a la búsqueda de micronichos menos hostiles. Por tal motivo se podría decir que el estrés es un factor que modula la fisiología de la planta huésped, las especies bacterianas y la comunidad rizosférica.

El análisis de afiliación filogenética de las cepas seleccionadas mostró que Actinobacterias y Proteobacterias fueron los miembros predominantes en el suelo rizosférico de alfalfa

Los agregados del suelo son partículas secundarias formadas por la combinación de partículas minerales con sustancias orgánicas e inorgánicas. Se evaluó la cantidad de agregados y se determinó que existe una diferencia significativa en la cantidad de agregados formados con las distintas concentraciones de EPS utilizados. Esto podría indicar que independientemente de la concentración de EPS, el suelo tiende a formar macroagregados, lo mismo sucedió cuando los suelos fueron inoculados con bacterias de *E. meliloti* Rm8530.

Se puede observar que la formación de macroagregados aumentó cuando se incluyeron plantas de alfalfa en los diferentes tratamientos, lo cual podría sugerir que los EPS y las bacterias en cada caso podrían estar en íntima relación con las raíces de las plantas para formarlos, lo que sería muy beneficioso para los suelos en donde se desarrollan estas interacciones.

Finalmente la figura 25 presenta un modelo integrador el cual permite concluir que en general las condiciones de estrés generan una disminución en la CFB de las bacterias no productoras de EPS (Rm1021), a diferencia de las cepas Rm8530 y Rm8530expA, las cuales aumentan su CFB por disponer de una copia intacta del gen *expR*. Este aumento en la CFB está relacionado con una reducción en los efectos provocados por la desecación, un incremento en la supervivencia bacteriana, optimizando de esta manera el crecimiento de la planta. Además esto trae aparejado una beneficiosa estructuración de los suelos ya que en la rizósfera los microorganismos se encuentran principalmente como comunidades microbianas, mejorando así la agregación de los suelos donde habitan.

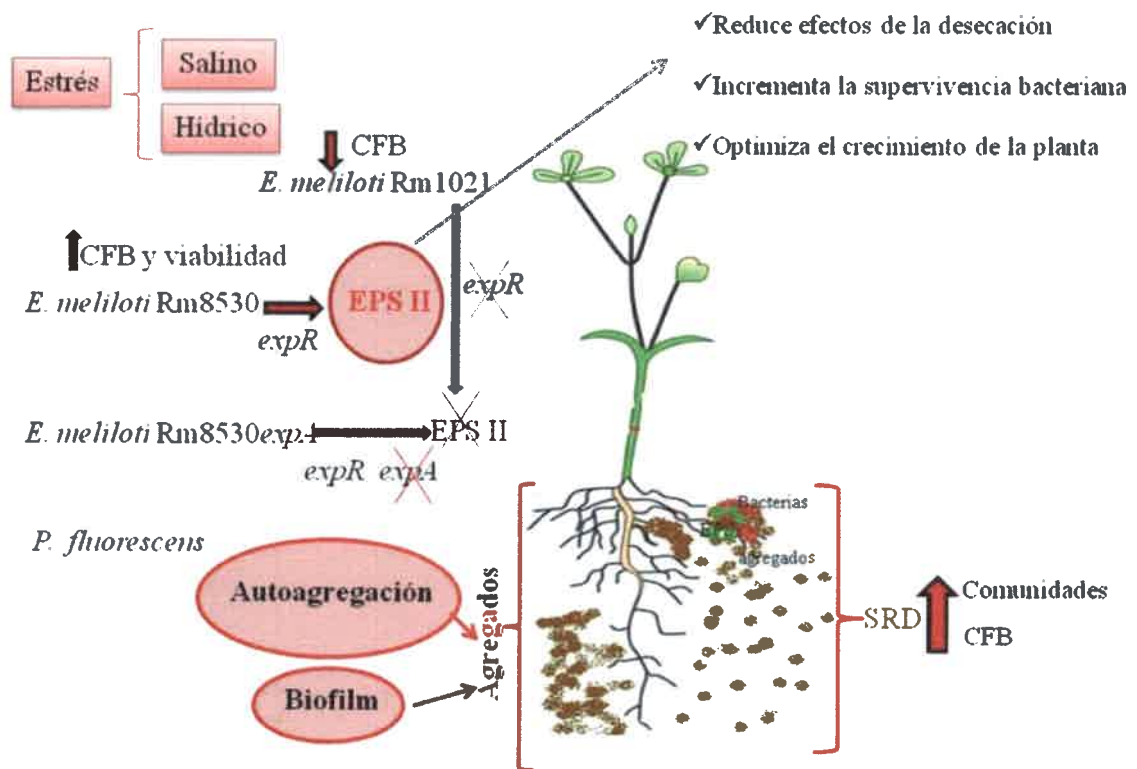


Figura 25. Modelo integrador que refleja el efecto generado por estrés osmótico en las comunidades bacterianas y el efecto de la CFB sobre la estructuración del suelo

7. ANEXO

7.1. Medios de cultivos para bacterias

Medio LB (Luria-Bertani) (Sambrook y col., 1989)

Triptona	1%
Extracto de levadura	0.5%
NaCl	1%
Agar	1.5%

(Se adicionó cuando se requirió medio sólido)

pH	7
----	---

TY (*Tryptone-Yeast extract*) (Beringer, 1974).

Triptona	0.5%
Extracto de levadura	0.3%
CaCl ₂	0.1%
Agar	1.5%

(Se adicionó cuando se requirió medio sólido)

pH	7
----	---

MGM (*Minimal Glutamate Mannitol*) bajo fosfato

MOPS	150mM
Glutamato de sodio	19mM
Manitol	55mM
K ₂ HPO ₄ - KH ₂ PO ₄	0.1mM

(concentraciones equimolares)

MgSO ₄	1mM
CaCl ₂	0.25mM
Biotina	0.004 mM
pH	7,2



8. BIBLIOGRAFÍA

Agaras B., Wall L.G., Valverde C. (2012). Specific enumeration and analysis of the community structure of culturable pseudomonads in agricultural soils under no-till management in Argentina. *Appl Soil Ecol* 61: 305-319. Doi:10.1016/j.apsoil.2011.11.016.

Alami, Y., Achouak, W., Marol. C., Heulin, T. (2000). Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Appl Environ Microbiol* 66, 3393-3398.

Albareda M., Dardanelli M.S., Sousa C., Megías M., Temprano Fy Rodriguez-Navarro D.N (2006). Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to vean and soybean roots. *FEMS Microbiol. Letters* 259:67-73.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J. Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J.(1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.

Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59, 143-169.

An, D., Danhorn, T., Fuqua, C., Parsek, M.R. (2006). Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm coculture. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 3828-3833.

Anderson, G.G., O'Toole, G. A. (2008). Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. En: *Bacterial Biofilms* (ed. Romeo T.) pp. 85-105. Springer, Heidelberg.

Andreote F.D., Mendes R., Andreote F.D., Rosetto P.B., Labate C.A. (2008). Transgenic tobacco revealing altered bacterial diversity in the rhizosphere during early plant development. *Anton leew.* 93:415-424. Doi:10.1007/s10482-007-9219-6. PubMed: 18181027.

Angelard, C., Tanner, C.J., Fontanillas, P., Niculita-Hirzel, H., Masclaux, F., Sanders, I.R. 2014. Rapid genotypic change and plasticity in arbuscular mycorrhizal fungi is caused by a host shift and enhanced by segregation. *The ISME jour.* 8:284-294.

Appun A., Joergensen R.G. (2006). Microbial colonization of roots as a function of plant species. *Soil Biol Biochem* 38:1040-1051

Bahat-Samet, E., Castro-Sowinski, S., Okon, Y. (2004). Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Letters* 237:195-203

Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G; Gilroy S., Vivanco J.M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57: 233-266. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159.PubMed:16669762.

Bahattacharya I., Das H.R. (2003). Cell surface characteristics of two halotolerant strains of *Sinorhizobium meliloti*. *Microb.l Res* 158: 187-194.

Beringer, J.E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J of Microbiol.* 84:188-198

Bertram-Drogatz, P. A., Quester, I., Becker, A., Pühler, A. (1998). The *Sinorhizobium meliloti* MucR protein, which is essential for the production of high-molecular-weight succinoglycan exopolysaccharide, binds to short DNA regions upstream of *exoH* and *exoY*. *Mol and General Gen.* 257: 433-441.

Bertram-Drogatz, P. A., Rüberg, S., Becker, A., Pühler, A. (1997). The regulatory protein MucR binds to a short DNA region located upstream of the *mucR* coding region in *Rhizobium meliloti*. *Mol Genom and Gen.* 254(5): 529-538.

Bieber, D., Ramer, S. W., Wu, C.Y., Murray, W.G., Tobe, T., Fernandez, R., Shoolnik, G.K. (1998). Tye IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Sci* 280:2114-2118.

Billi D., Potts M. (2000). Life without water: responses of prokaryotes to desiccation. In: KB StoreyJMStorey. Environ stressors and gene responses. pp. 181-192.

Bogino, P., Oliva, M. M., Sorroche, F. G., Giordano W. (2013). The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. International J of Mol Sci.

Bogino, P., Banchio, E., Rinaudi, L., Cerioni, G., Bonfiglio, C., Giordano, W. (2006). Peanut (*Arachis hypogaea*) response to inoculation with *Bradyrhizobium* sp. in soils of Argentina. Ann Appl Biol 148 207-212.

Bogino, P., Banchio, E., Giordano, W. (2010). Molecular diversity of peanut-nodulating rhizobia in soils of Argentina. J Basic Microbiol 50: 274-279.

Bogino, P., Banchio, E., Rinaudi, L., Cerioni, G., Bonfiglio, C., Giordano, W. (2006) Peanut (*Arachis hypogaea*) response to inoculation with *Bradyrhizobium* sp. in soils of Argentina. Ann Appl Biol 148 207-212.

Bongiovanni, M., Lobartini, J.C. (2006). Particulate organic matter, carbohydrate, humic acid contents in soil macro-and microaggregates as affected by cultivation. Geo 136, 660-665.

Bossier, P., Verstraete, W. (1996). Comamonas testosteroni colony phenotype influences exopolisaccharide production and coaggregation with yeast cells. Appl and environ microbiol. 62(8):2687-2691

Burdman, S., Juekevitch, E., Schewartsburd, B., Okon, Y. (2009). Involvement of outer membrane proteins in the aggregation of *Azospirillum brasilense*. Microbiol. 145:1145-1152.

Branda S.S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R. (2005). Biofilms: The matrix revisited. Trends in Microbiol. 13:20-26

Breedveld, M.W., Zevenhizen, L. P. T. M., Zehnder, A. J. B. (1990) Osmotically-induced oligo- and polysaccharide synthesis by *Rhizobium meliloti* SU-47. J of Gen Microbiol. 136: 2511-2519.

Breg G., Smalla K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. FEMS microbiol Ecol 68: 1-13.

Brown, A.D. (1990). Microbial water stress physiology, principles and perspectives. John Wiley and Sons, Inc, New York.

Burmølle, M., Webb, J.S., Rao, D., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., Kjelleberg, S. (2006). Enhanced biofilm formation and increased resistance towards antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. Appl Environ Microbiol 72, 3916-3923.

Burmølle, M., Hansen, L., Sørensen, J. (2007) Establishment and early succession of a multispecies biofilm composed of soil bacteria. Microbial Ecol 54, 352-362.

Bronick C.J. y Lal, R. 2005. Soil structure and management: a review. Geoderma 124: 3-22.

Campbell, G.R.O., Reuhs B.L. y Walker G.C. (2002). Chronic intracellular infection of alfalfa nodules by *Sinorhizobium meliloti* requires correct lipopolysaccharide core. Proceedings of the National Academy of Sci. 99:3938-3943.

Campbell, G.R.O., Sharypova, L.A, Scheidle, H., Jones, K.M., Niehaus, K., Becker. A., Walker, G.C., (2003). Striking complexity of lipopolysaccharides defects in a collection of *Sinorhizobium meliloti* using agarose gelelectrophoresis. J of Bacteriol 113:229-242

Casse, F., Boucher, C., Julliot, S., Michel, M., Dénarié, J. (1979). Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J of Bacteriol.* 113: 229–242.

Castellanos, T., Ascencio, F., Bashan Y. (1998). Cell surface lectins of *Azospirillum spp.* *Curr. Microbiol.* 36:241-244.

Cha, C.E., Gao, O., Chen, Y.C., Shaw, P.D., Farrand, S.K. (1998). Production of acylhomoserine lactone quórum-sensing signals by gram negative plant associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact.* 11: 1119.1129.

Chaney, K., Swift, R.S. (1984). The influence of organic matter on aggregate stability in some British soils. *J Soil Sci* 35, 223-230.

Chang, W.S., Halverson, L.J. (2003). Reduced water availability influences the dynamics, development, and ultrastructural properties of *Pseudomonas putida* biofilms. *J. Bacteriol* 185, 6199-6204.

Chang, W.S., van de Mortel, M., Nielsen, L., Nino de Guzman, G., Li, X., Halverson, L.J. (2007) Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *J. Bacteriol* 189, 8290-8299.

Cheng, H.P., Walker, G.C. (1998) Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 180, 5183-5191.

Cheng, H.P., Walker, G.C. (1998) Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 180, 5183-5191.

Chenu, C., Le Bissonnais., Y., Arrouays, D., 2000. Organic matter influence on clay wettability and soil aggregate stability. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 1479-1486.

Christensen B.B., Haagenen J.A., Heydorn A., Molin S. (2002). Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium. *Appl Environ microbiol* 68: 2495-2502.

Clover, R. H., Kieber, J., Signer, E.R. (1989). Lipopolysaccharide mutants of *Rhizobium meliloti* are not defective in symbiosis. *Journal of Bacteriology* 171:3961-3967.

Compant S., Clement C., Sessitsch A. (2010). Plant v growth-promoting bacteria in the rizho- endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* 42:669-678. doi: 10.1016/j.soilbio.2009.11.024.

Costa R., Gotz M., Mrotzec N., Lottmann J., Berg G. (2006). Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiol Ecol* 56: 236-249.

Cytryn, E.J., Sangurdekar, D.P., Streeter, J.G., Franck, W.L., Chang, W., Stacey, G., Emerich, D.W., Joshi, T., Xu, D., Sadowsky, M.j. (2007). Transcriptional and physiological responses of *Bradyrhizobium japonicum* to desiccation-induced stress.

Dardanelli M.S., Fernández de Córdoba F.J., Rosario Esouny M., Rodriguez Carvajal M.A., Diaz Soria (2008). Effect of *Azpspirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biol Biochem* 40: 2713-2721. doi: 10.1016/j.soilbio.2008.06.016.

Davey , M. E., O'Toole, G. A. (2000). Micorbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol and mol biol rev.* 64 (4):847-867.

Dell'Amico E., Cavalca L., Andreoni V. (2005). Analysis of rhizobacterial communities in perennial Graminaceae from pollutes water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 52: 153-162. doi: 10.1016/j.femsec.2004.11.005. PubMed:16329902.

Dimkpa C., Weinand T., Asch F. (2009). Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ* 32: 1682-1694. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x.PubMed: 19671096.

Dinel, H., Lévesque, P.E.M., Jambu, P., Righi, D. (1992) Microbial activity and long-chain aliphatics in the formation of stable soil aggregates. *Soil Sci Soc Am J* 56, 1455-1463.

Dominguez-Ferreras, A., R. Perez-Arnedo, A. Becker, J. Olivares, M.J.Soto, J. Sanjuan. 2006. Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymb for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 188:7617-25.

Davies, D.G., Marques, C.N. (2009). A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J. of Bacteriol.* 191 (5): 1393-403.

De Araujo, C., Balestrino, D., Roth, L., Charbonnel, N., Forestier, C. (2010). Quorum sensing affects biofilm formation through lipopolysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Res in Microbiol.* 161(7): 595-603.

Debosz, K., Petersen, S.O., Kure, L.K., Ambus, P., 2002b. Evaluating effects of sewage sludge and household compost on soil physical, chemical and microbiological properties. *Appl. Soil. Ecol.* 19, 237-248.

Degens, B.P., 1997. Macro-aggregation of soils by biological bonding mechanisms and the factors affecting these: a review. *Aust. J. Soil. Res.* 35, 431-459.

De La Fuente, L., Burr, T. J., Hosch, H. C. (2008). Autoaggregation of *Shigella* *fastidiosa* cells is influenced by type I and type IV pili. *Appl and environ microbiol.* 74:5579-5581.

Del Re, B., Busetto, A., Vignola, G., Sgorbati, B., Palenzona, D. L. (1998). Autoaggregation and adhesion ability in a *Bifidobacterium suis* strain. *letters in appl microbiol.* 74:5579-5581.

Duiker, S.W., Rhoton, F.E., Torrent, J., Smeck, M.E., Lal, R. 2003. Iron (hydr)oxide crystallinity affects on soil aggregation. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 67, 606-611.

Dunne, M. W. (2002). Bacterial Adhesion. Seen Any Good Biofilms Lately?. *Clinical Microbiol Rev.* 15 (2): 155-166

Eberl, L., Tummeler, B. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. *Int J Med Microbiol.* 294, 123-131

Eddie, J., Cytryn, Dipen, P., Sangurdekar, Jhon G., Streeter, William L., Franck, Woo-Suk Chang, Gary Stacey, David W. Emerich, Trupti Joshi, Dong Xu y Mcihael J. Sadowsky. (2007). Transcriptional and Physiological Resposes of *Bradyrhizobium japonicum* to Desiccation-Induced Stress. *J. of Bacteriol.* vol 189 (19): 6751-6762

Farina R., Beneduzi A., Ambrosini A., Campos S., Brito-Lisboa B. (2012). Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. *Appl Soil Ecol* 55: 44-52.

Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra S.M.A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron sustain Dev* 29: 185-212. doi: 10.1051/agro:20080021.

Farrand S.K., Qin Y., Oger P. (2002) Quorum Sensing System of *Agrobacterium* plasmids: Análisis and Utility. *Methods Enzymol* 358: 452-484. doi:10.1016/S0076-6879(02)58108-8. PubMed: 12474406.

Finan, T.M., Hartweig, E., LeMieux, K., Bergman, K., Walker, G.C., Signer, E.R. (1984) General transduction in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 159, 120-124.

Flemming, H.C., Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nature Rev. Microbiol.* 8 (9), 623-633.

Fraysse, N., Couderc, F., Poinso, V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Europ J of Biochem* 270:1365-1380

Fujishige, N.A., Kapadia, N. N., De Hoff, P. L., Hirsch A. M 2006. Investigations of Rhizobium biofilm formation. *FEMS Microbiol Ecol.* 56(2):195-206.

Fuqua, C.M., Parsek, R., Greenberg, E.P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Ann Rev of Gen* 35: 439-468.

Gage, D.j. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol and Mol Biol Rev* 68:280-300

Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Pühler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., Dreano, S., Federspiel, N. A., Fisher, R. F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M. C., Pohl, T. M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandenbol, M., Vorhölter, F. J., Weidner, S., Wells, D. H., Wong, K., Yeh, K. C., Batut, J. (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293: 668-672.

Garbeva P., Van Veen J.A., Van Elsas J.D. (2004). Microbial diversity in soil: selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu Rev Phytophatol* 42: 243-270.

Garbeva P., Van Elsas J., Van Veen J.A. (2008). Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant soil* 302: 19-32.

Ghigo J.M (2001). Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm

develop. Nat 412:422-445.

Glazebrook, J., Walker G. C. (1989). A novel exopolysaccharide can function in place of the Calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. Cell 56: 661–672.

Glazebrook, J., Walker, G.C. (1991) Genetic Techniques in *Rhizobium meliloti*. Meth of Enz. 204: 398-418.

Glenn, S. A., Gurich, N., Feeney, M.A., González, J.A. (2007). The ExpR/Sin quorum-sensing system controls succinoglycan production in *Sinorhizobium meliloti*. J of Bacteriol 189:7077-70788.

González , J. E., York, G. M., Walker, G. C. (1996) *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. Gene 179: 141-146.

González, J. E., Reuhs, B. L., Walker, G. C. (1996). Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. PNAS 93: 8636–8641.

Gurtler V., Stanisich V.A (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. Microbiol. 142: 3-16.

Hall-Stoodlay, L., Stoodlay, . (2009). Evolving concepts in biofilms infections. Cellr Microbiol 11:1034-1043.

Harris, R.F., Chesters, G., Allen, O.N. 1966. Dynamics of soil aggregation. Adv. Agron. 18, 107-169.

Hartmann A., Rothballer M., Schmid M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. Plant Soil. 312:7-14. doi:10.1007/s11104-007-9514-z.

Hasman, H., Chakraborty, T., Klemm, P. (1999). Antigen 43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. *J of Bacteriol* 182:1089-1096.

Haynes, R.J., Beare, M.H., 1997. Influence of six crop species on aggregate stability and some labile organic matter fractions. *Soil Biol. Biochem.* 29, 1647-1653.

Her, G.R., Glazebrook, J., Walker, G.C., Reinhold, V.N. (1990). Structural studies of a novel exopolysaccharide produced by a mutant of *Rhizobium meliloti* strain Rm1021. *Carbohydrate Res* 198: 305-312.

Hinsinger P., Bengough A.G., Vetterlein D., Young I.M. (2009). Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant soil* 321: 117-152. doi: 10.1007/s11104-008-9885-9.

Hoang, H., Becker, A., Gonzalez, J. E. (2004). The LuxR homolog ExpR, in combination with the Sin quorum sensing system, plays a central role in *Sinorhizobium meliloti* gene expression. *J of Bacteriol* 186: 5460–5472.

Hooshangi S., Bentley W.E. (2008). From unicellular properties to multicellular behavior: bacteria quorum sensing circuitry and applications. *Curr Opin Biotechnol* 19: 550-555.

Houlden A., Timms-Wilson T.M., Day M.J., Bailey M.J. (2008). Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS microbiol Ecol* 65: 193-201. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00535.x.PubMed: 18616582.

Ibarra-Trujillo C. Ensayo de formación y cuantificación de biopelículas mixtas de *Cándida albicans* y *Staphylococcus aureus*. *Rev Iberoam Micol.* 2012.

Jacobs, A., Chenia, H. Y. (2010). Biofilm-forming capacity, surface hydrophobicity and aggregation characteristics of myroides odoratus isolated from

South African *Oreochromis mossambicus* fish. Journal Applied Microbiology 107(6):1957-1966

Jackson, C.R., Churchill, P.F., Roden, E.E. (2001) Successional changes in bacterial assemblage structure during epilithic biofilm development. Ecol 82, 555-566.

Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E., Walker, G.C. (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model Nat. Rev. Microbiology 5: 619-633.

Kaci Y., Heyraud, A., Barakat, M., Helvin T. (2005). Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium starin* from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure.

Khamna S., Yocota A., Lumyong S. (2009). Actynomicetes isolated from medicinal plant rhizosphere soil: diversity and screening of antifungal compound, indole-3-acetic acid and siderophore production. World J Microbiol Biotechnol 25: 649-655.

Karagoz K., Ates F., Karagoz H., Kotan R., Cakmakci R. (2012). Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from the rhizosphere of grapevine grown in alkaline and acidic soils. Eur J Soil biol 50: 144-150.

Keller, M., Roxlau, A., Weng, W. M., Schmidt, M., Quandt, J., Karsten, N., Jording, D., Arnold, W., Pühler, A. (1995). Molecular analysis of the *Rhizobium meliloti mucR* gene regulating the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoglucan. Mol Plant-Microbe Interact 8: 267-277.

Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutglis P., Kliromonos J.N. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. J microbiol Methods 58:169-188.

Klausen Mikkil, Aaes-Joregensen Anders, Molñin Soren y Tolker-Nielsen Tim. (2003). Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Mol Microbiol. 50(1): 61-68.

Klausen Mikkelsen, Aaes-Jørgensen Anders, Molnár Søren y Tolker-Nielsen Tim. (2003). Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol.* 50(1): 61-68.

Klebenberger, J., Birkenmaier, A., Geffers, R., Kjelleberg, S., Philipp, B. (2009). SiaA and SiaD are essential for inducing autoaggregation as a specific response to detergent stress in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol.* 11(12):3073-3086.

Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N., Holdeman, L.V (1985). Coaggregation of oral bacteroides species with other bacteria: central role in coaggregation bridges and competitions. *Infection and immunity* 48(3): 741-746

Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., Kolter, R., Losick, R. 2010. D- amino acids trigger biofilm disassembly. *Sci* 328 (5978): 627-629.

Konnova, SA (2001) The Role of Cell-Surface Lectins Nikitina, V.E, Ponomareva, E.G., Alen'kina, S.A., in the Aggregation of *Azospirilla*. *Microbiol* 70, 471-476.

Kos, B., Suskovic, J., Vucovic, S. Simpraga. M., Frece, J., Matosic, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J of applied microbiol* 94:981-987

Kukilnsky-Sobral J., Araujo W.L., Mendez R., Geraldi I.O., Pizzirani-Kleiner A.A. (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ Microbiol* 6: 1244-1251. doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00658.x. PubMed: 15560822.

Lagares, A., Caetano-Anolles, G., Niehaus, K., Lorenzen, J., Ljunggren, H. D., Puhler, A., Favelukes, G. (1992). A *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant altered in competitiveness for nodulation of alfalfa. *J of Bacteriol* 174:5941-5952.

Lal, R., 1991. Soil structure and organic carbon: a review. In: Lal, R., Kimble., J.M., Follet, R.F., Stewart, B.A. (Eds), Soil Processes and the Carbon Cycle. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 169-197.

Lau, P.C.Y., Lindhout, T., Beveridge, T.J., Dutcher, J.R., Lam, J.S. (2009). Differential Lipopolysaccharide Core Capping Leads to Quantitative and Correlated Modifications of Mechanical and Structural Properties in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. J of Bacteriol. 191:6618-6631.

Ledder, R. G., Timperley, A.S., Friswell, M. K., MacFarlane, S., McBain, A.J. (2008). Coaggregation between and among human intestinal and oral bacteria. FEMS Microbiol and Ecol 66(3):630-636

Lee, Y.W., Jeong, S.Y., In, Y.H., Kim K. Y., So, J.S., Chang W. S (2010). Lack of O-polysaccharide enhances biofilm formation by *Bradyrhizobium japonicum*. Lett of Appl Microbiol 50(5):452-456

Leifheit, E.F., Veresoglou, S.D., Lehmann A., Morris, E.K, Rilling, M.C. 2014. Multiple factors influence the role of arbuscular mycorrhizal fungi in soil aggregation- a meta-analysis. Plant and Soil. 374: 523-537.

Leigh, J.A., Singer, E.R, Walker, G.C., (1985). Exopolisaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. Proceedings of the National Academy of Sci. 82:6231-6235

Lerouge, I., Vanderlayden, J. (2001). O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. FEMS Microbiol Rev 26:17-47

Le Rudulier, D. Bernard, T. (1986) Salt tolerance in *Rhizobium*: a possible role for betaines. FEMS Microbiol Rev 39: 67-72.

Li, J., Wang, N. (2011). Genome-Wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Reveals Novel Genetic Determinants and Regulation Mechanisms of Biofilm Formation. Plos One 6(7): e21804.doi:10.1371/journal.pone.0021804.

Lodwig, E. M., Hosie, A. H., Bourdés, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., Downie, J. A., Poole, P.S. (2003). Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nat.* 422 (6933):722-726.

Lloret, J., Wulff, B.B.H., Rubio, J.M Downie, A.J., Bonilla, I., Rivilla, R. (1998). Exopolisaccharide II production is regulated by salt in the halotolerant starin rhizobium meliloti EFB1. *Appl and environ microbiol* 64(3): 1024-1028

Lopez, D., Vlamakis, H., Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2:a000398

Lupwayi, N.Z., Arshad, M.A., Rice, W.A., Clayton, G.W., 2001. Bacterial diversity in water-stable aggregates of soils under conventional and zero tillage management. *Appl. Soil. Biol. Biochem.* 32, 361-369.

Lynch, J., Bragg, E. 1985. Microorganisms and soil aggregate stability. *Adv. Soil. Sci.* 2: 133-171.

Mah, T. F., O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiol.* 9:34-39.

Malik, A., Sakamoto, M., Hanazaki, S., Osawa, M., Susuki, T., Tochigi, M, Kakii, K. (2002). Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* SinR/SinI locus and the production of novel N-acyl homoserine lactones. *J of Bacteriol* 184: 5686-5695.

Marketon, M.M., González, J.E. (2002) Identification of two quorum-sensing systems in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 184, 3466-3475.

Marschner, P., Crowley, D., Hong Yang, C. (2004) Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant Soil* 261: 199-208
O'Toole, G.A. and Kolter, R. (1998a) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28, 449-461.

Martens, D.A., 2000. Plant residue biochemistry regulates soil carbon cycling and carbon sequestration. *Soil. Biol. Biochem.* 32, 361-369.

Martin, J.P., Martin, W.P., Page, J.B., Raney, W.A., De Ment, J.D. 1955. Soil aggregation. *Adv. Agron.* 7, 1-37.

Matz, C. y Kjelleberg, S. (2005). Off the hook-how bacteria survive protozoan grazing. *Trends in Microbiol.* 13:302-307.

McClellan, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camaro, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S., Williams, P. (1997). Quorum sensing on *Chromobacterium violaceum* : exploitation of violace in production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiol.* 143. 3703-3711.

McIntosh, M., Krol, E, Becker, A. (2008). Competitive and cooperative effects in quorum sensing regulated galactoglucan biosynthesis in *S. meliloti*. *J. Bacteriol.* 190:5308-5317.

Meade, H. M., Long, S.R., Ruvkun, G.B., Brown, S.E., Ausubel, F.M. (1982): Physical and genetic characterization of simbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J of Bacteriol* 149: 114-122

Meier, M.S., Stoessel, F., Jungbluth, N., Juraske, R., Schader, C., Stolze, M. (2014). Environmental impacts of organic and conventional agricultural products- Are the differences captured by life cycle assessment.

Mendes, I.C., Bandick, A.K., Dick, R.P., Bottomley, P.J., 1999. Microbial biomass and activities in soil aggregates affected by winter cover crops. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 63, 873-881.

Merckx R., Dijkstra A., Hartog A.D., Veen J.A.V. (1987). Production of root-

derived material and associated microbial growth in soil at different nutrient levels .
Biol Fert Soils 5:126-132.

Merrit, P.M., Danhorn, T., Fuqua, C. (2007). Motility and chemotaxis in *Agrobacterium tumefaciens* surface attachment and biofilm formation. J of Bacteriol 189(22):8005-8014.

Miller-Williams, M., Loewen, P. C., Oresnik I. J. (2006). Isolation of salt-sensitive mutants of *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. Microbiol 152: 2049-2059.

Monds, R. D., O'Toole, G. A. (2009). The developmental model of microbial biofilms: Ten years of a paradigm up for review. Trends in Microbiol. 17:73-87

Neyra, C., Sadasivan, L. (1985) Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: Exopolysaccharides and Cyst Formation. J Bacteriol 163, 716-723.

Nikitina, V.E., Ponomareva, E.G., Alenkina, S.A., Konnova, S.A. (2001) The Role of Cell-Surface Lectins in the Aggregation of Azospirilla. Microbiology 70, 471-476.

Niehaus, K., Lagares, A., Puhler, A. (1998). A *Sinorhizobium meliloti* lopolysaccharide mutant induces effective nodules on the host plant *Medicago sativa* (alfalfa) but fails to establish a symbiosis with *Medicago truncatula*. Mol Plant-Microbe Interact 11:906-914.

Nievas F., Bogino P., Nocelli N., Giordano W. (2012a) Genotypic analysis of isolated peanut-nodulating rhizobial strains reveals differences among populations obtained from soils with different cropping histories. Appl. Soil Ecol. 53, 74-82.

Nimnoi P., Lumyong S., Pongsilp N. (2011). Impact of rhizobial inoculants on rhizosphere bacterial communities of three medicinal legumes assessed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Ann Microbiol 61: 237-245.

Oades, J.M. (1984). Soil Organic-Matter and structural stability-Mechanisms and implications for management. *Plant and soil* 76: 319-337.

Oades, J.M., Waters, A.G., 1991. Aggregate hierarchy in soils. *Aust. J. Soil. Res.* 29, 815-828.

Oldroyd, G.E., Downie, J.A. (2006). Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signaling. *Curr Opin in Plant Biol* 9: 351-357.

O'Toole, G.A., Kolter, R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28, 449-461.

Owen, P., Caffrey, P., Joseffson, L.G. (1987). Identification and partial characterization of a novel bipartite protein antigen associated with the outer membrane of *Escherichia coli*. *J of Bacteriol* 169:3770-3778.

Papendick, R.I., Campbell, G.S. (1980) Theory and measurement of water potential, p. 1–22. En JF Parr, WR Gardner, LF Elliott (ed.), *Water potential relations in soil microbiology*. Soil Science Society of America, Madison, WI.

Parsek M.R., Greenberg E.P. (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms . *Trends Microbiol* 13: 27-33.

Pearce D., Bazín M.J. y Lynch J.M. (1995). The rizosphere as a biofilm. In: HM Lappin-Scott JW Costerton. *Microbial Biofilms*: 207-220.

Peck, M. C., Fisher, R. F., Long S. R (2006). Diverse flavonoids symulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *J of Bacteriol* 188 (15): 5417-27.

Pellock, B.J., Hai-Ping Cheng, Walker, G.C., (2000). Alfalfa root nodule efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polisaccharides. *J of Bacteriol* 182 (15). 4310-4318.

Pellock, B. J., Teplitski, M., Boinay, R. P., Bauer, W. D. Walker G. C. (2002). A LuxR Homolog Controls Production of Symbiotically Active Extracellular Polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti*. *J of Bacteriol* 184(18): 5067-5076.

Picireanu, C., Van Loosdrecht, M.N.C, Heijnen, J.J. (1998). Mathematical modeling of biofilm structure with a hybrid differential-discrete cellular automaton approach. *Biotechn Bioeng* 58:101-116.

Potera, C. (1996) Biofilms invade microbiology. *Sci* 273, 1795-1797.

Pratt, L. A., Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, Chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol.* 30:285-293.

Puttamreddy, S., Cornick, N. A., Minion, F. C. (2010). Genome-Wide Transposon Mutagenesis Reveals a Role for pO157 Genes in Biofilm Development in *Escherichia coli* O157:H7 EDL 933. *Infection and Immunity* 78:2377-2384.

Prosser, B. L., Taylor, D., Dix, B.A., Cleeland, R. (1987). Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 31:1502-1506.

Ramos, J.L., Gallegos, M.T., Marqués, S., Ramos-González, M.I., Espinosa-Urgel, M., Segura, A. (2001) Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Curr Opin Microbiol* 4, 166-171.

Reinhold, B. B., Chan, S. Y., Reuber, T. L., Marra, A., Walker, G. C., Reinhold, V. N. (1994). Detailed structural characterization of succinoglycan, the major exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* Rm1021. *J of Bacteriol.* 176: 1997-2002

Ren, N., Xie, T., Xing, D. (2009). Composition of extracellular polymeric substances influences the autoaggregation capability of hydrogen-producing bacterium *Ethanligenens harbinense*. *Biores Techn* 100 (21): 5109-5113.

Reuber, T. L., Walker, G. C. (1993). Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Cell* 74: 269-280

Reuhs, B. L., Geller, D. P., Kim, J. S., Fox, J. E., Kolli, V. S. K., Pueppke, S. G. (1998). *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium meliloti* produce structurally conserved lipopolysaccharides and strain-specific K antigens. *Appl and Environ Microbiol* 64(12): 4930-4938.

Reyes, I., Bernier, L., Simard, R.R., Tanguay, P., Antoun, H. (1999) Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microb Ecol* 28, 291-295.

Rickard, A.H., Gilbert, P., High, N.J., Kolenbrander, P.E., Handley, P.S. (2003) Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol* 11, 94-100.

Rilling, M.C., Wright, S.F., Kimball, B.A., Pinter, P.J., Wall, G. W., Ottman, M.J., Leavitt, S.W., 2001. Elevated carbon dioxide and irrigation effects on water stable aggregates in a Sorghum field: a possible role for arbuscular mycorrhizal fungi. *Glob. Chang. Biol.* 7, 333-337.

Rilling, M.C., Aguilar-Trigueros, C.A., Bergmann, J., Verbruggen, E., Veresoglou, S.D., Lehmann, A. (2014). Plant root and mycorrhizal fungal traits for understanding soil aggregation. *New Phytologist* (2015) 205: 1385-1388.

Rinaudi, L., Fujishige, N.A., Hirschm, A.M., Banchio, E., Zorreguieta, A., Giordano, W. (2006). Effects of nutritional and environmental conditions on *Sinorhizobium meliloti* biofilm formation. *Res Microbiol* 157, 867-875.

Rinaudi, L.V., González, J.E. (2009). The low-molecular-weight fraction of exopolysaccharide II from *Sinorhizobium meliloti* is a crucial determinant of biofilm formation. *J of Bacteriol.* 191(23):7216-7224.

Rinaudi, L., Sorroche, F., Zorreguieta, A., Giordano, W. (2010) Analysis of *mucR* gene regulating biosynthesis of exopolysaccharides: implications for biofilm formation in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. FEMS Microbiol Letters 302, 15-21.

Rinaudi, L.V. Giordano W (2010) An integrated view of biofilm formation in rhizobia. FEMS Microbiol Lett 304, 1-11.

Rinaudo, M. (2004). Role of substituents on the properties of some polysaccharides. Biomacromol. 5:1155-65.

Ruberg, S., Z.X. Tian, E. Krol, B. Linke, F. Meyer, Y. P. Wang, A. Puhler, S. Weidner, and A. Becer. (2003). Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. J. Biotech. 106:255-268.

Russo, D.M., Abdian, P.L., Posadas, D.M., Williams, A., Vozza, N., Giordano, W., Kannenberg, E., Downie, J.A., 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 and environ microbiol. 81:1013-1023.

Russo, D.M., Williams, A., Edwards, A., Posadas, D.M., F., Finnie, C., Dankert, M., Downie, J.A., 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 of Bacteriol 188(12): 4474-86.

Saiman, L., Cacalano, G., Prince, A. (1990). *Pseudomonas cepacia* adherence to respiratory epithelial cells is influenced by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun 58, 2578-2584.

Sánchez, P., Proger, M., Naranjo, R., Sclemente, O. (2011). El suelo, su metabolismo, ciclaje de nutrientes y prácticas agroecológicas. 7: 19-34, 20

Sanz-Sáez, A., Health, K., Burke, P.V., Ainsworth, E.A. (2015). Inoculation with an enhanced N₂-fixing *Bradyrhizobium japonicum* strain (USDA 110) does not alter soybean (*Glycine max* Merr.) response to elevated (CO₂)

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual.

Schembri, M.A., Christiansen, G., Klemm, P. (2001) FimH-mediated autoaggregation of *E. coli*. *Mol Microbiol* 41, 1419-1430.

Schnider-Keel, U., Lejbolle, K.B., Baehler, E., Haas, D., Keel, C. (2001) The sigma factor AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation and osmotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl Environ Microbiol* 67, 5683-5693.

Schulten, H.R., Leinweber, P., 2000. New insights into organic-mineral particles: composition, properties and models of molecular structure. *Biol. Fertil. Soils* 30, 399-432.

Schutter, M.E., Dick, R.P., 2002. Microbial community profiles and activities among aggregates of winter fallow and cover-cropped soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66, 142-153.

Sharma A., Inagaki S., Sigurdson W., Kuramitsu H.K. (2005). Between *Tannerella forsythia* and *Fusobacterium nucleatum* in biofilm formation. *Oral Microbiol Immunol* 20: 39-42.

Shepherd, T.G., Saggar, S., Newman, R.H., Ross, C.W., Dando, J.L., 2001. Tillage-induced changes to soil structure and organic carbon fractions in New Zealand soils. *Aust. J. Soil Res.* 39, 465-489.

Sherlock, O., Schembri, M.A., Reisner, A., Klemm, P. (2004). Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. *J of Bacteriol* 186(23)8058-8065.

Shi J.Y., Yuan X.F., Lin H.R., Yang Y.Q., Li Z. Y. (2011). Differences in soil properites and bacterial communities between the rhizosphere and bulk soil and among different production areas of the medicianl plant *Fritillaria thunbergii*. *Int J Mol Sci* 12: 3770-3785.

Six, J., Bossuyt, H., degryze, S., Denef, K. 2004. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil and Tillage research*. 79: 7-31.

Six, J., Elliot, E.T., Paustian, K. (2000). Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation: a mechanism for C sequestration under no-tillage agriculture. *soil Biol and Biochem*. 32: 2099-2103.

Six J., Elliot, E.T., Paustian, K., Doran, J.W (1998). Aggregation and soil organic matter accumulation in cultivated and native grassland soils. *Soil Science Society of America J* 62: 1367-1377.

Schembr,i M..A., Christianesen, G., Klemm, P. (2001) FimH-mediated autoaggregation of *E. coli*. *Mol Microbiol* 41, 1419-1430.

Sharypova, L.A., Niehaus, K., Schaidle, H., Holst., O., Becker, A. (2003). *Sinorhizobium meliloti* acpXL mutant lacks the C28 hydroxylated fatty acid moiety of lipid A and does not express a slow migrating form of lipopolysacharide. *The J of Biol Chem* 278:12946-12954.

Smalla K., Sessitsch A., Hartmann A. (2006). The Rhizosphere: Soil compartment influenced by the root. *FEMS Microbiol Ecol* 56: 165. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00148.x.

Smalla K., Oros-Sichler M., Milling A., Heuer H., Baumgarte S: (2007). Bacterial diversity of solis assassed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results. *J. Microbiol Methods* 96: 470-479. doi: 10.1016/j. mimet. 2007.02.014.PubMed: 174077797.

Sorensen S.J., Bailey M., Hansen L.H., Kroer N., Wuertz S. (2005). Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat Rev Microbiol.* 3: 700-710.

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. (2011). Tesis doctoral: Aspectos moleculares de la adhesión bacteriana, el desarrollo de biofilms y la colonización de la planta en bacterias rizosféricas.

Spaink, H. P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Ann Rev of Microbiol* 54:257-288

Stach J.E.M., Burns R.G (2002). Enrichment versus biofilm culture: a functional and phylogenetic comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial communities. *Environ Microbiol* 4: 169-182.

Stewart P.S., Camper A.K., Handran S.D., Huang C., Warnecke M. (1997). Spatial distribution and coexistence of *klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Microb Ecol* 33: 2-10.

Sutherland I.W (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiol* 147:3-9. PubMed: 11160795.

Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S. (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nat* 418, 671-677.

Tisdall, J.M., Oades, J.M. (1982). Organic matter and water-stable aggregates in soils. *J of Soil Sci* 33: 141-163.

Tomlin, K.L., Coll, O.P., Ceri, H. (2001). Interspecies biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Can j Microbiol.* 47,949-954.

Ulrich A., Becker R. (2006). Soil is a key determinant of the bacterial community structure in arable soils. *FEMS Microbiol Ecol.* 56: 430-443.

Vanderlinde, E.M., Muszynski, A., Harrison, J.J., Koval, S.F., Foreman, D.L., Ceri, H., Kanneenberg, E.L., Carlson, R.W., Yost, C.K. (2009) *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 3841, deficient in 27-hydroxyoctacosanoate-modified lipopolisaccharide, is impaired in desiccation tolerance, biofilm formation and motility. *Microbiol* 155(9):3055-3069

Van Loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J. Norde, W., Schraa, G., Zehnder, A. B. J. (1987). Electrophoretic Mobility and Hydrophobicity To Predict the initial Steps of Bacterial Adhesion. *Appl and Environ Microbiol* 53:1898-1901

Van Peer, R., Niemann, G.J., Schippers, B., (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp strain WCS 417r. *Phytopath* 81: 728 -734.

Velázquez-Hernández M.L., Baizabal-Aguirre V.M., Cruz-Velázquez F., Trejo-Contreras M.J., Fuentes-Ramírez L.E. (2011). Gluconacetobacter diazotrophicus levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation. *Arch Microbiol* 193: 137-149. doi: 10.1007/s00203-010-0651-z. PubMed: 21103984.

Vriezen, J.A.C.F.J de Bruijn, K. Nüsslein. (2006). Desiccation responses and survival of *Sinorhizobium meliloti* USDA 1021 in relation to growth-phase, temperature, chloride and sulfate availability. *Lett. Appl. Microbiol.* 42:172-178.

Wang, L.X., Wang, Y., Pellock, B. Walker G.C. (1999). Structural characterization of the symbiotically important low-molecular-weight succinoglycan of *Sinorhizobium meliloti*. *J of Bacteriol* 181: 6788-6796.

Watt M., McCully ME., Jeffrey C.E. (1993) Plant and bacterial mucilages of the maize rhizosphere: comparison of their soil binding properties and histochemistry in a model system. *Plant Soil* 151, 151-165.

Wentland, E.J. (1996). Spatial variation in growth rate within *Klebsiella pneumoniae* colonies and biofilm. *Biotechnology Progress*. 12:316-321

Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N. J. y Salmond, G. P. (2001). Quorum-sensing in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 25: 365-404.

Wimpenny, J.W.T., y Colasanti, R. (1997). A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. *FEMS Microbiol Ecol* 22:1-16.

Wright, K. J., Seed, P. C., Hultgren, S. J. (2007). Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type I pili. *Cell Microbiol* 9:2230-2241.

Woo-Suk Chang y Larry J. Halverson. (2003). Reduced Water Availability Influences the Dynamics, Development, and Ultrastructural Properties of *Pseudomonas putida* Biofilms. *J of Bacteriol*. 185(20): 6199-6204.

Wu, S. Y., Lin, C. N., Chang, J.S. (2005). Biohydrogen production with anaerobic sludge immobilized by ethylene-vinyl acetate copolymer. *International J of Hydrogen Energy* 30:1375-1381.

Xu Y ., Wang G., Jin J., Liu J., Zhang Q., Xiaobing L. (2009). Bacterial communities in soybean rhizosphere in response to soil type, soybean genotype, and their growth stage . *Soil Biol Biochem* 41:919-925.doi: 10.1016/j.soilbio.2008.10.027.

Yamaguchi, M., Sato, K., Yukitake, H., Noiri, Y., Ebisu, S., Nakayama, K. (2010) *Porphyromonas gingivalis* mutant defective in a putative glycosyltransferase exhibits defect in biosynthesis of polysaccharide portions of lipopolysaccharides, decreased gingipain activities, strong autoaggregation and increased biofilm formation. *Infect and immun* 8(9):3801-3812

Yang J. K., Xie F.L., Zou J., Zhou Q., Zhou J.C. (2005). Polyphasic characteristics of *Bradyrhizobia* isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea*) in

China. *Soil Biol Biochem* 37: 141-153.

Ying Y.X., Ding W.L., Li Y. (2012). Characterization of soil bacterial communities in rhizospheric and nonrhizospheric soil of *Panax ginseng*. *Biochem Genet*, 50:848-59.

Yoshida, S., Ogawa, N., Fujii, T., Tsushima, S. (2009) Enhanced biofilm formation and 3-chlorobenzoate degrading activity by the bacterial consortium of *Burkholderia* sp. NK8 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Appl Microbiol* 106, 790-800.

Yoshida, S., Ogawa, N., Fujii, T., Tsushima, S. (2009). Enhanced biofilm formation and 3-chlorobenzoate degrading activity by the bacterial consortium of *Burkholderia* sp. NK8 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Appl Microbiol* 106, 790-800.

Zhan, H. J., Lee, C. C. y Leigh, J. A. (1991). Induction of the second exopolysaccharide (EPSb) in *Rhizobium meliloti* SU47 by low phosphate concentrations. *Journal of Bacteriology* 173: 7391-7394.

Zhan, H., Levery, S. B., Lee, C. C. y Leigh, J. A. (1989). A second exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* strain SU47 can function in root nodule invasión. *PNAS* 86: 3055-305.

Zhang F., She Y.H., Ma S.S., Hu J.M., Banat I.M. (2010). Respose of microbial community structure to microbial plugging in a mesothermic petroleum reservoir in China. *Appl microbial Biotechnol.* 88: 1413-1422.-

Zahran, H.H. (1999) *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 968-989.