

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas- Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Biología Molecular
Borrador del Manuscrito de Tesis Doctoral
Doctorado en Ciencias Biológicas



*“Componentes de superficie celular de
Rizobios y su impacto en la
supervivencia y adhesión bacteriana”*

Mic. Natalia Estefanía Nocelli

Director

DR. Walter Giordano

Co-Director

DR. Pablo Bogino

MARZO 2019

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

Dr. Walter Giordano

Director

Dr. Pablo Bogino

Co-director

Aprobado por el Tribunal de Tesis:

Dra. Liliana Odierno

Dra. Adriana Torres.

Dr. Adrian Vojnov.

Río Cuarto, 19 de Marzo de 2019

A mis abuelos, a mi mamá, mi hermano y mis sobrinos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Walter Giordano, director de mi proyecto de tesis doctoral, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su dirección paciente, por el apoyo mostrado y por responder siempre a todo que lo necesité.

Al Dr. Pablo Bogino por su gentileza y colaboración como co-director del presente trabajo de investigación, por su apoyo constante, por sus palabras de aliento, por su contención, por las horas que pasaron sentados discutiendo resultados, Gracias de corazón, hoy llegue hasta aquí, porque me guiaste como el excelente líder que sos y enseñaste todo lo que se en este ámbito.

A los miembros de comisión de tesis y jurados, Dra. Liliana Odierno, Dr. Adrian Vojnov y Dra. Adriana Torres, por sus valiosos aportes críticos y científicos brindados.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto por haberme brindado la educación de grado y posgrado, el espacio físico e instalaciones para el desarrollo de este trabajo y para mi desarrollo profesional.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas Tecnológicas (CONICET) por el otorgamiento de la beca que permitieron completar mi formación profesional.

A la Dra. Elizabeth Agostini, por su gran dedicación, paciencia, por acompañarme y enseñarme todo lo que sabía en la docencia y como ser una buena líder, escuche a muchos no estar conformes o de acuerdo con los Jefes de cátedra, pero siempre fui en contra de esa corriente, porque en mi caso, paso todo lo contrario.

A la Dra. Paola Gonzales y la Dra. Sabrina Ibañez, gracias por la paciencia, la buena onda, el acompañamiento y enseñarme tanto en la docencia. Esta materia que compartimos, es hermosa y se hizo mucho más linda gracias a que siempre fuimos un gran equipo.

A mi mamá por ser esa persona incondicional que estuvo en todos los días de mi vida ayudándome, guiándome y diciéndome que nunca baje los brazos, por ser mi sostén, por enseñarme, por tu sabiduría y confianza. Por tus consejos y sobre todo tu apoyo incondicional muchas gracias sin vos no lo hubiese logrado!!!! Te amo!!!.

A mis hermanos, por entender mis ausencias, Jonatan porque a pesar de las peleas que tenemos siempre estuviste cuando te necesite, gracias por estar por quererme loca como soy y por tus consejos que aunque fueron pocos valen mucho y siempre me sirvieron.

A mi abuela "Abu" por acompañarme siempre durante esta etapa, por darme la confianza que yo no tengo, por entender mis ausencias y disfrutar a pleno cada momentos juntas, por

por darme todos los gustos gracias!!!!

A mis tíos Liliana y Ernesto por el amor, la contención que me brindaron y por ser incondicionales muchas gracias!!!

A esas grandes personas que encontré en el caminar de mi carrera de grado, “los microbios” solo tengo palabras de agradecimiento, porque siguen demostrando las excelentes personas que son, a pesar de los kilómetros que nos separan, sabemos que somos incondicionales.

A la Dra. Maricel Santoro, por su apoyo incondicional, por su paciencia y su gran amistad. Al Dr. Julio Vicario muchas gracias por tus consejos, por hacerme reír ya sea con el carrito del mate, para que nadie tuviera que levantarse, por “ayudar a Aye”, y tantas otras anécdotas, siempre me hiciste sentir que éramos una familia loca y bizarra en el laboratorio, pero felices.

A la Dra. Fiorela Nievas, gracias por todo lo compartido y por todo lo que me enseñaste.

A Vasca, por ser esa amiga incondicional, compañera de vivienda, me enseñaste tanto dentro del laboratorio, como en la vida misma.

A Cristhian, gracias porque siempre estuviste ahí, para todo lo que necesite, te admiro mucho por la bella persona y el excelente profesional que sos.

A Mari Bringas, mi vieji, gracias por ser esa bella persona que siempre está pensando en cada uno de nosotros, por cuidarme y siempre estar al pie del cañon

A Mica, Mati y Manu, a ustedes les tengo que dar millones de gracias, me enseñaron que uno puede querer mucho, pero mucho a pesar de ser tan diferentes, y que podemos respetar al otro en su forma y pensamiento, somos tan distintos y a la vez luchamos por lo mismo en esta vida, a pesar que los caminos que transitamos son opuestos.

A Luli y Aye, lograron que acepte que las quiero, gracias por estar de manera incondicional, gracias por cada momento compartido y son tan pesadas que lograron que fueran muchos, con risas, llantos o un mix de todos los estados emocionales

A Juli, Sacha y Emi, su ingreso al laboratorio, hizo que todo fuera más equilibrado, aunque el matriarcado cambiara de líder, saben que siempre van a ser muy importantes en mi vida, seguimos siendo esa familia loca y bizarra, que con solo mirarnos sabemos que está pensando el otro, Gracias por estos años lleno de emociones.

A Femi, gracias por ser esa amiga incondicional, por dejarme ser parte de tu familia, de compartir con Lola, personita que me robo el corazón, gracias eternas.

sus mates compartidos, por estar siempre disponibles para cualquier consulta.

Al equipo de los laboratorios 6 y 14, gracias por la paciencia, tolerancia, y por todo lo compartido en estos bellos 5 años.

A Romi y Loli, gracias por la predisposición, y su buena onda.

A Betty, Denise y Estefi a pesar de la distancia que nos separa, siempre nos hicimos el tiempo, para saber de la otra, para acompañarnos en los diferentes momentos de nuestras vidas, gracias por estar siempre.

A Lucas, Pancho y Héctor por las juntadas a tomar mates, por acompañarme en este camino, por estar, muchas gracias por ser mis amigos incondicionales!!!

A Miguel, miles de gracias por ser sostén a la distancia, me contuviste, me acompañaste y siempre pero siempre lograste que terminara riendo más allá de lo que haya vivido.

A Ale Guchea, mi amigo y hermano, gracias por acompañarme, por escucharme, y sobre todo por ser incondicional.

A David Troitiño, por ser el que siempre me guía e ilumina mi camino, cuando más perdida estoy, por ser ese padre, compañero, consejero, siempre mostrándome que yo podía con lo que me propusiera, gracias por ser tan incondicional conmigo

A Leo y Adrián, gracias eternas por la paciencia que me tuvieron estos meses, que mi prioridad era la Tesis, gracias por acompañarme y preocuparse por mí, para que siempre me sintiera cómoda en esta nueva etapa.

A la Dra. Erika Banchio, Dra. Lorena Cappellari y el Dra. Emiliano Primo muchas gracias por todo lo que me brindaron siempre, por ayudarme siempre que los necesite.

A Mariela Woelke, Miguel Bueno, Miguel Andrés y a cada Técnico que nos acompañó en nuestro departamento por su predisposición para colaborar ante cualquier pedido o solicitud.

A todos los miembros de los Departamentos de Biología Molecular y Ciencias Naturales, que colaboraron profesional o humanamente en mi trabajo, por los elementos prestados, por las preguntas respondidas, por los problemas solucionados.

Al Batallón 59 y a la Región Norte de los Exploradores Argentinos de Don Bosco por estar siempre, por llenarme de alegrías, por la paciencia, el compromiso y por seguir enseñándome.

A todas aquellas personas que de una u otra forma participaron en esta Tesis, ya que no solo contribuyeron en mi progreso académico sino también en lo personal.

A Dios, María Auxiliadora y San Juan Bosco, por siempre protegerme.

RESUMEN

Los componentes bacterianos de la superficie y los compuestos extracelulares, en particular flagelos, lipopolisacáridos (LPS) y exopolisacáridos (EPS), en combinación con señales ambientales y señales de detección de *quórum sensing*, desempeñan un papel crucial en la autoagregación bacteriana, el desarrollo de biopelículas, la supervivencia frente a diferentes tipos de stres y la colonización del huésped. La especie fijadora de nitrógeno *Sinorhizobium meliloti* (*S. meliloti*) produce dos EPS que promueven la simbiosis: succinoglicano (o EPS I) y galactoglucano (o EPS II). Los estudios del sistema modelo de simbiosis de *S. meliloti* / alfalfa han revelado numerosas funciones biológicas de las EPS, incluida la especificidad del huésped, la participación en las etapas tempranas de la infección de la planta huésped, la molécula de señalización durante el desarrollo de la planta y la protección contra el estrés ambiental.

En el presente trabajo se evaluó, las funciones de los EPS, en la resistencia bacteriana a metales pesados y metaloides, que se sabe que afectan a varios procesos biológicos, y el rol en la coagregación intergenérica de estos polímeros con otras rizobacterias

La presencia de metales pesados o metaloides en el medio de cultivo no tuvo un efecto aparente en la formación de biofilm, en contraste con informes anteriores de que la formación de biofilm ayuda a proteger a varias especies de microorganismos de condiciones ambientales adversas. En experimentos de co-cultivo, las cepas resistentes a metales pesados que producen EPS ejercen un efecto protector sobre las cepas sensibles a metales pesados no productoras de EPS, o mutantes en LPS y flagelo; produciendo un fenómeno denominado "rescate" de la cepa no resistente.

En el estudio del rol en la coagregación intergenérica con otras rizobacterias que comparten el mismo nicho ecológico como *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum brasilense* y *Burkholderia sp.* Se evidencio que las cepas productoras EPS II, producen una mayor coagregación en comparación con aquellas cepas incapaces de producir EPS II.

En consecuencia, se concluyó que las cepas de *S. meliloti* productoras de EPS II juegan un papel importante tanto como mecanismo de resistencia a la exposición de metales tóxicos, como en el proceso de agregación con diferentes bacterias rizosféricas. Este exopolisacárido puede ser un factor clave para que los microorganismos comiencen el desarrollo de biopelículas en la naturaleza. Además, esta molécula podría considerarse como un posible conector universal con varias propiedades relevantes a nivel ecológico, biotecnológico y agroproductivo.

ÍNDICE GENERAL

Índice de Figuras	I
Índice de tablas	II
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Sinorhizobium meliloti</i>	1
1.2 Fijación Biológica del Nitrógeno: Simbiosis <i>S. meliloti</i> - Alfalfa	3
1.3 Componentes Poliméricos Extracelulares	5
1.4 EPSs de <i>S. meliloti</i>	7
1.4.1 Exopolisacárido I o succinoglicano.	7
1.4.2 Exopolisacárido II o Galactoglucano.	9
1.4.3 β Glucano ML	9
1.4.4 Funciones de los EPSs	10
1.5 Autoagregación y Coagregación	11
1.6 Biofilm	12
1.6.1 Proceso de formación del biofilm	12
1.6.2 <i>Sinorhizobium meliloti</i> y los biofilms	14
1.7 Metales Pesados.	14
1.7.1 Arsénico	16
1.7.2 Mercurio	17
1.7.3 Mecanismos de resistencia microbiana a los metales pesados	19
CAPÍTULO II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	22
2.1 Hipótesis	22
2.2 Objetivos	22
2.2.1 Objetivo general	22
2.2.2 Objetivos específicos	22
CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS.	23
3.1 Medios de cultivo para Bacterias	23
3.2 Condiciones de cultivo bacteriano	23
3.3 Conservación de cepas bacterianas	23
3.4 Cepas bacterianas empleadas	24
3.5 Soluciones madre de Arsénico y Mercurio.	25
3.6 Determinación del crecimiento por turbidimetría y recuento de células viables.	25

3.7 Formación de <i>biofilms</i> en presencia de Arsénico o Mercurio	26
3.7.1 Ensayo de biofilm en tubos de khan	26
3.7.2 Ensayo de recuento de biofilm	26
3.8 “Ensayos de rescate entre diferentes cepas de <i>S. meliloti</i> ”.	27
3.9 Extracción de exopolisacárido tipo II	28
3.10 Determinación de Azúcares por Antrona	28
3.11 Conjugación para marcaje de cepas con proteínas fluorescentes	28
3.12 Ensayos de co-agregación macroscópica y microscópica	29
3.13 Análisis estadístico	30
CAPÍTULO IV RESULTADOS.	31
4.1 Efecto de metales pesados sobre el crecimiento bacteriano de <i>S. meliloti</i> .	31
4.2 Formación de Biofilm	35
4.3 Co-cultivo bacteriano	38
4.3.1 Co-cultivos de la cepa <i>wt</i> con las mutantes <i>expA</i> y DM	39
4.3.2 Co-cultivo de <i>wt</i> con <i>lpsB</i>	45
4.3.3 Co-cultivo entre la cepa <i>wt</i> y la mutante <i>fliP</i>	48
4.3.4 Co-cultivos de las mutantes Rm8530 <i>exoY</i> con Rm8530 <i>expA</i> y Rm8530 DM	51
4.4 Estudio del rol de los exopolisacáridos de <i>S. meliloti</i> 8530 en la co-agregación intragenérica macroscópica y microscópica con cepas <i>wt</i> y mutantes en EPS.	57
4.4.1 Co-agregaciones de <i>S. meliloti</i> 8530 y sus mutantes en EPSs	57
4.5 Co-agregaciones intergenéricas de <i>S. meliloti</i> 8530 y sus mutantes en EPS con microorganismos rizosféricos	60
4.5.1 Agregaciones mixtas entre <i>S. meliloti</i> Rm8530 <i>wt</i> con cepas rizosféricas	60
4.5.2 Agregaciones mixtas entre <i>S. meliloti</i> Rm8530 <i>exoY</i> con cepas rizosféricas.	62
4.5.3. Agregaciones mixtas entre <i>S. meliloti</i> Rm8530 y mutantes no productoras de EPSII (<i>expA</i> y DM) con cepas rizosféricas.	63
4.6 Co-agregaciones con EPSII purificado de <i>S. meliloti</i> 8530 <i>exoY</i> con sus mutantes en EPS y microorganismos rizosféricos.	66
5. DISCUSIÓN	69
6. CONCLUSION	79
8. BIBLIOGRAFÍA	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 1.1: Replicones de <i>S. meliloti</i>	2
Figura. 1.2. Etapas de la simbiosis rizobio-leguminosa	5
Figura. 1.3. Clasificación de los EPSs en función al grado de unión con las superficies celulares	7
Figura.1 4. Estructura del succinoglicano	8
Figura. 1.5. Estructura del galactoglucano.	9
Figura 1.6: Estructura del β -glucano ML	9
Figura.1.7. Modelo de formación de un <i>biofilm</i>	13
Figura 4.1: Curvas de crecimiento de las cepas de <i>S. meliloti</i> Rm8530 tipo salvaje (<i>wt</i>) y mutantes en la síntesis de EPS I (<i>exoY</i>), EPS II (<i>expA</i>), ambos EPSs (<i>exoYexpA</i> , DM), flagelo (<i>fliP</i>), y en LPS (<i>lpsB</i>).	33
Figura 4.2: Formación de biofilm (A) y relación biofilm / crecimiento (DO_{570}/DO_{620}) (B) de cepas de <i>S. meliloti</i>	37
Figura 4.3: Crecimiento Bacteriano (A) y formación de biofilm (B) de cultivos individuales y co-cultivos de cepas de <i>S. meliloti</i> en medio control y expuestas a condiciones de estrés con metales pesados	41
Figura 4.4: (A) Crecimiento Bacteriano (B) formación de biofilm, cultivo individual y co-cultivos en cepas <i>S. meliloti</i> control y expuestas a condiciones de estrés con metales pesados	44
Figura 4.5: (A) Crecimiento Bacteriano (B) formación de biofilm, cultivo individual y co-cultivos en cepas <i>S. meliloti</i> control y expuestas a condiciones de estrés con metales pesados.	46
Figura 4.6: (A) Crecimiento Bacteriano (B) formación de biofilm, cultivo individual y co-cultivos en cepas <i>S. meliloti</i> control y expuestas a condiciones de estrés con metales pesados.	50
Figura 4.7: (A) Crecimiento Bacteriano (B) formación de biofilm, cultivo individual y co-cultivos en cepas <i>S. meliloti</i> control y expuestas a condiciones de estrés con metales pesados	53
Figura 4.8: (A) Crecimiento Bacteriano (B) formación de biofilm, cultivo individual y co-cultivos en cepas <i>S. meliloti</i> control y expuestas a condiciones de estrés con metales pesados.	56

Figura 4.9 Porcentaje de co-agregación intragenérica en relación a los tratamientos de cepas de <i>S. meliloti wt</i> y sus mutantes en EPSs	58
Figura 4.10: Ensayos de co-agregación microscópicos intragenericos, visualizados por microscopía de epifluorescencia.	59
Figura 4.11 Porcentaje de co-agregación de <i>S. meliloti 8530 wt</i> y cepas rizosfericas	61
Figura 4.12 Ensayos de agregación microscópicos, visualizados por microscopía de epifluorescencia	61
Figura 4.13: Porcentaje de co-agregación de <i>S. meliloti 8530 exoY</i> y cepas rizósfericas	62
Figura 4.14: Ensayos de agregación microscópicos, visualizados por microscopía de epifluorescencia	62
Figura 4.15: Ensayos de agregación microscópicos, visualizados por microscopía de epifluorescencia.	64
Figura 4.16: Ensayos de agregación microscópicos, visualizados por microscopía de epifluorescencia	65
Figura 4.17: Porcentaje de co-agregación de <i>S. meliloti 8530 DM</i> y cepas rizosféricas	65
Figura 4.18: Ensayos de agregación microscópicos, visualizados por microscopía de epifluorescencia	66
Figura 4.19: Porcentaje de co-agregación de <i>S. meliloti 8530 wt</i> y sus mutantes en EPS,	66
Figura 4.20: Ensayos de co-agregación microscópicos intragenéricos, visualizados por microscopía de epifluorescencia.	67
Figura 4.21: Porcentaje de co-agregación de <i>S. meliloti 8530 wt</i> y sus mutantes en EPS con cepas rizosféricas.	68
Figura 4.22: Ensayos de agregación microscópicos, visualizados por microscopía de epifluorescencia	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Cepas de <i>S. meliloti</i> utilizadas	24
Tabla 3.2: Soluciones madres de Arsénico y Mercurio	25
Tabla 4.1: Recuento de ufc.ml ⁻¹ de las cepas de <i>S. meliloti</i> Rm8530 y mutantes expuestas a metales	34
Tabla 4.2: Recuento de ufc.ml ⁻¹ de células planctónica o células sésiles <i>S. meliloti</i> y sus mutantes, expuestas a metales	38
Tabla 4.3: Recuento de ufc.ml ⁻¹ de células planctónica o células sésiles de las cepas de <i>S. meliloti wt</i> y su mutante DM, expuestas a metales	41
Tabla 4.4.: Recuento de ufc.ml ⁻¹ de células planctónica o células sésiles de las cepas de <i>S. meliloti wt</i> y su mutante <i>expA</i> , expuestas a metales	44
Tabla 4.5 Recuento de ufc.ml ⁻¹ de células planctónica o células sésiles de las cepas de <i>S. meliloti wt</i> y su mutante <i>lpsB</i> , expuestas a metales	47
Tabla 4.6: Recuento de ufc.ml ⁻¹ de células planctónica o células sésiles de las cepas de <i>S. meliloti wt</i> y su mutante <i>fliP</i> , expuestas a metales	49
Tabla 4.7: Recuento de ufc.ml ⁻¹ de células planctónica o células sésiles de las cepas de <i>S. meliloti exoY</i> y su mutante DM, expuestas a metales	53
Tabla 4.8: Recuento de ufc.ml ⁻¹ de células planctónica o células sésiles de las cepas de <i>S. meliloti exoY</i> y su mutante <i>expA</i> , expuestas a metales	56

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Sinorhizobium meliloti*

El Reino Bacteria tiene una gran amplitud de filos, uno de ellos es el filum Proteobacteria, dentro de esta categoría se encuentran sub-categorías como: clase Alfa-proteobacteria, orden Rhizobiales, familia Rhizobiaceae y el género *Sinorhizobium*; donde la especie es *Sinorhizobium meliloti*, objeto de estudio del presente trabajo. Esta bacteria Gram negativa puede vivir como un organismo de vida libre en el suelo o en relación simbiótica con leguminosas, como por ejemplo *Medicago sativa* (alfalfa), la cual es una leguminosa de gran relevancia en términos agrícolas (Jones y col., 2007; Mendis y col., 2017). Como resultado de la simbiosis, se generan cambios tanto morfológicos como fisiológicos en ambos organismos que culminan con la formación de nuevas estructuras en las raíces de las plantas denominadas nódulos radicales. Dentro de estas estructuras, *S. meliloti* reduce el nitrógeno atmosférico en amonio, el cual es utilizado por la planta; mientras que a cambio de estos productos el microsimbionte recibe nutrientes carbonados en el interior del nódulo radical.

Para el establecimiento de una efectiva simbiosis, se produce un diálogo molecular complejo (Oldroyd, 2013). En el paso inicial, el rizobio reconoce a moléculas orgánicas producidas por la planta, llamados flavonoides. Estos compuestos activan los genes *nod* rizobianos, y como consecuencia se producen los Factores Nod (Jones y col., 2007; Hawkins y Oreskin, 2017), provocando el desencadenamiento de la comunicación, y como paso final el desarrollo de una simbiosis efectiva.

El genoma de *S. meliloti* está formado por tres elementos: el cromosoma, de 3.65 Mb y dos megaplásmidos, pSymA de 1.35 Mb y pSymB de 1.68 Mb (Figura 1.1). La totalidad del mismo ha sido secuenciada y dichos análisis de secuenciamiento indican que los tres elementos contribuyen, en diferente medida, en la simbiosis (Galibert y col., 2001; Epstein y col., 2018).

El genoma tripartito, codifica funciones que permiten a *S. meliloti* enfrentar varias condiciones del suelo y dentro de su planta huésped. Al igual que otras bacterias gram negativas, la envoltura de *S. meliloti* consiste de una membrana interna y otra externa, con una capa de peptidoglicano en el espacio periplásmico entre ambas (Barnett y Long, 2017), además produce una serie compleja de moléculas glucídicas que incluyen lipopolisacárido (LPS), polisacáridos capsulares (CPS), glucanos cíclicos, polisacárido neutro de alto peso molecular (glucomanano), y exopolisacáridos (EPSs) (Laus y col.,

2006; Skorupska y col., 2006; Pérez- Mendoza y col., 2015), estos componentes en combinación con señales funcionales bacterianas, son cruciales para la formación de biofilms de rizobios en todas las especies estudiadas hasta ahora (Rinaudi y Giordano, 2010). Los polisacáridos de la superficie del rizobio juegan un papel importante en la simbiosis y en la formación de nódulos activos en la raíz de la leguminosa (Sorroche y col., 2012). Además, estas bacterias simbióticas secretan otros compuestos, como los oligosacáridos de lipo-quitina (factores Nod), que median específicamente la interacción con sus hospedadores leguminosas (Spaink y Lugtenberg, 1994; Pérez- Mendoza y col., 2015).

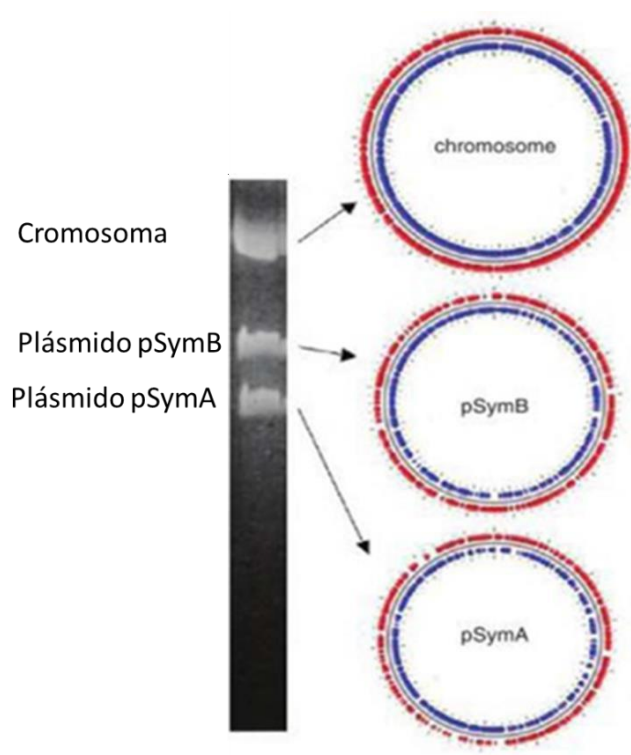


Figura. 1.1: Replicones de *S. meliloti*. Separación mediante electroforesis PFGE. Modificado de Barloy-Hubler., 2009.

S. meliloti posee al menos tres mecanismos de comunicación célula-célula empleado para coordinar el comportamiento a nivel comunitario a través de la regulación de la expresión génica, conocido como *Quorum Sensing* (QS) (Nievas y col., 2012). Entre ellos el sistema Sin, que consiste en SinR, un regulador transcripcional de tipo LuxR, y SinI, una autoinductor sintasa responsable de la síntesis de una serie de *N*-acil homoserín lactonas de cadena larga (AHL) (Marketon y col., 2003). El sistema Sin regula la expresión de muchos genes de *S. meliloti*, incluyendo genes implicados en la producción de EPS I y EPS II, motilidad, quimiotaxis y otros procesos celulares, tales como fijación de nitrógeno y transporte de metales. La regulación de la mayoría de estos genes depende de la

presencia de otra proteína reguladora de tipo LuxR, ExpR (Hoang y col., 2004; Mueller y González, 2011).

1.2 Fijación Biológica del Nitrógeno: Simbiosis *S. meliloti*- Alfalfa

En la rizósfera, las plantas y los microorganismos están permanentemente interactuando ya sea de manera deletérea (patógenos) o beneficiosa (simbiontes) (Van Loon, 2007). La comunicación extensa ocurre entre ambas partes durante diversas etapas del desarrollo de la planta, donde las moléculas de señalización de ambos desempeñan un papel importante. El resultado final de estas relaciones depende del diálogo molecular establecido (Bais y col., 2004). Entre las interacciones beneficiosas se encuentran aquellas con rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas (PGPR, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), colonizando la rizósfera o tejidos internos de muchas especies de macrosimbiontes, lo que induce efectos positivos tales como aumento del crecimiento de las plantas, menor susceptibilidad a enfermedades (causadas por hongos, bacterias, virus y/o nematodos) y mejor tolerancia a los diferentes tipos de estreses abióticos (Van Loon, 2007; Ortíz-Castro y col., 2008; Dimkpa y col., 2009). Se han propuesto diferentes mecanismos de promoción del crecimiento de las rizobacterias. Por ejemplo, la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico (Dobbelaere y col., 2003); solubilización de nutrientes inorgánicos que limitan la tasa de crecimiento de las plantas, como el fosfato (Vessey, 2003; Karthikeyan y col., 2007, 2008a, b); estimulación de la entrega y absorción de nutrientes por las raíces de las plantas; modulación de los mecanismos reguladores de las plantas mediante la producción de hormonas como auxinas, giberelinas y citoquininas (Ortiz-Castro y col., 2008; Ortiz-Castro y col., 2011), reducción de los niveles de etileno en las plantas (Glick, 2004; Chen y col., 2013) o producción de otros compuestos que influyen en el desarrollo del macrosimbionte (Ortiz-Castro y col., 2008; Wang y col., 2006; Poupin y col., 2013).

En condiciones de escasez de nitrógeno en el suelo las plantas leguminosas producen un exudado radical rico en flavonoides (Figura 1.2). Estos compuestos son verdaderas señales para los rizobios, los cuales en respuesta a los mismos pueden abandonar su modo de vida libre o saprofítico, y asociarse con las leguminosas e inducir la formación de órganos especiales, denominados nódulos, en las raíces y tallos, dentro de los cuales el nitrógeno atmosférico se reduce a amoníaco por el complejo enzimático de nitrogenasa. El establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa, en general es una interacción específica, aunque en la actualidad se conoce que en los nódulos se pueden encontrar

más de una cepa colonizando e interaccionando en la simbiosis (Checcucci y col., 2016; Martínez-Hidalgo y Hirsch, 2017), siendo este proceso muy complejo. Todos los polisacáridos superficiales de la bacteria desempeñan un papel esencial en el establecimiento de una simbiosis eficaz, especialmente con las plantas hospedadoras que forman nódulos de tipo indeterminado, como *Trifolium*, *Pisum*, *Vicia* y *Medicago* spp. (Skorupska y col., 2006; Downie, 2010; Janczarek, 2011; Checcucci y col., 2016).

La rizobacteria *S. meliloti* forma nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de las plantas de alfalfa. La formación de nódulos es un proceso complejo: los primeros pasos involucran intercambios de señales entre el microbio y la planta; como así también la interacción física cercana durante la colonización bacteriana (Barnett y Long, 2017). En el intercambio de señal inicial, las bacterias responden a los compuestos secretados (flavonoides) por la planta mediante la inducción de la expresión de sus genes *nod*, cuyos productos proteicos sintetizan el lipo-quito-oligosacárido (factor Nod), que a su vez desencadena las respuestas de la planta necesarias para la formación de los nódulos radicales (Barnett y Long, 2017). Uno de los primeros eventos de invasión bacteriana se corresponde con la elongación y curvatura de los pelos radicales de la planta. Las bacterias establecen microcolonias en esta estructura e invaden el tejido vegetal a través de un tubo que crece hacia el interior de la pared celular de la planta denominado hilo de infección (HI), mientras que la planta inicia la morfogénesis de los nódulos. Cuando un HI alargado alcanza una célula nodular competente para la infección, las bacterias se liberan en su citoplasma a través de la endocitosis. En el citoplasma de la célula vegetal, los rizobios se diferencian en bacteroides fijadores de nitrógeno que suministran amonio a la planta a cambio de carbono en forma de dicarboxilatos (Udvardi y Poole, 2013), estas estructuras se encuentran envueltas por una membrana peribacteroidal de origen vegetal. Una proporción de las células bacterianas permanecen como rizobios desdiferenciados que pueden reproducirse en el interior del nódulo (Denison y Kiers, 2004; Checcucci y col., 2016). La diferenciación bacteroide está regulada por la baja concentración de oxígeno de la planta y por los péptidos ricos en cisteína (NCR) específicos para nódulos, sintetizados en plantas (Maroti y col., 2015).

Estas nuevas células infectadas y las bacterias dentro de ellas, se desarrollan aún más y forman nuevo tejido nodular que fija activamente el nitrógeno. Este proceso resulta en un gradiente de estados de desarrollo desde el meristema joven en el extremo del nódulo hasta el tejido senescente próximo a la raíz (Diouf y col., 2003).

1.3 Componentes Poliméricos Extracelulares

Los componentes poliméricos extracelulares (CPEs) están presentes tanto en el exterior de las células como en el interior de los agregados microbianos (Wingender y col., 1999). Los CPEs representan el término más general e integral para representar diferentes clases de macromoléculas tales como polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros compuestos poliméricos que se presentan en el interior de diversos agregados microbianos (biofilm, flóculos, agregados). Los polisacáridos extracelulares o exopolisacáridos (EPSs) son las principales macromoléculas constituyentes de los CPEs, los EPSs son sintetizadas y secretadas por varios microorganismos como hongos, bacterias y levaduras durante su crecimiento, desempeñando funciones biológicas importantes en ellos (Tarafdar y col., 2012). En la naturaleza, los EPSs se producen como resultado de exudados microbianos, y juegan un papel fundamental en el mecanismo de defensa de las influencias ambientales, ataque de bacteriófagos, fenómenos de adhesión

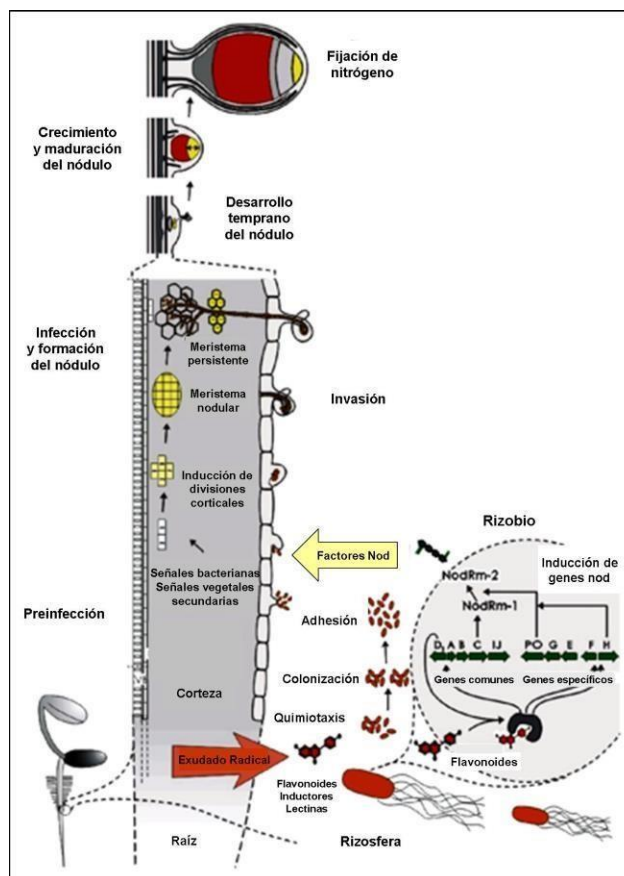


Figura. 1.2. Etapas de la simbiosis rizobio-leguminosa vía hilo de infección. Imagen tomada de: www.cebitec.uni-bielefeld.de/CeBiTec/rhizogate/symbioses.

a las superficies, la recolección de nutrientes y antigenicidad (Stewart y col., 2001; Vu, 2009; Raliya y col., 2014). Los EPSs también parecen suprimir las respuestas de defensa de la planta hospedadora (Jones y col., 2008), y pueden estimular la formación de HI mediante estimulación mecánica, o mediante la unión de iones de calcio y, por lo tanto, altera los niveles de calcio libre (Jayaraman y col., 2014). Los EPSs presentan carga negativa y son altamente hidrofílicos, pudiendo adsorber materia orgánica y cationes, entre otras sustancias (Nielsen y Jahn, 1999; Liu y Fang, 2003). Asimismo, los EPS son un medio que permite la cooperación y comunicación entre células en agregados microbianos (Wingender., 1999; Lapidou., 2002).

Químicamente estas macromoléculas son polímeros de carbohidratos lineales y/o ramificados, compuestos de monómeros heterogéneos que están unidos entre sí por enlaces glicosídicos. (Bafana, 2013,). Además, también se han encontrado lípidos, ácidos nucleicos, ácidos urónicos y algunos componentes inorgánicos en EPSs de diversas matrices (Raliya y col., 2014). Los EPSs en agregados microbianos tienen muchos grupos cargados, por ejemplo, grupos carboxilo, fosfórico, sulfhídrico, fenólico e hidroxilo y grupos apolares, como compuestos aromáticos, alifáticos en proteínas y regiones hidrófobas en hidratos de carbono (Flemming y Wingender, 2002).

Los EPSs se clasifican como solubles (S-EPSs) y enlazados (B-EPSs). Los S-EPSs se disuelven en solución; mientras que los B-EPSs se unen a las células y por lo general se subdividen en EPSs libremente vinculados (LB-EPSs) y EPSs estrechamente vinculados (TB-EPSs) (Li y Yang, 2007; Sheng y col., 2010) (Figura 1.3). Los LB-EPSs pueden funcionar como la superficie primaria para la adhesión celular y la floculación. Sin embargo, la mayoría de los trabajos experimentales sobre EPSs no han abordado específicamente el papel de los tres tipos de EPSs en la biosorción en solución (Hou y col., 2013).

Los EPSs se acumulan en la superficie de las células microbianas, provocando que las células se agreguen y proporcionen protección contra tensiones bióticas y abióticas ambientales, estabilizando la membrana contra un ambiente externo adverso y sirviendo como reservas de carbono y energía durante la inanición (Slaveykova y col., 2010; Hou y col., 2013). Además, los EPSs se utilizan como moléculas de señalización que son indispensables para la invasión de las plantas hospedadoras (Glazebrook y Walker, 1989; Janczarek, 2011; Pérez-Mendoza y col., 2015). Asimismo, estas macromoléculas tienen numerosas aplicaciones industriales, y debido a su alta viscosidad y pseudo plasticidad en una amplia gama de temperaturas y pH (Becker y col., 1998; Raliya y col., 2014),

recientemente se han utilizado estos polímeros para atrapar y retener la humedad en los suelos arenosos, y de este modo reducir la infiltración de agua protegiendo el suelo de la erosión (Cólica y col., 2014)

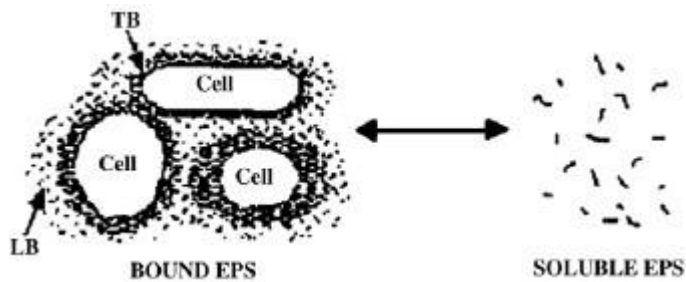


Figura. 1.3. Clasificación de los EPSs en función al grado de unión con las superficies celulares (Sheng y col., 2010)

1.4 EPSs de *S. meliloti*.

ExpR, el producto proteico propuesto del gen *expR* de *S. meliloti* tiene un regulador de tipo LuxR que controla muchas funciones en este microorganismo, incluyendo la síntesis de dos exopolisacáridos, EPS I (succinoglicano) y EPS II (galactoglucano), (Pérez-Mendoza y col., 2015). Estos compuestos se sintetizan continuamente a niveles basales en algunas cepas de *S. meliloti* y su producción esta mediada por *Quorum Sensing* (QS). Cuando en el interior celular se encuentran altas concentraciones de diguanilato cíclico (c-di-GMP), *S. meliloti* puede sintetizar un nuevo exopolisacárido, llamado β Glucano ML (Pérez-Mendoza y col., 2015). La regulación post-traducciona en la biosíntesis y en la secreción están mediados positivamente por c-di-GMP (Pérez-Mendoza y Sanjuan, 2016).

1.4.1 Exopolisacárido I o succinoglicano.

Uno de los polisacáridos más estudiados producidos por cepas de *S. meliloti* es el succinoglicano (también conocido como EPS I) (Reinhold y col., 1994), que está compuesto por unidades repetitivas de un octasacárido formado por una galactosa y siete residuos de glucosa unidos por enlaces β -1,3, β -1,4 y β -1,6. La unidad repetitiva tiene sustituyentes como grupos succinilo, acetilo y piruvilo (Figura 1.5).

El succinoglicano es producido en dos tamaños definidos de peso molecular. Una fracción, contiene el succinoglicano de alto peso molecular (HMW, *High Molecular Weight*) que consiste en más de 2000 subunidades del octasacárido (Battisti y col., 1992; González y col., 1998). La segunda fracción, llamada de bajo peso molecular (LMW, *Low*

Molecular Weight), consiste en monómeros, dímeros y trímeros del octasacárido (González y col., 1998; Wang y col., 1999). La fracción constituida por los trímeros de succinoglicano es la molécula señal activa en la invasión del nódulo (Urzainqui y Walker, 1992). Las fracciones de bajo peso molecular de succinoglicano pueden producirse por polimerización parcial o por despolimerización de la fracción de alto peso molecular a través de la acción de endoglicanasas específicas (York y Walker, 1997; González y col., 1998).

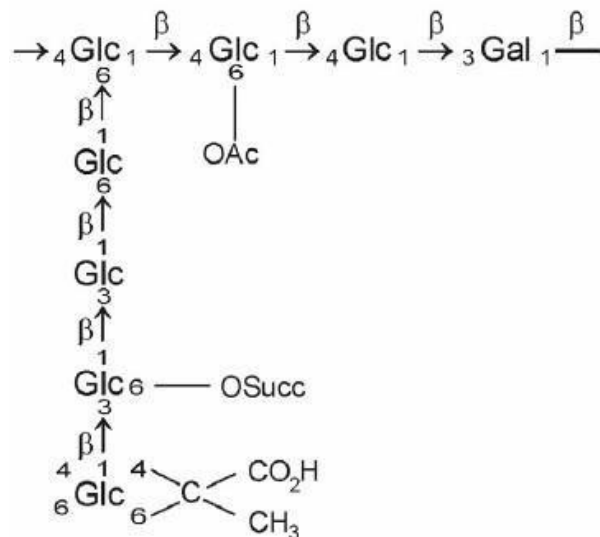


Figura.1 4. Estructura del succinoglicano. Estructura química de las unidades repetitivas constituyentes del EPS I producido por *S. meliloti*. Abreviaciones: Glc, glucosa; Gal, galactosa; Succ, succinilo; y Ac, acetilo (Janczarek, 2011).

En cepas de *S. meliloti*, los genes implicados en la síntesis de EPS I forman un gran cluster *exo/exs* (~ 35 kb), ubicado en el megaplasmido pSymB (Glucksmann y col., 1993; Reuber y Walker, 1993; Finan y col., 2001; Janczarek, 2011). En esta región se han identificado 28 genes *exo/exs* organizados en varios operones.

Una mutación en el gen *exoY* dio como resultado un efecto deletéreo muy marcado sobre el desarrollo de la simbiosis. Cepas mutantes en este gen fueron totalmente defectuosas en la producción de EPS I, la formación de hilos de infección y, en consecuencia, en la fijación de nitrógeno (Glucksmann y col., 1993; Müller y col., 1993).

La producción de EPS de *S. meliloti* se ve afectada por varias condiciones nutricionales y de estrés. Limitaciones de algunos nutrientes no-carbonados, como el nitrógeno y el azufre, o muy altas concentraciones de fosfato, y el estrés hiperosmótico estimulan la síntesis de EPS I (Doherty y col., 1988, Mendrygal y González, 2000). Además, diferentes

condiciones osmóticas modifican la biosíntesis de EPS en esta bacteria. Jofré y Becker (2009) han informado de que la polimerización de EPS I se ve afectada por la fuerza iónica del medio.

1.4.2 Exopolisacárido II o Galactoglucano.

La síntesis del segundo exopolisacárido de *S. meliloti*, denominado galactoglucano (EPS II), está dirigido por genes *exp* localizados en un grupo de 27 kb en el plásmido pSymB, a una distancia de 160 kb de los genes *exo / exs* (Becker y col., 1998; Moreira y col., 2000). Este grupo contiene 22 genes organizados en cinco operones. El EPS II, es uno de los dos exopolisacáridos simbióticamente importantes producidos por *S. meliloti* Rm8530 (Downie., 2010; Gao y col., 2012). Al igual que EPSI, se secreta en dos fracciones, de alto y bajo peso molecular. Particularmente la fracción de bajo peso molecular (LMW) consiste en 15-20 subunidades de disacáridos, permite la invasión a plantas de *Medicago sativa* (Gonzales y col., 1996) y también es crítica para la formación de biofilm y autoagregación en condiciones de laboratorio (Rinaudi y Gonzalez, 2010; Sorroche y col., 2010). Este polímero está constituido por un disacárido formado por una galactosa piruvilada y una glucosa acetilada unidas por enlaces α -1,3 y β -1,3 (Figura 1.6) (Her y col., 1990).

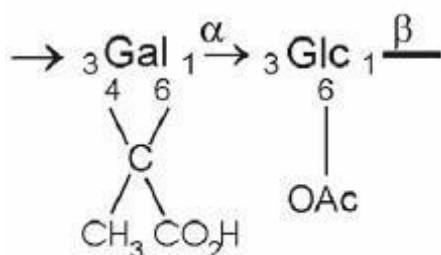


Figura. 1.5. Estructura del galactoglucano. Estructura química de las unidades repetitivas constituyentes del EPS II producido por *S. meliloti*. Abreviaciones: Glc, glucosa; Gal, galactosa y Ac, acetilo (Skorupska y col., 2006).

El EPS II es sintetizado bajo condiciones de limitación de factores nutricionales como el fosfato, este juega un papel importante en la regulación de la síntesis del galactoglucano en *S. meliloti*. (Schmeisser y col., 2009).

1.4.3 β Glucano ML

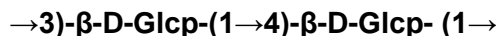


Figura 1.6: Estructura del β -glucano ML. Estructura química de las unidades repetidas, producido por *S. meliloti* 8530. Abreviaciones: Glcp: glucosa en forma de piranosa (Pérez Mendoza y col, 2015).

Aún no se conoce mucho sobre las características y funciones de este nuevo glucano, pero comparte características comunes a otros EPSs, como su insolubilidad en agua (similar a los EPSs que están constituidos por celulosa y curdlano) y solubilidad en álcali diluido (como el EPS de curdlano) (Pérez Mendoza y col., 2015). Este β -glucano, se expresa solamente en cepas de *S. meliloti* 8530 (lo que se conoce hasta el momento) y en concentraciones de c-di-GMP elevadas a nivel intracelular (Pérez Mendoza y col., 2015). Este sacárido, está compuesto por unidades repetidas de un disacárido formado por dos glucosas en forma de piranosa, con uniones β 1-3 y β 1-4. (Pérez Mendoza y col., 2015) (Figura 1.4).

Probablemente una Glucosil-Transferasa y una proteína de fusión de membrana, son necesarios para la producción de este β -glucano extracelular (Pérez Mendoza y col., 2015). La síntesis del β -glucano también depende del sistema ExpR / SinI que regula la transcripción de los otros dos EPSs conocidos hasta el momento, enlazando así el β -glucano con la producción de otros EPSs de *S. meliloti* (Skorupka y col., 2006; Pérez-Mendoza y col., 2015).

La alta producción de β -glucano facilita la agregación y la formación de biopelículas por *S. meliloti* 8530 bajo condiciones de vida libre y también sobre la superficie de raíz de alfalfa. La sobreproducción de β -glucano aumenta en gran medida la adhesión bacteriana a la raíz de la planta hospedadora y la formación de un biofilm denso en la superficie de la misma, del cual parecen excluidos los mutantes incapaces de producir β -glucano (Pérez Mendoza y col., 2015).

1.4.4 Funciones de los EPSs

Los EPSs son moléculas no tóxicas y biodegradables (Poli y col., 2011), la síntesis de estos polímeros en microorganismos es más simple, rápida y producen mucha mayor cantidad en comparación con los polisacáridos de plantas o algas (Mahapatra y Banerjee, 2013). Debido a estas características, los EPSs tienen amplias posibilidades de aplicación, entre otras, en las industrias de biomedicina, agrícolas, de alimentos y farmacéutica, así como en cosméticos (Nwodo y col., 2012; Madhuri y Prabhakar, 2014). En la industria alimentaria, son sintetizados principalmente por bacterias lácticas. Actúan como estabilizantes, emulsionantes o viscosificadores (Patel y Prajapati, 2013). Por ejemplo, el dextrano producido por *Leuconostoc mesenteroides* es un agente gelificante y espesante, que también puede prevenir la cristalización del azúcar y dar una viscosidad y humedad adecuadas a los productos (Szewczuk-Karpisza, y Wiśniewska, 2018). El EPS

también es una fuente de prebióticos e inmunomoduladores (Szewczuk-Karpisza, y Wiśniewska, 2018). Algunos de ellos también se utilizan en la industria farmacéutica. Tienen propiedades antitumorales y pueden reducir el nivel de colesterol (Szewczuk-Karpisza, y Wiśniewska, 2018). En la actualidad y para nuestro conocimiento, no hay información disponible sobre el uso directo de EPSs, en formulaciones de inoculantes para uso agrícolas.

1.5 Autoagregación y Coagregación

Las agregaciones bacterianas son procesos altamente específicos que implican la interacción entre moléculas de superficies de los microorganismos, las cuales actúan como adhesinas y receptores complementarios, incluyendo proteínas e hidratos de carbono (Simoes y col., 2011).

Los EPSs desempeñan un papel importante en la agregación celular, floculación y formación de biofilm, procesos críticos en las etapas iniciales de la interacción bacteriana con los hospedadores eucariotas (Danhorn y Fuqua, 2007; Pérez Mendoza y col., 2015). Las principales interacciones intermoleculares entre las células, las cuales contribuyen a la estabilidad de los agregados microbianos, son el entrecruzamiento del polímero (Mikkelsen y Nielsen, 2001), los puentes iónicos a través del EPS y la interacción electrostática (Sheng y col., 2006a), así como las fuerzas de Van der Waals y los enlaces de hidrógeno (Mayer y col., 1999).

Macroscópicamente, el fenómeno de co-agregación puede definirse como aglutinación cuando se mezclan los diferentes tipos de células (Cisar y col., 1979). El reconocimiento puede ser de naturaleza intragenérica, intergenérica o multi-genérica (Kolenbrander y col., 1995).

La co-agregación está mediada por interacciones proteína-sacárido y bloqueada por azúcares simples (Bogino y col., 2013). Las interacciones de floculación contribuyen al desarrollo de biofilms a través del reconocimiento y adhesión específicos entre células individuales en suspensión a bacterias genéticamente distintas en un biofilm en desarrollo y/o por la posterior adhesión al biofilm en desarrollo de colonizadores secundarios previamente co-agregados (Simoes y col., 2007). Si se produce un reconocimiento celular específico, las células se agregan y se asientan. (Simoes y col., 2007). En *S. melloti*, la presencia de EPS II LMW, solo o en combinación con la fracción HMW, puede funcionar como una matriz extracelular polimérica que aglutina las células bacterianas (Sorroche y col., 2010; Sorroche y col., 2012).

1.6 Biofilm

Los biofilms son comunidades microbianas que se unen a superficies sólidas bióticas o abióticas y se encapsulan en una matriz que suele ser autoproducida y generalmente consiste en agua, EPS, proteínas, lípidos y ADN extracelular formando complejos tridimensionales (Flemming y Wingender, 2010). La composición del biofilm difiere dependiendo del sistema, es un mecanismo de adhesión muy específico y confiere ventajas a los microorganismos, incluyendo la transferencia de señales químicas, el intercambio de información genética, la protección contra condiciones ambientales adversas y la cooperación metabólica entre diferentes especies, así como la diferenciación celular en algunas poblaciones (Simoës y col., 2011).

El *Quorum Sensing* (QS) es una estrategia reguladora basada en la densidad poblacional, y es un importante regulador de la formación y dispersión de biofilm en microorganismos, porque el desarrollo de esta estructura representa un proceso de comportamiento cooperativo (Castiblanco y col., 2016).

Las células sésiles (en biofilm) expresan genes en un patrón que difiere profundamente de aquel que expresan sus homólogas de vida planctónica (vida libre) (Sauer y col., 2002; Stoodley y col., 2002). Luego de la unión a la superficie, las bacterias se multiplican y la comunidad adquiere una estructura tridimensional. Estos sistemas están permeados por canales, los cuales actúan como sistemas circulatorios, permitiendo a las bacterias el intercambio de agua, nutrientes, enzimas y señales, así como la eliminación de metabolitos potencialmente tóxicos y a su vez, facilitan el cooperativismo metabólico (Costerton y col., 1995; Stanley y Lazazzera, 2004).

1.6.1 Proceso de formación del biofilm

La formación de biofilms puede ocurrir por, al menos, tres mecanismos:

1. Mediante redistribución de células unidas a una superficie, gracias a la movilidad propia de los microorganismos (Korber y col., 1995; Dalton y col., 1996).
2. Por división binaria de células adheridas a una superficie (Heydorn y col., 2000).
3. Por reclutamiento de células desde el seno del fluido en que se encuentran al biofilm en desarrollo (Tolker-Nielson y col., 2000).

La contribución relativa de cada uno de estos mecanismos depende de los organismos involucrados, la naturaleza de la superficie a ser colonizada y las condiciones físico-químicas del ambiente (Heydorn y col., 2000).

Como en la mayoría de los procesos de diferenciación, lo primero que se percibe en la formación de biofilm es una serie de cambios morfológicos. Las células individuales que inician la adhesión a una superficie están rodeadas sólo por una pequeña cantidad de material exopolimérico, y la mayoría son capaces de realizar movimientos independientes por medio de sus pilis (O'Toole y Kolter, 1998). Estas células todavía no están comprometidas al proceso de diferenciación que conducirá a la formación del biofilm, por lo que muchas pueden abandonar la superficie y retomar su vida planctónica. Durante esta etapa de adhesión reversible (Marshall y col., 1971) las bacterias exhiben varios comportamientos específicos de especie, los cuales incluyen rotar, reptar, formar agregados y filamentos (Korber y col., 1995) antes de comenzar a secretar EPSs y adherirse irreversiblemente. Luego de que ocurre el proceso de adhesión irreversible, las células se multiplican en el sitio de adhesión para dar lugar a la formación de microcolonias. Posteriormente, mientras los biofilms van madurando, desarrollan la arquitectura básica basada en la interacción de microcolonias y canales de agua, las bacterias alteran sus procesos fisiológicos normales (por ejemplo, creciendo en anaerobiosis) en respuesta a condiciones de sus nichos particulares (Figura 1.7).

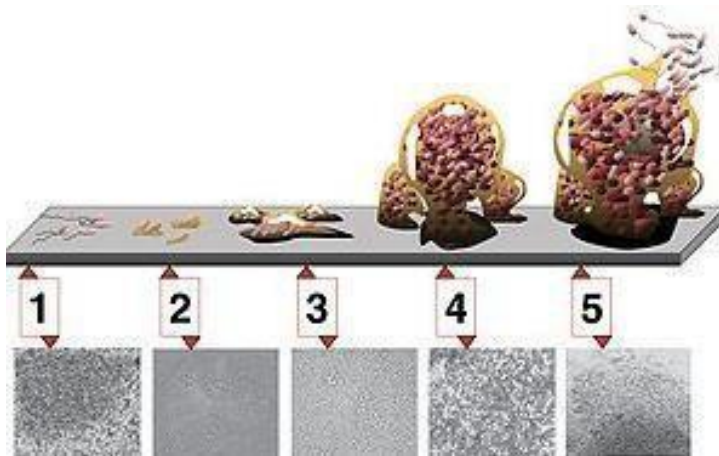


Figura.1.7. Modelo de formación de un *biofilm*. Bacterias planctónicas se adhieren inicialmente a una superficie (1) y posteriormente se diferencian (2 y 3) a un *biofilm* formando columnas o pilares multicelulares (4), hasta llegar a un biofilm maduro (5).

Las microcolonias individuales pueden despegarse de la superficie, dando lugar a revertantes planctónicos que nadan o flotan, alejándose de la estructura definida encerrada en una matriz, dejando huecos remanentes o espacios vacíos que pasan a formar parte de los canales de agua. Adicionalmente, colonias enteras pueden despegarse naturalmente del biofilm sin provocar ninguna perturbación obvia al sistema. Estos procesos no necesariamente están sincronizados a lo largo de toda la biopelícula, sino que son casi siempre localizados, por lo cual al mismo tiempo diferentes áreas de la

superficie pueden contener biofilms en distintas etapas de desarrollo (Stoodley y col., 2002).

1.6.2 *Sinorhizobium meliloti* y los biofilms

Los efectos de varios nutrientes, como es la concentración de sacarosa, fosfato y calcio así como de condiciones ambientales, tales como temperaturas extremas y pH sobre la formación de biofilm en *S. meliloti*, están positiva y negativamente correlacionadas. (Rinaudi y col, 2006).

Los EPSs determinan las condiciones de vida de las células en los biofilms afectando su porosidad, densidad, contenido de agua, carga, hidrofobicidad y la estabilidad mecánica (Flemming y Wingender, 2002). Los dos EPSs de *S. meliloti* son diferencialmente producidos en función de la disponibilidad de fosfato del medio en el cual es cultivada la bacteria. En *S. meliloti* Rm8530, el sistema de *quorum sensing* Sin/ExpR controla la formación de biofilms a través de la producción de EPS II (Rinaudi y González, 2010).

1.7 Metales Pesados

Los metales pesados se definen como elementos metálicos que tienen una densidad relativamente alta en comparación con el agua (Fergusson, 1990). Con la suposición de que el peso molecular y la toxicidad están relacionados entre sí, el término metales pesados también incluye metaloides, tales como arsénico, que son capaces de inducir toxicidad a bajo nivel de exposición (Duffus, 2002). Hay un nuevo término que se refiere a sus propiedades dañinas, y se está usando regularmente, es el de “elementos potencialmente tóxicos” (EPT o PTE por sus siglas en inglés), estos son persistentes, es decir, no pueden ser creados o degradados, ni mediante procesos biológicos ni antropogénicamente (Reyes, 2016).

A pesar de que los metales pesados son de origen natural, la contaminación es ocasionada por vía natural o actividades antropogénicas (Efsa, 2015) tales como las operaciones de minería y fundición, la producción industrial y el uso doméstico y agrícola de compuestos que contienen metales (He y col, 2005). La contaminación ambiental también puede ocurrir a través de la corrosión del metal, la deposición atmosférica, la erosión del suelo, la lixiviación de metales pesados, la evaporación de los recursos hídricos a suelos y aguas subterráneas (Nriagu, 1989). Ciertos fenómenos naturales tales como erupciones volcánicas han sido informados de contribuir significativamente a la contaminación con metales pesados (He y col., 2005).

Se ha informado de que los metales tales como cobalto (Co), cobre (Cu), cromo (Cr), hierro (Fe), magnesio (Mg), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni), selenio (Se) y zinc (Zn) son nutrientes esenciales que se requieren para diversas funciones bioquímicas y fisiológicas (WHO/FAO/IAEA., 1996). El suministro inadecuado de estos micronutrientes resulta en una variedad de enfermedades de deficiencia o síndromes (WHO/FAO/IAEA., 1996). Los metales pesados también se consideran como elementos traza, debido a su presencia y requerimiento en concentraciones muy bajas (Kabata-Pendia, 2001). Su biodisponibilidad es influenciada por factores físicos tales como temperatura, la adsorción y secuestro. También se ve afectada por factores químicos que influyen en la especiación en equilibrio termodinámico, solubilidad en lípidos y los coeficientes de reparto octanol/agua (Hamelink y col., 1994). Los factores biológicos tales como características de las especies, las interacciones tróficas y bioquímica / adaptación fisiológica, también juegan un papel importante (Verkleji, 1993). Los metales pesados esenciales ejercen funciones bioquímicas y fisiológicas en plantas y animales. Ellos son componentes importantes de varias enzimas clave y desempeñan papeles importantes en varias reacciones de oxidación-reducción (WHO/FAO/IAEA, 1996). Se requieren otros elementos esenciales para el funcionamiento biológico; sin embargo, un exceso en la cantidad de tales metales produce daño celular y tisular que conduce a una variedad de efectos adversos y de enfermedades humanas. Para algunos incluyendo cromo y cobre, hay un rango muy estrecho de las concentraciones entre efectos beneficiosos y tóxicos (Chang y col., 1996; Tchounwou y Centeno, 2008). Otros metales tales como el aluminio (Al), antimonio (Sb), arsénico (As), bario (Ba), berilio (Be), bismuto (Bi), cadmio (Cd), galio (Ga), germanio (Ge), oro (Au), indio (In), plomo (Pb), litio (Li), mercurio (Hg), níquel (Ni), platino (Pt), plata (Ag), estroncio (Sr), telurio (Te), talio (Tl), estaño (Sn), titanio (Ti), vanadio (V) y uranio (U) no tienen funciones biológicas establecidas y son considerados como metales no esenciales (Chang y col., 1996). Muchos de ellos como mercurio (Hg), arsénico (As), plomo (Pb), cadmio (Cd), zinc (Zn), níquel (Ni) y cromo (Cr), se han reportado como contaminantes en hortalizas tales como la lechuga, repollo, calabaza, brócoli y papa (Singh y col., 2010; Chen y col., 2013).

En los sistemas biológicos, se ha informado que los metales pesados pueden afectar orgánulos y componentes celulares, tales como la membrana celular, mitocondria, lisosomas, retículo endoplásmico, núcleo, y algunas enzimas implicadas en el metabolismo, la desintoxicación y reparación de daños (Wang y col., 2001). Los iones metálicos presentan capacidad para interactuar con componentes de la célula tales como

el ADN y las proteínas nucleares, causando daño del ADN y cambios conformacionales que pueden conducir a interferencias en la modulación del ciclo celular, la carcinogénesis o la apoptosis (Chang y col., 1996; Beyersmann y col., 2008). Varios estudios han demostrado que las especies reactivas del oxígeno (ROS) y el estrés oxidativo juegan un papel clave en la toxicidad y carcinogenicidad que producen los metales, como arsénico (Tchounwou y col., 2004), cadmio (Tchounwou y col., 2001), cromo (Patlolla y col., 2009) y mercurio (Sutton y col., 2007). Debido a su alto grado de toxicidad, estos cuatro elementos se encuentran entre los metales prioritarios que son de gran importancia para la salud pública. Todos ellos son tóxicos sistémicos que se conocen por inducir daños en múltiples órganos, incluso a niveles muy bajos de exposición. Según la Agencia de Protección de medio Ambiente de EEUU (EPA) y la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC), estos metales también se clasifican como "conocidos" o "probables" carcinógenos humanos.

1.7.1 Arsénico

El arsénico es un elemento natural de la corteza terrestre; ampliamente distribuido en todo el medio ambiente, está presente en el aire, el agua y la tierra. En su forma inorgánica es muy tóxico (OMS., 2018), las principales formas inorgánicas de arsénico incluyen a arsénico trivalente o arsenito (AsO_2^-) y arsénico pentavalente o arseniato (AsO_3^-), las cuales son mucho más tóxicas que sus formas orgánicas (OMS., 2012), estas son metabolitos metilados como ácido monometil arsénico (MMA), ácido dimetil arsénico (DMA) y óxido de trimetilarsina. La contaminación ambiental por el arsénico se produce como resultado de fenómenos naturales como las erupciones volcánicas y la erosión del suelo y actividades antropogénicas (ATSDR., 2000). Varios compuestos que contienen arsénico se producen industrialmente y se han utilizado para la fabricación de productos con aplicaciones agrícolas, tales como insecticidas, herbicidas, fungicidas, alguicidas, conservantes de madera y colorantes. También se han utilizado en la medicina veterinaria y humana (Tchounwou y col., 1999; Centeno y col., 2005), en este último caso el trióxido de arsénico ha sido aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) como un agente contra el cáncer en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (Rousselot y col., 1999). Su acción terapéutica se ha atribuido a la inducción de la muerte celular programada (apoptosis) en las células de la leucemia (Yedjou y Tchounwou, 2007).

Se estima que varios millones de personas están expuestas al arsénico crónicamente en todo el mundo, especialmente en países como Bangladesh, India, Chile, Uruguay, México,

Taiwán y Argentina. Puntualmente en nuestro país, el mayor foco de exposición se concentra en la provincia de Córdoba, donde el agua subterránea está contaminada con altas concentraciones de arsénico. La exposición al arsénico se produce a través de la vía oral (ingestión), inhalación, contacto con la piel y, en cierta medida, por vía parenteral, (ATSDR., 2000; Tchounwou y col., 1999; NRCC., 1978).

Los niveles naturales de arsénico en el suelo por lo general oscilan entre 1 a 40 mg kg⁻¹ pero la aplicación o eliminación de residuos de pesticidas pueden producir valores mucho más altos (Tchounwou y col., 2004).

El arsénico se ha identificado en 781 de los 1300 sitios de desechos peligrosos que han sido propuestos por la EPA de los Estados Unidos para su inclusión en la lista nacional de prioridades (ATSDR., 2000). La exposición humana en estos sitios se puede producir por una variedad de vías, incluyendo la inhalación de polvo en el aire, la ingestión de agua o suelo contaminado, o a través de la cadena alimentaria (Tchounwou y col., 2008).

La mayoría de casos de toxicidad de arsénico se han asociado con la exposición al arsénico inorgánico. En general, en aguas superficiales, el As (V) predomina sobre el As (III) especie de mayor toxicidad (Reyes y col., 2016). Mediante la unión a grupos tiol o sulfhidrilos en proteínas, As (III) pueden inactivar a más de 200 enzimas. El As (V) puede sustituir fosfatos, que está implicado en muchas vías bioquímica (Goyer, 2001, Hughes, 2002).

Los efectos toxicológicos del As en seres humanos producen la arsenicosis o hidroarsenicismo crónico es una enfermedad que se presenta por elevadas concentraciones de As inorgánico y presenta diferentes afectaciones en la salud humana tales como problemas respiratorios, enfermedades cardiovasculares, gastrointestinales y efectos cancerígenos (pulmón, vejiga y piel) entre otras (Reyes y col., 2016).

Según el Codex 1995, el cual es una colección de normas, códigos de práctica, directrices y otras recomendaciones internacionalmente reconocidas y relacionadas con los alimentos, la producción de alimentos y la inocuidad de los alimentos, y el reglamento de la UE (2016), el límite recomendado para la concentración de arsénico en el agua potable es de 0.05 ppm.

1.7.2 Mercurio

El mercurio es un metal pesado perteneciente a la serie de los elementos de transición de la tabla periódica. Es un elemento único debido a que existe o se encuentra en la naturaleza en tres formas (elemental, inorgánica y orgánica), y cada una tiene su propio

perfil de toxicidad (Clarkson y col., 2003). A la temperatura del medio del ambiente, el mercurio elemental existe como un líquido que tiene una alta presión de vapor y se libera al ambiente en forma de vapor de mercurio. El mercurio también existe como cationes con estados de oxidación de +1 (mercurioso) o +2 (mercúrico) (Guzzi y LaPorta, 2008). El metilmercurio (CH_3Hg^+ , MeHg) es el compuesto orgánico más frecuentemente encontrado en el medio ambiente y se forma como resultado de la metilación del mercurio inorgánico, el cual es formada por microorganismos que se encuentran en el suelo y el agua (Dopp y col., 2004). El metilmercurio es una de las formas con elevada toxicidad y es muy fácilmente incorporado en la cadena alimenticia y bio-acumulado en seres vivos (Reyes y col., 2016).

El mercurio es un tóxico ambiental generalizado y muy contaminante que induce alteraciones graves en los tejidos del cuerpo y causa una amplia gama de efectos adversos en la salud (Sarkar, 2005).

El mercurio se utiliza en la industria eléctrica y en numerosos procesos industriales (Tchounwou y col., 2003). Las fuentes importantes de exposición humana al mercurio provienen de las amalgamas dentales, productos farmacéuticos, cosméticos y alimentos, principalmente pescado contaminado (Tchounwou y col., 2003). El mercurio entra en el agua como un proceso natural de liberación de gases de la corteza de la tierra y también a través de la contaminación industrial (Dopp y col., 2004). Las algas y bacterias metilan el mercurio al entrar en los cursos de agua, e ingresa a la cadena alimentaria a través de peces, crustáceos y, finalmente, es incorporado por los seres humanos (Sanfeliu y col., 2003).

Las dos especies más altamente absorbidas son el mercurio elemental (Hg^0) y metilmercurio (MeHg). Las amalgamas dentales contienen más del 50% del mercurio elemental (Zahir y col., 2005). El mercurio gaseoso es altamente lipofílico y se absorbe de manera efectiva a través de los pulmones y tejidos de la boca. Después de que Hg^0 entra en la sangre pasa rápidamente a través de las membranas celulares, que incluyen tanto la barrera hematoencefálica como la placenta (Guzzi y LaPorta, 2008). A nivel intracelular, Hg^0 se oxida y se vuelve altamente reactivo como Hg^{2+} . El metilmercurio derivado del consumo de pescado se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal y debido a su solubilidad en lípidos, puede cruzar fácilmente la barrera placentaria y hematoencefálica. Este elemento tiene una muy baja la tasa de excreción y una proporción importante de lo que es absorbido se acumula en los riñones, tejido neurológico e hígado. Todas las

formas de mercurio son tóxicas, y sus efectos incluyen toxicidad gastrointestinal, neurotoxicidad, nefrotoxicidad, entre otras (Tchounwou y col., 2003).

1.7.3 Mecanismos de resistencia microbiana a los metales pesados

Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y tolerantes a metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal. En cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia de metal. Tanto los microorganismos resistentes como tolerantes son de particular interés como captadores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los contaminantes (Silver y Misra, 1988).

Los sistemas de resistencia a metales deben haberse desarrollado tempranamente luego de que la vida procariota comenzó, ya que se encuentran presentes en casi todos los tipos de bacterias (Ji y Silver, 1995). Los mismos se originaron debido a que las bacterias existen en un ambiente que siempre ha contenido metales y dicha resistencia está a menudo asociada a la resistencia a antibióticos (Nakahara y col., 1977; Harnett y Gyles, 1984; McEntee y col., 1986; Schwarz y Hobel, 1989; Belliveau y col., 1991). La resistencia a ambos puede ser transferida entre organismos a través de mecanismos de transferencia horizontal de genes, tales como conjugación o transducción (Harnett y Gyles, 1984). Inclusive en algunos casos la resistencia a metales y a antibióticos es mediada por el mismo plásmido (Nakahara y col., 1977). Al igual que con el desarrollo de la resistencia a antibióticos, las actividades humanas han creado ambientes de alta selección para la resistencia a metales. Sin embargo, esta última ha sido documentada antes del uso de los antibióticos (Ji y Silver, 1995).

Son seis los mecanismos involucrados en la resistencia a metales:

- Exclusión de metales por una barrera de permeabilidad: La pared celular, la membrana plasmática o la cápsula podrían evitar que los iones metálicos ingresen a la célula. Las bacterias que pertenecen a diferentes grupos taxonómicos pueden adsorber iones metálicos por grupos de la pared celular o cápsula (grupos carboxilo, amino, fosfato e hidroxilo) (Helow y col., 2000, Taniguchi y col., 2000). Esta adsorción es un proceso pasivo, ya que las células bacterianas muertas también son capaces de unirse a iones metálicos (Pardo y col., 2003). La barrera se puede lograr con alteraciones en la pared celular, en la membrana plasmática o en la envoltura de los microorganismos, como la producción de porinas alteradas (Rouch y col., 1995) y modificación de las envolturas de

polisacáridos extracelulares y de las cápsulas (Scott y col., 1988). Se ha demostrado que las células bacterianas eliminadas por tratamiento térmico poseen la misma o incluso mayor capacidad de adsorción que las células vivas (Yilmaz, 2003; Green-Ruiz, 2006). Ianeva, (2009) observó que la acumulación de iones metálicos por parte de las células vivas tiene lugar en dos pasos: la adsorción inicial rápida e inespecífica por la pared celular y luego el transporte activo lento de iones metálicos al citoplasma. Las bacterias que forman naturalmente envolturas de polisacáridos extracelulares muestran mayor capacidad para bioadsorber iones metálicos y así prevenir que los mismos interactúen con componentes celulares vitales. Se cree que en dichas bacterias, la envoltura les provee sitios de unión para los cationes metálicos (Arundhati y col., 2008).

- Transporte activo del metal fuera de la célula: son bombas de eflujo que pueden ser mecanismos codificados en cromosomas o en plásmidos (Ianeva., 2009). La hidrólisis de ATP o el gradiente electroquímico se utilizan como fuente de energía para exportar iones metálicos de la célula. Los sistemas de eflujo contienen proteínas pertenecientes a tres familias: RND (resistencia, nodulación, división celular), CDF (facilitador de la difusión de cationes) y ATPasas tipoP; estas junto con las proteínas CDF de bacterias gram negativas son específicas para el transporte de sustratos a través de la membrana plasmática en el periplasma (Ianeva., 2009). Un ejemplo de este tipo de sistema dualista es el sistema de resistencia al arsénico *ars*, compuesto de 3-5 genes y se encuentra en bacterias gram positivas y gram negativas. El operón *ars* codifica la bomba ATPasa *ArsA / ArsB* y *ArsC* reductasa. En el primer paso, el arsenato citoplasmático se reduce enzimáticamente a arsenito por arsenato reductasa (*ArsC*) y luego se exporta por el sistema de salida (ATPasa *ArsA / ArsB*) a través de la membrana plasmática (Mukhopadhyay y col., 2004).
- Secuestro intracelular del metal por proteínas de unión: El secuestro intracelular se realiza por la formación de complejos, de iones metálicos por varios compuestos en el citoplasma celular. Existen dos clases de péptidos de unión a metales: las metalotioneínas y las fitoquelatinas que son ricas en residuos de cisteína y se unen a los iones metálicos mediante grupos sulfhidrilos (Pinto y col., 2003). Entre los procariotas se ha demostrado la capacidad de sintetizar metalotioneína, fitoquelatinas y péptidos, por ejemplo el secuestro intracelular de iones de cadmio por glutatión se observó en células de *Rhizobium leguminosarum* (Lima y col., 2006)
- Secuestro extracelular: El secuestro extracelular es la acumulación de iones metálicos por componentes celulares en el periplasma, en la membrana externa o la complejación de

iones metálicos como compuestos insolubles (Ianieva, 2009). Las bacterias reductoras de sulfato generan grandes cantidades de sulfuro de hidrógeno que causa la precipitación de varios cationes metálicos (Luptakova y Kusnierova, 2005). La resistencia ocurre cuando el metal se acompleja de forma tal que ya no puede atravesar la membrana celular (Murphy y Levy, 1983).

- Detoxificación enzimática del metal hacia una forma menos tóxica: Las bacterias pueden reducir un amplio espectro de iones de metales pesados. Algunas bacterias pueden usar metales y metaloides como donantes de electrones o receptores para la generación de energía o en su forma oxidada podrían servir como receptores terminales de electrones durante la respiración anaeróbica. El sistema mejor estudiado de desintoxicación de metales mediante la reducción enzimática otorga tolerancia al mercurio codificado por el operón *mer*. Los iones de mercurio divalentes se transfieren a la célula mediante la proteína de transporte MerT y se reducen a mercurio elemental mediante la reductasa intracelular MerA (Brown y col., 2001).
- Reducción de la sensibilidad a metales por alteración de los blancos celulares: la protección es adquirida por mutaciones que disminuyen la sensibilidad sin alterar funciones básicas, o por el incremento de la producción de un componente celular particular que lleve adelante la inactivación del metal (los sistemas de reparación de ADN también proveen de una protección limitada al ADN genómico y plasmídico). Los microorganismos también pueden protegerse produciendo componentes resistentes a metales o alternando vías metabólicas en un esfuerzo de evitar el contacto de componentes sensibles con los metales (McEntee y col., 1986; Mergeay, 1991).

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

Los componentes extracelulares de *Sinorhizobium meliloti* constituyen moléculas conectoras claves en la formación de agregados bacterianos y biofilms mixtos entre células de *S. meliloti* y otras rizobacterias, confiriendo un ambiente protegido para el desarrollo microbiano

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GENERAL

El propósito del presente trabajo de tesis doctoral está orientado a determinar los factores ambientales, genéticos, estructurales y de regulación propios de los rizobios y otras bacterias rizosféricas que influyen en la adhesión y en las interacciones célula-célula.

2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Analizar la contribución de los EPSs de *S. meliloti* en la resistencia a metales pesados.
- 2.- Evaluar la función de los polisacáridos extracelulares de *S. meliloti* en la co-agregación intragenérica.
- 3.- Estudiar el rol de los EPSs de *S. meliloti* en la co-agregación intergenérica con otras rizobacterias.
- 4.- Identificar el tipo de EPS clave en el desarrollo del proceso autoagregativo.

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1 Medios de cultivo para Bacterias.

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

0.5% Triptona

0.3% Extracto de levadura

0.1% CaCl₂

1.5% Agar

3.1.2 MGM (*Minimal Glutamate Mannitol*) bajo en fosfato (Marketon y Gonzales., 2002)

50 mM MOPS

19 mM Glutamato de sodio

55 mM Manitol

0,1 mM K₂HPO₄-KH₂PO₄ (concentraciones equimolares)

1 mM MgSO₄

0,25 mM CaCl₂

0,0004 mM Biotina

pH 7,2.

3.2 Condiciones de cultivo bacteriano.

Las cepas empleadas en este trabajo fueron cultivadas a 30°C y en agitación a 150 rpm. Dependiendo del microorganismo, los medios de cultivo fueron suplementados con los siguientes antibióticos: estreptomina (500 µg/ml), neomicina (200 µg/ml), gentamicina (40 µg/ml), tetraciclina (10 µg/ml) y cicloheximida (25 µg/ml).

3.3 Conservación de cepas bacterianas.

La conservación de las cepas bacterianas se llevó a cabo mediante el crecimiento de cultivos hasta fase exponencial tardía, los cuales fueron fraccionados en microtubos adicionados con glicerol estéril a la concentración final de 20 % y finalmente conservados a -80 °C.

3.4 Cepas bacterianas empleadas.

En la tabla 3.1 se detallan las cepas utilizadas en esta investigación.

Tabla 3.1 Cepas de *S. meliloti* utilizadas.

Cepa	Propiedades relevantes	Referencia u origen
<i>S. meliloti</i>		
Rm8530	SU47 <i>str21 expR101 (expR⁺)</i>	Glazebrook y Walker., 1989
Rm8530 <i>exoY</i>	Rm8530 <i>exoY210::TN5, Neo^R</i>	Sorroche y col., 2010
Rm8530 <i>expA</i>	Rm8530 <i>expA3::Tn5-233, Gm^R</i>	Sorroche y col., 2010
Rm8530 <i>expAexoY</i>	Rm8530 <i>expA3::Tn5-233 exoY210::TN5, Gm^R Neo^R</i>	Sorroche y col., 2010
Rm 8530 <i>fliP</i>	Rm8530 <i>fliPQTn5</i>	Sorroche y col., no publicado.
Rm 8530 <i>lpsB</i>	Rm8530 <i>lpsB::Tn5</i>	Sorroche y col., 2018
Cepas de la Rizosfera		
<i>Azospirillum brasiliense</i> AZ39	Inoculante Comercial	IMYZA; INTA Castelar
<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417r	Cepa de referencia	Van Peer y col., 1991
<i>Burkholderia</i> sp LVR16	Aislamiento de rizósfera de garbanzo	Laboratorio 13 Biología Molecular UNRC
Cepas fluorescentes		
<i>Escherichia coli</i> <i>pHC60</i>	Plásmido para la expresión de GFP Tc ^R	Cheng y Walker, 1998
<i>Escherichia coli</i> <i>pRK600</i>	Helper km ^R	Finan y col., 1984
<i>Escherichia coli</i> <i>pMP7604</i>	Plásmido para la expresión de Cherry Tc ^R	Lagendijk y col ., 2010
<i>Escherichia coli</i> <i>pRK2013</i>	Helper Cn ^R	

También fueron creadas variantes fluorescentes (GFP y mCherry) de cepas silvestres y mutantes de *S. meliloti* 8530 por conjugación triparental con los plásmidos pHC60 (GFP) o pMP7604 (mCherry) según corresponda.

3.5 Soluciones madre de Arsénico y Mercurio.

Las soluciones madre fueron preparadas a partir de las sales de los metales detallados en la tabla 3.2, las cuales fueron esterilizadas por filtración, con filtros de MC-PES-02S con un poro de 0.22 μm y conservadas en recipientes plásticos de 50 ml estériles a 4°C. Estas soluciones se emplearon para suplementar medios de cultivo, en los ensayos de crecimiento, formación de biofilm y rescate; y así obtener las concentraciones finales deseadas.

Tabla 3.2: Soluciones madres de Arsénico y Mercurio.

Sal	PM (g mol ⁻¹)	Concentración madre (mM)	Concentraciones empleadas (μM)
NaAsO ₂	130	10	25, 50, 100.
HgCl ₂	271.52	10	2.5, 5, 10, 20

3.6 Determinación del crecimiento por turbidimetría y recuento de células viables.

El crecimiento bacteriano se evaluó mediante turbidimetría, midiendo la absorbancia (densidad óptica, DO) alcanzada a 620 nm. *S. meliloti* Rm8530 *wt* (*wild type*), y sus mutantes Rm8530 *exoY*, Rm8530 *expA*, Rm8530 *expAexoY* (DM), Rm8530 *fliP* y Rm8530 *lpsB*, se cultivaron en medio líquido TY, suplementado con concentraciones de 25, 50 y 100 μM de AsIII o 2,5; 5, 10, 20 μM de Hg²⁺. En todos se partió de una DO inicial de 0,01 y se tomaron alícuotas cada 4 h aproximadamente para determinar crecimiento por turbidimetría a DO₆₂₀ en lector de microplaca.

El número de células viables se determinó mediante recuento en placa utilizando la técnica de la microgota (Somasegarán y Hoben., 1994). La misma consistió en realizar diluciones seriadas de cada muestra y sembrarlas en placas de Petri estériles conteniendo medio sólido (TY). Cada placa se dividió en cuatro campos y en cada uno de ellos se sembraron dos gotas (20 μL) de cada dilución. Las placas se incubaron a 28°C durante 48 h y luego se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

3.7 Formación de *biofilms* en presencia de Arsénico o Mercurio.

3.7.1 Ensayo de *biofilm* en tubos de *khan*

La capacidad de formación de *biofilms* fue determinada macroscópicamente mediante un ensayo cuantitativo en tubos de *khan* donde el *biofilm* formado fue teñido con cristal violeta (CV) de acuerdo a lo descrito previamente para *Pseudomonas* (O'Toole y Kolter., 1998). En una primera instancia se hicieron crecer los microorganismos (Rm8530 *wt*, Rm8530 *exoY*, Rm8530 *expA*, Rm8530 *expAexoY*, Rm8530 *fliP* y Rm8530 *lpsB*) en medio líquido TY con sus antibióticos correspondientes, posteriormente estos cultivos fueron diluidos con solución fisiológica estéril hasta alcanzar una $DO_{620}=1$. Estos preinóculos fueron utilizados posteriormente inoculando cada tubo de *khan* con 8 μ l de cultivo bacteriano ($DO_{620}=1$) sobre 800 μ l de medio de cultivo TY fresco para alcanzar una DO_{620} inicial de 0,01. Se utilizaron concentraciones de 25 μ M, 50 μ M y 100 μ M de AsO_2^- , y 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M y 20 μ M de Hg^{+2} , a los fines de evaluar la formación de *biofilm* frente a los EPT. Inmediatamente después de la inoculación los tubos fueron cubiertos con tapones plásticos para prevenir la evaporación y contaminación con otros microorganismos e incubadas con agitación a 30 °C por 48 h. Luego el contenido de cada tubo fue homogenizado suavemente por pipeteo y se midió el crecimiento bacteriano por absorbancia a 620 nm en lector de microplacas. Las células planctónicas de cada tubo fueron posteriormente removidas con pipeta automática, y los tubos fueron cuidadosamente lavados tres veces con solución fisiológica estéril (NaCl 0.85% m/V), luego fueron vaciados y teñidos con CV al 0.1% durante 15 min. Cumplido el tiempo de incubación con CV, el colorante fue aspirado cuidadosamente de los tubos los cuales fueron enjuagados con agua destilada tres veces. El CV retenido en la biomasa sétil fue solubilizado mediante la adición de 1 ml de alcohol etílico (96%), agitación vigorosa, distribución de alícuotas en microplaca y cuantificación de la absorbancia del colorante en solución a una DO_{570} en lector de microplaca. Al mismo tiempo se colocaron como control de medio de cultivo 4 tubos de *khan* sin inocular, sobre los cuales se realizaron los mismos procedimientos que a los diferentes tratamientos del ensayo.

3.7.2 Ensayo de recuento de *biofilm*

Para liberar las células sétiles adheridas al soporte de vidrio, se eliminó el medio de cultivo y luego se realizaron 3 lavados con 1 ml de solución fisiológica de manera muy cuidadosa para no romper la biopelícula, y eliminar así las células que no integran el *biofilm*. Posterior a los lavados, se agregó 1 ml de solución fisiológica y perlititas de vidrio,

las cuales por medio de agitación vigorosa, permitieron desagregar el biofilm, y de esta manera se liberaron las células asociadas al mismo y se alcanzó una suspensión homogénea de células.

El número de células viables en biofilm se determinó mediante la técnica de la microgota (Somasegarán y Hoben, 1994). La misma consistió en realizar diluciones seriadas de cada muestra y sembrarlas en placas de Petri estériles conteniendo medio sólido (TY) y el/los antibiótico/s correspondiente/s para la cepa en estudio. Cada placa se dividió en cuatro campos y en cada uno de ellos se sembraron dos gotas (20 μ L) de cada dilución. Las placas se incubaron a 28 °C, posteriormente se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

3.8 Ensayos de rescate entre diferentes cepas de *S. meliloti*.

Las bacterias fueron cultivadas en medio TY, suplementado con los antibióticos correspondientes, e incubadas 48 h a 28 °C en agitación a 150 rpm. Posteriormente estos cultivos fueron diluidos con solución fisiológica estéril hasta alcanzar una $DO_{620}=1$. Luego en un tubo de ensayo se colocan 3 ml de medio de cultivo (TY), estreptomicina 500 μ g/ml y 30 μ l de *S. meliloti* Rm8530 *wt* con 30 μ l de *S. meliloti* Rm8530 mutante en *expA*, *expA-exoY*, *fliP* o *lpsB*; para alcanzar una $DO_{620}=0,01$. Se agregó la solución del metal/metaloide para alcanzar las concentraciones descriptas previamente y se incubó cada tubo en agitación a 30 °C durante 48 h. Luego se realizaron diluciones seriadas a cada tratamiento y se sembraron placas de TY mediante la técnica de microgota (Somasegaran y Hoben., 1994). Para diferenciar las cepas, cada dilución fue sembrada por duplicado en placas de TY con estreptomicina y en placas de TY con estreptomicina y gentamicina para el desarrollo de *expA*, para la selección de *lpsB* y *fliP* se utilizó estreptomicina y neomicina en las placas, mientras que para seleccionar la cepa *S. meliloti* Rm8530 *expA-exoY*, a las placas de TY se les agregó estreptomicina, gentamicina y neomicina. En estas últimas se realizaron las selecciones de las cepas mutantes (*S. meliloti* Rm8530 *expA*, *Rm8530 expA-exoY*, *Rm8530 fliP* y *Rm8530 lpsB*), ya que *S. meliloti* Rm8530 *wt* es sensible a gentamicina y/o neomicina, de esta manera por diferencia se puede evaluar el rescate de la cepa *wt* a cada cepa mutante.

El mismo procedimiento se utilizó para evaluar el rescate de la cepa *S. meliloti* Rm8530 *exoY* a la cepa mutante en *expA* y a la cepa doble mutante (*expA-exoY*), sólo que en este caso la cepa mutante en EPSI (*exoY*) es resistente a estreptomicina y neomicina, pero

sensible a gentamicina, lo que no nos permitió diferenciar a la cepa mutante en *exoY* con todas las cepas mutantes, como con Rm8530 *fliP* y Rm8530 *lpsB*.

3.9 Extracción de exopolisacárido tipo II

S. meliloti Rm8530 *exoY* se cultivó en medio TY, suplementado con los antibióticos correspondientes, durante 24 h a 28 °C en agitación a 150 rpm. Posteriormente una alícuota de este pre-inoculo se agregó en 1L de medio MGM, el cual se incubó por 7 días a 28 °C en agitación a 150 rpm, luego se centrifugó a 10.000 g por 20 minutos. Para separar las células bacteriana del sobrenadante se utilizaron filtros de 0.22 µm, se calentó a 100 °C durante 15 minutos, para inactivar las enzimas del medio y posteriormente se liofilizó, al producto de este proceso y se lo resuspendió en 200 ml de agua con tres volúmenes de etanol. Se realizó la precipitación durante toda la noche a 4°C, se centrifugó a 16.000 g y al precipitado, se lo diluyó en buffer fosfato de sodio pH 7. Por último, se filtró en filtros Amicon® Ultra15 y mediante la técnica de Antrona se cuantificó la concentración de azúcares totales.

3.10 Determinación de Azúcares por Antrona

La concentración de EPSs extraído de cada muestra se determinó por una reacción colorimétrica. Se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de glucosa, y el blanco correspondiente con agua destilada.

Se agregó reactivo de color (Antrona – H₂SO₄) a cada tubo de vidrio (estándares, blanco y muestras). Se agitó y se dejó reposar 2 minutos en hielo, luego se incubó a 100 °C durante 10 min, inmediatamente cumplido el tiempo los tubos fueron retirados y colocados en hielo nuevamente. La intensidad de color desarrollada en cada tubo se midió en espectrofotómetro a una absorbancia a 625 nm, con estos resultados se construyó la curva de calibrado y por extrapolación se definió la concentración de las muestras.

3.11 Conjugación para marcaje de cepas con proteínas fluorescentes

La transferencia de los plásmidos que expresan las proteínas fluorescentes, a *S. meliloti* y bacterias rizosféricas, se llevó a cabo mediante la técnica de conjugación triparental. Para ello se cultivaron en placa de LB con los antibióticos correspondientes a las cepas dadoras (*E. coli* pHc60 GFP y *E. coli* pMP7604 Cherry) y *helper* (*E. coli* pRK600 y *E. coli* pRK2013); las cepas receptoras fueron cultivadas en placas de TY con sus antibióticos correspondientes. En un microtubo de 1,5 ml se colocó 100 µl de medio LB, y una

cantidad suficiente de las cepas dadoras y *helper*, y de la cepa receptora se colocó una menor proporción en relación a las cepas dadoras, se agitó vigorosamente con vortex, para permitir mezclar de manera más eficiente los microorganismos, esta mezcla se sembró en una placa de LB sin antibióticos y se incubó a 28 °C por 24 h. Luego se recolectó la masa de células y se procedió a su resuspensión en un microtubo con 1 ml de LB; la suspensión obtenida fue sembrada superficialmente en placas de TY suplementada con los antibióticos correspondientes para la selección de las bacterias transconjugantes. Las mismas fueron purificadas por los reiterados repiques en placas selectivas por los antibióticos. Los controles, se realizaron observando preparados de las cepas conjugantes al microscopio de epifluorescencia.

3.12 Ensayos de co-agregación macroscópica y microscópica

Las bacterias se cultivaron de manera individual en 2 ml de medio adecuado al microorganismo en estudio, e incubadas durante 24 h a 28 °C. Posteriormente 100 µl de los mismos fueron subcultivados en 150 ml de medio, e incubados durante 48 hs en las condiciones antes descritas, luego se determinaron las ufc/ml (técnica de la microgota) de cada microorganismo de estudio. La concentración elegida para este ensayo fue de 10⁹ ufc/ml. Posteriormente, se plantearon cuatro tratamientos diferentes, incluyendo los controles:

- 1- TY (control): se centrifugó cada cultivo dos veces y se lo resuspendió en TY, luego se mezcló 2,5 ml de cada suspensión y se agregó al tubo de hemolisis.
- 2- Sobrenadante cepa 1 (S1): Se centrifugó cada cultivo dos veces y se lo resuspendió en el sobrenadante de la cepa que se nombra en primer lugar, en las combinaciones de microorganismos que describiremos en resultados. Luego se mezcló 2,5 ml de cada suspensión y se agregó al tubo de hemolisis.
- 3- Sobrenadante cepa 2 (S2): Se centrifugó cada cultivo dos veces y se lo resuspendió en el sobrenadante de la otra cepa en estudio, luego se mezcló 2,5 ml de cada suspensión y se agregó al tubo de hemolisis.
- 4- EPSs purificado: Se centrifugó cada cultivo dos veces y se lo resuspendió en EPSII purificado. Luego se mezcló 2,5 ml de cada suspensión y se agregó al tubo de hemolisis.

Posteriormente se mantuvieron en reposo a 4 °C durante 24 h. Luego, de la zona superior de la suspensión cercana a la interfase aire-líquido, se extrajeron cuidadosamente 500 µl

y se midió a DO_{600} (DO_f), paso siguiente, se agitó vigorosamente el tubo, y se volvió a leer la DO_{600} (DO_i). El porcentaje de co-agregación se calculó en base a la siguiente fórmula:

$$100(1-DO_f/DO_i)$$

Donde DO_i corresponde a la DO_{600} de la suspensión inicial y se determinó empleando una alícuota de uno de los tubos, previa agitación vigorosa; DO_f, es la DO_{600} de la alícuota tomada luego del periodo de sedimentación (sin previa agitación).

Las centrifugaciones que se realizaron en los tratamientos fueron a 4000 rpm durante 15 minutos.

Para la determinación microscópica, las cepas fluorescentes, verdes (pHC60 GFP) o rojas (pMP7604 Cherry), descritas en la tabla 3.1; se combinaron, y luego del periodo de incubación a 4 °C por 24 h, se extrajo cuidadosamente el sobrenadante y se tomaron 20 µl de las agregaciones, se colocaron entre portaobjeto y un cubreobjetos, se lo dejó entre 6 a 8 h a 4°C en cámara húmeda, posteriormente fueron examinados en un microscopio de epifluorescencia.

3.13 Análisis estadístico.

Los ensayos se realizaron por triplicado y se repitieron tres veces. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una comparación de múltiples niveles de tratamiento con el control mediante el test *post hoc* de diferencia menos significativa de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron con Infostat, versión 1.0 (Grupo Infostat Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina).

4. RESULTADOS.

4.1 Efecto de metales pesados sobre el crecimiento bacteriano de *S. meliloti*.

Con el objetivo de determinar los efectos de diferentes concentraciones de metales y/o metaloides pesados en el crecimiento del microsimbionte de alfalfa, se utilizaron cepas de *S. meliloti*, Rm8530 (*wt*), y sus mutantes: Rm8530 *exoY*, (deficiente en la producción de EPS I); Rm8530 *expA*, (deficiente en EPS II), Rm8530 *exoYexpA* (DM), la cual no produce ningún tipo de EPS, Rm8530 *fliP*, (deficiente en flagelo) y Rm8530 *lpsB*, la cual tiene una alteración en el lipopolisacárido.

El crecimiento bacteriano de las diferentes cepas de *S. meliloti* en función del tiempo, se cuantificó a través de mediciones de DO a 620 nm y los datos obtenidos en las distintas condiciones de crecimiento fueron empleados para la construcción de curvas de crecimiento. Asimismo, el crecimiento bacteriano también fue cuantificado mediante recuentos de células viables (ufc.ml⁻¹) a distintos tiempos en las diferentes concentraciones de metales.

En general, la presencia de EPT en el medio de cultivo condujo a una disminución del crecimiento de las cepas mutantes y a un retraso en el crecimiento de la cepa *wt*. Además, no hubo variaciones en el crecimiento de cada cepa en las diferentes concentraciones de un mismo EPT (Figura 4.1). Esto indicaría que, independientemente de la concentración utilizada, la presencia del metal/metaloides fue el elemento clave para determinar el crecimiento bacteriano de *S. meliloti*.

La figura 4.1 muestra curvas de crecimiento de las seis cepas de *S. meliloti* evaluadas en medio TY sin agregado de metales (control, Figura 4.1A), y en presencia de las diferentes concentraciones de los distintos EPT (Figuras 4.1 B a H). En la figura 4.1A puede observarse que todas las cepas mostraron curvas de crecimiento típicas, con una fase de latencia aproximada de 5 a 8 hs, seguida de una fase exponencial hasta las 25 h y una fase estacionaria desde las 25 a 30 h en adelante, a excepción de las cepas de *S. meliloti* mutantes en lipopolisacárido y flagelo, las cuales no mostraron un crecimiento típico, sino que tuvieron una fase de latencia prolongada y al final del tiempo de experimentación no alcanzaron a obtener la misma DO que el resto de las cepas evaluadas. Estos resultados demuestran la importancia de estas estructuras en este microorganismo.

En las condiciones de exposición a EPT (Figuras 4.1 B, C, D, F, G, H) pudo determinarse un ligero aumento inicial en la absorbancia seguido de una detención en el crecimiento, lo que lleva a una fase de latencia mucho más prolongada. La cepa *wt* fue la única que a las 48 h pudo alcanzar una DO similar a las condiciones control. La mutante Rm 8530 *exoY*, alcanzó la mayor absorbancia al final del ensayo (48 h), en

comparación con las demás mutantes Rm 8530 *expA*, Rm 8530 *exoYexpA*, Rm 8530 *lpsB* y Rm 8530 *fliP*, esta última cepa tuvo una fase latencia muy prolongada, de aproximadamente 40 h, seguida de una incipiente fase exponencial, que sólo se midió hasta las 48 h, este efecto fue observado principalmente cuando las cepas estuvieron expuestas a Arsenito. De ambos EPT, Hg^{2+} fue el que produjo mayor reducción en la capacidad de crecimiento de las cepas de *S. meliloti*.

Debido a que las curvas de crecimiento son ensayos cualitativos, validamos estos resultados por medio de recuentos bacterianos, los cuales se realizaron a las 0, 24 y 48 h de crecimiento. Todas las cepas tuvieron un recuento inicial a las 0 h de aproximadamente 1×10^2 ufc.ml⁻¹. Cada cepa mostró diferencias significativas en los recuentos que se realizaron a las 24 y 48 h, lo que indica que fueron capaces de crecer con el tiempo (Tabla 4.1), estos resultados nos demuestran que hay una correlación entre las curvas de crecimiento evaluadas por absorbancia y el recuento de unidades formadoras de colonias. Bajo las condiciones control, el número de bacterias fue mucho más alto en comparación con la exposición a AsO_2^- o Hg^{2+} ; y las cepas *wt* y *exoY* fueron capaces de alcanzar recuentos de alrededor de 1×10^9 y 1×10^7 ufc.ml⁻¹ respectivamente, en comparación a las demás cepas evaluadas. Como se muestra en la Tabla 4.1, a las 24 h, la presencia de metal/metaloide (Hg^{2+}/AsO_2^-) en el medio de cultivo, redujo el número de bacterias en todas las cepas comparándolo con la condición control, mientras que a las 48 h, ese efecto se revirtió sólo para la cepa *wt*, que alcanzó un recuento de 1×10^9 ufc.ml⁻¹, mientras que los recuentos de las cepas mutantes fueron claramente afectados por los EPT. La cepa mutante Rm8530 *exoY* productora de EPS II, fue capaz de adaptarse de mejor manera a cualquier EPT ensayado en comparación con las demás cepas mutantes en EPS. Rm8530 *exoY* alcanzó recuentos de 10^7 ufc.ml⁻¹, mientras que las cepas con mutaciones en *expA* y *lpsB* alcanzaron recuentos bacterianos de 10^5 ufc.ml⁻¹; y las cepas mutantes en *fliP* y DM obtuvieron recuentos de 10^4 y 10^6 ufc.ml⁻¹ respectivamente, en todas las concentraciones evaluadas de los metales pesados.

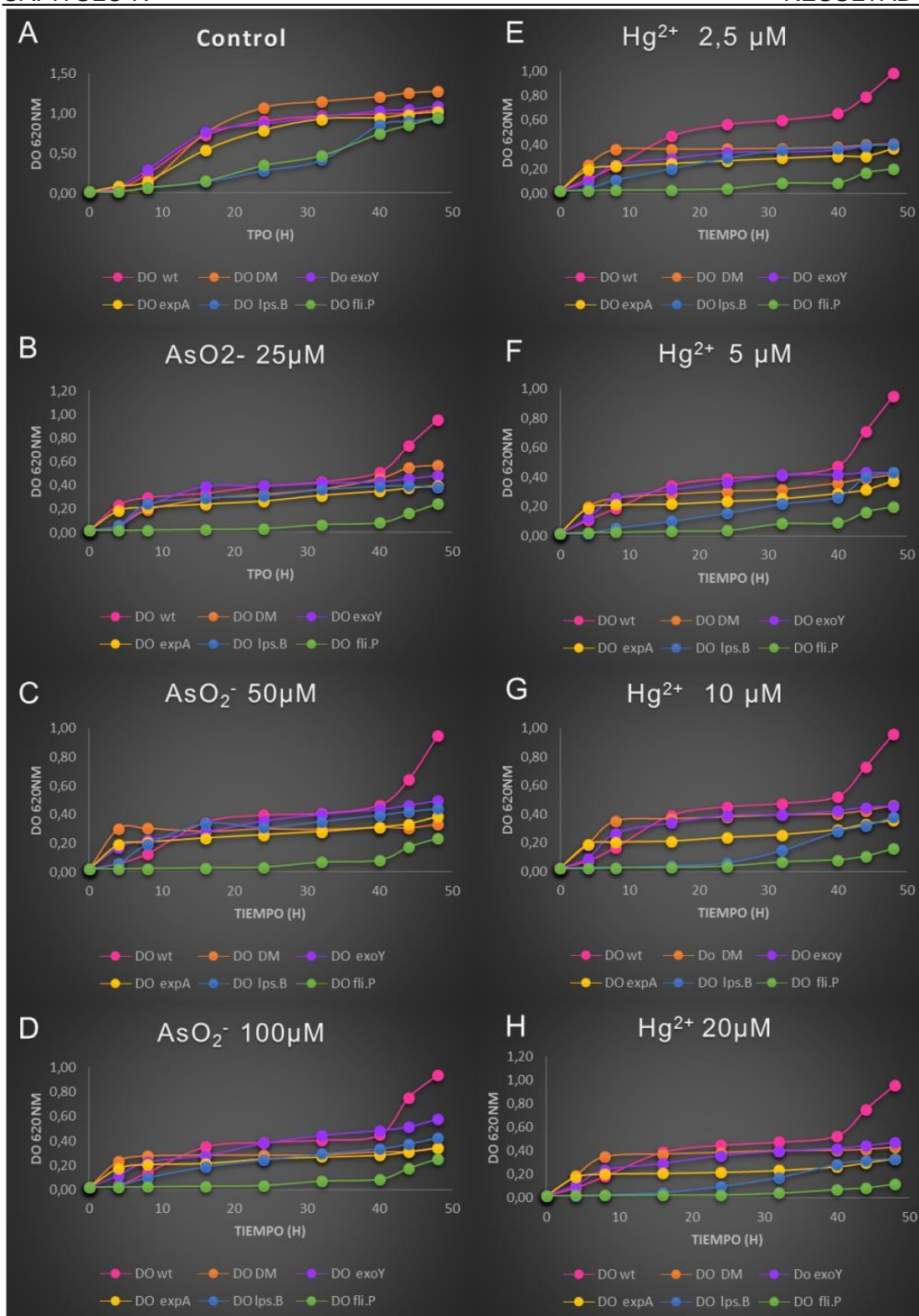


Figura 4.1: Curvas de crecimiento de las cepas de *S. meliloti* Rm8530 tipo salvaje (*wt*) y mutantes en la síntesis de EPS I (*exoY*), EPS II (*expA*), ambos EPSs (*exoYexpA*, DM), flagelo (*fliP*), y en LPS (*IpsB*). Las cepas se cultivaron durante 48 h en medio TY sin metales añadidos (control) (A); y en medio TY suplementado con NaAsO₂ 25 μM (B), 50 μM (C) y 100 μM (D); y HgCl₂ 2,5 μM (E), 5 μM (F), 10 μM (G) y 20 μM (H). Cada punto representa el valor medio de tres ensayos diferentes realizados por triplicado. Las barras de error fueron omitidas para una mejor visualización del gráfico

Cepas Control						
Tiempo (h)	Wt	DM	expA	exoY	lpsB	fliP
0	1,36x10 ²	1,19x10 ²	1,03x10 ²	1,09x10 ²	1,06x10 ²	1,17x10 ²
24	3,83x10 ⁷	2,93x10 ⁶	1,19x10 ⁶	4,97x10 ⁷	3,16x10 ⁴	7,13x10 ⁴
48	7,06x10 ⁹	4,75x10 ⁸	1,98x10 ⁸	6,16x10 ⁹	8,15x10 ⁷	9,23x10 ⁷
Cepas en AsO₂ 25µM						
Tiempo (h)	Wt	DM	expA	exoY	lpsB	fliP
0	1,36x10 ²	1,19x10 ²	1,03x10 ²	1,09x10 ²	1,06x10 ²	1,17x10 ²
24	2,19x10 ⁵	1,74x10 ⁴	1,44x10 ⁴	6,34x10 ⁵	1,16x10 ⁴	3,64x10 ²
48	5,93x10 ⁹	3,23x10 ⁶	2,31x10 ⁵	7,23x10 ⁷	1,89x10 ⁴	6,64x10 ⁴
Cepas AsO₂ 50µM						
Tiempo (h)	Wt	DM	expA	exoY	lpsB	fliP
0	1,03x10 ²	1,19x10 ²	1,03x10 ²	1,09x10 ²	1,06x10 ²	1,17x10 ²
24	2,17x10 ⁴	1,22x10 ⁴	2,17x10 ⁴	3,94x10 ⁵	2,64x10 ⁴	3,86x10 ²
48	3,06x10 ⁵	2,49x10 ⁶	3,06x10 ⁵	5,03x10 ⁷	3,37x10 ⁵	1,96x10 ⁴
Cepas en AsO₂ 100µM						
Tiempo (h)	Wt	DM	expA	exoY	lpsB	fliP
0	1,36x10 ²	1,19x10 ²	1,03x10 ²	1,09x10 ²	1,06x10 ²	1,17x10 ²
24	1,71x10 ⁵	1,17x10 ⁴	2x10 ⁴	2,94x10 ⁵	2,63x10 ⁴	2,12x10 ²
48	3,49x10 ⁹	2,08x10 ⁶	2,98x10 ⁵	1,09x10 ⁷	1,65x10 ⁵	1,94x10 ⁴
Cepas en Hg²⁺ 2,5 µM						
Tiempo (h)	Wt	DM	expA	exoY	lpsB	fliP
0	1,36x10 ²	1,19x10 ²	1,03x10 ²	1,09x10 ²	1,06x10 ²	1,17x10 ²
24	8,74x10 ⁵	1,9x10 ⁴	2,37x10 ⁴	3,03x10 ⁵	2,43x10 ⁴	2,36x10 ²
48	6,18x10 ⁹	2,12x10 ⁵	2,97x10 ⁵	6,97x10 ⁷	2,6x10 ⁵	8,17x10 ³
Cepas en Hg²⁺ 5 µM						
Tiempo (h)	Wt	DM	expA	exoY	lpsB	fliP
0	1,36x10 ²	1,19x10 ²	1,03x10 ²	1,09x10 ²	1,06x10 ²	1,17x10 ²
24	7,31x10 ⁵	2,41x10 ⁴	2,34x10 ³	2,94x10 ⁵	1,91x10 ³	2,13x10 ²
48	3,87x10 ⁹	7,76x10 ⁶	2,33x10 ⁵	3,12x10 ⁷	3,01x10 ⁵	1,87x10 ³
Cepas en Hg²⁺ 10 µM						
Tiempo (h)	Wt	DM	expA	exoY	lpsB	fliP
0	1,36x10 ²	1,19x10 ²	1,03x10 ²	1,09x10 ²	1,06x10 ²	1,17x10 ²
24	3,59x10 ⁵	2,32x10 ⁴	3,32x10 ⁴	3,73x10 ⁵	6,54x10 ²	1,86x10 ²
48	2,44x10 ⁹	1,87x10 ⁶	2,98x10 ⁵	4,12x10 ⁷	1,34x10 ⁵	2,06x10 ²
Cepas en Hg²⁺ 20 µM						
Tiempo (h)	Wt	DM	expA	exoY	lpsB	fliP
0	1,36x10 ²	1,19x10 ²	1,03x10 ²	1,09x10 ²	1,06x10 ²	1,17x10 ²
24	2,77x10 ⁵	1,90x10 ⁴	1,60x10 ⁴	2,95x10 ⁵	8,16x10 ²	2,16x10 ²
48	1,23x10 ⁹	2,08x10 ⁶	2,7x10 ⁵	2,56x10 ⁷	2,16x10 ⁵	3,67x10 ³

Tabla 4.1: Recuento de las cepas de *S. meliloti* y sus mutantes, expuestas a metales. Cada valor es la media de tres ensayos diferentes realizados por triplicado, estos resultados se expresan como ufc.ml⁻¹. Los valores de desviación estándar fueron omitidos, para simplificar el formato de la tabla. Conforme al test de Tukey (P<0.05), dos o más exponentes de diferencia se considera que es significativamente diferente.

4.2 Formación de Biofilm

La capacidad para formar biofilm en diferentes cepas de *S. meliloti* Rm8530 usadas en el presente trabajo deriva de un grupo de genes que se evalúan en estos ensayos, bajo la exposición al metal pesado Hg (II) y al metaloide arsenito (As III).

El rol de los EPSs de *S. meliloti* en el proceso de la formación de biopelículas, es fundamental y lo podemos considerar como uno de los mecanismos para contrarrestar el efecto tóxico de As y Hg. Para este propósito, cepas Rm8530 *wt* y mutantes en la síntesis de EPSs, flagelo y LPS, fueron estudiadas de manera cualitativa a través del ensayo de adhesión bacteriana a soportes inertes y tinción con cristal violeta, (Figura 4.2) y de manera cuantitativa por medio de recuentos en placas.

En coincidencia con estudios anteriores (Rinaudi y González., 2009; Sorroche y col., 2012), la figura 4.2 muestra que la cepa productora de EPS II, Rm8530 *exoY*, fue la que presentó la capacidad de producir mayor cantidad biofilm en comparación con la cepa *wt* productora de ambos EPSs y cepas deficientes en la síntesis de EPS II (*expA* y *DM*). A diferencia con estudios previos realizados con otras rizobacterias (Paul y col., 2014; Armendariz y col., 2015) y con bacterias extremófilas (Marchal y col, 2010; Marchal y col, 2011), en las cuales aumentaron su capacidad de formar biopelículas durante condiciones de estrés frente a exposición a metales, la presencia de As o Hg en el medio de cultivo redujo la capacidad de las cepas de *S. meliloti* de formación de biofilm, con excepción de la cepa Rm8530 *exoY* sobreproductora de EPS II. En este sentido, la cepa mutante en *exoY* es superior en la producción de biofilm en cada condición en comparación con el resto de las cepas y no se vio afectada por el efecto tóxico de los metales en relación con la condición control.

La figura 4.2B muestra la relación DO_{570}/DO_{620} , la cual se obtiene entre las células sésiles (células asociadas como biofilm) y las células planctónicas (células libres en el medio de cultivo), respectivamente. Esta relación es un parámetro útil que se utiliza para identificar la forma de vida dominante en una condición dada. Con excepción de la cepa *wt*, las cepas mutantes mostraron valores más altos en esta relación cuando fueron expuestos a los diferentes EPT. Particularmente, la cepa *exoY* fue la que presentó la relación DO_{570}/DO_{620} más alta, definiendo una mayor capacidad de adhesión al soporte en presencia de los metales, sugiriendo que en estas condiciones la mayoría de la biomasa es parte del biofilm en comparación con células libres, sin embargo, estas observaciones se obtuvieron mediante determinaciones indirectas (mediciones de DO) y no siempre corresponden a las células viables. Basado en esto, se cuantificaron las fracciones celulares viables (planctónicas y sésiles) por medio de recuentos en placas (Tabla 4.2). En este sentido, se llevaron a cabo comparaciones entre recuentos a partir de células bacterianas libres en el medio de cultivo (fase

planctónica) y células bacterianas liberadas del biofilm adherido al vidrio (fase sésil). En general, los recuentos de células planctónicas de todas las cepas se redujeron con excepción de la cepa *wt* cuando las cepas fueron expuestas a metales pesados en comparación con el medio control. Las cepas mutantes como las no productoras de EPS II (*expA* y *DM*), o mutantes en su flagelo o LPS, mostraron muy bajos recuentos de células sésiles en todas las condiciones evaluadas (tabla 4.2), lo que demuestra la incapacidad de estas cepas para la formación biofilm, y la importancia que podrían tener el LPS y flagelo intacto en el desarrollo del mismo. En contraposición a estos resultados, las cepas productoras de EPS II, como lo son las cepas *wt* y *exoY*, mostraron recuentos superiores en todas las condiciones ensayadas, aunque la presencia de As o Hg causó reducciones en el recuento de células en uno o dos órdenes de magnitud en comparación a la condición control (tabla 4.2). Particularmente y en coincidencia con los resultados cualitativos (Figura 4.2), la mutante *exoY* mostró un recuento de células sésiles superior en todas las condiciones, en comparación con la cepa *wt*.

La fracción de células sésiles con respecto a las células totales en una condición dada ha sido definida como porcentaje de eficiencia (% ef). Este parámetro denota la tendencia de una cepa particular de establecer un estilo de vida biofilm en una condición dada.

En cada condición probada, la cepa *exoY* mostró un alto % ef seguido de la cepa *wt*, mientras que las cepas mutantes mostraron muy poca eficacia para la formación de biopelículas. La cepa *wt* reveló una reducción en % ef en presencia de metales pesados en comparación con la condición control, mientras que la cepa *exoY* aumentó su % ef cuando se expuso a los metales pesados. A pesar de su bajo % ef, las cepas *expA*, la doble mutante, *fliP* y *lpsB* mostraron un ligero aumento en este parámetro bajo la exposición a As o Hg.

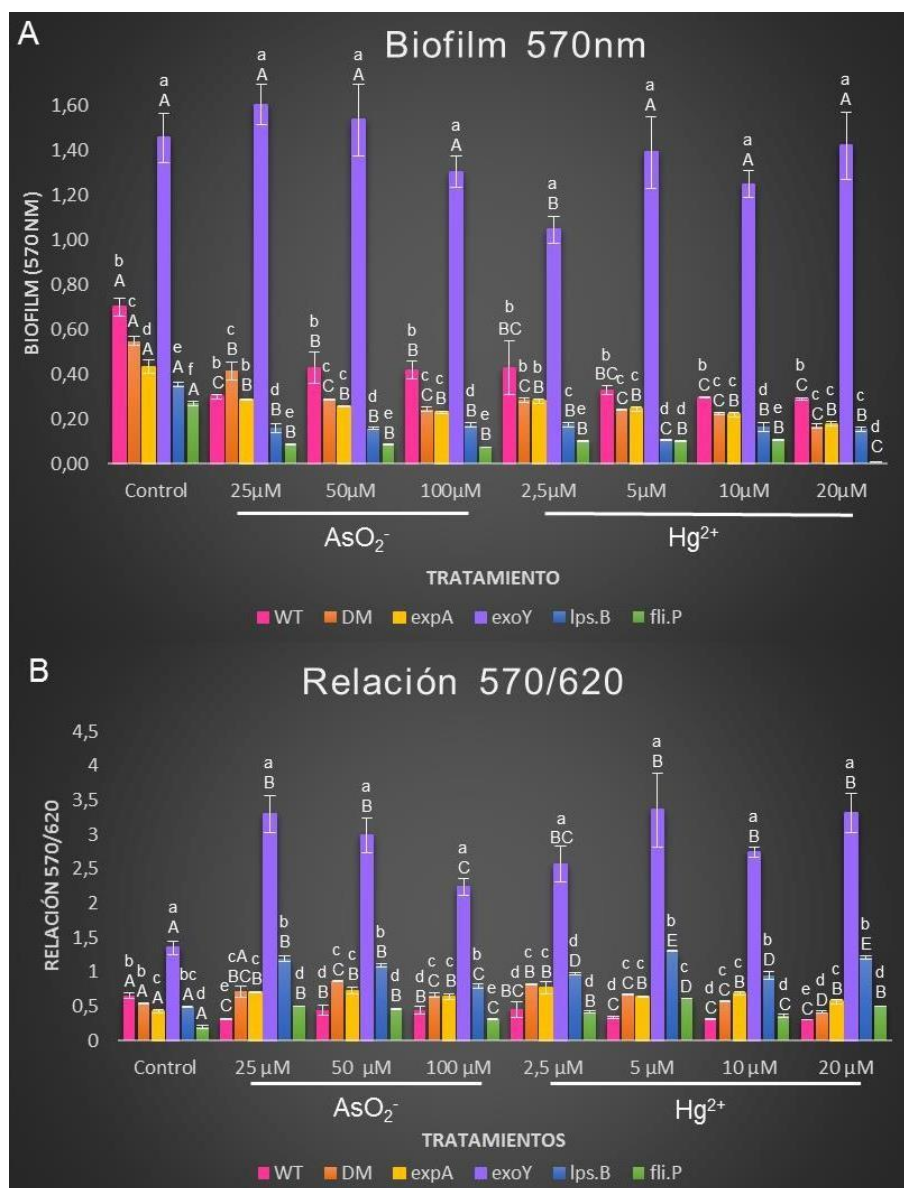


Figura 4.2: Formación de biofilm (A) y relación biofilm / crecimiento (DO₅₇₀/DO₆₂₀) (B) de cepas de *S. meliloti* en condiciones control y expuestas a diferentes concentraciones de AsO₂⁻ y Hg²⁺. La presencia de letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre diferentes cepas expuestas a una misma condición según la prueba de Tukey (P < 0,05). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre distintas condiciones para una cepa dada según la prueba de Tukey (p < 0,05).

Tratamientos	Cepas					
	<i>wt</i>	DM	<i>expA</i>	<i>exoY</i>	<i>lpsB</i>	<i>fliP</i>
Control CP	7,10x10 ⁹	5,56x10 ⁸	2,14x10 ⁹	6,9x10 ⁹	2,73x10 ⁷	5,32x10 ⁷
Control-CS	1,36x10 ⁹	5,25x10 ²	3,35x10 ³	2,37x10 ⁹	3,56x10 ⁴	2,59x10 ⁴
% ef	16,07	9,44x10 ⁻⁵	1,57x10 ⁻⁴	25,57	0,13	0,0487
AsO ₂ ⁻ 25 µM - CP	2,32x10 ⁹	1,94x10 ⁶	5x10 ⁵	5,31x10 ⁷	4,13x10 ⁴	2,75x10 ⁴
AsO ₂ ⁻ 25 µM-CS	3,95x10 ⁷	2,70x10 ²	3,34x10 ²	2,42x10 ⁸	3,17x10 ³	3,13x10 ²
%ef	1,68	0,014	0,067	82,01	7,128	1,125
AsO ₂ ⁻ 50 µM-CP	4,39x10 ⁹	1,31x10 ⁶	2,79x10 ⁵	4,46x10 ⁷	2,32x10 ⁴	2,67x10 ⁴
AsO ₂ ⁻ 50 µM-CS	5,82x10 ⁷	3,22x10 ²	1,82x10 ²	2,71x10 ⁸	1,93x10 ²	2,61x10 ²
% ef	1,31	0,024	0,065	85,87	0,825	0,9681
AsO ₂ ⁻ 100 µM-CP	2,96x10 ⁹	2,34x10 ⁶	1,92x10 ⁵	4,34x10 ⁷	1,43x10 ⁴	2,32x10 ⁵
AsO ₂ ⁻ 100 µM- CS	6,33x10 ⁷	2,14x10 ²	2,04x10 ²	2,16x10 ⁸	2,84x10 ²	2,76x10 ²
% ef	2,09	9,14x10 ⁻³	0,106	83,27	1,9473	0,1188
Hg ²⁺ 2,5 µM- CP	5,07 x10 ⁹	2,24x10 ⁶	1,28x10 ⁵	3,62x10 ⁷	2,86x10 ⁴	2,23x10 ³
Hg ²⁺ 2,5 µM-CS	5,9x10 ⁷	3,11x10 ²	4,07x10 ²	2,94x10 ⁸	1,96x10 ²	5,13x10 ²
% ef	1,15	0,014	0,317	89,04	0,6806	18,7
Hg ²⁺ 5 µM-CP	1,81x10 ⁹	2,16x10 ⁶	1,69x10 ⁵	1,82x10 ⁷	1,76x10 ⁴	2,37x10 ³
Hg ²⁺ 5 µM-CS	4,01x10 ⁷	1,83x10 ²	2,51x10 ²	5,1x10 ⁸	1,34x10 ²	6,11x10 ²
% ef	2,17	8,47x10 ⁻³	0,148	96,55	0,7556	20,97
Hg ²⁺ 10 µM-CP	3,04x10 ⁹	2,36x10 ⁶	2,48x10 ⁵	2,85x10 ⁷	1,34x10 ⁴	2,03x10 ⁵
Hg ²⁺ 10 µM-CS	1,94x10 ⁷	2,27x10 ²	1,64x10 ²	4,28x10 ⁸	2,31x10 ²	4,16x10 ²
% ef	0,064	9,62x10 ⁻³	0,066	93,76	1,6947	0,2045
Hg ²⁺ 20 µM-CP	1,45x10 ⁹	1,44x10 ⁶	1,28x10 ⁵	3,47x10 ⁷	5,37x10 ⁴	2,39x10 ⁴
Hg ²⁺ 20 µM-CS	4,35x10 ⁷	2,26x10 ²	1,84x10 ²	2,79x10 ⁸	3,16x10 ²	2,19x10 ²
% ef	2,91	0,016	0,143	88,94	0,585	0,9079

Tabla 4.2: Recuento de ufc.ml⁻¹ de las cepas de *S. melloti* Rm8530 y mutantes expuestas a metales. Los valores corresponden a las medias de tres ensayos diferentes realizados por triplicado. Los tratamientos son AsO₂⁻ 25, 50 y 100 µM; y Hg²⁺ 2.5, 5, 10 y 20 µM. Los valores de la desviación estándar se han omitido para simplificar la visualización y el formato de la tabla. Una diferencia de dos logaritmos en recuentos de bacterias implica diferencias estadísticamente significativas entre sí según la prueba de Tukey (p <0,05). “% ef” se refiere a la fracción de células sésiles respecto del total de células, PC: Recuento de células planctónicas. CS: Recuento de células sésiles. Ef (%): (CSx100) / CT. CT: Recuento total (PC + CS).

4.3 Co-cultivo bacteriano

Los resultados de la formación de biofilm mostrados anteriormente manifiestan el papel de la producción de EPS como un posible mecanismo de resistencia al estrés

producido por la exposición a metales pesados. Con el fin de establecer la función de los EPSs de *S. meliloti* en la resistencia a As y/o Hg, se realizaron ensayos de co-cultivos. Estos estudios se efectuaron entre una cepa productora de ambos tipos de EPS (*wt*) o una productora de EPS II como lo es la cepa *exoY*, con cepas mutantes no productora EPS II (*expA*) y no productora de ningún EPS (DM), o mutantes en estructuras propias del microorganismo, como es el flagelo (*fliP*) o LPS (*lpsB*). Los ensayos cualitativos se realizaron determinando el crecimiento a través de mediciones de DO a 620 nm y la formación de biopelículas por medio de la técnica de cristal violeta y medición de DO a 570 nm; los ensayos cuantitativos de recuento bacteriano en fase planctónica y sésil fueron determinados en cultivos individuales y en co-cultivos de las cepas seleccionadas. Los fenómenos de rescate o recuperación de una cepa defectuosa en co-cultivo con otra cepa con respecto al cultivo individual, se evaluaron en fases planctónica y sésil.

4.3.1 Co-cultivos de la cepa *wt* con las mutantes *expA* y DM

El crecimiento (DO620 nm) del cultivo individual de la cepa Rm8530 *exoYexpA* fue menor en los cultivos tratados con EPT, en comparación con el cultivo individual de la cepa Rm8530 *wt* y el co-cultivo (Figura 4.3A). La presencia de As o Hg, en el medio de cultivo, redujo el crecimiento de DM y del co-cultivo, aunque el efecto fue más marcado en el cultivo individual de la doble mutante que creció de manera disminuida en metales, mientras que el co-cultivo creció de una manera similar al cultivo individual de la cepa *wt* (Figura 4.3A). El ensayo de formación de biofilm (DO570 nm) mostró que, para la mayoría de las condiciones, (a excepción AsO_2^- 100 μM) la capacidad de las cepas para formar biofilm en co-cultivo fue mayor en comparación con el cultivo individual (Figura 4.3B). La exposición a Hg o As redujo la formación de biofilm en cultivos individuales en comparación con la condición control, mientras que el co-cultivo expuesto a Hg 20 μM tuvo una mayor capacidad para formar biofilm en comparación con los co-cultivos expuestos a As, otras concentraciones de Hg o el control (Figura 4.3B).

El recuento de las células planctónicas mostró que la cepa *wt* en cultivo individual, se mantuvo en el orden de $\sim 10^9$ ufc.ml⁻¹ tanto en condiciones control como en condiciones de exposición a metales. En el caso de la cepa DM la presencia de metales en el medio de cultivo redujo en 2 órdenes de magnitud comparado a la condición control. Un dato interesante es que la composición de cepas del co-cultivo se formó predominantemente por la cepa *wt* en el control y en las condiciones de Hg. Sin embargo, la composición del co-cultivo expuesto a As, estuvo constituida aproximadamente por partes iguales de cada cepa.

El índice de rescate constituye un parámetro de utilidad para valorar la recuperación de una cepa defectuosa por otra cepa en co-cultivo con respecto al cultivo individual. En este sentido, el índice de rescate de la cepa DM en co-cultivo con respecto al cultivo individual fue de aproximadamente 180 veces mayor en la condición de As 50 μM , mientras que en el tratamiento con As 100 μM fue de 15 veces (tabla 4.3), lo que sugiere que la cepa *wt* proporciona un mecanismo de rescate para la cepa DM en presencia de As.

Los resultados obtenidos para las células que participan en el biofilm (células sésiles) de co-cultivo son muy interesantes. El recuento de bacterias de la cepa *wt* en cultivo individual fueron más bajos ($\sim 10^7$ ufc.ml⁻¹) cuando se expone a metales en comparación con la condición control ($\sim 10^9$ ufc.ml⁻¹), mientras que las bacterias del cultivo individual de la cepa DM fueron prácticamente incapaces de formar biofilm independientemente de la condición, produciendo un recuento de células sésiles insignificante ($\sim 10^2$ ufc.ml⁻¹) (tabla 4.3). Curiosamente, los recuentos de células sésiles del co-cultivo mostraron un biofilm formada por un gran número de ufc.ml⁻¹ de ambas cepas *wt* y DM, en todas las condiciones estudiadas. La cepa *wt* en co-cultivo mostró un recuento de células sésiles mayor en comparación con el cultivo individual y este resultado fue más marcado en las condiciones de exposición a As o Hg. La DM en co-cultivo adquiere capacidad para formar parte del biofilm, hecho que se manifiesta por el aumento en su recuento de células sésiles de $\sim 10^2$ ufc.ml⁻¹ (en cada condición) en cultivo individual a $10^7 - 10^8$ (en As) y 10^8 ufc.ml⁻¹ (en Hg) cuando se co-cultiva con la cepa *wt* (tabla 4.3B). Aunque la composición del co-cultivo estuvo predominantemente dominado por la cepa *wt*, con rangos que oscilan entre $\sim 99\%$ en Hg 20 μM a $\sim 65\%$ en As 50 μM , el índice de rescate de las células sésiles de la cepa DM en el co-cultivo fue increíblemente alta. En este sentido, la cepa DM fue rescatada en el orden de $\sim 10^5$ y 10^6 veces en el biofilm mixto de cualquier condición (tabla 4.3).

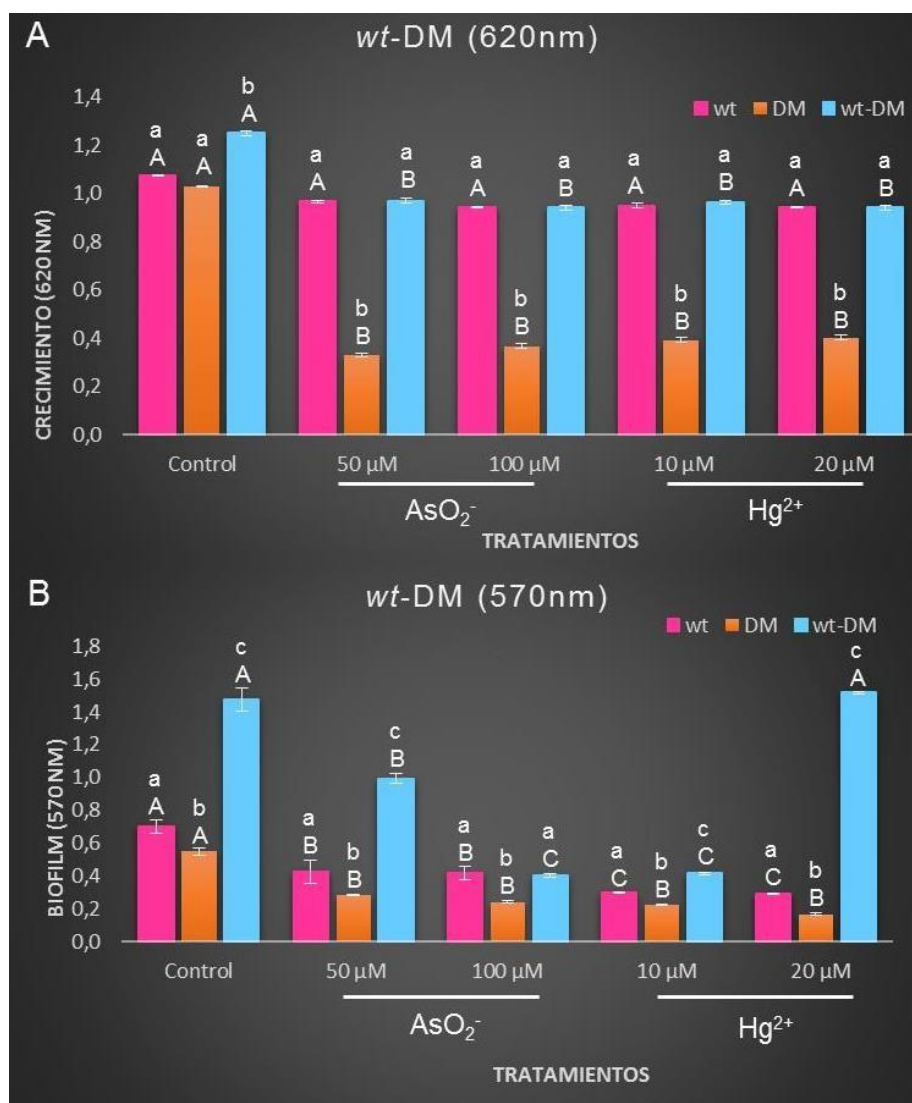


Figura 4.3: Crecimiento Bacteriano (A) y formación de biofilm (B) de cultivos individuales y co-cultivos de cepas de *S. meliloti* en medio control y expuestas a condiciones de estrés con metales pesados. Barras marcadas con letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre las cepas individuales o co-cultivo para la misma condición según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Barras marcadas con letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones para una cepa dada de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Células Planctónicas							
Tratamientos	cultivos individuales		Co cultivos		Composición Porcentual (%)#		Índice de Rescate *
	wt	DM	wt	DM	wt	DM	
Control	7,98x10 ⁹	4,02x10 ⁸	5,38x10 ⁹	8,01x10 ⁸	87,04	12,96	1,99
AsO ₂ 50 μM	4,39x10 ⁹	1,31x10 ⁶	5,12x10 ⁸	2,36x10 ⁸	68,45	31,55	180,15
AsO ₂ 100 μM	2,96x10 ⁹	2,34x10 ⁶	4,64x10 ⁷	3,52x10 ⁷	56,86	43,14	2,15
Hg ²⁺ 10 μM	3,04x10 ⁹	2,36x10 ⁶	4,82x10 ⁷	3,14x10 ⁶	93,88	6,12	1,33
Hg ²⁺ 20 μM	1,45x10 ⁹	1,44x10 ⁶	2,14x10 ⁷	1,97x10 ⁶	91,57	8,43	1,36

Células Sésiles							
Tratamientos	cultivos individuales		Co cultivos		Composición Porcentual (%)#		Índice de Rescate *
	wt	DM	wt	DM	wt	DM	
Control	1,36x10 ⁹	5,25x10 ²	6,69x10 ⁹	2,46x10 ⁹	73,11	26,89	4,68x10 ⁶
AsO ₂ ⁻ 50 µM	5,82x10 ⁷	3,22x10 ²	3,99x10 ⁸	2,25x10 ⁸	63,94	36,06	6,98x10 ⁵
AsO ₂ ⁻ 100 µM	6,33x10 ⁷	2,14x10 ²	3,33x10 ⁸	8,25x10 ⁷	80,14	19,86	3,85x10 ⁵
Hg ²⁺ 10 µM	1,94x10 ⁷	2,27x10 ²	6,45x10 ⁹	4,45x10 ⁸	93,55	6,45	1,96x10 ⁶
Hg ²⁺ 20 µM	4,35x10 ⁷	2,26x10 ²	8,93x10 ⁹	1,04x10 ⁸	98,85	1,15	4,60x10 ⁵

Tabla 4.3: Recuento de ufc.ml⁻¹ de células planctónica o células sésiles después de 48 h de crecimiento en medio TY (control), medio TY con NaAsO₂ 50 µM (AsO₂⁻ 50 µM) y 100 µM (en AsO₂⁻ 100 µM) y medio TY con HgCl₂ 10 µM (Hg²⁺ 10 µM) y 20 µM (Hg²⁺ 20 µM). Los valores corresponden a las medias de tres ensayos diferentes realizados por triplicado por tratamiento. Los valores de la desviación estándar se han omitido para simplificar la visualización y el formato de la tabla. Una diferencia de dos log en el recuento bacteriano implica diferencia estadísticamente significativas entre sí según la prueba de Tukey (p < 0,05). # ufc.ml⁻¹ de wt o DM x 100 / TC. TC: Recuento total (ufc.ml⁻¹ wt + DM ufc.ml⁻¹). * ufc.ml⁻¹ cepa DM en co-cultivo / ufc.ml⁻¹ DM en cultivo individual.

Los ensayos realizados entre las cepas *wt* y la mutante *expA* deficiente en la síntesis en EPSII, mostraron que el crecimiento de esta última en cultivo individual cuando se la expone a metales pesados estuvo muy disminuido comparado con la condición control (Figura 4.4A). Un efecto similar, fue observado para el cultivo individual de la cepa *wt* y el co-cultivo *wt*-mutante (Figura 4.4A).

Cuando se evaluó la producción de biopelículas, se determinó que en cada condición la capacidad de formar biofilm en co-cultivo fue mucho mayor que en cultivos individuales (Figura 4.4B). En la mayoría de las condiciones que se evaluaron (excepto en AsO₂⁻ 50 µM), ya sea en cultivos individuales o co-cultivos, se vio disminuida la formación de biofilm. Los co-cultivos expuestos a mercurio mostraron una producción de biofilm semejante entre ellos, suceso que no fue observado en los tratamientos con las diferentes concentraciones de As, en cuyo caso se determinó que no hubo diferencia significativa en la producción de biofilm en la concentración de As 50 µM en relación con el control, pero en comparación con As 100 µM la diferencia fue significativa (Figura 4.4B).

Con relación al recuento de células libres presentes en el medio de cultivo, en el caso de la cepa *wt*, el mismo se mantiene en el orden de ~10⁹ ufc.ml⁻¹, tanto el control como para los tratamientos con metales pesados. A diferencia de esto, la mutante en EPS II fue afectada por la exposición a metales, condición que condujo a una disminución del crecimiento en aproximadamente 4 órdenes de magnitud comparado al control. En el

caso del co-cultivo, ambas cepas se vieron afectadas en presencia de los metales, sin embargo, *expA* presentó un mayor crecimiento en cultivo mixto en relación con el cultivo individual (tabla 4.4A). La composición porcentual de las cepas denota que hay entre un 60 a 70 % aproximadamente que corresponde a la cepa *wt*, en todas las condiciones. Los resultados del índice de rescate son muy interesantes, ya que se vieron altos valores de rescate en condiciones de exposición a metales en comparación con el control. Este índice tuvo un mínimo de ~500 veces en el tratamiento con As 50 μM , y un máximo de $1,59 \times 10^3$ veces en Hg 20 μM , indicando que la cepa *wt* rescata a la mutante en este tipo de estrés.

Los recuentos de células asociadas a biofilm mostraron datos interesantes y similares a los obtenidos en este mismo tipo de ensayo pero con la cepa DM. En este caso se pudo determinar que el biofilm mixto es una condición que ayuda a la resistencia de estas cepas frente al estrés abiótico al cual se las somete. Se observó que la cepa *wt* se desarrolló de mejor manera en biofilm en co-cultivo, en cuya condición las células sésiles fueron dos órdenes superiores en comparación con el cultivo individual enfrentado a metales pesados (tabla 4.4B). Las células sésiles de la cepa *expA* en co-cultivo ascendieron entre 6 y 7 órdenes, de 10^2 ufc ml^{-1} en el cultivo individual a 10^8 - 10^9 ufc ml^{-1} en co-cultivo, en todas las condiciones de estrés.

En relación con la composición del biofilm, pudo determinarse que la cepa *wt*, estuvo en mayor porcentaje en esta estructura, la cual oscila entre el 55 al 85%, no obstante, en los tratamientos As 100 μM y Hg 10 μM la composición fue casi del 50% para ambas cepas. Los resultados obtenidos luego de definir el índice de rescate en biofilm fueron valores muy altos, los cuales estuvieron en el orden de 10^5 , 10^6 y 10^7 ; y aumentaron en uno o dos órdenes en condiciones de exposición a metales respecto al control (tabla 4.4B).

Estos valores claramente sugieren que la cepa *wt*, rescata a la mutante deficiente en la producción de EPS II y ambas forman parte del biofilm mixto. En el caso de células planctónicas los valores de los índices de rescate fueron menores, pero también se observó un mayor índice de células mutantes en fase planctónica en condiciones de estrés por metales, indicando que la cepa *wt*, provee de factores que permiten la supervivencia de la cepa mutante en cultivo mixto.

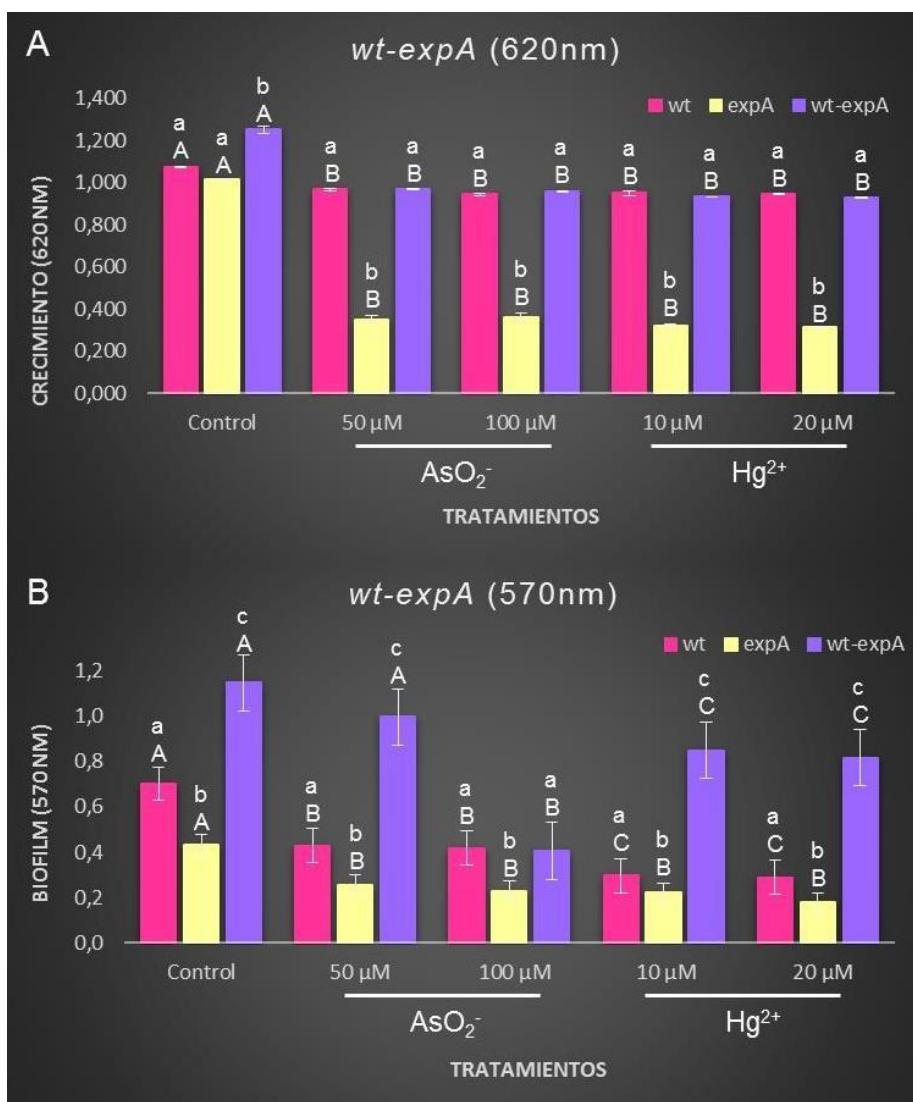


Figura 4.4: (A) Crecimiento Bacteriano (B) formación de biofilm, cultivo individual y co-cultivos en cepas *S. meliloti* control y expuestas a condiciones de estrés con metales pesados. Barras marcados con letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre las cepas individuales o co-cultivo para la misma condición según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Barras marcados con letra mayúscula indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones para una cepa dada de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$)

Tratamientos	Células Planctónicas						
	cultivos individuales		Co cultivos		Composición Porcentual (%) [#]		Índice de Rescate *
	<i>wt</i>	<i>expA</i>	<i>wt</i>	<i>expA</i>	<i>wt</i>	<i>expA</i>	
Control	7,10x10 ⁹	2,14x10 ⁹	2,11x10 ⁹	1,03x10 ⁹	67,2	32,8	0,48
AsO ₂ 50 μ M	4,39x10 ⁹	2,79x10 ⁵	2x10 ⁸	1,39x10 ⁸	59	41	498,21
AsO ₂ 100 μ M	2,96x10 ⁹	1,92x10 ⁵	3,83x10 ⁸	2,14x10 ⁸	64,15	35,85	1,11x 10 ³
Hg ²⁺ 10 μ M	3,04x10 ⁹	2,48x10 ⁵	5,16x10 ⁸	2,64x10 ⁸	66,15	33,85	1,06x10 ³
Hg ²⁺ 20 μ M	1,45x10 ⁹	1,28x10 ⁵	3,3x10 ⁸	2,03x10 ⁸	61,91	38,09	1,59x10 ³

Células Sésiles							
Tratamientos	cultivos individuales		Co cultivos		Composición Porcentual (%) [#]		Índice de Rescate *
	wt	expA	wt	expA	wt	expA	
Control	1,36x10 ⁹	3,35x10 ³	3,23x10 ⁹	2,11x10 ⁹	60,49	39,51	6,3x10 ⁵
AsO ₂ ⁻ 50 μM	5,82x10 ⁷	1,82x10 ²	4,59x10 ⁹	1,85x10 ⁹	71,27	28,73	1,02x10 ⁷
AsO ₂ ⁻ 100 μM	6,33x10 ⁷	2,04x10 ²	3,72x10 ⁸	3,12x10 ⁸	54,39	45,61	1,53x10 ⁶
Hg ²⁺ 10 μM	1,94x10 ⁷	1,64x10 ²	3,59x10 ⁹	2,64x10 ⁹	57,62	42,38	1,61x10 ⁷
Hg ²⁺ 20 μM	4,35x10 ⁷	1,84x10 ²	6,77x10 ⁹	1,28x10 ⁹	84,1	15,9	6,96x10 ⁶

Tabla 4.4.: Recuento de ufc.ml⁻¹ de células planctónica o células sésiles después de 48 h de crecimiento en medio TY (control), medio TY con NaAsO₂ 50 μM (AsO₂⁻ 50 μM) y 100 μM (en AsO₂⁻ 100 μM) y medio TY con HgCl₂ 10 μM (Hg²⁺ 10 μM) y 20 μM (Hg²⁺ 20 μM). Los valores corresponden a las medias de tres ensayos diferentes realizados por triplicado por tratamiento. Los valores de la desviación estándar se han omitido para simplificar la visualización y el formato de la tabla. Una diferencia de dos log en el recuento bacteriano implica diferencia estadísticamente significativas entre sí según la prueba de Tukey (p <0,05). # ufc.ml⁻¹ de wt o expA x 100 / TC. TC: Recuento total (ufc.ml⁻¹ wt + expA ufc.ml⁻¹). * ufc.ml⁻¹ cepa expA en co-cultivo / ufc.ml⁻¹ expA en cultivo individual.

4.3.2 Co-cultivo de wt con *lpsB*

La cepa Rm 8530 *lpsB* como su denominación lo indica tiene una mutación en el gen *lpsB*, el cual está involucrado en la biosíntesis del LPS en *S. 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 LPS, dado que se ha observado un incremento relativo en la cantidad de xilosa y la concomitante desaparición de ácidos urónicos pudiendo afectar su desarrollo en el crecimiento temprano (Figura 4.1A). En este ensayo se observó que en todas las condiciones de exposición a metales la cepa mutante en *lpsB* disminuyó su crecimiento, situación similar sucede para la cepa wt. El desarrollo de los co-cultivos fue variado, ya que no hubo diferencia significativa en los tratamientos con AsO₂⁻, pero si con el control y los tratamientos con Hg, debido a que en estos casos se vio disminuido el crecimiento de los co-cultivos (Figura 4.5A).

El desarrollo del biofilm en los monocultivos, se vio disminuido en todos los casos, particularmente en la cepa wt hubo una disminución mayor en los tratamientos con Hg que con As, mientras que la mutante en *lpsB*, la disminución de la producción de biofilm se mantuvo relativamente constante en las diferentes condiciones de exposición a los metales en relación al control (Figura 4.5B). En los co-cultivos, se observó que en los tratamientos hubo un aumento significativo en la producción de biofilm en relación al control.

La cepa wt, mostró un recuento de células planctónicas de 10⁹ ufc.ml⁻¹, en el control, y se mantuvo constante en los diferentes tratamientos con los EPT, mientras que la

mutante en *lpsB* mostró una reducción en los recuentos, disminuyendo en dos órdenes su crecimiento, de tal manera mientras que en el control se encontró un crecimiento de 10^7 ufc.ml⁻¹, en los tratamientos se obtuvieron recuentos de 10^5 ufc.ml⁻¹. Particularmente en los co-cultivos hubo una disminución de los recuentos en los tratamientos con metales en relación al control. La cepa mutante en *lpsB* se vió beneficiada en esta relación, ya que hubo un aumento en su crecimiento (tabla 4.5A) que se puede ver reflejado en el índice de rescate, con valores máximos de alrededor de 200 veces en el tratamiento de AsO_2^- 100 μM , y un mínimo de 10 veces en el control. La cepa *wt* se encontró en mayor proporción porcentual en todos los tratamientos de los co-cultivos, sin embargo en el tratamiento expuesto a As 100 μM y Hg 10 μM estuvo constituida aproximadamente por partes iguales de cada cepa.

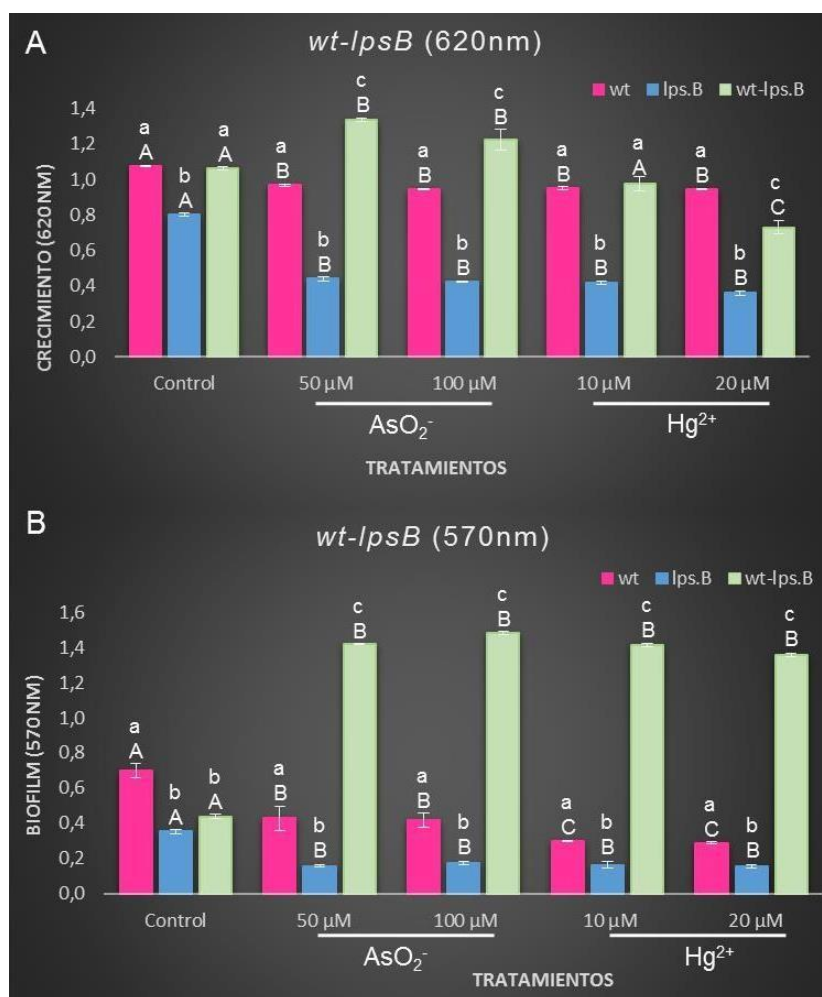


Figura 4.5: (A) Crecimiento Bacteriano (B) formación de biofilm, cultivo individual y co-cultivos en cepas *S. meliloti* control y expuestas a condiciones de estrés con metales pesados. Barras marcados con letras minúscula indican diferencias estadísticamente significativas entre las cepas individuales o co-cultivo para la misma condición según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Barras marcados con letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones para una cepa dada de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

La cepa *wt*, mostró un recuento de células planctónicas de 10^9 ufc.ml⁻¹, en el control, y se mantuvo constante en los diferentes tratamientos con los EPT, mientras que la mutante en *lpsB* mostró una reducción en los recuentos, disminuyendo en dos órdenes su crecimiento, de tal manera mientras que en el control se encontró un crecimiento de 10^7 ufc.ml⁻¹, en los tratamientos se obtuvieron recuentos de 10^5 ufc.ml⁻¹. Particularmente en los co-cultivos hubo una disminución de los recuentos en los tratamientos con metales en relación al control. La cepa mutante en *lpsB* se vió beneficiada en esta relación, ya que hubo un aumento en su crecimiento (tabla 4.5A) que se puede ver reflejado en el índice de rescate, con valores máximos de alrededor de 200 veces en el tratamiento de AsO_2^- 100 μM , y un mínimo de 10 veces en el control. La cepa *wt* se encontró en mayor proporción porcentual en todos los tratamientos de los co-cultivos, sin embargo en el tratamiento expuesto a As 100 μM y Hg 10 μM estuvo constituida aproximadamente por partes iguales de cada cepa.

El recuento de células sésiles en cultivos individuales de la cepa *lpsB* fue muy bajo, tanto en el control (10^4 ufc.ml⁻¹) como en la exposición frente a los metales ($\sim 10^2$ ufc.ml⁻¹), mientras que para la cepa *wt* fueron más bajos ($\sim 10^7$ ufc.ml⁻¹) cuando se expuso a metales en comparación con la condición control ($\sim 10^9$ ufc.ml⁻¹) (tabla 4.5). Los resultados obtenidos en los co-cultivos de células sésiles, fueron similares entre ellas ya que ambas cepas oscilaron entre 10^8 y 10^9 ufc.ml⁻¹ en todos los casos, particularmente la cepa *wt* obtuvo resultados de magnitud similar al control del monocultivo, mientras que para la cepa mutante en LPS, se determinó una diferencia significativa en relación al cultivo individual, de alrededor de 6 a 7 órdenes superior, mostrando su capacidad de formar parte del biofilm. La composición porcentual del co-cultivo estuvo dominada por la cepa *wt*, (como sucedió en las células planctónicas), con rangos que oscilaron entre $\sim 81\%$ en las condiciones con Hg a $\sim 50-70\%$ en presencia de As. El índice de rescate de la mutante en estudio, fue muy alto, $\sim 10^4$ y 10^6 veces fue rescatada en el biofilm mixto en las diferentes condiciones.

Tratamientos	Células Planctónicas						
	cultivos individuales		Co cultivos		Composición Porcentual (%) #		Índice de Rescate *
	<i>wt</i>	<i>lpsB</i>	<i>wt</i>	<i>lpsB</i>	<i>wt</i>	<i>lpsB</i>	
Control	$7,98 \times 10^9$	$2,73 \times 10^7$	$5,11 \times 10^9$	$2,69 \times 10^8$	94,98	5,02	9,85
AsO_2^- 50 μM	$4,39 \times 10^9$	$2,32 \times 10^4$	$3,89 \times 10^7$	$1,86 \times 10^7$	67,65	32,35	801,72
AsO_2^- 100 μM	$2,96 \times 10^9$	$1,43 \times 10^4$	$4,21 \times 10^7$	$3,11 \times 10^7$	56,15	43,85	2874,13
Hg^{2+} 10 μM	$3,04 \times 10^9$	$1,34 \times 10^4$	$2,87 \times 10^7$	$1,86 \times 10^7$	60,04	39,96	21345,33
Hg^{2+} 20 μM	$1,45 \times 10^9$	$5,37 \times 10^4$	$4,38 \times 10^7$	$1,75 \times 10^7$	71,45	28,55	325,88

Células Sésiles							
Tratamientos	cultivos individuales		Co cultivos		Composición Porcentual		Índice de Rescate
	<i>wt</i>	<i>lps.B</i>	<i>wt</i>	<i>lps.B</i>	<i>wt</i>	<i>lps.B</i>	
Control	1,36x10 ⁹	3,56x10 ⁴	5,98x10 ⁹	3,13x10 ⁹	65,64	34,36	8,79 x10 ⁴
AsO ₂ ⁻ 50 μM	5,82x10 ⁷	1,93x10 ²	4,48x10 ⁹	3,86x10 ⁹	53,71	46,29	2 x10 ⁴
AsO ₂ ⁻ 100 μM	6,33x10 ⁷	2,84x10 ²	2,28x10 ⁸	1,39x10 ⁸	62,13	37,87	4,89 x10 ⁵
Hg ²⁺ 10 μM	1,94x10 ⁷	2,31x10 ²	6,72x10 ⁹	1,51x10 ⁹	81,65	18,35	2,81 x10 ⁴
Hg ²⁺ 20 μM	4,35x10 ⁷	3,16x10 ²	6,51x10 ⁹	2,13x10 ⁹	75,35	24,65	1,94x10 ⁷

Tabla 4.5: Recuento de ufc.ml⁻¹ de células planctónica o células sésiles después de 48 h de crecimiento en medio TY (control), medio TY con NaAsO₂ 50 μM (AsO₂⁻ 50 μM) y 100 μM (en AsO₂⁻ 100 μM) y medio TY con HgCl₂ 10 μM (Hg²⁺ 10 μM) y 20 μM (Hg²⁺ 20 μM). Los valores corresponden a las medias de tres ensayos diferentes realizados por triplicado por tratamiento. Los valores de la desviación estándar se han omitido para simplificar la visualización y el formato de la tabla. Una diferencia de dos log en el recuento bacteriano implica diferencia estadísticamente significativas entre sí según la prueba de Tukey (p <0,05). # ufc.ml⁻¹ de *wt* x 100 / TC. TC: Recuento total (ufc.ml⁻¹ *wt* + *lpsB* ufc.ml⁻¹). * ufc.ml⁻¹ cepa *lpsB* en cultivo / ufc.ml⁻¹ *lpsB* en cultivo individual.

4.3.3 Co-cultivo entre la cepa *wt* y la mutante *fliP*

Al evaluar el crecimiento de la cepa *wt* y la mutante *fliP* (tabla 4.6) se observó que ambas se vieron disminuidas en los monocultivos expuestos a metales, aunque la mutante en flagelo tuvo una disminución mayor que rondó el 60% en los tratamientos con Hg y As, en relación al control. En el caso de los co-cultivos, la disminución que se obtuvo en los tratamientos con los EPT fue pequeña, aunque la diferencia fue significativa al compararlo con el control del mismo. Al relacionar las cepas individuales con el co-cultivo en cada tratamiento, se observó que no hubo diferencia significativa entre el monocultivo de la cepa *wt*, con el co-cultivo en ninguno de los casos.

La formación de biofilm (DO 570nm) de la cepa mutante en el flagelo fue muy reducida, obteniéndose valores que no superaron 0,3 nm (control) y en el caso Hg²⁺ 20 μM fueron cercanos a cero, situación similar ocurrió con la cepa *wt*, pero en este caso los valores llegaron a un máximo de 0,7 nm en el control y el mínimo fue en el tratamiento con Hg²⁺ 20 μM que no superó los 0,3 nm (Figura 4.6). Los resultados que se obtuvieron cuando se ensayó la formación de biofilm con co-cultivos, fueron llamativos, debido a que en los tratamientos con Hg²⁺, se obtuvieron valores muy altos, marcando una diferencia significativa con el control; no sucedió lo mismo en los tratamientos con AsO₂⁻ ya que no hubo diferencia significativa con el control, pero si en todos los casos los co-cultivos desarrollaron un biofilm mayor en relación con los monocultivos.

Células Planctónicas							
Tratamientos	cultivos individuales		Co cultivos		Composición Porcentual (%) [#]		Índice de Rescate [*]
	<i>wt</i>	<i>fliP</i>	<i>wt</i>	<i>fliP</i>	<i>wt</i>	<i>fliP</i>	
Control	7,98x10 ⁹	5,32x10 ⁷	4,87x10 ⁹	3,85x10 ⁹	55,85	44,15	72,37
AsO ₂ 50 µM	4,39x10 ⁹	2,67x10 ⁴	4,96x10 ⁸	1,86x10 ⁸	71,85	28,15	6,97x10 ³
AsO ₂ 100 µM	2,96x10 ⁹	2,32x10 ⁴	3,65x10 ⁸	2,61x10 ⁸	58,31	41,69	1,13x10 ⁴
Hg ²⁺ 10 µM	3,04x10 ⁹	2,03x10 ³	3,78x10 ⁷	3,06x10 ⁷	55,26	44,74	1,51x10 ⁴
Hg ²⁺ 20 µM	1,45x10 ⁹	2,39x10 ³	5,16x10 ⁷	2,69x10 ⁷	65,73	34,27	1,13x10 ³

Células Sésiles							
Tratamientos	cultivos individuales		Co cultivos		Composición Porcentual (%) [#]		Índice de Rescate [*]
	<i>wt</i>	<i>fliP</i>	<i>wt</i>	<i>fliP</i>	<i>wt</i>	<i>fliP</i>	
Control	1,36x10 ⁹	2,59x10 ⁴	3,55x10 ⁹	3,23x10 ⁹	52,36	47,64	1,25x10 ⁵
AsO ₂ 50 µM	5,82x10 ⁷	2,61x10 ²	4,7x10 ⁸	2,62x10 ⁸	64,21	35,79	1x10 ⁷
AsO ₂ 100 µM	6,33x10 ⁷	2,76x10 ²	1,69x10 ⁸	1,06x10 ⁸	61,45	38,55	3,84x10 ⁶
Hg ²⁺ 10 µM	1,94x10 ⁷	4,16x10 ²	4,64x10 ⁹	3,75x10 ⁹	55,03	44,97	9,01x10 ⁶
Hg ²⁺ 20 µM	4,35x10 ⁷	2,19x10 ²	4,18x10 ⁹	3,16x10 ⁹	56,95	43,05	1,44x10 ⁶

Tabla 4.6: Recuento de ufc.ml⁻¹ de células planctónicas o células sésiles después de 48 h de crecimiento en medio TY (control), medio TY con NaAsO₂ 50 µM (AsO₂ 50 µM) y 100 µM (en AsO₂ 100 µM) y medio TY con HgCl₂ 10 µM (Hg²⁺ 10 µM) y 20 µM (Hg²⁺ 20 µM). Los valores corresponden a las medias de tres ensayos diferentes realizados por triplicado por tratamiento. Los valores de la desviación estándar se han omitido para simplificar la visualización y el formato de la tabla. Una diferencia de dos log en el recuento bacteriano implica diferencia estadísticamente significativas entre sí según la prueba de Tukey (p < 0,05). # ufc.ml⁻¹ de *wt* x 100 / TC. TC: Recuento total (ufc.ml⁻¹ *wt* + *fliP* ufc.ml⁻¹). * ufc.ml⁻¹ cepa *fliP* en co-cultivo / ufc.ml⁻¹ *fliP* en cultivo individual.

Los resultados obtenidos en el recuento de células planctónicas (tabla 4.6) de la cepa *wt*, no se vieron alterados al enfrentarse con los metales pesados, mientras que *fliP* fue afectado disminuyendo entre 3 y 4 órdenes con relación al control (10⁷ ufc.ml⁻¹), mientras que en los co-cultivos esta cepa se vio muy beneficiada, dado que sus recuentos fueron entre 10⁹ (control) y 10⁷ (Hg²⁺ 20 µM) ufc.ml⁻¹. EL porcentaje de cada cepa en los co-cultivos, denotó que hay entre un 50 a 70 % aproximadamente que corresponde a la cepa *wt*, en todas las condiciones ensayadas. Al evaluar los índices de rescate, los valores oscilaron entre un mínimo de 72 veces en la condición control y un máximo de 1,51x10⁴ veces en Hg²⁺ 10 µM, indicando que la cepa *wt* rescata a la cepa mutante en este tipo de estrés.

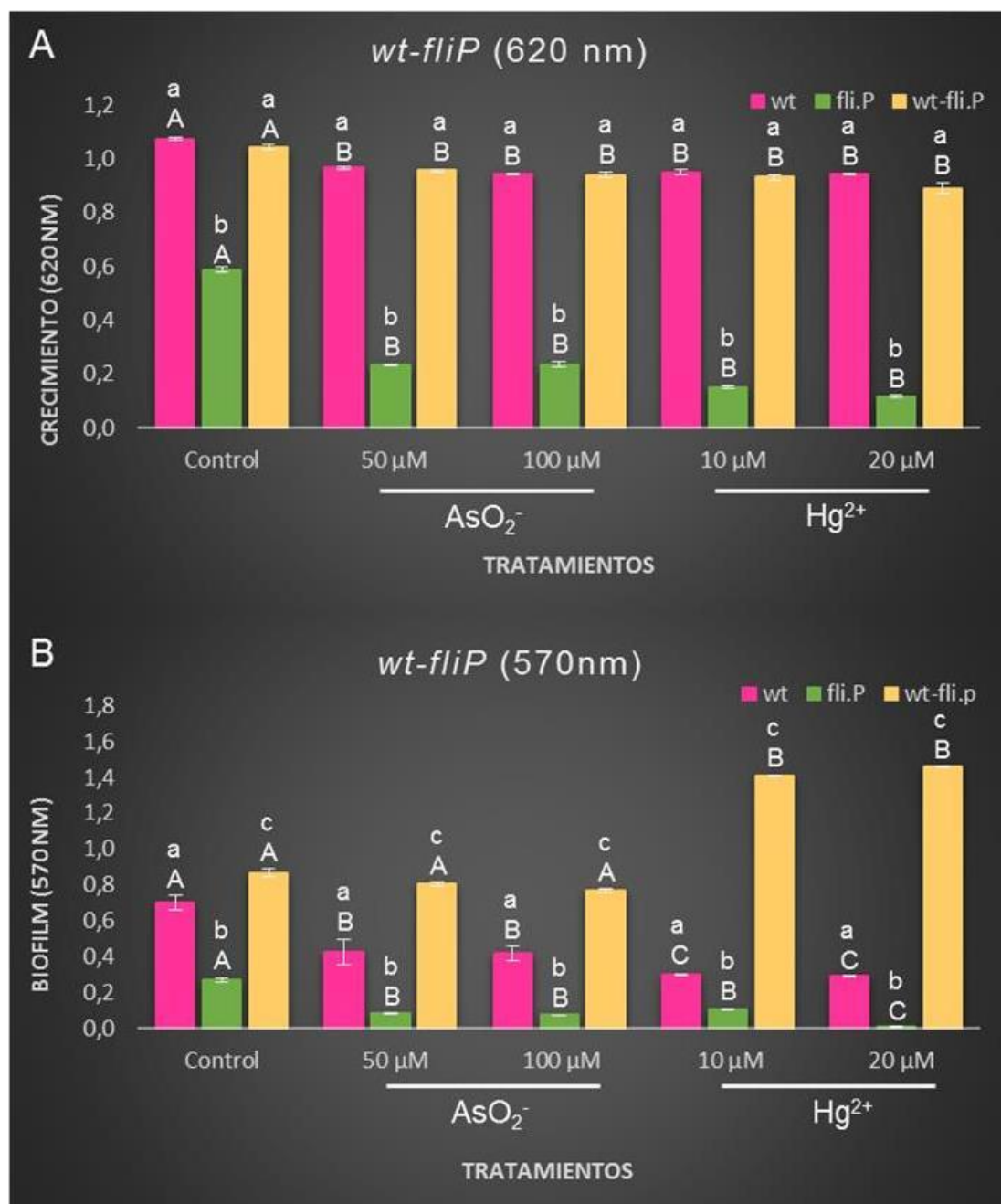


Figura 4.6: (A) Crecimiento Bacteriano (B) formación de biofilm, cultivo individual y co-cultivos en cepas *S. meliloti* control y expuestas a condiciones de estrés con metales pesados. Barras marcados con letras minúscula indican diferencias estadísticamente significativas entre las cepas individuales o co-cultivo para la misma condición según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Barras marcados con letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones para una cepa dada de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Los recuentos de células asociadas a biofilm mostraron datos interesantes y similares a los obtenidos en este mismo tipo de ensayo pero con la cepa *lpsB*. En el caso del monocultivo de la cepa *wt*, se obtuvo una disminución de células sésiles (10^7 ufc.ml⁻¹) en los tratamientos comparados con el control (10^9 ufc.ml⁻¹); la cepa mutante *fliP* también mostró recuentos disminuidos en este tipo de condiciones. En los co-cultivos de todos los tratamientos ensayados se obtuvieron recuentos muy elevados, los

cuales ascendieron entre 6 a 7 órdenes ($10^8 - 10^9$ ufc.ml⁻¹) en relación a los monocultivos (10^2 ufc.ml⁻¹).

La composición del biofilm, determinó que la cepa *wt* estuvo en mayor porcentaje en esta estructura, la cual oscila entre el 50 al 65 %. Los resultados obtenidos luego de definir el índice de rescate de la cepa mutante *fliP* en biofilm fueron valores muy altos, los cuales estuvieron en el orden de 10^5 , 10^6 y 10^7 ; aumentando así, uno o dos órdenes en condiciones de exposición a metales respecto al control (tabla 4.6B). Estos resultados sugieren que la cepa *wt* rescata a la mutante y ambas forman parte del biofilm mixto. En el caso de células planctónicas los valores de los índices de rescate fueron menores, pero también se observó un mayor índice de células mutantes en fase planctónica en condiciones de estrés por metales, indicando que la cepa *wt* provee de factores que permiten la supervivencia de la cepa mutante en cultivo mixto.

4.3.4 Co-cultivos de las mutantes Rm8530 *exoY* con Rm8530 *expA* y Rm8530 DM

Se realizaron los siguientes ensayos de co-cultivo: (i) Rm8530 *exoY* (cepa productora de EPS II) y Rm8530 *expA* (cepa no productora de EPS II); y (ii) Rm8530 *exoY* y Rm8530 *exoYexpA* (DM) (cepa no productora de ningún tipo de EPSs).

Como se puede evidenciar en la figura 4.7A), el crecimiento del cultivo individual de la cepa Rm8530 *exoYexpA* fue menor cuando se expone a condiciones de estrés abiótico producido por metales pesados. Se obtuvo un efecto similar para el cultivo individual de la mutante Rm8530 *exoY* así como para el co-cultivo (Figura 4.7A).

Coincidentemente con los resultados mostrados anteriormente, la doble mutante estuvo severamente afectada en su capacidad de formar biofilms en todas las condiciones evaluadas (Figura 4.7B). Para cada condición, el ensayo de adhesión al soporte de vidrio mostró que el co-cultivo fue superior en su capacidad de formar biopelículas en comparación con cultivos individuales, aunque los valores obtenidos fueron similares al cultivo individual de *exoY* (Figura 4.2A). Estos resultados apoyan la posibilidad de un mecanismo de rescate de la cepa *exoY* para la cepa doble mutante. La tabla 4.7 muestra el recuento de bacterias de las células planctónicas y sésiles del cultivo individual y del co-cultivo, de las cepas *exoY* y DM. El recuento de bacterias planctónicas mostró que las ufc.ml⁻¹ fueron más bajas en el cultivo individual de cada cepa en presencia de metal en comparación con la condición control. Sin embargo, el número de células se incrementó notablemente en la fase planctónica de cada condición cuando las cepas fueron crecidas en co-cultivo. Este efecto fue más marcado en presencia de metales y también se refleja en el índice de rescate que fue más alto en As con respecto a Hg y el control (Tabla 4.7A). La composición del co-cultivo en la fase planctónica varió entre un 60 a 80 % de la cepa *exoY*, mientras que

la DM osciló entre 17 a 40 %. Se pudo observar que la DM llega a su máximo en el co-cultivo, en la concentración más alta de Hg (Tabla 4.7A), mientras que en la mayor concentración de As la composición de la fase planctónica fue más desequilibrada en una relación 75/25, *exoY*/DM, respectivamente.

El recuento de bacterias en la fase sésil del co-cultivo Rm8530 *exoY*- Rm8530 *exoYexpA* (DM) fue similar a los obtenidos para el co-cultivo Rm8530 *wt*- Rm8530 *exoYexpA*. En este sentido, se vió claramente que la cepa productora de EPS II, Rm8530 *exoY*, fue capaz de rescatar a la cepa no productora de EPS, Rm8530 *exoYexpA*.

El recuento de células sésiles de la cepa *exoY* del cultivo individual fue ligeramente menor ($\sim 10^8$ ufc ml⁻¹) cuando se expuso a metales en comparación con la condición control ($\sim 10^9$ ufc ml⁻¹). Por otra parte, y con independencia de la condición, la población de las bacterias sésiles de la cepa doble mutante fue muy baja ($\sim 10^2$ ufc.ml⁻¹), un hecho que es coincidente con una incapacidad para formar biofilm (tabla 4.2). La cepa *exoY* en co-cultivo mostró recuentos de células sésiles similares al cultivo individual. Sin embargo, la doble mutante se vio favorecida en gran medida de la vida en consorcios con la cepa *exoY*, alcanzando un elevado número de células sésiles en el biofilm mixto ($\sim 10^8$ ufc.ml⁻¹).

Similar a lo que fue descrito anteriormente, los índices de rescate que se obtuvieron para cada condición destacan el hecho de que en el co-cultivo, la bacteria DM adquiere capacidad para formar parte de la biomasa del biofilm mixto con *exoY*, mostrando índices de rescate de aproximadamente 10^5 (As) y 10^6 (control y Hg) veces (tabla 4.7B). La composición del biofilm mixto se caracteriza por la mayor proporción de la cepa *exoY* en todas las condiciones; sin embargo, la exposición a Hg determinó una mayor participación de la cepa DM en el consorcio, el cual estuvo constituido por partes iguales de ambas cepas en esta condición.

Tanto en los cultivos individuales como en el co-cultivo entre las cepas *exoY* y *expA*, se observó una disminución del crecimiento bacteriano en todas las condiciones de exposición a metales comparándolo con el control.

En el caso de las concentraciones de As, se observó que el co-cultivo se desarrolló más que las cepas crecidas por separado, mientras que en las concentraciones de Hg, los co-cultivos fueron similares al cultivo individual de la mutante *exoY*. La cepa *expA*, mostró un crecimiento muy disminuido cuando se la expuso a un estrés por metales (Figura 4.8A).

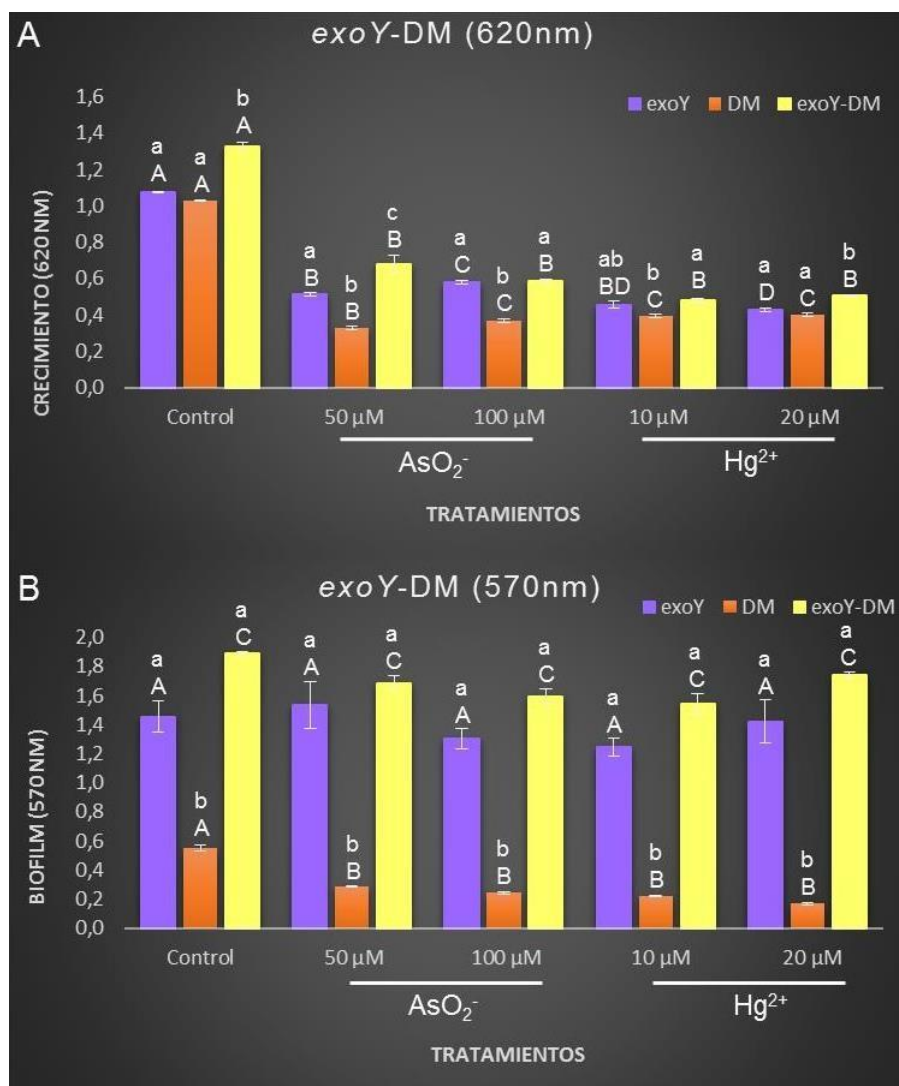


Figura 4.7: (A) Crecimiento Bacteriano (B) formación de biofilm, cultivo individual y co-cultivos en cepas *S. meliloti* control y expuestas a condiciones de estrés con metales pesados. Barras marcados con letra minúscula indican diferencias estadísticamente significativas entre las cepas individuales o co-cultivo para la misma condición según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Barras marcados con letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones para una cepa dada de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

A	Células Planctónicas						
	cultivos individuales		Co cultivos		Composición Porcentual (%) [#]		Índice de Rescate *
Tratamientos	<i>exoY</i>	DM	<i>exoY</i>	DM	<i>exoY</i>	DM	
Control	$6,9 \times 10^9$	$4,02 \times 10^8$	$3,22 \times 10^9$	$2,13 \times 10^9$	60,2	39,8	5,3
AsO_2^- 50 μM	$4,46 \times 10^7$	$1,31 \times 10^6$	$3,97 \times 10^9$	$1,91 \times 10^9$	67,52	32,48	$1,46 \times 10^3$
AsO_2^- 100 μM	$4,34 \times 10^7$	$2,34 \times 10^6$	$3,92 \times 10^9$	$1,34 \times 10^9$	74,52	25,48	572,65
Hg^{2+} 10 μM	$2,85 \times 10^7$	$2,36 \times 10^6$	$6,41 \times 10^8$	$1,33 \times 10^8$	82,82	17,18	56,36
Hg^{2+} 20 μM	$3,47 \times 10^7$	$1,44 \times 10^6$	$3,04 \times 10^8$	$2,11 \times 10^8$	59,03	40,97	146,53

Células Sésiles							
Tratamientos	cultivos individuales		Co cultivos		Composición Porcentual (%) [#]		Índice de Rescate [*]
	<i>exoY</i>	DM	<i>exoY</i>	DM	<i>exoY</i>	DM	
Control	2,37x10 ⁹	5,25x10 ²	3,24x10 ⁹	1,25x10 ⁹	72,16	27,84	2,38x10 ⁶
AsO ₂ 50 μM	2,71x10 ⁸	3,22x10 ²	6,19x10 ⁸	2,04x10 ⁸	75,21	24,79	6,33x10 ⁵
AsO ₂ 100 μM	2,16x10 ⁸	2,14x10 ²	3,3x10 ⁸	2,05x10 ⁸	61,68	38,32	9,58x10 ⁵
Hg ²⁺ 10 μM	4,28x10 ⁸	2,27x10 ²	3,97x10 ⁸	2,95x10 ⁸	57,37	42,63	1,29x10 ⁶
Hg ²⁺ 20 μM	2,79x10 ⁸	2,26x10 ²	2,88x10 ⁸	2,35x10 ⁸	55,07	44,93	1,04x10 ⁶

Tabla 4.7: Recuento de ufc.ml⁻¹ de células planctónica o células sésiles después de 48 h de crecimiento en medio TY (control), medio TY con NaAsO₂ 50 μM (AsO₂ 50 μM) y 100 μM (en AsO₂ 100 μM) y medio TY con HgCl₂ 10 μM (Hg²⁺ 10 μM) y 20 μM (Hg²⁺ 20 μM). Los valores corresponden a las medias de tres ensayos diferentes realizados por triplicado por tratamiento. Los valores de la desviación estándar se han omitido para simplificar la visualización y el formato de la tabla. Una diferencia de dos log en el recuento bacteriano implica diferencia estadísticamente significativas entre sí según la prueba de Tukey (p <0,05). # ufc.ml⁻¹ de *exoY* o DM x 100 / TC. TC: Recuento total (ufc.ml⁻¹*exoY* + DM ufc.ml⁻¹). * ufc.ml⁻¹ cepa DM en co-cultivo / ufc.ml⁻¹ DM en cultivo individual.

En cuanto a los resultados obtenidos en la producción de biofilm, se verificó una marcada disminución en la cepa *expA* en comparación con la cepa *exoY* y el co-cultivo cuando se los expuso frente a los EPT. En general, el desarrollo de biofilm en la *exoY*, se vio levemente disminuido en comparación con el control, de la misma manera a lo verificado para el consorcio (Figura 4.8B).

En la tabla 4.8A, se muestra que el recuento en las células libres de la cepa *exoY* expuesta a metales disminuyó en 2 órdenes respecto al control. Sin embargo, el recuento de células planctónicas en el co-cultivo se vio aumentado, lo que indica que el consorcio es de gran ayuda para enfrentar el estrés que se les produjo. Un dato destacable es que *expA* presentó una disminución en la capacidad para desarrollar biopelículas cuando se la expone de manera individual a los metales pesados. No obstante, este comportamiento se revierte completamente cuando la cepa *expA* está en co-cultivo con la cepa *exoY*, ya que aumentó su desarrollo en el consorcio en 4 órdenes para las concentraciones de As y en 3 órdenes cuando se la expuso a Hg. La composición en el co-cultivo en fase planctónica, de la cepa *exoY*, varió desde un 56 a un 77 %, indicando que este microorganismo mutante estaba en mayor proporción en el consorcio bacteriano.

Los valores de rescate de la cepa *expA* por la cepa *exoY* en fase planctónica fueron muy elevados en condiciones de presencia de metales. En estas condiciones, los índices de rescate oscilaron entre 820 a 7000 veces en comparación con el control (tabla 4.8A).

Por último, en el recuento de células asociadas a biofilm, se observó una disminución leve, de solo un orden, en el caso de la cepa *exoY* en los tratamientos con metales. Independientemente de la condición, los recuentos de células sésiles de la cepa *expA* fueron tan pequeños que se concluye sobre la incapacidad de esta cepa para formar biofilm, lo cual es coincidente con la necesidad de producción de EPS II para que las cepas de *S. meliloti* sean capaces de desarrollar un biofilm. El hecho llamativo fue que la cepa *expA* fue capaz de formar parte de la estructura del biofilm en el co-cultivo con la cepa *exoY*, registrando recuentos de células sésiles de 6 a 7 órdenes de magnitud mayores más que en el cultivo individual, en todas las condiciones (tabla 4.8B). La cepa *exoY* en el co-cultivo se mantuvo en el mismo orden que el control ya sea en el cultivo individual o en el co-cultivo, en este último en los tratamientos con metales, se vio aumentado en un orden con respecto al cultivo individual en las mismas condiciones. Se determinó que la composición de los co-cultivos estuvo dominada por un mayor porcentaje de la cepa *exoY* (60 a 70 %). Un dato obtenido y que es muy interesante, es el índice de rescate de la cepa *expA*, dicho parámetro mostró valores de 10^7 veces en los tratamientos con metales, y de 10^5 veces en el control. Este resultado es una prueba más que permite confirmar la importancia de la producción de biofilm frente a este tipo de estrés abiótico y que resalta la importancia de la síntesis de los EPSs para incrementar la supervivencia de cepas susceptibles, ya sea por su capacidad para neutralizar el efecto nocivo de los metales, para permitir el predominio del estilo de vida sésil o por ambos mecanismos.

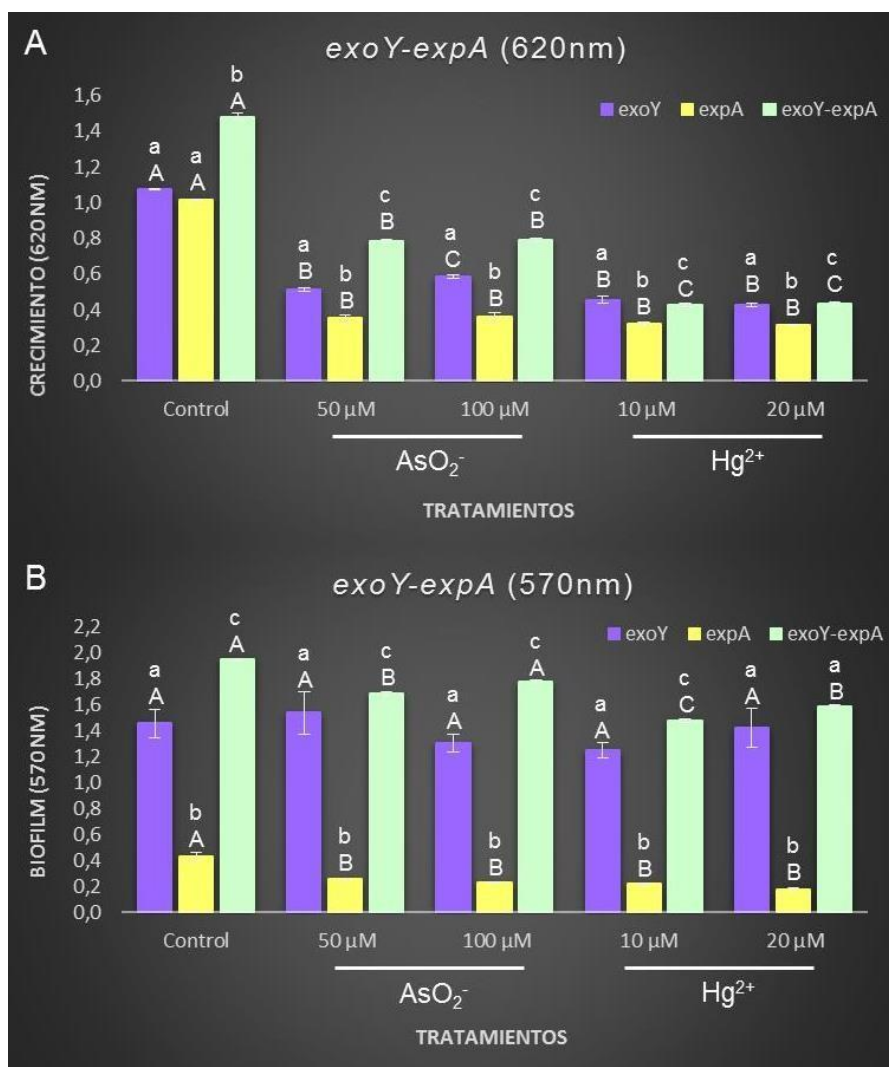


Figura 4.8: (A) Crecimiento Bacteriano (B) formación de biofilm, cultivo individual y co-cultivos en cepas *S. meliloti* control y expuestas a condiciones de estrés con metales pesados. Barras marcados con letra minúscula indican diferencias estadísticamente significativas entre las cepas individuales o co-cultivo para la misma condición según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Barras marcados con un letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones para una cepa dada de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Tratamientos	Células Planctónicas						Índice de Rescate
	cultivos individuales		Co cultivos		Composición Porcentual		
	<i>exoY</i>	<i>expA</i>	<i>exoY</i>	<i>expA</i>	<i>exoY</i>	<i>expA</i>	
Control	$6,9 \times 10^9$	$2,14 \times 10^9$	$6,58 \times 10^9$	$2,75 \times 10^9$	70,53	29,47	1,29
AsO_2^- 50 μM	$4,46 \times 10^7$	$2,79 \times 10^5$	$4,48 \times 10^9$	$1,36 \times 10^9$	76,71	23,29	$4,87 \times 10^3$
AsO_2^- 100 μM	$4,34 \times 10^7$	$1,92 \times 10^5$	$1,9 \times 10^9$	$1,31 \times 10^9$	59,19	40,81	$6,82 \times 10^3$
Hg^{2+} 10 μM	$2,85 \times 10^7$	$2,48 \times 10^5$	$2,8 \times 10^8$	$2,03 \times 10^8$	57,97	42,03	818,5
Hg^{2+} 20 μM	$3,47 \times 10^7$	$1,28 \times 10^5$	$5,3 \times 10^8$	$4,13 \times 10^8$	56,2	43,8	$3,23 \times 10^3$

Tratamientos	Células Sésiles						
	cultivos individuales		Co cultivos		Composición Porcentual		Índice de Rescate
	<i>exoY</i>	<i>expA</i>	<i>exoY</i>	<i>expA</i>	<i>exoY</i>	<i>expA</i>	
Control	2,37x10 ⁹	3,35x10 ³	5,29x10 ⁹	2,17x10 ⁹	70,91	29,09	6,48x10 ⁵
AsO ₂ 50 µM	2,71x10 ⁸	1,82x10 ²	3,18x10 ⁹	1,96x10 ⁹	61,87	38,13	1,06x10 ⁷
AsO ₂ 100 µM	2,16x10 ⁸	2,04x10 ²	4,9x10 ⁹	3,45x10 ⁹	58,68	41,32	1,69x10 ⁷
Hg ²⁺ 10 µM	4,28x10 ⁸	1,64x10 ²	3,87x10 ⁹	2,55x10 ⁹	60,28	39,72	1,55x10 ⁷
Hg ²⁺ 20 µM	2,79x10 ⁸	1,84x10 ²	4,11x10 ⁹	2,59x10 ⁹	61,34	38,66	1,41x10 ⁷

Tabla 4.8: Recuento de ufc.ml⁻¹ de células planctónica o células sésiles después de 48 h de crecimiento en medio TY (control), medio TY con NaAsO₂ 50 µM (AsO₂:50 µM) y 100 µM (en AsO₂:100 µM) y medio TY con HgCl₂ 10 µM (Hg²⁺ 10 µM) y 20 µM (Hg²⁺ 20 µM). Los valores corresponden a las medias de tres ensayos diferentes realizados por triplicado por tratamiento. Los valores de la desviación estándar se han omitido para simplificar la visualización y el formato de la tabla. Una diferencia de dos log en el recuento bacteriano implica diferencia estadísticamente significativas entre sí según la prueba de Tukey (p <0,05). # ufc.ml⁻¹ de *exoY* o *expA* x 100 / TC. TC: Recuento total (ufc.ml⁻¹ *exoY* + *expA* ufc.ml⁻¹). * ufc.ml⁻¹ cepa *expA* en co-cultivo / ufc.ml⁻¹ *expA* en cultivo individual.

4.4 Estudio del rol de los exopolisacáridos de *S. meliloti* 8530 en la co-agregación intragenérica macroscópica y microscópica con cepas *wt* y mutantes en EPS.

Los EPSs de *S. meliloti* serían de gran importancia en la interacción con otros microorganismos en su nicho ecológico. Determinar la funcionalidad de cada EPSs en dichas interacciones, permitiría conocer el grado de importancia de cada uno de ellos en estos procesos, por este motivo se realizaron ensayos macroscópicos y microscópicos de co-agregaciones entre células de diferentes cepas de *S. meliloti* 8530, silvestre: *wt*, productora de EPS II: *exoY*, productora de EPS I: *expA*, no productora de EPSs: DM.

4.4.1 Co-agregaciones de *S. meliloti* 8530 y sus mutantes en EPSs

Al evaluar la capacidad co-agregativa de *S. meliloti* Rm 8530 *wt* y sus mutantes en EPSs (Figura 4.9), se observó en el medio control (TY fresco y estéril), un porcentaje de co-agregación de alrededor del 20 % para todas las combinaciones de cepas a excepción de la mezcla *wt-exoY*, la cual tuvo diferencia significativa con las demás, ya que su co-agregación fue del 37 % aproximadamente. Este resultado podría atribuirse a que un remanente del EPSs producidos por ambas cepas de *S. meliloti* (*wt* y *exoY*) queda adherido a la superficie celular permitiendo que las bacterias puedan interactuar y agregarse. En la figura 4.10 (columna A) que corresponde al ensayo microscópico, se pueden observar las células separadas o no agregadas, corroborando de esta manera el ensayo de agregación en tubo.

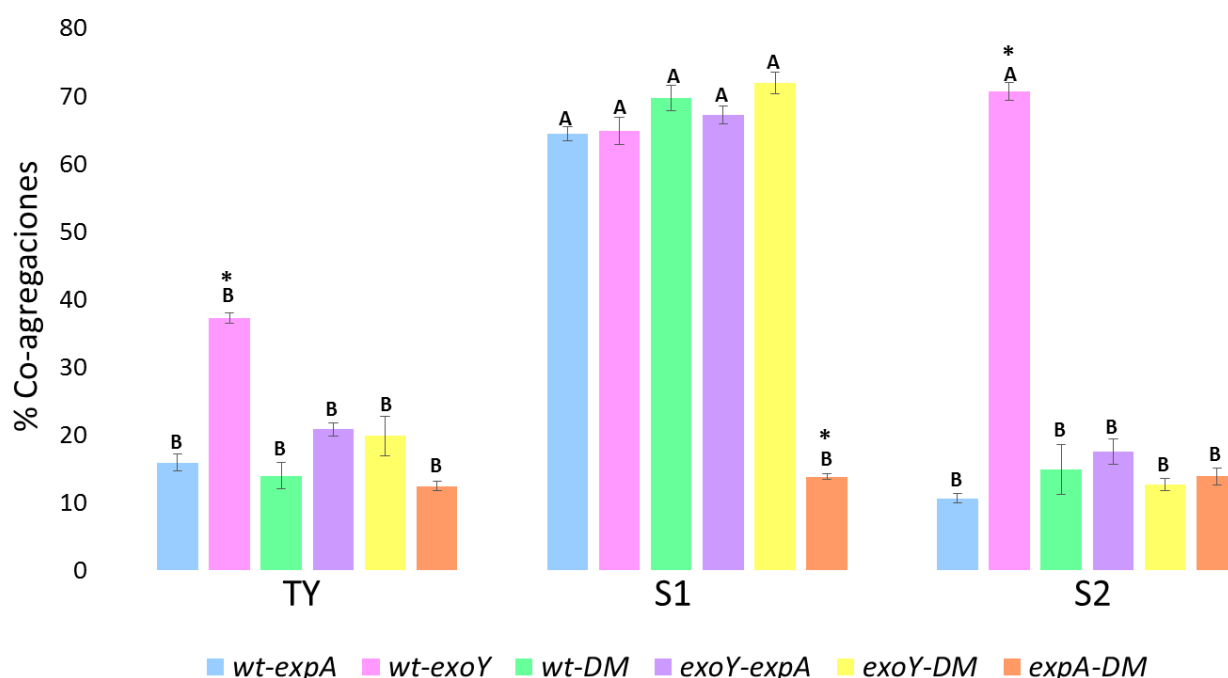


Figura 4.9 Porcentaje de co-agregación intragenérica en relación a los tratamientos de cepas de *S. melliloti* wt y sus mutantes en EPSs. Los tratamientos realizados corresponden a TY (medio de cultivo limpio y estéril), S1 (sobrenadante 1 extraído de la primera cepa nombrada en la mezcla), S2 (sobrenadante 2 extraído de la segunda cepa nombrada en la combinación). La presencia de un asterisco indica diferencias estadísticamente significativas en una misma condición según la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre distintas condiciones para una combinación de cepas dadas según la prueba Tukey ($p < 0,05$).

Cuando los microorganismos están en contacto con sobrenadante de cepas productoras de EPS II (sobrenadante 1 derivado de la cepa *exoY* o wt, Figura 4.9), los resultados indicaron un alto porcentaje de co-agregación, el cual osciló entre el 65 al 75 %. La co-agregación entre las cepas de este ensayo se diferencia aproximadamente en un 50 % con las duplas que tienen sobrenadante de microorganismos no productores de EPS II (sobrenadante 2 derivado de la cepa *expA* o DM) y con el tratamiento con medio de cultivo fresco y estéril (Figura 4.9). Los estudios de co-agregación microscópica avalaron los resultados obtenidos en las co-agregaciones macroscópicas en tubo, de esta manera podemos observar que en la columna S1, en la mayoría de las combinaciones se pudieron observar agregaciones, sólo en la mezcla *expA*-DM, no se registraron aglutinaciones. Esto podría deberse a que en el sobrenadante de la cepa *expA*, no hay EPSII (Figura 4.10). De igual manera la figura 4.10, muestra que en la columna S2, no hay desarrollo de co-agregaciones, a excepción del cuadrante S2 *wt-exoY*, en cuyo caso se observa una agregación marcada, nuevamente esto podría deberse a la presencia de una molécula clave, que no está en los demás sobrenadantes de este tratamiento.

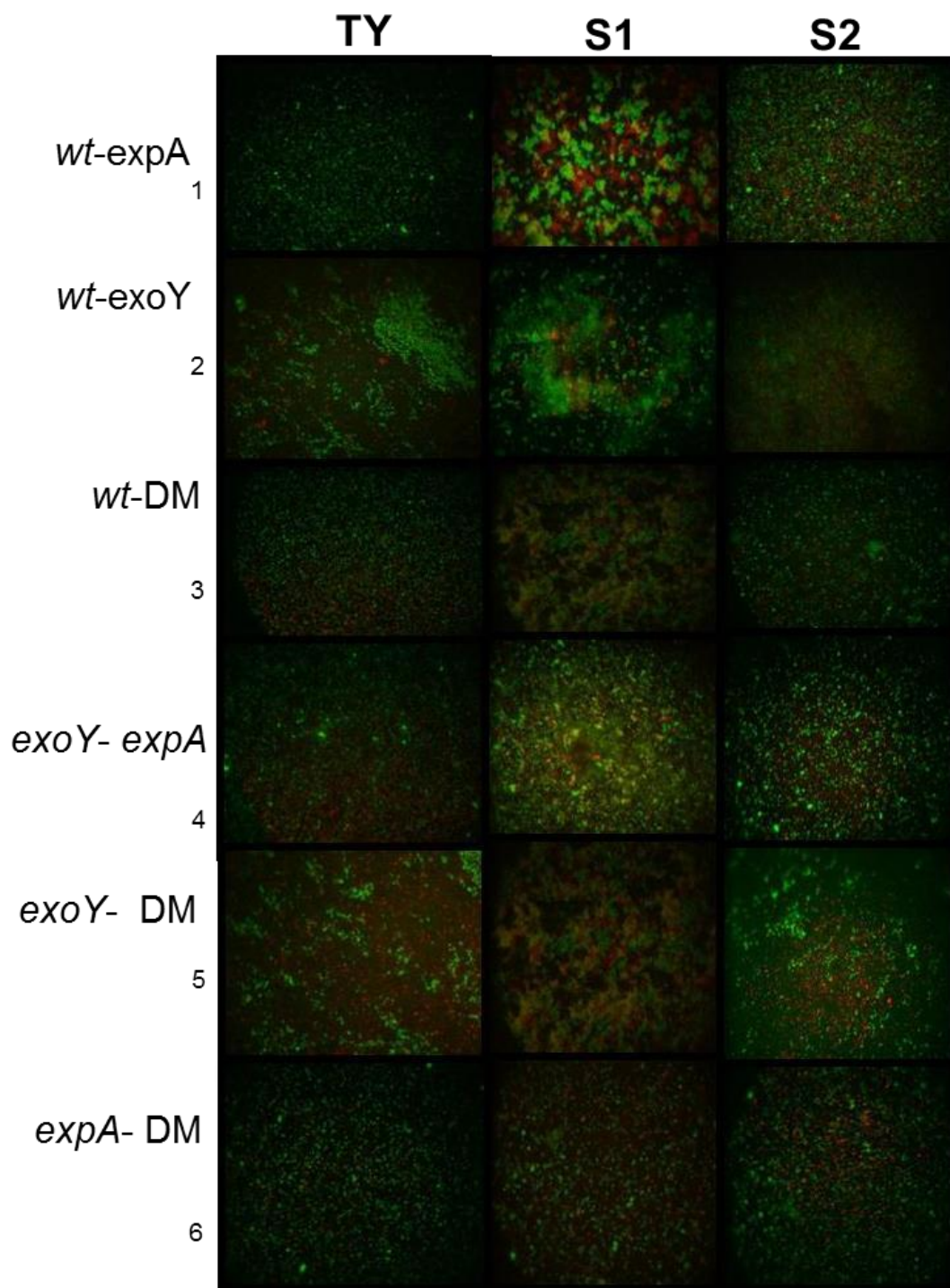


Figura 4.10: Ensayos de co-agregación microscópicos intragenericos, visualizados por microscopía de epifluorescencia. Las células de *S. meliloti* 8530 nombradas en primer lugar fueron marcadas con el plásmido pHC60 (que expresa GFP) y las cepas nombradas en segundo lugar fueron marcadas con el plásmido pMP 7604 (que expresa mCherry). Los tratamientos evaluados fueron: TY (medio de cultivo limpio y estéril), S1 (sobrenadante 1 extraído de la primer cepa nombrada en la combinación), S2 (sobrenadante 2 extraído de la segunda cepa nombrada en la mezcla). Fotografiadas luego de un período de reposo de 8 hs a 4 °C. Aumento: 400X.

4.5 Co-agregaciones intergenéricas de *S. meliloti* 8530 y sus mutantes en EPS con microorganismos rizosféricos.

En virtud de las interesantes capacidades floculantes de *S. meliloti*, surgió la inquietud respecto del comportamiento del posible rol del EPSs frente a otras rizobacterias de importancia agronómica, tomando en consideración que el estudio de un microorganismo aislado no refleja la realidad de lo que sucede en su entorno natural, debido a que el microbio convive con centenares de otros seres vivos que influyen en su desarrollo. Es por ello que el estudio de las interacciones celulares en el proceso de agregación bacteriana entre el microorganismo de estudio *S. meliloti* 8530 y sus mutantes, como también con bacterias rizosféricas de leguminosas resulta de gran utilidad como inicio de las evaluaciones sobre mecanismos de mayor complejidad como por ejemplo formación de biofilms mixtos, colonización de nicho, adhesión a superficies bióticas, entre otros. Particularmente, para los estudios de co-agregación mixta se evaluaron las cepas de *Pseudomonas fluorescens* WCS417r, *Azospirillum brasilense* AZ39, en ambos casos cepas de referencia y utilizadas en formulaciones de inoculantes agronómicos; y *Bulkholderia* sp. LVR 16, cepa aislada de la rizósfera de garbanzo (Vilchez y col., comunicación personal).

4.5.1 Agregaciones mixtas entre *S. meliloti* Rm8530 wt con cepas rizosféricas

La figura 4.11 muestra los resultados de las co-agregaciones entre *S. meliloti* 8530 wt y las tres bacterias rizosféricas elegidas para estos ensayos. Al evaluarse la co-agregación intergenérica con el sobrenadante de *S. meliloti* 8530 wt, se observó que hubo diferencia significativa entre los tres casos (Figura 4.11). El ensayo de la cepa wt de *S. meliloti* y *P. fluorescens* WCS417r mostró mayor co-agregación (alrededor del 70 %) comparado con el resultado de co-agregación entre *S. meliloti* y *Burkholderia* sp. (~ 50 %) y entre *S. meliloti* y *A. brasilense* (~ 40 %). Interesantemente, cuando estos ensayos se llevaron a cabo con el sobrenadante de la cepa rizosférica se observó una marcada reducción en la capacidad de co-agregar para cada combinación (Figura 4.11), siendo sus valores similares a los observados cuando los ensayos se realizaron utilizando medio TY fresco (Figura 4.11). Estos resultados claramente demuestran que la bacteria *S. meliloti* es quien proporciona el determinante molecular clave para los procesos de agregación intergenérica, mientras que la intensidad de tales interacciones varía dependiendo de la especie rizosférica con la cual interactúa el rizobio.

Al analizar las imágenes obtenidas mediante microscopía, surgió como dato interesante que en el tratamiento con el sobrenadante de *P. fluorescens* hubo formación de pequeñas agregaciones (Figura 4.12, S2) las cuales no eran mixtas como

sucedió en los tratamientos con el sobrenadante de *S. meliloti* (Figura 4.12 S1), sino que las agrupaciones fueron de *P. fluorescens* WCS417r solamente mientras que la cepa de *S. meliloti* no presentaba una agregación muy marcada. Esto es coincidente con los resultados de la figura 4.11 en los cuales la co-agregación no superó el 40%. En el caso de la co-agregación entre *S. meliloti* y *A. brasilense* AZ39 o *Burkholderia* sp. LVR16 con el sobrenadante de la bacteria rizosférica (Figura 4.12 S2), se obtuvieron valores que no superaron el 15% o 20% respectivamente, y en ambos casos no hubo diferencias significativas con el tratamiento de TY fresco y estéril, indicando así su bajo poder de agregación cuando en el medio no hay sobrenadante de *S. meliloti* 8530 wt, es decir la cepa que proporciona el determinante molecular clave, para los procesos de agregación intergenérica

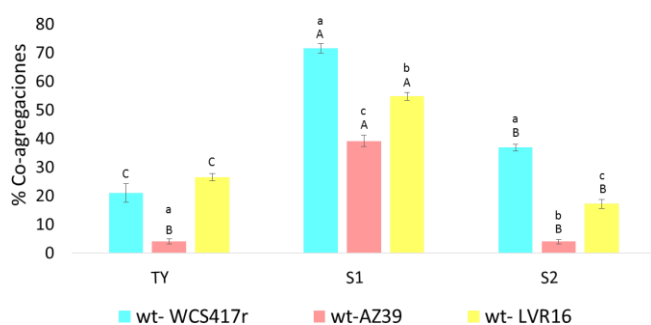


Figura 4.11 Porcentaje de co-agregación de *S. meliloti* 8530 wt y cepas rizosféricas (*P. fluorescens* WCS417r; *Azospirillum brasilense* AZ39; *Burkholderia* sp. LVR16) expuestas a diferentes tratamientos: TY, Sobrenadante 1 (S1); sobrenadante 2 (S2). Barras marcadas con letras mayúsculas indican diferencias estadísticas significativas entre los diferentes tratamientos para un co-cultivo dado según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Barras marcadas con una letra minúscula indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

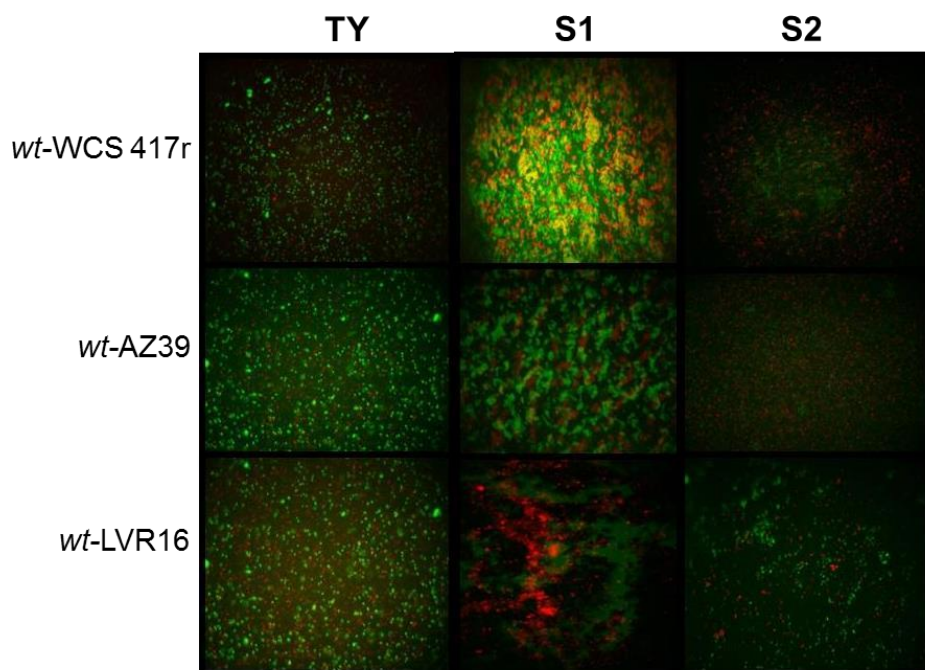


Figura 4.12 Ensayos de agregación microscópicos, visualizados por microscopía de epifluorescencia. Las células de *S. meliloti* 8530 fueron marcadas con el plásmido pMP 7604 (que expresa mCherry) y las cepas rizosféricas fueron marcadas con el plásmido pHC60 (que expresa GFP). Los tratamientos ensayados fueron: TY (medio de cultivo

limpio y estéril), S1 (sobrenadante 1 extraído de la primera cepa nombrada en la combinación), S2 (sobrenadante 2 extraído de la segunda cepa nombrada en la mezcla). Las células fueron fotografiadas luego de un período de reposo de 8 hs a 4° C. Aumento: 400X.

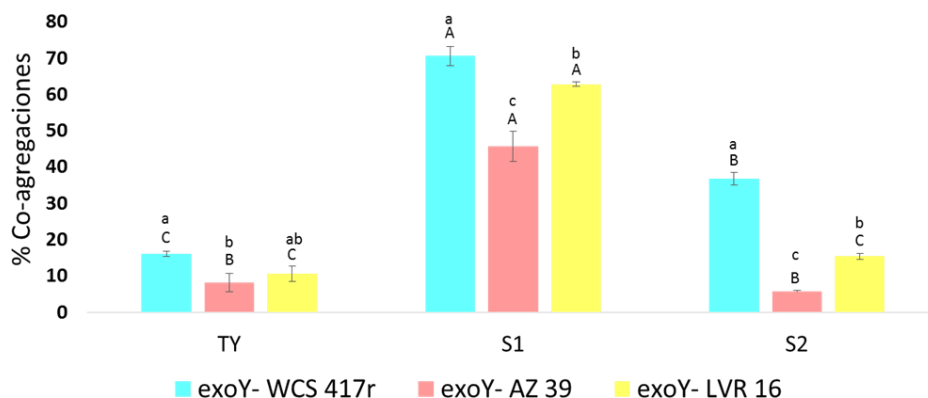
4.5.2 Agregaciones mixtas entre *S. meliloti* Rm8530 *exoY* con cepas rizosfericas.

Figura 4.13: Porcentaje de co-agregación de *S. meliloti* 8530 *exoY* y cepas rizosfericas (*P. fluorescens* WCS417r; *Azospirillum brasilense* AZ39; *Burkholderia* sp. LVR16) expuestas a diferentes tratamientos: TY, sobrenadante 1 (S1); sobrenadante 2 (S2). Barras marcados con letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos para un co-cultivo dado según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Barras marcados con una letra minúscula indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$)

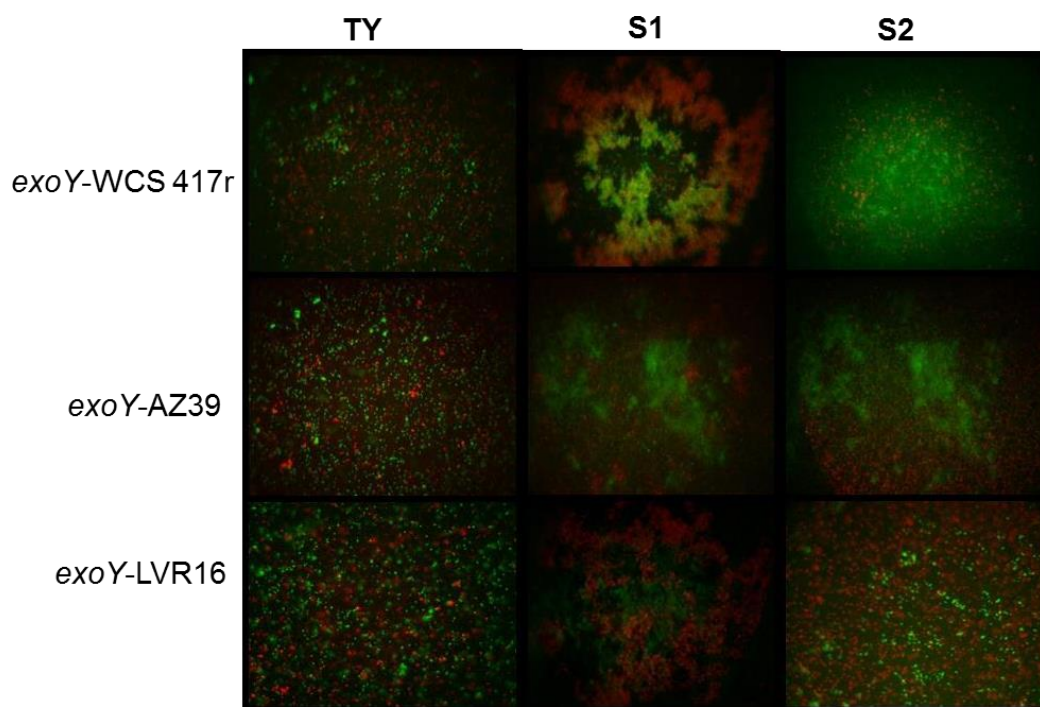


Figura 4.14: Ensayos de agregación microscópicos, visualizados por microscopía de epifluorescencia. Las células de *S. meliloti* 8530 *exoY* fueron marcadas con el plásmido pMP 7604 (que expresa mCherry) y las cepas rizosféricas fueron marcadas con el plásmido pHc60 (que expresa GFP). Los tratamientos ensayados fueron: TY (medio de cultivo limpio y estéril) S1 (sobrenadante 1 extraído de la primera cepa nombrada en el co-cultivo), S2 (sobrenadante 2 extraído de la segunda cepa nombrada en la mezcla). Las células fueron fotografiadas luego de un período de reposo de 8 hs a 4° C. Aumento: 400X.

Se evaluaron las agregaciones intergenéricas, utilizando *S. meliloti* mutante en la síntesis de EPS I, productora exclusivamente de EPS II (*exoY*) con microorganismo rizosfericos. En la figura 4.13, de manera similar a la figura 4.9, se observó que al

colocar células en un medio de cultivo fresco y estéril, las co-agregaciones fueron menores al 18% en todos los casos, confirmando estos datos con la microscopía (Figura 4.14), resultados similares se obtuvieron, en el tratamiento con el sobrenadante procedente de la cepa rizosférica en cuya condición todas las combinaciones de cepas tratadas mostraron agregaciones menores al 20%. La microscopía demostró, en esta condición la formación de agregados exclusivamente formados por *P. fluorescens* WCS 417r, demostrando que el polímero extracelular que produce este microorganismo no induciría a la agregación de la cepa de *S. meliloti*, (Figura 4.14, S1). En el tratamiento con el sobrenadante libre de células de *S. meliloti* 8530 *exoY*, tanto las cepas *P. fluorescens* WCS 417r y *Burkholderia sp* LVR16, mostraron diferencia significativa entre ellas, indicando nuevamente que la presencia de una “molécula clave” permitiría una mayor agregación independientemente de la especie bacteriana con la cual *S. meliloti* esté estableciendo la interacción agregativa. Lo mismo sucedió, cuando se combinó *S. meliloti exoY* y *Azospirillum brasilense* AZ39 (Figura 4.14), y al igual que con la cepa silvestre de *S. meliloti* (Figura 4.13), *A. brasilense* mostró una co-agregación igual que en el control con TY. La combinación de esta cepa con *exoY* y el sobrenadante de AZ39, nos permitió observar en la co-agregación en tubo (Figura 4.14), su poca capacidad de agregación, ya que no se diferenció del control con TY y no superó el 10 % de agregación, la cual se corroboró al observar el ensayo de microscopía (Figura 4.14 S2), donde se vieron agregados pequeños y microorganismos dispersos, resultados similares se observaron en este mismo tratamiento pero con los sobrenadantes de cada cepa rizosférica, donde se pudo observar que no hubo diferencias significativas entre las combinaciones, con respecto al control (tratamiento con TY).

4.5.3. Agregaciones mixtas entre *S. meliloti* Rm8530 y mutantes no productoras de EPSII (*expA* y DM) con cepas rizosféricas

Para los ensayos con cepas no productoras de EPS II, como lo son *expA* y DM (Figura 4.15 y 4.17 respectivamente), con las cepas rizosféricas elegidas, puede observarse que para todos los ensayos, TY, sobrenadante 1 y sobrenadante 2, las agregaciones no superaron el 19 % a excepción de la combinación *expA*-WCS417r o DM-WCS 417r con sobrenadante de la cepa rizosférica. De acuerdo a estos últimos datos y a lo observado previamente (Figura 4.11 y Figura 4.15), la cepa de *P. fluorescens* sería productora de un tipo de molécula (u otro factor extracelular), con cierta capacidad de autoagregación, logrando aumentar el porcentaje de floculación con las cepas *expA*

y DM, el cual osciló entre el 20 al 25% respectivamente, en relación con los respectivos controles que no superaron el 10 % de agregación celular.

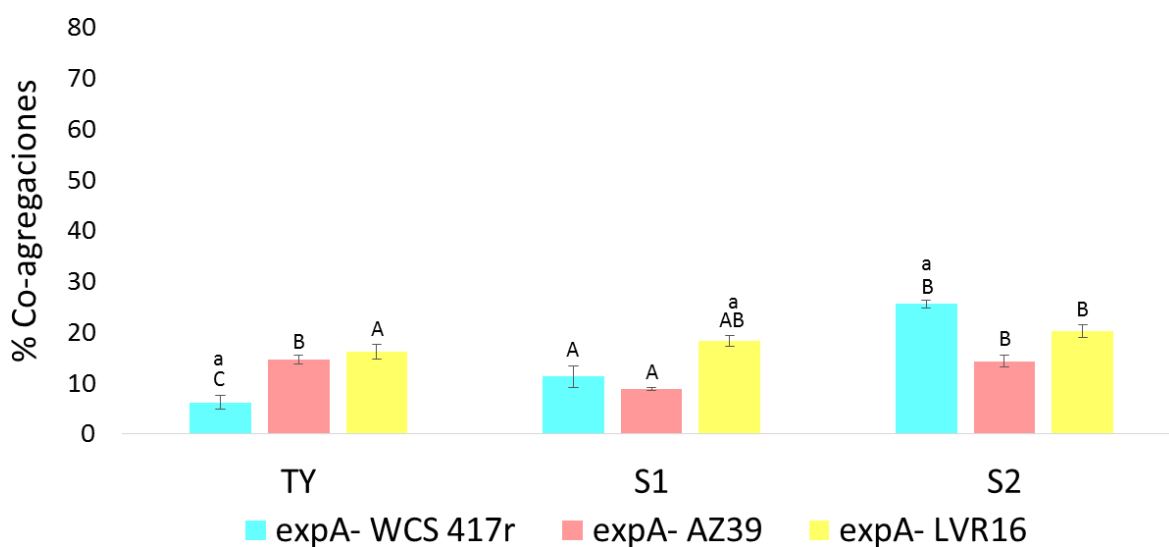


Figura 4.15: Porcentaje de co-agregación de *S. meliloti* 8530 *expA* y cepas rizosféricas (*P. fluorescens* WCS417r; *Azospirillum brasilense* AZ39; *Burkholderia sp.* LVR16) bajo diferentes tratamientos: TY; sobrenadante 1 (S1); sobrenadante 2 (S2). Barras marcados con letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos para un co-cultivo dado según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Barras marcadas con una letra minúscula indican diferencias estadísticamente significativas entre diferentes co-cultivos para una misma condición de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos por los ensayos macroscópicos, son respaldados por la microscopía, estos ensayos nos permitieron mostrar claramente que no hay formación de agregados en ninguno de los tratamientos que no tienen presente el exopolisacarido II de *S. meliloti* 8530 (Figura 4.16 y 4.17), la cual sería la “molécula clave”, que permitiría desarrollar las co-agregaciones.

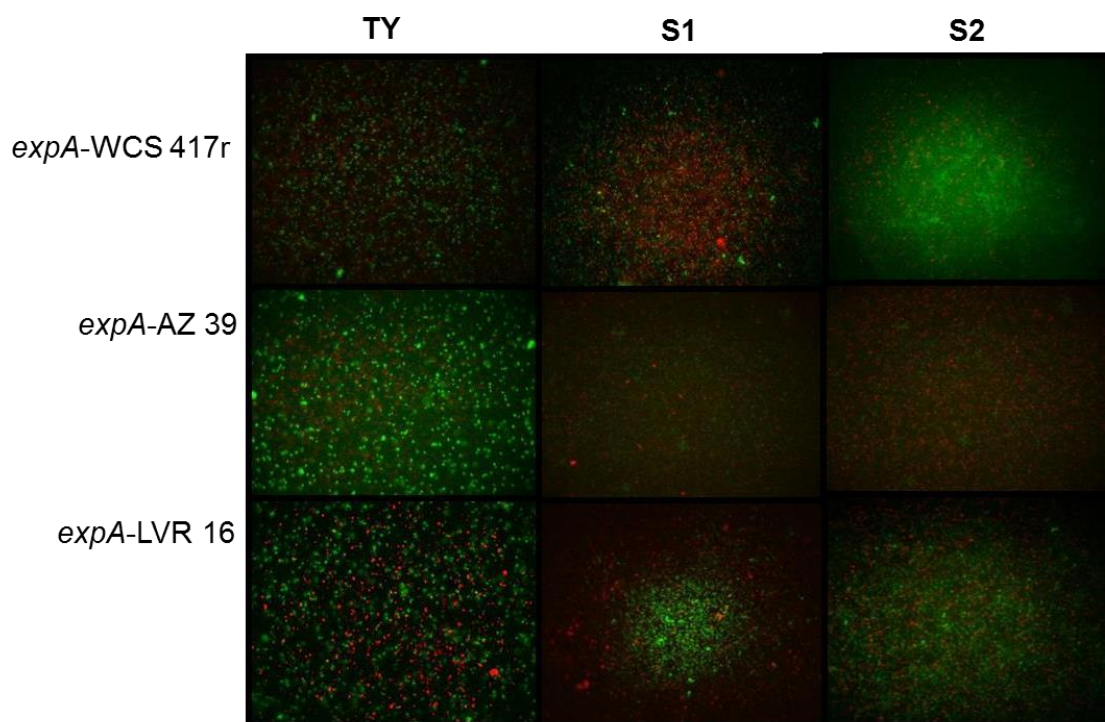


Figura 4.16: Ensayos de agregación microscópicos, visualizados por microscopía de epifluorescencia. Las células de *S. meliloti* 8530 *expA*, fueron marcadas con el plásmido pMP 7604 (que expresa mCherry) y las diferentes cepas rizosféricas fueron marcadas con el plásmido pHC60 (que expresa GFP). Los tratamientos ensayados: TY (medio de cultivo limpio y estéril); S1 (sobrenadante 1 extraído de la primera cepa nombrada en la combinación), S2 (sobrenadante 2 extraído de la segunda cepa nombrada en la mezcla). Las células fueron fotografiadas luego de un período de reposo de 8 hs a 4° C. Aumento: 400X.

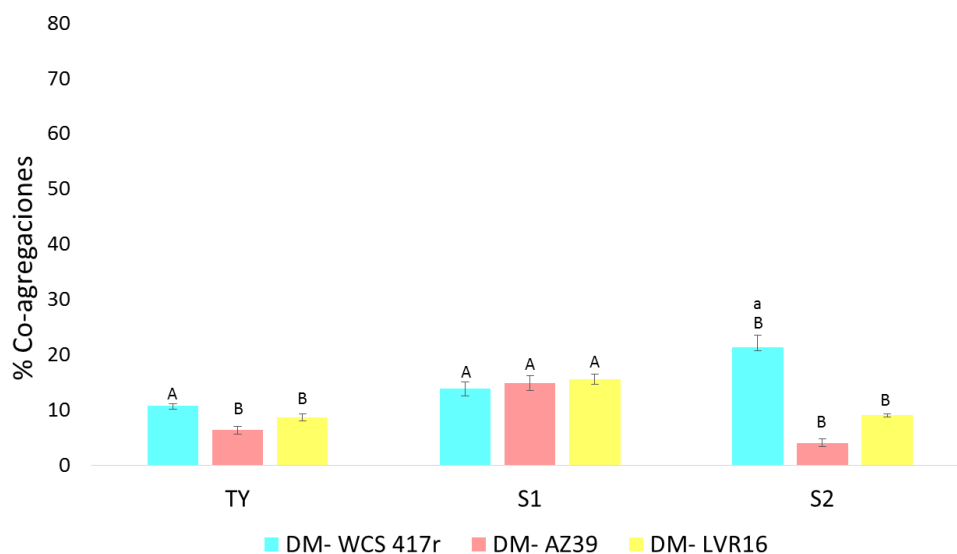


Figura 4.17: Porcentaje de co-agregación de *S. meliloti* 8530 DM y cepas rizosféricas (*P. fluorescens* WCS417r; *Azospirillum brasilense* AZ39; *Burkholderia sp.* LVR16), bajo diferentes tratamientos: TY; sobrenadante 1 (S1); sobrenadante 2 (S2). Barras marcados con letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos para un co-cultivo dado según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Barras marcadas con una letra minúscula indican diferencias estadísticamente significativas entre diferentes co-cultivos para una misma condición de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

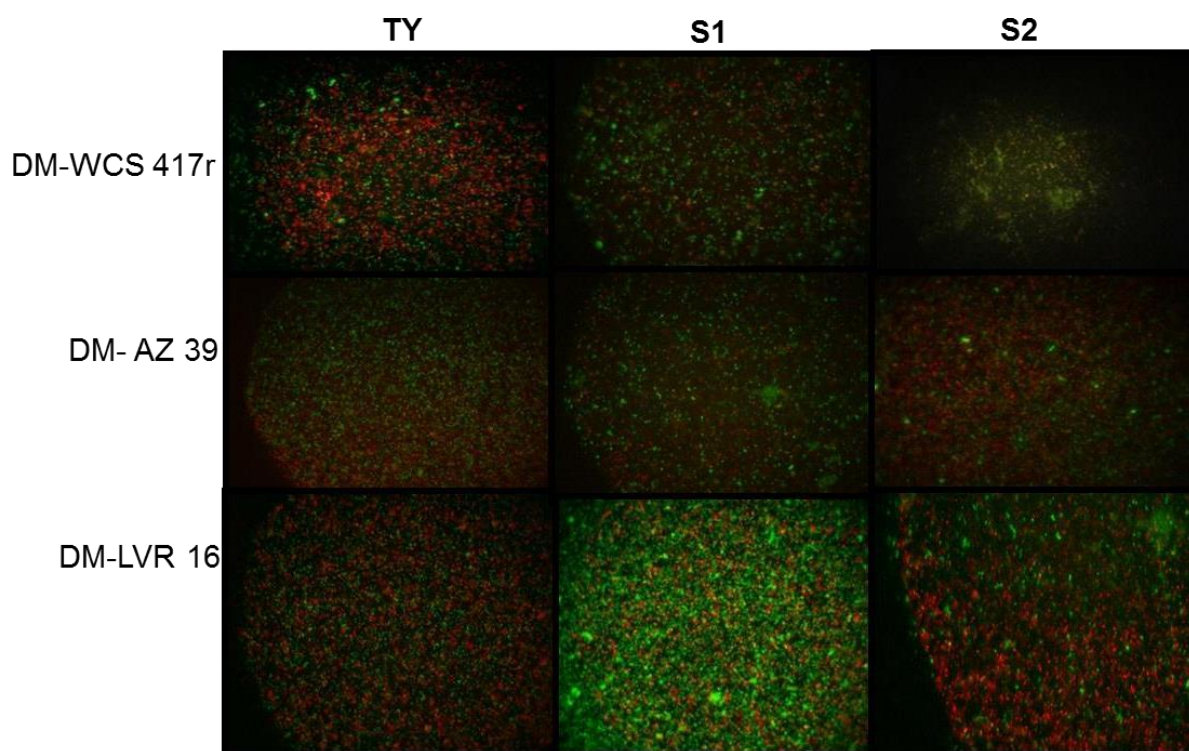
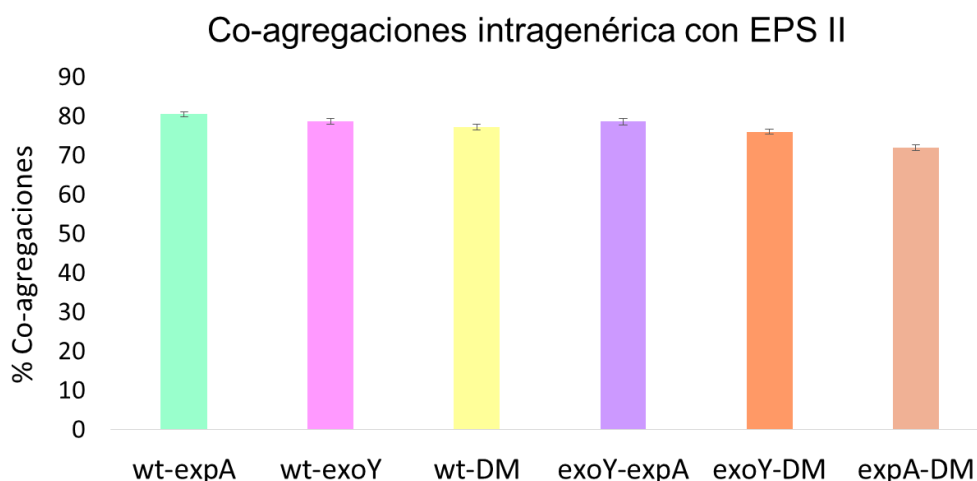


Figura 4.18: Ensayos de agregación microscópicos, visualizados por microscopía de epifluorescencia. Las células de *S. meliloti* 8530 DM fueron marcadas con el plásmido pMP 7604 (que expresa mCherry) y las diferentes cepas rizosféricas fueron marcadas con el plásmido pH60 (que expresa GFP). Los tratamientos ensayados fueron: TY (medio de cultivo limpio y estéril); S1 (sobrenadante 1 extraído de la primera cepa nombrada en la combinación), S2 (sobrenadante 2 extraído de la segunda cepa nombrada en el co-cultivo). Las células fueron fotografiadas luego de un período de reposo de 8 hs a 4° C. Aumento: 400X.

4.6 Co-agregaciones con EPSII purificado de *S. meliloti* 8530 *exoY* con sus mutantes en EPS y microorganismos rizosféricos.



4.19: Porcentaje de co-agregación de *S. meliloti* 8530 wt y sus mutantes en EPS, en medio conteniendo EPSII purificado.

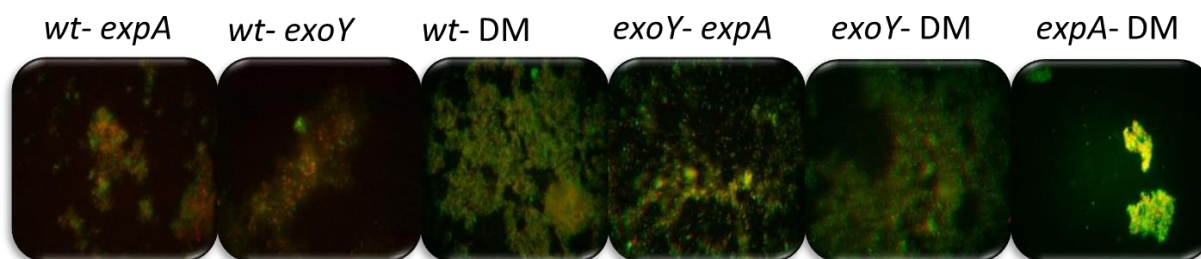


Figura 4.20: Ensayos de co-agregación microscópicos intragenéricos, visualizados por microscopía de epifluorescencia. Las células de *S. meliloti* 8530 nombradas en primer lugar fueron marcadas con el plásmido pHC60 (que expresa GFP) y las cepas nombradas en segundo lugar fueron marcadas con el plásmido pMP 7604 (que expresa mCherry). Los tratamientos: TY (medio de cultivo limpio y estéril); S1 (sobrenadante 1 extraído de la primera cepa nombrada en la combinación), S2 (sobrenadante 2 extraído de la segunda cepa nombrada en la mezcla). Fotografiadas luego de un período de reposo de 8 hs a 4° C. Aumento: 400X.

Entre los estudios realizados anteriormente y la bibliografía, pudimos estimar que el EPSII, podría ser la molécula clave, en las agregaciones de *S. meliloti*. En el ensayo de co-agregación microscópica las fotografías de la figura 4.20, nos muestran que la presencia de EPS II (obtenido del sobrenadante de cepas productoras de este polisacárido) en el medio permitió la formación de flóculos, en la mayoría de los casos, no se pudieron distinguir de manera definida las cepas, por ello la aparición de tonalidad amarilla en algunos sectores. Los resultados obtenidos en la microscopía son coincidentes con la co-agregaciones macroscópicas en tubo (Figura 4.19); que se vieron fuertemente aumentadas en comparación con el tratamiento con TY (Figura 4.19), teniendo un mínimo de 68 % (*expA-DM*) y llegando a un máximo de 85% (*wt-expA*). Todos estos resultados en conjunto sugieren la importancia que tiene el EPS II en el proceso de agregación entre células, siendo éste uno de los primeros pasos para la formación de biopelículas.

Los resultados obtenidos al adicionar el EPS II (Figura 4.21 y 4.22) mostraron elevados porcentajes de co-agregación intergenérica para cada mezcla (alrededor del 70 %), los cuales no tuvieron diferencia significativa entre ellos. Debido a esto, podría especularse que algún producto presente en este sobrenadante o alguna condición físico-química (temperatura, pH) estuvo inhibiendo o reduciendo la agregación con *Burkholderia* y *Azospirillum* en los tratamientos con sobrenadantes que contenían EPSII (Figuras 4.11 y 4.14).

En todas la combinaciones co-agregativas evaluadas (intra e intergenéricas), la presencia de EPS II restauró el fenotipo altamente autoagregativo de la cepa de *S. meliloti* 8530 *wt* cuyos valores oscilaron entre el 70 al 80 %, demostrando tanto de manera macroscópica como microscópica (Figura 4.20 y 4.22) la importancia y el posible rol que podría cumplir este polisacárido en el desarrollo inicial de las interacciones celulares en comunidades bacterianas

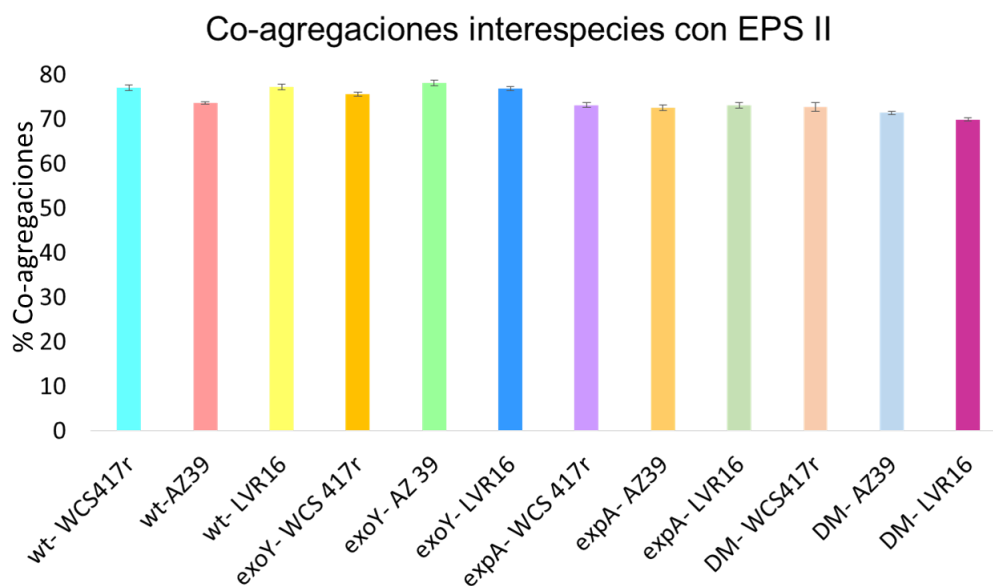


Figura 4.21: Porcentaje de co-agregación de *S. meliloti* 8530 wt y sus mutantes en EPS con cepas rizosféricas (*P. fluorescens* WCS417r; *Azospirillum brasilense* AZ39; *Burkholderia* sp LVR16), bajo tratamiento con EPSII puro.

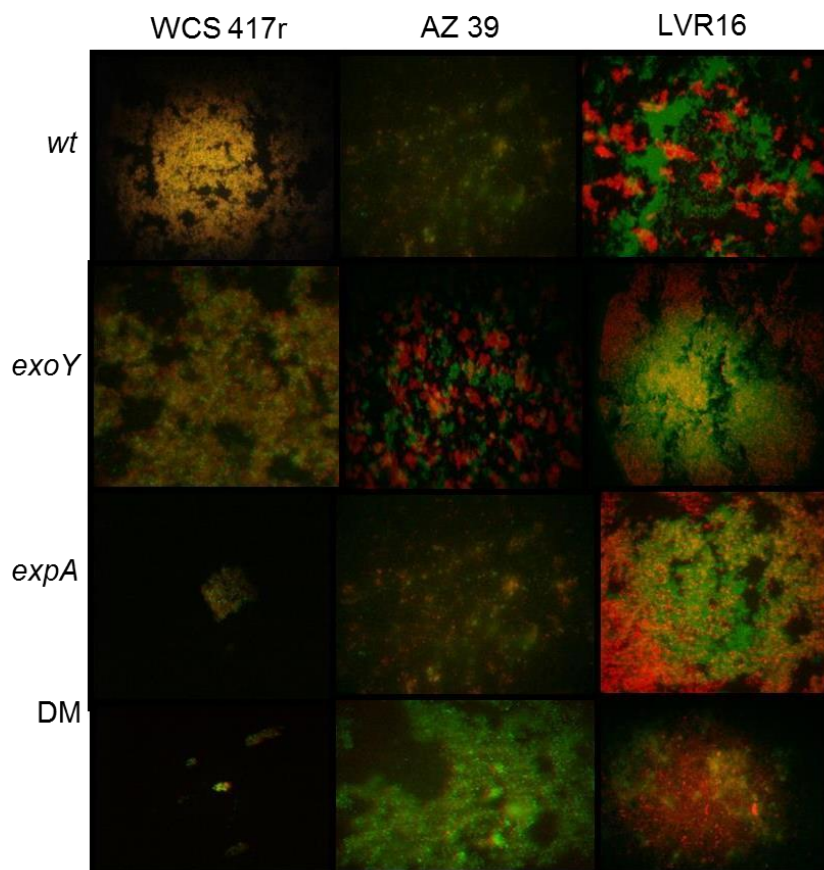


Figura 4.22: Ensayos de agregación microscópicos, visualizados por microscopía de epifluorescencia. Las células de *S. meliloti* 8530 fueron marcadas con el plásmido pMP 7604 (que expresa mCherry) y las diferentes cepas rizosféricas fueron marcadas con el plásmido pHc60 (que expresa GFP). El tratamiento utilizado fue EPSII purificado. Las células fueron fotografiadas luego de un periodo de reposo de 8 hs a 4° C. Aumento: 400X.

5. Discusión

Analizando los resultados en forma conjunta, a pesar de la diferencia entre la naturaleza química de los elementos tóxicos evaluados, es decir, As como un metaloide y Hg como un metal de transición, no se encontraron diferencias sustanciales en los distintos ensayos de exposición de *S. meliloti* a estos elementos. Se sugiere que la cepa *S. meliloti* se vería afectada en una forma similar por As y Hg, y que, posiblemente, esta bacteria puede tener un mecanismo fisiológico y/o metabólico para hacer frente a estos elementos tóxicos.

Un mecanismo bien conocido y eficaz de resistencia al mercurio entre bacterias gram-positivas y gram-negativas (incluyendo *S. meliloti*) (Barkay y col., 2003) implica la reducción de mercurio codificado por el operón *mer*, situado en elementos genéticos móviles (Schneiker y col., 2001; Norberg y col., 2014). Mientras que la resistencia en *S. meliloti* para arsénico depende del operón *ars* que consiste en *arsR* (regulador transcripcional), *arsC* (arseniato reductasa) y AQPS (glicero aquaporina). Las AQPs son las únicas proteínas del operon *ars* en *S. meliloti* que facilitan el transporte de arsenito hacia afuera de la célula (Yang y Rosen., 2016). Además, una proteína codificada por el gen *arsH* ha sido descrito como una Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH): flavin mononucleótido (FMN) óxido-reductasa que forma H₂O₂ en *S. meliloti* expuesto a As (Ye y col., 2007).

A pesar de estos antecedentes sobre la participación de toda la maquinaria de la resistencia a metales, en este trabajo, se puso de manifiesto el impacto de los EPSs de *S. meliloti*, en conferir resistencia a metales en este rizobio.

Los resultados obtenidos de las curvas de crecimiento (Figura 4.1) y el número de bacterias (Tabla 4.1) indican claramente que los EPSs de *S. meliloti* podrían tener un papel protector contra la exposición a metales tóxicos. En este sentido, en presencia de los EPT, usados en este trabajo (As o Hg), la cepa Rm8530 *wt* fue capaz de alcanzar una DO de 1 aproximadamente, y 10⁹ ufc.ml⁻¹ a las 48 h, para controlar la condición de estrés frente a metal, mientras que las cepas mutantes, ya sean deficientes en la síntesis de EPSs, flagelo o LPS, no fueron capaces, en presencia de metales, de alcanzar las DO ni las ufc.ml⁻¹, que sí lograron en las condiciones control.

Coincidentemente, trabajos anteriores habían informado que la tasa de crecimiento de varias cepas bacterianas del suelo disminuyó en presencia de metales pesados o metaloides (Armendariz., 2015; Iebrazi y Fikri-Benbrahim., 2018). También se determinó que la cepa *wt* creció lentamente cuando el As o Hg estaban en el medio de cultivo. Sin

embargo, fue capaz de recuperarse al final del ensayo. Este fenómeno de adaptación a la presencia de los metales durante largo tiempo y de ser, capaz de lograr un crecimiento similar por contrarrestar la exposición al metal sugiere que posiblemente la producción de EPS por la cepa *wt* podría secuestrar el metal tóxico, dando a las bacterias el tiempo necesario para la adaptación, a los cambios fisiológicos o metabólicos necesarios para eliminar el efecto tóxico del metal, es decir, la expresión de enzimas y transportadores detoxificantes de metal (Yang y col., 2005; Yang y Rosen., 2016). Este efecto no se observó en las cepas mutantes de *S. meliloti*, hecho que sugiere que a pesar de tener las herramientas genéticas / metabólicas para la resistencia a metales, la ausencia de producción total o parcial de EPSs o la alteración del LPS o del flagelo son cruciales, para su desarrollo y conduce a la toxicidad de los metales, ya que no se produce la captura de los mismos, lo que provoca una mayor dificultad, hasta que el microorganismo se adapte, y ponga en marcha otras vías de detoxificación. La cepa *exoY* productora de EPS II mostró una mejor supervivencia durante la exposición a As o Hg en comparación con las cepas que no producen EPS II, pero si EPS I (*expA*) o la cepa no productora de ningún EPS, (Rm8530 *exoYexpA*), de igual manera sucede con la cepa *lpsB* la cual, como se mencionó anteriormente tiene una alteración en el LPS, pero contiene el gen *expR* intacto, o la cepa no móvil *fliP*, productora de ambos EPS, en ambos microorganismos, se ve muy afectado el desarrollo de su crecimiento. Estos resultados apoyan que el EPS II, LPS y la estructura flagelar de los microorganismos serían más relevante que el EPS I en el trato con la toxicidad de metales pesados/ metaloides. Aunque es bien conocido que las bacterias producen más biofilm durante la exposición a metales, los resultados del presente trabajo para diferentes cepas de *S. meliloti* son discordantes. En este sentido, la capacidad de biofilm se redujo o casi no se modificó por la presencia de metales en el medio de cultivo.

El proceso de formación, desarrollo y vida bacteriana en biofilm, está asociado a mecanismos de protección, que les permite a las bacterias sobrevivir y desarrollarse en los ambientes que contienen altas concentraciones de metales pesados o metaloides (Muller y col., 2007). En este sentido, cuando se expone a altas concentraciones de As (III), se induce la producción de biopelículas como se ha descrito para *Herminiimonas arsenicoxydans* y *Thiomonas arsenitoxydans* (Marchal y col., 2011). El desarrollo de esta capacidad permite que las bacterias se adhieran sobre las superficies ambientales y por lo tanto facilita su adaptación fisiológica y metabólica a los fines de sobrevivir con éxito en entornos metálicos contaminados (Paul y col., 2014).

La formación de biopelículas de *S. meliloti* expuesto a condiciones de estrés por metales, es bastante concluyente respecto al papel de EPS en esta bacteria. La función del EPS II como factor clave en el proceso de desarrollo del biofilm de *S. meliloti* (Rinaudi y Gonzales., 2009), fue crucial para la resistencia a EPT. En este mismo sentido, tanto la cepa *wt* que produce EPS I y EPS II, como la cepa *exoY* que produce sólo EPS II; fueron mejores productoras de biopelículas en todas las condiciones en comparación con las cepas *fliP*, *lpsB* y las cepas no productoras de EPS II, *expA* y DM; las cuales mostraron reducidos parámetros de formación de biofilm en todas las condiciones. En particular, la cepa productora de EPS II, Rm8530 *exoY* fue la cepa con mayor capacidad de formar biofilm independientemente de la condición (si bien EPS II no fue cuantificado, el fenotipo en placa de la cepa *exoY* se caracteriza por ser muy mucoso debido a la sobreproducción de este EPS). Su relación de biofilm/crecimiento (DO_{570}/DO_{620}) aumentó como consecuencia de la exposición a As con respecto al control y fue incluso mayor cuando se la expuso a Hg. Estas observaciones tuvieron una correlación con el recuento de células sésiles y la efectividad para establecerse como biofilm, lo que condujo a un aumento de los %ef de un 25% en condiciones control a un 83% y 96% en presencia de As o Hg, respectivamente. En función de estos resultados, se puede concluir que, al menos para las cepas de *S. meliloti* productoras de EPS II, cuando se las expone a metales tóxicos, esta condición de estrés impulsa a las células bacterianas al desarrollo de población cuyo principal estilo de vida está relacionado al establecimiento de biofilm, probablemente como una estrategia para mejorar la supervivencia en esta situación de estrés. Casualmente, el rol de los EPS como mecanismo de resistencia de metales, ha sido descrito para otros rizobios, y bacterias extremófilas. En este sentido, fue demostrado el aumento significativo de la producción de EPSs en *Bradyrhizobium japonicum* E109 y *Azospirillum brasilense* Az39 por exposición a 25 μM y 500 μM de As (III), respectivamente (Armendariz y col., 2014). Un estudio proteómico llevado a cabo en *H. arsenicoxydans* mostró que el perfil de expresión de proteínas se requieren no sólo para la desintoxicación de arsénico o como respuesta al estrés, sino también en la motilidad, síntesis de EPSs, importación de fosfato y metabolismo energético, lo que sugiere que la exposición a metales tóxicos impulsa cambios globales en la fisiología bacteriana (Weiss y col., 2009). Por otra parte, en apoyo a los hallazgos en el presente trabajo, los genes implicados en la resistencia a arsénico y metabolismo (Muller y col., 2007; Carapito y col.2006), muestran que *H. arsenicoxydans* ha adquirido la propiedad de producir una gruesa cápsula de EPSs, que la bacteria utiliza para eliminar el arsénico en forma de

gránulos (Muller y col., 2007). También se demostró que la sustancia exopolimérica de un biofilm maduro ambiental contenía concentraciones más altas de metales y carbohidratos comparado con la sustancia exopolimérica del biofilm inicial /inmaduro, mostrando así que la composición bioquímica de las biopelículas depende de la madurez y es controlado por las comunidades microbianas, así como por el entorno geoquímico local (Jiao y col., 2010), otro claro ejemplo de la importancia de esta sustancia polimérica es *Pantoea agglomerans*, microorganismo de aislamiento de entornos agrícolas, que tiene la capacidad de producir EPS en respuesta protectora al estrés para sobrevivir y crecer en un entorno contaminado con metales. *P. agglomerans* muestra tolerancia y crecimiento mucoso en presencia de metales pesados, los cuales se acumulan intracelularmente y unidos a la superficie de la célula (Mohite y col., 2018).

La mayoría de los biofilms en la naturaleza se componen de múltiples especies de consorcios microbianos (Zhou y col., 2018). Varios estudios mostraron la incapacidad de ciertas bacterias para formar biopelículas individualmente pero en sinergismo con otras cepas bacterianas tales estructuras podrían formarse (Filoche y col., 2004; Yoshida y col., 2009). Las biopelículas de dos cepas bacterianas representan modelos simplificados para verificar las interacciones microbianas como sinergismo, antagonismo y el estudio de los determinantes de tales interacciones (EPSs, mecanismo de detección de quórum sensing, motilidad, etc.) (An y col., 2009). Aunque los informes no son abundantes, el estudio de la formación de biofilms mixtos entre diferentes especies ha adquirido gran interés debido a sus aplicaciones como por ejemplo en la biorremediación de suelos contaminados (Beer y col., 2018).

En este trabajo, se muestra el papel de los EPSs de *S. meliloti* en el proceso de tolerancia a metales y supervivencia de las bacterias a través del estudio de los co-cultivos entre cepas productoras de EPS II (*wt* o *exoY*), cepas no productoras de este tipo de EPS (DM, *expA*) y con cepas con alteraciones en estructuras como el LPS y el flagelo (*lpsB* y *fliP*). El impacto más relevante de los resultados obtenidos en los estudios de co-cultivo fueron los adquiridos a partir del recuento de células en fases planctónicas y sésiles. En particular, la mayoría de los hallazgos fueron sorprendentes, debido a la capacidad de las cepas productoras de EPS II de rescatar a las cepas no productoras, aumentando la supervivencia en la fase planctónica y permitiendo la formación de un biofilm mixto (fase sésil). Fenómenos de rescate han sido determinados a nivel ambiental en biorreactores de lecho empacado para el tratamiento de efluentes industriales con mercurio, en los cuales el biofilm inicial mono-específico de *Pseudomonas putida* cambió a una biopelícula

mixta, poliespecífica, la cual incluyó cepas no resistentes a mercurio (Wagner-Dobler y col., 2000; Von Castein y col 2002).

En el presente trabajo, pueden describirse dos fenómenos posibles de los resultados obtenidos del recuento de células que se encuentran en la biopelícula mixta en los co-cultivos *wt*-DM; *wt-expA*; *wt-mpsB*; *wt-fliP*; (Tabla 4.3, 4.4, 4.5 y 4.6 respectivamente): (i) un efecto cooperativo en presencia de metales entre la cepas productoras de EPSs (*wt*), la no productoras de EPS II (*expA*), la cepa no productora de EPSs (DM), la cepa que contiene alterado su lipopolisacárido (*mpsB*) o en su flagelo (*fliP*), basado en los elevados recuentos de bacterias en co-cultivo en comparación con cultivos individuales; y (ii) un proceso de rescate de la cepa *wt* a las cepas mutantes ensayadas en todas las condiciones, basado en los valores sorprendentemente elevados de ufc.ml⁻¹ de células sésiles mutantes en co-cultivo en comparación con su cultivo individual.

Los resultados de recuento de células e índices de rescate planctónicos y sésiles para los co-cultivos *exoY*-DM y *exoY-expA* con respecto a los cultivos individuales (Tabla 4.7 y 4.8 respectivamente), pueden sostener la idea de que existe un efecto protector de EPS II producido por la cepa *exoY*, el cual confiere resistencia a metales y conduce al rescate de las cepas no productoras de EPSII o de ningún tipo de EPS. Con esta afirmación puede suponerse que una cepa de *S. meliloti* no productora de EPS II no es capaz de formar biofilm y por lo tanto no sobrevive a los efectos nocivos de la exposición a metales tóxicos. Sin embargo, en cepas de *S. meliloti* productoras de EPS II, o aún en otras bacterias formadoras de biofilm, una vez que se forma la estructura; la misma constituye el soporte capaz de proteger a las células que están inmersas en el agregado polimérico de forma independiente del tipo de bacteria o cepa atrapadas en la matriz del biofilm (incluyendo también a las cepas no formadoras de biofilm), incluso a mayores concentraciones del compuesto tóxico. Los resultados globales que se presentan en este trabajo determinan claramente que las cepas productoras de EPS II (*wt* o *exoY*) fueron capaces de rescatar a las cepas no productoras de EPS II (DM o *expA*), apoyando la idea de que los EPS proporcionan protección contra la toxicidad de metales (Flemming y Wingender., 2002; Joshi y col., 2012).

El EPS en los agregados microbianos tiene muchos sitios para la adsorción de metales y materias orgánicas, como sustancias aromáticas, alifáticos en proteínas y regiones hidrófobas en carbohidratos (Flemming y Leis., 2002). Esto revela los papeles potenciales del EPS en la adsorción de metales pesados a las células bacterianas y el transporte hacia el entorno (Toner y col., 2005; Hu y col., 2007). La presencia de muchos grupos

funcionales en los EPSs, tales como grupos carboxilo, fosforilo, sulfhidrilo, fenólico e hidroxilo, pueden conducir a la formación de complejos con diferentes metales pesados (Liu y Fang., 2002b; Joshi y Juwarkar., 2009; Ha y col., 2010). Basándose en los números estimados de los grupos carboxilo e hidroxilo disponibles, se considera que los EPSs tienen una capacidad de unión muy alta (Flemming y Leis., 2002; Guibaud y col., 2003, 2006). Además, el EPS soluble podría tener una mayor capacidad de adsorción para metales pesados que el EPS unido de los lodos (Comte y col., 2006a) y que las bacterias excretarían más EPS en condiciones desfavorables. (Sheng y col., 2010).

Los flagelos son necesarios para el tipo de movilidad de swarming (Gao y col., 2010), permitiendo a los microorganismos llegar a lugares, nutricional y ecológicamente más favorables, siendo su EPS el medio por el que se mueve.

Los resultados demostraron que las cepas productoras de EPS II proporcionan el escenario propicio para el establecimiento en el biofilm de las cepas no productoras de este EPS, mejorando y aun permitiendo su supervivencia incluso en condiciones de exposición a metales tóxicos.

Varias bacterias se han descrito como resistentes a metales, siendo capaces de crecer en ambientes contaminados con estos compuestos. Por lo tanto, la utilización de microorganismos en ambientes contaminados representaría una solución prometedora para la remediación de metales (Denton., 2007; Xie y col., 2015). Los hallazgos del presente trabajo implican el potencial uso de *S. meliloti* para la mejora en el crecimiento de plantas de alfalfa en suelos contaminados con metal/ metaloide, proporcionando evidencia del rol clave de los EPSs como probables determinantes moleculares de la supervivencia bacteriana en suelos con EPT y consecuentemente favoreciendo el desarrollo de la simbiosis en tales ambientes contaminados.

En base a estos resultados, y sabiendo que los EPSs, son claves para el inicio de la formación de biofilm, se definió evaluar el papel de cada uno de los exopolisacáridos, en las agregaciones bacteriana.

Las bacterias se estudiaron durante muchos años como entidades celulares aisladas, sin embargo, al igual que muchos microorganismos, tienen una fuerte tendencia a asociarse. Una manifestación fenotípica común de este comportamiento es la autoagregación, que se basa en las interacciones adhesivas entre las células bacterianas; este fenómeno puede visualizarse macroscópicamente mediante el típico aglutinamiento de células en cultivos líquidos, seguido por la sedimentación de los grumos en condiciones estáticas (Sorroche y col., 2012), y de manera microscópica mediante el uso de microorganismos

marcados con proteínas fluorescentes y observados en microscopio de epifluorescencia luego de la sedimentación. Macroscópicamente, el fenómeno de la co-agregación puede definirse como aglomeración cuando se mezclan diferentes tipos de células (Simoes y col., 2007). Esta agregación inter-bacteriana se observa fácilmente a simple vista (Kolenbrander, 1995). La co-agregación es un proceso integral en la formación de biofilms mixtos y por lo tanto ecológicamente importante (Rickard, y col., 2003). El reconocimiento interactivo entre células puede ser de naturaleza intragenérica, intergenérica o multigenérica (Joe y col., 2009). Para lograr estos procesos naturales de agregación celular es crucial la participación de componentes superficiales y extracelulares de las bacterias (primariamente flagelo, LPS y EPS), en combinación con el medio ambiente y señales de quorum sensing (QS) (Bogino y col., 2013), por ello fue muy necesario tener cultivos con altos contenidos en ufc.ml^{-1} ($\sim 10^9$).

Los ensayos macroscópicos y microscópicos realizados sobre diferentes combinaciones duales de bacterias, ya sea *S. meliloti* 8530 y sus mutantes en EPS (interacción intragenérica), o *S. meliloti* 8530 con bacterias rizosféricas (interacción intergenérica), revelaron que al exponer estos microorganismos en medios libres de células no productoras de EPS II, como es el caso de sobrenadantes de cultivos de mutantes de *S. meliloti* 8530 *expA* (no productora de EPS II) o DM (no productora de ningún EPS), o con medio TY fresco y estéril; el mecanismo de agregación bacteriana prácticamente no fue promovido, obteniendo porcentajes significativamente bajos si se los compara, cuando al medio se le agrego EPS II purificado o sobrenadante de cepas productoras de EPS II, (*S. meliloti* 8530 *wt* o *exoY*). Estos resultados indicarían que el EPS II sería el exopolisacárido responsable de la agregación diferencial observada y se descartaría alguna influencia de EPS I en este proceso. En este sentido, cuando el tratamiento del ensayo de agregación incluyó la adición exógena de EPS II purificado, se observó un alto porcentaje de co-agregación siendo indistinto el tipo de cepa que participó del ensayo. De esta manera se puso de manifiesto el papel fundamental del galactoglucano en la agregación, esto concuerda con estudios realizados por Sorroche y colaboradores (2010), que destacaron el rol que el EPS II posee en la formación de agregados bacterianos. El proceso de agregación bacteriano promueve el inicio de la formación de biofilm, siendo fundamental para la buena invasión de las bacterias en las plantas y así desarrollar diferentes actividades de interacción con los vegetales. Particularmente para el sistema de estudio con *S. meliloti*, estos procesos serían relevantes para el establecimiento y desarrollo de una simbiosis óptima con la planta leguminosa (Nikitina y col., 2000).

Hacia finales del siglo pasado y desde entonces hasta la actualidad, la noción del estudio de microorganismos como entes aislados ha cambiado por la evaluación de los mismos como unidades altamente sociales. En este sentido, el estudio de las características que pueda tener un microorganismo aislado puede no ser representativo de su comportamiento en la naturaleza ya que su nicho ecológico es compartido con una amplia y diversa comunidad polimicrobiana. Por consiguiente, las interacciones microbianas subterráneas de las leguminosas no son la excepción a esta gran diversidad de microorganismos que habitan este nicho, es así que es ampliamente conocido que los rizobios coexisten e interaccionan con un sinnúmero de microorganismos (Martínez-Hidalgo y Hirsch, 2017). Por Por ello, la tendencia moderna es realizar enfoques experimentales que tengan en consideración dichos aspectos. De esta manera fue evaluado el rol del EPS II de *S. meliloti* Rm8530 en la interacción co-agregativa con cepas que se encuentran normalmente en suelos de uso agronómico, como lo son *Pseudomonas fluorescens* WCS417r, *Azospirillum brasilense* AZ39 y *Bulkholderia* sp. LVR16.

P. fluorescens WCS417r es un microorganismo rizosférico muy utilizado como inoculante, en compañía de algún microorganismo nodulante, debido a su poder en la solubilización de fosfatos y por su eficacia en el control biológico (Leeman y col., 1995, Meyer y Hofte., 1997, Sivakumar y Joe., 2007). Este microorganismo produce EPS de tipo alginato, o heteropolisacáridos ácidos en escala de laboratorio (Sirajunnisa y col., 2016). Como se puede observar en varias fotografías (Figuras 4.12, 4.14 y 4.15) esta macromolécula sería la causante de la agregación de esta especie, y permite un porcentaje de agregación con *S. meliloti* que oscila entre un 20 a un 40 %. Este último porcentaje se produjo con cepas de *S. meliloti* productoras de EPS II, hecho que podría estar indicando cierta interacción con el polímero de *P. fluorescens* WCS417r y provocando un sinergismo en la propiedad evaluada, ya que no sucede cuando se combina esta cepa con microorganismos mutantes en EPS II.

Azospirillum brasilense AZ39, es un microorganismo rizosférico, que tiene la capacidad de fijar nitrógeno en vida libre (Joe y col., 2009), mejora el crecimiento de las raíces, aumenta producción de biomasa de capilares radicales, que a su vez aumenta la adsorción de agua y minerales; hechos que eventualmente ejercen beneficios a las plantas promoviendo su crecimiento (Dobbelaree y col., 2001; Russo y col., 2008). Algunos autores aseguran que *Azospirillum* tiene proteínas extracelulares que le proporcionan una adhesión a superficies abióticas y le permiten agregarse en condiciones de movimiento y,

a temperaturas de crecimiento normal para este microorganismo (28°C), lo cual contrasta con las características autoagregativas de *S. meliloti* 8530 (Neyra C y Sadasivan L., 1985). En este sentido, *A. brasilense* no flocula cuando la agregación se produce a 4°C de la misma manera que lo hace a 28°C, además debe considerarse que cuando el pH del medio ronda la neutralidad, disminuye su capacidad autoagregativa (Nikitina y col., 2000; Sorroche y col., 2010), de esta manera se podrían explicar los porcentajes de co-agregación disminuidos de *A. brasilense* AZ39 al combinarlos con cepas (y sus sobrenadantes) libres de EPS II (Figura 4.11, 4.14, 4.15 y 4.17), siendo respaldado estos resultados con la microscopia de fluorescencia (Figura 4.12, 4.13, 4.16 y 4.18). Totalmente diferente fue el tratamiento con EPS II en cuya condición el poder agregativo de este polímero condujo a porcentajes altos de co-agregación intergenérica de *S. meliloti* con *A. brasilense*.

Bulkholderia sp. LVR16 es una cepa aislada de la rizósfera del garbanzo (*Cicer arietinum* L.), es un microorganismo productor de AHL de cadenas largas y cortas, móvil y presenta una gran capacidad de formar biofilm. Los resultados que se obtuvieron con esta bacteria mostraron un bajo porcentaje autoagregación con *S. meliloti* a 4°C; similares a los obtenidos con *A. brasilense* AZ39. Del mismo modo, cuando el tratamiento incluyó la presencia de EPS II proveniente de diferentes fuentes (EPS II puro o sobrenadante de wt/exoY), el poder agregativo fue mayor al 60 %.(Figura 4.11, 4.14, 4.15 y 4.17).

A nivel general dentro del conjunto de tratamientos realizados, el ensayo que se destacó por sus elevados valores porcentuales de co-agregación fue, en todas las combinaciones, cuando se agregó EPS II purificado, de esta manera se podría suponer que esta macromolécula no sólo interacciona con los microorganismos rizosféricos sino también mejora esta capacidad ya que estas bacterias elegidas no tienen altos porcentajes de autoagregación (10 a 15 %) esto podría sugerir, que los polisacáridos son moléculas conectoras para este tipo de procesos; pudiendo actuar como "pegamento molecular" que inicia y mantiene el contacto entre las células, causando la floculación. (Bogino y col., 2013). De manera particular algunos autores sugieren que la capacidad autoagregativa de *Azospirillum* es debida a la unión de proteínas (presumiblemente lecitinas) con EPSs específicos o inespecíficos (Nikitina y col., 2010). A nivel molecular, la co-agregación de bacterias intestinales u orales humanas y de bacterias acuáticas depende de la interacción de una lectina de un participante con un receptor glucosídico complementario del otro participante (Ledder y col., 2008). Se esperan mecanismos similares en bacterias que establecen asociaciones con plantas, particularmente en ciertos hábitats en los que

las poblaciones bacterianas son muy diversas, por ejemplo, suelos rizosféricos (Bogino y col, 2013).

Según lo descrito por Lopez-Baena (2016) los polisacáridos de superficie bacterianos pueden tener un papel importante en la efectividad y especificidad de la simbiosis. El efecto de las variaciones en la ausencia de EPS parece ser específico para cada pareja simbiótica. En base a todo lo expuesto tanto en las interacciones entre cepas de *S. meliloti* Rm8530 y sus mutantes, como con otras bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), los datos obtenidos indicarían que los sobrenadantes de cultivo de las cepas autoagregativas son capaces de complementar la agregación de cepas no agregativas. Estos resultados hacen presumir que el EPS II sería el polímero extracelular que mediaría la agregación en *S. meliloti* y en otras rizobacterias. Sin embargo cabe aclarar que el EPS II podría cobrar mayor importancia en procesos bacterianos de vida libre respecto de procesos simbióticos, en los cuales está bien establecido que este exopolisacárido no es esencial.

Tomando en consideración todo lo expuesto estos hallazgos serían relevantes para la compleja comprensión de los procesos que conducen a mecanismos de interacciones entre bacteria-bacteria, planta-bacteria y para el desarrollo de inoculantes comerciales.

6. CONCLUSION

Existen varios mecanismos descritos en relación a la resistencia microbiana a metales, incluidas las interacciones físico-químicas, de secuestro intracelular y extracelular precipitación de los compuestos poliméricos excretados. Toda la evidencia presentada aquí, claramente indica que la síntesis de EPS II es para *S. meliloti* como un mecanismo de resistencia a la exposición a metales tóxicos, probablemente a través de diferentes efectos tales como atrapar el metal fuera de las células y/o formación de biofilm. Ambos son posibles mecanismos exitosos para reducir la toxicidad de metales en el medio ambiente, mejorar el desarrollo de la simbiosis y el crecimiento de la planta leguminosa en suelos de metal contaminado.

La molécula polisacarídica extracelular de tipo II (EPS II) producida por *S. meliloti* 8530 podría realizar una función de puente, como molécula conectora, entre los microorganismos permitiendo co-agregarse, y pudiendo ser una ventaja para poder convivir y formar comunidades multiespecies siendo beneficioso para la colonización. Este polisacárido puede facilitar la asociación de otras especies que no se agregan directamente entre sí, aumentando la oportunidad de cooperación metabólica. Estos hallazgos son relevantes para nuestra comprensión en las interacciones planta-bacteria y el desarrollo de biofertilizantes jerarquizando la importancia del presente estudio.

7. BIBLIOGRAFÍA

- **An D.; Danhorn T.; Fuqua C.; Parsek M.** (2006). *Quorum sensing* and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 7: 3828–3833.
- **Anderson G.G. y O’Toole G.A.** (2008). Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Spring*. 85-105.
- **Armendariz A.L.; Talano M.A.; Travaglia C.; Reinoso H.; Wevar Oller A.L.; Agostini E.** (2016). Arsenic toxicity in soybean seedlings and their attenuation mechanisms. *Plant Physiol. Biochem.* 98: 119-127.
- **Armendariz A.L.; Talano M.A.; Wevar Oller A.L.; Medina M.I.; Agostini E.** (2015). Effect of arsenic on tolerance mechanisms of two plant growth-promoting bacteria used as biological inoculants. *J. Environ. Sci.* 33, 203-210.
- **ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry,** (2002). Arsenic Toxicity: Case Studies in Environmental Medicine. US Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry and Support Lab.
- **Bafana A.** (2013). Diversity and metabolic potential of culturable root-associated bacteria from *Origanum vulgare* in sub-Himalayan region. *World J Microb Biot.* 29: 63–74.
- **Bais H.P.; Park S.W.; Weir T.L.; Callaway R.M.; Vivanco J.M.** (2004). How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci.* 9: 26-32.
- **Barkay T.; Miller S.M.; Summers A.O.** (2003). Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 355–384.
- **Barloy-Hubler F. y Jebbar M.** (2009). *Sinorhizobium meliloti* megaplasmids and symbiosis in *S. meliloti*. Part III. Bacterial Megaplasmids. *Spring*. 91-118.
- **Barnett M.; Sharon J.; Longa R.** (2017). Novel Genes and Regulators That Influence Production of Cell Surface Exopolysaccharides in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 200: 1-22.
- **Battisti L.; Lara J.C.; Leigh J.A.** (1992). Specific oligosaccharide form of the *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide promotes nodule invasion in alfalfa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 5625-5629.
- **Becker A.; Rüberg S.; Küster H.; Roxlau AA.; Keller M.; Ivashina T.; Cheng H.; Walker GC.; Pühler A.** (1998). The 32-kilobase *exp* gene cluster of *Rhizobium meliloti*

directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products. *J. Bacteriol.* 179: 1375-1384.

- **Beer D.M.; Botes M.; Cloete T.E.** (2018). The microbial community of a biofilm contact reactor for the treatment of winery wastewater *J. Appl. Microbiol.* 124: 598-609.
- **Belliveau B.H.; Staradub M.E.; Trevor J.T.** (1991). Occurrence of antibiotic and metal resistance and plasmids in *Bacillus* strains isolated from marine sediment. *Canad. J. Microbiol.* 37: 513-520.
- **Beringer JE.** (1974). R Factor Transfer in *Rhizobium Zegurninosarum* *J. Microbiol.* 84: 188-198.
- **Beyersmann D.; y Hartwig A.** (2008). Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol* 82: 493-512.
- **Bogino P.; Abod A.; Nieves F.; Giordano W.** (2013). Water-limiting conditions alter the structure and biofilm-forming ability of bacterial multispecies communities in the alfalfa rhizosphere. *PLoS ONE* 8, 15837-15859.
- **Brown K.;** (2001). Workers' health and colonial mercury mining at Huancavelica Perú. *The Americas* 57: 467-496.
- **Buendia A.M.; Enenkel B.; Koplín R.; Niehaus K.; Arnold W.; Pühler A.** (1991). The *Rhizobium meliloti* *exoZ1 exoB* fragment of megaplasmid 2: *ExoB* functions as a UDP-glucose 4-epimerase and *ExoZ* shows homology to *NodX* of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain TOM. *Mol. Microbiol.* 5: 1519-1530.
- **Carapito C.; Muller D.; Turlin E.** (2006). Identification of genes and proteins involved in the pleiotropic response to arsenic stress in *Caenibacter arsenoxydans*, a metalloresistant proteobacterium with an unsequenced genome. *Biochim.* 88: 595-606.
- **Castiblanco L. y Sundin G.** (2016). New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. *J. Integ. Plant. biology.* 58: 362-372.
- **Chang L.W.; Magos L.; Suzuki T.** (1996). *Toxicology of metals.* CRC, FL 21.
- **Checucci A.; Azzarello E.; Bazzicalupo M.; Galardini M.; Lagomarsino A.; Mancuso S.; Marti L.; Marzano MC.; Mocali S.; Squartini A.; Zanardo M.; Mengoni A.** (2016). Mixed nodule infection in *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa* symbiosis suggest the presence of cheating behavior. *Front Plant Scien* 7: Art.835.
- **Chen E.J.; Sabio E.A.; Long S.R.** (2008). The periplasmic regulator *ExoR* inhibits *ExoS/ChvI* two-component signalling in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* 69: 1290-1303.

- **Chen L.; Dodd I.C.; Theobald J.C.; Belimov A.A.; Davies W.J.** (2013). The rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2, containing ACC deaminase, promotes growth and development of *Arabidopsis thaliana*. *J. Experim. Bot.* 64:1565-1573.
- **Cheng HP., Walker GC.** (1998). Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 180: 5183-5191.
- **Cisari J.; Kolenbrander P.; Mcintire F.** (1979). Specificity of Coaggregation Reactions Between Human Oral *Streptococci* and Strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*. *Infect. Immun.* 24: 742-752.
- **Clarkson T.W.; Magos L.; Myers G.J.** (2003). The toxicology of mercury-current exposures and clinical manifestations. *N. Engl. J. Med.* 349: 1731-1737.
- **Colica G.; Li H.; Rossi F.; Li D.; Liu Y.; De Philippis R.** (2014). Microbial secreted exopolysaccharides affect the hydrological behavior of induced biological soil crusts in desert sandy soils. *S. Biol. Biochem.* 68: 62-70.
- **Comte S.; Guibaud G.; Baudu M.** (2006) Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) resulting from activated sludge according to their type: soluble or bound. *Proc. Biochem.* 41: 815-23.
- **Cooper JE.** (2007). Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J. App. Microbiol.* 103: 1355-1365.
- **Costerton J.W.; Lewandowski Z.; Caldwell D.E.; Korber D.R.; Lappin-Scott H.M.** (1995) Microbial biofilms. *An. Rev. Microbiol.* 49: 711-745.
- **Dalton H.M.; Goodman A.E.; Marshall K.C.** (1996). Diversity in surface colonization behavior in marine bacteria. *J. Ind. Microbiol.* 17: 228-234.
- **Danhorn T.; Fuqua C.** (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *An. Rev. Microbiol.* 61: 401-422.
- **Denarié J.; Debellé F.; Promé J.C.** (1996). Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *An. Rev. Biochem.* 65: 503–535.
- **Denison RF. and Kiers ET.** (2004). Life style alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 237, 187–193.
- **Denton B.** (2007) Advances in phytoremediation of heavy metals using plant growth promoting bacteria and fungi. *Basic Biotechnol.* 3, 1–5.
- **Dimkpa C.; Weinand T.; Asch F.;** (2009). Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant. Cell. Environ.* 32: 1682-1694.

- **Diouf D.; Diop T.A.; Ndoye I.** (2003). Actinorhizal, mycorrhizal and rhizobial symbioses: how much do we know. *Afric. J. Biotechnol.* 2: 1-7.
- **Döbbelaere S.; Croonenborghs A.; Thys A.; Ptaeck D.; Vanderleyden J.; Dutto P.; Labandera-Gonzalez C.; Caballero-Mellado J.; Aguire J.F.; Kapulnik Y.; Bener S.; Burdman S.; Kadouri D.; Sarig S.; Okon Y.** (2001). Response of Agronomically Important Crops to Inoculant with *Azospirillum*, *Aust. J. Plant. Physiol.* 28: 871- 879.
- **Dobbelaere S.; Vanderleyden J.; Okon Y.** (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant. Sci* 22: 107-149.
- **Doherty D.; Leigh J.A.; Glazebrook J.; Walker G.C.** (1988). *Rhizobium meliloti* mutants that overproduce the *R. meliloti* acidic calcofluor-binding exopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 170: 4249-4256
- **Dopp E.; Hartmann L.M.; Florea A.M.; Rettenmier A.W.; Hirner A.V.** (2004). Environmental distribution, analysis, and toxicity of organometal (loid) compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 34: 301-333
- **Downie JA.** (2010). The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS. Microbiol. Rev.* 34: 150-170.
- **Duffus JH** (2002). Heavy metals a meaningless term. *Appl Chem* 74:793–807.
- **Dusha I.; Olah B.; Szegletes Z.; Erdei L.; Kondorosi A.** (1999). *syfM* is involved in the determination of the amount and ratio of the two forms of the acidic exopolysaccharide EPSI in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Plant. Microb. Interact.* 12: 755-765.
- **EPA** Agencia de Protección de Medio ambiente de Estados Unidos.
- **Epstein B.; Abou-Shanab R.; Shamseldin A.; Taylor M.R.; Guhlin J.; Burghardt L.T.; Nelson M.; Sadowsky M.J.; Tiffin P.** (2018). Genome-Wide Association Analyses in the Model Rhizobium *Ensifer meliloti*. *mSphere ASM.* 5: 1-15.
- **Fergusson JE.** (1990) The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects. Pergamon, Oxford.
- **Filoche S.K.; Anderson S.A.; Sissons C.H.** (2004) Biofilm growth of *Lactobacillus* species is promoted by *Actinomyces* species and *Streptococcus* mutants. *Oral. Microbiol. Immun.* 19: 322-326.
- **Finan T.M.; Hartweg E.; Lemieux K.; Bergman K.; Walker G.C.; Signe E.R.** (1984). General Transduction in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 159: 120-124.
- **Finan T.M.; Weidner S.; Wong K.; Buhrmester J.; Chain P.; Vorhölter F.J.; Hernandez-Lucas I.; Becker A.; Cowie A.; Gouzy J.; Golding B.; Pühler A.** (2001). The

complete sequence of the 1683-kb pSymb megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 9889-9894.

- **Fisher R.F. y Long S.R.** (1992). Rhizobium-plant signal exchange. Nat. 357: 655-660.
- **Flemming H.C.** (1993) Biofilms and environmental protection. Wat. Sci. Technol. 27: 1-10.
- **Flemming H.C. y Wingender J.** (2002). Extracellular polymeric substances: Structure, ecological functions, technical relevance. J. enviroment. Microbiol. 3: 1223-1231.
- **Flemming H.C.; Wingender J.** (2010). The biofilm matrix. Nat. Rev. Microbiol.8: 623–633.
- **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.; Vorholter F.J.; Weidner S.; Wells D.H.; Wong K.; Yeh K.C.; Batut J.** (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Sci. 293: 668-672.
- **Gao M.; Chen H.; Eberhard A.; Gronquist M.R.; Robinson J.B.; Rolfe B.G.; Bauer W.D.** (2005). *sinI* and *expR*-dependent *quorum sensing* in *Sinorhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 187: 7931-7944.
- **Gao M.; Coggin A.; Yagnik K.; Teplitski M.** (2012). Role of Specific *Quorum-Sensing* Signals in the Regulation of Exopolysaccharide II Production within *Sinorhizobium meliloti* Spreading Colonies Pl. On. 7: e42611.
- **Gao N.; Kumar A.; Jyot J.; Yu F.** (2010). Flagellin-Induced Corneal Antimicrobial Peptide Production and Wound Repair Involve a Novel NF-κB–Independent and EGFR-Dependent Pathway Pl. On. 5: e9351.
- **Gilbert P.; Das J.; Foley I.** (1997). Biofilms susceptibility to antimicrobials. Adv. Dent. Res. 11: 160-167.
- **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. Enzymol 204: 398-418.

- **Glick BR.** (2004). Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Adv. Appl. Microbiol.* 56: 291-312.
- **Glucksmann M.A.; Reuber T.L.; Walker G.C.** (1993). Family of glycosyl transferases needed for the synthesis of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 175: 7033-7044.
- **Glucksmann M.A.; Reuber T.L.; Walker G.C.** (1993). Genes needed for the modification, polymerization, export, and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: a model for succinoglycan biosynthesis. *J. Bacteriol.* 175: 7045-7055.
- **González J.E.; Reuhs B.L.; Walker G.C.** (1996). Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 8636-8641.
- **González J.E.; Semino C.E.; Wang L.X.; Castellano-Torres L.E.; Walker G.C.** (1998). Biosynthetic control of molecular weight in the polymerization of the octasaccharide subunits of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 13477-13482.
- **González J.E.; York G.M.; Walker G.C.** (1996). *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. *Gen.* 179: 141-146.
- **Goyer R.A.; Clarkson T.W.** (2001). Toxic effects of metals. *Cassarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons.* McGraw-Hill 23: 811–867.
- **Green-Ruiz C.** (2006). Mercury (II) removal from aqueous solutions by nonviable *Bacillus* sp. from a tropical estuary. *Bioresource Technology* 97: 1907–1911.
- **Guibaud G, Tixier N.; Bouju A.; Baudu M.** (2003). Relation between extracellular polymers composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemosp.* 52: 1701–1710.
- **Gusmao Lima A.I.; Cacoilo Corticeiro S.; de Almeida E.M.; Figueira P.** (2006). Glutathione-mediated cadmium sequestration in *Rhizobium leguminosarum*. *Enz and Microb. Technol.* 39: 763–769.
- **Guzzi G.; LaPorta C.A.M.** (2008). Molecular mechanisms triggered by mercury. *Toxic.* 244: 1-12.
- **Ha J.; Gelabert A.; Spormann A.M.; Brown G.E.** (2010). Role of extracellular polymeric substances in metal ion complexation on *Shewanella oneidensis*: batch uptake, thermodynamic modeling, ATR-FTIR, and EXAFS study. *Geoc. Cosmoc.* 74: 1-15.
- **Hamelink J.L.; Landrum P.F.; Bergman H.L y Benson W.H.** (1994). Bioavailability: Physical, Chemical and Biological Interactions. *Lew. Publis. Introduc.* 1-4.

- **Harnett N.M.; Gyles C.L.** (1984). Resistance to drugs and heavy metals, colicin production, and biochemical characteristics of selected bovine and porcine *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 930-945.
- **Hawkins J.P. y Oresnik I.J.** (2017). Characterisation of a gene encoding a membrane protein that affects exopolysaccharide production and intracellular Mg²⁺ concentrations in *Ensifer meliloti*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 364: 1-7.
- **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. *Carboh. Res.* 198: 305-312.
- **Heydorn A.; Nielsen A.T.; Hentzer M.; Sternberg C.; Givskov M.; Ersboll B.K. y Molin S.** (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiol.* 146: 2395-2407.
- **Hoang H.H.; Becker A.; González JE.** (2004). The LuxR homolog ExpR, in combination with the Sin *quorum sensing* system, plays a central role in *Sinorhizobium meliloti* gene expression. *J. Bacteriol.* 186: 5460-5472.
- **Holmes P.; Hames K.A.F.; Levy L.S.** (2009). Is low-level mercury exposure of concern to human health. *Sci. Tot. Environ.* 408:171-182.
- **Hou W.; Ma Z.; Sun L.; Han M.; Lu J.; Li Z.; Mohamad O.A.; Wei G.** (2013). Extracellular polymeric substances from copper-tolerance *Sinorhizobium meliloti* immobilize Cu²⁺. *J. Haz. Mat.* 261: 614-620.
- **Hu Z.Q.; Jin J.; Abruna H.D.; Houston P.L.; Hay A.G.; Ghiorse W.C.; Shulerm M.L.; Hidalgo G.A. y Lion L.W.** (2007). Spatial distributions of copper in microbial biofilms by scanning electrochemical microscopy. *Environ. Sci. Technol.* 41: 936–941.
- **Hughes M.F.** (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* 133: 1-16
- **Ianieva O.D.** (2009). heavy metal resistance mechanisms in bacteria. *J. Microbiol.* 71: 54-65.
- **IARC** Agencia Internacional para la investigación sobre el cáncer.
- **INSHT** Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.
- **Janczarek M.** (2011). Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 7898-7933.
- **Jayaraman D.; Gilroy S. y Ane J.M.** (2014). Staying in touch: mechanical signals in plant-microbe interactions. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 20: 104-109.

- **Ji G.; Silver S.** (1995). Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. *J. Ind. Microbiol.* 14: 61-75.
- **Jiao Y.; Cody G.D.; Harding A.K.; Wilmes P.; Schrenk M.; Wheeler K.E Banfield J.F.; Thelen M.P.** (2010). Characterization of Extracellular Polymeric Substances from Acidophilic Microbial Biofilms Pplied and Environm Microbiol 76: 2916-2922.
- **Joe M.M, Jaleel C.A.; Palanivel Sivakumar P.K.; Zhao C.; Karthikeyan B.** (2009). Co-aggregation in *Azospirillum brasilense* MTCC-125 with other PGPR strains: Effect of physical and chemical factors and stress endurance ability. *J. Taiw. Inst. Chem. Engin.* 40: 491-499.
- **Jofre E.; Becker A.** (2009). Production of succinoglycan polymer in *Sinorhizobium meliloti* is affected by SMb21506 and requires the N-terminal domain of ExoP. *Mol. Plant. Microb. Interact.* 22: 1656-1668.
- **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. Microbiol.* 5: 619-633.
- **Jones K.M.; Sharopova N.; Lohar D.P.; Zhang J.Q.; VandenBosch K.A.; Walker G.C.** (2008). Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 704 –709.
- **Joshi N.; Ngwenya B.T.; French C.E.** (2012). Enhanced resistance to nanoparticle toxicity is conferred by overproduction of extracellular polymeric substances. *J. Hazard. Mater.* 241: 363-370.
- **Joshi RM.; Juwarkar A.A.** (2009). In vivo studies to elucidate the role of extracellular polymeric substances from *Azotobacter* in immobilization of heavy metals. *Environ. Sci. Technol.* 43: 5884-5889.
- **Kabata-Pendia A.** (2010). Trace elements in soils and plants. 3rd edn. CRC.
- **Karthikeyan N.R.; Philip J.; Raj B.** (2008). Effect of clustering on the thermal conductivity of nanofluids. *Mat. Chem. and Phys.* 109: 50–55.
- **Karthikeyan S.; Balasubramanian R.; Iyer C.S.P.** (2007). Evaluation of the marine algae *Ulva fasciata* and *Sargassum* sp. for the biosorption of Cu (II) from aqueous solutions. *Biores. Techn.* 98: 452-455.
- **Kawaharada Y.; Kelly S.; Nielsen M.W.; Hjuler C.T.; Gysel K.; Muszynski A.; Carlson R.W.; Thygesen M.B.; Sandal N.; Asmussen M.H.; Vinther M.; Andersen S.U; Krusell L.; Thirup S.; Jensen K.J.; Ronson C.W.; Blaise M.; Radutoiu S.; Stougaard J.** (2015).

Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nat.* 523:308–312.

- **Klausen M.; Gjermansen M.; Kreft J.U.; Tolker-Nielsen T.** (2006). Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: Examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS. Microbiol. Lett.* 261: 1-11.
- **Kolenbrander P.E.; Parrish K.D.; Andersen R.N.; Greenberg E.P.** (1995). Intergeneric coaggregation of oral *Treponema* spp. with *Fusobacterium* spp. and intrageneric coaggregation among *Fusobacterium* spp. *Infect. Immun.* 63: 4584–4588.
- **Kolter R. y Losick R.** (1998). One for all and all for one. *Sci.* 280: 226-227.
- **Korber D.R., Lawrence J.R., Lappin-Scott H.M.; Costerton J.W.** (1995). Growth of microorganisms on surfaces. *Microbial Biofilms*, Camb. Univ. Press. 1: 15-45.
- **Legendijk E.L.; Validov S.; Lamers G.E.M.; de Weert S.; Bloemberg G.V.** (2010). Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization in vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies. *FEMS. Microb. Lett.* 305: 81–90.
- **Lapidou C.S y Rittman, B.E.** (2002). A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Wat. Res.* 36: 2711-2720.
- **Laus M.C., Logman T.J.; Lamers G.E.; Van Brussel A.A.N.; Carlson R.W.; Kijne J.W.** (2006). A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Mol. Microb.* 59: 1704-1713.
- **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 Ecol* 66: 630–636.
- **Leeman M.; Van Pelt J.A.; Den Ouden F.M.; heinsbroek M.; Bakker P.A; Schippers M.** (1995). Induction of Systemic resistance Against Fusarium Wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Dis. Cont. Pest. Manag.* 85: 1021-1027.
- **Li X.Y. y Yang S.F.** (2007). Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge. *Wat. Res.* 41: 1022-1030.
- **Li Z.F.; Ma Z.Q.; Hao X.L.; Rensing C.; Wei G.H.** (2014). Genes conferring copper resistance in *Sinorhizobium meliloti* CCNWSX0020 also promote the growth of *Medicago lupulina* in copper contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 1961–1971.

- **Liu Y. y Fang H.H.P.** (2003). Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge. *Cri. Rev. Environ. Sci. Technol.* 33: 237–273.
- **Llamas I.; Amjres H.; Mata J.A.; Quesada E.; Bejar V.** (2012). The potential biotechnological applications of the exopolysaccharide produced by halophilic bacterium *Halomonas almeriensis*. *Mol.* 17: 7103-7120.
- **Lodwig E.M.; Hosie A.H.; Bourdès 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.* 422:722-726.
- **Long S.; Reed J.W.; Himawan J.; Walker G.C.** (1988) Genetic analysis of a cluster of genes required for synthesis of the calcofluor-binding exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *J. Bact.* 170: 4239-4248.
- **López-Baena F.J.; Ruiz-Sainz J.E.; Rodríguez-Carvajal M.A.; Vinardell J.M.** (2016). Bacterial Molecular Signals in the *Sinorhizobium fredii*-Soybean Symbiosis. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 1-22.
- **Luptakova A. y Kusnierova M.** (2005). Bioremediation of acid mine drainage contaminated. *SRB. Hydromet.* 77: 97–102.
- **Madhuri K.V. y Prabhakar K.V.** (2014). Microbial exopolysaccharides: biosynthesis and potential applications. *Orient. J. Chem.* 30: 1401–1410.
- **Mahapatra S. y Banerjee D.** (2013). Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications. *Microbiol. Insig.* 6: 1–16.
- **Marchal M.; Briandet R.; Halter D.; Koechler, S.; DuBow M.S.; Lett M.C.; Bertin P.N.** (2011). Subinhibitory arsenite concentrations lead to population dispersal in *Thiomonas* sp. *Pl. On.* 6: 1-8.
- **Marchal M.; Briandet R.; Koechler S.; Kammerer B.; Bertin P.N.** (2010). Effect of arsenite on swimming motility delays surface colonization in *Herminiimonas arsenicoxydans*. *Microb.* 156: 2336–2342.
- **Marketon M.M. y Gonzalez J.E.** (2003). Identification of two *quorum sensing* systems in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bact.* 184: 3466–3475.
- **Marketon M.M.; Glenn S.A.; Eberhard A.; González J.E.** (2003). *Quorum Sensing* Controls Exopolysaccharide Production in *Sinorhizobium meliloti*, *J Bact.* 185: 325–331.
- **Maroti G.; Downie JA. y Kondorosi E.** (2015). Plant cysteine-rich peptides that inhibit pathogen growth and control rhizobial differentiation in legume nodules. *Curr Opin Plant Biol* 26, 57– 63.

- **Marshall K.C.; Stout R.; Mitchell R.** (1971). Mechanisms of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J. Gen. Microbiol.* 68: 337-348.
- **Martinez-Hidalgo P. y Hirsch A.M.** (2017). The nodule microbiome: N₂-fixing rhizobia do not live alone. *Phytob.* 1: 70-82.
- **Mayer C.; Moritz R.; Kirschner C.; Borchard W.** (1999). The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int. J. Biol. Macromol.* 26: 3-16.
- **McEntee J.D.; Woodrow J.R.; Quirk A.V.** (1986). Investigation of cadmium resistance in *Alcaligenes* sp. *Appl. Environ. Microb.* 51: 515-520.
- **Medot D.; Rivero R.; Cendoya E.; Contreras Moreira B.; Rossi F.; Fisher S.; Becker A.; Jofré E.** (2016). *Sinorhizobium meliloti* low molecular mass phosphotyrosine phosphatase SMC02309 modifies activity of the UDP-glucose pyrophosphorylase ExoN involved succinoglycan biosynthesis. *Microb. Res.* 162: 552-563.
- **Mendis H.C, Madzima T.F.; Queiroux C.; Jones K.M.** (2016). Function of Succinoglycan Polysaccharide in *Sinorhizobium meliloti* Host Plant Invasion Depends on Succinylation, *mBio.* 7: 1-11.
- **Mendrygal K.E. y González J.E.** (2000). Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bact.* 182: 599-606.
- **Mergeay M.** (1991). Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance. *Tren. Biotec.* 9: 17-24.
- **Mikkelsen L.H. y Nielsen P.H** (2001). Quantification of the bond energy of bacteria attached to activated sludge floc surfaces. *Wat. Sci. Technol.* 43: 67–75.
- **Moreira L.M.; Becker J.D.; Pühler A.; Becker A.** (2000). The *Sinorhizobium meliloti* ExpE1 protein secreted by a type I secretion system involving ExpD1 and ExpD2 is required for biosynthesis or secretion of the exopolysaccharide galactoglucan. *Microb.* 136: 2237-2248.
- **Müller D.; Médigue C.; Koechler S.** (2007). A tale of two oxidation states: Bacterial colonization of arsenic-rich environments. *PI Genet.*3: 53.
- **Müller P.; Hynes M.; Kapp D.; Niehaus K.; Pühler A.** (1988). Two classes of *Rhizobium meliloti* infection mutants differ in exopolysaccharide production and in coinoculation properties with nodulation mutants. *Mol. Gen. Genet.* 211: 17-26.
- **Müller P.; Keller M.; Weng W.M.; Quandt J.; Arnold W.; Pühler A** (1993). Genetic analysis of the *Rhizobium meliloti* *exoYFQ* operon: ExoY is homologous to sugar

transferases and ExoQ represents a transmembrane protein. *Mol. Plant Microb Interact.* 6: 55–65.

- **Murata K.; Fukuda Y.; Shimosaka M.; Wantanabe K.; Saikusa T.; Kimura A.** (1985). Phenotypic character of methylglyoxal resistance gene in *Saccharomyces cerevisiae*: expression in *Escherichia coli* and application to breeding wild-type yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1200-1207.
- **Murphy R.J. y Levy J.F.** (1983). Production of copper oxalate by some copper tolerant fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 81: 165-168.
- **Nakahara H.; Ishikawa T.; Yasunaga S.; Kondo I.; Kozukue H.; Silver S.** (1977). Linkage of mercury, cadmium, and arsenate and drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 975-976.
- **Nielsen P.H. y Jahn A.** (1999). Extraction of EPS. *Microb Extracell Polym Substanc.* Charper 3:49-72.
- **Nies D.H. y Silver S.** (1995). Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Ind. Microbiol.* 14: 189-199.
- **Nievas F.; Bogino P.; Sorroche F.; Giordano W.** (2012). Detection, Characterization, and Biological Effect of Quorum-Sensing Signaling Molecules in Peanut-Nodulating Bradyrhizobia. *J.sens.* 12: 2851-2873.
- **Nikitina VE.; Ponomareva EG.; Alen'kina SA.; Konnova SA.** (2001). The Role of Cell-Surface Lectins in the Aggregation of Azospirilla. *J. Microb.* 70: 408–412.
- **Nocelli N.; Bogino P.C.; Banchio E.; Giordano W.** (2016). Roles of Extracellular Polysaccharides and Biofilm Formation in Heavy Metal Resistance of Rhizobia. *Mater.* 9: 418.
- **Norberg P.; Bergström M.; Hermansson M.** (2014). Complete nucleotide sequence and analysis of two conjugative broad host range plasmids from a marine microbial biofilm. *PL On.* 9: e92321.
- **NRCC.** (1978). Effects of arsenic in the environment. National Research Council of Canada, Ot. 1–349.
- **Nriagu J.O.** (1989). A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nat.* 338: 47–49.
- **Nwodo U.U.; E. Green E.; Okoh A.I.** (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects, *Int. J. Mol. Sci.* 13:14002–14015.
- **O'Toole G.A. y Kolter R.** (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30: 295-304.

- **Oda M.; Lasegawa H.; Komatsu S.; Kambe M.; Tsuchiya F.** (1983). Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus* spp, Agric. Biol. Chem. 47: 1623–1625.
- **Oldroyd G.D.E.** (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants Nat. Rev. Microbiol. 11: 252–263.
- **Oldroyd G.E. y Downie J.A.** (2006). Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signaling. Curr. Op. in Plant Biol. 9: 351-357.
- **OMS.** Organización Mundial de la Salud 2012.
- **Ortiz-Castro R.; Díaz-Pérez C.; Martínez-Trujillo M.; del Río R.E.; Campos-García J.; Lopez-Bucio J.** (2011). Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. 108: 7253-7258.
- **Ortiz-Castro R.; Valencia-Cantero E.; López-Bucio J.** (2008). Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. Plants Signal Behav 3: 263-265.
- **OSHA** Agencia de Protección del Medio Ambiente.
- **Osteras M.; Stanley J.; Finan T.M.** (1995). Identification of *Rhizobium*-specific intergenic mosaic elements within an essential two-component regulatory system of *Rhizobium* species. J. Bacteriol. 177: 5485–5494.
- **Patel A. y Prajapati J.B.** (2013). Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, Adv. Diar. Res. 1: 1–7.
- **Patlolla A.; Barnes C.; Field J.; Hackett D.; Tchounwou P.B.** (2009). Potassium dichromate-induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells. Int J. Environ. Res. Public. 6: 643–653.
- **Patlolla A.; Barnes C.; Yedjou C.; Velma V.; Tchounwou P.B.** (2009) Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in Sprague Dawley rats. Environ. Toxicol. 24: 66–73.
- **Paul D.; Poddar S.; Sar, P.** (2014). Characterization of arsenite-oxidizing bacteria isolated from arsenic-contaminated groundwater of West Bengal. J. Environ. Sci. Heal. 49: 1481–1492.
- **Peck M.C.; Fisher R.F.; Long S.R.** (2006). Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 188: 5417-5427.
- **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. Bacteriol. 184: 5067-5076.

- **Perez Mendoza D.; Rodriguez Carabajal A.; Romero-Jimenez L.; de Araujo Farias G.; Lloret J.; Gallegos T.; San Juan J.** (2015). Novel mixed-linkage beta glucan activated by c-di-GMP in *Sinorhizobium meliloti*. PNAS. 757-765
- **Pérez-Mendoza D.; Sanjuán J.** (2016). Exploiting the commons: cyclic diguanylate regulation of bacterial exopolysaccharide production. Current. Op. Microbiol. 30: 36-43
- **Pinto E.; Sigaud-Kutner T.C.S.; Leitao M.A.S.; Okamoto O.K.; Morse D.; Colepicolo P.** (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. J. Phycol. 39: 1008–1018.
- **Poli A.; Di Donato P.; Abbamondi G.R.; Nicolaus B.** (2011). Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by Archea. Hind.Publ. Corp. Archea. 1–13.
- **Poupin M.J.; Timmermann T.; Vega A.; Zuñiga A.; González B.** (2013). Effects of the Plant Growth-Promoting Bacterium Burkholderia phytofirmans PsJN throughout the Life Cycle of Arabidopsis thaliana Pl. On. 8: e69435.
- **Quester I. y Becker A.** (2004). Four promoters subject to regulation by ExoR and PhoB direct transcription of the *Sinorhizobium meliloti* *exoYFQ* operon involved in the biosynthesis of succinoglycan. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 7: 115–132.
- **Raimunda D. y Elso-Berberián G.** (2014). Functional characterization of the CDF transporter SMC02724 (SmYiiP) in *Sinorhizobium meliloti*: Roles in manganese homeostasis and nodulation. Biochim. Biophys. 1838: 3203–3211.
- **Raliya J.; Tarafdarb J.; Mahawar H.; Kumar R.; Gupta P.M; Mathur T.; Kaul R.; Kumar P.; Kalia A.; GautamR.; Singh S.; Gehlot R.** (2014). ZnO nanoparticles induced exopolysaccharide production by *B. subtilis* strain JCT1 for arid soil applications. International J. Biol. Macromol. 64: 362–368.
- **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 symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* Rm1021. J. Bacteriol. 176: 1997-2002.
- **Reuber T.L. y Walker G.C.** (1993). Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. Cell. 74: 269-280.
- **Reyes Y.C.; Vergara I.; Torres O.E.; Díaz M.; Edgar E.; González E.** (2016). Heavy metals contamination: implications for health and food safety. Rev. Ing. Inv. y Des. 16: 66-77.
- **Rickard A.H, McBain A.J.; Ledder R.G.; Handley P.; Gilbert P.** (2003). Coaggregation between freshwater bacteria within biofilm and planktonic communities Microbiol. Lett. 220: 133- 140.

- **Rinaudi L.V. y Giordano W.** (2010). An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *Microbiol Lett* 304:1-11.
- **Rinaudi L.V. y Gonzalez J.E.** (2009). The low-molecular-weight fraction of exopolysaccharide II from *Sinorhizobium meliloti* is a crucial determinant of biofilm formation. *J. Bacteriol.* 191:7216-7224.
- **Rinaudi L.V.; Fujishige N.A.; Hirsch 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.
- **Rouch D.A.; Lee, B.T.D.; Morby, A.P.** (1995). Understanding cellular responses to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial metal resistance. *J. Ind. Microbiol.* 14: 132-141.
- **Rousselot P.; Laboume S.; Marolleau JP.; Larghero T.; Noguera M.L.; Brouet J.C.; Femand J.P.** (1999). Arsenic trioxide and melarsoprol induce apoptosis in plasma cell lines and in plasmacells from myeloma patients. *Cancer Res.* 59:1041–1048.
- **Rüberg S.; Pühler A.; Becker A.** (1999) Biosynthesis of the exopolysaccharide galactoglucan in *Sinorhizobium meliloti* is subject to a complex control by the phosphate-dependent regulator PhoB and the proteins ExpG and MucR. *Microbiol.* 145: 603–611.
- **Russo A.; Vettori L.; Felici C.; Fiaschi G.; Morini S.; Toffanin A.** (2008). Enhanced micropropagation response and biocontrol effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 on *Prunus cerasifera* L. clone Mr.S 2/5 plants. *J. Biotech.* 134: 312–319.
- **Sadasivan L y Neyra C.A.** (1985). Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: Exopolysaccharides and Cyst Formation *J. Bacteriol.* 716-723.
- **Sambrook J.; Fritsch E.F.; Maniatis F.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Lab., New York.
- **Sanfeliu C.; Sebastia J.; Cristofol R.; Rodriquez-Farre E.** (2003). Neurotoxicity of organomercurial compounds. *Neurot. Res.* 5:283–305.
- **Sarkar B.A.** (2005). Mercury in the environment: effects on health and reproduction. *Rev Environ Health* 20:39-56.
- **Sauer K.; Camper A.K.; Ehrlich G.D.; Costerton J.W.; Davies D.G.** (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184: 1140-54.
- **Schmeisser C.; Liesegang H.; Krysciak D.; Bakkou N.; Le Quéré A.; Wollherr A.; Heinemeyer I.; Morgenstern B.; Pommerening-Röser A.; Flores M.; Palacios R.; Brenner S.; Gottschalk G.; Schmitz R.A.; Broughton W.J.; Perret X.; Strittmatter**

- A.W.; Streit W.R.**(2009). *Rhizobium* sp. Strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. Appl. Environ Microbiol. 75: 4035-4045.
- **Schneiker S.; Keller M.; Dröge M.; Lanka E.; Pühler A.; Selbitschka W.** (2001). The genetic organization and evolution of the broad host range mercury resistance plasmid pSB102 isolated from a microbial population residing in the rhizosphere of alfalfa. Nucleic Acids Res. 29: 5169–5181.
 - **Schwarz S.T. y Hobel H.** (1989). Plasmid and resistance to anti-microbial agents and heavy metals in *Staphylococcus hyicus* from pigs and cattle. J. Vet. Med. 36: 669-673.
 - **Scott J.A. y Palmer S.J.** (1988). Cadmium bio-sorption by bacterial exopolysaccharide. Biotechnol. Lett. 10: 21-24.
 - **Sheng G.; Yu H.; Li X.** (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems. Biotech. Adv. 28: 882-894.
 - **Sheng G.P.; Yu H.Q.; Li X.Y.** (2006a). Stability of sludge flocs under shear conditions: roles of extracellular polymeric substances (EPS). Biotech. Bioeng. 93: 1095–102.
 - **Silver S. y Misra T.** (1988). Plasmid-mediated Heavy Metal Resistances. Ann. Rev. Microbiol. 42: 717-43.
 - **Silver S. y Phung L.T.** (1996). Bacterial heavy metal resistance: new surprises. Ann. Rev. Microbiol. 50: 753-789.
 - **Silver S., Nucifors G., Chu L. y Misra T.K.** (1989). Bacterial resistance ATPases: Primary pumps for exporting toxic cations and anions. Trend. Biochem. Sci. 14: 76-80.
 - **Simoes C.V.; Simoes M.; Vieira M.J.** (2007). “Intergeneric Coaggregation among Drinking Water Bacteria: Evidence of a Role for *Acinetobacter calcoaceticus* as a Bridging Bacterium”. AEM 74: 1259-1263.
 - **Simões L.C.; Simões M.; Vieira M.J.** (2011). The effects of metabolite molecules produced by drinking water-isolated bacteria on their single and multispecies biofilms. Biof. 27:685–699.
 - **Singh R.; Debarati P.; Rakesh K.J.** (2006) Biofilms: Implications in bioremediation. Trend. Microbiol. 14: 389–397.
 - **Sirajunnisa A.R.; Vijayagopal V.; Sivaprakash B.; Viruthagiri T.; Surendhiran D.** (2016). Optimization, kinetics and antioxidant activity of exopolysaccharide produced from rhizosphere isolate, *Pseudomonas fluorescens* CrN6. Carboh. Polym. 135:35–43.
 - **Skorupska A.; Janczarek M.; Marczak M.; Mazur A.; Król J.** (2006). Rhizobial exopolysaccharides: Genetic control and symbiotic functions. Microb. Cel. 5: 1-19

- **Slaveykova V.; Parthasarathy N.; Dedieu K.; Toescher D.** (2010). Role of extracellular compounds in Cd-sequestration relative to Cd uptake by bacterium *Sinorhizobium meliloti* *Env. Pollut.* 158: 2561-2565
- **Somasegaran, P. y Hoben H.J.** (1994) for Rhizobia. *Methods in Legume-Rhizobium Technology*; Springer-Verlag Inc.: New York, USA.
- **Sorroche F.; Bogino P.; Russo D.M.; Zorreguieta A.; Nievas F.; Morales G.M.; Hirsch A.M.; Giordano W.** (2018). Cell autoaggregation, biofilm formation, and plant attachment in a *Sinorhizobium meliloti* *lpsB* mutant. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31: 1075-1082.
- **Sorroche F.; Rinaudi L.; Zorreguieta A.; Giordano W.** (2010). EPS II dependent autoaggregation of *Sinorhizobium meliloti* planktonic cells. *Curr. Microbiol.* 61:465–470.
- **Sorroche F.; Specia M.; Zorreguieta A.; Giordano W.** (2012). A positive correlation between bacterial autoaggregation and biofilm formation in native *Sinorhizobium meliloti* isolates from Argentina. *Ap. Env. Microb.* 78: 4092–4101.
- **Spaink H.P.** (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 54: 257-288.
- **Spaink H.P. y Lugtenberg B.J.** (1994). Role of rhizobial lipo-chitin oligosaccharide signal molecules in root nodule organogenesis. *Plant Mol Biol* 26:1413–1422.
- **Stanley N.R. y Lazazzera B.A.** (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol* 52: 917-924.
- **Stewart P.S. y Costerton J.W.** (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms *Lancet* ; 358: 135–138.
- **Stoodley P.; Dodds I.; Boyle J.D.; Lappin-Scott, H.M.** (1999). Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J. Appl. Microbiol.* 85: 19-28.
- **Stoodley P.; Sauer, K.; Davies, D.G.; Costerton, J.W.** (2002). Biofilm as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 187-209.
- **Summers, M.L.; Elkins, J.G.; Elliot, B.A.; McDermott, T.R.** (1999). Expression and regulation of phosphate stress inducible genes in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Plant. Microb. Interact.*, 11:1094–1101.
- **Sutherland I.W.** (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microb.* 147: 3-9.
- **Sutton D.; Tchounwou P.B.; Ninashvili N.; Shen E.** (2002). Mercury induces cytotoxicity, and transcriptionally activates stress genes in human liver carcinoma cells. *Int. J. Mol. Sci.* 3:965–984.

- **Sutton D.J.; Tchounwou P.B.** (2007). Mercury induces the externalization of phosphatidylserine in human proximal tubule (HK-2) cells. *Int J Environ Res Public Health* 4:138–144 system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1938–1946.
- **Szewczuk-Karpisz K. y Wiśniewska M.** (2018) Flocculation efficiency of the *Sinorhizobium meliloti* 1021 exopolysaccharide relative to mineral oxide suspensions, A preliminary study for wastewater treatment. *Sep. Purif. Tec.* 201: 51–59.
- **Tarafdar J.C.; Agrawal A.; Raliya R.; Kumar P.; Burman U.; Kau R.K.** (2012). ZnO Nanoparticles Induced Synthesis of Polysaccharides and Phosphatases by *Aspergillus* Fungi. *Adv. Sci.Eng. Med.* 4:324–328.
- **Tchounwou P.B. y Centeno J.A.** (2008). Toxicologic pathology. Handbook of pre-clinical development. Wiley, New York. 551–580.
- **Tchounwou P.B.; Ayensu W.K.; Ninashvilli N.; Sutton D.** (2003). Environmental exposures to mercury and its toxicopathologic implications for public health. *Environ. Toxicol.* 18:149–175.
- **Tchounwou P.B.; Centeno J.A.; Patlolla A.K.** (2004). Arsenic toxicity, mutagenesis and carcinogénesis a health risk assessment and management approach. *Mol. Cel. Biochem.* 255:47–55.
- **Tchounwou P.B.; Ishaque A.; Schneider J.** (2001). Cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells (HepG2) exposed to cadmium chloride. *Mol. Cel. Biochem.* 222:21–28.
- **Tchounwou P.B.; Wilson B.; Ishaque A.** (1999) Important considerations in the development of public health advisories for arsenic and arsenic-containing compounds in drinking water. *Rev. Environ. Health.* 14:211–229.
- **Tolker-Nielson T.; Brinch U.C.; Ragas P.C.; Andersen J.B.; Jacobsen C.S.; Molin, S.** (2000). Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J. Bacteriol.* 182: 6482-6489.
- **Toner B.; Manceau A.; Marcus M.A.; Millet D.B.; Sposito G.** (2005). Zinc sorption by a bacterial biofilm. *Env. Sci. Technol.* 39:8288–8294.
- **Udvardi M. y Poole P.S.** (2013). Transport and metabolism in legumerhizobia symbioses. *An. Rev. Plant. Biol.* 64:781– 805.
- **UNEP:** Programa Medio Ambiebtal de las Naciones Unidas
- **Unión Europea.** (2016). Contenidos máximos en metales pesados en productos alimenticios. Recuperado de: <http://plaguicidas.comercio.es/Metal-Pesa.pdf>

- **Urzainqui A. y Walker G.C.** (1992). Exogenous suppression of the symbiotic deficiencies of *Rhizobium meliloti* exo mutants. *J. Bacteriol.* 174: 3403-3406.
- **Van Loon L.C.** (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant. Pathol.* 119: 243-254.
- **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 WCS417r. *Phytop.* 81:728-734.
- **Verkleji J.A.S.** (1993). The effects of heavy metals stress on higher plants and their use as bio monitors. 1993. In P. C. Nagajyoti, K. D. Lee, T. V. M. Srekanth (Eds.), *Heavy metals, occurrence and toxicity for plants.* *Env. Chem. Let.* 8:199–216.
- **Vessey J.K.** (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Pl. Soil* 255: 571-586.
- **Von Canstein H.; Li Y.; Leonhauser J.; Haase E.; Felske A.; Deckwer W.D.; Wagner-Döbler I.** (2002). Spatially oscillating activity and microbial succession of mercury-reducing biofilms in a technical-scale bioremediation system. *Ap Env. Microb.* 68:1938-1946.
- **Vu B.; Chen M.; Crawford R.J.; Ivanova E.P.** (2009) Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Mol.* 14: 2535–2554.
- **Wagner-dobler I.; Lünsdorf H.; Lübbehü T.; Von Canstein H.; Li Y.** (2000). Structure and Species Composition of Mercury-Reducing Biofilms. . *Ap Env. Microb.* 66:4559–4563.
- **Wang K.; Conn K.; Lazarovits G.** (2006) Involvement of quinolinate phosphoribosyl transferase in promotion of potato growth by a Burkholderia strain. *Appl Env. Microbiol.* 72: 760-768.
- **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. Bacteriol.* 181:6788-6796.
- **Wang S. y Shi X.** (2001). Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Mol. Cell Biochem.* 222:3–9.
- **Weiss S.; Carapito C.; Cleiss J.; Koechler S.; Turlin E.; Coppee J.Y.; Heymann M.; Kugler V.; Stauffert M.; Cruveiller S.; Médigue C.; Dorsselaer A.; Bertin P.N.; Arsène-Plöetze F.** (2009). Enhanced structural and functional genome elucidation of the arsenite-oxidizing strain *Herminiimonas arsenicoxydans* by proteomics data. *Bioch.* 91:192–203.
- **Wells D.H.; Chen E.J.; Fisher R.F.; Long S.R.** (2007). ExoR is genetically coupled to the ExoS-ChvI two-component system and located in the periplasm of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Microbiol.* 64:647– 664.

- **Werning M.L.; Notararigo S.; Náchér M.; de Palencia P.F.; R. Aznar R.; P. López P.** (2012) Biosynthesis, purification and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Food Additive.
- **WHO/FAO/IAEA** (1996) Trace elements in human nutrition and health. World Health Organization, Geneva.
- **Wingender J.; Neu, T.; Flemming, H.C.** (1999). En: Microbial Extracellular Polymeric Substances, Heid. 1-19.
- www.cebitec.uni-bielefeld.de/CeBiTec/rhizogate/symbioses.
- **Xavier J.B. y Foster K.R.** (2007). Cooperation and conflict in microbial biofilms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104: 876-881.
- **Xie P.; Hao X.; Herzberg M.; Luo Y.; Nies D.H.; Wei, G.** (2015). Genomic analyses of metal resistance genes in three plant growth promoting bacteria of legume plants in Northwest mine tailings, China. J. Environ. Sci. 27:179–187.
- **Yang H.C. y Rosen, B.P.** (2016). New mechanisms of bacterial arsenic resistance. J. Biomed. 39: 5-13.
- **Yang H.C.; Cheng J.; Finan T.M.; Rosen B.P.; Bhattacharjee, H.** (2005). Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 187: 6991–6997.
- **Yao S.Y.; Luo L.; Har K.J.; Becker A.; Rüberg S.; Yu G.Q.; Zhu J.B.; Cheng H.P.** (2004). *Sinorhizobium meliloti* ExoR and ExoS proteins regulate both succinoglycan and flagellum production. J. Bacteriol. 186:6042–6049.
- **Ye J.; Yang H.C.; Rosen B.P.; Bhattacharjee H.** (2007). Crystal structure of the flavoprotein ArsH from *Sinorhizobium meliloti*. FEBS Lett. 581: 3996–4000.
- **Yedjou C.G. y Tchounwou P.B.** (2007). In-vitro cytotoxic and genotoxic effects of arsenic trioxide on human leukemia (HL-60) cells using the MTT and alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assays. Mol. Cel. Bioch. 301:123-130.
- **Yilmaz A.B.** (2003). Levels of heavy metals (Fe, Cu, Ni, Cr, Pb, and Zn) in tissue of Mugil cephalus and Trachurus mediterraneus from Iskenderun Bay. Env. Res. 92:277–281.
- **York G.M. y Walker G.C.** (1997). The *Rhizobium meliloti* exoK gene and prsD/prsE/exsH genes are components of independent degradative pathways which contribute to production of low-molecular-weight succinoglycan. Mol. Microbiol. 25:117-134.
- **Yoshida S.; Ogawa N.; Fujii T.; Tsushima S.** (2009). Enhanced biofilm formation and 3-chlorobenzoatedegrading activity by the bacterial consortium of Burkholderia sp. NK8 and Pseudomonas aeruginosa PAO1. J. Ap. Microbiol.106:790–800.

- **Zahir F.; Rizzi S.J.; Haq S.K.; Khan R.H.** (2005). Low dose mercury toxicity and human health. *Env. Toxic. Pharmac.* 20:351–360.
- **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.
- **Zhou E.; Lib H.; Yangb C.; Wanga J.; Xua D.; Zhangc D.; Gud T.** (2018). Accelerated corrosion of 2304 duplex stainless steel by marine *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Biodet. Biodeg.* 127:1–9.