



UNIVERSIDAD NACIONAL  
*de* MAR DEL PLATA  
.....

**Facultad Ciencias Exactas y Naturales**

**Formación de biopelícula por *Azospirillum  
brasiliense*: regulación por óxido nítrico y  
auxinas, e interacción con *Pseudomonas  
protegens*.**

**Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias,  
Área Biología**

**2017**

***Licenciada:* Florencia Salcedo**

***Directora:* Dra. Cecilia Creus**

***Co-director:* Dr. Lorenzo Lamattina**

## **Agradecimientos**

Quisiera expresar mi profundo agradecimiento a todos aquellos que de alguna u otra manera aportaron a la realización de esta Tesis;

A Cecilia por todo el aprendizaje, la confianza y la paciencia.

A Lorenzo por sus valiosos aportes.

A todos mis compañeros de laboratorio: Silvia Alicia, Mabel, Alejandra, Guille, Luciana, Melina, Cintia, Andrés y Paula. Gracias por sus aportes y discusiones, por los mates, las risas y por el aguante.

Al laboratorio de Biotecnología y todos sus integrantes por su colaboración para la realización de esta tesis.

A “los chicos del cole” por hacer los viajes más divertidos.

A mi familia.

A Miguel y Nicolasa.

A mis amigos todos.

A la Universidad Nacional de Mar del Plata, a INTA-Balcarce y al CONICET por haber posibilitado el desarrollo de esta tesis.

***Para Anika, Lucía y Emma,***

***junto a ellas lo cotidiano se vuelve mágico...***

## Índice de contenidos

<b>Resumen</b> .....	1
Glosario de abreviaturas .....	5
<b>Introducción general</b> .....	7
1. La rizósfera y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal .....	8
2. El género <i>Azospirillum</i> .....	9
2.1. Mecanismos de acción de <i>Azospirillum</i> en la promoción del crecimiento vegetal...	10
2.2. Interacción de <i>Azospirillum</i> con las plantas.....	11
2.3. Interacción de <i>Azospirillum</i> con otros microorganismos de la rizósfera.....	12
3. Formación de biopelícula.....	13
3.1. Formación de biopelícula frente a condiciones de estrés .....	14
<b>Planteo del problema</b> .....	15
<b>Hipótesis de trabajo</b> .....	16
<b>Capítulo 1: Análisis de la formación de biopelícula en <i>A. brasilense</i> y su regulación por óxido nítrico y auxinas</b> .....	17
Introducción y objetivos .....	18
Materiales y Métodos.....	27
Resultados .....	34
Discusión.....	53
<b>Capítulo 2: Formación de biopelícula por <i>A. brasilense</i> en condiciones de estrés salino, participación del óxido nítrico y auxinas</b> .....	63
Introducción y objetivos .....	64
Materiales y métodos.....	68
Resultados .....	70
Discusión.....	75
<b>Capítulo 3: Estudio de la interacción entre <i>A. brasilense</i> y <i>P. protegens</i> en la formación de biopelícula mixta</b> .....	80
Introducción y Objetivos .....	81
Materiales y métodos.....	87

Resultados .....	93
Discusión.....	106
<b>Conclusiones generales, aportes y perspectivas .....</b>	<b>114</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>121</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>127</b>

## Índice de Figuras y Tablas

### Capítulo 1

<b>Figura 1.1:</b> Formación de biopelícula de acuerdo al modelo de desarrollo .....	19
<b>Figura 1.2:</b> Información general de las diferentes vías para sintetizar AIA en bacteria.....	24
<b>Figura 1.3:</b> Crecimiento estático de <i>A. brasilense</i> Sp245, Faj009 y Faj164.....	35
<b>Figura 1.4:</b> Unidades formadoras de colonias de <i>A. brasilense</i> a los 2, 5 y 11 días de crecimiento estático .....	35
<b>Figura 1.5:</b> Formación de biopelícula en <i>A. brasilense</i> Sp245 y mutantes isogénicas Faj009 y Faj164 .....	36
<b>Figura 1.6:</b> Concentración de auxinas en la biopelícula de <i>A. brasilense</i> Sp245, Faj009 y Faj164 .....	37
<b>Figura 1.7:</b> Crecimiento estático, formación de biopelícula y contenido de AIA en Sp245 y sus mutantes Faj009 y Faj164 en medio Nfb amonio .....	40
<b>Figura 1.8:</b> Efecto del agregado exógeno de SNP y AIA sobre la formación de biopelícula en <i>A. brasilense</i> .....	41
<b>Figura 1.9:</b> Efecto del agregado exógeno de SNP y AIA sobre la formación de biopelícula de <i>A. brasilense</i> .....	43
<b>Figura 1.10:</b> Efecto del agregado exógeno de SNP y AIA sobre la producción de nitrito en <i>A. brasilense</i> .....	45
<b>Figura 1.11:</b> Producción de NO por <i>A. brasilense</i> Sp245 y Faj009 cuantificada fluorométricamente .....	46

<b>Figura 1.12:</b> Efecto del agregado de SNP sobre el contenido de AIA en las biopelícula.....	47
<b>Figura 1.13:</b> Efecto del agregado de cPTIO sobre la regulación de <i>ppdC egfp</i> .....	48
<b>Figura 1.14:</b> Efecto del agregado de AIA sobre la expresión de genes involucrados en el metabolismo del NO en <i>A. brasilense</i> .....	49
<b>Figura 1.15:</b> Efecto del agregado de auxina exógena sobre la biopelícula madura .....	50
<b>Figura 1.16:</b> Formación de biopelículas sobre raíces de plántulas de tomate .....	51
<b>Tabla 1.1:</b> Producción de nitrito en la biopelícula de <i>A. brasilense</i> .....	38

## Capítulo 2

<b>Figura 2.1:</b> Crecimiento de <i>A. brasilense</i> en distintas concentraciones de NaCl .....	69
<b>Figura 2.2:</b> Crecimiento estático y formación de biopelícula de <i>A. brasilense</i> en condiciones de salinidad.....	70
<b>Figura 2.3:</b> Producción de nitrito en la biopelícula de <i>A. brasilense</i> en condiciones de salinidad.....	71
<b>Figura 2.4:</b> Concentración de auxinas en la biopelícula de <i>A. brasilense</i> Sp245, Faj009 y Faj164 en condiciones de salinidad.....	72

## Capítulo 3

<b>Figura 3.1:</b> Regresión lineal entre valores de fluorescencia y UFC.ml <sup>-1</sup> .....	88
<b>Figura 3.2:</b> Crecimiento estático de cultivos simples o mixtos de <i>A. brasilense</i> Sp245 y <i>P. protegens</i> CHA0 .....	92
<b>Figura 3.3:</b> Efecto de distintas concentraciones de <i>A. brasilense</i> sobre el crecimiento en cultivos mixtos de <i>A. brasilense</i> Sp245 y <i>P. protegens</i> CHA0.....	94
<b>Figura 3.4:</b> Formación de biopelícula simples y mixtas de <i>A. brasilense</i> Sp245 y <i>P. protegens</i> CHA0 .....	95
<b>Figura 3.5:</b> Análisis de la estructura de las biopelículas simples o mixtas de <i>A. brasilense</i> Sp245 y <i>P. protegens</i> CHA0 mediante microscopia confocal .....	98
<b>Figura 3.6:</b> Crecimiento en placa de <i>A. brasilense</i> Sp245 y <i>P. protegenes</i> CHA0.....	100

<b>Figura 3.7:</b> Análisis de la colonización de raíces de tomate co-inoculadas con <i>A. brasilense</i> y <i>P. protegens</i> .....	102
<b>Figura 3.8:</b> Aspecto morfológico de plántulas de tomate luego de la inoculación simple o co inoculación con <i>A. brasilense</i> y <i>P. protegens</i> .....	103
Esquema del dispositivo experimental utilizado para los ensayos de microscopia confocal.....	89

### **Conclusiones, aportes y perspectivas**

Esquema de la formación de biopelícula y colonización de la raíz por <i>A. brasilense</i> y <i>P. protegens</i> .....	115
---	-----

## Resumen

*Azospirillum spp.* es uno de los géneros más representativo del grupo de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Diversos factores afectan la colonización de la raíz y la promoción del crecimiento por parte de *Azospirillum*, entre ellos: la capacidad de formar una biopelícula estable sobre la raíz, la interacción y competencia con otros microorganismos de la rizosfera y la presencia de factores ambientales estresantes que alteren la actividad y supervivencia de la bacteria en la rizosfera.

En esta tesis, se abordó el estudio de la regulación de la formación de biopelícula por dos moléculas señal que produce *A. brasilense* Sp245: óxido nítrico (NO) y auxinas (AIA). Además se investigó la capacidad de esta bacteria de formar biopelícula en condiciones de estrés salino. Por último, se estudió el efecto de la interacción con otro microorganismo habitante de la rizosfera como *Pseudomonas protegens* sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Azospirillum*.

Para estudiar la participación del NO y el AIA en la formación de biopelícula se utilizaron mutantes isogénicas de Sp245; Faj164 deficiente en la producción de NO y Faj009 disminuida en la síntesis de AIA. Además se analizó la producción de NO y el contenido de AIA en la biopelícula, así como el efecto del agregado exógeno de dadores de NO y de auxina sintética. Asimismo, se determinó el efecto del agregado de cloruro de sodio sobre la formación de biopelícula, la producción de NO y auxinas. Por otra parte, la interacción en el crecimiento estático y la formación de biopelícula entre *A. brasilense* Sp245 y *P. protegens* CHA0 se abordó mediante microscopia confocal y ensayos en placa de Petri.

Los resultados indicaron que el NO participa en la formación de biopelícula en *A. brasilense*, no así las auxinas. En contraste, el agregado de auxina exógena provocó una disminución en la producción de NO y en la formación de biopelícula, mientras que la adición de NO disminuyó el contenido de AIA en la biopelícula. Por otra parte, el estrés salino indujo la formación de biopelícula independientemente de la producción de NO. Los

estudios de interacción entre *A. brasilense* y *P. protegens* mostraron que el crecimiento estático de ambas cepas fue mayor cuando crecieron co-cultivadas, mostrando un efecto cooperativo. Asimismo, las imágenes de microscopía confocal revelaron la formación de biopelículas mixtas estructuradas, ubicándose Sp245 principalmente en el fondo y CHA0 hacia la superficie de la biopelícula. Los ensayos de interacción en placa de Petri mostraron que *A. brasilense* presentó un fenotipo de colonia pequeña en presencia de un césped de *P. protegens*.

En conclusión, el NO modula la formación de biopelícula en *Azospirillum* y no las auxinas. Existe una regulación cruzada entre AIA y NO evidenciada por un requerimiento de NO para la formación de biopelícula en *Azospirillum* y una dispersión de la misma por AIA. La salinidad induce mayor formación de biopelícula.

Por otra parte, los resultados revelan una interacción cooperativa entre *A. brasilense* y *P. protegens*, en la que ambas cepas aumentaron su crecimiento estático y formaron biopelículas mixtas con una distribución especie-específica. Asimismo, los cambios en el fenotipo de la colonia de Sp245 sugieren una comunicación activa entre estas dos cepas.

## Abstract

*Azospirillum* spp. is one of the most representative genera of plant growth promoting rhizobacteria.

Several factors affect root colonization and plant growth promotion by *Azospirillum*. Among them the ability to form biofilm on roots, the interaction with other important inhabitants of the rhizosphere and the occurrence of environmental stressing factors altering its survivor in the rhizosphere.

The regulation of biofilm formation by the two signals molecules produced by *A. brasilense* Sp245, auxin (IAA) and nitric oxide (NO), was studied. In addition, the capability of the bacteria to form biofilm in salt conditions was investigated. Finally, the growth and biofilm formation of *A. brasilense* Sp245 when is co-cultivated with *Pseudomonas protegens*, a natural inhabitant of the rhizosphere, were studied.

Isogenic mutant strains of Sp245 impaired in auxin synthesis (Faj009 strain) and in NO production (Faj164 strain) were chosen as a genetic model to distinguish between IAA and NO regulations. IAA and NO production by the biofilm were analyzed. In addition the effect of exogenously added IAA and NO donors on biofilm formation and dispersion were analyzed. The interaction between *A. brasilense* Sp245 and *P. protegens* CHA0 was analyzed by confocal microscopy of mixed biofilms and by growth compatibility assays in Petri dishes.

Results indicated that NO participates in the regulation of biofilm formation but not IAA, which produced *A. brasilense* biofilm dispersion. The exogenous addition of synthetic AIA decreased NO production and biofilm formation, while NO donors reduced biofilm's AIA content. On the other hand, saline stress produced higher biofilm formation independent of the level of NO production. When co-cultured *A. brasilense* and *P. protegens* were capable to form structured biofilms with a specie-specific distribution within it. Both strains statically grew better when co-cultivated indicating a cooperative effect.

In conclusion, biofilm formation by *Azospirillum* is modulated by NO but no by IAA. Moreover, it was also possible to establish a crosstalk between auxin and NO. The salt

stress induced higher biofilm formation. When co-cultivated with *P. protegens*, mixed biofilms were structured in a specie specific way and phenotypic changes in plate assays suggested an active communication between both strains.

## Glosario de abreviaturas

- $\mu$ l: microlitro
- $\mu$ M: micromolar
- ARC: Agar Rojo Congo
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- AIA: ácido-3-indol acético
- AMPc: adenosín monofosfato cíclico
- ARN: ácido ribonucleico
- cPTIO: (2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-oxil-3-oxido de potasio)
- CV: cristal violeta
- DGC: diguanilato ciclasa
- di-GMPc: 3'5' -di-guanosín-monofosfato-ciclico
- $DO_{xxxnm}$ : densidad optica XXX nanómetros
- eGFP: enhanced green fluorescent protein
- EPS: exopolisacaridos
- *E. coli*: *Escherichia coli*
- Faj009: cepa mutante nula en el gen *ipdC* de *Azospirillum brasilense* Sp245
- Faj164: cepa mutante nula en el gen *Nap* de *Azospirillum brasilense* Sp245
- FBN: fijación biológica de nitrógeno
- FDE: fosfodiesterasas
- Fe: hierro
- $FeCl_3$ : Tricloruro férrico
- g: gramo
- GSNO: S-nitrosoglutatión
- HCl: ácido clorhídrico
- $HSO_4$ : ácido sulfúrico
- KI: yoduro de potasio
- $KNO_3$ : nitrato de potasio
- LB: medio de cultivo Luria-Bertani
- min: minutos
- ml: mililitro
- mM: milimolar
- N: nitrógeno
- NaCl: cloruro de sodio
- Nap: nitrato reductasa periplásmica
- Nfb: medio de cultivo libre de nitrógeno
- NNF: medio de cultivo Nfb suplementado con nitrato y hierro
- $NH_4Cl$ : cloruro de amonio

- nm: nanómetros
- NO/NO • : óxido nítrico
- NO<sub>2</sub>Na: nitrito de sodio
- OAB: medio de cultivo Okon Albrecht Burris
- °C: grados centígrados
- P: fósforo
- PAS: dominio estructural que se encuentra presente en muchas proteínas involucradas en señalización
- PGPR: plant growth promoting rhizobacteria
- pH: potencial hidrógeno
- PHB: polihidroxibutirato
- PPDC: fenil piruvato descarboxilasa
- QS: quórum sensing
- rpm: revoluciones por minuto
- SNP: nitroprusiato de sodio
- Sp245: cepa salvaje de *Azospirillum brasilense*
- Trp: triptófano
- UFC: unidades formadoras de colonias
- % v/v: porcentaje volumen en volumen

# Introducción general

## 1. La rizósfera y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal

La rizósfera es el área del suelo influenciada por las raíces de las plantas y se caracteriza por presentar una alta concentración de nutrientes debido principalmente a la presencia de exudados y deposiciones radicales (Bais et al. 2006; Somers et al. 2008). En ella se desarrollan y son activas una gran diversidad de comunidades microbianas (Vacheron et al. 2014; Van Loon 2007). Se denomina microbioma de la rizósfera a la comunidad microbiana asociada a las raíces, y su composición es diferente de las comunidades microbianas de suelo circundante (Chaparro et al. 2013). Muchos miembros de esta comunidad no tienen efecto sobre las plantas, sin embargo, algunos ejercen efectos deletéreos y otros, benéficos. Aquellos que afectan adversamente el crecimiento y la salud de la planta incluyen hongos patógenos, oomycetes, bacterias, virus y nematodos, mientras que dentro de los microorganismos benéficos se incluyen las endo y ecto micorrizas, ciertos hongos y bacterias (Raaijmakers et al. 2009). Las bacterias del suelo capaces de colonizar la superficie del sistema radical (y a veces los tejidos internos) y que estimulan el crecimiento y mejoran la salud de la planta se denominan rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, PGPR, por sus siglas en inglés: *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (Barea et al. 2005; Couillerot et al. 2009; Vacheron et al. 2014).

Dentro las PGPR, podemos encontrar las que directamente promueven el crecimiento de la planta por medio de la secreción de fitohormonas como auxinas, giberellinas y citoquininas, o facilitando la disponibilidad de nutrientes, a través de la fijación biológica de nitrógeno, o la solubilización de fosfatos (Spaepen et al. 2009b). Otras PGPR ejercen indirectamente su efecto, que principalmente está asociado con la reducción de daños causados por patógenos. Estos microorganismos también llamados agentes de control biológico, pueden actuar sobre el patógeno a través de la producción de antibióticos, depletando de Fe el medio por la síntesis de sideróforos, o inducir la resistencia sistémica de la planta (Helman et al. 2011; Spaepen et al. 2009b; Weller 2007).

Los efectos benéficos de las PGPR sobre las plantas son muy variados, entre los más conocidos se encuentran, el aumento de la superficie radical, de las tasas de germinación y de crecimiento, de la tolerancia a estrés (tanto biótico como abiótico), de la

resistencia a patógenos. Todos estos efectos conllevan, a un incremento en el rendimiento de los cultivos (Bashan y de-Bashan 2010; De-Bashan et al. 2007; Mercado-Blanco 2015; Nautiyal et al. 2013; Timmusk et al. 2014).

Entre los géneros más conocidos de PGPR se encuentran; *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus*, *Arthrobacter*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*. (Bashan y de-Bashan 2010; Bloemberg y Lugtenberg 2001; Drogue et al. 2014; Okon et al. 2015; Spaepen et al. 2009b).

## 2. El género *Azospirillum*

*Azospirillum spp* es uno de los géneros más representativo del grupo de las PGPR (Bashan y de-Bashan 2010). Desde su re-descubrimiento a mediados de la década del 70 por Johana Döbereiner, y su definición como bacteria promotora del crecimiento vegetal (Döbereiner y Day 1976), *Azospirillum* se ha convertido en la PGPR de vida libre más estudiada, y es modelo de investigación en fisiología, ecología y genética molecular de bacterias rizosféricas asociadas a las plantas (Bashan et al. 2004; De-Bashan et al. 2007). Durante las décadas de los '80 y '90 se realizaron ensayos de inoculación con *Azospirillum* en varios países, incluyendo Israel, Francia, Bélgica, Argentina, Uruguay, México y Sudáfrica. Los resultados de estos ensayos fueron analizados en sendas reuniones internacionales (Okon and Labandera-González 1994, Dobbelaere *et al.* 2001), arribando a la conclusión que la inoculación con *Azospirillum* resulta en aumentos significativos del rendimiento de los cultivos en magnitudes del orden de 5–30% por sobre los controles, con una eficiencia del 60–70%. Debido a esto, ha sido aplicada directamente en la agricultura, desarrollándose y comercializándose inoculantes en países como Argentina México, India, Italia, Francia y otros (Díaz-Zorita y Fernández-Canigia 2009).

El género *Azospirillum* pertenece a la subclase alfa de las proteobacterias, Gram negativa, fijadoras de nitrógeno de vida libre, microaerófilas, móviles con un único flagelo polar (Bashan et al. 2004; Okon y Labandera-Gonzalez 1994). Las cepas de *Azospirillum* han sido aisladas de la rizósfera de diversos pastos tropicales, de filósfera y de raíces de

numerosas gramíneas (silvestres y cultivadas), de cereales y de plantas de diversas familias de climas tropicales, subtropicales, templados y árticos (De-Bashan et al. 2007). Hasta el momento se han descrito 18 especies de *Azospirillum* (<http://www.bacterio.net.>).

## 2.1. Mecanismos de acción de *Azospirillum* en la promoción del crecimiento vegetal

Al comienzo de las investigaciones, el efecto de promoción del crecimiento vegetal fue atribuido a la capacidad de *Azospirillum* de fijar nitrógeno atmosférico. En la actualidad, se han descrito numerosos mecanismos por los cuales *Azospirillum* puede promover el crecimiento vegetal. La capacidad de producir fitohormonas como auxinas, giberelinas y citoquininas es una de las características más importantes para la inducción de cambios en la morfología radical (Somers et al. 2008). Más recientemente se ha descrito la producción de óxido nítrico (NO) por parte de esta bacteria (Creus et al. 2005), esta molécula señal sería necesaria para la formación de las raíces laterales y adventicias (Molina-Favero et al. 2008).

Otros mecanismos descritos para explicar los efectos de *Azospirillum* sobre las plantas, son la inducción de cambios en la fisiología de la planta como el incremento en la tasa de respiración celular (Sarig et al. 1992), cambios en la pared celular (Pereyra et al. 2010), incremento de la movilización y absorción de iones como fosfatos, nitratos, potasio (Bashan et al. 1990). Además, se ha comprobado que *Azospirillum* es capaz de mitigar el estrés ambiental al cual está sometida la planta, como el estrés hídrico (Sarig et al. 1990), salino (Bacilio et al. 2004; Casanovas et al. 2003; Creus et al. 1997) y estrés por toxicidad de metales pesados (Belimov y Dietz 2000). Si bien no se ha definido un mecanismo principal por medio del cual *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal, se ha propuesto la “hipótesis aditiva”, que supone la acción simultánea de todos los mecanismos mencionados previamente para ejercer la promoción del crecimiento (De-Bashan et al. 2007). Hay que destacar que estos mecanismos pueden variar de acuerdo a

la especie vegetal, la cepa de *Azospirillum sp.* y las condiciones medioambientales en la cual ocurre la interacción planta-bacteria (Bashan y de-Bashan 2010).

## 2.2. Interacción de *Azospirillum* con las plantas

Para que se establezca la asociación planta-bacteria, un evento preliminar y decisivo es el contacto de la bacteria con la superficie de la raíz, el cual ocurre cuando las bacterias móviles migran hacia el sustrato. En el caso específico de *Azospirillum*, estas bacterias son atraídas a la raíz por una gran variedad de quimio-atrayentes, exudados por la raíz, que pueden ser utilizados como fuente de carbono (Burdman et al. 2000). Además, la baja concentración de oxígeno típica de la rizósfera es otro de los principales estímulos que atrae a la bacteria hacia la raíz. *Azospirillum* tiene la capacidad de moverse en busca de concentraciones óptimas de oxígeno (aerotaxis) para la generación de energía y la fijación de nitrógeno (Alexandre et al. 2000; Barak et al. 1982; Burdman et al. 2000). Una vez que la rizobacteria ha sido atraída hacia la raíz tiene que establecerse y adherirse al sistema radical para ejercer sus propiedades benéficas (Droge et al. 2012). Entonces, la colonización de la raíz es un proceso activo que involucra el crecimiento y establecimiento de la bacteria sobre la raíz, y es afectado tanto por la planta huésped como por la presencia de otros microorganismos del suelo (Kloepper 1996; Kloepper y Beauchamp 1992).

*Azospirillum* puede colonizar la endodermis y el córtex (la endorizosfera) o la epidermis (el rizoplano) de la raíz. En esta última, las bacterias tienden a formar agregados de unas pocas o unas decenas de células, aunque es posible encontrar también células aisladas distribuidas a lo largo de la superficie radicular. *Azospirillum* se caracteriza por colonizar la zona de elongación de la raíz y los pelos radicales (Assmus et al. 1995; Ramos et al. 2002; Zhu et al. 2002). Se ha descrito un mayor número de bacterias colonizando la superficie basal de la raíz que disminuye hacia la parte apical (Rothballer et al. 2003). Algunas cepas pueden ser endófitas, este es el caso de *A. brasilense* Sp245 que es capaz de colonizar los espacios intercelulares (apoplasto) y los haces vasculares (Baldani et al. 1986; Rothballer et al. 2003).

### 2.3. Interacción de *Azospirillum* con otros microorganismos de la rizósfera

La capacidad de la PGPR para interactuar no sólo con la planta sino también con los miembros de la comunidad microbiana del suelo es un factor clave para su supervivencia y para que ejerza la promoción del crecimiento vegetal. Los estudios de interacción de *Azospirillum* con otros microorganismos se basan principalmente en el impacto ecológico de la inoculación con esta bacteria sobre los microorganismos residentes de la rizósfera y el efecto de este inoculante sobre la planta (Couillerot et al. 2013). En estos estudios se ha demostrado que la inoculación con *Azospirillum* no afecta a las poblaciones microbianas autóctonas (Baudoin et al. 2009; Lerner et al. 2006; Naiman et al. 2009; Russo et al. 2005).

Muchos de los microorganismos presentes en la rizósfera tienen la capacidad de sintetizar y liberar compuestos con actividad antimicrobiana que inhiben el crecimiento de otros microorganismos, de esta forma, reducen la población patogénica para la planta. Estos microorganismos biocontroladores también tienen la capacidad de colonizar la raíz (Couillerot et al. 2009). Microorganismos del género *Pseudomonas* pertenecen a este grupo y son capaces de producir metabolitos antifúngicos, sideróforos y compuestos antimicrobianos (Haas y Défago 2005). Estas bacterias no sólo presentan una gran capacidad de protección de los cultivos mediante el biocontrol de diversos microorganismos patógenos, sino que también fomentan el equilibrio y sanidad del suelo con su potente capacidad solubilizadora de fósforo (Rodríguez y Fraga 1999).

En nuestro país se ha generalizado el uso de inoculantes mixtos conteniendo *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*, mezcladas en proporciones no indicadas en marbete, ni de uso propuesto para cultivos específicos. El hecho de que existan escasos estudios básicos acerca de la interacción entre estas dos bacterias, que poseen características fisiológicas y culturales bien diferentes, no ha sido impedimento para que estos productos ya estén disponibles en el mercado.

### 3. Formación de biopelícula

La formación de las biopelículas es una estrategia de vida común de las bacterias en ambientes naturales. La biopelícula se define como una comunidad estructurada de células microbianas compuesta por una o varias especies de microorganismos, adheridas a una superficie, y embebidas en una matriz polimérica que incluye exopolisacaridos (EPS), lipopolisacaridos (LPS), proteínas y ADN (Fujishige et al. 2006; Ramey et al. 2004).

Estas comunidades microbianas de estructura tridimensional, se pueden formar en todos los ambientes colonizados por bacterias, tales como sustratos inertes sólidos en contacto con la humedad, o sobre superficies de tejidos en organismos vivos. Las biopelículas le confieren a las bacterias tolerancia a condiciones ambientales adversas como desecación, escasez de nutrientes, temperaturas extremas, exposición a luz UV, como también resistencia a compuestos antibióticos (Barraud et al. 2015; Brooun et al. 2000; Davey y O'toole 2000; Rinaudi y Giordano 2010). Las biopelículas pueden colonizar diferentes tipos de superficies, bióticas o abióticas, causando un efecto benéfico o perjudicial para el medio ambiente, la industria y la salud humana (Costerton et al. 1987).

Las propiedades de las biopelículas pueden ser explotadas para el tratamiento de aguas residuales (Nicoletta et al. 2000), para la biorremediación (Wu et al. 2015), o para incrementar el efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Rinaudi y Giordano 2010). De hecho en la rizósfera, muchas especies microbianas adoptan un estilo de vida sésil para colonizar las raíces (Rudrappa et al. 2008)

Estas bacterias interactúan físicamente con la superficie para formar complejos multicelulares, intra e interespecie, incluyendo biopelículas y pequeños agregados (Danhorn y Fuqua 2007). El proceso de formación de agregados celulares y biopelícula es de particular relevancia para la supervivencia de la bacteria y la colonización de la planta. Una variedad de factores ambientales, genéticos y estructurales afectan la adhesión celular, las interacciones célula-célula y por consiguiente la interacción planta-bacteria (Bogino et al. 2013).

Algunos componentes de la superficie de la bacteria, particularmente flagelos, exopolisacáridos y lipopolisacáridos, en combinación con la presencia de señales

funcionales en la bacteria, son cruciales para el establecimiento de las biopelículas (Rinaudi y Giordano 2010).

Las bacterias en las biopelículas actúan en forma coordinada mediante la secreción de señales químicas funcionales en procesos *Quorum Sensing* (QS). Estas moléculas suelen estar relacionadas a la etapa inicial de formación de la biopelícula, mediando la transición de las microcolonias a una biopelícula madura (Nadell et al. 2008). Otras moléculas señales implicadas en la regulación de la formación de las biopelículas son: i) el segundo mensajero, ubicuo en bacterias, 3'-5'-diguanylate monofosphate cyclic, (di-GMPc) (Plate y Marletta 2012; Ramirez-Mata et al. 2016), ii) el NO (Arruebarrena Di Palma et al. 2013; Barraud et al. 2006; Barraud et al. 2015), iii) las poliaminas (Ding et al. 2014; McGinnis et al. 2009) y iv) las auxinas (Bianco et al. 2006). Por otro lado, compuestos antimicrobianos producidos por otros microorganismos de la rizósfera, también pueden afectar la formación de biopelículas (Combes-Meynet et al. 2011; Powers et al. 2015). De este modo, tanto factores internos, como externos, pueden afectar la formación y el establecimiento de la biopelícula en una superficie.

### 3.1. Formación de biopelícula frente a condiciones de estrés

La formación de biopelícula es reconocida como una estrategia de supervivencia microbiana que permite la resistencia a diferentes tipos de estrés ambiental, como falta de nutrientes, presencia de metales pesados, luz UV, desecación, agentes bactericidas y bacteriostáticos, diferencias de temperatura y de pH (Loera Muro et al. 2012). Esta resistencia ha sido atribuida a distintos mecanismos que operan conjuntamente, que incluyen barreras físicas como la producción de una matriz de EPS, químicas como la producción y acumulación de osmoprotectores; y a la activación a una respuesta general a estrés (Mah y O'Toole 2001; Qurashi y Sabri 2012). La formación de biopelícula frente a condiciones de estrés es una característica importante en las PGPR, ya que le confiere una mayor capacidad para sobrevivir y así entonces ejercer efectos benéficos en las plantas frente a estas condiciones.

## **Planteo del problema**

La capacidad de *Azospirillum* de formar biopelículas sobre raíces y también sobre superficies abióticas ha sido demostrada (Arruebarrena Di Palma et al. 2013; Assmus et al. 1995; Cerqueira 2015). Sin embargo hay pocos estudios acerca de los mecanismos que regulan la formación de la biopelícula en esta bacteria de interés agronómico. En este contexto, se ha descrito que el NO es necesario para la formación de biopelícula en *A. brasilense* (Arruebarrena Di Palma et al. 2013), pero no se ha implicado la molécula de AIA en este proceso. Teniendo en cuenta que *Azospirillum* produce NO y AIA, y que estas moléculas son reguladoras de los efectos positivos sobre el sistema de raíces y que además se han implicado, en forma separada, en el desarrollo de biopelículas (Arruebarrena Di Palma et al. 2013; Bianco et al. 2006), resulta de importancia estudiar la regulación por NO y AIA del desarrollo de biopelículas durante la colonización de raíces por *Azospirillum*.

Argentina es el tercer país en el mundo con áreas extensamente salinizadas (Puchulu 2008). Una estrategia prometedora es el uso de inoculantes microbianos, que pueden promover el crecimiento vegetal bajo condiciones de estrés abiótico (Boostani et al. 2014; Egamberdieva y Lugtenberg 2014; Yang et al. 2009). Si bien ha sido demostrado que la inoculación *Azospirillum* mitiga los efectos del estrés salino en las plantas, se desconocen los mecanismos que adopta esta bacteria para enfrentar dichas condiciones. La formación de biopelícula es un proceso clave para la colonización pero también una estrategia de supervivencia frente a condiciones de estrés, entonces resulta de interés estudiar si *Azospirillum* es capaz de formar biopelícula frente a condiciones de estrés salino y si el AIA y el NO están implicados en esta respuesta.

Mediante la combinación de microorganismos PGPR con capacidades metabólicas diferentes, se puede esperar un efecto sinérgico o aditivo sobre la planta. Este efecto,

obtenido de la combinación de diferentes microorganismos benéficos, es importante para mejorar consistentemente el rendimiento (Couillerot et al. 2013).

Las bases de la interacción y formación de biopelículas mixtas entre diferentes PGPR, y en particular entre *Pseudomonas sp.* y *Azospirillum sp.*, es un campo de escasa investigación. No obstante a la falta de conocimiento en el tema, estas dos especies son actualmente utilizadas en nuestro país para la formulación de inoculantes mixtos de uso agrícola. Es necesario entonces estudiar las bases moleculares y fisiológicas de la interacción *Pseudomonas-Azospirillum* para lograr un conocimiento integral del proceso que sirva como guía para el diseño y formulación de inoculantes mixtos más eficientes.

Comprender como interactúan las PGPR en las biopelículas mixtas posibilitaría la generación de inoculantes con alto impacto tecnológico en la producción agropecuaria y en la industria.

### **Hipótesis de trabajo**

En base a los antecedentes previamente expuestos, se plantearon las siguientes **hipótesis generales** de trabajo:

1. “El óxido nítrico y las auxinas participan conjuntamente en la regulación de la formación de biopelícula de *Azospirillum brasilense*, siendo este proceso necesario para la colonización exitosa de la raíz.”
2. “*Azospirillum brasilense* forma biopelícula en respuesta a condiciones de salinidad y el AIA y el NO participan conjuntamente en la regulación de este proceso”.
3. “*Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas protegens* son capaces de crecer en forma conjunta y formar biopelículas mixtas (*in vitro* y sobre raíces) a través de una comunicación activa entre estas dos bacterias que modula la interacción inter-específica.”

## Capítulo 1

# **Análisis de la formación de biopelícula en *A. brasilense* y su regulación por óxido nítrico y auxinas**

# **Introducción y objetivos**

## Formación de biopelícula

La formación de la biopelícula se inicia cuando señales ambientales estimulan a que células planctónicas se asienten y se establezcan como microcolonias sobre una superficie (Fig. 1.1). En este proceso las bacterias pierden la movilidad, reprimen la síntesis de flagelos, y producen abundantes EPS (Stoodley et al. 2002). Posteriormente, la biopelícula comienza a desarrollarse y forma una estructura vertical de espesor variable con canales libres para el transporte de oxígeno, nutrientes y para la eliminación de desechos metabólicos. Como consecuencia existen en la biopelícula distintos microambientes con condiciones físico-químicas diferentes a las que las bacterias deben adaptarse (Stoodley et al. 2002). El último paso en el ciclo de vida de este tipo de bacterias, es la dispersión de la biopelícula. Nuevamente, cambios ambientales como la baja disponibilidad de nutrientes, concentración de oxígeno, estrés oxidativo o acumulación de desechos, disparan señales moleculares que causan la dispersión de la biopelícula. En esta etapa, las células bacterianas se separan de la biopelícula volviendo al estado planctónico, para comenzar un nuevo ciclo de formación de biopelícula (McDougald et al. 2012).

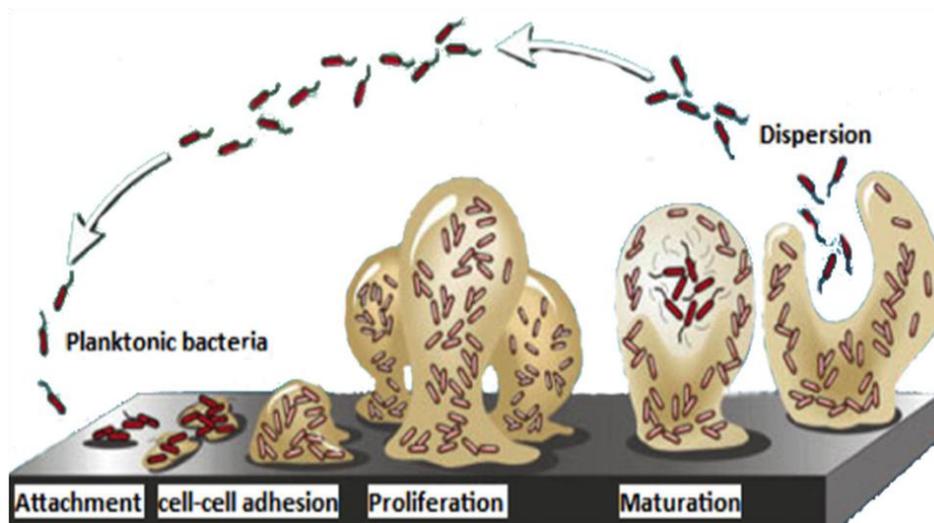


Figura 1.1: **Formación de biopelícula de acuerdo al modelo de desarrollo.** Imagen recuperada de la librería de imágenes CBE, Centro de Ingeniería de Biopelículas, Universidad Estatal de Montana, USA.

## Señales moleculares que modulan la formación de biopelículas

El sistema de señalización QS es un tipo de comunicación que presentan las bacterias para detectar la densidad de su población. Esta comunicación ocurre debido a la producción y secreción de moléculas señales específicas denominadas “autoinductores”. Cuando la concentración de la molécula señal alcanza un determinado nivel umbral, se dispara el mecanismo de detección de quórum y la célula bacteriana activa genes que expresan funciones de manera cooperativa, favoreciendo la adaptación de la bacteria al entorno (Ramírez-Mata et al. 2014). Dependiendo del entorno específico y de su estilo de vida, las bacterias controlan de manera definida los fenotipos asociados a la densidad de población. Un ejemplo de esto lo constituyen los genes que participan en la formación de biopelícula en *V. cholerae*, los cuales se expresan a baja densidad de población, mientras que en *P. aeruginosa*, estos genes se expresan en condiciones de alta densidad de población (revisado en Ramírez-Mata et al. (2014)).

Uno de los reguladores implicados en la formación de biopelículas más estudiado es el 3`5`-guanosin-monofosfato-cíclico (di-GMPc). El di-GMPc está presente en casi todas las bacterias y regula procesos tan variados como las transiciones en el desarrollo, el comportamiento de agregación, la adhesión, y la virulencia en patógenos de plantas y animales, entre otros (Kalia et al. 2013; Ryan et al. 2006). En particular, un aumento en los niveles intracelulares de di-GMPc resulta en la expresión de los factores necesarios para la formación de la biopelícula e inhibe la síntesis flagelar y la movilidad, mientras que una disminución en los niveles de esta molécula promueve la dispersión de la biopelícula y la virulencia. Los niveles de di-GMPc están regulados por actividades opuestas de diguanilato(s) ciclasa(s) (DGC) que lo sintetizan, y de fosfodiesterasas (FDE) que lo degradan (Paul et al. 2010; Ryan et al. 2006).

Otra molécula señal involucrada en la regulación de la formación de la biopelícula es el NO (Barraud et al. 2006; Schmidt et al. 2004). El NO es una molécula gaseosa,

lipofílica, que actúa como molécula de señalización en mamíferos, plantas y microorganismos (Cohen et al. 2010; Schmidt y Walter 1994).

En organismos procariotas, el NO participa en numerosos procesos que van desde la regulación de la vía de desnitrificación (Zumft 2002), la respuesta al estrés oxidativo (Cruz-Ramos et al. 2002), la respuesta a estrés por UV (Patel et al. 2009) y los procesos de colonización (Cohen y Yamasaki 2003; Wang et al. 2010), entre otros.

El NO como molécula señal en la biopelícula, tiene una participación dual, ya que puede intervenir en la formación o bien en la dispersión de la misma, dependiendo del estilo de vida de la bacteria y de la concentración fisiológica acumulada dentro de la célula (Barraud et al. 2006; Barraud et al. 2015; Plate y Marletta 2012). El mecanismo por el cual el NO ejerce efecto sobre la formación o dispersión de las biopelículas ha sido en parte dilucidado en los últimos años. Se ha reportado que el NO interactúa con dominios receptores del tipo PAS o H-NOX (hemo NO/oxígeno) los cuales están unidos a dominios GGDEF o EAL/HD-GYP regulando la actividad de éstos y por lo tanto alterando la concentración celular de di-GMPc. En este sentido el NO actúa como promotor de la formación de la biopelícula o de su desensamblado, dependiendo de qué clase de actividad (DGC o FDE) regule en cada sistema (Barraud et al. 2015; Barraud et al. 2009).

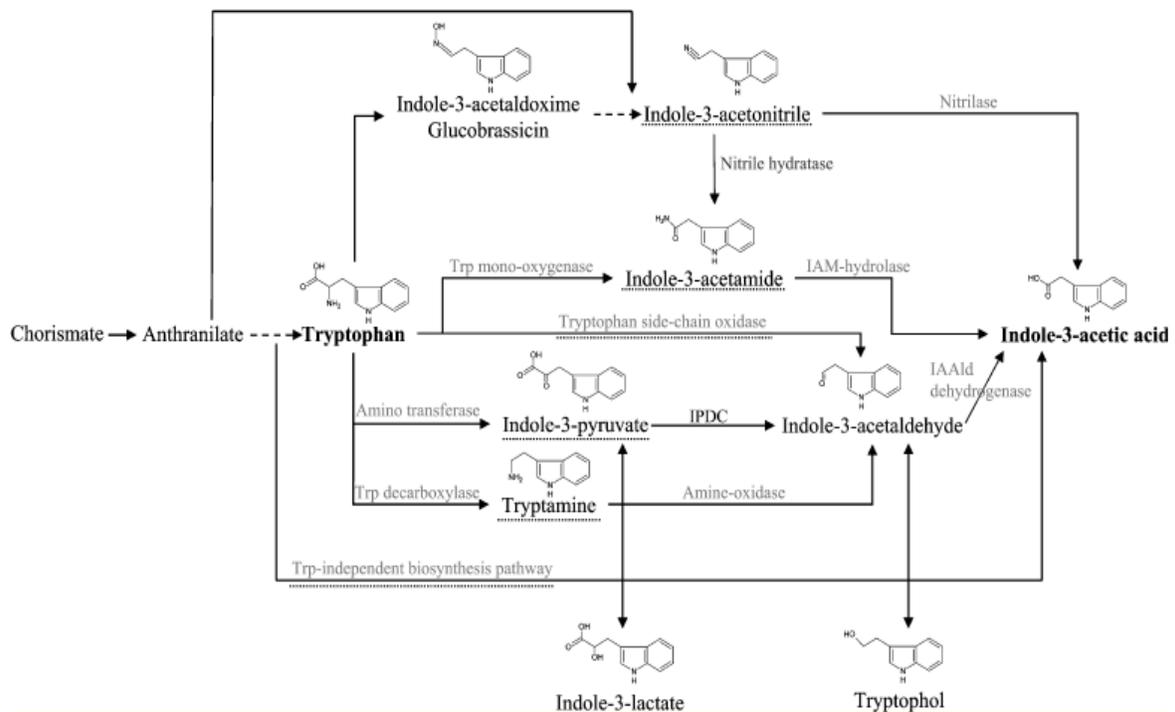
La influencia del AIA en la formación de biopelículas ha sido escasamente investigada. Sin embargo algunos estudios han demostrado que el AIA puede disparar en bacterias, tanto la formación como la dispersión de la biopelícula. En este sentido, Bianco et al. (2006) demostró que cultivos de *E. coli* tratadas con AIA incrementaban la producción de LPS, EPS y la formación de biopelícula, lo que llevó a esta bacteria a aumentar la tolerancia al estrés. En *Rhizobium etli* se reportó que la adición de AIA regula los genes involucrados en la movilidad y adhesión a las raíces de las plantas (Spaepen et al. 2009a), mientras que en *Bradyrhizobium japonicum* el tratamiento con AIA estimula la formación de biopelícula (Donati et al. 2013). Por otro lado, y en contraposición con los estudios previamente mencionados, Lee et al. (2011) reportó que derivados de indoles producidos por las plantas, como el 3-indolacetonitrilo (IAN) y el AIA, en menor medida, inhiben la formación de biopelícula de *E. coli* O157:H7.

## Producción de NO y AIA por *A. brasilense*

*A. brasilense* Sp245 produce NO (Creus et al. 2005) tanto por las vías de nitrificación heterotrófica, como por desnitrificación aeróbica (Molina-Favero et al. 2008). La desnitrificación es la reducción desasimilatoria sucesiva de nitrato a nitrito, óxido nítrico, óxido nitroso y por último a nitrógeno molecular por las correspondientes N-óxido reductasas. En este proceso, el nitrato es utilizado como aceptor final de electrones en la respiración en ausencia de oxígeno. Este mecanismo permite a los microorganismos desnitrificadores generar energía para su crecimiento bajo condiciones anaeróbicas o microaeróbicas (Cutruzzolà 1999; Zumft 1993, 1997). Las enzimas involucradas en la desnitrificación son: nitrato reductasa (NR), nitrito reductasa (NiR), óxido nítrico reductasa (NoR) y óxido nitroso reductasa (Nos). Además, *A. brasilense* posee una Nitrato reductasa periplasmática, *Nap*, que le permite realizar la desnitrificación aeróbica, ya que no es reprimible ni inactivada por oxígeno (Steenhoudt et al. 2001a). Esta vía es la principal forma de producción de NO en *A. brasilense* Sp245, ya que una mutante isogénica (cepa Faj164) nula para esta enzima produce sólo un 5% de NO (*ca.* 6 nmol NO.g<sup>-1</sup>) comparado con la cepa salvaje (*ca.* 120 nmol NO.g<sup>-1</sup>) cuando ambas crecen con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como única fuente de nitrógeno (Molina-Favero et al. 2008).

Los reportes acerca de la regulación de la formación de biopelícula en *A. brasilense* son escasos, pero se han identificado algunos genes involucrados, los cuales están relacionados a la síntesis de EPS (Lerner et al. 2009; Sheludko et al. 2008) o al regulador de la respuesta quimiotáctica *Che1* (Siuti et al. 2011). Recientemente, se han implicado en este proceso, a las moléculas reguladoras NO y di-GMPc. Arruebarrena Di Palma y col. (2013) demostraron que el NO producido por la propia bacteria tiene un rol clave en la formación de la biopelícula, ya que la mutante de *A. brasilense* Faj164, deficiente en la producción de NO, forma menos biopelícula que la cepa salvaje cuando ambas cepas crecen de forma estática en medios con nitrato. Por otra parte, se ha descrito que un gen que codifica para una Diguamilato Ciclasa A (DGC A) en *A. brasilense* Sp7, está involucrado en la formación de biopelícula y en la producción de EPS (Ramirez-Mata et al. 2016).

*A. brasilense* puede sintetizar AIA y se ha descrito que lo hace al menos por cuatro vías diferentes, dependientes del precursor triptofano (Fig. 1.2). De ellas, las tres principales son: la vía del ácido 3-indolpirúvico (IPyA), la vía de la 3-indolacetamida (IAM) y la vía de la triptamina (TAM) (Costacurta et al. 1994). El 90% del AIA producido en *A. brasilense* es por la vía IPyA (Trp → IPyA → 3-indol acetaldehído → AIA), cuyo paso limitante es el catalizado por la enzima IPyA descarboxilasa codificada por el gen *ipdC* (Prinsen et al. 1993). Esta multiplicidad de vías es probablemente la causa de que no se hayan podido aislar mutantes que carezcan completamente de AIA (Hartmann y Baldani 2006). Además de la producción en cultivos puros, la síntesis de fitohormonas se ha observado también en la interacción con plantas (Hartmann y Baldani 2006). Es así que las bacterias utilizan esta fitohormona para interactuar con las plantas como parte de su estrategia de colonización, incluyendo fitoestimulación y elusión de los mecanismos basales de defensa de las plantas (Spaepen et al. 2007). Por otra parte, como ya se ha mencionado, varios informes indican que el AIA también puede ser una molécula señal en las bacterias, pudiendo tener efecto directo sobre la fisiología bacteriana (revisado en Kochar et al. (2013) y Spaepen et al. (2007)).



**Figura. 1.2: Información general de las diferentes vías para sintetizar AIA en bacterias.** El intermediario que hace referencia al nombre de la vía o de la vía en sí mismo está subrayado en una línea discontinua. Figura tomada de Spaepen et al. (2007).

Particularmente en *Azospirillum*, se ha reportado que el AIA regula la expresión de los genes implicados en su propia síntesis por un mecanismo de retroalimentación positiva (Lambrecht et al. 1999; Vande Broek et al. 1999). Sin embargo, no existen reportes acerca de la participación de esta molécula sobre la formación de su biopelícula, proceso que es importante para la efectiva colonización de la raíz.

### Interacción NO-AIA

Muchos reportes han documentado la estrecha relación entre las auxinas y el NO en el desarrollo de las plantas, principalmente en los procesos de crecimiento de las raíces (Correa-Aragunde et al. 2006; Correa-Aragunde et al. 2004; Lombardo y Lamattina 2012; Lombardo et al. 2006; Pagnussat et al. 2002). En todos ellos fue demostrado inequívocamente el requerimiento del NO para la acción de la auxina, dando lugar al normal crecimiento y desarrollo de las raíces (Correa-Aragunde et al. 2016).

Si bien se ha estudiado la participación tanto del AIA como del NO como moléculas señal en la interacción planta-microorganismo, debido a que ambos reguladores modulan la expresión génica en ambos organismos, sólo un trabajo de publicación posterior al planteo de nuestras hipótesis, ha sugerido una interacción entre estas dos moléculas (Koul et al. 2015a). En este estudio se sugiere una interrelación entre la producción de AIA y NO, ya que mutantes que sobreexpresaban genes del catabolismo del NO (*nosZ*, *nosR* y *norB*) presentaban niveles anormales de AIA en *A. brasilense* SM (Koul et al. 2015b). Por otra parte, un estudio transcriptómico realizado en *A. brasilense* Sp245 reveló que el gen que codifica la Nap, la primera de las enzimas involucradas en la vía de desnitrificación, a partir de la cual se produce NO tiene incrementada su expresión en la mutante deficiente en la producción de AIA (Van Puyvelde et al. 2011). Estos antecedentes nos condujeron a postular la existencia de una relación entre el AIA y el NO en *A. brasilense*.

Teniendo en cuenta que *A. brasilense* es capaz de producir ambas moléculas señal, y que la formación de biopelícula es un paso fundamental para la colonización de las raíces, en este capítulo se estudió la interacción de estas dos moléculas en la regulación de la formación de biopelícula en *A. brasilense* Sp245. Para ello se planteó el siguiente objetivo general y los particulares:

### **Objetivo general**

Investigar la regulación por óxido nítrico y auxinas (ácido indolacético, AIA) del proceso de formación de biopelículas y colonización de raíces por la bacteria rizosférica promotora del crecimiento de las plantas *Azospirillum brasilense*.

### **Objetivos particulares**

1- Analizar la formación de biopelícula *in vitro* por las siguientes cepas de *A. brasilense*: a) Sp245 (salvaje); b) Faj164 (mutante isogénica *NapA*, nitrato reductasa

periplasmica negativa); c) Faj 009 (mutante isogénica de la Sp245 en la piruvato decarboxilasa (*ipdC*)).

2- Estudiar la participación del NO y el AIA en la regulación de formación de biopelícula de *A. brasilense*.

3- Determinar la capacidad de formar biopelícula sobre raíces de tomate de las cepas de *A. brasilense* Sp245, Faj164 y Faj009 mediante microscopia de epifluorescencia.

4- Analizar el efecto del agregado de exógeno de AIA sobre la dispersión de la biopelícula

# **Materiales y Métodos**

### **Material biológico, condiciones de crecimiento**

Para el estudio de la regulación de la formación de biopelícula y la colonización de raíces por NO y auxinas, se utilizaron las siguientes cepas de *A. brasilense*: la cepa salvaje Sp245 (Baldani et al. 1986) y dos mutantes isogénicas: Faj164 knockeada en el gen *napA* de la nitrato reductasa periplasmática (Steenhoudt et al. 2001a) que produce solo un 5% de NO respecto de la cepa salvaje cuando crece en medio con nitrato (Molina-Favero et al. 2008) y Faj009 mutante en el gen *ipdC*, de la indol-3-piruvato decarboxilasa que produce un 10% de AIA respecto de la cepa salvaje (Costacurta et al. 1994; Molina-Favero et al. 2008). También se utilizó una cepa de *A. brasilense* Sp245-Rif (pOT1e-*ppdC-egfp*) que contiene un plásmido con el promotor del gen *ipdC* fusionado a *egfp* (Combes-Meynet et al. 2011; Pothier et al. 2007) cedido amablemente por la Dra. Claire Prigent Combaret de la Universidad de Lyon, Francia.

Todas las cepas de *A. brasilense* fueron estriadas desde stocks de medio papa a placas con medio agar Rojo Congo (ARC, (Rodríguez Cáceres 1982) con el antibiótico correspondiente (Kanamicina 25 µg/ml para Faj009 y Faj164, Gm 25µg/ml para Sp245 PppdC).

Una o dos colonias de cada cepa provenientes de placa ARC, fueron inoculadas en 25 ml de LB e incubado por 16 horas, en agitación (100 rpm) a 32°C y se determinó la densidad óptica a 540nm (DO<sub>540nm</sub>). Los cultivos que llegaron a una DO<sub>540nm</sub> de 1 fueron centrifugados 10 min a 5800 g y se ajustaron a una DO de 2 en buffer fosfato (66 mM). Para los ensayos de formación de biopelículas, estos cultivos fueron diluidos 1/100 en medio Nfb adicionado con 13,8 mM de nitrato o 13,8 mM de amonio (anexo 1) y suplementado con Triptofano 100 µg/ml. Doscientos µl de cada dilución se colocaron en pocillos de placas de poliestireno de 96 pocillos, fondo plano (Deltalab). Las placas fueron incubadas en forma estática a 32°C durante 2, 5 y 11 días.

### **Crecimiento total y cuantificación de la formación de biopelícula**

Para la determinación del crecimiento total (células planctónicas más adheridas) se despegó de paredes y fondo de los pocillos la biopelícula con micropipeta en forma

mecánica (Salcedo et al. 2015) y se determinó la  $DO_{540nm}$  (Spectra MR, Dynex Technologies). Los recuentos de  $UFC.ml^{-1}$  se realizaron por medio de diluciones seriadas en buffer fosfato, sembrando 10  $\mu l$  sobre placa ARC. La formación de biopelícula se cuantificó utilizando la técnica de cristal violeta (O'Toole et al. 1999). Se agregó 20  $\mu l$  de cristal violeta 1%  $v/v$  a cada pocillo (0,1% concentración final), y se dejó a temperatura ambiente durante 30 min. Luego se lavaron las placas completas por inmersión con agua corriente y se dejaron escurrir sobre papel. Finalmente, se colocó 200  $\mu l$  de ácido acético 33%  $v/v$  en cada pocillo, se agitó con pipeta de manera que se homogeneizara el colorante y se determinó la absorbancia a 590 nm. Los datos fueron normalizados en relación al crecimiento total bacteriano en cada pocillo ( $DO_{590nm}/DO_{540nm}$ ).

### **Contenido de auxinas y nitrito en el sobrenadante de las biopelículas**

El contenido de auxinas se determinó con el método de Salkowski (Glickmann y Dessaux 1995). Para ello se tomaron los sobrenadantes de los cultivos estáticos y se centrifugaron 15 min a 5800 g. Se tomaron nuevamente los sobrenadantes y se trataron durante 1 hora con ácido sulfámico 1 mM (Yoshida y Yatazawa 1968). El tratamiento con ácido sulfámico se realizó debido a que ha sido reportado que el AIA es destruido por el nitrito en una solución ácida (Tanner y Anderson 1963; Rodríguez-Barrueco et al. 1983). Luego del tratamiento con ácido sulfámico, se agregó el reactivo de Salkowski (100 ml de reactivo: 2 g  $FeCl_3$  en  $H_2SO_4$  7,9 M) en una relación 1 a 1 y se incubó en oscuridad durante 30 min. Posteriormente se determinó la absorbancia a 540nm, las determinaciones realizadas fueron referidas a una curva estándar. Los valores de AIA obtenidos fueron normalizados al crecimiento total de cada muestra.

La producción de nitritos, estimador de la producción de NO (Mur et al. 2011), se realizó mediante un electrodo específico inNO-T-II (Innovative Instruments, Inc). Los sobrenadantes de las biopelículas fueron centrifugados 10 min a 5800 g en frío (4°C). La detección se realizó según indica el proveedor. Las determinaciones fueron referidas a una curva estándar y los valores obtenidos normalizados al crecimiento total. En algunos casos

el contenido de nitritos se determinó mediante el método de Griess según indica Amenta et al. (2015).

### **Tratamientos con dadores de óxido nítrico y auxina sintética**

Para evaluar el efecto del dador de NO, Nitroprusiato de Sodio (SNP, Merk), las cepas fueron crecidas en placa de 96 pocillos por dos días en medio Nfb-nitrato suplementado con SNP en concentraciones finales de 10  $\mu\text{M}$  o 100  $\mu\text{M}$ . Para el SNP envejecido, se preparó el SNP y se dejó a temperatura ambiente durante 24 hs. En el caso del NO producido por S-nitrosoglutation (GSNO), éste se agregó diariamente al medio, desde el inicio del experimento y por dos días en concentraciones finales de 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ .

El AIA (Sigma) fue preparado en etanol 80% y agregado al medio de cultivo en concentraciones finales de 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 1 mM al inicio de cada experimento. Como control se utilizaron volúmenes equivalentes de etanol 80%. En los experimentos en los cuales se adicionaron conjuntamente SNP y AIA, éstos fueron agregados al inicio de cada ensayo en las concentraciones indicadas.

Para los ensayos de dispersión de las biopelículas por AIA, las cepas fueron crecidas en placa de 96 pocillos por cuatro días en medio Nfb con nitrato. Transcurrido este periodo, se agregó AIA en concentraciones finales de 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 1mM y se dejó en estufa 24 hs adicionales.

### **Determinación fluorométrica del NO**

La cinética de producción de NO en las distintas condiciones fue realizada monitoreando los cambios en la intensidad de la sonda fluorescente específica para NO diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA, Calbiochem, La Jolla, USA) (Kojima *et al.*, 1998).

Las cepas fueron crecidas en placa de 96 pocillos por 2 días en medio Nfb-nitrato suplementado o no con AIA 1 mM. Pasado ese periodo de tiempo, se retiraron las células plantónicas, y las adheridas fueron resuspendidas en solución salina. 100  $\mu\text{l}$  de cada

condición fueron incubados en placa de 96 pocillos en oscuridad, a temperatura ambiente con 10  $\mu$ M DAF-2DA durante 20 min. La intensidad de la fluorescencia se midió cada 4 min durante un período de 2 hs en un lector de placas Fluoroskan Ascent (Labsystems, Ramsey, USA), con filtros de excitación a 480 nm y de emisión a 525 nm. Para cada tratamiento se analizaron al menos tres cultivos independientes, cada uno incubado por triplicado con DAF-2DA.

#### **Determinación fluorométrica de la expresión del promotor *ppdC***

A. *brasiliense* Sp245-Rif (pOT1e-*ppdC-egfp*) fue crecida en placa de 96 pocillos durante 2 días en medio Nfb nitrato con el agregado o no de 1 mM de 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxil-3-óxido (cPTIO). La intensidad de la fluorescencia se midió en un lector de placas Fluoroskan Ascent (Labsystems, Ramsey, USA), con filtros de excitación a 480 nm y de emisión a 525 nm. Para cada tratamiento se analizaron al menos tres cultivos independientes, cada uno por triplicado.

#### **Extracción de ARN y determinación de la expresión por RT-PCR semicuantitativa**

A. *brasiliense* Sp245 fue crecida en placa de 96 pocillos por 2 días en medio Nfb-nitrato suplementado con 1 mM de AIA. Posteriormente se retiraron las células plantónicas y se agregó a cada pocillo solución salina. Se despegaron mecánicamente con pipeta las células adheridas y fueron cosechadas a 5800 g. Se extrajo ARN total según el protocolo del Trizol (Anexo 2). El ARN extraído fue tratado con DNasa Promega según las indicaciones del proveedor y posteriormente se realizó la síntesis del ADN copia (ADNc) (Anexo 2). El ajuste de la carga de ADNc se realizó mediante la amplificación el gen *16S* utilizando los primers *Fw-16S*: AGGCTTGACTTCCGGAGAGG y *Rv-16S*: TGGTAAGGTTCTGCGGTTG con 18 ciclos de amplificación (Anexo 3).

Los genes estudiados en su expresión fueron: *Nap* (nitrato reductasa periplasmática) (Steenhoudt et al. 2001a) y *Nir* (nitrito reductasa). Los primers directo y reverso para cada uno de ellos fueron: *Fw-Nap*: GGAGATGCACCCCATCCTGT, *Rv-Nap*: GTGCTGGTTGAAGCCCATG, *Fw-Nir*: GGATGACGGCACGACCTACA, *Rv-Nir*: GCTTCTCGTTGACCAAGCCG. Las reacciones de PCR se detallan en el anexo 3. Los

productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa 1% <sup>P</sup>/<sub>V</sub> teñidos con GelRed (Biotium). La cuantificación de los niveles de expresión se realizó analizando las imágenes obtenidas de los geles de agarosa 1% <sup>P</sup>/<sub>V</sub> mediante el programa Image Quant y relativizando la expresión de los genes estudiados a la del gen *16S*.

### **Construcción del plásmido pRojo y transformación de *A. brasilense* Sp245**

Para optimizar la visualización sobre las raíces de *A. brasilense* Sp245, Faj009 y Faj164 al microscopio de epifluorescencia, las cepas fueron transformadas con un plásmido que expresa la proteína fluorescente dsRed, que se llamó pRojo.

Para la construcción del plásmido pRojo se digirió el plásmido pME3280 (Koch et al. 2001) con BamHI, se purificó el fragmento conteniendo la región *mob* y se ligó en el pME7134 previamente tratado con la misma enzima y desfosforilado. pME7134 es un plásmido de amplio rango de hospedante y estable (origen de replicación pVS1) que lleva un cassette de expresión del gen dsRedT3\_S4T bajo el control del promotor *tac* (Pagnussat y col., resultados no publicados). pRojo es una versión movilizable de pME7134 y tiene un cassette de resistencia a Tetraciclina.

Las cepas de *A. brasilense* fueron transformadas por conjugación tri-parental, utilizando el plásmido helper de conjugación pRK600.

### **Preparación de los inóculos**

Cepas de *A. brasilense* transformadas con el plásmido pRojo fueron crecidas en placa de ARC con 25 mg/ml de tetraciclina para Sp245 y 25 mg/ml de tetraciclina más 25 mg/ml Kanamicina para Faj009 y Faj164, durante 4 días a 32°C. Luego se tomaron colonias de las placas RC, se colocaron en 100 ml de medio OA (anexo 1) y se crecieron durante 18 hs en agitación (100 rpm) a 32°C. Pasado ese periodo se determinó la  $DO_{540nm}$ , se centrifugaron los cultivos a 4000 g por 10 min, los pellet se lavaron con buffer fosfato 66 mM y se ajustaron los cultivos a  $DO_{540nm} = 1,5$ . Posteriormente los cultivos fueron diluidos 1/100 en 3 ml de agua con nitrato 13,8 mM. Se tomó una alícuota de esta dilución y se determinaron las UFC.ml<sup>-1</sup> a fin de corroborar el número inicial del inóculo.

### **Ensayos de formación de biopelículas sobre raíces**

Semillas de tomate variedad ACE 55 fueron desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio 50%  $V/V$  durante 4 min. Luego fueron enjuagadas con abundante agua estéril. Posteriormente fueron colocadas en placas con Phytigel 0,6% e incubadas en cámara a 25°C con período de luz de 16 hs, durante 7 días. Posteriormente, las plántulas fueron retiradas y colocadas en tubos de ensayos que contenían 3 ml de agua con nitrato 13,8 mM y  $1 \times 10^7$  bacterias de cada cepa. Los tubos con las plántulas fueron incubados en cámara por dos días.

**Microscopia:** 2 días post inoculación, las raíces fueron cortadas y separadas de las plántulas con bisturí, montadas con agua en un porta objetos, y observadas directamente con un microscopio de luz UV Olympus BX61 (filtro ex. BP545-580nm; filtro barrera BA610<sub>nm</sub>). Las imágenes fueron adquiridas con una cámara Olympus DP71, conectada a una computadora y controlada por el software Image Pro 6.1.

**Cálculo de UFC.g<sup>-1</sup> de peso fresco de raíz:** se tomaron entre 6 y 7 raíces para lograr muestras de 0,05 g y se colocaron en 450  $\mu$ l de buffer fosfato, se trituraron y homogeneizaron y se realizaron diluciones seriadas en buffer fosfato. Se sembraron 10  $\mu$ l de cada dilución en una placa ARC con los correspondientes antibióticos. Las placas se incubaron a 32°C durante 4-5 días.

### **Diseño experimental**

Se utilizaron 2 a 6 réplicas biológicas en 2 o 3 ensayos independientes, según el experimento. Para los ensayos de plántulas se utilizaron 15 plántulas por tratamiento. Se realizó ANOVA con posterior test de Tukey o LSD, según correspondiera. Las medias también se compararon mediante test de t-Student. El test que se realizó en cada ensayo se indica en la leyenda de cada figura. Se utilizó el software R (2.14.2).

# Resultados

### Crecimiento y formación de biopelícula por *A. brasilense* Sp245 y sus mutantes

Se estudió el crecimiento estático y la formación de biopelícula en *A. brasilense* Sp245 y sus mutantes: Faj164 (mutante en la producción de NO) y Faj009 (mutante en la producción de auxinas). Para ello, las cepas se crecieron en forma estática en medio Nfb suplementado con nitrato durante 11 días. El crecimiento total (bacterias planctónicas más adheridas) a los 2, 5 y 11 días, estimado por turbidez y por UFC.ml<sup>-1</sup> se muestra en las Figuras 1.3 y 1.4, respectivamente.

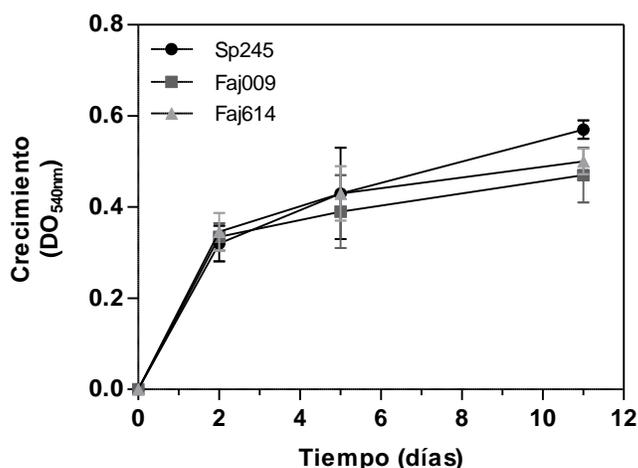


Figura 1.3: Crecimiento estático de *A. brasilense* Sp245, Faj009 y Faj164. *A. brasilense* Sp245, Faj009 y Faj164 fueron crecidas en placa de 96 pocillos sin agitación en medio Nfb NO<sub>3</sub> durante 2, 5 y 11 días. El crecimiento total (células planctónicas más adheridas) fue determinado (DO<sub>540nm</sub>). Se muestra la media con sus desvíos estándar de 3 ensayos independientes, con 3 réplicas cada uno.

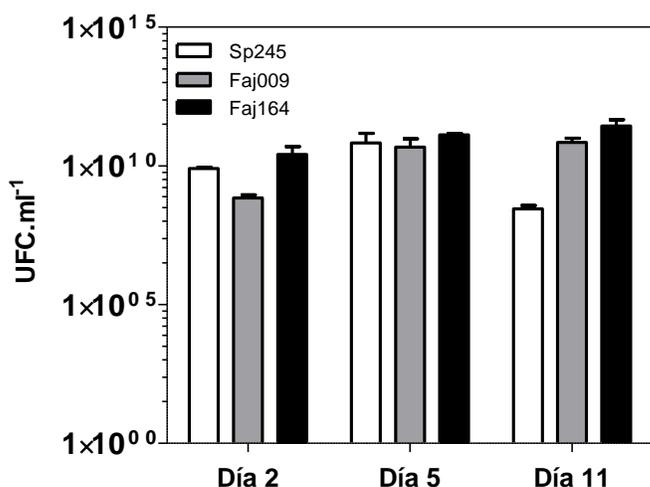
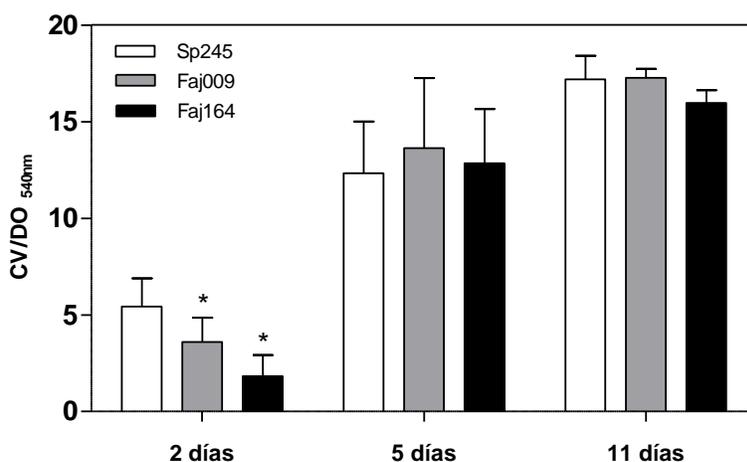


Figura: 1.4: Unidades formadoras de colonias de *A. brasilense* a los 2, 5 y 11 días de crecimiento estático. Las cepas Sp245, Faj009 y Faj164 fueron crecidas en placa de 96 pocillos sin agitación durante 2, 5 y 11 días. El crecimiento total (células planctónicas más adheridas) se determinó calculando las UFC/ml para cada cepa. Se muestra la media con sus desvíos de 2 ensayos independientes con 2 réplicas cada uno.

El crecimiento estático de *A. brasilense* Sp245 y las mutantes, Faj009 y Faj164, fue similar a los 2 días alcanzando una densidad óptica aproximada de 0,35. Con el tiempo de cultivo, las tres cepas aumentaron gradualmente el crecimiento, observándose una leve diferencia a los once días, momento en el cual la cepa salvaje (Sp245) mostró mayor crecimiento que las mutantes (Fig. 1.3). Paralelamente se realizaron recuentos de viables a través de las UFC. ml<sup>-1</sup> correspondientes a cada tiempo (Fig. 1.4). El número de UFC. ml<sup>-1</sup> a los 2 días fue levemente menor para Faj009, sin embargo entre los 2 y los 5 días las UFC. ml<sup>-1</sup> aumentaron en las tres cepas, manteniéndose constante hasta los 11 días en las cepas mutantes, indicando que a los 5 días todas las cepas habían alcanzado su máximo crecimiento. Contrariamente a las cepas mutantes, Sp245 mostró una disminución en las UFC a los once días, indicando una disminución en la viabilidad celular (Fig. 1.4).

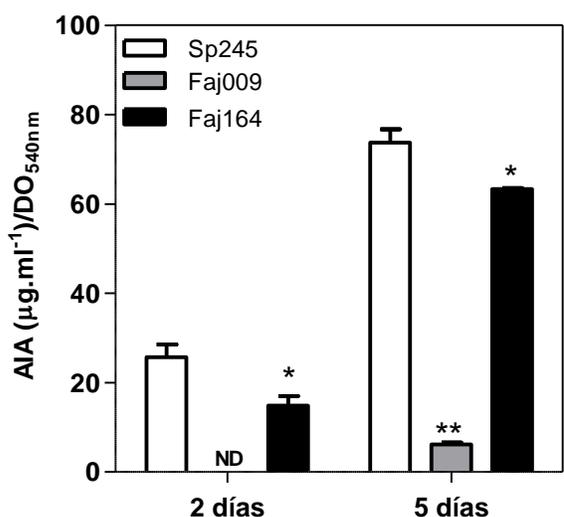
Por otro lado, se analizó la formación de biopelícula en los mismos tiempos que se se determinó el crecimiento. A los 2 días las cepas mutantes formaron significativamente menos biopelícula que Sp245, siendo Faj164 la cepa que formó menos biopelícula. La formación de biopelícula aumentó a los 5 y aún más a los 11 días y no se observaron diferencias significativas entre las cepas en ninguno de estos dos momentos (Fig. 1.5).



**Figura 1.5: Formación de biopelícula en *A. brasilense* Sp245 y mutantes isogénicas Faj009 y Faj164.** Formación de biopelícula en Nfb-NO<sub>3</sub> a los dos, cinco y once días de las cepas Sp245, Faj009 y Faj164. Se determinó la formación de biopelícula por cristal violeta (CV), los valores fueron normalizados por el crecimiento total. Los valores corresponden a las medias mas desvío estandar de 3 ensayos independendientes con 3 replicas cada uno. \*indica diferencias significativas entre las cepas al mismo tiempo basado en ANOVA y Test de Tukey (P<0,05).

### Contenido de AIA y nitritos en la biopelícula

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, demostraron que en condiciones de crecimiento estático la formación de biopelícula y la producción de NO por Faj164 es marcadamente menor en comparación con la cepa salvaje, y que este metabolito es necesario para iniciar la formación de la biopelícula de *A. brasilense* (Arruebarrena Di Palma *et al.* 2013). El hecho de que la cepa mutante en la producción de auxinas, Faj009, haya formado menos biopelícula que la cepa salvaje, podría indicar la participación de este metabolito, además del NO, en el proceso. Para evaluar esta posibilidad, se determinó la concentración de auxinas en el sobrenadante de las biopelículas.



**Figura 1.6: Concentración de auxinas en la biopelícula de *A. brasilense* Sp245, Faj009 y Faj164.** Se determinó el contenido de auxinas (AIA) en el sobrenadante de las biopelículas Sp245, Faj009 y Faj164 a los 2 y 5 días mediante el método de Salkowski. Los valores obtenidos fueron normalizados en relación al crecimiento total (DO 540<sub>nm</sub>). Los valores corresponden a las medias más desvíos estándar de 3 ensayos independientes con 3 réplicas cada uno. \*, \*\* Indican diferencias significativas entre cepas dentro del mismo día basado en ANOVA y test de Tukey (P<0,05). ND; no detectado.

La determinación del contenido de AIA en el sobrenadante de las biopelículas mostró que a los 2 días la cepa salvaje (Sp245) acumula significativamente mayor contenido de AIA que la cepa mutante Faj164; al 5<sup>to</sup> día todas las cepas aumentaron marcadamente el contenido de AIA, sin embargo la diferencia entre ellas se mantuvo (Fig. 1.6). Como era de esperar no se detectó producción de AIA por la cepa Faj009 a los 2 días. Sin embargo, a los 5 días sí hubo producción de AIA por la Faj009, aunque en concentración considerablemente menor que las otras cepas estudiadas (Fig. 1.5).

La diferencia encontrada en el contenido de AIA entre la mutante en la producción de NO (Faj164) y la cepa salvaje, podría indicar una relación entre la producción de NO y de AIA en *A. brasilense*. Por lo tanto, se determinó la producción de nitrito (como estimador indirecto de la producción de NO) a los 2 y 5 días.

A los 2 días la producción de nitritos en el sobrenadante de la cepa mutante en AIA, Faj009, fue significativamente menor que en el de la cepa salvaje registrándose 13,47  $\mu\text{moles.ml}^{-1}$  y 18  $\mu\text{moles.ml}^{-1}$ , respectivamente, mientras que en Faj164 no se detectó producción alguna (Tabla 1.1). Al día 5 el contenido de nitritos disminuyó en Sp245 mientras que en Faj009 se mantuvo igual; por el contrario, en Faj164 la producción de nitritos aumentó obteniéndose valores similares a los de la cepa salvaje (Tabla 1.1). Los resultados obtenidos en este ensayo indican nuevamente que existiría una relación entre la producción de nitritos, la de AIA y la formación de biopelícula a los 2 días. La menor formación de biopelícula por parte de las cepas mutantes, se corresponde con una menor producción de nitritos (NO) y nula de AIA en Faj009, y un menor contenido de AIA y escasa producción de nitritos en Faj164 (Fig. 1.5, 1.6 y Tabla 1.1).

**Tabla 1.1: Producción de nitrito en la biopelícula de *A. brasilense*.** Se determinó la producción de nitritos en el sobrenadante de la biopelícula de Sp245, Faj009 y Faj164 a los 2 y 5 días. Los valores obtenidos fueron normalizados en relación al crecimiento total ( $\text{DO } 540_{\text{nm}}$ ). Los valores corresponden a las medias y desvíos estandar de 3 ensayos independendientes con 3 replicas cada uno. \*Indica diferencias significativas respecto de la cepa salvaje al mismo tiempo basado en Test de Student ( $P < 0,05$ ). Nd; no detectado.

Producción de nitrito ( $\mu\text{moles.ml}^{-1}$ )		
Cepa	Día 2	Día 5
Sp245	18,88 $\pm$ 1,79	13,18 $\pm$ 3,55
Faj009	13,37 $\pm$ 2,17*	12,61 $\pm$ 5
Faj164	Nd	14,75 $\pm$ 3,3

Debido a que todas las cepas a los 2 días crecieron de igual forma y las diferencias más marcadas en la formación de biopelícula, el contenido de AIA y la producción de nitrito se observó en ese momento, se decidió evaluar el resto de los parámetros de estudio en ese tiempo.

**Crecimiento, formación de biopelícula y contenido de AIA en medios suplementados con amonio.**

Se evaluó el efecto del crecimiento en amonio, condición en que la producción de NO no está favorecida, sobre la formación de biopelícula y la producción de AIA. En medio con amonio como fuente de N el crecimiento fue similar para las tres cepas y no se observaron diferencias en la formación de biopelícula al tiempo ensayado (Fig. 1.7 A y B). Concordando con lo reportado previamente por Arruebarrena et al. (2013), la formación de biopelícula en medio con amonio fue considerablemente menor (10 veces) que la obtenida en nitrato (Fig. 1.5 y 1.7 B). Por otro lado, el contenido de AIA en el sobrenadante fue similar para Sp245 y Faj164, mientras que en Faj009 la producción de AIA fue significativamente menor (Fig. 1.7 C). Cabe destacar que en estas condiciones no se detectó producción de nitrito en ninguna de las cepas estudiadas.

Los resultados obtenidos sugieren que las diferencias en la formación de biopelícula y en la producción de AIA, se observan en medios suplementados con nitrato, donde está favorecida la producción de NO.

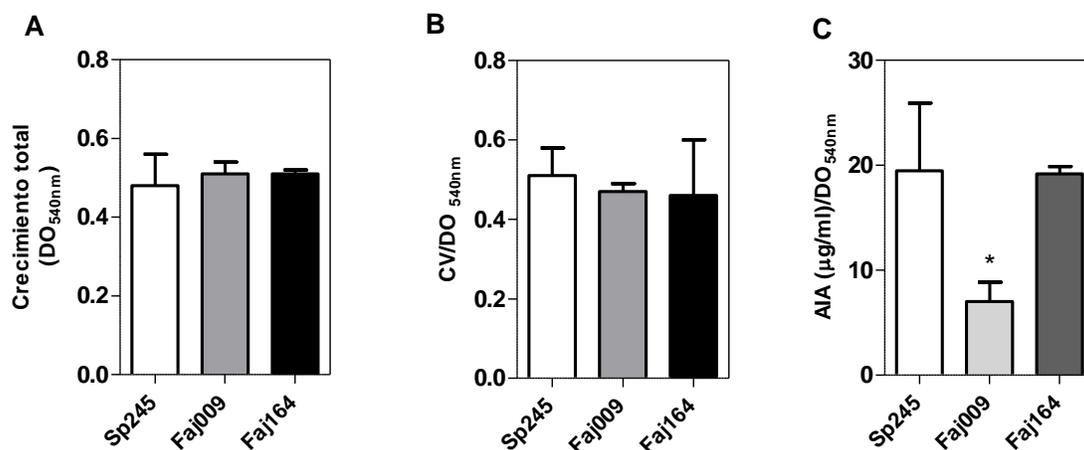


Figura 1.7: Crecimiento estático, formación de biopelícula y contenido de AIA en Sp245 y sus mutantes Faj009 y Faj164 en medio Nfb amonio. Las bacterias fueron crecidas en placa de 96 pocillos sin agitación por 2 días en medio Nfb amonio. Se determinó el crecimiento total (plantónicas más adheridas) por DO<sub>540nm</sub> (A), la formación de biopelícula por CV (B), y el contenido de AIA en el sobrenadante por Salkowski (C). \*indica diferencias significativas basado en un ANOVA y test de Tukey (P<0,05).

### **Formación de biopelícula frente al agregado exógeno de dadores de NO y auxina sobre la biopelícula**

Con el objetivo de evaluar los efectos del NO y la auxina sobre la posibilidad de reversión de una deficiente formación de biopelícula en las mutantes, se realizaron ensayos con agregado de diferentes concentraciones de dadores de NO (SNP y GSNO) y de ácido 3-indolacético sintético (AIA).

Cabe destacar que ninguna de las concentraciones ensayadas de ambos tipos de moléculas reguladoras modificó el crecimiento de las cepas a los 2 días (datos no mostrados).

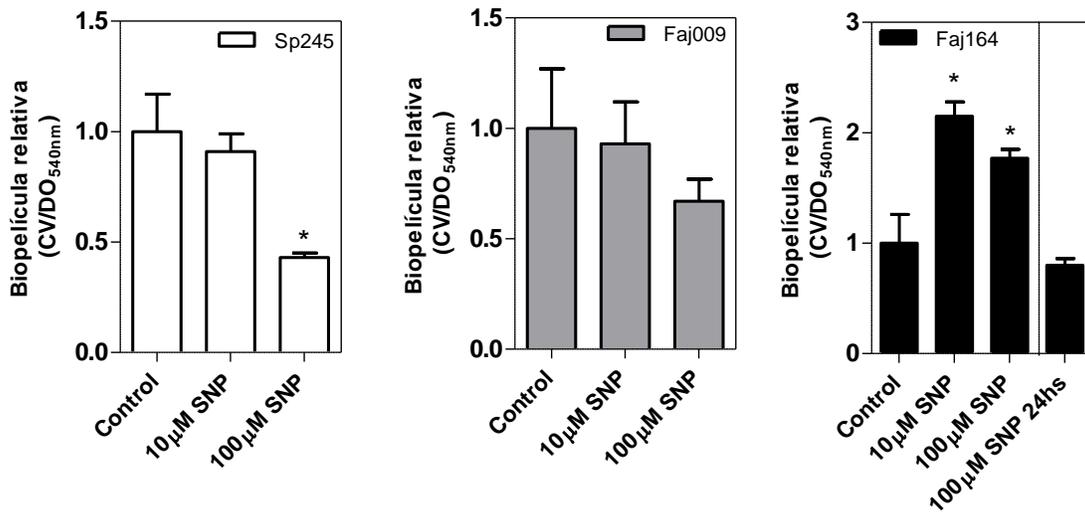
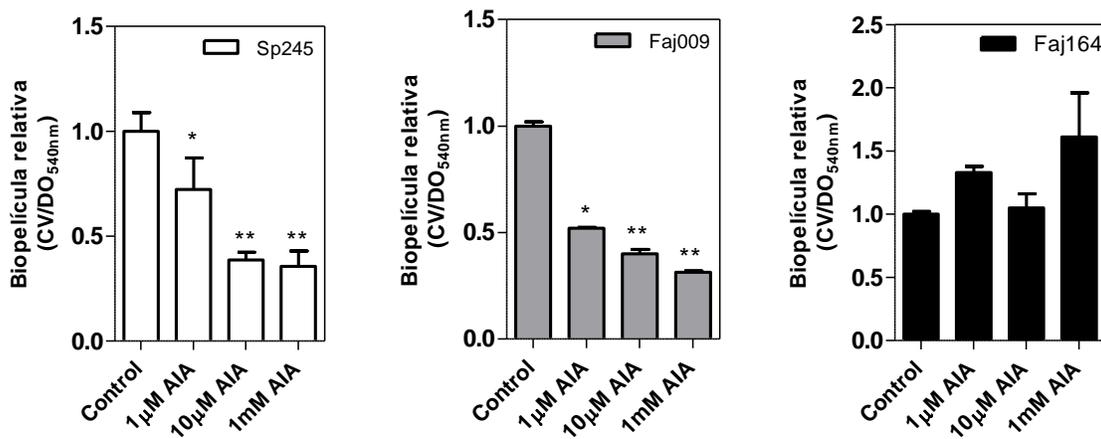
En primer lugar, evaluó el efecto del agregado exógeno de distintas concentraciones de los dadores de NO: SNP y GSNO. La adición de 10 µM de SNP no afectó la formación de biopelícula en la cepa salvaje, sin embargo 100 µM de SNP la disminuyó aproximadamente un 50% (Fig. 1.8 A). Para la mutante Faj009, el comportamiento frente a las diferentes concentraciones de SNP fue similar a la de la cepa salvaje, en donde 10 µM de SNP no alteró la formación de biopelícula pero 100 µM la

disminuyó (Fig. 1.8 A). Por el contrario, en la mutante deficiente en la producción de NO, Faj164, el agregado de 10 y 100  $\mu\text{M}$  de SNP indujo una formación de biopelícula significativamente mayor, 100 y 80% respectivamente, para cada concentración del dador respecto al control sin el agregado de SNP (Fig. 1.8 A). El control con el agregado de SNP envejecido por 24hs no promovió la formación de biopelícula en Faj164 (Fig. 1.8 A), por lo que se descarta que el aumento de la biopelícula provocado por SNP se deba a un subproducto liberado por este dador de NO. Cabe destacar que el dador de NO: SNP, libera una concentración efectiva 1000 veces menor de NO que la concentración del dador utilizada (Barraud et al. 2006), por lo que una concentración de 10  $\mu\text{M}$  de SNP libera aproximadamente 10nM de NO.

En cuanto a los experimentos realizados con el dador GSNO, las concentraciones utilizadas en este ensayo (1  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  y 1 mM), no tuvieron efecto en revertir la deficiencia en la formación de biopelícula en Faj164 (datos no mostrados).

Por otra parte, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de AIA sobre la formación de biopelícula (Fig. 1.8 B). El agregado de AIA desde el comienzo del ensayo provocó que las cepas Sp245 y Faj009 formaran menos biopelícula respecto de su control sin AIA, esta disminución fue mayor a medida que aumentaba la concentración de AIA, observándose la mayor disminución de la formación de biopelícula en 10  $\mu\text{M}$  y 1 mM (Fig. 1.8 B). Por el contrario, en la cepa Faj164, ninguna concentración de AIA utilizada modificó la formación de la biopelícula (Fig. 1.8 B). Los resultados obtenidos con el agregado de AIA muestran un efecto de disminución en la formación de biopelícula en la cepas salvaje y deficiente en AIA, pero no en la cepa deficiente en la producción de NO.

En base a estos resultados, se decidió continuar con 10  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  de SNP y 1 mM de AIA, debido a que en estas concentraciones se observaron los efectos más marcados sobre la formación de biopelícula en las distintas cepas.

**A****B**

**Figura 1.8: Efecto del agregado exógeno de SNP y AIA sobre la formación de biopelícula en *A. brasilense*.** *A. brasilense* Sp245, Faj009 y Faj164 fueron crecidas en placa de 96 pocillos con Nfb NO<sub>3</sub> más el agregado de 10 μM o 100 μM de SNP (A) o 100 μM de SNP envejecido por 24hs (A, para el caso de Faj164) o 1 μM, 10 μM ó 1 mM de AIA (B). En ambos casos se determinó la formación de biopelícula por CV a los 2 días de iniciado el experimento. Los datos fueron relativizados al control de cada cepa. Se muestra la media con sus desvíos de 3 ensayos independientes con tres replicas biológicas cada uno. \*, \*\* indica diferencias significativas entre tratamientos basado en un Anova y test de Tukey (P<0,05).

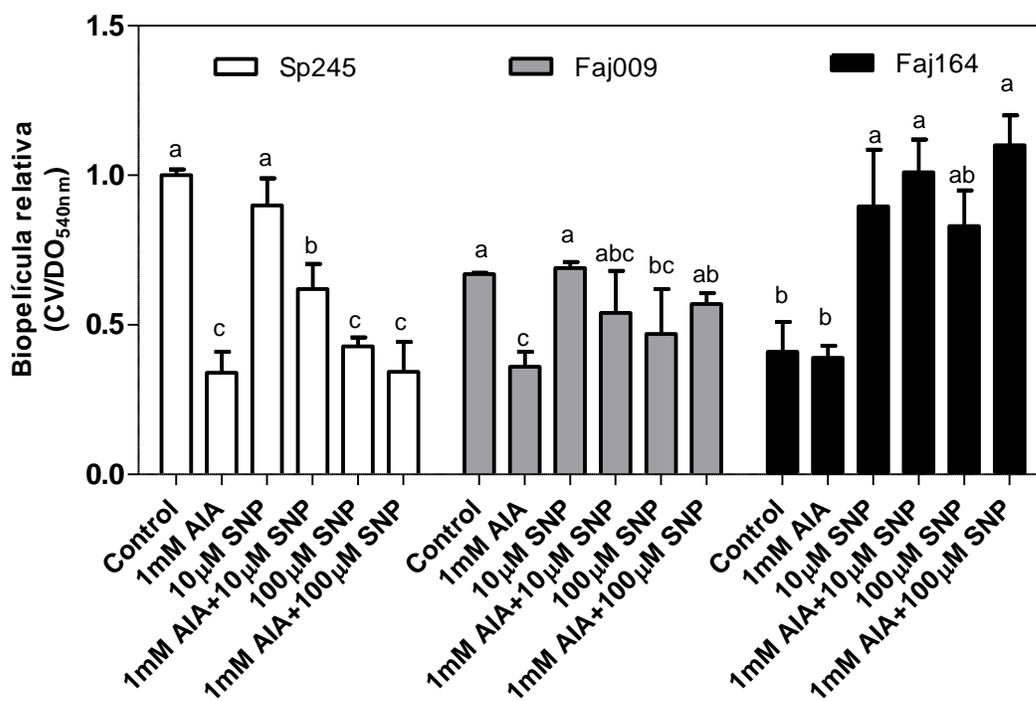
A continuación se estudió el efecto del agregado conjunto de SNP y AIA sobre la formación biopelícula a los 2 días.

Como se mencionó previamente, el agregado de 1 mM de AIA provocó una disminución en la formación de biopelícula de Sp245, mientras que la adición de SNP 10  $\mu$ M no tuvo efecto marcado sobre la misma (Fig. 1.9). Cuando se agregó AIA 1 mM y SNP 10  $\mu$ M en forma conjunta, se observó una menor formación de biopelícula respecto del control, pero mayor que la observada en el tratamiento solo con AIA. Este resultado permitiría suponer que el NO producido por SNP 10  $\mu$ M, contrarrestaría el efecto del AIA en disminuir la biopelícula. Sin embargo, a una concentración mayor de SNP (100  $\mu$ M), la cepa salvaje formó menos biopelícula igualando la cantidad que se forma en presencia de AIA 1 mM (Fig. 1.9). Finalmente, el tratamiento con 100  $\mu$ M de SNP y 1 mM de AIA conjuntamente, disminuyó la biopelícula (Fig. 1.9)

La cepa mutante Faj009 tuvo un comportamiento similar al observado en la cepa salvaje frente al agregado de los distintos metabolitos (Fig. 1.9).

En Faj164 el AIA no tuvo efecto sobre la formación de biopelícula, mientras que el agregado SNP 10 y 100  $\mu$ M indujo la formación de más biopelícula respecto de su control (aproximadamente el doble), alcanzando niveles cercanos a los de de la cepa salvaje. El agregado de AIA mas SNP (10 ó 100  $\mu$ M) provocó un aumento en la formación de biopelícula similar al obtenido con SNP solo. Estos resultados indican que el AIA no tendría el efecto de disminuir la formación de biopelícula en esta bacteria (Fig. 1.9).

Las evidencias presentadas en estos ensayos indican un efecto opuesto del NO y del AIA sobre la formación de biopelícula de *A. brasilense*. De este modo, el NO (en bajas concentraciones, 10 nM) promovería la formación de biopelícula y el AIA (1 mM) disminuiría la formación de la misma.



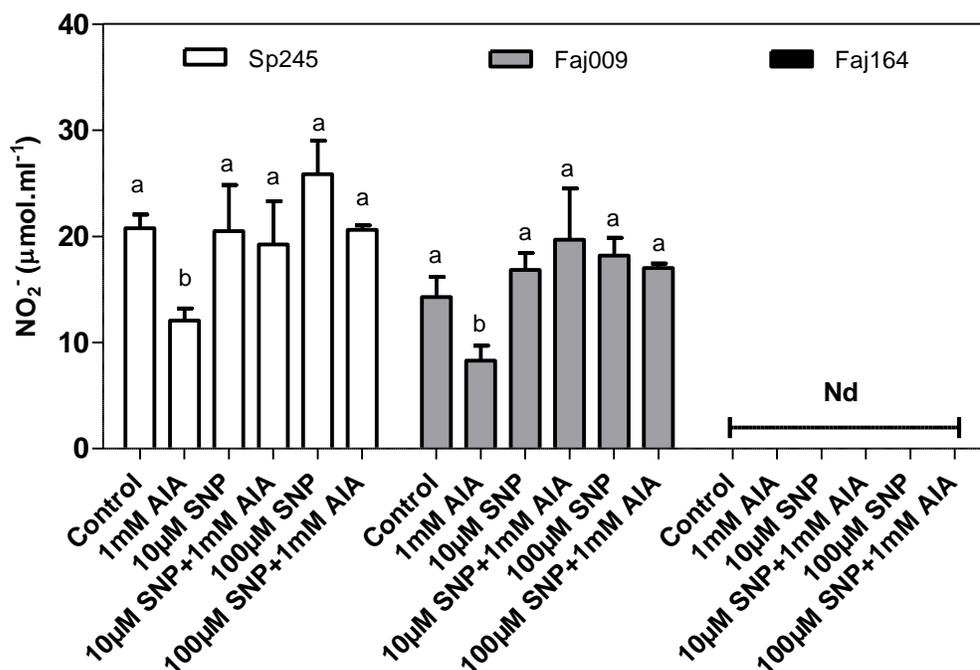
**Figura 1.9: Efecto del agregado exógeno de SNP y AIA sobre la formación de biopelícula de *A. brasilense*.** Sp245, Faj009 y Faj164 fueron crecidas en placa de 96 pocillos por 2 días en Nfb NO<sub>3</sub> en presencia de SNP, AIA o SNP y AIA. Se determinó la formación de biopelícula por cristal violeta. Los datos fueron relativizados al control de Sp245. Se muestra la media con sus desvíos de 4 ensayos independientes con tres replicas biológicas cada uno. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de la misma cepa en base a un ANOVA y posterior test LSD ( $p > 0,05$ ).

### **Producción de nitritos, NO y contenido de AIA en la biopelícula frente al agregado exógeno de SNP y AIA**

Con el objetivo de evaluar si el agregado exógeno del dador de NO y de AIA sintética modifican la producción propia de NO y de AIA por la bacteria, se determinó la producción de nitrito (estimador indirecto del NO), de NO y el contenido de auxinas en el sobrenadante de las biopelículas en los distintos tratamientos.

Las determinaciones de nitrito mostraron, que a los 2 días de crecimiento estático, la cepa Sp245 acumula mayor cantidad de nitrito que su mutante en la producción de AIA (Faj009), mientras que en la cepa mutante Faj164, como es esperado, no se detectó producción de este metabolito, en ninguna condición ensayada (Fig.1.10). El agregado de 1 mM de AIA produjo una disminución en la producción de nitrito en los sobrenadantes de

las biopelículas, tanto en la cepa salvaje como en la mutante Faj009 (Fig. 1.10). La adición de 10  $\mu\text{M}$  de SNP a los cultivos estáticos de Sp245, no modificó el contenido de nitritos respecto de su control, este valor tampoco se vio modificado cuando se añadió 10  $\mu\text{M}$  de SNP y 1 mM de AIA conjuntamente (Fig. 1.10). El resto de los tratamientos no modificó la producción de nitritos respecto del control. De la misma manera, para la cepa Faj009 no se observaron diferencias en la producción de nitritos en los tratamientos solo con SNP, o con SNP y AIA juntos, respecto del control sin tratar (Fig. 1.10).



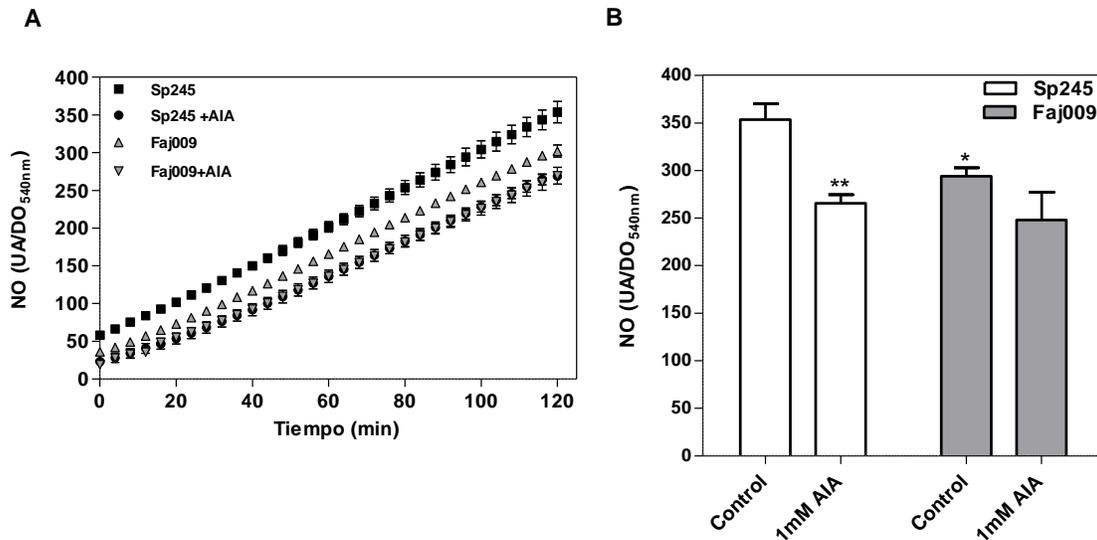
**Figura 1.10: Efecto del agregado exógeno de SNP y AIA sobre la producción de nitrito en *A. brasilense*.** Sp245, Faj009 y Faj164 fueron crecidas en placa de 96 pocillos en Nfb  $\text{NO}_3^-$  por 2 días en presencia de SNP, AIA o SNP y AIA. Se determinó la producción de nitrito en el sobrenadante de las biopelículas mediante un electrodo específico. Los valores obtenidos de  $\text{NO}_2^-$  fueron normalizados en relación al crecimiento total ( $\text{DO } 540_{\text{nm}}$ ). Se muestra la media con sus desvíos de 2 ensayos independientes con tres replicas biológicas cada uno. Nd: no detectado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de la misma cepa basado en un ANOVA y test LSD ( $P < 0,05$ ).

Los resultados obtenidos indican que el agregado exógeno de 1 mM de AIA produjo una disminución en la producción de nitritos tanto de Sp245 y de Faj009, mientras que el SNP no la modificó. Sin embargo, cuando ambos compuestos se

agregaron juntos, el contenido de nitritos no se modificó, indicando que el SNP contrarrestó el efecto del AIA.

Además de determinar los nitritos como medida indirecta de la producción endógena de NO frente al agregado de AIA, se cuantificó fluorométricamente la producción de NO en la biopelícula de 2 días en medio con nitrato. Inicialmente, se determinó la cinética de producción de NO durante un periodo de 2 hs en las biopelículas, se observó que fueron similares en Sp245 y Faj009, tanto en presencia como en ausencia de AIA (Fig. 1.11 A). Las tasas máximas de producción de NO fueron de 2.5 UA NO.min<sup>-1</sup> para Sp245 y 2.2 UA NO.min<sup>-1</sup> para Faj009. Con el agregado de AIA las tasas máximas de producción correspondieron a 2.0 UA NO.min<sup>-1</sup> para Sp245 y Faj009 (Fig. 1.11 A). La producción neta de NO fue significativamente mayor en Sp245 que en Faj009 (Fig. 1.11 B). El agregado de AIA exógeno provocó una disminución en la producción neta de NO en Sp245 y también en Faj009, aunque en menor medida (Fig. 1.11 B). En la cepa Faj164 no se detectó producción de NO. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en las determinaciones del contenido de nitritos (Fig. 1.10).

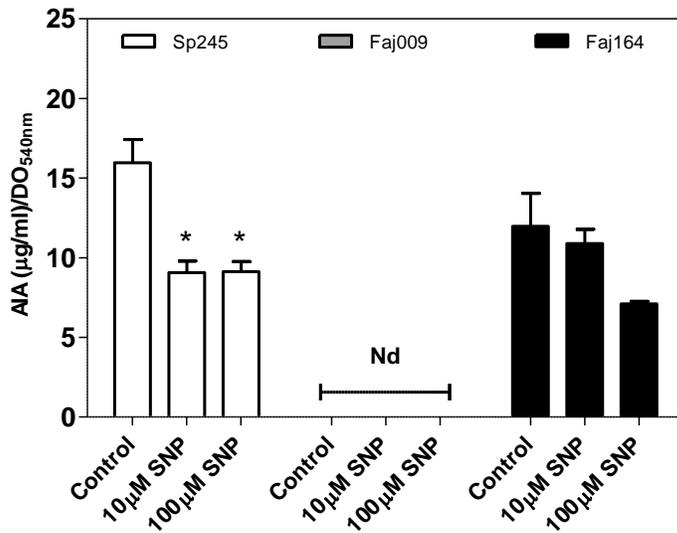
Las diferencia en la tasa de producción de NO en Sp245 indica que el agregado de AIA provocó una disminución en la producción de NO endógeno .



**Figura 1.11: Producción de NO por *A. brasilense* Sp245 y Faj009 cuantificada fluorométricamente.** 100  $\mu$ l de cultivos crecidos por 2 días de forma estática en  $\text{Nfb NO}_3^-$  fueron incubados en placa de 96 pocillos con 10  $\mu$ M de la sonda fluorescente DAF-2DA. La intensidad de la fluorescencia fue medida con un lector de placas (Fluoroskan Ascent) usando filtros de excitación a 480 nm y de emisión a 525 nm. A) Cinéticas de producción de NO de las biopelículas determinadas cada 4 min durante 2 hs de incubación con 0 o 1 mM AIA. Los valores de fluorescencia fueron relativizados al crecimiento ( $\text{DO}_{540\text{nm}}$ ) B) Producción neta de NO con o sin AIA 1 mM, los niveles de NO se determinaron luego de 2 hs de incubación con la sonda. Se representa la media  $\pm$  desvío estándar de tres mediciones. UA: unidades arbitrarias de fluorescencia. Las medias se compararon mediante un test de Student ( $P < 0,05$ ). \*Indica diferencias significativas entre Sp245 y Faj009 (condición control). \*\*indica diferencias significativas entre cada condición para una misma cepa.

Por otro lado, el agregado exógeno de 10 y 100  $\mu$ M del dador de NO, provocó en la cepa salvaje una disminución significativa del contenido de AIA respecto del control (Fig. 1.12). En cuanto a la cepa Faj164, que posee menor contenido de AIA respecto de la cepa salvaje, el agregado de 10  $\mu$ M SNP solo disminuyó levemente el contenido de AIA, mientras que 100  $\mu$ M produjo una disminución más marcada, aunque no resultó estadísticamente significativa (Fig. 1.12).

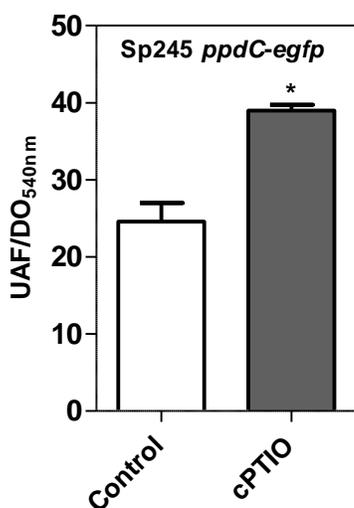
Estos últimos resultados indicarían que tanto el AIA como el NO, agregados exógenamente, no solo tienen la capacidad de modificar la formación de biopelícula, sino también de ejercer efecto sobre la producción de AIA y de nitritos propia de la bacteria.



**Figura 1.12: Efecto del agregado de SNP sobre el contenido de AIA en las biopelículas. *A. brasilense*.** Sp245, Faj009 y Faj164 fueron crecidas en placa de 96 pocillos por 2 días en NFb NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en presencia de 10 o 100 µM de SNP. Se determinó el contenido de AIA en el sobrenadante de las biopelículas mediante Salkowski. Los valores obtenidos de AIA fueron normalizados en relación al crecimiento total (DO<sub>540nm</sub>). Se muestra la media con sus desvíos de 2 ensayos independientes con tres replicas biológicas cada uno. \*indica diferencias significativas entre tratamientos dentro de la misma cepa basado en ANOVA y test de Tukey (P<0,05). Nd: no detectado.

### **Regulación del promotor del gen *ipdC* frente al agregado de secuestrante de NO, cPTIO**

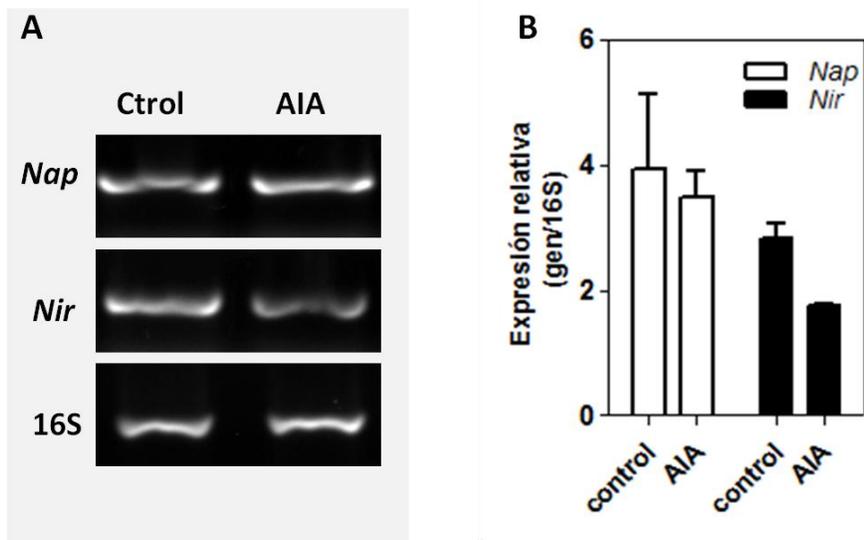
El agregado exógeno de NO disminuyó el contenido de AIA en *A. brasilense* (Fig. 1.12), en base a esto se decidió evaluar el efecto del NO sobre la síntesis de AIA. Para ello se realizó un análisis de expresión del promotor del gen *ipdC*. Se utilizó una cepa de *A. brasilense* Sp245 que contiene un plásmido con el promotor del gen *ipdC* fusionado a *egfp* (PppdC) (Combes-Meynet et al. 2011). Se evaluó la intensidad de fluorescencia en la biopelícula de dos días en medios con nitrato en ausencia o presencia del secuestrante de NO: cPTIO. Las determinaciones de fluorescencia indicaron que la expresión de Sp245 *ppdC* aumentó significativamente en presencia de 1 mM de cPTIO (Fig. 1.13). Paralelamente, se realizó el recuento de UFC para descartar un efecto de cPTIO sobre la viabilidad bacterias. El recuento fue de  $9,4 \times 10^9$  UFC.ml<sup>-1</sup> para Sp245 y  $1,27 \times 10^9$  UFC.ml<sup>-1</sup> para Sp245+cPTIO, si bien estas diferencias no fueron significativas, hay que destacar que un menor número de bacterias en presencia de cPTIO tuvo mayor intensidad de fluorescencia respecto de su control. Estos resultados indican que el NO afecta la expresión del promotor del gen *ipdC*.



**Figura 1.13: Efecto del agregado de cPTIO sobre la regulación de *ppdC-egfp*.** *A. brasilense* Sp245 *PppdC-egfp* fue crecida en placa de 96 pocillos por 2 días en Nfb NO<sub>3</sub> en presencia de 1mM de cPTIO. La intensidad de la fluorescencia fue medida con un lector de placas Fluoroskan, usando filtros de excitación a 480 nm y de emisión a 525 nm. Los valores de fluorescencia fueron relativizados al crecimiento (DO<sub>540nm</sub>). Los valores representan la media ± desvío estándar de tres mediciones. UA: unidades arbitrarias. \*indica diferencias significativas basadas en un test de Student (P<0,05).

### **Efecto del AIA sobre la expresión de genes del metabolismo del NO**

Teniendo en cuenta la menor producción de NO observada en presencia de AIA (Fig. 1.11), se estudió si el agregado exógeno de AIA alteraba la expresión de los genes involucrados en el metabolismo del NO en *Azospirillum*. Para ello se analizó la expresión de los genes correspondientes a la nitrato reductasa periplasmática (*Nap*) y la nitrito reductasa (*Nir*), en forma semicuantitativa en Sp245. Como se puede observar en la figura 1.14 A y B, el agregado de AIA en la biopelícula de 2 días no modificó la expresión del gen *Nap*, mientras que la expresión del gen *Nir* se vio disminuida en presencia de AIA (Fig. 1.14).

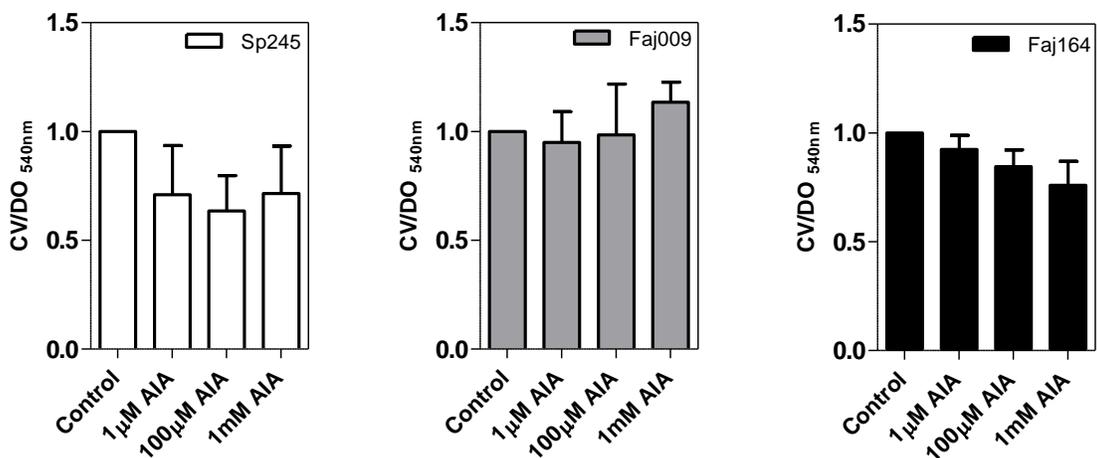


**Figura 1.14: Efecto del agregado de AIA sobre la expresión de genes involucrados en el metabolismo del NO en *A. brasilense*.** La cepa Sp245 fue crecida durante 2 días en placa 96 pocillos en medio Nfb NO<sub>3</sub><sup>-</sup> con el agregado de AIA 1 mM. Se extrajo ARN total de las bacterias adheridas por el método del Trizol y se sintetizó el ADN copia. La carga de ARN para cada RT-PCR fue estandarizada por amplificación del gen de la subunidad pequeña ribosomal (16S). A) Geles de agarosa 1% <sup>p/v</sup>, donde se muestra los distintos amplicones de las distintas RT-PCR para cada gen. B) Expresión de cada gen relativa al control 16S. *Nap*: nitrato reductasa periplasmática, *Nir*: nitrito reductasa.

### **Efecto del AIA sobre la dispersión de la biopelículas**

El agregado exógeno de auxinas produjo una disminución en la biopelícula, lo que indicaría que este metabolito podría disminuir la formación de biopelícula pero también dispersar la biopelícula ya formada. Para establecer si el AIA tiene un efecto dispersante sobre las biopelículas de *A. brasilense*, se evaluó el efecto del agregado de auxina exógena sobre la biopelícula madura. Para ello, se crecieron las cepas de *A. brasilense* en forma estática durante 5 días, al 4<sup>to</sup> día de crecimiento se agregó el AIA y al siguiente día se determinó la biopelícula. En la figura 1.15 se puede observar que el agregado de distintas concentraciones de AIA a Sp245 dispersó la biopelícula. En cuanto a las mutantes, en la cepa Faj009 bajas concentraciones de AIA (1 y 100 μM) no tuvieron efecto sobre la biopelícula, pero 1 mM la aumentó levemente (Fig. 1.15). Por otro lado, en la cepa Faj164 las distintas concentraciones de AIA disminuyeron levemente la biopelícula, observándose el mayor efecto a 1 mM de AIA (Fig. 1.15). Si bien las diferencias observadas no fueron significativas los resultados sugieren que existiría un efecto de dispersión que podría

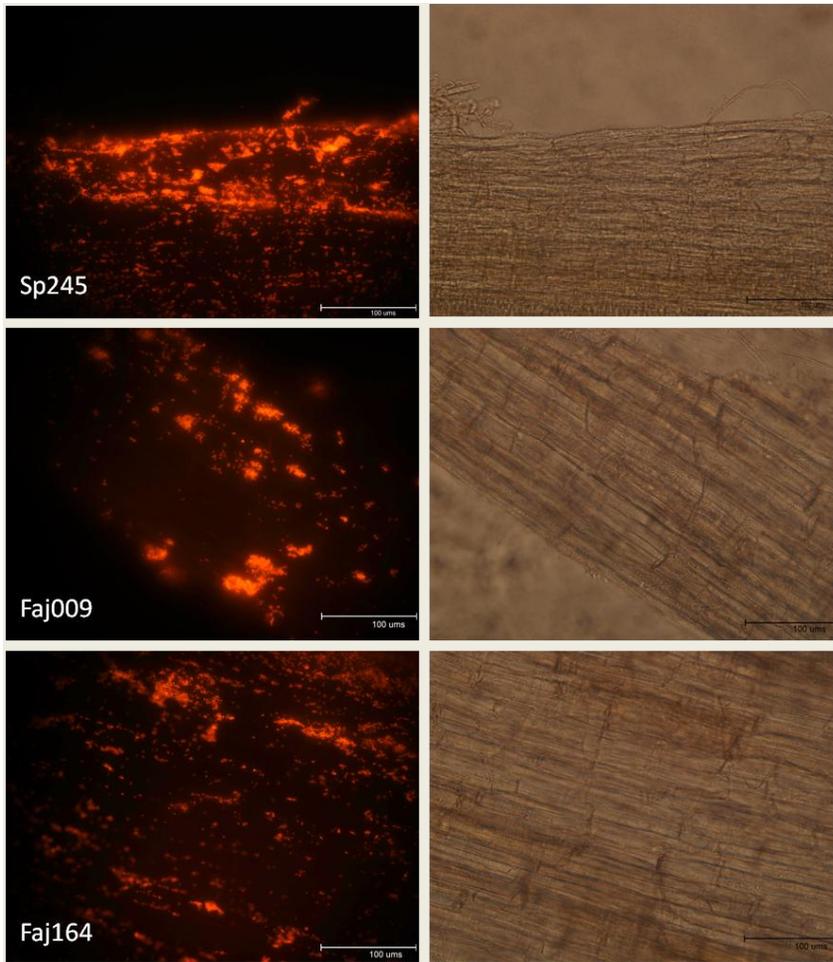
depender de la concentración de AIA en la biopelícula, ya que la mayor dispersión ocurrió en la cepa salvaje, cepa que a este tiempo tiene mayor contenido de AIA (Fig. 1.6).



**Figura. 1.15: Efecto del agregado de auxina exógena sobre la biopelícula madura.** *A. brasilense* Sp245 y sus mutantes Faj009 y Faj164 fueron crecidas en placa de 96 pocillos en Nfb NO<sub>3</sub> sin agitación durante 5 días. Al 4<sup>to</sup> día de crecimiento se agregó 1 μM, 100 μM o 1 mM de AIA, y al día siguiente se determinó la biopelícula formada por cristal violeta. Los datos fueron relativizados al control de cada cepa. Se muestra la media con sus desvíos de 3 ensayos independientes con tres replicas biológicas cada uno.

### **Formación de biopelícula sobre raíces de plántulas de tomate**

Por último, se analizó la capacidad de las cepas de formar biopelícula sobre la raíz. Como puede verse en la figura 1.16 las tres cepas colonizaron y formaron biopelículas sobre la raíz en 2 días, observándose cúmulos de células en las raíces colonizadas principalmente por Sp245 y Faj009, mientras que en Faj164 si bien se observó una gran cantidad de bacterias, estas estaban más dispersas sobre la superficie de la raíz (Fig. 1.16). Tampoco se observaron diferencias en el patrón de colonización, las tres cepas colonizaron principalmente el ápice y la superficie media de la raíz. Por otro lado, en las raíces inoculadas el número de UFC.g<sup>-1</sup> estuvo en el rango de 10<sup>9</sup> bacterias.g<sup>-1</sup> indicando que la colonización fue efectiva para las tres cepas (1x10<sup>9</sup> bacterias.g<sup>-1</sup> para Sp245, 5x10<sup>9</sup> bacterias.g<sup>-1</sup> para Faj009 y 3,63 x10<sup>9</sup> bacterias.g<sup>-1</sup> para Faj164).



**Figura 1.16: Formación de biopelículas sobre raíces de plántulas de tomate.** La capacidad de las cepas de *A. brasilense* de formar biopelículas fue evaluada mediante microscopia de fluorescencia. Las plántulas fueron colocadas en tubos conteniendo agua con 13,8 mM  $\text{NO}_3^-$  y  $1 \times 10^7$  bacterias. $\text{ml}^{-1}$  de cada cepa. Luego de 2 días las plantas fueron retiradas y las raíces observadas al microscopio. El panel de la izquierda corresponde al campo de fluorescencia, mientras que el de derecha al campo claro. La barra en cada foto representa 100 $\mu\text{m}$ .

## **Discusión**

Ciertas características de las PGPR son importantes para que éstas colonicen en forma eficiente las raíces (Compant et al. 2010; Whipps 2001). Entre estas características, se describen la movilidad bacteriana, el reconocimiento de señales de comunicación planta-bacteria y la producción de EPS, entre otros (Reis y Olivares 2006). La capacidad de formar biopelículas es un proceso clave para la efectiva colonización de la raíz. Las señales que inician el proceso son variables y para el desarrollo de la biopelícula es necesaria la expresión de genes distintos de aquellos necesarios para la vida en cultivo planctónico (Watnick y Kolter 2000). Se ha reportado que hasta un 30% de los genes pueden estar diferencialmente expresados entre condiciones de crecimiento planctónicas y en biopelícula (Solano et al. 2002).

Numerosos estudios en los que se ha focalizado en la acción de las moléculas señal AIA y NO, en forma separada, destacan que ambos reguladores modulan la expresión de genes y la acumulación de moléculas que son parte de las cascadas de señalización (Hu et al. 2010; Kochar y Srivastava 2012; Lambrecht et al. 2000; Molina-Favero et al. 2007; Prusty et al. 2004; Somers et al. 2008; Spaepen et al. 2007). La capacidad de *A. brasilense* de producir dos moléculas señal como el AIA y el NO, que participan en la interacción planta-bacteria está bien establecida (Creus et al. 2005; Molina-Favero et al. 2008; Spaepen et al. 2009b; Spaepen et al. 2007; Vande Broek et al. 1999).

El rol del NO en la regulación de la formación de biopelícula ha sido demostrado (Barraud et al. 2015; Schmidt et al. 2004). Particularmente en *Azospirillum*, se ha reportado que en medios suplementados con nitrato *A. brasilense* forma más biopelícula que en medios con amonio o sin N, en donde se encuentra activa la fijación de nitrógeno (Siuti et al. 2011), y estas diferencias se han atribuido a la producción de NO a partir de nitrato, proceso en el que está implicada la enzima nitrato reductasa periplásmica (Nap) (Arruebarrena Di Palma 2015). Por otra parte, el AIA es considerado una molécula señal en *Azospirillum*, y un componente clave en la interacción planta-microorganismo (Sukumar et al. 2013; Van Puyvelde et al. 2011). Sin embargo, hasta el momento no se había estudiado en esta bacteria, su participación en la formación de biopelícula.

A pesar de que el AIA y el NO pueden no ser necesarios para los procesos fisiológicos esenciales en las bacterias, existen pocos estudios que apuntan hacia una intercomunicación entre AIA y NO (Koul et al. 2015a; Koul et al. 2015b).

En este capítulo se estudió la participación del AIA y el NO durante la formación de biopelícula en *A. brasilense* y la interacción de estas dos moléculas durante ese proceso. Inicialmente se estudió el crecimiento estático y la formación de biopelícula *in vitro* por *A. brasilense* Sp245 y sus mutantes Faj164 (nitrato reductasa periplasmática negativa, Nap<sup>-</sup>) y Faj009 (indol-3-piruvato descarboxilasa negativa, ipdC<sup>-</sup>), a los 2, 5 y 11 días. Los resultados mostraron que en medios suplementados con nitrato, las 3 cepas crecieron de forma estática y fueron capaces de formar biopelícula hasta los 11 días de estudio (Fig. 1.3, 1.4 y 1.5). Si bien el crecimiento fue similar para las tres cepas a todos los tiempos, la formación de biopelícula fue diferente a los 2 días entre la cepa salvaje y sus mutantes. En concordancia con lo reportado por Arruebarrena Di Palma et al. (2013), la cepa Faj164 formó menos biopelícula que Sp245 en medios con nitrato (Fig. 1.5). Asimismo, la cepa Faj009 también formó menos biopelícula que la salvaje, al día 2 (Fig. 1.5). Este último resultado sugiere que el AIA podría estar involucrado directa o indirectamente en la regulación de este proceso.

A los 2 días la determinación del contenido de nitritos y de AIA en los sobrenadantes, mostró que la cepa Faj164 no produjo nitritos y que el contenido de AIA fue significativamente menor que en la cepa salvaje (Fig. 1.6 y Tabla 1.1), mientras que en la cepa Faj009 la producción de nitritos fue menor y no se detectó AIA (Fig. 1.6 y tabla 1.1). Sin embargo, a los 5 días la cantidad de biopelícula formada y la producción de nitritos fue similar para las tres cepas, no obstante, sí hubo diferencias en el contenido de AIA (Fig. 1.5 y Tabla 1.1). Este resultado fortalece resultados anteriores que establecían la participación del NO en la formación de biopelícula y desvincularía al AIA en este proceso, ya que las diferencias observadas en la formación de biopelícula se corresponderían con diferencias en el contenido de NO y no con los niveles de AIA.

Otra evidencia que apoya este resultado, es el estudio de la formación de biopelícula en medios suplementados con amonio. En este medio la formación de

biopelícula fue igual para las 3 cepas a pesar de ser 10 veces menor que en nitrato (Fig. 1.7 B). Además, el contenido de AIA fue similar para Sp245 y Faj164. En este ensayo no se detectó producción de nitritos, aunque se ha reportado que la producción de NO en amonio es 25 veces menor que en nitrato (Molina Favero 2013). Independientemente del medio, la producción de AIA por Sp245 alcanzó una concentración de entre 20 y 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}/\text{DO}_{540\text{nm}}$ , la cual se encuentra dentro del rango reportado para *A. brasilense* creciendo en agitación en medios con amonio como fuente de N (Cassán et al. 2014). Es importante destacar que la mayoría de los estudios acerca de la producción de AIA por *A. brasilense* reportados por otros autores, fueron realizados creciendo la bacteria en agitación y en otros medios de cultivo, generalmente suplementados con amonio (Malhotra y Srivastava 2009; Masciarelli et al. 2013; Vande Broek et al. 1999), y hasta el desarrollo de esta tesis no había estudios acerca de la producción de AIA por *A. brasilense* en cultivos estáticos suplementados con nitrato o amonio.

Los resultados obtenidos con la cepa Faj009, afectada en la vía más importante de síntesis de AIA, que formó menos biopelícula y produjo menor contenido de NO, indican que los niveles de AIA afectan los del NO. Asimismo, los resultados observados con la mutante Faj164 indican que la ausencia de NO influye, no sólo en la formación de biopelícula sino también en el contenido de AIA. En conjunto ambas evidencias dan cuenta de una posible interacción entre estas dos moléculas. Recientemente Koul y colaboradores (2015), mostraron la existencia de una interacción entre NO y AIA en *A. brasilense* cepa SM. En este caso, mutantes en el regulador de la óxido nitroso reductasa (*norR*) y en la óxido nítrico reductasa (*norB*), que tienen niveles levemente más bajos de NO, mostraron mayor contenido de AIA que la cepa salvaje, indicando que alteraciones en los niveles endógenos de NO podrían estar regulando la síntesis de AIA. Este mismo autor mostró que la presencia en el medio de triptófano, precursor de auxinas, o de AIA, también influyeron en la producción de NO por las cepas mutantes en comparación con la cepa salvaje (Koul et al. 2015b). Los resultados hallados en esta tesis también muestran una interacción entre ambos reguladores en Sp245. Las diferencias observadas en el contenido de AIA entre la cepa salvaje Sp245 y la mutante Faj164 podrían atribuirse a los

niveles diferenciales de NO endógeno. Del mismo modo, y en base a los observado con la mutante Faj009, los bajos niveles de auxinas podrían estar afectando la síntesis de NO.

El tratamiento de los cultivos con 10 o 100  $\mu\text{M}$  de SNP como dador de NO, aumentó la formación de biopelícula en Faj164, produciendo probablemente una complementación química. Sin embargo, no tuvo el mismo efecto en Sp245 y Faj009, donde 10  $\mu\text{M}$  no afectó la biopelícula pero 100  $\mu\text{M}$  de SNP la disminuyó (Fig. 1.8 A). En *A. brasilense*, ya ha sido reportada esta respuesta, donde bajas concentraciones de NO promueven la formación de biopelícula y altas la disminuyen (Arruebarrena Di Palma 2015). La producción de nitritos de la biopelícula (como medida indirecta de la producción endógena de NO) no se vio afectada con el agregado del dador de NO, SNP (Fig. 1.10). En medios con nitrato el 95% del NO es producido por la vía de desnitrificación en *A. brasilense* (Molina-Favero et al. 2008), donde la producción de nitritos es un intermediario de dicha vía (Cohen et al. 2010). El agregado de un dador exógeno de NO, no necesariamente afectaría la producción endógena de nitritos. Por otra parte, como se mencionó previamente, el SNP libera una concentración de NO 1000 veces menor respecto de la concentración de dador utilizada (Barraud et al. 2006; Ederli et al. 2009), y el uso de SNP tiene la ventaja de que establece niveles estacionarios de NO que imitan la producción endógena de NO durante la desnitrificación bacteriana (Kwiatkowski y Shapleigh 1996). Por otro lado, el agregado de 1  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  y 1mM del dador de NO, GSNO, no logró revertir la deficiencia en la formación de biopelícula en Faj164. El mecanismo y la cinética de liberación de NO del donante depende de factores externos, de la toxicidad de productos acumulados, etc. (Floryszak-Wieczorek et al. 2006). Para el GSNO se ha descrito una cinética de liberación del NO rápida y transitoria (entre 30 y 60 min), además de liberar 8 veces menos NO que el SNP a una misma concentración (Ederli et al. 2009). El hecho de no haber obtenido resultados similares al tratamiento con el SNP, puede deberse a que las concentraciones utilizadas no liberaron suficiente NO, o que la adición de GSNO cada 24 hs fue insuficiente y no generó niveles estables y necesarios de NO para revertir la deficiencia la formación de biopelícula en Faj164.

Se ha reportado que en *Pseudomonas aeruginosa* el NO afecta la formación y la dispersión de la biopelícula modificando los niveles intracelulares de di-GMPc (Barraud et al. 2009). En *A. brasilense* cepa Sp7 recientemente se ha mostrado que una mutante en Diguanilato ciclasa A, desmejorada en la síntesis de di-GMPc, mostró menor formación de biopelícula, indicando que este mecanismo de regulación también estaría presente en esta bacteria (Ramirez-Mata et al. 2016).

Por otro lado, la adición de distintas concentraciones de AIA exógeno al cultivo disminuyó la formación de biopelícula en Sp245 y Faj009 (Fig. 1.8 B). De todas las concentraciones probadas de AIA (1 y 10  $\mu$ M, 1 mM), ninguna logró restituir la biopelícula en Faj009. Las concentraciones de auxina utilizadas esta tesis fueron seleccionadas en base a las utilizadas para *Azospirillum* en estudios previos realizados por otros autores (Vande Broek et al. 2005; Spaepen et al. 2009b; Van Puyvelde et al. 2011). Además se incluyó la misma concentración producida por Sp245 (aprox. 30 $\mu$ M), de manera de poder complementar exógenamente los niveles de AIA en Faj009, y no se logró restituir la biopelícula (resultados no mostrados). Es importante notar que esta disminución en la formación de biopelícula ocasionada por el agregado exógeno de AIA solo se observó en la cepa salvaje y en Faj009 y no está relacionada a una diferencia en el crecimiento, ya que las tres cepas crecieron de forma similar. Por lo tanto, el agregado de AIA tiene el efecto de disminuir la formación de biopelícula en Sp245 y Faj009.

En otras especies como *E. coli* K12 (Bianco et al. 2006), *Rhizobium etli* (Spaepen et al. 2009a) y *Bradyrhizobium japonicum* (Donati et al. 2013), el agregado de AIA indujo la formación de biopelícula ya sea incrementando la expresión de los genes implicados en la síntesis de lipopolisacaridos, de exopolisacaridos y de trehalosa, o bien alterando genes involucrados en la movilidad y adhesión. Todos estos estudios apuntan a la presencia de AIA como una señal que desencadena una respuesta a condiciones de estrés. Por otro lado, se ha reportado que compuestos derivados de indoles, tales como el indol-3-acetaldehído, indolacetonitrilo, el ácido indolacético, entre otros, tienen el potencial de inhibir la formación de biopelícula de especies clínicamente relevantes para la salud humana (Lee et al. 2011; Rabin et al. 2015; Worthington et al. 2012). En particular, los

efectos del agregado exógeno de AIA a la biopelícula de *A. brasilense* Sp245 no se habían estudiado. No obstante, algunos reportes indican que la adición de AIA a los cultivos de *Azospirillum* modifica la expresión de genes involucrados en la síntesis de proteínas de transporte y de superficie, e incrementa la expresión del sistema de secreción tipo IV (T6SS) que está relacionado a la interacción bacteria-eucariotas (Van Puyvelde et al. 2011). Todo esto indicaría que la bacteria expuesta a AIA estaría mejor adaptada para la interacción con la planta (Van Puyvelde et al. 2011). En las condiciones ensayadas en esta tesis el agregado de AIA disminuyó la formación de biopelícula en Sp245. Teniendo en cuenta la respuesta obtenida con las concentraciones de AIA utilizadas, sería interesante evaluar si concentraciones menores (del orden de nanomolares) tienen un efecto opuesto sobre la formación de biopelícula. Relacionado a esto, se ha reportado una respuesta dual al AIA en *A. tumefaciens* y *P. aeruginosa* durante la formación de biopelícula, donde bajas concentraciones la promueven y altas la disminuyen (Plyuta et al. 2013).

Otra posibilidad es que el AIA sea la señal para iniciar la dispersión de la biopelícula. El agregado de AIA exógeno no logró dispersar la biopelícula pre formada de manera significativa, sin embargo la cepa salvaje mostró una notable disminución (Fig. 1.12), por lo que no se descarta que el AIA tenga la capacidad de dispersar la biopelícula establecida, favoreciendo de esta forma la colonización bacteriana de otros sitios.

Se sabe que cambios en el ambiente como variaciones en la temperatura, en el PH, o en la disponibilidad de nutrientes disparan la síntesis de AIA en *Azospirillum* (Malhotra y Srivastava 2009; Ona et al. 2005). Si bien el agregado de altas concentraciones de AIA no afectó el crecimiento de la bacteria, un exceso de esta molécula en el medio podría disparar señales en la bacteria que le indiquen que el ambiente ya no es favorable y movilizarse hacia otros ambientes. La dispersión de la biopelícula puede proporcionar a la bacteria una ventaja competitiva al acceder a un nuevo nicho y continuar colonizando otros sitios del mismo u otro hospedador. Recientemente se ha reportado que la degradación de auxinas tiene un rol clave en la colonización y promoción del crecimiento ejercida por *Burkholderia phytofirmans* PsJN (Zúñiga et al. 2013). En este trabajo se reportó que la inoculación de *Arabidopsis* con una mutante de *B. phytofirmans*, incapaz de

degradar auxinas, no tuvo efectos de promoción del crecimiento comparado con la cepa salvaje. Por otro lado *B. phytofirmans* PsNJ logró prevenir los efectos de inhibición del largo de la raíz principal provocado por el agregado de AIA exógeno, mientras que la mutante solo lo hizo parcialmente (Zúñiga et al. 2013). Estos resultados dan cuenta de que las bacterias controlan finamente los niveles de AIA en la interacción con la planta hospedadora (Leveau y Lindow 2005).

Las evidencias sugieren, que el NO (a baja concentración, 10 nM) y el AIA tienen efectos opuestos sobre la formación de biopelícula en *A. brasilense* Sp245 (Fig. 1.9): el NO la promueve mientras que el AIA la reduce. En esta tesis se observó que el agregado de AIA exógeno disminuyó el contenido de nitritos (Fig. 1.10) y la tasa de producción de NO tanto en la cepa salvaje como en Faj009 (Fig. 1.12 B), indicando que los efectos del AIA sobre la biopelícula se deberían a que esta molécula es capaz de afectar la síntesis de NO. Asimismo el hecho de que la adición del dador de NO, SNP, evite que el AIA reduzca la formación de biopelícula apoyan esta hipótesis (Fig. 1.9).

Independientemente de la formación de biopelícula los resultados muestran una interacción entre estas dos moléculas en *Azospirillum*, donde los niveles de AIA modifican los niveles de NO, y los niveles de NO modifican los de AIA. Esto queda en evidencia ya que el agregado de NO exógeno al cultivo disminuye el contenido de AIA, así como el de AIA disminuye los niveles de NO (Fig. 1.11, 1.12). Resultados similares fueron observados en *Azospirillum* SM donde el agregado de SNP disminuyó el contenido de AIA (Koul et al. 2015b).

La interacción entre el AIA y el NO queda expuesta con el análisis de la expresión de genes involucrados en el metabolismo del NO y de la biosíntesis de AIA (Fig. 1.13 y 1.14). El hecho de que el secuestrante específico de NO endógeno, cPTIO, induzca la expresión del promotor de uno de los genes más importante en la vía de síntesis de AIA (*ipdC*), indica que el NO es capaz de alterar la síntesis de AIA modificando la expresión del gen *ipdC* (Fig. 1.13). Por otro lado, la expresión del gen de la nitrato reductasa periplasmática (*Nap*) en presencia de AIA no se vio modificada (Fig. 1.14 Ay B), por lo que no se puede atribuir la disminución en la producción de nitritos observada a alteraciones

en la expresión de dicho gen. Sin embargo la expresión del gen de nitrito reductasa (*Nir*), que codifica para la enzima encargada de la síntesis de NO a partir de nitrito, sí se vio disminuida en presencia de AIA. Este resultado indica que el AIA afecta la síntesis de NO, disminuyendo la expresión del gen *Nir* (Fig. 1.14 A y B).

Si bien hay pocos estudios en bacterias acerca de la interacción de estos dos reguladores, en plantas es conocido que existe una correlación entre los niveles de NO y AIA, donde el NO exógeno modula la expresión de los genes dependientes de auxina (Terrile et al. 2012), así como el AIA induce la acumulación de NO en raíces (Correa-Aragunde et al. 2004; Pagnussat et al. 2002) Más recientemente, se ha reportado que el NO afecta la biosíntesis, el transporte y la vía de señalización de auxinas en *Arabidopsis* (Sanz et al. 2015).

Es sabido que la inoculación con *Azospirillum* genera cambios en la arquitectura radical que son desencadenados por la acción conjunta de fitohormonas en asociación con otras moléculas (Bashan y de-Bashan 2010). Los efectos positivos de *Azospirillum* sobre el crecimiento de la planta se obtienen si el grado de colonización se encuentra entre  $10^6$  a  $10^9$  células por plántula, mientras que a concentraciones menores o mayores no se induce respuesta o sus efectos son negativos, respectivamente (Dobbelaere et al. 1999; Fallik et al. 1994; Kapulnik et al. 1985; Pereyra et al. 2007). Aquí se estudió la capacidad de *Azospirillum* y sus mutantes de formar biopelícula y colonizar las raíces de tomate. Luego de dos días de exponer las raíces a las bacterias, las tres cepas se adhirieron a la superficie de la raíz y formaron biopelículas (Fig. 1.14). La colonización estuvo en el orden de  $10^9$  células.g<sup>-1</sup> de peso fresco de raíz. Este grado de colonización estuvo dentro del óptimo para la inducción de efectos positivos en el crecimiento, aunque no se evaluaron dichos parámetros. Resultados similares obtuvo Molina Favero (2013), en donde semillas de tomate inoculadas con Sp245, Faj009 y Faj164 no mostraron diferencias en el grado de colonización, pero sí en la promoción del crecimiento. En dicho trabajo se demostró que el NO media la formación de raíces laterales y adventicias promovida por el AIA producido por *Azospirillum*. En contraposición a estos resultados, Steenhoudt et al. (2001b) observaron menor capacidad de colonización de la rizósfera de arroz y trigo por una

mutante espontánea de *A. brasilense* Sp245 deficiente en actividades nitrato reductasa periplásmica Nap y asimilatoria Nar. Por lo tanto, en las condiciones ensayadas y con la metodología empleada para evaluar la colonización en esta tesis (UFC y microscopía de fluorescencia), la deficiencia en la síntesis de auxinas como la falta de actividad Nap no afectaría la formación de biopelícula y la colonización de las raíces de plántulas de tomate. Sin embargo, no puede descartarse la presencia de otros factores liberados por la planta que puedan estar influenciando la colonización, como los exudados de las raíces (Lugtenberg et al. 1999).

En resumen, los resultados obtenidos en este capítulo, permiten consolidar al NO como participante clave en la formación de la biopelícula por *A. brasilense*. Además, se presentan evidencias de que el AIA exógeno disminuye la formación de biopelícula indirectamente, posiblemente afectando la síntesis de NO. Por otro lado, los resultados sugieren una interacción entre AIA y NO, donde la síntesis de NO es afectada por la presencia de AIA, y el agregado de NO disminuye el contenido de AIA en biopelículas de *Azospirillum*.

## Capítulo 2

**Formación de biopelícula por *A. brasilense* en condiciones de estrés salino, participación del óxido nítrico y auxinas**

# **Introducción y objetivos**

La salinización del suelo y del agua es uno de los problemas medioambientales más antiguos y serios en el mundo, que afecta a más de 830 millones de hectáreas en más de 100 países (Martinez-Beltran y Manzur 2005). Argentina es el tercer país en el mundo con áreas extensamente salinizadas luego de Rusia y Australia (Puchulu 2008). La salinización se produce mayormente en regiones áridas y semiáridas (FAO, 2002). Uno de los aspectos más característicos de los suelos con exceso de sodio es la compactación, donde estos se convierten en duros, secos e impermeables debido a la dispersión de arcilla y de la materia orgánica. Esto afecta el crecimiento y desarrollo de muchas especies vegetales, así como también el rendimiento de los cultivos (Sánchez et al. 2014). La aplicación de PGPR para disminuir los efectos nocivos ocasionados por diferentes tipos de estrés ha sido ampliamente reportada (Dimkpa et al. 2009; Gururani et al. 2013; Rojas-Tapias et al. 2012; Yang et al. 2009; Yousefi et al. 2017). Particularmente para el estrés salino, se ha demostrado que la inoculación con PGPR tiende a mejorar la eficiencia del uso del agua y la absorción de nutrientes, lo que conlleva a un mejor crecimiento de las raíces y de la planta en general (Qurashi y Sabri 2012). En este sentido, la inoculación con *Azospirillum brasilense* para mitigar los efectos del estrés salino sobre especies de importancia agronómica ha sido estudiada, obteniéndose resultados favorables (Barassi et al. 2006; Creus et al. 1997; Fasciglione et al. 2015; Khalid et al. 2017). Para que *A. brasilense* pueda ejercer su efecto benéfico y/o protector sobre la planta es necesaria una efectiva adhesión a la raíz y la posterior colonización formando una biopelícula. El establecimiento de la biopelícula sobre la raíz proporciona protección frente a la ocurrencia de estrés ambiental, disminuyendo la capacidad de competencia microbiana, y afectando positivamente a la planta hospedante en lo concerniente a su crecimiento, y a nivel de cultivos aumentando el rendimiento y la calidad de éstos (Ramey et al. 2004)

En *Azospirillum* el proceso de adhesión a la raíz involucra dos pasos: el primero es una adsorción rápida, débil y reversible que depende de proteínas de la superficie. El segundo es el anclaje irreversible de la bacteria a la raíz, en el cual están involucrados exopolisacáridos bacterianos (Michiels et al. 1991). Estudios realizados por Jofré et al. (1998) demostraron que la adhesión de *Azospirillum* a raíces de plantas de maíz y trigo se

veía alterada cuando la bacteria crecía en condiciones de salinidad. Por otro lado, se ha visto que la agregación bacteriana se encuentra afectada por la presencia de sal en el medio (Chowdhury et al. 2007). La capacidad de *Azospirillum* para formar biopelícula en condiciones de salinidad como estrategia para sobrevivir en la rizosfera y colonizar las raíces, resulta de interés debido al uso de estas bacterias como inoculantes para mejorar la tolerancia de las plantas a la salinidad.

En Argentina, el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola del INTA desarrolló un intenso programa para seleccionar e identificar cepas de *Azospirillum* sp. potencialmente aplicables en la agricultura. Considerando los antecedentes generados por este programa, se estableció que la cepa nativa Az39 de *A. brasilense* es la estirpe recomendable para la fabricación de inoculantes, destinados inicialmente a los cultivos de maíz y trigo en la República Argentina (Cassán et al. 2015). La misma fue adoptada mayoritariamente por las empresas de inoculantes para cultivos. Por esta razón, se decidió incorporar esta cepa al estudio de la respuesta a la salinidad y la formación de biopelícula por *A. brasilense*.

### **Objetivo general**

Investigar la capacidad de *A. brasilense* de formar biopelícula en condiciones de salinidad y la participación del AIA y NO en este proceso.

### **Objetivos específicos**

1- Estudiar el crecimiento en placa de las cepas de *A. brasilense*: a) Sp245 (salvaje); b) Faj164 (mutante isogénica *NapA*, nitrato reductasa periplasmica negativa); c) Faj 009 (mutante isogénica de la Sp245 en la piruvato decarboxilasa (*ipdC*) y d) Az39, frente a distintas concentraciones de cloruro de sodio.

2- Analizar la formación de biopelícula *in vitro* por las cepas de *A. brasilense* mencionadas en presencia de cloruro de sodio.

3- Determinar si la presencia de sal en el medio afecta la producción de AIA y NO por *A. brasilense*.

# **Materiales y métodos**

### **1- Crecimiento en placa Rojo Congo con 0, 200, 300 y 350mM NaCl**

Los precultivos en medio LB fueron iniciados a partir de 1 o 2 colonias de las cepas a utilizar, se llevaron a agitación por 16 hs a 100 rpm. Por cada cepa se realizaron dos replicas biológicas. Se ajustó a una  $DO_{540\text{nm}}$  de 1, se realizaron diluciones seriadas ( $10^{-1}$  hasta  $10^{-10}$ ) en buffer fosfato. Se colocaron 10  $\mu\text{l}$  de cada dilución (gota) en placa conteniendo ARC suplementado con 0, 200, 300 o 350 mM de NaCl. Las placas fueron incubadas a 32°C durante 4-5 días. Las bacterias viables de cada placa fueron enumeradas para calcular las UFC en cada condición (Herigstad et al. 2001).

### **2- Formación de biopelícula**

Los precultivos en LB se iniciaron a partir de 1 o 2 colonias de las cepas de *A. brasilense* a utilizar, y se incubaron en agitación por 16 hs a 100 rpm. Se ajustaron DO en buffer fosfato a 2, se diluyeron 1/100 en medio fresco Nfb o Nfb suplementado con NaCl. 200  $\mu\text{l}$  de cada dilución fueron colocados en la placa de 96 pocillos incubada sin agitación a 32°C durante 2 días. Se determinó el crecimiento total y la formación de biopelícula como se describe en materiales y métodos del capítulo 1.

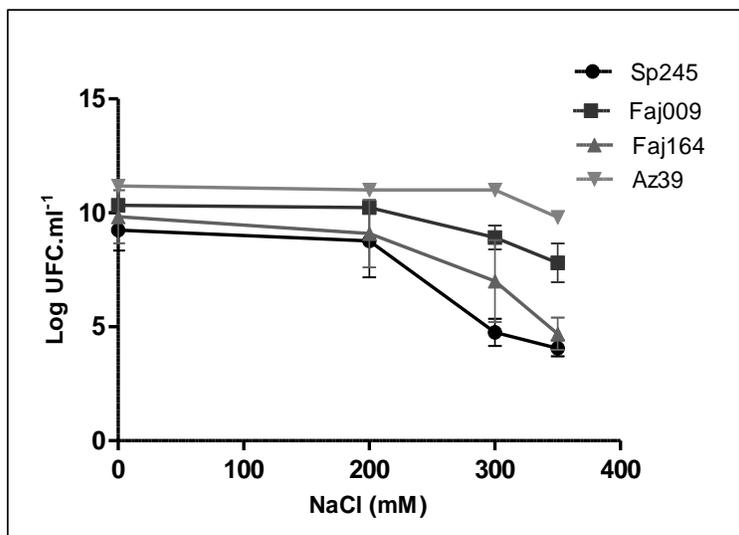
### **3- Determinación del contenido de nitritos y auxinas en la biopelícula**

El contenido de nitritos y auxinas en el sobrenadante de la biopelícula se determinó como se describe en la sección de materiales y métodos en el capítulo 1.

# Resultados

### Crecimiento de *A. brasilense* frente a distintas concentraciones de NaCl

Con el objetivo de estudiar la capacidad de *A. brasilense* Sp245 y Az39 de crecer en distintas concentraciones de cloruro de sodio, se determinó el crecimiento en placa de Petri con ARC suplementado con 0, 200, 300 o 350 mM de NaCl. En este caso también se utilizaron las cepas mutantes Faj009 y Faj164 para establecer si el AIA o el NO están implicados en la respuesta frente a condiciones de salinidad. Como puede observarse en la figura 2.1, 200 mM de NaCl no afectó el crecimiento de las cepas de *A. brasilense* mientras que 300 mM lo disminuyó en Sp245, Faj164 y Faj009 pero no en Az39. En 350 mM todas las cepas bajaron el número de UFC, sin embargo podemos destacar que Az39 mostró mayor resistencia a esta condición, y que las cepas más afectadas fueron Sp245 y Faj164, y en menor medida Faj009.



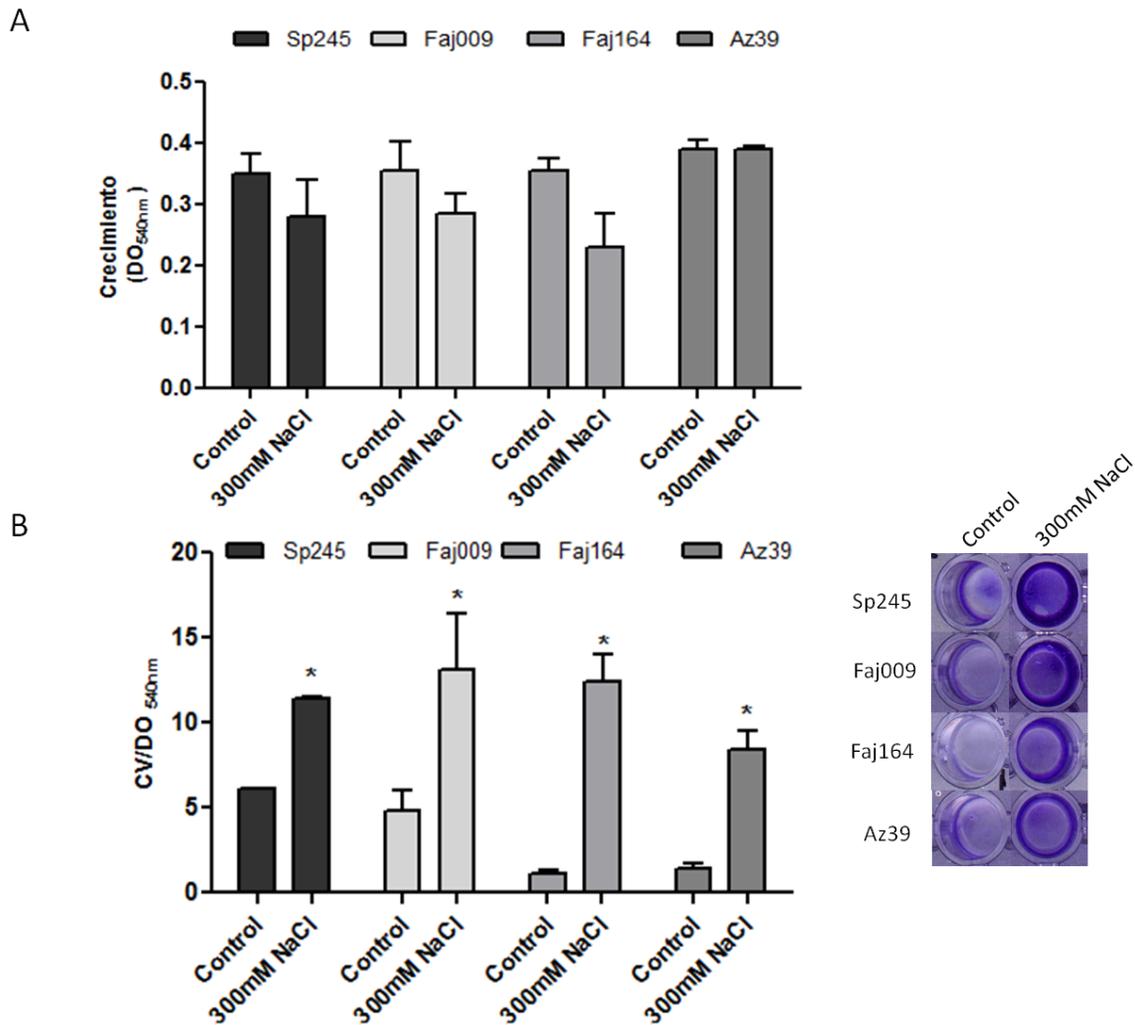
**Figura 2.1: Crecimiento de *A. brasilense* en distintas concentraciones de NaCl.** Las cepas de *A. brasilense* fueron crecidas en medio RC suplementado con 200, 300 ó 350 mM de NaCl y se determinaron las UFC.ml<sup>-1</sup>. Se muestra el Log de las UFC.ml<sup>-1</sup> promedio de 3 ensayos independientes con 2 réplicas cada uno, y las barras indican los desvíos estándares.

### Crecimiento estático y formación de biopelícula en condiciones de salinidad

Se analizó el crecimiento estático y la formación de biopelícula de *A. brasilense* Sp245, Faj164, Faj009 y Az39 en estrés salino. Para ello, las cepas se crecieron en Nfb nitrato suplementado con 300 mM de NaCl durante dos días. Al igual que en el caso del crecimiento en placa ARC, 300 mM de NaCl disminuyó el crecimiento de Sp245, Faj009 y

Faj164 respecto de su control sin NaCl, mientras que Az39 a esa concentración de NaCl no fue afectada, (Fig. 2.2 A).

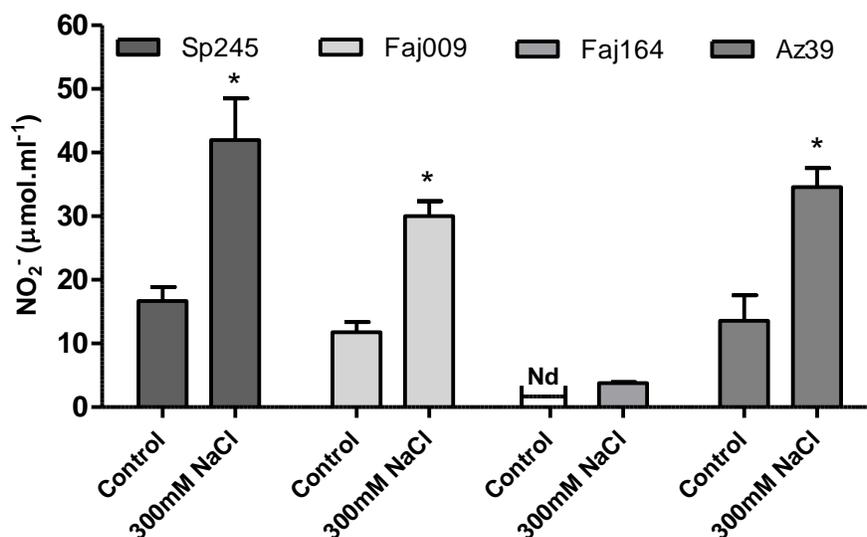
Las cepas Faj164 y Az39 mostraron los niveles más bajos de formación de biopelícula en condición control sin sal. En 300 mM de NaCl se observó un aumento en la formación de biopelícula en todas las cepas respecto de su control sin sal (Fig. 2.2 B).



**Figura 2.2: Crecimiento estático y formación de biopelícula de *A. brasilense* en condiciones de salinidad.** Sp245, Faj009, Faj164 y Az39, fueron crecidas en placa 96 pocillos sin agitación por 2 días en medio Nfb NO<sub>3</sub> más el agregado de 300 mM de NaCl. (A) Se determinó el crecimiento total (plantónicas más adheridas) por DO<sub>540nm</sub> y (B) la formación de biopelícula por CV. Los datos de CV están relativizados al crecimiento total. Se muestra la media con sus desvíos de 3 ensayos independientes con 3 replicas cada uno. A la derecha de la figura B se muestra una fotografía representativa de la tinción con CV. \*Indica diferencias significativas respecto de su control basado en un test de t-Student (P<0,05).

### **Efecto del NaCl sobre la producción de nitritos y auxinas en la biopelícula**

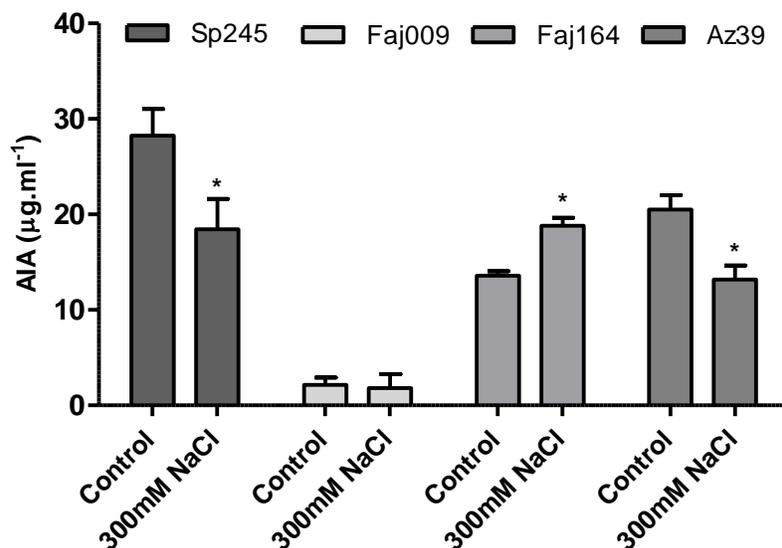
Para evaluar si la presencia de alta concentración de NaCl aumenta la formación de biopelícula por un incremento en la producción de NO se determinó la producción de nitritos (como medida indirecta de NO) en los sobrenadantes de las biopelículas. En las cepas Sp245, Faj009 y Az39 la adición de 300 mM de NaCl al medio de cultivo produjo un aumento significativo de la producción de nitritos (Fig. 2.3). La cepa Faj164 no mostró producción de nitritos en condiciones control, sin embargo en presencia de NaCl pudo observarse un leve aumento del contenido de nitritos (Fig. 2.3).



**Figura 2.3: Producción de nitrito en la biopelícula de *A. brasilense* en condiciones de salinidad.** Se determinó la producción de nitritos en el sobrenadante de la biopelícula de Sp245, Faj009, Faj164 y Az39 a los dos días en medio Nfb NO<sub>3</sub> suplementado con 300 mM NaCl. Los valores obtenidos fueron normalizados en relación al crecimiento total (DO 540<sub>nm</sub>). Los valores corresponden a las medias y los desvíos estándares de 3 ensayos independientes, con 3 replicas cada uno. \*Indica diferencias significativas respecto de su control basado en un test de t-Student (P<0,05). Nd; no detectado.

Por otro lado, también se estudió si la presencia de sal en el medio afecta la producción de AIA. Como se observa en la figura 2.4, 300 mM de NaCl disminuyó el contenido de AIA en la biopelícula de Sp245 y de Az39, mientras que en Faj164 lo aumentó.

Estos resultados indican que altas concentraciones de NaCl (300 mM) incrementan la formación de biopelícula, la producción de nitritos (NO) y modifican el contenido de AIA en *A. brasilense*.



**Figura 2.4: Concentración de auxinas en la biopelícula de *A. brasilense* en condiciones de salinidad.** Se determinó el contenido de auxinas (AIA) en el sobrenadante de las biopelículas de Sp245, Faj009, Faj164 y Az39 a los dos días mediante el método de Salkowski. Los valores obtenidos fueron normalizados en relación al crecimiento total (DO 540<sub>nm</sub>). Los valores corresponden a las medias y los desvíos estándares de 3 ensayos independientes, con 3 replicas cada uno. \*Indica diferencias significativas respecto de su control basado en test de Student (P<0,05).

## **Discusión**

La inoculación de plantas con PGPR puede proporcionar una protección contra el estrés biótico, y aumentar la tolerancia frente a estreses abióticos tales como la sequía, la salinidad y la toxicidad de metales pesados (Dimkpa et al. 2009). *Azospirillum* es capaz de mitigar el estrés salino, hídrico y osmótico en diferentes especies vegetales (Barassi et al. 2006; Casanovas et al. 2002; Cassán et al. 2009a; Creus et al. 2004; Hamaoui et al. 2001). Sin embargo, se ha demostrado que en *Azospirillum*, altos niveles de salinidad afectan el crecimiento, la fijación de nitrógeno (Tripathi et al. 2002) y también la adhesión a raíces de maíz y trigo (Jofré et al. 1998). La formación de biopelícula representa una solución óptima para colonizar nichos y sobrevivir aún en condiciones desfavorables como la baja disponibilidad de nutrientes, la desecación, condiciones de bajos pH, etc (Rinaudi y Giordano 2010).

En esta Tesis se estudió la capacidad de *A. brasilense* de sobrevivir y formar biopelícula en condiciones de alta salinidad, en relación a la producción de AIA y NO durante este proceso.

En primer lugar se analizó el crecimiento de las diferentes cepas de *A. brasilense* Sp245 en placa de Petri. Una concentración moderada de sal como es 200 mM de NaCl no afectó el crecimiento de ninguna de las cepas estudiadas, sin embargo a mayores concentraciones, 300 y 350 mM de NaCl, la cepa Sp245 y sus mutantes disminuyeron su crecimiento. Interesantemente, Az39 mostró una mayor tolerancia a condiciones de alta salinidad (Fig. 2.1). Resultados similares obtuvo Rivarola et al. (1998) donde se muestra que 200 mM NaCl no afectó el crecimiento de *A. brasilense* Cd pero 300 mM NaCl lo disminuyó en un 60%. La tolerancia a la salinidad de *Azospirillum* varía según la cepa. Algunos autores sugieren que en *Azospirillum* la tolerancia a la salinidad es especie-específica y otros que es cepa específica y depende de la salinidad del hábitat de donde fue aislada (Tripathi et al. 1998). Nuestros resultados muestran una respuesta diferencial ante la condición salinidad entre *A. brasilense* Sp245 y Az39. Estos resultados reafirman la elección de la cepa Az39 que fue considerada la de mejor performance para la inoculación de cultivos en diferentes regiones agroecológicas de nuestro país (Cassán et al. 2015).

Una de las estrategias que adoptan las bacterias frente a variaciones en la salinidad del suelo es la acumulación de osmolitos como glicina betaina, prolina, iones de potasio, o trehalosa (Da Costa et al. 1998; Fernandez-Auni6n et al. 2010). Otras producen cambios en los componentes de la superficie celular como en sus EPS y LPS (Chowdhury et al. 2007; Jofr6 et al. 1998), y tambi6n en la variaci6n en su capacidad de formaci6n de biopel6cula (Qurashi y Sabri 2012). Como se describi6 en el cap6tulo 1 de esta tesis, en medios con nitrato, *Azospirillum* forma biopel6cula mostrando la cepa Sp245 la mayor formaci6n de biopel6cula que las cepas mutantes Faj164 y Faj009. Asimismo, Az39 form6 menos biopel6cula que Sp245 (Fig. 2.2 B). La cepa Az39 tiene una Nap funcional (Perrig 2015, comunicaci6n personal y Fig. 2.3) por lo que estas diferencias no pueden ser atribuidas a la ausencia de NO (Cap. 1). Sin embargo por ser cepas diferentes de *A. brasilense* podr6an tener distinta capacidad de formar biopel6cula en las condiciones ensayadas. Se ha descrito que cepas de *A. brasilense* difieren entre s6 en varios aspectos relacionados a la promoci6n del crecimiento, como la producci6n de auxinas, etileno, giberilinas y poliaminas, entre otros (Perrig et al. 2007).

Por otro lado, una alta condici6n de salinidad (300 mM NaCl) provoc6 que todas las cepas de *Azospirillum* en estudio formaran una mayor cantidad de biopel6cula (Fig.2.2 B). Es importante notar que la formaci6n de biopel6cula fue promovida a una concentraci6n de sal que afecta el crecimiento. Este resultado sugiere que la formaci6n de la biopel6cula est6 asociada a un mecanismo de protecci6n, que le permite a la bacteria sobrevivir en ambientes adversos.

Se sabe que la formaci6n de biopel6cula en *A. brasilense* esta mediada por NO (Arruebarrena Di Palma et al. 2013), el an6lisis de la producci6n de nitritos (como medida indirecta de NO) mostr6 que frente a condiciones de salinidad existe un aumento de la producci6n de nitritos (NO) (Fig. 2.3). El aumento en la producci6n de nitritos y de NO, y la consecuente formaci6n de biopel6cula podr6a ser una respuesta de *A. brasilense* a una condici6n de estr6s como es la exposici6n a una alta concentraci6n de sal. Adem6s de ser el NO una mol6cula se6al en la formaci6n y/o dispersi6n de la biopel6culas en bacterias, tambi6n se lo ha vinculado a la respuesta al estr6s. En *B. subtilis* se ha demostrado que

tanto el NO endógeno como el exógeno protege la célula contra el daño oxidativo, activando catalasas para detoxificar el exceso de especies reactivas de oxígeno (Gusarov y Nudler 2005). Por otro lado, en plantas, se sabe que el NO actúa como una molécula señal en la respuesta a NaCl, aumentando la actividad de enzimas antioxidantes, y la expresión de genes específicos de resistencia a salinidad (Arasimowicz y Floryszak-Wieczorek 2007). Sin embargo, que la cepa Faj164 forme igual cantidad de biopelícula que la cepa salvaje en condiciones de salinidad sugiere que otro/s mecanismos de respuestas independientes de la producción de NO actuarían en la regulación de la formación de biopelícula frente a condiciones de estrés. Por ejemplo, ha sido reportado que la producción de EPS tiene un rol significativo en la protección de las células bajo estrés salino (Arora et al. 2010), y que una mayor producción de EPS permite el desarrollo de una biopelícula más estable (Qurashi y Sabri 2012). Si bien en esta tesis no se determinó el contenido de EPS, está descrito que en presencia de estrés salino *A. brasilense* Cd aumenta la producción de EPS y la formación de agregados, lo que le confiere mayor adaptación a las condiciones de salinidad (Chowdhury et al. 2007).

Por otro lado, que la cepa Faj009, deficiente en la producción de auxinas, se comporte de manera similar a la salvaje, permite concluir que la mutación *ipdC*<sup>-</sup> de *A. brasilense* no afecta la formación de biopelícula y la producción de nitritos en condiciones de estrés salino. Sin embargo, se pudo observar que el agregado de 300 mM NaCl sí afectó la síntesis de auxinas en la biopelícula Sp245, Az39 y Faj164 (Fig. 2.4). En este sentido, se ha reportado que diversos factores ambientales afectan la biosíntesis de AIA en *Azospirillum*. El estrés osmótico, el ácido abscísico y efectores de hongos fitopatógenos aumentan la síntesis de AIA, mientras que el estrés oxidativo, la salinidad y el metil jasmonato la disminuyen (Cassán et al. 2014). En concordancia con este reporte, una alta concentración de NaCl disminuyó el contenido de auxinas en la cepa Sp245 y Az39 (Fig. 2.4). En este contexto, la biosíntesis de auxinas en *Azospirillum* parece depender de la concentración de NaCl en el medio, ya que bajos niveles de salinidad (menores a 100 mM NaCl) estimulan la producción de auxinas, mientras que mayores concentraciones la inhiben (Tripathi et al. 1998). En contraste a lo observado en las cepas salvajes Sp245 y

Az39, el agregado de 300 mM NaCl aumentó el contenido de auxinas en Faj164 la cepa mutante en la Nap (Fig. 2.4). Si bien no se han dilucidado los mecanismos por los cuales los distintos tipos de estrés modifican la síntesis de auxinas, en base a lo reportado en el capítulo 1 de esta tesis, se podría hipotetizar que la presencia de NaCl induce la producción de NO, y que este aumento produciría una disminución en la síntesis de AIA. En la cepa Faj164, debido a la ausencia o la baja producción de NO, estos mecanismos estarían desbalanceados encontrándose respuestas diferentes. En este sentido, se ha reportado que la cepa Faj164 posee mecanismos desbalanceados respecto de la cepa salvaje, en el proceso de adquisición de hierro y en la expresión de los genes vinculados al metabolismo del hierro, los cuales se ven afectados por la mutación *nap<sup>-</sup>* de *A. brasilense* (Arruebarrena Di Palma 2015).

Los resultados obtenidos en este capítulo permiten establecer que *A. brasilense* Sp245 y Az39 forman biopelícula como una estrategia para afrontar las condiciones de estrés salino. El rol del NO en este proceso no puede ser descartado ya que la presencia de NaCl aumenta significativamente la producción de nitritos. Sin embargo, los resultados obtenidos con la cepa Faj164 permiten suponer la existencia de otros mecanismos involucrados en la regulación de la formación de biopelícula bajo condiciones de estrés salino.

## Capítulo 3

**Estudio de la interacción entre *A. brasilense* y *P. protegens* en la formación de biopelícula mixta.**

# **Introducción y Objetivos**

## Inoculantes bacterianos

Se definen a los inoculantes como insumos formulados con uno o varios microorganismos, que aplicados a los cultivos mejoran el crecimiento, estado sanitario y rendimiento de los cultivos. La aplicación práctica de bacterias vivas como inoculantes fue controvertida desde su inicio, ya que los resultados sobre los cultivos no siempre pueden ser predichos, y dependen de varios factores entre ellos ecológicos, climáticos y tecnológicos. El entender dichos factores y sus interacciones posibilitará el uso exitoso de esta tecnología.

PGPR pueden encuadrarse dentro de los siguientes tipos de acuerdo al efecto benéfico que presenten en la agricultura: **a) Fitoestimulantes**, estimulan la germinación de las semillas y el enraizamiento por la producción de reguladores del crecimiento, vitaminas y otras sustancias; **b) Biofertilizantes**, incrementan el suministro de los nutrimentos por su acción sobre los ciclos biogeoquímicos, tales como la fijación de N<sub>2</sub>, la solubilización de elementos minerales o la mineralización de compuestos orgánicos; **c) Agentes de control biológico de patógenos**, desarrollan fenómenos de antagonismo microbio-microbio; **d) Biorremediadores**, eliminan productos xenobióticos tales como pesticidas, herbicidas y fungicidas; y **e) Mejoradores ecofisiológicos**, incrementan la resistencia de las plantas al estrés tanto biótico como abiótico (Bowen y Rovira 1999; Grageda-Cabrera et al. 2012).

La inoculación con más de una cepa bacteriana tiene como objetivo obtener mayor efecto positivo sobre la planta debido a la interacción sinérgica de las cepas. Sin embargo, puede ocurrir que las cepas que componen el inoculante compitan entre sí, y como consecuencia no ejerzan el efecto positivo esperado (Trabelsi y Mhamdi 2013).

El uso potencial de *Azospirillum* en inoculantes mixtos es prometedor (Cassán et al. 2009b; Combes-Meynet et al. 2011; Singh et al. 2010). Por ejemplo, la co-inoculación de *A. brasilense* Az39 y la micorriza *Glomus intraradices* mejoró el crecimiento de arroz en condiciones de riego normal y de estrés hídrico (Ruíz-Sánchez et al. 2011); en tomate *A. brasilense* Sp7 y *Glomus clarum* o *Glomus fasciculatum* incrementaron el peso y el largo de

las raíces (Pulido et al. 2003), mientras que *A. brasilense* Az39 y *Bradyrhizobium japonicum* E109 promovieron la germinación, y el crecimiento de las plántulas en maíz y soja (Cassán et al. 2009b), sólo para mencionar algunos de los trabajos que muestran que la co-inoculación de dos microorganismos es superadora de la inoculación simple.

### El género *Pseudomonas*

*Pseudomonas* es un género amplio y diverso integrado por bacilos Gram-negativos, generalmente aeróbicos y móviles por la presencia de un flagelo polar. A pesar de que algunas especies de *Pseudomonas* son patógenas de animales y plantas, muchas otras como las especies de *Pseudomonas* fluorescentes (denominadas así por su capacidad de producir compuestos fluorescentes) son componentes notables de la rizósfera y de gran importancia agrícola debido a su acción como PGPR (Choudhary et al. 2009). Estas bacterias no sólo presentan una gran capacidad de protección de los cultivos mediante el biocontrol de diversos patógenos, sino que también fomentan el equilibrio y la sanidad del suelo con su potente capacidad solubilizadora de fósforo (Rodríguez y Fraga 1999). La capacidad biocontroladora de *Pseudomonas fluorescens* se basa generalmente en la secreción de compuestos antibióticos y antifúngicos difusibles, como fenazinas, fluoroglucinoles, pioluteolinas, pirrolnitrinas y lipopéptidos cíclicos, y volátiles como el cianuro de hidrógeno (Haas y Défago 2005). Además de estas características que las distinguen dentro del grupo de bacterias PGPR, algunas cepas son capaces de sintetizar AIA (Khakipour et al. 2008). *Pseudomonas fluorescens* coloniza las raíces de una amplia gama de especies vegetales, habitando principalmente los surcos de las células epidérmicas y el cuello de la raíz (Gamalero et al. 2004), aunque otras *Pseudomonas* pueden penetrar los espacios intercelulares de la epidermis y el córtex (Troxler et al. 1997).

### Interacción bacteriana

En la naturaleza, las bacterias existen en comunidades formadas por varias especies, y la señalización entre las células es parte de la dinámica de la comunidad (Egland et al. 2004). La mayoría de los estudios de interacción bacteriana se han enfocado en la comunicación célula-célula y se le ha dado menos importancia al contexto ecológico de por qué las bacterias producen moléculas señales y responden tanto a las señales intraespecíficas como a las interespecíficas (Crespi 2001). Entonces, compuestos secretados por las bacterias pueden actuar como moléculas señal alterando el desarrollo y el comportamiento de otras especies bacterianas que se encuentren en su entorno inmediato (Ryan y Dow 2008). En este contexto, ha sido demostrado que las distintas especies bacterianas dentro de una biopelícula interaccionan unas con otras de manera tanto positiva como negativa (Burmølle et al. 2006). Entre las interacciones positivas entre una o varias especies podemos mencionar la co-agregación de las células (Palmer Jr et al. 2003; Rickard et al. 2003), la conjugación (Ghigo 2001) y la protección contra compuestos antimicrobianos (Lee et al. 2014) ya sea mediante la complementación enzimática (Shu et al. 2003) o bien mediante la organización espacial de las células dentro de la biopelícula (Lerliche et al. 2003). Mientras que las interacciones negativas incluyen la producción de toxinas (Tait y Sutherland 2002) y la disminución del pH por alguna de las especies que perjudique el crecimiento de otra especie bacteriana (Burne y Marquis 2000).

### Interacción *Azospirillum*-*Pseudomonas*

*Azospirillum* y *Pseudomonas* son dos géneros importantes que habitan la rizósfera, y es de esperar que ambos microorganismos se encuentren en consorcios mixtos en la naturaleza.

Como se mencionó previamente *Pseudomonas* produce una amplia gama de compuestos con actividad antimicrobiana (Keel et al. 1990). Esto hace suponer que cuando estas cepas interaccionan la secreción de estos compuestos por parte de *Pseudomonas* podría afectar negativamente el crecimiento y la proliferación de

*Azospirillum*. En este sentido, la interacción *Azospirillum-Pseudomonas* ha sido escasamente estudiada.

Se ha reportado que la cepa de *A. brasilense* Cd es sensible a la adición del compuesto sintético DAPG *in vitro*, el cual induce la acumulación de carotenoides y gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato, además de producir daño en la membrana e inhibición del crecimiento (Couillerot et al. 2011). Sin embargo, también se ha demostrado que el DAPG, a bajas concentraciones, puede tener efecto positivo sobre la formación de biopelícula y actuar como una señal induciendo genes relevantes en *A. brasilense* (Combes-Meynet et al. 2011). En este mismo trabajo, se muestra que la co-inoculación de maíz con *A. brasilense* Sp245 Rif y una cepa productora de DAPG *P. fluorescens* F113 incrementan el volumen total de raíces, lo cual indicaría que existe una interacción positiva entre las dos cepas (Combes-Meynet et al. 2011). Sin embargo, en plantas de maíz inoculadas con micorrizas arbusculares, la población de *Azospirillum* en el suelo se vio disminuida cuando estas mismas plantas fueron inoculadas con *Pseudomonas* y/o *Trichoderma*, indicando un efecto negativo de estos microorganismos sobre *Azospirillum* (Vázquez et al. 2000).

En base a los pocos estudios existentes, que además muestran resultados contradictorios, y a que ya existen disponibles en el mercado inoculantes que combinan ambos microorganismos, resulta de importancia estudiar la formación de biopelículas mixtas de *Azospirillum* y *Pseudomonas*.

### **Objetivo general**

Estudiar la interacción entre *A. brasilense* y *P. protegens* durante el crecimiento estático y evaluar la capacidad de ambas cepas de formar biopelículas mixtas.

### **Objetivos particulares**

1- Evaluar el efecto de *P. protegens* CHA0 (*ex fluorescens*) sobre el crecimiento estático de *A. brasilense* Sp245 en cultivos mixtos.

2- Determinar la capacidad de *A. brasilense* Sp245 y *P. protegens* CHA0 de formar biopelículas mixtas *in vitro*.

3- Analizar la distribución espacial de *A. brasilense* Sp245 y *P. protegens* CHA0 en la biopelícula mixta mediante microscopia confocal.

4- Analizar la capacidad de *A. brasilense* Sp245 y *P. protegens* CHA0 de colonizar y formar biopelículas sobre raíces de tomate mediante microscopia confocal.

5- Estudiar el efecto de *P. protegens* CHA0 sobre el desarrollo y morfología de las colonias de *A. brasilense* Sp245 en placa de Petri.

# **Materiales y métodos**

### **Material biológico y condiciones de cultivo**

Se utilizaron cepas fluorescentes derivadas de *A. brasilense* Sp245 y *P. protegens* CHA0. Las cepas fueron obtenidas introduciendo el plásmido pMP2444 ( $Gm^r$ ,  $P_{tac}$ -*egfp*) en Sp245 por conjugación biparental (Arruebarrena Di Palma et al. 2013) o el plásmido pME7134 ( $Tc^r$ ,  $P_{tac}$ -*dsRed*) en CHA0, por electroporación. El plásmido pME7134 fue construido de la siguiente manera: un fragmento de 0.7 kb conteniendo el gen *dsred* T4\_S4T fue digerido con enzimas de restricción *SmaI-Hind III* del plásmido pDsRed T3\_S4T (Sörensen et al. 2003) y luego fue clonado bajo el control del promotor  $P_{tac}$  en el plásmido pME6552 (Wenner et al. 2014). Posteriormente un fragmento de 1.5 kb conteniendo la fusión  $P_{tac}$ -*dsred*.T3\_S4T fue digerido con las enzimas de restricción *MluI-HindIII* y subclonado en pME6031 (Heeb et al. 2000) para dar origen al plásmido pME7134. Este plásmido fue cedido por el Dr. Christoph Keel de la Universidad de Lausanne, Bâtiment.

*Azospirillum brasilense* Sp245/pMP2444 y *Pseudomonas protegens* CHA0/pME7134 fueron crecidas en medio LB durante 18 hs a 32°C en agitación (100 rpm). Cuando fue necesario se agregó Gentamicina 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  al cultivo de *A. brasilense* y Tetraciclina 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , al de *P. protegens*. Para los ensayos de crecimiento estático, biopelícula y morfología de la colonia, se utilizó medio Nfb como se indica en Döbereiner y Day (1976), adicionado con 13,8 mM  $\text{KNO}_3$  como fuente de N y enriquecido con 0,17 mM  $\text{FeCl}_3$  y 0,015 mM Fe-EDTA (NNF). Para los ensayos en los que se utilizó medio agotado, las bacterias fueron crecidas por 18 hs o por 3 días en NNF sin antibiótico. Los cultivos se centrifugaron 10 min a 4000 g y el sobrenadante fue filtrado con filtro estéril de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ . Para determinar los cambios en el pH se agregó al medio de cultivo Azul de bromotimol 0,5% p/v.

### **Crecimiento total y cuantificación de la formación de biopelícula**

El crecimiento estático de Sp245/pMP2444 y CHA0/pME7134 fue analizado en placa de 96 pocillos de fondo plano (Deltalab). Los cultivos simples (una sola cepa) fueron iniciados con 200  $\mu\text{l}$  de medio fresco NNF conteniendo  $10^5$  bacterias. $\text{mL}^{-1}$ , estimado por la

medición de su densidad óptica ( $DO_{540nm}$ , Spectra MR; Dynex Technologies). Los cultivos mixtos (dos cepas) fueron iniciados con  $5 \cdot 10^4$  bacterias de cada cultivo en un total de 200  $\mu$ l, de manera de alcanzar una concentración total final de  $10^5$  bacterias. $ml^{-1}$ .

Con el fin de evaluar diferentes densidades celulares de *A. brasilense* en cultivos mixtos se iniciaron también cultivos estáticos con  $10^4$  o  $10^6$  bacterias. $ml^{-1}$  de Sp245, manteniendo constante la cantidad de *P. protegens* en  $10^5$  bacterias. $ml^{-1}$ . Para los ensayos de medio agotado y filtrado, 100  $\mu$ l de medio (NNF) agotado y filtrado en donde CHAO fue crecida en las condiciones descritas más arriba, fueron agregados a 100  $\mu$ l de medio fresco NNF conteniendo  $5 \cdot 10^4$  bacterias. $ml^{-1}$  de Sp245. La combinación opuesta se realizó de la misma manera. Las placas fueron incubadas por 2 días a 32°C sin agitación.

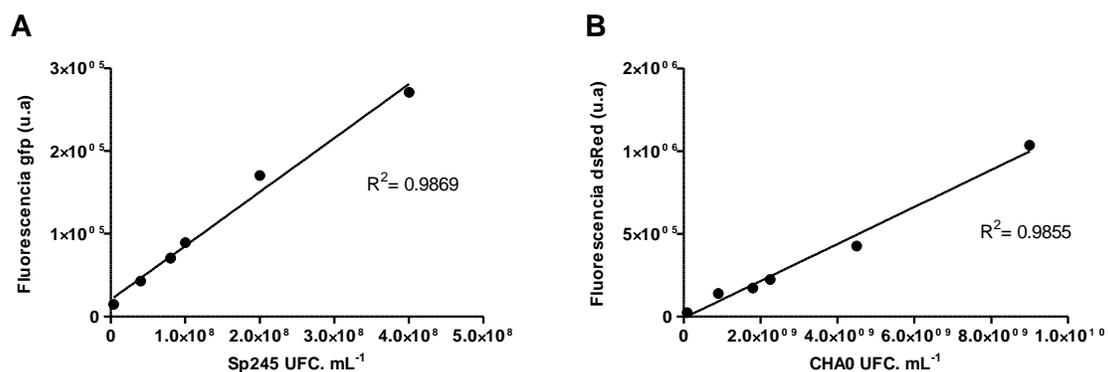
Para cuantificar el crecimiento total, se despegó la biopelícula de los pocillos en formamecánica utilizando una micropipeta y mezclándolas de esta forma con células plantónicas, determinando sobre estas mezclas la  $DO_{540nm}$  y su fluorescencia por *dsRed gfp* y (ABI 7500 en modo fluorómetro: Ex: 538 nm, Em: 605 nm para CHAO/pME7134 y Ex: 460, Em: 525nm para Sp245/pMP2444).

La cuantificación de las células adheridas se realizó determinando la  $DO_{540nm}$  y la fluorescencia, luego de descartar las células planctónicas de pocillos repetidos. El porcentaje de biopelícula fue calculado como células adheridas/células totales x 100. Por otro lado, la biopelícula también fue cuantificada por CV ( $DO_{590nm}$ ) y normalizando su valor de DO por el crecimiento total ( $DO_{540nm}$ ), como se describe en materiales y métodos del capítulo 1.

### **Determinación de UFC a partir de valores de fluorescencia**

Se registraron los valores de fluorescencia y se calcularon las UFC. $ml^{-1}$  para diluciones seriadas de cultivos de Sp245/pMP2444 y CHAO/pME7134. La correlación entre los valores de fluorescencia y UFC. $ml^{-1}$  fue determinada a través de una regresión lineal, utilizando el software el Graphpad Prism 5.03 (Sp245/pMP2444  $R^2$ : 0,9869 y CHAO/pME7134  $R^2$ : 0,9855). En los ensayos, los valores de UFC. $ml^{-1}$  fueron estimados por interpolación de los valores de fluorescencia en la curva (Fig. 3.1). Para asegurar la

correspondencia entre los valores de fluorescencia y las UFC.ml<sup>-1</sup>, se realizaron en los primeros ensayos, recuentos en placa por el método de la gota en medio NNF suplementado con 25 µg ml<sup>-1</sup> Gm o 125 µg ml<sup>-1</sup> Tc para Sp245/pMP2444 o CHA0/pME7134, respectivamente.



**Figura 3.1: Regresión lineal entre valores de fluorescencia y UFC.ml<sup>-1</sup>.** Se registró la fluorescencia para diluciones seriadas de cultivos de *A. brasilense*/pMP2444 (A) y *P. protegens*/pME7134 (B), paralelamente se determinaron las UFC.ml<sup>-1</sup> de las mismas muestras. Se calculó la regresión lineal entre ambos parámetros para cada cepa.

Los controles de cruzamiento de fluorescencia se realizaron registrando los valores de fluorescencia roja (Ex: 538 nm, Em: 605 nm) y verde (Ex: 460nm, Em: 525nm) para cada cepa. Debido a que se registró cruzamiento en CHA0/pME7134, los valores de fluorescencia verde registrados para los cultivos mixtos fueron corregidos de la siguiente manera: se realizó una curva de regresión entre valores de fluorescencia verde y roja obtenida para diferentes concentraciones de CHA0/pME7134. Los valores de fluorescencia verde obtenidos de la curva correspondiente al cruzamiento, fueron restados de los valores de fluorescencia verde de los cultivos mixtos.

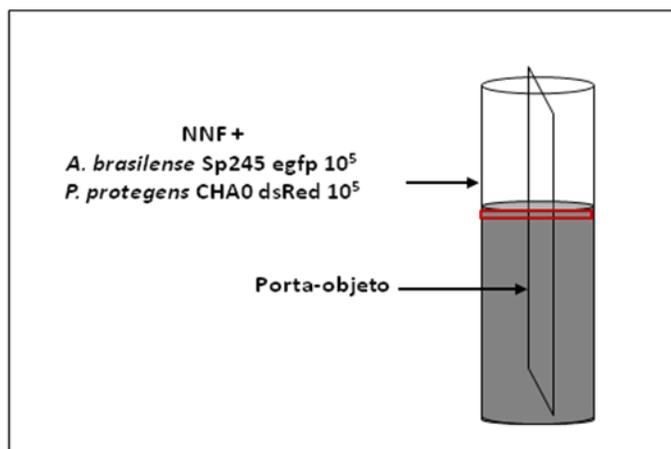
### **Análisis de la morfología de las colonias**

Cultivos de Sp245 y CHA0 fueron crecidos por 18 hs en LB en agitación (100 rpm) a 32°C y llevados a 10<sup>8</sup> bacterias.ml<sup>-1</sup> y 10<sup>9</sup> bacterias.ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Diluciones seriadas de cada cepa fueron sembradas sobre placas con NNF (control) o NNF

previamente inoculadas con 1ml de un césped de Sp245 o CHA0, o 1 ml de medio agotado y filtrado. La morfología de las colonias fue analizada mediante lupa óptica.

### **Microscopía confocal de fluorescencia**

Se colocaron porta-objetos recubiertos con poliestireno dentro de tubos de ensayo que contenían 3 ml de NNF. Se inoculó este medio con  $10^5$  células de Sp245/pMP2444,  $10^5$  células de CHA0/pME7134, o una combinación de ambas (cultivos mixtos, UFC.mL<sup>-1</sup> final de  $10^5$ ). Los tubos fueron incubados por 2 días a 32°C sin agitación. Transcurrido el periodo mencionado, los porta-objetos fueron retirados y lavados suavemente (3 veces) con agua destilada estéril. La biopelícula formada en la zona de la interfase aire-líquido fue directamente observada con un microscopio láser confocal Nikon C1.



**Esquema del dispositivo experimental utilizado para los ensayos de microscopía confocal.** El recuadro rojo muestra la zona de la interfase aire-líquido donde se observó la biopelícula.

### **Cepas utilizadas para los ensayos de colonización de raíces**

Para estos ensayos se utilizaron otras construcciones de las cepas, de manera de optimizar la visualización de las bacterias al microscopio. Se utilizó la cepa Sp245/pME7134 que expresa constitutivamente *dsRed* (ver materiales y métodos capítulo 1). *P. protegens* CHA0 fue transformada por conjugación con el plásmido pMP4566 Tc<sup>r</sup>, P<sub>tac</sub>-*egfp*, que expresa constitutivamente proteína verde fluorescente GFP cedido por el Dr. Claudio Valverde.

### **Ensayos de formación de biopelículas sobre raíces**

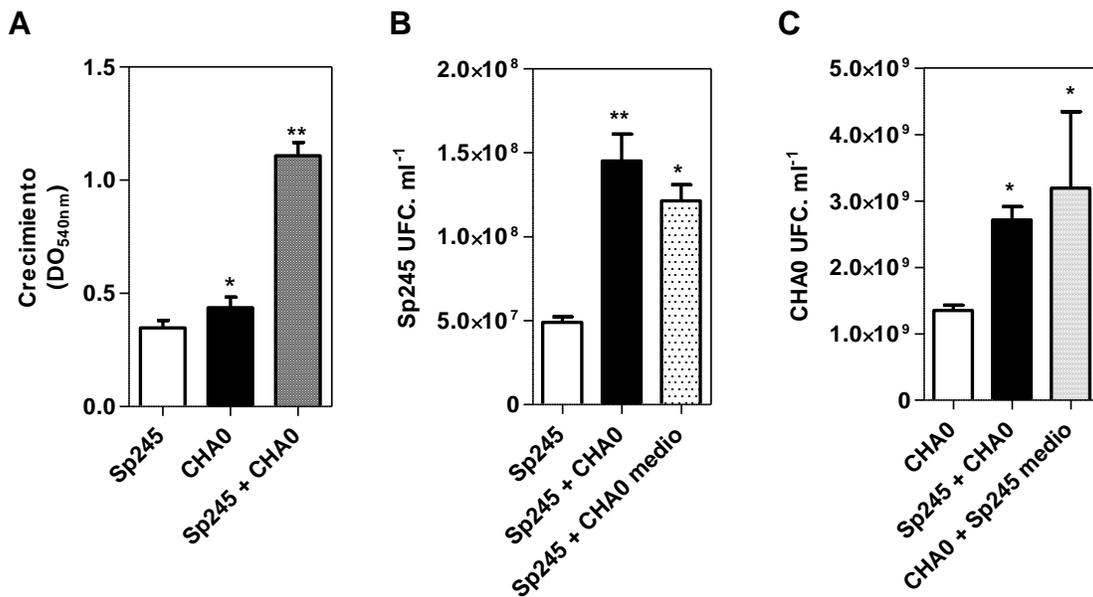
Semillas de tomate variedad ACE 55 fueron desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio 50%  $V/V$  durante 4 min. Luego fueron enjuagadas con abundante agua estéril. Posteriormente fueron colocadas en placas con Phytigel 0,6% (SIGMA) e incubadas en cámara a 25°C con período de luz de 16 hs, durante 7 días. Pasado dicho período, las plántulas fueron retiradas y colocadas en tubos de ensayos que contenían 3 ml de agua con:  $10^5$  células de Sp245/ pME7134 (dsRED) o  $10^5$  células de CHA0/pMP4566 (GFP), o una combinación de  $5 \cdot 10^4$  células de cada cepa (co-inoculación). Luego de dos días se retiraron las raíces, se lavaron con agua destilada y se observaron al microscopio láser confocal Nikon C1. GFP y DsRed fueron excitadas 488 y 543nm, y detectadas a 550-650nm y 650-750nm, respectivamente. Las imágenes fueron analizadas mediante el software Nikon EZ-C1 Freeviewer.

Cálculo de UFC.g<sup>-1</sup> de peso fresco de raíz: se pesaron 0,05 g de raíz y se colocaron en 450  $\mu$ l de buffer fosfato, se homogeneizaron triturándolas con embolo de teflón y se realizaron diluciones seriadas. Se sembraron 10  $\mu$ l de cada dilución en una placa ARC con los correspondientes antibióticos: para Sp245 Tc 20 mg/ml, para CHA0 Tc 125 mg/ml. Para CHA0 en combinación con Sp245 se utilizó Tc 125 mg/ml ya que Sp245/pME7134 es incapaz de crecer a esa concentración de antibiótico. Para Sp245 en combinación con CHA0 se incubó la placa a 40°C, ya que CHA0 a dicha temperatura retrasa marcadamente su crecimiento en 2 días de cultivo, lo que permite contar las colonias de Sp245 que sí crecen satisfactoriamente a dicha temperatura. Todas las placas (excepto la mencionadas anteriormente) se incubaron a 32°C durante 4-5 días.

# Resultados

### **Efecto de la co-inoculación de *A. brasilense* y *P. protegens* sobre el crecimiento**

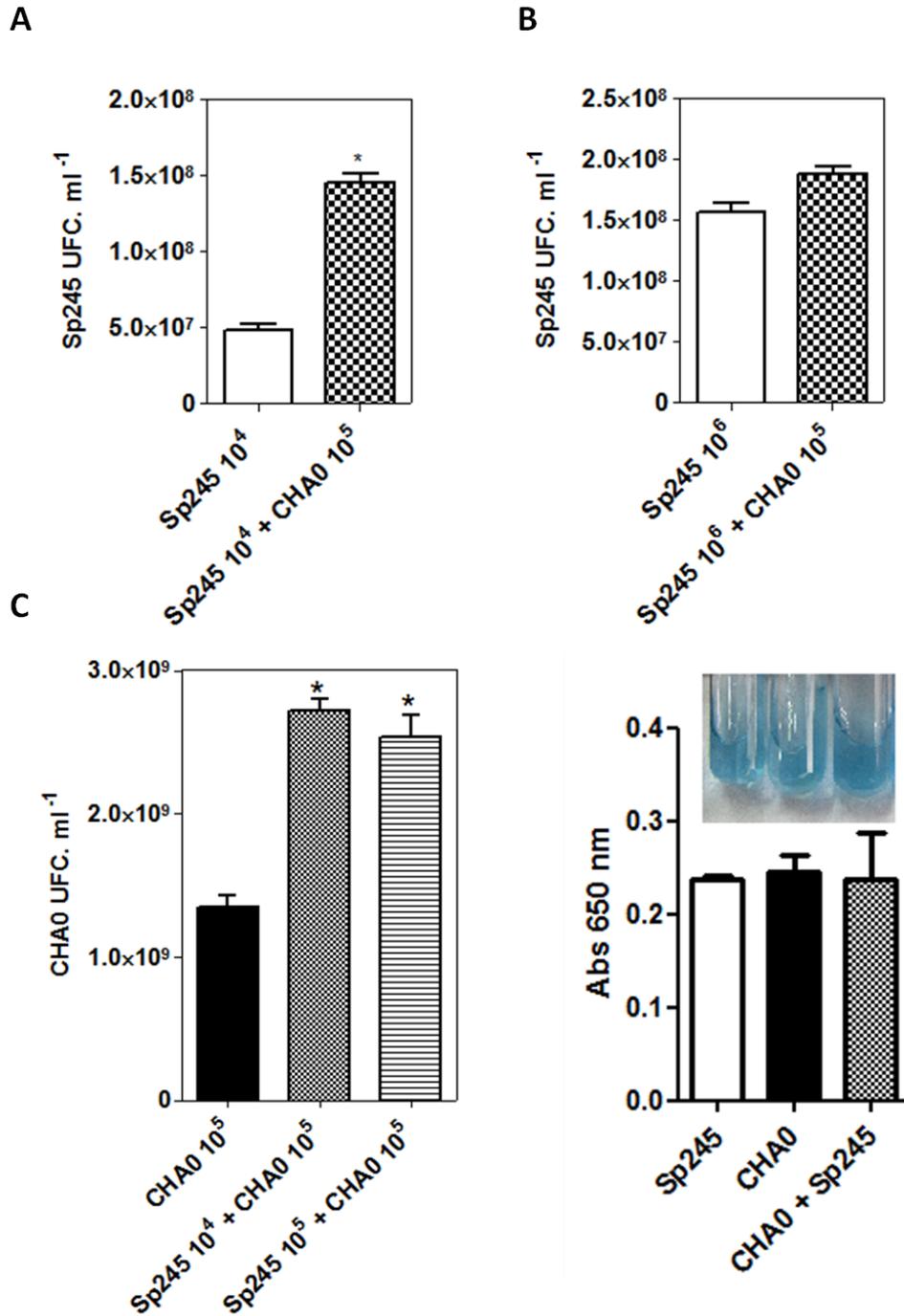
Se determinó el efecto de la co-inoculación sobre el crecimiento de las cepas *A. brasilense* Sp245 pMP2444 y *P. protegens* CHA0 pME7134. El crecimiento estático de ambas cepas fue mayor cuando crecieron juntas respecto al crecimiento por separado (Fig. 3.2 A). Además, las UFC.ml<sup>-1</sup> estimadas a través de la medición de la fluorescencia, fueron 2 veces mayor, tanto para *A. brasilense* como para *P. protegens*, respecto del cultivo simple de cada cepa (Fig. 3.2 B y C). También se estudió el crecimiento de Sp245 en presencia de medio de cultivo agotado y filtrado de CHA0 (Fig. 3.2 B), y el crecimiento de CHA0 en medio agotado y filtrado de Sp245 (Fig. 3.2 C). El medio agotado y libre de cada cepa fue suficiente para promover el crecimiento de la otra cepa (Fig. 3.2 B y C). Estos resultados sugieren que cada cepa produce y libera al medio algún factor y/o metabolito que favorece el crecimiento de la otra.



**Figura 3.2: Crecimiento estático de cultivos simples o mixtos de *A. brasilense* Sp245 y *P. protegens* CHA0.** *A. brasilense* Sp245 y *P. protegens* CHA0 fueron crecidas en placa de 96 pocillos en medio NNF durante 2 días ó con medio de cultivo agotado y filtrado de CHA0 (Sp245+CHA0 medio (B)) o de Sp245 (CHA0+Sp245 medio (C)). El crecimiento total (células plantónicas más adheridas) fue determinado por densidad óptica a DO<sub>540nm</sub> (A) y por fluorescencia verde (GFP) de Sp245 (B) y roja (dsRed) de CHA0(C). Las UFC.ml<sup>-1</sup> fueron obtenidas mediante una regresión lineal con valores de fluorescencia para cada cepa. Se muestra la media con sus desvíos de 3 ensayos independientes con 3 replicas cada uno. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA y posterior test de Tukey. \*indica diferencias significativas (P<0,05).

Por otro lado, se evaluó si el incremento en las UFC observado en los cultivos mixtos fue dependiente del número de bacterias de *A. brasilense*. Para ello, los co-cultivos se iniciaron con distintas concentraciones de *A. brasilense* junto a una concentración constante de *P. protegens*. En este caso, un inóculo inicial de  $10^4$  o  $10^5$  UFC.ml<sup>-1</sup> de Sp245 con  $10^5$  UFC.ml<sup>-1</sup> de CHA0 fue suficiente para que el crecimiento de cada cepa se incrementara en el cultivo mixto (Fig. 3.2; 3.3 A y C). Sin embargo, cuando el número inicial de Sp245 fue de  $10^6$  UFC.ml<sup>-1</sup> el crecimiento total en los cultivos mixtos no difirió significativamente del control (Fig. 3.3 B). Por lo tanto, sería necesario una determinada concentración de *A. brasilense* y *P. protegens* en los inóculos iniciales para que se promueva el crecimiento en los cultivos mixtos.

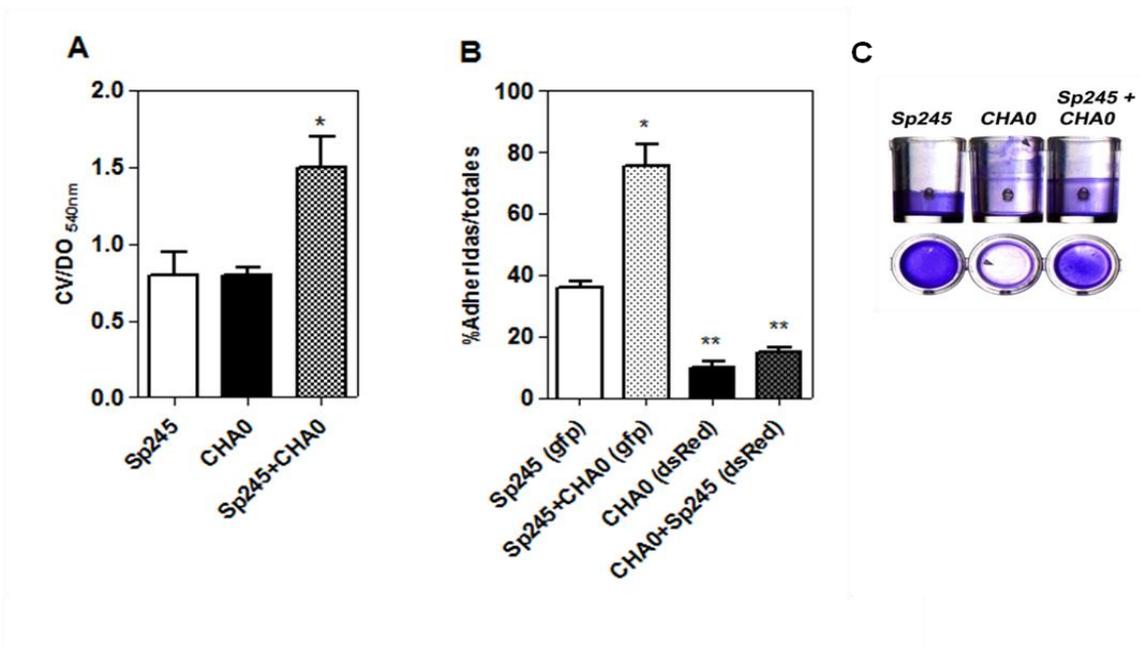
Dado que una posibilidad es que en el co-cultivo se produzcan cambios en el pH que modifiquen el crecimiento de las bacterias, se investigó si el pH del co-cultivo variaba respecto del de los cultivos simples. Para ello se agregó azul de bromotimol al medio, un indicador colorimétrico de variaciones de pH y se determinó la absorbancia. Como puede verse en la figura 3.3 D, la absorbancia a 650nm fue similar para los cultivos, indicando que el pH de los co-cultivos fue similar al de los cultivos simples.



**Figura 3.3:** Efecto de distintas concentraciones de *A. brasilense* sobre el crecimiento en cultivos mixtos de *A. brasilense* Sp245 y *P. protegens* CHA0. Los cultivos fueron iniciados con diferente número de bacterias de Sp245. Las cepas fueron crecidas en placa de 96 pocillos en medio NNF durante 2 días. El crecimiento total (células platónicas más adheridas) fue determinado por fluorescencia verde (GFP) de Sp245 (A y B) y roja (dsRed) de CHA0(C). Las UFC.ml<sup>-1</sup> fueron obtenidas mediante una regresión lineal con valores de fluorescencia para cada cepa (ver materiales y métodos). Se registró la absorbancia de los cultivos simples o mixtos con el agregado de azul de bromotimol (D).Se muestra la media con sus desvíos de 3 ensayos independientes con 3 réplicas cada uno. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA y posterior test de Tukey. \* indican diferencias significativas (P<0,05).

### **Formación de biopelícula mixta entre *A. brasilense* y *P. protegens***

Paralelamente a la cuantificación del crecimiento, se determinó capacidad de *A. brasilense* de formar *in vitro* biopelículas mixtas con *P. protegens*. Inicialmente se analizó la formación de biopelícula mediante CV. La cantidad de biopelícula formada en cultivos individuales fue significativamente menor respecto de la cantidad de biopelícula formada en cultivos mixtos (Fig. 3.4 A). Para establecer la contribución de cada cepa a este aumento en la biopelícula, se estudió la formación de biopelícula por fluorescencia. Pudo observarse que *A. brasilense* incrementó 2 veces el porcentaje de biopelícula formada en cultivos mixtos, mientras que en *P. protegens* no se observaron diferencias respecto de su cultivo simple (Fig. 3.4 B). Llamativamente, la observación de los pocillos teñidos con CV mostró que en los cultivos simples *A. brasilense* Sp245 se ubicó en el fondo y en las paredes cerca del fondo del pocillo, mientras que *P. protegens* CHA0 se ubicó más hacia arriba, sobre las paredes en la interfase aire líquido (Fig. 3.4 C). Sin embargo cuando ambas cepas crecieron juntas (co-cultivo), se cubrió todo el pocillo, tanto el fondo como las paredes (Fig. 3.4 C, Sp245+CHA0). Esto sugiere que ambas cepas estarían ocupando distintas zonas dentro del pocillo, con lo cual en los cultivos mixtos, la formación de la biopelícula podría favorecerse debido a que las cepas ocupan zonas específicas o exclusivas en el pocillo.



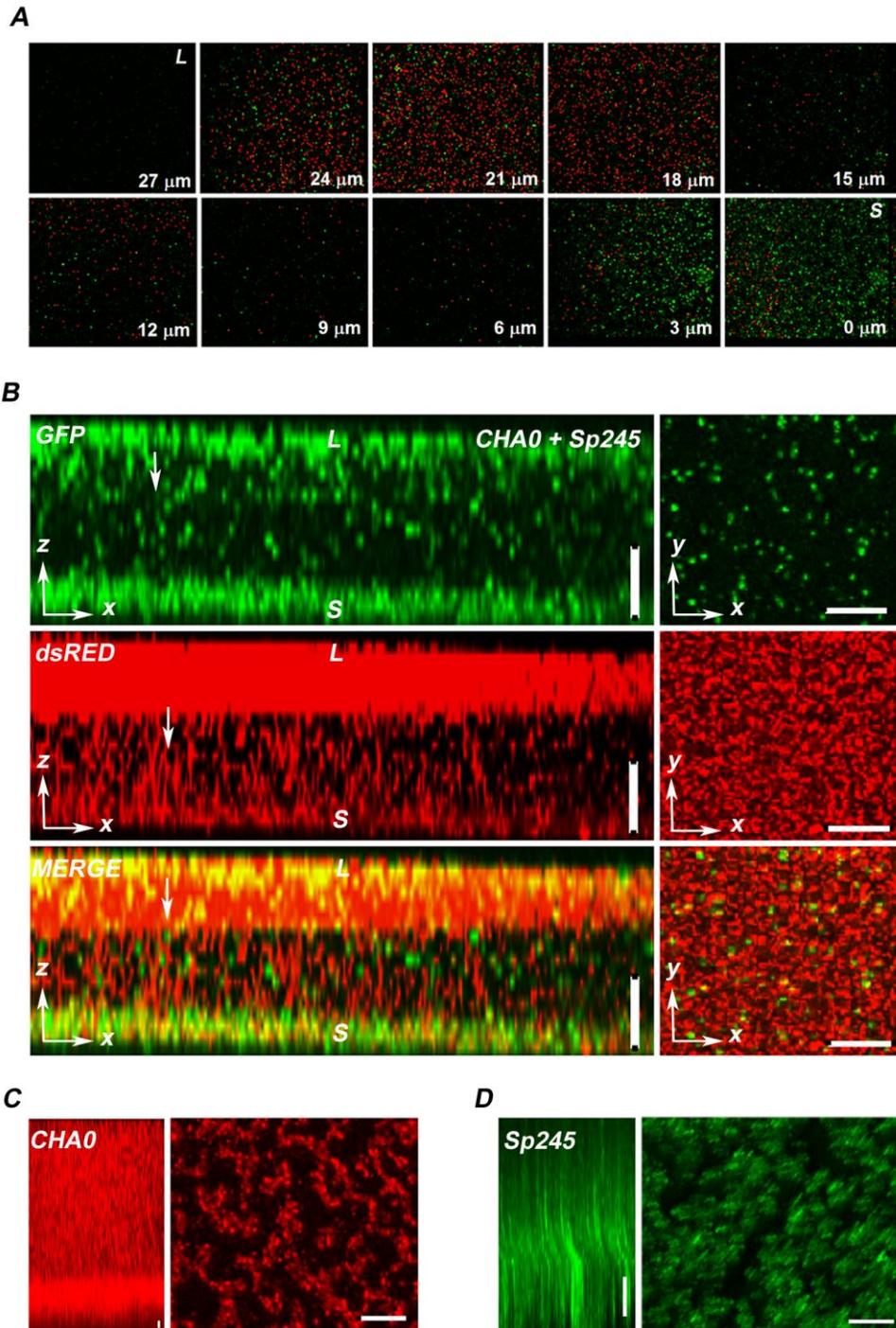
**Figura 3.4:** Formación de biopelícula simples y mixtas de *A. brasilense* Sp245 y *P. protegens* CHA0. *A. brasilense* Sp245 y *P. protegens* CHA0 fueron crecidas en placa de 96 pocillos en medio NNF durante 2 días. La formación de biopelícula se determinó por CV (A) y por fluorescencia (% de células adheridas sobre células totales) (B). Fotografía representativa de los pocillos de crecimiento de Sp245, CHA0 o Sp245+CHA0 teñidos con CV (C). Los resultados fueron analizados mediante ANOVA y posterior test de Tukey. \* y \*\* indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Sin embargo, cuando se estudió la distribución de las cepas y la estructura de la biopelícula mediante microscopia confocal, los resultados revelaron una exclusión parcial de las cepas. En este punto es importante destacar que la mayor formación de biopelícula se observó en la interface aire-líquido, razón por la cual fue esta la zona estudiada por microscopía confocal. Las imágenes obtenidas mostraron la formación de una biopelícula mixta que tenía una estructura de múltiples capas, con un espesor promedio de  $200 \pm 15 \mu\text{m}$  y una distribución particular dentro de la biopelícula (Fig. 3.5). Se observó que Sp245 se ubicó principalmente en las capas inferiores en contacto con el porta-objeto, mientras que CHA0 lo hizo hacia la superficie de la biopelícula, en contacto con el medio líquido (Fig. 3.5 A y B). Sin embargo, también pudo verse una pequeña porción de células de Sp245 localizadas cerca de la superficie (Fig. 3.5 A y B). Se destacó una zona oscura en

medio de ambas capas bacterianas, lo cual podría estar indicando la presencia de células muertas (Fig. 3.5 B).

Por otra parte, también se analizaron las biopelículas en los cultivos simples. En el caso de Sp245 la biopelícula formada tuvo un espesor aproximado de 25 $\mu$ m (Fig. 3.5 D), mientras que la biopelícula de CHA0 fue llamativamente mayor con un espesor de 600 $\mu$ m formada por capas homogéneas con una alta densidad de células hacia el fondo (no mostrado) y una estructura esponjosa con canales en las capas más cercanas a la superficie (Fig. 3.5 C). Cabe destacar que durante los pasos de lavados, pudo observarse que la biopelícula simple de Sp245 estaba débilmente adherida, mientras que la de CHA0 estaba fuertemente adherida al igual que la biopelícula mixta.

Los resultados indican que Sp245 y CHA0 son capaces de formar biopelículas mixtas con una distribución especie específica dentro de ellas, donde *A. brasilense* se ubica mayoritariamente sobre la superficie del portaobjetos, mientras que *P. protegens* lo hace por arriba de ésta y hacia la zona de contacto con el medio líquido. Asimismo la biopelícula de Sp245 fue más fuerte y densa en presencia de CHA0 respecto del cultivo simple, lo que indica que CHA0 favorecería la formación de biopelícula en Sp245. Esto no se vio para el caso de CHA0, en el que la biopelícula simple fue mucho más gruesa que la mixta.



**Figura 3.5: Análisis de la estructura de las biopelículas simples o mixtas de *A. brasilense* Sp245 y *P. protegens* CHA0 mediante microscopía confocal.** Porta-objetos recubiertos con poliestireno fueron colocados en tubos de ensayo conteniendo 3ml de medio NNF con  $10^5$  células de Sp245,  $10^5$  células de CHA0 o una combinación de ambas y crecidas estáticamente durante 2 días a 32°C. La fluorescencia a través de la biopelícula formada en la interface aire-liquido fue monitoreada. La reconstrucción de la biopelícula mixta

fue realizada cada 3  $\mu\text{m}$  (A). Se muestran proyecciones en Z (paneles a la izquierda) o imágenes XY (paneles a la derecha) de Sp245, CHA0 o la superposición (merge) de las biopelículas mixtas (B) o biopelículas simples (C y D). Sp245 expresando GFP es verde, CHA0 expresando *dsRed* es roja. Flechas blancas en las proyecciones Z indican la posición en la imagen X-Y. Las proyecciones Z fueron reconstruidas con un espacio de 3  $\mu\text{m}$  entre imágenes. L: en contacto con el medio líquido, S: en contacto con el porta-objeto. Las barras blancas representan 20  $\mu\text{m}$ .

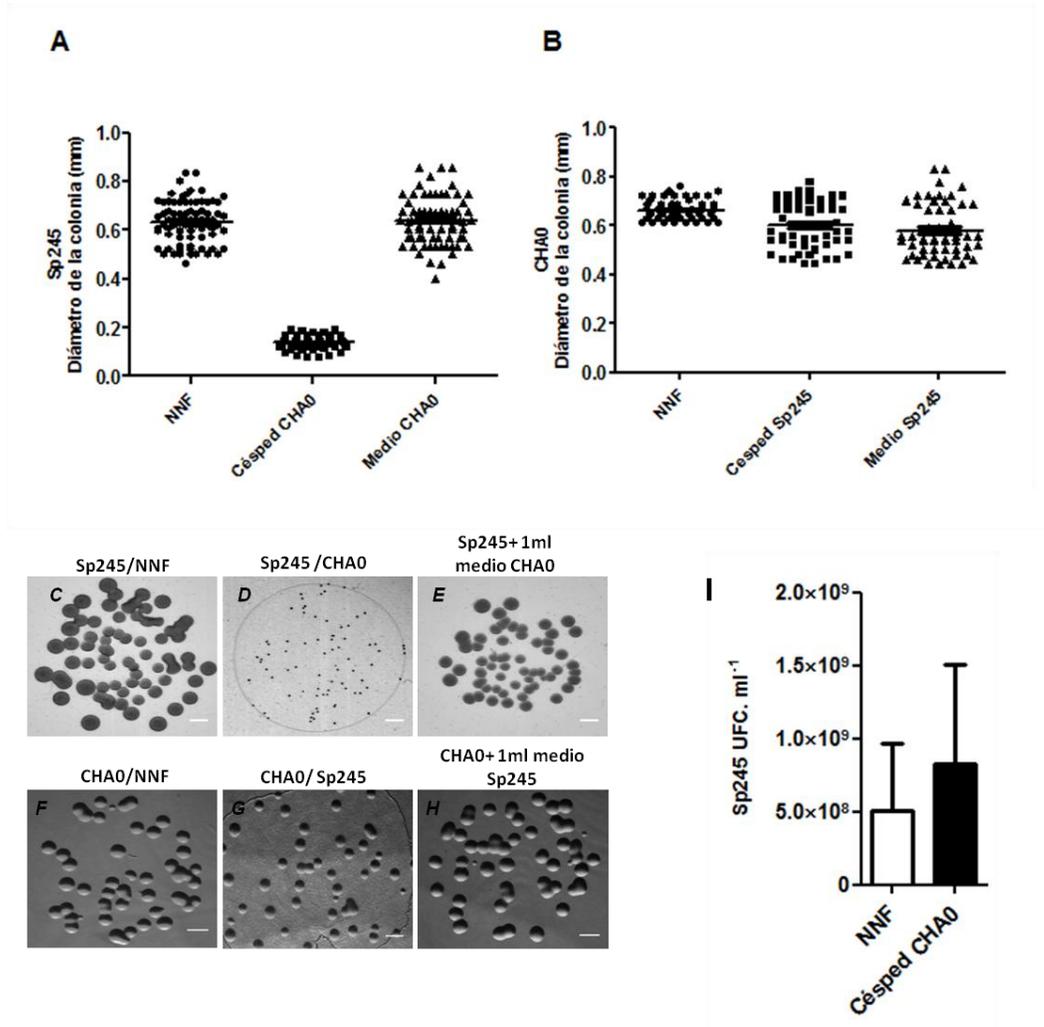
### **Interacción de *A. brasilense* y *P. protegens* creciendo en placa**

Para complementar el estudio de la interacción entre *A. brasilense* y *P. protegens* se llevó a cabo el análisis del crecimiento en placa de Petri. Se evaluó si la presencia de CHA0 afectaba directamente el crecimiento en placa de Sp245, o si Sp245 afectaba el crecimiento de CHA0. Para ello diluciones seriadas de ambas cepas fueron crecidas sobre un césped de Sp245 o CHA0, o un césped de medio agotado libre de células, e incubadas por 3 días a 32°C.

En presencia del césped de células de CHA0, la cepa Sp245 desarrolló colonias pequeñas con un diámetro promedio de 0,13 mm (Fig. 3.6 A y D), sin embargo cuando Sp245 creció sobre el césped de medio agotado y filtrado de CHA0 el desarrollo de las colonias fue similar al control con un diámetro medio de 0,65 mm (Fig. 3.6 A y E). Por otro lado, las colonias de CHA0 no se vieron afectadas ni por el césped de Sp245 ni por el medio agotado y filtrado de Sp245 manteniendo un diámetro promedio aproximado de 0,61 mm (Fig. 3.6 B, F, G y H).

Estos resultados podrían sugerir que un metabolito producido por CHA0 sería el responsable de la reducción del tamaño de las colonias de Sp245. Sin embargo, la ausencia del fenotipo de colonia pequeña en Sp245 en presencia de un césped de medio agotado y filtrado de CHA0, podría indicar la inadecuada concentración de este metabolito. Para descartar esta posibilidad se creció *P. protegens* durante 3 días ( $\text{DO}_{540\text{nm}} = 6$ ), de esta manera se obtuvo un medio concentrado en metabolitos. Nuevamente Sp245 desarrolló un fenotipo normal sobre dicho césped (no mostrado). Los resultados indican que el desarrollo de colonias pequeñas por Sp245 requiere de la presencia cercana de CHA0, o bien que es un metabolito que secretan las células de CHA0 solo cuando están en contacto con Sp245 como respuesta a su presencia. Por otro lado, el número de colonias

de Sp245 (UFC.ml<sup>-1</sup>) desarrolladas sobre el césped de CHA0 fue mayor que su control (Fig. 3.6 I). Si bien este efecto positivo no fue significativo, es importante destacar que la mayoría de las repeticiones realizadas mostraron una tendencia en el mismo sentido.

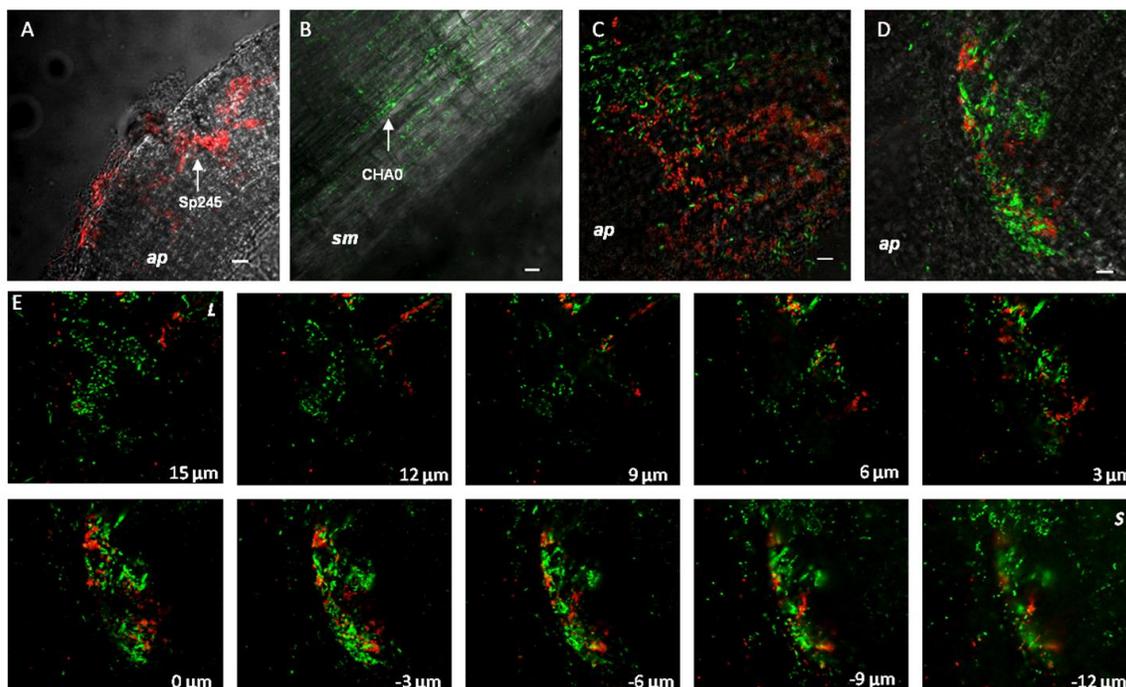


**Figura 3.6: Crecimiento en placa de *A. brasilense* Sp245 y *P. protegens* CHA0.** Diluciones seriadas de cada cepa fueron sembradas sobre NNF, sobre un césped de CHA0 o de Sp245, o medio agotado y filtrado. Se midió el diámetro de las colonias de Sp245 (A) y de CHA0 (B), la morfología de las colonias fue analizada con lupa óptica (C-H), y se calculó el número de UFC para Sp245 (I). La barra en cada fotografía representa 1 mm.

### **Formación de biopelículas mixtas sobre raíces**

Los resultados obtenidos muestran que *A. brasilense* y *P. protegens* son capaces de formar una biopelícula mixta *in vitro*, y que la presencia de CHA0 tiene un efecto positivo no solo sobre el crecimiento estático, sino también sobre la biopelícula de Sp245 (Fig. 3.2, 3.4 y 3.5). En base a esto, se decidió evaluar la formación de biopelículas sobre raíces de plántulas de tomate. Para ello, se colocaron plántulas de tomate de 7 días en tubos de ensayo cuyas raíces quedaron sumergidas en agua conteniendo células de Sp245 o de CHA0, o una combinación de ambas. Luego de dos días de incubación, se retiraron las plántulas y las raíces se observaron al microscopio confocal. Paralelamente se realizaron los recuentos de UFC por peso fresco de raíz. Se encontró que *A. brasilense* colonizó principalmente el ápice de la raíz encontrándose bacterias aisladas o formando cúmulos de células (Fig. 3.7 A), sin embargo en las partes superiores o más viejas de la raíz la colonización fue marcadamente menor (no mostrado). Contrariamente a *Azospirillum*, *P. protegens* colonizó mayormente la parte media de la raíz observándose (al igual que para *Azospirillum*) células aisladas y cúmulos de bacterias (Fig. 3.7 B) y en menor proporción el ápice (no mostrado). Sin embargo, cuando ambas cepas se inocularon conjuntamente, la colonización fue mayor en el ápice (Fig. 3.7 C y D). En esta zona de la raíz pueden verse células aisladas de Sp245 y de CHA0 colonizando diferentes aéreas (Fig. 3.7 C), o bien agrupamientos de células constituidos por ambas cepas (Fig. 3.7 D). Para evaluar la disposición de Sp245 y CHA0, en estos agrupamientos se realizó un seccionamiento óptico. Como puede verse en la figura 3.7 E, hacia el líquido (15  $\mu\text{m}$ ) pueden verse pequeños agregados de células de CHA0 y en menor cantidad de *A. brasilense*. Luego, avanzando en profundidad hacia la superficie de la raíz, comienzan a observarse aglomerados tanto de Sp245 y de CHA0 (-3 y -6  $\mu\text{m}$ ). Si bien no pudo observarse formación de biopelículas mixtas, estos agrupamientos de células sugieren que cuando están juntas *A. brasilense* y *P. protegens* pueden colonizar la raíz en las mismas zonas, preferentemente el ápice, y formar aglomerados mixtos en los cuales cohabitan ambas especies. El recuento de UFC.g<sup>-1</sup> de peso fresco de raíz mostró valores en el rango de 10<sup>7</sup> UFC.g<sup>-1</sup> indicando que la inoculación simple fue efectiva para las dos cepas (3.9x10<sup>7</sup> UFC.g<sup>-1</sup>

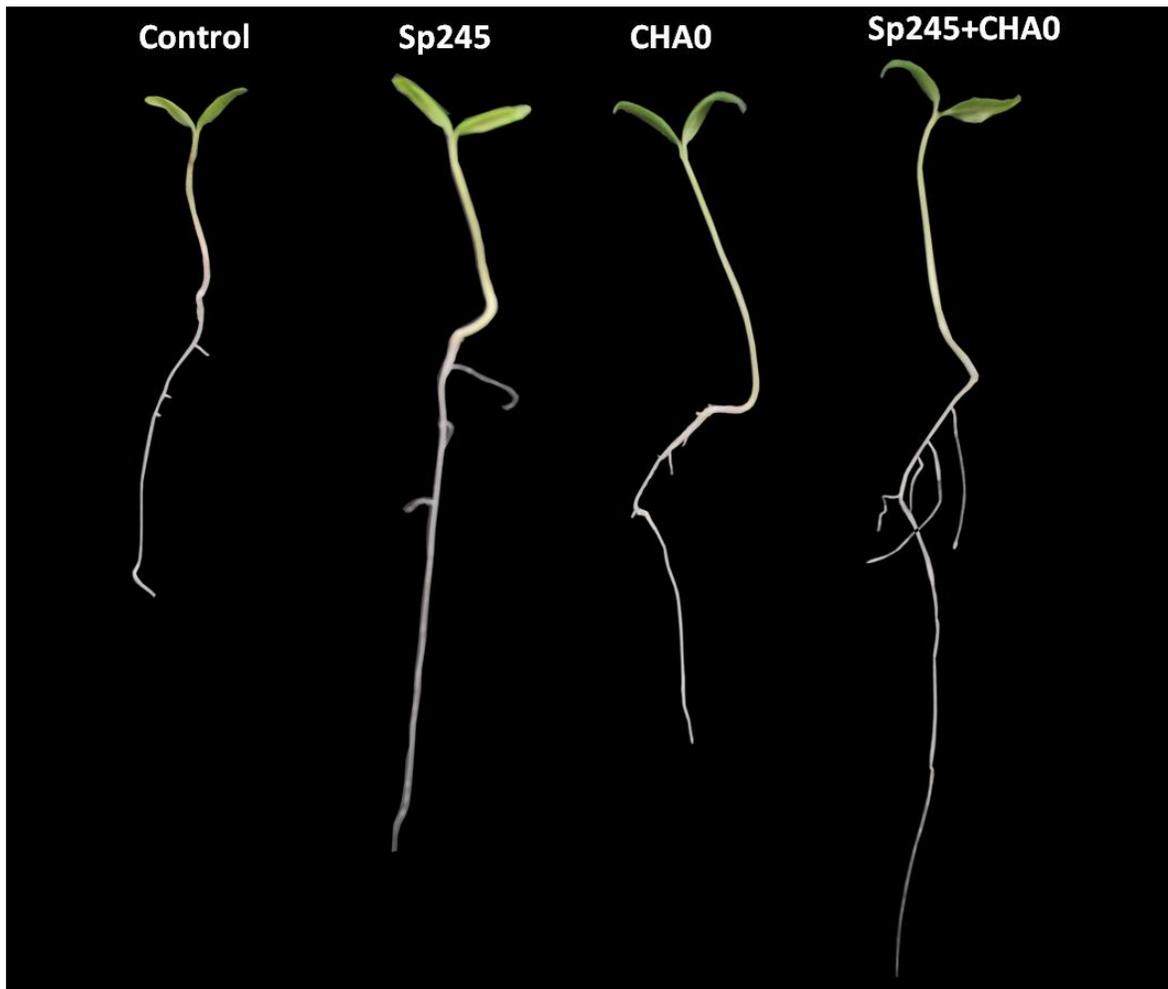
para Sp245 y  $1.3 \times 10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> para CHA0). En cuanto a las raíces inoculadas con ambas cepas, el número de UFC de Sp245 fue de  $2 \times 10^7$  UFC.g<sup>-1</sup>, mientras que el de CHA0 fue  $3.5 \times 10^7$  UFC.g<sup>-1</sup>. Esto indica que la co-inoculación no afectó la colonización de las cepas comparado a la inoculación de cada una por separada.



**Figura 3.7:** Análisis de la colonización de raíces de tomate co-inoculadas con *A. brasilense* y *P. protegens*. Las plántulas de tomate fueron colocadas en tubos conteniendo agua con  $10^5$  células de Sp245 (A),  $10^5$  células de CHA0 (B) o una combinación de ambas ( $5 \cdot 10^4$  bacterias de cada especie.ml<sup>-1</sup>) (C y D). Luego de 2 días las plantas fueron retiradas y las raíces observadas al microscopio confocal. Se realizó un z-stack, reconstruyendo la imagen cada 3 μm (E). *A. brasilense* expresando constitutivamente *dsRed* es roja (A), *P. protegens* expresando constitutivamente GFP es verde (B). *ap*: ápice de la raíz, *sm*: superficie de la raíz. La barra en (A) y (B) corresponde a 20 μm, mientras que en (C y D) a 10 μm. *L*: en contacto con el líquido. *S*: en contacto con la superficie de la raíz.

El análisis del aspecto morfológico de las plántulas de tomate luego de la inoculación con las cepas bacterianas, mostró que tanto las inoculaciones simples como la co-inoculación con *A. brasilense* y *P. protegens* tuvieron efecto de promoción del crecimiento de las plántulas. Como puede verse en la figura 3.8, las plántulas inoculadas con Sp245 o con CHA0 se vieron más grandes y de mejor aspecto, y mostraron principalmente un mayor desarrollo radicular que las plántulas control. En el caso de la co-

inoculación con ambas cepas, este efecto fue aún mayor, observándose raíces laterales más largas. Este resultado indica que, tanto la inoculación como la co-inoculación fueron efectivas, ya que las plántulas presentaron un evidente efecto de promoción del crecimiento.



**Figura 3.8:** Aspecto morfológico de plántulas de tomate luego de la inoculación simple o co inoculación con *A. brasilense* y *P. protegens*. Las plántulas de tomate fueron colocadas durante 2 días en tubos conteniendo agua estéril (control), agua con  $10^5$  células de Sp245, con  $10^5$  células de CHA0, o con una combinación de ambas ( $5 \cdot 10^4$  bacterias de cada especie. $\text{ml}^{-1}$ ). Pasado el tiempo de incubación las plántulas fueron retiradas y fotografiadas. Se muestra la morfología representativa de  $n=10$  repeticiones por tratamiento.

## Discusión

Debido a la capacidad de estimular el crecimiento y mejorar la salud de cultivos, las PGPR han sido foco de estudio en los últimos años (Beneduzi et al. 2012; Bhattacharyya y Jha 2012; Drogue et al. 2013; Hayat et al. 2010; Lugtenberg y Kamilova 2009). Sin embargo, el estudio de la interacción entre microorganismos PGPR con otros habitantes de la rizosfera, ha recibido menos atención. La generalización en Argentina del uso de inoculantes mixtos que contienen *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens* (Bhattacharyya y Jha 2012), requiere de estudios que demuestren la capacidad de ambas bacterias de co-existir en un mismo hábitat y a su vez de ejercer sus efectos promotores y/o protectores sobre la planta.

En este capítulo se estudió la interacción entre *A. brasilense* y *P. protegens* durante el crecimiento estático y se evaluó la capacidad de ambas cepas de formar biopelículas mixtas sobre superficies inertes y sobre raíces.

En primera instancia se analizó el crecimiento estático de cultivos mixtos de *A. brasilense* Sp245 y *P. protegens* CHA0. Se observó que tanto el crecimiento de Sp245 como el de CHA0 fueron mayores cuando ambas cepas crecieron juntas que cuando lo hicieron por separado (Fig. 3.2 A). De este modo, el hecho de que tanto la DO como las UFC se incrementaran para ambas especies durante su co-cultivo (Fig. 3.2), indica una cooperación interespecífica, y descarta, en principio, un efecto negativo de *P. protegens* sobre el crecimiento de *A. brasilense* mediado por compuestos liberados al medio (Fig. 3.2 B). La producción de una amplia variedad de compuestos antimicrobianos es una característica del género *Pseudomonas* (Haas y Défago 2005). Dentro de estos, el más estudiado es el DAPG (Keel et al. 1990). No obstante, ha sido demostrado que bajas concentraciones de este compuesto promueven el crecimiento de la cepa Cd de *A. brasilense in vitro* (Couillerot et al. 2011). Estos resultados sugerirían que el DAPG podría ser el metabolito responsable de los efectos observados en este ensayo. Experimentos con cepas de CHA0 mutantes en los genes de síntesis de DAPG podrían corroborar dicha hipótesis. Otra evidencia que apoya lo anteriormente expuesto es el resultado obtenido en los ensayos en los que se utilizó medio agotado filtrado, en el cual el medio agotado libre de células de CHA0 o de Sp245, también fue capaz de promover el crecimiento de la

otra cepa (Fig. 3.2 B y C). Sin embargo, este efecto no se repitió cuando el crecimiento fue evaluado en placa de Petri (Fig. 3.6 C-H). En este sentido, se sabe que las bacterias pueden interactuar sinérgicamente, ya sea proporcionando nutrientes, eliminando algunos productos inhibidores, o estimulándose mutuamente a través de mecanismos físicos o bioquímicos (Burmølle et al. 2006). Entre estos, los cambios en el pH, en las condiciones de microaerofilia, en la producción de EPS como en la liberación de metabolitos solubles, podrían explicar el aumento en el crecimiento de ambas cepas en esta interacción. Sin embargo, los experimentos realizados con el medio de cultivo agotado, donde la producción de EPS o las condiciones de microaerofilia no son factores determinantes, descartan dichas posibilidades. Junto a esto, también se descartan los cambios en el pH del medio, ya que no se detectaron variaciones en el mismo en los co-cultivos respecto de los cultivos simples (Fig. 3.3 D). Además, el resultado encontrado acerca de que este efecto estimulador de crecimiento es dependiente del número inicial de UFC.ml<sup>-1</sup> de Sp245, podría indicar que la relación numérica entre Sp245 y CHA0 en el co-cultivo es determinante para que se produzca dicho efecto (Fig. 3.3 A, B y C).

En una segunda instancia se evaluó la formación de biopelículas mixtas por Sp245 y CHA0. La capacidad de *Azospirillum* y de *Pseudomonas* de formar biopelículas *in vitro* ya había sido previamente demostrada (Allison et al. 1998; Arruebarrena Di Palma et al. 2013). Los resultados obtenidos en este capítulo indican que en el co-cultivo ambas cepas fueron capaces de formar biopelículas mixtas, y que la biopelícula de *A. brasilense* fue mayor cuando creció junto con *P. protegens* (Fig. 3.4 B). La observación de la biopelícula mediante la tinción con CV (Fig. 3.4 C) mostró que cada cepa se ubicó en distintas zonas del pocillo, posiblemente debido a la preferencia de cada cepa por una determinada concentración de oxígeno. En el fondo del pocillo donde existe un ambiente de microaerobiosis se ubicó Sp245, mientras que CHA0, estrictamente aeróbica, lo hizo en la parte superior del pocillo en la interface aire-líquido (Fig. 3.4 C). En los co-cultivos, pudo observarse que todo el pocillo se cubrió con CV, lo que podría indicar que cada cepa estaría ocupando un nicho específico dentro del pocillo (Sp245 en el fondo y paredes inferiores CHA0 en las paredes superiores). Sin embargo este método no permite

distinguir la ubicación de cada cepa, por lo que no se puede con esta metodología descartar que ambas cepas se encuentren juntas formando biopelícula mixta en la misma zona. Las imágenes de microscopía confocal mostraron que la formación de biopelículas mixtas ocurría también en la interfase aire-líquido (Fig. 3.5). Esta biopelícula formada por múltiples capas, mostró que Sp245 se ubicó principalmente en las capas inferiores, mientras que CHA0 lo hizo hacia la superficie de la biopelícula, en contacto con el medio líquido (Fig. 3.5 A y B). Esta distribución particular podría deberse a que el consumo de oxígeno por parte de la biopelícula de CHA0 genera zonas microaerofilas y permite a Sp245 colonizarlas. En línea con esta hipótesis, Fox et al. (2014) demostraron que dentro de la biopelícula de *C. albicans* se generaba un microambiente hipóxico que permitía el crecimiento de dos bacterias anaeróbicas, y que en ausencia de dicha biopelícula la viabilidad de estas bacterias decrecía drásticamente.

Por otra parte, el porcentaje de adhesión de *A. brasilense* fue mayor en la biopelícula mixta, que en la simple (Fig. 3.4 B y 3.5). Joe et al. (2009) mostraron que *Azospirillum* es capaz de crecer en medio líquido junto a *Pseudomonas* durante 5 días y de co agregar conjuntamente. La formación de co agregados mixtos le confirió a ambas bacterias una mayor supervivencia en la rizosfera, un aumento en la tolerancia a la desecación, y en la capacidad de adhesión a raíces de arroz (Joe et al. 2009). Además, se ha demostrado que las células de *Azospirillum* se agregan y floculan bajo diversas condiciones de estrés y por cambios en la relación carbono/nitrógeno en el medio (Burdman et al. 1998; Joe et al. 2009). El hecho de que la biopelícula de *A. brasilense* sea más densa y gruesa cuando es co-cultivada con *P. protegens* podría indicar una adaptación a un microambiente particular generado por ambas especies cuando coexisten. Algunos autores sugieren que dentro de una biopelícula mixta existe una cooperación metabólica que favorece el desarrollo de los integrantes de la misma (Fox et al. 2014; Lee et al. 2014; Ren et al. 2015). En relación a esto, ha sido demostrado que en co-cultivos formados por cuatro especies aisladas de suelo, cada especie formó mayor cantidad de biopelícula en el co-cultivo respecto de su cultivo simple, sugiriendo una especie de sinergismo en las biopelículas multiespecies (Ren et al. 2015).

Respecto a los ensayos de formación de biopelículas sobre raíces de plántulas de tomate, ambas cepas fueron capaces de colonizar la raíz y en igual grado tanto cuando se inocularon por separado como en forma mixta (Fig. 3.7). Las UFC  $\text{gr}^{-1}$  de PF de raíz de cada cepa creciendo juntas fueron similares a las UFC de la cepa creciendo sola (en el orden de  $10^7$  UFC. $\text{gr}^{-1}$ ). Resultados similares obtuvieron Pagnussat et al. (2013), quienes mostraron que el crecimiento de *A. brasilense* y de *P. protegens* en las raíces, no se modificó independientemente de la inoculación de las cepas solas o combinadas. Esto apoya la hipótesis de que ambas cepas pueden colonizar conjuntamente la raíz sin afectar el crecimiento y la colonización de la otra. Sin embargo la distribución de ambas especies en la raíz fue diferente. Cuando las raíces de tomate fueron inoculadas con los cultivos simples, *A. brasilense* colonizó principalmente el ápice (Fig. 3.7 A), mientras que *P. protegens* colonizó la parte media de la raíz (Fig. 3.7 B). Llamativamente, en la co-inoculación ambas cepas colonizaron principalmente el ápice, donde pudo observarse a Sp245 y CHA0 colonizando distintas aéreas dentro de la misma zona de la raíz (Fig. 3.7 C). Resultados similares obtuvo Couillerot et al. (2011) en raíces de trigo, donde reportó el mismo patrón de colonización por *A. brasilense* Cd y *P. fluorescens* F113. Estos autores adjudican esta disposición espacial a la producción de DAPG por parte de *Pseudomonas*, ya que la co-inoculación de *A. brasilense* Cd con mutantes de *P. fluorescens* incapaces de sintetizar este metabolito mostró a ambas cepas colonizando las mismas zonas de la raíz, mientras que la co inoculación de *A. brasilense* con la cepa salvaje de *P. fluorecens* mostró a ambas bacterias en distintas zonas de la raíz (Couillerot et al. 2011). Sin embargo, los resultados aquí presentados mostraron pequeños agregados formados Sp245 y CHA0 en el ápice (Fig. 3.7 D), lo que permitiría suponer que CHA0 en presencia de Sp245 no produce o produce DAPG en concentraciones que no afectan la colonización de *A. brasilense*. El estudio de la estructura de estos agregados mostró una disposición particular, nuevamente CHA0 hacia afuera y en contacto con el líquido mientras que Sp245 más hacia el fondo en contacto con la superficie de la raíz (Fig. 3.7 E). Si bien en este ensayo no pudo observarse la formación de una biopelícula densa formada por ambas cepas, los resultados se aproximan a los obtenidos en los experimentos de

formación de biopelícula sobre una superficie artificial (Fig. 3.5). A partir de esto se puede sugerir que ambas cepas son capaces de formar biopelícula mixtas sobre la raíz con una distribución específica dentro de la misma. Por otra parte, que no se haya formado una biopelícula sobre la raíz a los 2 días siendo que si lo observamos sobre superficies artificiales, pudo deberse a que este tiempo sea escaso para que las bacterias se adapten a un nuevo ambiente donde, las condiciones de crecimiento fueron modificadas en función de mantener saludables las plántulas (periodo luz/oscuridad, 25°C).

Los ensayos de crecimiento en placa de Petri mostraron que *P. protegens* fue capaz de modificar la morfología de la colonia de *A. brasilense* (Fig. 3.6). En este caso, la presencia de un césped de CHA0 produjo una disminución en el tamaño de las colonias de Sp245 (Fig. 3.6 A, C y D) mientras que, si bien el número UFC no se vio modificado significativamente, tuvo una tendencia a aumentar (Fig. 3.6 I). El hecho de que el número de UFC no haya sido afectado indica que CHA0 no afecta la viabilidad de Sp245. Sin embargo el fenotipo observado de las colonias de Sp245 en presencia de un césped de CHA0 podría adjudicarse a una depleción de nutrientes generada por la competencia con CHA0. Esto no puede descartarse a pesar de que el medio utilizado para estos experimentos fue suplementado con nitrato y con hierro, este último se adicionó para limitar la producción de sideróforos por parte de *Pseudomonas* que podrían perjudicar el crecimiento de *Azospirillum*. Otra posibilidad es que la tasa de crecimiento de Sp245 en presencia de CHA0 fuese más lenta, sin embargo luego de 23 días de crecimiento el tamaño de las colonias permaneció igual (Maroniche datos no publicados). El fenotipo de colonia pequeña observado para Sp245 es generalmente el observado en las bacterias patogénicas bajo condiciones de estrés. Estas variantes en los fenotipos son llamadas variantes de colonias pequeñas (SCV, por sus siglas en inglés: *small colony variants*) y han sido extensamente estudiadas en varios géneros incluyendo *Pseudomonas* (Häußler et al. 1999). Estas SCV constituyen una subpoblación de colonias poco pigmentadas que son aproximadamente 10 veces más pequeñas y más susceptibles a antibióticos (Proctor et al. 2006). El efecto observado de CHA0 sobre las colonias de Sp245 podría ser el resultado de

la exposición a metabolitos producidos por CHA0 que induzca una respuesta fenotípica del tipo SCV.

Por otra parte, Sp245 no modificó ni el número ni la morfología de la colonia de CHA0. El hecho de que el fenotipo de la colonia Sp245 se haya modificado solo en presencia de CHA0 y no con el césped de medio filtrado agotado y concentrado de CHA0, podría sugerir que este metabolito es producido y secretado al medio por *P. protegens* solo en presencia de *A. brasilense*. Existen reportes donde el crecimiento de dos colonias vecinas de *P. dendritiformis* se inhibe mutuamente (Be'Er et al. 2009), y se ha demostrado que la causa de dicho efecto es la secreción de un factor difusible (Be'er et al. 2010). Si bien en esta tesis se presentan evidencias que soportan la existencia de un metabolito probablemente difusible, se desconoce por completo su naturaleza, la obtención y caracterización de mutantes de CHA0 que sean incapaces de inducir este fenotipo en Sp245 sería una primera aproximación para corroborar dicha hipótesis.

Finalmente, existen reportes en los que se muestra que la co-inoculación con distintas cepas de *Azospirillum* y *Pseudomonas* promueven un aumento en la superficie radicular de trigo (Combes-Meynet et al. 2011) y de maíz (Faggioli et al. 2003), así como también un incremento en la germinación y la resistencia a enfermedades en arroz (Joe et al. 2009). En esta tesis, tanto la inoculación simple como la co-inoculación con *A. brasilense* y *P. protegens* produjo una efectiva promoción del crecimiento en las plántulas de tomate (Fig. 3.8), evidenciándose principalmente en un incremento del sistema radicular. Este resultado refuerza aún más las evidencias directas (Fig. 3.7) sobre la colonización de las raíces de tomate por *A. brasilense* y *P. protegens* y permite postular que ambas cepas son capaces de colonizar la raíz conjuntamente y promover en forma sinérgica el crecimiento de plántulas de tomate.

En resumen, los resultados presentados en este capítulo permiten establecer que *A. brasilense* Sp245 y *P. protegens* CHA0 son capaces de interactuar y favorecer conjuntamente su crecimiento. Además, se ha podido mostrar que ambas cepas forman

una biopelícula mixta con una distribución especie-específica tanto en superficies inertes como en raíces y que existe una comunicación activa entre estas dos bacterias.

## **Conclusiones generales, aportes y perspectivas**

## Conclusiones generales

En esta tesis se presenta evidencia acerca de dos factores importantes relacionados a la promoción del crecimiento vegetal por *Azospirillum brasilense*, como son la regulación de la formación de biopelícula y la interacción con otro microorganismo de la rizosfera, *Pseudomonas protegens*.

En el capítulo 1 se estudió la formación de biopelícula y la participación de las moléculas señal óxido nítrico y auxinas en la regulación de este proceso. En base a los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la hipótesis planteada que establecía que el óxido nítrico y las auxinas participan conjuntamente en la regulación de la formación de biopelícula de *Azospirillum*, siendo este proceso necesario para la colonización exitosa de la raíz, se concluye que la misma **es rechazada**.

Los resultados permiten establecer sólo al NO como regulador de la formación de biopelícula. El análisis de la formación de biopelícula por Faj009 (mutante en la producción de AIA) y por Faj164 (mutante en la producción de NO) indica que ambas cepas formaron menos biopelícula que Sp245 a los 2 días de crecimiento estático en medios con nitrato, donde está favorecida la producción de NO (Molina Favero et al. 2008). La complementación química con el dador de NO (SNP) restituyó la formación de la biopelícula en Faj164, sin embargo el agregado de AIA sintética no lo hizo.

Las evidencias previamente descriptas desvinculan a la auxina como regulador directo en la formación de biopelícula en *A. brasilense*. Sin embargo se encontró que frente al agregado de AIA exógeno existe un claro efecto de disminución de la formación de biopelícula. La reducción de la formación de biopelícula por el AIA se debe, en parte, a que esta molécula es capaz de afectar los niveles de NO. El agregado de AIA exógeno disminuye la producción de nitritos, la síntesis *de novo* de NO, así como también la expresión del gen *Nir*, que codifica para una de las enzimas encargadas de la síntesis de NO. Esto permite concluir que la auxina reduce la formación de biopelícula indirectamente, a través de la disminución de los niveles de NO.

Sin embargo, como se mencionó en la introducción de esta tesis, la auxina es considerada una molécula señal en *Azospirillum* (Van Puyvelde et al. 2011), por lo que no puede descartarse que afecte otros aspectos involucrados en la formación de biopelícula como es la producción de EPS y la movilidad, entre otros (Lee et al. 2011).

Por otro lado, se encontró que el NO también afecta los niveles de auxinas. Los resultados indican que el NO reduce los niveles de AIA, posiblemente afectando la expresión de uno de los genes clave en la síntesis de auxinas en *A. brasilense*, el gen de la piruvato decarboxilasa (*ipdC*). Análisis más precisos de la expresión de los genes involucrados en la síntesis de AIA frente a diferentes concentraciones de NO ayudarían a confirmar este resultado.

La auxina dispersa la biopelícula madura en Sp245, pero no en Faj164 y Faj009. Este efecto de dispersión podría depender de la concentración de AIA, dado que la cepa salvaje posee mayor contenido de AIA en la biopelícula madura.

La formación de biopelícula y la colonización de las raíces de plántulas de tomate fueron similares para la cepa salvaje como para las mutantes *Nap<sup>-</sup>* e *ipdC*.

Los resultados expuestos en el capítulo 1 permiten hipotetizar acerca de una intercomunicación entre el AIA y el NO en *Azospirillum brasilense*: el NO modificaría los niveles de AIA alterando la expresión del gen *ipdC*, mientras que el AIA afectaría los niveles de NO, afectando, en parte, la vía de desnitrificación. Sin embargo, la formación de biopelícula solo estaría siendo regulada por los niveles de NO.

Posteriormente se estudió la capacidad de formar biopelícula de *Azospirillum brasilense* Sp245 y de la cepa nativa Az39 en condiciones de estrés salino (cap. 2). La hipótesis planteaba que *Azospirillum brasilense* forma biopelícula en respuesta a condiciones de salinidad, siendo el AIA y el NO participantes de la regulación de este proceso. En base a los resultados obtenidos se puede concluir que en forma parcial, la hipótesis **no se rechaza**. *A. brasilense* forma gran cantidad de biopelícula en condiciones de salinidad. El uso de las mutantes Faj164 y Faj009 permitió establecer que el NO participa de este proceso, no así las auxinas. Sin embargo, los resultados permiten suponer la existencia de

otro/s mecanismo/s de regulación de la formación de biopelícula frente a estas condiciones.

Por otro lado y abordando otro aspecto importante para una PGPR como lo es la interacción con otro microorganismo de la rizosfera, en el capítulo 3 de esta tesis, se estudió la interacción de *A. brasilense* con *P. protegens* durante el crecimiento y la formación de biopelícula.

La hipótesis para este capítulo planteaba que *Azospirillum* y *Pseudomonas* son capaces de crecer en forma conjunta y formar biopelículas mixtas (*in vitro* y sobre raíces) a través de una comunicación activa entre estas dos bacterias que modula la interacción inter-específica. En base a los resultados obtenidos y discutidos se puede concluir que **no se rechaza la hipótesis.**

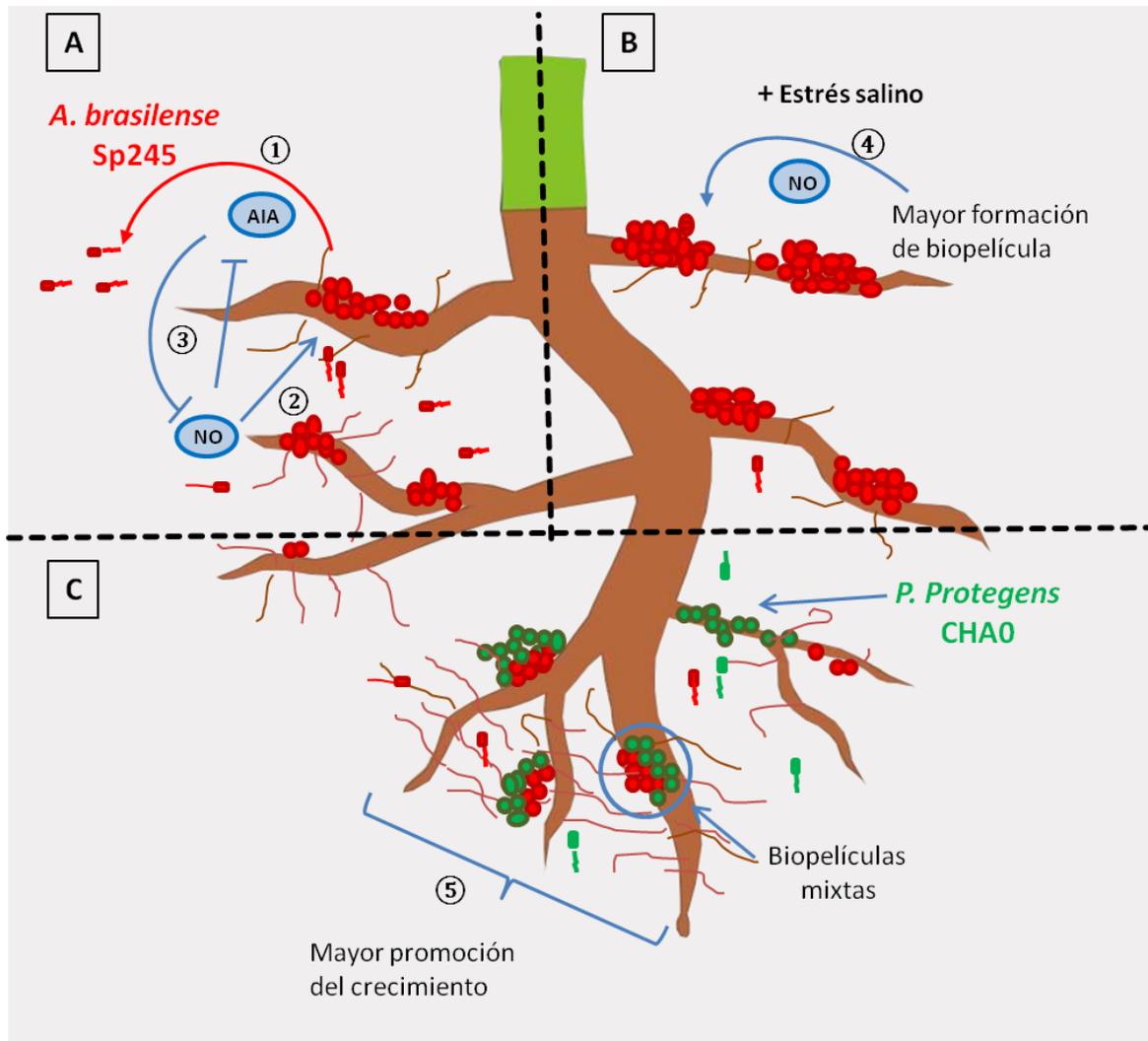
*A. brasilense* Sp245 y *P. protegenes* CHA0 son capaces de crecer en forma conjunta incrementando cada cepa su crecimiento, lo que sugiere una cooperación inter-específica. Los resultados permiten establecer la existencia de un factor liberado al medio de cultivo, como responsable de este efecto de estimulación. Sin embargo, este efecto sería dependiente de la cantidad de células de *A. brasilense* presentes en el co-cultivo.

Las evidencias permiten establecer que *A. brasilense* y *P. protegens* forman biopelículas mixtas sobre superficies inertes. Esta biopelícula mixta tiene una distribución especie-específica, en la cual *A. brasilense* se ubica principalmente en las capas inferiores mientras que *P. protegens* lo hace hacia la superficie de la biopelícula.

Ambas cepas forman biopelícula sobre las raíces, con la misma distribución especie-específica descrita, y colonizan efectivamente en forma conjunta las raíces ejerciendo un efecto sinérgico de promoción del crecimiento respecto de la inoculación simple.

*P. protegens* afecta el crecimiento en placa de *A. brasilense*, provocando un aumento en el número de colonias y una disminución en el tamaño de las mismas. Este fenotipo de colonias pequeñas en *A. brasilense* es observado solo en presencia de *P. protegens*, y no cuando se agrega el medio en el que creció conteniendo sus metabolitos,

por lo que sería necesaria una comunicación activa entre ambas especies, que modula tanto el crecimiento como la formación de biopelícula.



**Esquema de la formación de biopelícula y colonización de la raíz por *A. brasilense* y *P. protegens*.** A: *A. brasilense* produce AIA y NO; el AIA dispersa la biopelícula madura (1), mientras que el NO es necesario para la formación de biopelícula (2). Existe una interacción entre el AIA y el NO en *A. brasilense*, actuando cada uno como modulador negativo del otro (3). B: en condiciones de estrés salino, aumenta la formación de biopelícula (4). C: Durante el co-cultivo *A. brasilense* (●) y *P. protegens* (●) colonizan la raíz en forma separada, pero también en forma conjunta formando biopelículas mixtas con una disposición de *A. brasilense* preponderante sobre la raíz y de *P. protegens* mayoritariamente sobre la cara externa de la biopelícula o aglomerados celulares. La co-inoculación promueve un mejor desarrollo del sistema radical respecto de la inoculación simple (5).

## Aportes y perspectivas

La información generada en esta tesis permite una aproximación al conocimiento de los mecanismos básicos que regulan la formación de biopelícula en *Azospirillum*, permitiendo inferir acerca de la importancia del NO como determinante para el establecimiento de la biopelícula.

La habilidad de producir hormonas vegetales es una de las propiedades más importantes de *Azospirillum* (Bashan y de-Bashan 2010). *Azospirillum brasilense* produce NO a partir de nitrato (Molina Favero 2013), compuesto que puede encontrarse en los suelos fertilizados. Sin embargo, la desnitrificación es una característica indeseada en las PGPR que se utilizan como inoculante, porque reducen la disponibilidad de nitrato en el suelo para las plantas (Bashan y de-Bashan 2010). En base a los antecedentes generados en nuestro grupo de investigación, que establecen que el NO es capaz de promover el desarrollo de raíces laterales y adventicias (Molina Favero 2013), y que es necesario para el establecimiento de una biopelícula (Arruebarrena Di Palma et al. 2013 y presente tesis), en este punto, la presencia de nitrato en el suelo favorecería la producción de NO por parte de *Azospirillum* y la formación de biopelícula, la colonización y la promoción del crecimiento por parte de *Azospirillum*. Asimismo, las evidencias de la interacción entre AIA y NO en *Azospirillum*, establecen que esta bacteria sería capaz de regular la producción de una u otra molécula en base a la presencia de la otra. Teniendo en cuenta que ambas moléculas son producidas también por la planta, sería de interés estudiar esta regulación en la rizosfera y qué ventajas le confiere a la bacteria este mecanismo de regulación cruzada en la interacción con la planta. Además, esta tesis aporta nuevas evidencias acerca de la existencia de un mecanismo de dispersión de la biopelícula mediada por auxinas, el cual permitiría que células de *Azospirillum* colonicen y formen biopelículas en otras zonas del mismo u otro hospedador.

Por otra parte, en bacterias y particularmente en *Azospirillum*, existe un solo reporte acerca de la interacción entre el AIA y el NO (Koul et al. 2015b), por lo que estos

resultados aportan nuevas evidencias para comprender el metabolismo de la bacteria y su relación con los posibles mecanismos de promoción del crecimiento vegetal.

Por otro lado, esta tesis presenta las primeras evidencias acerca de la formación de biopelícula por *A. brasilense* como estrategia para sobrevivir a condiciones de alta salinidad y la participación del NO en esta respuesta. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren la existencia de otro/s mecanismo/s que estarían involucrados en regular la formación de biopelícula en condiciones de estrés salino. Estudios globales de expresión génica para analizar los mecanismos implicados en la tolerancia a la salinidad, podrían ser la base para continuar con investigaciones que llevarán a potenciar y optimizar el empleo de *Azospirillum* como herramienta biotecnológica.

Teniendo en cuenta que *Azospirillum* y *Pseudomonas* son actualmente utilizadas en nuestro país para la formulación de inoculantes mixtos de uso agrícola, los resultados de esta tesis aportan información valiosa acerca de las bases fisiológicas de la interacción entre *A. brasilense* y *P. protegens*. En principio, los resultados permiten inferir un efecto sinérgico en base a una comunicación activa entre ambos géneros, por lo que surge como desafío explorar de una manera más completa las bases de esta interacción. En este sentido, el uso de nuevas tecnologías para analizar los cambios transcripcionales globales inducidos en *A. brasilense* Sp245 y *P. protegens* CHA0 cuando interactúan formando biopelículas mixtas serían de gran utilidad. La información detallada acerca de cuáles son los genes regulados diferencialmente durante la interacción en ambas especies, permitirá identificar posibles mecanismos fisiológicos involucrados en el proceso. De esta manera, se establecerán bases sólidas para futuras investigaciones que profundicen en el rol específico de los genes identificados y sus productos en la interacción *Azospirillum-Pseudomonas*.

## **ANEXOS**

### **Anexo 1: Medios de cultivo**

#### **Medio agar papa**

Para 1 litro

- 2,5 g de ácido málico
- 2,5 g de Sacarosa
- Azul de bromotimol: solución 0,5% en 0,2N de KOH
- Solución de micronutrientes (NaMO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,2 g.L<sup>-1</sup>; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,235 g.L<sup>-1</sup>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,28 g.L<sup>-1</sup>; CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,008 g.L<sup>-1</sup>; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,024 g.L<sup>-1</sup>)

#### **Medio Rojo Congo**

Para 1 litro

- 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0,2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O
- 0,1 g ClNa
- 0,5 g extracto de levadura
- 15 mg Cl<sub>3</sub>Fe.6H<sub>2</sub>O
- 5 g ácido málico
- 4,7 g KOH
- 20 g agar
- Rojo Congo (solución al 2,5 % (p/v) en agua destilada, filtrada y autoclavada)

#### **Medio LB**

Para 1 litro

- 10 g peptona de carne
- 5 g extracto de levadura
- 10 g ClNa
- 0,37 g Cl<sub>2</sub>Ca.2H<sub>2</sub>O
- 0,6 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O
- 20 g agar

### **Medio NFb NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub>**

Para 1 litro

- 3,7 g ácido málico
- 5 mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10% (p/v)
- 2 mL MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10% (p/v)
- 1 mL NaCl 10% (p/v)
- 2 mL CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1% (p/v)
- 4 mL FeEDTA 1,64% (p/v)
- 2 mL solución de micronutrientes (NaMO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,2 g.L<sup>-1</sup>; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,235 g.L<sup>-1</sup>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,28 g.L<sup>-1</sup>; CuSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,008 g.L<sup>-1</sup>; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,024 g.L<sup>-1</sup>).
- 0.769g KNO<sub>3</sub>/ 0.738g NH<sub>4</sub>Cl
- Llevar a pH 6,8 con KOH.

### **Medio OA(Okon-Albrecht-Burris)**

Para 1 litro

- 6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 5 g ácido málico
- 0,2 g SO<sub>4</sub>Mg·7H<sub>2</sub>O
- 0,1 g ClNa
- 20 mg Cl<sub>2</sub>Ca·2H<sub>2</sub>O
- 2 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O
- 10 mg Cl<sub>3</sub>Fe·6H<sub>2</sub>O
- 1 g NH<sub>4</sub>Cl o 2 g KNO<sub>3</sub>
- 0,1 g extracto de levadura
- 1 ml solución de micronutrientes (MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 14 mM; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 45,2 mM;
- Cl<sub>2</sub>Cu·2H<sub>2</sub>O 0,164 mM; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,965 mM)
- 3 g NaOH

## **Anexo 2: Extracción de RNA y síntesis de ADN copia**

### **Extracción de RNA de Azospirillum brasilense por método Trizol.**

1. Cosechar 1 ml de un cultivo de DO540nm cercana a 1 a 8000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Lavar el pellet con buffer TES (This-HCl 50 mM pH 8, EDTA 0.2 mM, NaCl 300 mM).
3. Centrifugar nuevamente 8000 rpm 5 minutos y resuspender el pellet en buffer TES y Lisozima 1mg/ml preparada en el momento. Incubar 10 minutos a 37°C.
4. Centrifugar las muestras 8000 rpm 5 minutos y resuspender el pellet en 1 ml de Trizol (Sigma).
5. Vortexar durante 2 minutos e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
6. Agregar 200 µl de cloroformo, vortexear por 15 segundos y dejar reposar sobre mesada 5 minutos.
7. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos en frio y traspasar la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo conteniendo 0.5 ml de isopropanol.
8. Mezclar por inversión algunas veces e incubar en la mesada por 10 minutos.
9. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos en frio. Notar la formación de un precipitado blanco. Descartar el sobrenadante.
10. Lavar el pellet con 1 ml de etanol 75% preparado con agua DEPC<sup>(1)</sup>. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos en frio.
11. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet boca abajo en mesada o flujo laminar.
12. Resuspender el pellet de RNA en 30 µl de agua DEPC. Cuantificar A260nm y sembrar en geles de agarosa 1% para chequear calidad del RNA.

<sup>(1)</sup>1 ml de DEPC por litro de agua, incubado toda una noche a 30°C

### **Síntesis de ADN copia.**

- 1- Colocar 1 µl de Random primers (0.5 µg/µl) y 1 µl dNTPs 10 mM. Agregar 11,5 µl de ARN extraído o equivalente a 2 µg totales.
- 2- Incubar a 65 °C durante 10 minutos. Pasar luego rápidamente las muestras a hielo.

3- Hacer una premix conteniendo por reacción: 1 µl buffer RT 5X, 2 µl DTT 10 mM, 0.5 µl enzima MMV 200 U/µl. Mezclar con vortex y centrifugar brevemente.

4- Colocar 7 µl de esta premix en los tubos conteniendo el ARN. Mezclar.

5- Llevar a 37°C por 75 minutos y luego inactivar la enzima a 70°C 15 minutos.

### **Anexo 3: Reacciones de PCR**

#### **Reacción de RT-PCR 16s**

Por reacción de PCR:

Primers utilizados:

*Fw-16S*: AGGCTTGACTTCCGGAGAGG

*Rv-16S*: TGGTAAGGTTCTGCGCGTTG

Concentración final

1. ADNc	2µl
2. Buffer 10X	1X
3. Cl2Mg 25mM	2mM
4. dNTPs 10mM	0,8mM
5. Primer Fw 10 µM	0,5mM
6. Primer Rv 10 µM	0,5mM
7. Taq invitrogen 5u/ µl	0,5u/x reacción
8. Agua hasta completar volumen final	

Programa:

1. 3 minutos 95°C
  2. 30 segundos 95°C
  3. 30 segundos 60°C (16S)
  4. 1 minutos 72°C
  5. 5 minutos 72°C
- El paso 2 a 4 fue repetido 18 ciclos.

**Reacción de RT-PCR Nap y Nir**

Por reacción de PCR:

Primers utilizados:

*Fw-Nap*: GGAGATGCACCCCATCCTGT

*Rv-Nap*: GTGCTGGTTGAAGCCCATG

*Fw-Nir*: GGATGACGGCACGACCTACA

*Rv-Nir*: GCTTCTCGTTGACCAAGCCG

1. ADNc	Según corresponda <sup>(1)</sup>
2. Buffer 10X	1X
3. Cl <sub>2</sub> Mg 25mM	2mM
4. dNTPs 10mM	0,4mM
5. 100% DMSO	7,5%
6. Primer Fw 10 µM	0,5 µM
7. Primer Rv 10 µM	0,5 µM
8. Taq invitrogen 5u/ µl	0,5u/x reacción
9. Agua hasta completar volumen final	

<sup>(1)</sup> Dado que se estaba realizando RT-PCR el contenido de templado de cada reacción de PCR se ajusto en función de la abundancia del ADNc 16S para cada muestra

Programa:

1. 2 minutos 94°C
  2. 30 segundos 72°C
  3. 30 segundos 65°C
  4. 20 segundos 72°C
  5. 5 minutos 72°C
- El paso 2 a 4 fue repetido 30 ciclos.

## Bibliografía

- Alexandre G, Greer SE, Zhulin IB (2000) Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense*. *Journal of bacteriology* 182 (21):6042-6048
- Allison DG, Ruiz B, SanJose C, Jaspe A, Gilbert P (1998) Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS microbiology letters* 167 (2):179-184
- Amenta M, Molina-Favero C, Creus CM, Lamattina L (2015) Nitric Oxide in *Azospirillum* and Related Bacteria: Production and Effects. In: *Handbook for Azospirillum*. Springer, pp 155-180
- Arasimowicz M, Floryszak-Wieczorek J (2007) Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Science* 172 (5):876-887
- Arora M, Kaushik A, Rani N, Kaushik C (2010) Effect of cyanobacterial exopolysaccharides on salt stress alleviation and seed germination.
- Arruebarrena Di Palma A (2015) Rol de la Nitrato Reductasa Periplásmica y el Óxido Nítrico en el Metabolismo del Hierro y Formación de Biopelículas en *Azospirillum brasilense*., Universidad Nacional de Mar del Plata,
- Arruebarrena Di Palma A, Pereyra CM, Moreno Ramirez L, Xiqui Vazquez ML, Baca BE, Pereyra MA, Lamattina L, Creus CM (2013) Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS microbiology letters* 338 (1):77-85. doi:10.1111/1574-6968.12030
- Assmus B, Hutzler P, Kirchhof G, Amann R, Lawrence JR, Hartmann A (1995) In Situ Localization of *Azospirillum brasilense* in the Rhizosphere of Wheat with Fluorescently Labeled, rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes and Scanning Confocal Laser Microscopy. *Applied and environmental microbiology* 61 (3):1013-1019
- Bacilio M, Rodriguez H, Moreno M, Hernandez J-P, Bashan Y (2004) Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a gfp-tagged *Azospirillum lipoferum*. *Biol Fert Soils* 40 (3):188-193
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:233-266
- Baldani V, Alvarez MdB, Baldani J, Döbereiner J (1986) Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant and Soil* 90 (1-3):35-46
- Barak R, Nur I, Okon Y, Henis Y (1982) Tactic responses of *Azospirillum brasilense* towards oxygen and organic compounds. *Israel Journal of Botany* 31 (1-4):229-236
- Barassi C, Ayrault G, Creus C, Sueldo R, Sobrero M (2006) Seed inoculation with *Azospirillum* mitigates NaCl effects on lettuce. *Scientia Horticulturae* 109 (1):8-14
- Barea J-M, Pozo MJ, Azcon R, Azcon-Aguilar C (2005) Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of experimental botany* 56 (417):1761-1778
- Barraud N, Hassett DJ, Hwang SH, Rice SA, Kjelleberg S, Webb JS (2006) Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 188 (21):7344-7353. doi:10.1128/JB.00779-06
- Barraud N, J Kelso M, A Rice S, Kjelleberg S (2015) Nitric oxide: a key mediator of biofilm dispersal with applications in infectious diseases. *Current pharmaceutical design* 21 (1):31-42
- Barraud N, Schleheck D, Klebensberger J, Webb JS, Hassett DJ, Rice SA, Kjelleberg S (2009) Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *Journal of bacteriology* 191 (23):7333-7342

- Bashan Y, de-Bashan LE (2010) How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical Assessment. 108:77-136. doi:10.1016/s0065-2113(10)08002-8
- Bashan Y, Harrison SK, Whitmoyer RE (1990) Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. *Applied and environmental microbiology* 56 (3):769-775
- Bashan Y, Holguin G, De-Bashan LE (2004) *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian journal of microbiology* 50 (8):521-577
- Baudoin E, Nazaret S, Mougél C, Ranjard L, Moënne-Loccoz Y (2009) Impact of inoculation with the phytostimulatory PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 on the genetic structure of the rhizobacterial community of field-grown maize. *Soil Biology and Biochemistry* 41 (2):409-413
- Be'Er A, Zhang H, Florin E-L, Payne SM, Ben-Jacob E, Swinney HL (2009) Deadly competition between sibling bacterial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (2):428-433
- Be'er A, Ariel G, Kalisman O, Helman Y, Sirota-Madi A, Zhang H, Florin E-L, Payne SM, Ben-Jacob E, Swinney HL (2010) Lethal protein produced in response to competition between sibling bacterial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (14):6258-6263
- Belimov AA, Dietz K-J (2000) Effect of associative bacteria on element composition of barley seedlings grown in solution culture at toxic cadmium concentrations. *Microbiological research* 155 (2):113-121
- Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LM (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and molecular biology* 35 (4):1044-1051
- Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28 (4):1327-1350. doi:10.1007/s11274-011-0979-9
- Bianco C, Imperlini E, Calogero R, Senatore B, Amoresano A, Carpentieri A, Pucci P, Defez R (2006) Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defences to stress. *Arch Microbiol* 185 (5):373-382. doi:10.1007/s00203-006-0103-y
- Bloemberg GV, Lugtenberg BJ (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current opinion in plant biology* 4 (4):343-350
- Bogino PC, Oliva Mde L, Sorroche FG, Giordano W (2013) The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *International journal of molecular sciences* 14 (8):15838-15859. doi:10.3390/ijms140815838
- Boostani HR, Chorom M, Moezzi AA, Enayatzamir N (2014) Mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and mycorrhizae fungi to enhancement of plant growth under salinity stress: A review. *Scientific Journal of Biological Sciences* 3 (11):98-107
- Bowen G, Rovira A (1999) The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in agronomy* 66:1-102
- Brooun A, Liu S, Lewis K (2000) A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44 (3):640-646
- Burdman S, Jurkevitch E, Schwartsburd B, Hampel M, Okon Y (1998) Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. *Microbiology* 144 (7):1989-1999

- Burdman S, Okon Y, Jurkevitch E (2000) Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Critical reviews in microbiology* 26 (2):91-110
- Burmølle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sørensen SJ, Kjelleberg S (2006) Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and environmental microbiology* 72 (6):3916-3923
- Burne RA, Marquis RE (2000) Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS microbiology letters* 193 (1):1-6
- Casanovas EM, Barassi CA, Andrade FH, Sueldo RJ (2003) *Azospirillum*-inoculated maize plant responses to irrigation restraints imposed during flowering. *Cereal research communications*:395-402
- Casanovas EM, Barassi CA, Sueldo RJ (2002) *Azospirillum* inoculation mitigates water stress effects in maize seedlings. *Cereal research communications*:343-350
- Cassán F, Maiale S, Masciarelli O, Vidal A, Luna V, Ruiz O (2009a) Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *European Journal of Soil Biology* 45 (1):12-19
- Cassán F, Perrig D, Sgroy V, Masciarelli O, Penna C, Luna V (2009b) *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology* 45 (1):28-35
- Cassán F, Vanderleyden J, Spaepen S (2014) Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation* 33 (2):440-459
- Cassán FD, Penna C, Creus CM, Radovancich D, Monteleone E, de Salamone IG, Di Salvo L, Mentel I, García J, Mayans MdCP (2015) Protocol for the Quality Control of *Azospirillum* spp. Inoculants. In: *Handbook for Azospirillum*. Springer, pp 487-499
- Cerqueira FD (2015) Biofilm formation by *Azospirillum brasilense*: microbial socialization in the rhizosphere.
- Cohen MF, Lamattina L, Yamasaki H (2010) Nitric oxide signaling by plant-associated bacteria. *Nitric oxide in plant physiology*. Wiley-VCH, Weinheim:161-172
- Cohen MF, Yamasaki H (2003) Involvement of nitric oxide synthase in sucrose-enhanced hydrogen peroxide tolerance of *Rhodococcus* sp. strain APG1, a plant-colonizing bacterium. *Nitric Oxide* 9 (1):1-9
- Combes-Meynet E, Pothier JF, Moënne-Loccoz Y, Prigent-Combaret C (2011) The *Pseudomonas* secondary metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *Azospirillum* genes involved in plant-growth promotion. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 24 (2):271-284
- Compant S, Clément C, Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* 42 (5):669-678
- Correa-Aragunde N, Foresi N, Lamattina L (2016) Chapter Three-Auxin and Nitric Oxide: A Counterbalanced Partnership Ensures the Redox Cue Control Required for Determining Root Growth Pattern. *Advances in botanical research* 77:41-54
- Correa-Aragunde N, Graziano M, Chevalier C, Lamattina L (2006) Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *Journal of experimental botany* 57 (3):581-588

- Correa-Aragunde N, Graziano M, Lamattina L (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* 218 (6):900-905
- Costacurta A, Keijers V, Vanderleyden J (1994) Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Molecular and General Genetics* 243:463-472
- Costerton JW, Cheng K, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology* 41 (1):435-464
- Couillerot O, Combes-Meynet E, Pothier JF, Bellvert F, Challita E, Poirier M-A, Rohr R, Comte G, Moëgne-Loccoz Y, Prigent-Combaret C (2011) The role of the antimicrobial compound 2, 4-diacetylphloroglucinol in the impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* F113 on *Azospirillum brasilense* phytostimulators. *Microbiology* 157 (6):1694-1705
- Couillerot O, Prigent-Combaret C, Caballero-Mellado J, Moëgne-Loccoz Y (2009) *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in applied microbiology* 48 (5):505-512
- Couillerot O, Ramírez-Trujillo A, Walker V, von Felten A, Jansa J, Maurhofer M, Défago G, Prigent-Combaret C, Comte G, Caballero-Mellado J (2013) Comparison of prominent *Azospirillum* strains in *Azospirillum*–*Pseudomonas*–*Glomus* consortia for promotion of maize growth. *Applied microbiology and biotechnology* 97 (10):4639-4649
- Crespi BJ (2001) The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends in ecology & evolution* 16 (4):178-183
- Creus CM, Graziano M, Casanovas EM, Pereyra MA, Simontacchi M, Puntarulo S, Barassi CA, Lamattina L (2005) Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta* 221 (2):297-303. doi:10.1007/s00425-005-1523-7
- Creus CM, Sueldo RJ, Barassi CA (1997) Shoot growth and water status in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings grown under osmotic and salt stresses. *PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY-PARIS*- 35:939-944
- Creus CM, Sueldo RJ, Barassi CA (2004) Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. *Canadian Journal of Botany* 82 (2):273-281
- Cruz-Ramos H, Crack J, Wu G, Hughes MN, Scott C, Thomson AJ, Green J, Poole RK (2002) NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. *The EMBO journal* 21 (13):3235-3244
- Cutruzzola F (1999) Bacterial nitric oxide synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1411 (2):231-249
- Chaparro JM, Badri DV, Bakker MG, Sugiyama A, Manter DK, Vivanco JM (2013) Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS one* 8 (2):e55731
- Choudhary DK, Prakash A, Wray V, Johri BN (2009) Insights of the fluorescent pseudomonads in plant growth regulation. *Current Science* 97 (2):170-179
- Chowdhury SP, Nagarajan T, Tripathi R, Mishra MN, Le Rudulier D, Tripathi AK (2007) Strain-specific salt tolerance and osmoregulatory mechanisms in *Azospirillum brasilense*. *FEMS microbiology letters* 267 (1):72-79
- Da Costa M, Santos H, Galinski E (1998) An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Biotechnology of extremophiles*:117-153
- Danhorn T, Fuqua C (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Microbiol* 61:401-422
- Davey ME, O'toole GA (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews* 64 (4):847-867

- De-Bashan LE, Holguin G, Glick BR, Bashan Y, Ferrera-Cerrato R, Alarcón R (2007) Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. Microbiología agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo. México: Editorial Trillas:170-224
- Díaz-Zorita M, Fernández-Canigia MV (2009) Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *European Journal of Soil Biology* 45 (1):3-11
- Dimkpa C, Weinand T, Asch F (2009) Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, cell & environment* 32 (12):1682-1694
- Ding Y, Peng N, Du Y, Ji L, Cao B (2014) Disruption of putrescine biosynthesis in *Shewanella oneidensis* enhances biofilm cohesiveness and performance in Cr (VI) immobilization. *Applied and environmental microbiology* 80 (4):1498-1506
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Broek AV, Vanderleyden J (1999) Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil* 212 (2):153-162
- Döbereiner J, Day J Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: Proceedings of the 1st international symposium on nitrogen fixation, 1976. Washington State University Press Pullman, pp 518-538
- Donati AJ, Lee H-I, Leveau JH, Chang W-S (2013) Effects of indole-3-acetic acid on the transcriptional activities and stress tolerance of *Bradyrhizobium japonicum*. *PloS one* 8 (10):e76559
- Drogue B, Combes-Meynet E, Moëgne-Loccoz Y, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C (2013) Control of the Cooperation Between Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Crops by Rhizosphere Signals. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere: Volume 1 & 2*:279-293
- Drogue B, Doré H, Borland S, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C (2012) Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? *Research in microbiology* 163 (8):500-510
- Drogue B, Sanguin H, Borland S, Prigent-Combaret C, Wisniewski-Dyé F (2014) Genome wide profiling of *Azospirillum lipoferum* 4B gene expression during interaction with rice roots. *FEMS microbiology ecology* 87 (2):543-555
- Ederli L, Reale L, Madeo L, Ferranti F, Gehring C, Fornaciari M, Romano B, Pasqualini S (2009) NO release by nitric oxide donors in vitro and in planta. *Plant physiology and biochemistry* 47 (1):42-48
- Egamberdieva D, Lugtenberg B (2014) Use of plant growth-promoting rhizobacteria to alleviate salinity stress in plants. In: *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses, Volume 1*. Springer, pp 73-96
- Egland PG, Palmer RJ, Kolenbrander PE (2004) Interspecies communication in *Streptococcus gordonii*–*Veillonella atypica* biofilms: signaling in flow conditions requires juxtaposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (48):16917-16922
- Faggioli VS, Cazorla CR, Vigna A, Berti MF (2003) Fertilizantes biológicos en maíz.: ensayo de inoculación con cepas de *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*. Córdoba, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria:4
- Fallik E, Sarig S, Okon Y (1994) Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. *Azospirillum/plant associations*:77-85

- Fasciglione G, Casanovas EM, Quillehauquy V, Yommi AK, Goñi MG, Roura SI, Barassi CA (2015) Azospirillum inoculation effects on growth, product quality and storage life of lettuce plants grown under salt stress. *Scientia Horticulturae* 195:154-162
- Fernandez-Auni6n C, Hamouda TB, Iglesias-Guerra F, Argandoña M, Reina-Bueno M, Nieto JJ, Aouani ME, Vargas C (2010) Biosynthesis of compatible solutes in rhizobial strains isolated from *Phaseolus vulgaris* nodules in Tunisian fields. *BMC microbiology* 10 (1):192
- Fox EP, Cowley ES, Nobile CJ, Hartooni N, Newman DK, Johnson AD (2014) Anaerobic bacteria grow within *Candida albicans* biofilms and induce biofilm formation in suspension cultures. *Current Biology* 24 (20):2411-2416
- Fujishige NA, Kapadia NN, Hirsch AM (2006) A feeling for the microorganism: structure on a small scale. *Biofilms on plant roots. Bot J Linn Soc* 150 (1):79-88
- Gamalero E, Lingua G, Capri FG, Fusconi A, Berta G, Lemanceau P (2004) Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy. *FEMS microbiology ecology* 48 (1):79-87
- Ghigo J-M (2001) Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 412 (6845):442-445
- Glickmann E, Dessaux Y (1995) A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and environmental microbiology* 61 (2):793-796
- Grageda-Cabrera OA, DÍaz-Franco A, Peña-Cabriales JJ, Vera-Nuñez JA (2012) Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 3 (6):1261-1274
- Gururani MA, Upadhyaya CP, Baskar V, Venkatesh J, Nookaraju A, Park SW (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *Journal of Plant Growth Regulation* 32 (2):245-258
- Gusarov I, Nudler E (2005) NO-mediated cytoprotection: instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (39):13855-13860
- Haas D, DÍefago G (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3 (4):307-319
- Hamaoui B, Abbadi J, Burdman S, Rashid A, Sarig S, Okon Y (2001) Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on chickpeas (*Cicer arietinum*) and faba beans (*Vicia faba*) under different growth conditions. *Agronomie* 21 (6-7):553-560
- Hartmann A, Baldani J (2006) The Genus *Azospirillum*. *The Prokaryotes*. Springer New York,
- Häußler S, Tümmler B, Weißbrodt H, Rohde M, Steinmetz I (1999) Small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Clinical infectious diseases* 29 (3):621-625
- Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, Ahmed I (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* 60 (4):579-598
- Heeb S, Itoh Y, Nishijyo T, Schnider U, Keel C, Wade J, Walsh U, O'Gara F, Haas D (2000) Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13 (2):232-237
- Helman Y, Burdman S, Okon Y (2011) Plant growth promotion by rhizosphere bacteria through direct effects. In: *Beneficial Microorganisms in Multicellular Life Forms*. Springer, pp 89-103
- Herigstad B, Hamilton M, Heersink J (2001) How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 44 (2):121-129

- <http://www.bacterio.net>. (2016) List of Prokaryotic names with standing in nomenclature.
- Hu M, Zhang C, Mu Y, Shen Q, Feng Y (2010) Indole affects biofilm formation in bacteria. *Indian journal of microbiology* 50 (4):362-368. doi:10.1007/s12088-011-0142-1
- Joe MM, Jaleel CA, Sivakumar PK, Zhao C-X, Karthikeyan B (2009) Co-aggregation in *Azospirillum brasilense* MTCC-125 with other PGPR strains: Effect of physical and chemical factors and stress endurance ability. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 40 (5):491-499
- Jofré E, Fischer S, Rivarola V, Balegno H, Mori G (1998) Saline stress affects the attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to maize and wheat roots. *Canadian journal of microbiology* 44 (5):416-422
- Kalia D, Merey G, Nakayama S, Zheng Y, Zhou J, Luo Y, Guo M, Roembke BT, Sintim HO (2013) Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP,(p) ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chemical Society Reviews* 42 (1):305-341
- Kapulnik Y, Gafny R, Okon Y (1985) Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and uptake in wheat (*Triticum aestivum* cv. Miriam) in hydroponic systems. *Canadian Journal of Botany* 63 (3):627-631
- Keel C, Wirthner P, Oberhänsli T, Voisard C, Burger, Haas D, Défago G (1990) Pseudomonads as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: role of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. *Symbiosis* 9 (1-3):327-341
- Khakipour N, Khavazi K, Mojallali H, Pazira E, Asadirahmani H (2008) Production of auxin hormone by fluorescent pseudomonads. *Am Eurasian J Agric Environ Sci* 4 (6):687-692
- Khalid M, Bilal M, Hassani D, Iqbal HM, Wang H, Huang D (2017) Mitigation of salt stress in white clover (*Trifolium repens*) by *Azospirillum brasilense* and its inoculation effect. *Botanical Studies* 58 (1):5
- Kloepper JW (1996) Host specificity in microbe-microbe interactions. *Bioscience* 46 (6):406-409
- Kloepper JW, Beauchamp CJ (1992) A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian journal of microbiology* 38 (12):1219-1232
- Koch B, Jensen LE, Nybroe O (2001) A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *Journal of Microbiological Methods* 45 (3):187-195
- Kochar M, Srivastava S (2012) Surface colonization by *Azospirillum brasilense* SM in the indole-3-acetic acid dependent growth improvement of sorghum. *Journal of basic microbiology* 52 (2):123-131. doi:10.1002/jobm.201100038
- Kochar M, Vaishnavi A, Upadhyay A, Srivastava S (2013) Bacterial Biosynthesis of Indole-3-Acetic Acid: Signal Messenger Service.309-325. doi:10.1002/9781118297674.ch29
- Koul V, Adholeya A, Kochar M (2015a) Sphere of influence of indole acetic acid and nitric oxide in bacteria. *Journal of basic microbiology* 55 (5):543-553. doi:10.1002/jobm.201400224
- Koul V, Tripathi C, Adholeya A, Kochar M (2015b) Nitric oxide metabolism and indole acetic acid biosynthesis cross-talk in *Azospirillum brasilense* SM. *Research in microbiology* 166 (3):174-185. doi:10.1016/j.resmic.2015.02.003
- Kwiatkowski AV, Shapleigh JP (1996) Requirement of nitric oxide for induction of genes whose products are involved in nitric oxide metabolism in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4. 3. *Journal of Biological Chemistry* 271 (40):24382-24388
- Lambrecht M, Okon Y, Broek AV, Vanderleyden J (2000) Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *evolution* 54:59

- Lambrecht M, Vande Broek A, Dosselaere F, Vanderleyden J (1999) The ipdC promoter auxin-responsive element of *Azospirillum brasilense*, a prokaryotic ancestral form of the plant AuxRE? *Molecular microbiology* 32 (4):889-891
- Lee JH, Cho MH, Lee J (2011) 3-Indolylacetonitrile Decreases *Escherichia coli* O157: H7 Biofilm Formation and *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Environmental microbiology* 13 (1):62-73
- Lee KWK, Periasamy S, Mukherjee M, Xie C, Kjelleberg S, Rice SA (2014) Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *The ISME journal* 8 (4):894-907
- Leriche V, Briandet R, Carpentier B (2003) Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to another. *Environmental microbiology* 5 (1):64-71
- Lerner A, Castro-Sowinski S, Lerner H, Okon Y, Burdman S (2009) Glycogen phosphorylase is involved in stress endurance and biofilm formation in *Azospirillum brasilense* Sp7. *FEMS microbiology letters* 300 (1):75-82. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01773.x
- Lerner A, Herschkovitz Y, Baudoin E, Nazaret S, Moenne-Loccoz Y, Okon Y, Jurkevitch E (2006) Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on rhizobacterial communities analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 38 (6):1212-1218
- Leveau JH, Lindow SE (2005) Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Applied and environmental microbiology* 71 (5):2365-2371. doi:10.1128/AEM.71.5.2365-2371.2005
- Lombardo M, Lamattina L (2012) Nitric oxide is essential for vesicle formation and trafficking in *Arabidopsis* root hair growth. *Journal of experimental botany*
- Lombardo MC, Graziano M, Polacco JC, Lamattina L (2006) Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant signaling & behavior* 1 (1):28-33
- Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology* 63:541-556
- Lugtenberg BJ, Kravchenko LV, Simons M (1999) Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environmental microbiology* 1 (5):439-446
- Mah T-FC, O'Toole GA (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology* 9 (1):34-39
- Malhotra M, Srivastava S (2009) Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. *European Journal of Soil Biology* 45 (1):73-80. doi:10.1016/j.ejsobi.2008.05.006
- Martinez-Beltran J, Manzur CL Overview of salinity problems in the world and FAO strategies to address the problem. In: *Proceedings of the international salinity forum*, Riverside, California, 2005. USDA-ARS Salinity Lab Riverside, pp 311-313
- Masciarelli O, Urbani L, Reinoso H, Luna V (2013) Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. *J Microbiol* 51 (5):590-597. doi:10.1007/s12275-013-3136-3
- McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S (2012) Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology* 10 (1):39-50

- McGinnis MW, Parker ZM, Walter NE, Rutkovsky AC, Cartaya-Marin C, Karatan E (2009) Spermidine regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation via transport and signaling pathways. *FEMS microbiology letters* 299 (2):166-174
- Mercado-Blanco J (2015) *Pseudomonas* strains that exert biocontrol of plant pathogens. In: *Pseudomonas*. Springer, pp 121-172
- Michiels KW, Croes CL, Vanderleyden J (1991) Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *Microbiology* 137 (9):2241-2246
- Molina-Favero, Creus CM, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L (2008) Aerobic Nitric Oxide Production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and Its Influence on Root Architecture in Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 21:1001–1009. doi:Molina-Favero
- Molina-Favero C, Creus CM, Lanteri ML, Correa-Aragunde N, Lombardo MC, Barassi CA, Lamattina L (2007) Nitric oxide and plant growth promoting rhizobacteria: common features influencing root growth and development. *Advances in botanical research* 46:1-33
- Molina Favero C (2013) Rol del óxido nítrico (NO) en la asociación de *Azospirillum* con raíces de plantas superiores. Universidad Nacional de Mar del Plata,
- Mur LA, Mandon J, Cristescu SM, Harren FJ, Prats E (2011) Methods of nitric oxide detection in plants: a commentary. *Plant Science* 181 (5):509-519
- Nadell CD, Xavier JB, Levin SA, Foster KR (2008) The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biol* 6 (1):e14
- Naiman AD, Latrónico A, de Salamone IEG (2009) Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact on the production and culturable rhizosphere microflora. *European Journal of Soil Biology* 45 (1):44-51
- Nautiyal CS, Srivastava S, Chauhan PS, Seem K, Mishra A, Sopory SK (2013) Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. *Plant physiology and biochemistry* 66:1-9
- Nicolella C, Van Loosdrecht M, Heijnen J (2000) Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of Biotechnology* 80 (1):1-33
- O'Toole GA, Pratt LA, Watnick PI, Newman DK, Weaver VB, Kolter R (1999) Genetic approaches to study of biofilms. *Method Enzymol* 310:91-109
- Okon Y, Labandera-Gonzales C, Lage M, Lage P (2015) Agronomic applications of *Azospirillum* and other PGPR. *Biological nitrogen fixation*. Wiley Blackwell, Hoboken:925-936
- Okon Y, Labandera-Gonzalez CA (1994) Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry* 26 (12):1591-1601
- Ona O, Van Impe J, Prinsen E, Vanderleyden J (2005) Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. *FEMS microbiology letters* 246 (1):125-132
- Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant physiology* 129 (3):954-956
- Pagnussat L, Pereyra A, Valverde C, Creus C (2013) *Pseudomonas fluorescens* promueve el crecimiento y la adhesión de *Azospirillum brasilense* sobre sustratos artificiales (poliestireno) pero no afecta la colonización de raíces de tomate. II Congreso Microbiología Agrícola y Ambiental vol 45. Revista Argentina de Microbiología, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina
- Palmer Jr RJ, Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE (2003) Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. *Journal of bacteriology* 185 (11):3400-3409

- Patel BA, Moreau M, Widom J, Chen H, Yin L, Hua Y, Crane BR (2009) Endogenous nitric oxide regulates the recovery of the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* from exposure to UV light. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (43):18183-18188
- Paul K, Nieto V, Carlquist WC, Blair DF, Harshey RM (2010) The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a “backstop brake” mechanism. *Molecular cell* 38 (1):128-139
- Pereyra CM, Ramella NA, Pereyra MA, Barassi CA, Creus CM (2010) Changes in cucumber hypocotyl cell wall dynamics caused by *Azospirillum brasilense* inoculation. *Plant physiology and biochemistry* 48 (1):62-69
- Pereyra M, González R, Creus C, Barassi C (2007) Root colonization vs. seedling growth, in two *Azospirillum*-inoculated wheat species. *Cereal research communications* 35 (4):1621-1629
- Perrig D, Boiero M, Masciarelli O, Penna C, Ruiz O, Cassán F, Luna M (2007) Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Applied microbiology and biotechnology* 75 (5):1143-1150
- Plate L, Marletta MA (2012) Nitric oxide modulates bacterial biofilm formation through a multicomponent cyclic-di-GMP signaling network. *Mol Cell* 46 (4):449-460
- Plyuta V, Lipasova V, Kuznetsov A, Khmel I (2013) Effect of salicylic, indole-3-acetic, gibberellic, and abscisic acids on biofilm formation by *Agrobacterium tumefaciens* C58 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied biochemistry and microbiology* 49 (8):706-710
- Pothier JF, Wisniewski-Dye F, Weiss-Gayet M, Moenne-Loccoz Y, Prigent-Combaret C (2007) Promoter-trap identification of wheat seed extract-induced genes in the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245. *Microbiology* 153 (10):3608-3622
- Powers MJ, Sanabria-Valentín E, Bowers AA, Shank EA (2015) Inhibition of Cell Differentiation in *Bacillus subtilis* by *Pseudomonas protegens*. *Journal of bacteriology* 197 (13):2129-2138
- Prinsen E, Costacurta A, Michiels K, Vanderleyden J, Van Onckelen H (1993) *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Molecular Plant Microbe Interactions* 6:609-609
- Proctor RA, Von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, Peters G (2006) Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nature Reviews Microbiology* 4 (4):295-305
- Prusty R, Grisafi P, Fink GR (2004) The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (12):4153-4157
- Puchulu ME (2008) Salinización de los suelos. Su incidencia en la provincia de Tucumán y en la República Argentina. *Acta geológica lilloana* 21 1:81-94
- Pulido L, Cabrera A, Medina N (2003) Biofertilization using rhizobacteria and AMF in the production of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and onion (*Allium cepa* L.) seedlings. II. Root colonization and nutritional status.
- Qurashi AW, Sabri AN (2012) Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Brazilian Journal of Microbiology* 43 (3):1183-1191
- Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moënné-Loccoz Y (2009) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* 321 (1-2):341-361

- Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO (2015) Agents that inhibit bacterial biofilm formation. *Future medicinal chemistry* 7 (5):647-671
- Ramey BE, Koutsoudis M, von Bodman SB, Fuqua C (2004) Biofilm formation in plant–microbe associations. *Curr Opin Microbiol* 7 (6):602-609
- Ramírez-Mata A, Fernández-Domínguez IJ, Nuñez-Reza KJ, Xiqui-Vázquez ML, Baca BE (2014) Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: quorum sensing, di-GMPc y óxido nítrico. *Revista argentina de microbiología* 46 (3):242-255
- Ramirez-Mata A, Lopez-Lara LI, Xiqui-Vazquez ML, Jijon-Moreno S, Romero-Osorio A, Baca BE (2016) The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense*. *Research in microbiology* 167 (3):190-201. doi:10.1016/j.resmic.2015.12.004
- Ramos HJ, Roncato-Maccari LD, Souza EM, Soares-Ramos JR, Hungria M, Pedrosa FO (2002) Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the *gfp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. *Journal of Biotechnology* 97 (3):243-252
- Reis V, Olivares F (2006) Vias de penetração e infecção de plantas por bactérias. Embrapa Agrobiologia. Documentos
- Ren D, Madsen JS, Sørensen SJ, Burmølle M (2015) High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. *The ISME journal* 9 (1):81-89
- Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS (2003) Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in microbiology* 11 (2):94-100
- Rinaudi LV, Giordano W (2010) An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS microbiology letters* 304 (1):1-11
- Rivarola V, Castro S, Mori G, Jofré E, Fabra A, Garnica R, Balegno H (1998) Response of *Azospirillum brasilense* Cd to sodium chloride stress. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73 (3):255-261
- Rodríguez-Barrueco C, Cañizo A, Subramaniam P (1983) Inactivación de la auxina IIA por nitrito y su relevancia en el proceso de infección de plantas fijadoras de nitrógeno. *Anu. Cent. Edafol. Biol. Apl. Salamanca* 9
- Rodríguez Cáceres EA (1982) Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and environmental microbiology* 44 (4):990
- Rodríguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17 (4):319-339
- Rojas-Tapias D, Moreno-Galván A, Pardo-Díaz S, Obando M, Rivera D, Bonilla R (2012) Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology* 61:264-272
- Rothballer M, Schmid M, Hartmann A (2003) In situ localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. *Symbiosis* 34 (3):261-279
- Rudrappa T, Biedrzycki ML, Bais HP (2008) Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS microbiology ecology* 64 (2):153-166
- Ruíz-Sánchez M, Armada E, Muñoz Y, de Salamone IEG, Aroca R, Ruíz-Lozano JM, Azcón R (2011) *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. *Journal of plant physiology* 168 (10):1031-1037
- Russo A, Felici C, Toffanin A, Götz M, Collados C, Barea JM, Moënné-Loccoz Y, Smalla K, Vanderleyden J, Nuti M (2005) Effect of *Azospirillum* inoculants on arbuscular mycorrhiza establishment in wheat and maize plants. *Biology and fertility of soils* 41 (5):301-309

- Ryan RP, Dow JM (2008) Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology* 154 (7):1845-1858
- Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, Dow JM (2006) Cyclic di-GMP signaling in bacteria: recent advances and new puzzles. *Journal of bacteriology* 188 (24):8327-8334
- Salcedo F, Pereyra CM, Di Palma AA, Lamattina L, Creus CM (2015) Methods for studying biofilms in *Azospirillum* and Other PGPRs. In: *Handbook for Azospirillum*. Springer, pp 199-229
- Sánchez RM, Guerra LD, Scherger M (2014) EVALUACION DE LAS AREAS BAJO RIEGO AFECTADAS POR SALINIDAD Y/O SODICIDAD EN ARGENTINA. Taller Estudio de Potencial de Ampliación de Irrigación en Argentina. 10. 2014 12 04, 4 dic. 2014. Buenos Aires. AR.
- Sanz L, Albertos P, Mateos I, Sánchez-Vicente I, Lechón T, Fernández-Marcos M, Lorenzo O (2015) Nitric oxide (NO) and phytohormones crosstalk during early plant development. *Journal of experimental botany* 66 (10):2857-2868
- Sarig S, Okon Y, Blum A (1990) Promotion of leaf area development and yield in *Sorghum bicolor* inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Symbiosis (Rehovot)* 9 (1-3):235-245
- Sarig S, Okon Y, Blum A (1992) Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on growth dynamics and hydraulic conductivity of *Sorghum bicolor* roots. *Journal of Plant Nutrition* 15 (6-7):805-819
- Schmidt H, Walter U (1994) NO at work. *Cell* 78 (6):919-926
- Schmidt I, Steenbakkens PJ, op den Camp HJ, Schmidt K, Jetten MS (2004) Physiologic and proteomic evidence for a role of nitric oxide in biofilm formation by *Nitrosomonas europaea* and other ammonia oxidizers. *Journal of bacteriology* 186 (9):2781-2788
- Sheludko AV, Kulibyakina OV, Shirokov AA, Petrova P, Matora LY, Katsy EI (2008) The Effect of Mutations Affecting Synthesis of Lipopolysaccharides and Calcofluor-Binding Polysaccharides on Biofilm Formation by *Azospirillum brasilense*. *Microbiology* 77:313-317
- Shu M, Browngardt CM, Chen Y-YM, Burne RA (2003) Role of urease enzymes in stability of a 10-species oral biofilm consortium cultivated in a constant-depth film fermenter. *Infection and immunity* 71 (12):7188-7192
- Singh S, Zargar M, Singh U, Ishaq M (2010) Influence of bio-inoculants and inorganic fertilizers on yield, nutrient balance, microbial dynamics and quality of strawberry (*Fragaria ananassa*) under rainfed conditions of Kashmir valley. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 80 (4):275
- Siuti P, Green C, Edwards AN, Doktycz MJ, Alexandre G (2011) The chemotaxis-like Che1 pathway has an indirect role in adhesive cell properties of *Azospirillum brasilense*. *FEMS microbiology letters* 323 (2):105-112. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02366.x
- Solano C, García B, Valle J, Berasain C, Ghigo JM, Gamazo C, Lasa I (2002) Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular Microbiology* 43 (3):793-808
- Somers E, Vanderleyden J, Srinivasan M (2008) Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical reviews in microbiology*
- Sörensen M, Lippuner C, Kaiser T, Mißlitz A, Aebischer T, Bumann D (2003) Rapidly maturing red fluorescent protein variants with strongly enhanced brightness in bacteria. *FEBS letters* 552 (2-3):110-114
- Spaepen S, Das F, Luyten E, Michiels J, Vanderleyden J (2009a) Indole-3-acetic acid-regulated genes in *Rhizobium etli* CNPAF512. *FEMS microbiology letters* 291 (2):195-200
- Spaepen S, Vanderleyden J, Okon Y (2009b) Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Advances in botanical research* 51:283-320

- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews* 31 (4):425-448. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x
- Steenhoudt O, Keijers V, Okon Y, Vanderleyden J (2001a) Identification and characterization of a periplasmic nitrate reductase in *Azospirillum brasilense* Sp245. *Archives of Microbiology* 175 (5):344-352. doi:10.1007/s002030100271
- Steenhoudt O, Ping Z, Vande Broek A, Vanderleyden J (2001b) A spontaneous chlorate-resistant mutant of *Azospirillum brasilense* Sp245 displays defects in nitrate reduction and plant root colonization. *Biology and fertility of soils* 33 (4):317-322
- Stoodley P, Sauer K, Davies D, Costerton JW (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology* 56 (1):187-209
- Sukumar P, Legue V, Vayssieres A, Martin F, Tuskan GA, Kalluri UC (2013) Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. *Plant, cell & environment* 36 (5):909-919
- Tait K, Sutherland I (2002) Antagonistic interactions amongst bacteriocin-producing enteric bacteria in dual species biofilms. *Journal of applied microbiology* 93 (2):345-352
- Tanner J, Anderson I (1963) An external effect of inorganic nitrogen in root nodulation.
- Terrile MC, París R, Calderón-Villalobos LI, Iglesias MJ, Lamattina L, Estelle M, Casalengué CA (2012) Nitric oxide influences auxin signaling through S-nitrosylation of the Arabidopsis TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 auxin receptor. *The Plant Journal* 70 (3):492-500
- Timmusk S, Abd El-Daim IA, Copolovici L, Tanilas T, Kannaste A, Behers L, Nevo E, Seisenbaeva G, Stenstrom E, Niinemets U (2014) Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. *PloS one* 9 (5):e96086. doi:10.1371/journal.pone.0096086
- Trabelsi D, Mhamdi R (2013) Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: a review. *BioMed research international* 2013
- Tripathi A, Mishra B, Tripathi P (1998) Responses of *Azospirillum brasilense* to salinity stress. In: *Nitrogen Fixation with Non-Legumes*. Springer, pp 179-185
- Tripathi AK, Nagarajan T, Verma SC, Rudulier DL (2002) Inhibition of biosynthesis and activity of nitrogenase in *Azospirillum brasilense* Sp7 under salinity stress. *Current microbiology* 44 (5):363-367
- Troxler J, Berling CH, KEEL C, DÉFAGO G (1997) Interactions between the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and *Thielaviopsis basicola* in tobacco roots observed by immunofluorescence microscopy. *Plant Pathology* 46 (1):62-71
- Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud M-L, Touraine B, Prigent-Combaret C (2014) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Ecophysiology of root systems-environment interaction*:166
- Van Loon L (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology* 119 (3):243-254
- Van Puyvelde S, Cloots L, Engelen K, Das F, Marchal K, Vanderleyden J, Spaepen S (2011) Transcriptome analysis of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* reveals an extensive auxin response. *Microbial ecology* 61 (4):723-728. doi:10.1007/s00248-011-9819-6
- Vande Broek A, Gysegom P, Ona O, Hendrickx N, Prinsen E, Van Impe J, Vanderleyden J (2005) Transcriptional analysis of the *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene and identification of a cis-acting sequence involved in auxin responsive expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18 (4):311-323

- Vande Broek A, Lambrecht M, Eggermont K, Vanderleyden J (1999) Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *Journal of bacteriology* 181 (4):1338-1342
- Vázquez MM, César S, Azcón R, Barea JM (2000) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecology* 15 (3):261-272
- Wang Y, Dufour YS, Carlson HK, Donohue TJ, Marletta MA, Ruby EG (2010) H-NOX-mediated nitric oxide sensing modulates symbiotic colonization by *Vibrio fischeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (18):8375-8380
- Watnick P, Kolter R (2000) Biofilm, city of microbes. *Journal of bacteriology* 182 (10):2675-2679
- Weller DM (2007) *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology* 97 (2):250-256
- Wenner N, Maes A, Cotado-Sampayo M, Lapouge K (2014) NrsZ: a novel, processed, nitrogen-dependent, small non-coding RNA that regulates *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence. *Environmental microbiology* 16 (4):1053-1068
- Whipps JM (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of experimental botany* 52 (suppl 1):487-511
- Worthington RJ, Richards JJ, Melander C (2012) Small molecule control of bacterial biofilms. *Organic & biomolecular chemistry* 10 (37):7457-7474
- Wu Y, Ding Y, Cohen Y, Cao B (2015) Elevated level of the second messenger c-di-GMP in *Comamonas testosteroni* enhances biofilm formation and biofilm-based biodegradation of 3-chloroaniline. *Applied microbiology and biotechnology* 99 (4):1967-1976
- Yang J, Kloepper JW, Ryu C-M (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in plant science* 14 (1):1-4
- Yoshida S, Yatazawa M (1968) Inhibitory effect of nitrite on color development in Gordon-Weber's colorimetric determination of IAA, and a device for eliminating the inhibitory effect. *Japan Analyst*
- Yousefi S, Kartoolinejad D, Bahmani M, Naghdi R (2017) Effect of *Azospirillum lipoferum* and *Azotobacter chroococcum* on germination and early growth of hopbush shrub (*Dodonaea viscosa* L.) under salinity stress. *Journal of Sustainable Forestry* 36 (2):107-120
- Zhu G-Y, Dobbelaere S, Vanderleyden J (2002) Use of green fluorescent protein to visualize rice root colonization by *Azospirillum irakense* and *A. brasilense*. *Functional plant biology* 29 (11):1279-1285
- Zumft WG (1993) The biological role of nitric oxide in bacteria. *Archives of Microbiology* 160 (4):253-264
- Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and molecular biology reviews* 61 (4):533-616
- Zumft WG (2002) Nitric oxide signaling and NO dependent transcriptional control in bacterial denitrification by members of the FNR-CRP regulator family. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 4 (3):277-286
- Zúñiga A, Poupin MJ, Donoso R, Ledger T, Guilianni N, Gutiérrez RA, González B (2013) Quorum sensing and indole-3-acetic acid degradation play a role in colonization and plant growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26 (5):546-553

