



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
Y GENÉTICA

TESIS DOCTORAL

ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN BACTERIANA ENDOFITA
PRESENTE EN NÓDULOS DE *Lupinus*: INTERACCIÓN Y
LOCALIZACIÓN *IN SITU*

Autor

RAÚL RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

Directores

Dra. Martha E. Trujillo Toledo

Dr. Eustoquio Martínez Molina

2008

MARTHA E. TRUJILLO TOLEDO PROFESOR DOCTOR CONTRATADO PERMANENTE DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y EUSTOQUIO MARTÍNEZ MOLINA, PROFESOR CATEDRÁTICO DEL MISMO DEPARTAMENTO,

CERTIFICAMOS:

Que la memoria titulada ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN BACTERIANA ENDOFITA PRESENTE EN NÓDULOS DE *Lupinus*: INTERACCIÓN Y LOCALIZACIÓN *IN SITU*, presentada por Raúl Rodríguez Martínez para optar el grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, extendemos el presente certificado en Salamanca a 27 de septiembre de 2008.

Fdo. Dra. Martha E. Trujillo Toledo

Fdo. Dr. Eustoquio Martínez Molina

**ÁNGEL DOMÍNGUEZ OLAVARRI CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA Y
DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE
LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

CERTIFICA:

Que la memoria titulada ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN BACTERIANA ENDOFITA PRESENTE EN NÓDULOS DE *Lupinus*: INTERACCION Y LOCALIZACIÓN *IN SITU*, presentada por Raúl Rodríguez Martínez para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Martha E. Trujillo Toledo y del Dr. Eustoquio Martínez Molina en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Salamanca a 27 de septiembre de 2008.

Fdo. Ángel Domínguez Olavarri

AGRADECIMIENTOS

Los agradecimientos: una parte delicada de la tesis... tal vez lo último que se escribe pero la mas cuidadosa por que se corre el riesgo de dejar a muchas personas por fuera. Desde ya si no aparecen escritas les ruego me disculpen... han sido tantos y tantas los que han hecho posible que esta memoria de tesis vea la luz...

A la Universidad de Pamplona, a sus directivos al ex-rector Dr. Álvaro González Joves y su actual rector Dr. Pedro León Peñaranda, sin el Plan Doctorando aprobado en la Universidad tal vez no hubiese podido realizar el doctorado aquí en España.

A la Dra. Martha Trujillo Toledo quien me brindó la oportunidad de vincularme al equipo de investigación, por enseñarme ese mundo tan amplio, variable pero a la vez fluido y ameno de la Taxonomía Microbiana, gracias por la dirección de la tesis y por cada una de sus enseñanzas. De igual manera, al Dr. Eustoquio Martínez Molina por sus amplísimas explicaciones y sus valiosos aportes en los momentos que ya no se me ocurrían nuevas ideas.

A los que conforman el departamento de Microbiología y Genética. Al Dr. Fernando Leal a quien admiro por tener la paciencia de un buen maestro, sus enseñanzas sobre el equipo de epifluorescencia fueron valiosas para desarrollar la técnica de FISH. A la Dra. Carmen Castro, a la Dra. Encarna Velásquez y al Dr. Pedro Mateos por sus buenos consejos y explicaciones cuando las necesité.

A mis amigos del laboratorio quienes se convirtieron en mis hermanos en la distancia, con los que he compartido el día a día y quienes me enseñaron desde las cosas técnicas hasta los pequeños y valiosos detalles de la vida. Van mis sinceros agradecimientos a Paula, Lorena, María Eugenia (Nica), Pablo, Anita, Pilar... como el buen aroma del café que disfrutamos cada mañana, así ha quedado impregnado los buenos recuerdos de los momentos compartidos. De igual manera a Martha Helena, Martha P., Lina, Jaime, Oscar, Martha R, Imma, María Eugenia (CIALE).

A Pedro y Oscar por darme acogida en su casa las primeras noches del rudo invierno en que llegue a Salamanca, así como a Nelson Uribe por su generosidad, apoyo y sincera amistad.

A Wendy con quien he compartido desde que pisé el suelo ibérico cada ilusión, angustia o celebración, por tu amistad recibe mis bendiciones. También a los demás compañeros de apartamento a Luis Fernando, Yary y Ana Pastora amiga desde tiempos remotos.

A Charo, gran periodista la "guerrillera de la pluma", fue a través de ti que conocí mejor el pensamiento de quienes viven en este país. Siempre tendré la imagen de esa mujer adelantada al futuro.

A Mónica por esa amistad de principio a fin, a Margarita amiga incondicional por escucharme, darme su paciencia, sus consejos y por haber dedicado su tiempo a corregir la escritura. A los compatriotas Sandra, María Eugenia, Carmen, Beatriz, Milady.

A todas las personas que abrieron la puertas de su amistad y pude compartir muchos momentos en esta expedición, gente de varias nacionalidades pero un solo corazón: Sophie (Alemania), Laura (Inglaterra), Manuel (México), Karina(Brasil), Racha (Tunez). Ximena, Aisa, Damian, Carolina, Diego (Colombia) como olvidar los instantes de gloria que alcanzamos en Televisión cuando bailamos la cumbia?. A los amigos del coro de la Universidad de Salamanca: Bernardo, José, Cristina, Sonia etc.

A los que estuvieron pendientes "al otro lado del mar" desde mi Colombia, por sus mensajes de apoyo, sus palabras de aliento y el ánimo que me enviaban en cada escrito: Diana M, Ximena M, Luz O, Gina S, Adriana, Martha L. A mi amigo Filósofo Alejandro Osess y el resto de compañero de la Unipamplona.

Como lo dijo el poeta, a Dios a quien todo le debo. A mi Familia por ser el motor constante que genera incentivos y quienes siempre han creído con esa fe ciega en lo que hago, sus oraciones han sido la gran fortaleza. A mi papá Saturnino y mi mamá María del Carmen, por tantas noches de desvelo, por tantos días de oración que dedicaron a mi cuidado. Su perseverancia, sacrificio, dulzura y tenacidad para sacar adelante a los 11 hijos han sido el mejor ejemplo que hoy me dejan.

A todos quienes han contribuido que este sueño se hiciera realidad, de todo corazón gracias!!!



DEDICATORIA

*A mi papá Saturnino y mis hermanos
Heriberto, Luz, Héctor, Teresa, azucena,
Zoraida, Nelly, Ernesto y Rodolfo.
A la memoria de mi Mamá Maria del Carmen
y mi hermano Toñito.*

*"No creas lo que tus ojos te dicen. Solo muestran
límites. Mira con tu entendimiento, descubre lo que ya
sabes, y hallarás la manera de poder volar mejor"
Juan salvador Gaviota. Richard Bach (1936-).
Escritor y aviador estadounidense.*

ÍNDICE

Página

CAPÍTULO I

AI SLAM IENTO Y CARACTER IZACIÓN DE *Micromonospora* A PARTIR DE NÓDULOS DE *Lupinus angustifolius*

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 LAS LEGUMINOSAS	2
1.2 EI LUPINO	5
1.2.1 Composición del grano	7
1.2.2 Toxicidad	7
1.2.3 <i>Lupinus angustifolius</i>	8
1.2.4 Usos de las distintas especies del género <i>Lupinus</i>	9
1.3 ACTINOBACTERIAS	10
1.4 EI GÉNERO <i>Micromonospora</i>	12
1.4.1 Clasificación taxonómica	13
1.4.2 Hábitat	17
1.5 INTERACCIÓN PLANTA-MICROORGANISMO	17
1.5.1 Los microorganismos endofitos y su papel ecológico en la naturaleza	19
1.6 MÉTODOS MOLECULARES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA	22
1.6.1 Filogenia derivada del empleo del gen ribosómico 16S	23
1.6.2 Métodos moleculares para la tipificación de microorganismos	25
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1 AISLAM IENTO DE MICROORGANISMOS A PARTIR DE NÓDULOS	28
3.1.1 Recolección de plantas	28
3.1.2 Análisis de las muestras del suelo	28
3.1.3 Aislamiento de cepas de <i>Micromonospora</i>	29
3.1.4 Condiciones de crecimiento y morfología de las colonias	29
3.1.5 Mantenimiento y conservación de los microorganismos	30
3.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	30
3.2.1 Obtención de células y extracción de ADN	30
3.2.1.1 Extracción del ADN	30
3.2.2 Caracterización de las cepas mediante la técnica de BOX-PCR	31
3.2.3 Agrupación de las cepas por el método de TP-RAPD	32
3.2.4 Caracterización de las cepas aisladas por el método de Microsatélites	34
3.2.5 Análisis de los perfiles moleculares	35

3.3 SECUENCIACIÓN DEL GEN RIBOSÓMICO 16S	35
3.3.1 Purificación de los productos de PCR	36
3.3.2 Secuenciación de los productos de PCR purificados	37
3.3.3 Análisis de los fragmentos secuenciados	38
3.4 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE LAS CEPAS DE <i>MICROMONOSPORA</i>	39
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
4.1 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL SUELO	45
4.2 AISLAMIENTO DE <i>Micromonospora</i>	46
4.2.1 Morfología de las colonias	48
4.3 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LAS CEPAS DE <i>Micromonospora</i>	54
4.3.1 Perfiles de ADN mediante BOX-PCR	54
4.3.2 Caracterización molecular mediante perfiles TP-RAPD	58
4.3.3 Caracterización molecular de las cepas mediante Microsatélites	61
4.3.4 Integración de los resultados obtenidos mediante los perfiles BOX-PCR, TP-RAPD y microsatélites.	64
4.4 SECUENCIACIÓN DEL GEN RIBOSÓMICO 16S	68
4.4.1 Análisis filogenético	70
4.5 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE LAS CEPAS DE <i>Micromonospora</i>	74
4.5.1 Análisis de los resultados fisiológicos obtenidos de las cepas secuenciadas	81
5. CONCLUSIONES Capítulo I	87

CAPÍTULO II

NODULACIÓN DE LA LEGUMINOSA *Lupinus albus* POR BACTERIAS DEL GÉNERO *Paenibacillus*

1. INTRODUCCIÓN	89
1.1 BIODIVERSIDAD DE MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS EN LA FIJACIÓN DEL NITRÓGENO	89
1.2 LA NODULACIÓN EN LA DIVISIÓN PROTEOBACTERIA	91
1.2.1 ¿Nodulación sin genes <i>nod</i> ?	94
1.3 EL GÉNERO <i>Paenibacillus</i>	96
1.3.1 Empleo de bacterias del género <i>Paenibacillus</i> como promotores del crecimiento vegetal	98
2. OBJETIVOS	100
3. MATERIALES Y MÉTODOS	101
3.1 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS A PARTIR DE NÓDULOS	101
3.2 AGRUPACIÓN DE LAS CEPAS POR EL MÉTODO DE TP-RAPD	101
3.3 ENSAYO DE NODULACIÓN	101
3.3.1 Preparación de las semillas y cultivo de las plantas	101

3.4 IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA Lupsa 11	102
3.4.1 Hibridación de ADN-ADN	102
3.5 PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y FISIOLÓGICAS DE LA CEPA <i>Paenibacillus</i> Lupsa 11	103
3.5.1 Resistencia natural a los antibióticos y reislamiento de <i>Paenibacillus</i> de los nódulos de <i>L. albus</i> .	103
3.5.1.1 Reislamiento de <i>Paenibacillus</i> de los nódulos	104
3.5.2 Evaluación del crecimiento de la cepa <i>Paenibacillus</i> Lupsa 11 en medio con y sin nitrógeno	104
3.6 ENSAYO DE NODULACIÓN CON LA CEPA <i>Paenibacillus</i> Lupsa 11	105
3.6.1 Ensayo de la actividad nitrogenasa (ARA)	106
3.7 AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>nifH</i>	106
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	108
4.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS A PARTIR DE NÓDULOS	108
4.2 AGRUPACIÓN DE LAS CEPAS POR TP-RAPD	109
4.3 ENSAYO DE NODULACIÓN CON LAS CEPAS Lupsa	110
4.4 IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA Lupsa 11	111
4.5 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	112
4.5.1 Resistencia natural a los antibióticos	115
4.5.2 Evaluación del crecimiento en medio con y sin nitrógeno	116
4.6 ENSAYOS DE NODULACIÓN CON LA CEPA <i>Paenibacillus</i> Lupsa 11	117
4.6.1 Ensayo de la actividad nitrogenasa (ARA)	122
4.7 DETECCIÓN DE GENES <i>nifH</i> EN <i>Paenibacillus</i> Lupsa 11	124
5. CONCLUSIONES Capítulo II	126

CAPÍTULO III

LOCALIZACIÓN *In Situ* de *Paenibacillus* y *Micromonospora* EN TEJIDOS DE *Lupinus angustifolius*

1. INTRODUCCIÓN	128
1.1 LA TÉCNICA DE FISH	128
1.1.1 ARN ribosómico 16S como molécula diana para FISH	129
1.1.2 Sondas y marcaje	129
1.1.3 Marcadores fluorescentes	130
1.1.4 Aspectos metodológicos de FISH	132
1.1.5 Inconvenientes al aplicar la técnica FISH	135
1.1.6 Aplicaciones de FISH	138
2. OBJETIVOS	140
3. MATERIALES Y MÉTODOS	141
3.1 OBTENCIÓN DE LOS NÓDULOS	141
3.2 MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE LOS NÓDULOS	141
3.3 DETECCIÓN DE BACTERIAS POR FISH	142
3.3.1 Fijación de las muestras	142
3.3.1.1 Pretratamiento de cultivos puros	142

3.3.1.2	Pretratamiento de cortes de nódulos	142
3.3.1.3	Empleo de diferentes agentes permeabilizantes	143
3.3.2	Hibridación con sondas marcadas con fluorocromos	144
3.3.2.1	Sondas utilizadas	144
3.3.2.2	Hibridación	145
3.3.3	Lavado	145
3.3.4	Visualización de las muestras fluorescentes	146
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	147
4.1	PERMEABILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS BACTERIANAS	147
4.2	DETECCIÓN DE BACTERIAS DEL GÉNERO <i>Paenibacillus</i> EN NÓDULOS DE <i>Lupinus albus</i> EMPLEANDO LA TÉCNICA DE FISH	148
4.2.1	Microscopía Electrónica de Barrido de <i>Paenibacillus</i> Lupsa 11	148
4.2.2	FISH en cultivo puro de <i>Paenibacillus</i> con las sondas Cy3 y Cy5.5	149
4.2.3	Identificación de bacterias del genero <i>Paenibacillus</i> en nódulos por FISH	152
4.2.3.1	Obtención de cortes histológicos	152
4.2.3.2	FISH en cortes histológicos de nódulos	154
4.3	DETECCIÓN DE <i>Micromonospora</i> EN NÓDULOS DE <i>Lupinus angustifolius</i> MEDIANTE FISH	158
4.3.1	Microscopía electrónica	158
4.3.2	FISH en cultivo puro de <i>Micromonospora</i>	160
4.3.3	Detección de <i>Micromonospora</i> en cortes histológicos de nódulos silvestres	163
5.	CONCLUSIONES Capítulo III	168
	CONCLUSIONES GENERALES	169
6.	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
	CAPÍTULO I	
1	Diversidad de plantas leguminosas	2
2	Fotografías de algunas especies de <i>Lupinus</i>	5
3	Semillas de <i>Lupinus</i>	7
4	Distribución de <i>L. angustifolius</i> en la Península Ibérica	9
5	Morfología de algunos géneros de <i>Actinobacterias</i>	10
6	Morfología del género <i>Micromonospora</i>	12
7	Microcolonias de <i>Streptomyces</i> en tejido de trigo, marcadas con GFP	20
8	<i>Lupinus angustifolius</i> crecida en Extremadura	46
9	Placa de aislamiento de bacterias a partir de nódulos de <i>Lupinus</i>	46
10	Características morfológicas de diversas cepas aisladas, crecidas en el medio M-65	48
11	Crecimiento de la cepa SB1-35 en el medio SA1	52
12	Producción de pigmento por la cepa SB1-47	53
13	Análisis de los perfiles de BOX-PCR de las cepas procedentes de SB1	55
14	Dendrograma en el que se muestra el conjunto de cepas SB1 y SB2 analizadas por la técnica BOX-PCR	56
15	Análisis de los perfiles de TP-RADP de las cepas SB1 y SB2	59
16	Dendrograma en el que se muestra el conjunto de cepas SB1 y SB2 analizadas por la técnica de TP-RAPD	60
17	Patrón de bandas obtenidas con microsatélites de las cepas SB1 y SB2	62
18	Dendrograma realizado mediante el método UPGMA de los patrones de bandas obtenidos con microsatélites para las 61 cepas de SB1 y SB2	63
19	Dendrograma basado en el método de agrupación UPGMA y el coeficiente de Pearson para el conjunto de las cepas SB1 y SB2, integrando los análisis de BOX-PCR, microsatélites y TP-RAPD	67
20	Relación filogenética de las cepas aisladas de nódulos de <i>Lupinus angustifolius</i>	71
21	Utilización de las distintas fuentes de carbono por parte de las cepas SB1 y SB2 aisladas de nódulos	75
22	Porcentajes de cepas que degradan compuestos químicos	76
23	Número de cepas que crecen a diferentes valores de pH	77
24	Crecimiento de las cepas a diferentes valores de temperatura	77
25	Pruebas fisiológicas y bioquímicas (a)	79
26	Pruebas fisiológicas y bioquímicas (b)	80

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
CAPÍTULO II		
27	Modelo esquemático de los Factores Nod	92
28	Árbol de las Proteobacterias basado en el gen ARNr 16S	93
29	Nodulación de la planta de <i>Aeschynomene sensitiva</i> por la cepa <i>Bradyrhizobium</i> ORS278	95
30	Morfología del género <i>Paenibacillus</i>	97
31	Interacción entre PGPB, plantas, patógenos y suelo	98
32	Aislamiento de bacterias de la planta de <i>Lupinus</i>	108
33	Imágenes de Microscopía electrónica de la cepa <i>Paenibacillus</i> Lupsa 11	109
34	Perfiles TP-RAPD de las cepas Lupsa aisladas de nódulos de <i>Lupinus angustifolius</i>	109
35	Relación filogenética de la cepa Lupsa 11 con algunas cepas tipo de <i>Paenibacillus</i>	111
36	Crecimiento de Lupsa 11 en medio de cultivo con nitrógeno y sin nitrógeno	116
37	Crecimiento de las plantas de <i>Lupinus albus</i> inoculadas con <i>Paenibacillus</i> Lupsa 11, <i>Bradyrhizobium</i> Islu 65 y la mezcla de los inóculos Lupsa 11 e Islu 65	118
38	Nódulos y raíces de las plantas de <i>Lupinus albus</i> obtenidos con diferentes inóculos	119
39	Reducción del acetileno en nódulos, empleando la cepa <i>Paenibacillus</i> Lupsa 11	123
40	Reducción del acetileno en nódulos, empleando el coinoculo <i>Paenibacillus</i> Lupsa 11 y <i>Bradyrhizobium</i> Islu 65	123
41	Reducción del acetileno en nódulos, empleando la cepa control <i>Bradyrhizobium</i> Islu 65	123
42	Relación filogenética de la cepa Lupsa 11 con las cepas de <i>Frankia</i> que tienen genes <i>nifH</i>	124
CAPITULO III		
43	Marcaje de las sondas para FISH	130
44	Estructura y perfiles espectrales de algunos fluoróforos de cianina	131
45	Diagrama de un procedimiento típico de FISH	132
46	Microscopía electrónica de barrido del interior de un nódulo de <i>Lupinus albus</i>	149
47	FISH en cultivo puro de <i>Paenibacillus</i> Lupsa 11 y <i>Bradyrhizobium</i> Islu 65	150
48	FISH en una mezcla de los cultivos puros de <i>Paenibacillus</i> Lupsa 11 y <i>Bradyrhizobium</i> Islu 65	150
49	FISH de cultivo puro de <i>Paenibacillus</i> Lupsa 11 analizado por microscopía confocal	151

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
50	FISH de cultivo puro de <i>Bradyrhizobium</i> Islu 65 analizado por microscopía confocal	152
51	Cortes histológicos transversales de los nódulos de la planta <i>Lupinus albus</i>	153
52	Secuencias del corte vertical realizado al nódulo Lupsa.	153
53	FISH de nódulos Lupsa con la sonda LupsaCy3 en microscopio de epifluorescencia	154
54	FISH en tejidos de nódulos de <i>Lupinus albus</i> , obtenidos al inocular con <i>Paenibacillus</i> Lupsa 11 y analizados por microscopía confocal	155
55	FISH en tejidos de nódulos de <i>Lupinus albus</i> , obtenidos al inocular con <i>Bradyrhizobium</i> Islu 65	156
56	Microscopía electrónica de barrido de nódulos de <i>Lupinus angustifolius</i>	159
57	Microscopía electrónica de barrido del interior del nódulo	160
58	FISH en cultivo puro de <i>Micromonospora lupini</i> DSM 44874 ^T empleando la sonda MicromFITC	161
59	FISH en cultivo puro de <i>Micromonospora lupini</i> DSM 44874 ^T y <i>Bradyrhizobium</i> Islu 65	162
60	FISH en tejidos de nódulos de <i>Lupinus angustifolius</i> con la sonda micromCy55 (a)	164
61	FISH en tejidos de nódulos de <i>Lupinus angustifolius</i> con la sonda micromCy55 (b)	165
62	FISH en nódulos empleando la sonda IsluCy5 y la mezcla de las sondas Islu Cy5 y microm Cy55	166

LISTA DE TABLAS

Tabla		página
CAPÍTULO I		
1	Resumen nacional de superficie, rendimiento y producción de leguminosas grano del año 2006	4
2	Destino del grano producido en el año 2006	4
3	Composición de distintos ingredientes de origen vegetal	7
4	Especies del género <i>Micromonospora</i> descritas en la actualidad	15
5	Pruebas bioquímicas realizadas a las diferentes cepas aisladas	20
6	Análisis físico-químico del suelo	45
7	Nombre asignado a las cepas utilizadas en el presente estudio	47
8	Crecimiento de las cepas SB1 en diferentes medios de cultivo	49
9	Crecimiento de las cepas SB2 en diferentes medios de cultivo	51
10	Tipo al que pertenecen las cepas SB1 y SB2 según los dendrogramas obtenidos por las técnicas BOX-PCR, TP-RAPD y microsatélites	65
11	Análisis de la secuencia del gen ARNr 16S de las cepas en estudio comparadas con las depositadas en las bases de datos públicas	69
12	Pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas, pH y NaCl, de las 22 cepas que fueron secuenciadas	83
13	Crecimiento en diferentes fuentes de carbono para las 22 cepas secuenciadas y organizadas por grupos según el árbol filogenético	84
14	Evaluación de aminoácidos como fuente de carbono para las 22 cepas secuenciadas	85
15	Pruebas de degradación de las cepas las 22 cepas secuenciadas	85
CAPÍTULO II		
16	Antibióticos empleados y sus concentraciones	103
17	Agrupación de las cepas de acuerdo con los perfiles TP-RAPD	110
18	Porcentajes de similitud de la cepa <i>Paenibacillus</i> Lupsa 11 con respecto a las especies tipo más cercanas	112
19	Pruebas bioquímicas de la cepa <i>Paenibacillus</i> Lupsa 11	113
20	Diferencias en las pruebas bioquímicas de la cepa <i>Paenibacillus</i> Lupsa 11 con las especies filogenéticamente relacionadas	114
21	Resistencia de las cepas <i>Paenibacillus</i> Lupsa 11 y <i>Bradyrhizobium</i> Islu 65 a diversos antibióticos	115
22	Parámetros evaluados en el ensayo de nodulación	120
CAPÍTULO III		
23	Propiedades espectrales de algunos fluorocromos utilizados para la detección de microorganismos por FISH	131
24	Secuencias de oligonucleótidos utilizados en el estudio	145
25	Resultados de los diversos métodos de permeabilización utilizados	147

Resumen

Esta memoria doctoral forma parte de la línea de investigación en la interacción planta-microorganismo que se ha venido desarrollando en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Salamanca. El trabajo se inició durante la búsqueda de microorganismos procedentes de nódulos de la leguminosa *Lupinus angustifolius*, en donde se encontró que en las placas de aislamiento aparecían de manera repetitiva colonias con morfología diferente a las del género *Bradyrhizobium*, que se sabe nodulan de manera natural el *Lupinus*. Por esta razón, uno de los objetivos de esta tesis Doctoral está orientado a estudiar la diversidad de bacterias que se encuentran en nódulos de *Lupinus angustifolius* como un nuevo hábitat para microorganismos.

El trabajo se llevó a cabo en tres frentes distintos pero a la vez interrelacionados. El desarrollo de la primera estrategia consistió inicialmente en aislar bacterias con morfología diferente de *Bradyrhizobium* que estuvieran presentes en el interior de los nódulos de *Lupinus*. De este ensayo se obtuvieron 61 cepas con características morfológicas de actinobacterias. A continuación, a todas las cepas aisladas se les realizó la caracterización molecular con las técnicas de BOX-PCR, TP-RADP y Microsatélites. Los resultados obtenidos mediante las técnicas moleculares, mostraron la elevada diversidad genética existente entre las cepas evaluadas y permitieron agruparlas en cinco grupos filogenéticamente relacionados.

A partir de los grupos formados se escogieron 22 cepas a las cuales se les hizo secuenciación del gen ribosómico 16S. Con las secuencias obtenidas de cada una de ellas, se construyó un árbol filogenético teniendo en cuenta las secuencias de las cepas de *Micromonospora* validadas hasta este momento. Se encontró que las cepas aisladas se distribuyen a lo largo del árbol y con valores que oscilan entre el 98% y 99% de similitud con las cepas tipo: *Micromonospora fulviviridis* DSM 43906^T, *Micromonospora echinospora* DSM 43816^T, *Micromonospora chaiyaphumensis* JCM 12873^T y *Micromonospora olivasterospora* DSM 43868^T, lo cual indica que algunas cepas pueden representar nuevas especies.

Por otra parte, a todas las cepas se les hizo la caracterización fenotípica en la que se encontró que existen diferencias tanto en las pruebas fisiológicas como en las bioquímicas, lo cual muestra la diversidad de cepas halladas aún entre las que pertenecían al mismo perfil molecular.

La segunda estrategia abordada en este estudio, se basó en el supuesto de que bacterias fijadoras de nitrógeno diferentes de *Bradyrhizobium* también se encontraban en el interior de los nódulos, esto debido a que, en diversas placas de aislamiento para *Micromonospora* aparecían colonias de crecimiento rápido, cremosas y eran Gram positivas. De los nódulos se aislaron 23 cepas denominadas Lupsa, las cuales se agruparon con la técnica de TP-RAPD en 8 perfiles distintos. De cada perfil se seleccionó una cepa que fue utilizada en estudios de nodulación, dichas cepas fueron capaces de reinfectar el *Lupinus albus* y se eligió a la cepa Lupsa 11 por ser la que presentó mayor número de nódulos en las raíces.

El análisis del gen ARNr 16S de la cepa Lupsa 11 mostró que pertenecía al género *Paenibacillus* y que está estrechamente relacionada con las cepas tipo *Paenibacillus cineris* LMG 18439^T, *Paenibacillus favisporus* 17253^T y *Paenibacillus rhizosphaerae* LMG 21995^T. Posteriormente, la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 se utilizó en los ensayos de nodulación de *Lupinus albus* en cámara en condiciones controladas. Teniendo en cuenta los diversos controles, se pudo establecer que al cabo de 6 semanas las plantas inoculadas sólo con la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 presentaron nódulos efectivos en las raíces y que fueron capaces de reducir el acetileno. En ensayos adicionales se encontró que la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 crecía en medios de cultivo sin nitrógeno y además, que contenía el gen *nifH* el cual mostró un 99% de similitud con respecto al gen *nifH* de la cepa *Frankia alni* ACN14a.

Una tercera estrategia consistió en demostrar la colonización por parte de las bacterias *Micromonospora* así como de *Paenibacillus* en los nódulos de *Lupinus* empleando la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). Inicialmente se evaluaron diversos tratamientos de permeabilización de las células y se eligió la mezcla de lisozima (5 mg/ml) y proteinasa K (5 µg/ml) por ser la que presentó mayor fluorescencia con la sonda universal EUB338. Para los ensayos en cultivo puro y en nódulos se diseñaron sondas específicas para cada uno de los géneros evaluados teniendo en cuenta las secuencias del gen ARNr 16S. Las sondas se marcaron con el fluorocromo Cy5.5 con el cual se evitó la autofluorescencia generada por el tejido del nódulo. Las sondas evaluadas fueron altamente selectivas e hibridaron de manera específica con las bacterias presentes en el cortex interno del nódulo y no se unieron a otros sitios como es el tejido intercelular. Tal como se había demostrado en los ensayos de aislamiento, por microscopía electrónica, los estudios fisiológicos, así como por la identificación del gen ARNr 16S, se confirmó por FISH la presencia de *Micromonospora* y de *Paenibacillus* en el interior de los nódulos de la leguminosa *Lupinus*.

CAPÍTULO I

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Micromonospora* A PARTIR DE NÓDULOS DE *Lupinus angustifolius*

CAPÍTULO I

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Micromonospora* A PARTIR DE NÓDULOS DE *Lupinus angustifolius*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LAS LEGUMINOSAS

Desde su aparición en la tierra hace unos 60 millones de años, las leguminosas, junto con los cereales y algunas frutas y raíces tropicales, han sido durante milenios la base esencial de la alimentación humana, convirtiéndose en compañero inseparable de la evolución del hombre (Lavin *et al.*, 2005). Aunque existen diferencias en cuanto al número exacto de variedades, se tienen identificados más de 700 géneros y 19.000 especies (Figura 1). Debido a su gran diversidad, se han encontrado leguminosas creciendo en regiones desfavorables para muchas plantas, como altas temperaturas, precipitación extrema y suelos de baja fertilidad (Moreno, 1983).



Figura 1. Diversidad de plantas leguminosas.

Pertenecen a la Familia *Fabaceae* la cual se divide en 3 subfamilias: *Faboideae* que pueden ser árboles, arbustos o herbáceas, *Mimosoideae* árboles pequeños y arbustos, y *Caesalpinioideae*, constituida por árboles (Strasburger, 2004).

Estas plantas exhiben gran diversidad vegetativa y floral, predominan las especies leñosas perennes, pero hay numerosas formas herbáceas y algunas acuáticas. Las flores son pentámeras, corola de 5 pétalos. El fruto denominado legumbre, lo constituye una vaina aplanada con una sola cámara y dos suturas que suele abrirse a lo largo de éstas,

como en el guisante y en el que las semillas están unidas longitudinalmente a una de las suturas.

La legumbre puede ser indehiscente (que no se abre), como la del cacahuete, que madura bajo tierra; o dehiscente de forma explosiva, como en el altramuz. En cuanto al tamaño de la vaina, oscila entre unos pocos milímetros y más de treinta centímetros (Strasburger, 2004; Summerfield y Bunting, 1980).

La capacidad de las leguminosas de fijar nitrógeno en simbiosis con bacterias fijadoras presentes en nódulos, es una característica que les confiere bastante interés desde el punto de vista de la recuperación de suelos pobres, de la regeneración de suelos degradados y de su utilización en prácticas agrícolas como la rotación de cultivos (Sprent, 2008).

La formación de nódulos, la mayoría de las veces en las raíces donde se lleva a cabo la fijación, se presenta en casi todas las papilionoideas (93% de los géneros y 99% de las especies), en mimosoideas (88% de los géneros y 97% de las especies) y bastante menos en las cesalpinoideas (5% de los géneros y 21% de las especies) (Sprent, 2001).

Bajo la denominación genérica "leguminosas" se incluyen numerosas especies de características similares, que se aprovechan de diferente manera ya sea como grano seco, grano verde, pienso, heno o aceite. En los cálculos estadísticos a nivel mundial, se consideran leguminosas grano a aquellas que son aprovechadas para consumo humano o animal. El cacahuete y la soja se incluyen dentro del grupo de las plantas oleaginosas. Las judías, habas y guisantes verdes, se ubican dentro de los cultivos hortícolas.

La Tabla 1, muestra las superficies y producciones de leguminosas en los últimos años, según los datos registrados en el anuario de estadística agroalimentaria y pesquera en España (MAPA, 2007). Se incluyen datos sobre las superficies ocupadas, los rendimientos, las producciones cosechadas tanto en secano como en regadío de judías, habas, lentejas, garbanzos, guisantes, altramuz y otras leguminosas. Así mismo, en la Tabla 2, se presentan los datos de la distribución del grano utilizados en el año 2006.

Tabla 1. Resumen nacional de superficie, rendimiento y producción de leguminosas grano, 2006.

Cultivos	Superficie (Hectáreas)			Rendimiento (Kg/ha)		Producción (toneladas)	
	Secano	Regadío	Total	Secano	Regadío	Grano	Paja cosechada
Judías secas	4.952	4.254	9.206	908	2.228	13.983	5.289
Habas secas	26.310	10.331	36.641	1.065	1.92	47.886	23.000
Lentejas	17.775	370	18.125	646	1.442	12.005	4.117
Garbanzos	23.173	2.032	25.205	716	1.561	19.764	7.474
Veza	44.878	2.913	47.791	781	1.568	39.662	19.346
Altramuz	8.064	1.641	9.705	549	1.627	7.100	138
Almortas	8	-	8	1.000	-	8	7
Yeros	18.863	242	19.105	707	1.219	13.632	6.243
Otras leguminosas	1.914	591	2.505	939	1.476	2.670	688

Fuente: MAPA, 2007.

Tabla 2. Destino del grano producido en el año 2006 (Toneladas).

Cultivos	Destino de la producción en explotaciones productoras					Total semilla utilizada
	Reserva para consumo propio			Ventas fuera de la explotación	Total	
	Semilla	Pienso	Alimentación Humana			
Judías secas	487	140	2.580	10.776	13.983	763
Habas secas	2.829	8.109	28	36.920	47.886	4.509
Lentejas	1.278	57	118	10.552	12.005	1.975
Garbanzos	1.544	252	551	17.417	19.764	2.101
Guisante secos	10.910	38.965	54	139.890	189.819	19.870
Veza	4.218	10.734	-	24.670	39.662	5.169
Altramuz	703	1.713	5	4.679	7.100	887
Almortas	1	3	-	4	8	-
Yeros	1.099	4.762	-	7.771	13.632	1.705
Otras leguminosas	204	1.006	-	1.460	2.670	272
TOTAL LEGUMINOSAS	23.273	65.742	3.336	254.139	346.489	37.250

Fuente: MAPA, 2007.

1.2 EL LUPINO (*Lupinus spp.*)

El lupino, conocido también como altramuz, tremoco o termis, es parte de las leguminosas que han constituido la base proteica principal en la alimentación humana y animal, desde tiempos muy antiguos (Figura 2). En Europa, algunas variedades de esta leguminosa se destinaron durante mucho tiempo a su empleo como abono verde, forraje y, en forma más reducida, como alimento humano previo proceso de lixiviación de los alcaloides (Bórquez, 2002). En América, alcanzó importancia desde la época incaica, donde las culturas americanas tenían en el lupino una de las principales fuentes de proteínas; sin embargo, a partir de la llegada de los españoles se introdujo un cambio radical en los hábitos alimenticios autóctonos, siendo el lupino desplazado y olvidado en el tiempo (Kurlovich *et al.*, 2007).

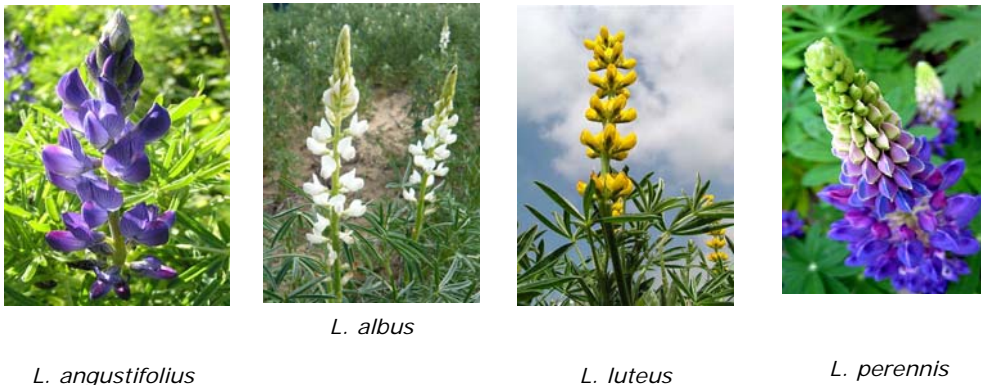


Figura 2. Fotografías de algunas especies de *Lupinus*.

La palabra *Lupinus* procede del término latino *Lupus*: lobo, haciendo referencia a la voracidad que tienen estas plantas en utilizar nutrientes del suelo que no están disponibles para otras plantas que crecen en el mismo suelo (Meredith, 1988). Este inusual poder de los altramuces está asociado a la formación de "proteoid roots", que son un manojo de raíces laterales que aparecen ante una situación de baja disponibilidad de fósforo y a la exudación de ácidos orgánicos que movilizan los nutrientes por procesos de quelación (Gerke *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 1994).

El lupino pertenece a la familia *Fabaceae* subfamilia *Lotoideae*, tribu *Genisteeae*. Son hierbas anuales o viváceas e incluso en América llegan a ser plantas arbustivas. Poseen hojas palmado-compuestas con estípulas concrecentes en la base del pecíolo. Inflorescencia en racimos terminales con las flores verticiladas o alternas, cáliz profundamente bilabiado y legumbres más o menos deshicentes, constreñidas entre semillas.

Al género *Lupinus* pertenecen cientos de especies. A continuación se muestra una clave para identificar las seis especies que crecen en la Península Ibérica (Pascual Terrats, 1986).

- | | |
|--|-------------------------|
| 1. Flores perfectamente verticiladas | |
| 2. Todas las flores amarillo-brillante | <i>L. luteus</i> |
| 2. Flores al principio amarillo-pálido y al final rosa-pálido o desde un principio de este color | <i>L. hispanicus</i> |
| 2. Flores alternas o irregularmente verticiladas | |
| 3. Labio superior del cáliz algo bidentado | <i>L. albus</i> |
| 3. Labio superior del cáliz partido | |
| 4. Foliolos lineares | <i>L. angustifolius</i> |
| 4. Foliolos no lineares | |
| 5. Planta hirsuta, semillas lisas | <i>L. micranthus</i> |
| 5. Planta sericea, flores irregularmente verticiladas | |
| Semillas ásperas | <i>L. consentinii</i> |

Gladstones (1998) describe que Von Sengbush en 1928, obtuvo las primeras variedades dulces con bajo contenido de alcaloides, siendo *Lupinus albus* la planta más cultivada debido a las mejoras recibidas que lo han llevado a ser un ecotipo dulce. En la antigüedad, *Lupinus albus* fue introducido en España procedente de Grecia y ha sido utilizado como fuente de proteínas. Sin embargo, fue poco a poco desplazado por la soja, la cual tiene un menor coste de producción.

Con relación a la bioquímica de las plantas, el lupino tiene una composición de azúcares muy compleja. Entre los polisacáridos estructurales, el más abundante es la celulosa seguido de algunas hemicelulosas y de lignina. Los azúcares neutros más abundantes son glucosa y galactosa, apareciendo muchos otros en menor proporción como α -rabinosa, xilosa, ácidos urónicos, manosa, ramnosa y mucosa. Entre los α -galactósidos están la estaquiosa, verbascosa, rafinosa y sacarosa; además existen otros en menor proporción como galactopinidol, galactoinositol, digalactopinitol y digalactoinositol (Gdala y Buraczewska, 1996).

La composición del aceite de lupino, es similar al de otras semillas vegetales y consta fundamentalmente de cadenas insaturadas de ácidos grasos, siendo los principales el ácido oleico y el ácido linolénico (William y McGibbon, 1980; López *et al.*, 1997).

1.2.1 Composición del grano



Figura 3. Semillas de *Lupinus*

La presencia de un alto porcentaje de proteínas en las semillas de *Lupinus* (Figura 3), es el aspecto nutricional más importante de este género (Petterson y Mackintosh, 1994; Gdala y Buraczewska, 1996). Existen distintas variedades de lupino con niveles de proteína cruda variable (Tabla 3).

La composición de aminoácidos esenciales es similar al de otras leguminosas en las cuales existe una deficiencia relativa en los aminoácidos azufrados.

Tabla 3. Composición de distintos ingredientes de origen vegetal (% en base seca).

	Materia Seca	Proteína Cruda	Lípidos	Cenizas	Carbohidratos	Energía (MJ/kg MS)
<i>Lupinus angustifolius</i>	89.2	36.5	4.8	3.2	55.4	20.1
<i>Lupinus luteus</i>	93.7	49.6	5.5	3.8	41.0	21.0
<i>Lupinus albus</i>	92.2	45.5	13.7	3.6	40.5	23.1
Harina de Soya	89.0	50.3	1.2	8.8	39.7	19.2
Harina de Canola	88.9	43.2	3.0	7.4	46.4	19.7

Fuente: Glencross *et al.*, 2003.

La semilla de *Lupinus* se ha empleado en dietas de cerdos, pollos y rumiantes, con muy buenos resultados en términos técnicos y económicos. En cuanto al contenido de vitaminas, las variedades de lupino dulce contienen un alto porcentaje de carotenos (pro vitamina A), que otorgan un característico color amarillo a la harina. También contiene vitaminas B1 y B2, y además aporta fósforo y calcio (De Witt, 1994).

1.2.2 Toxicidad

Los alcaloides presentes en algunas especies de *Lupinus*, proceden del metabolismo secundario y actúan como defensa de las plantas a la infección por bacterias y hongos y contra predadores herbívoros (Wink, 1992; Mole y Joern, 1994; Wink *et al.*, 1995). La diversidad estructural de los alcaloides, reduce las posibilidades de los herbívoros para desarrollar resistencia a todos ellos, aumentando de este modo su toxicidad (Wink, 1993).

En la concentración de alcaloides, además de condicionamientos genéticos, tienen gran importancia las condiciones ambientales en las que se desarrollan las plantas. Christiansen *et al.* (1997), observaron que la concentración de alcaloides en las semillas de *Lupinus angustifolius* de una variedad amarga (Zubr) y dos variedades dulces (W26 y polonez), incrementa o disminuye dependiendo de si las plantas sufren un periodo de estrés hídrico durante la etapa vegetativa o durante la floración.

1.2.3 *Lupinus angustifolius*

El nombre asignado a esta especie de *Lupinus* como "angustifolio", que significa "de hoja estrecha", fue para diferenciarla de otras especies cercanas, que tienen las hojas más anchas.



Es una planta anual, pubescente, de tallo erecto ramificado desde la base o más arriba. Tiene hojas pecioladas con 5-9 folíolos linear-oblongos, obtusos o truncados, glabros en el haz y dispersamente vellosos en el envés.

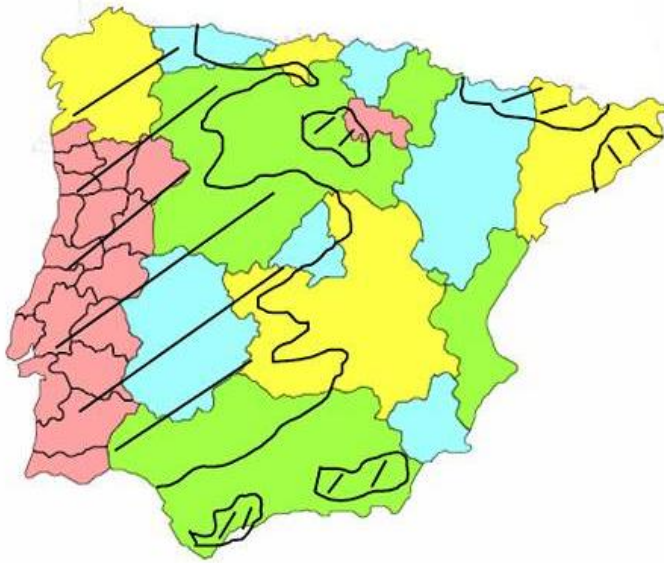


Florece entre la primavera y principios del verano, formando densos racimos terminales de flores muy vistosas, apenas pecioladas, de color azul. De ahí que también se llame altramuz azul.



El fruto es una legumbre de 5 a 7 cm de largo, que contiene de 3 a 5 semillas medianas, redondeadas, con el tegumento blanco o moteado de gris. La vaina se vuelve amarilla, parda o negra al madurar (Kurlovich *et al.*, 2007).

El altramuz más utilizado en España en la alimentación animal, es una variedad de origen australiano de *Lupinus angustifolius* tipo dulce, el cual, si se compara con *Lupinus albus* cultivado en Europa, tiene un menor contenido en proteína (30 vs 35%) y grasa (5 vs 10%) pero un mayor contenido en fibra (15 vs 10%). (FEADN, 2003).



Lupinus angustifolius es una de las pocas especies cultivadas, cuyo fruto se aprovecha en alimentación. Se extiende prácticamente por todos los suelos sin carbonatos de la Península Ibérica (Figura 4).

Figura 4. Distribución de *L. angustifolius* en la Península Ibérica.

1.2.4 Usos de las distintas especies del género *Lupinus*

La producción de *Lupinus* se está incrementando en Australia, Chile y Estados Unidos, al amparo de programas de mejora de cultivos. Las autoridades de estos países han considerado la gran importancia agrícola y económica que tiene esta planta, utilizándola en áreas donde las condiciones no permiten el crecimiento de la soja (Rahman y Gladstones, 1987).

Por otra parte, la facilidad de aclimatación que tiene *Lupinus* a condiciones de estrés tan diversos, como suelos extremadamente pobres, sequías, heladas, altas concentraciones de metales etc., hace de esta planta un recurso de extraordinario valor más ahora que se avanza hacia la agricultura sostenible, basada en el mínimo empleo de fertilizantes, pesticidas, correctores de crecimiento, etc. (Foy, 1992, 1993).

Las especies del género *Lupinus* se han utilizado en programas de rotación de cultivos con papatas y avena en suelos ácidos, y se ha comprobado que mantienen el pH en valores próximos a 5.5, controlando así al denominado mal de costra de la patata (Bolland, 1992). Además, estas plantas han sido utilizadas en programas de recuperación de suelos ácidos procedentes de minas de carbón abandonadas y en suelos con alto contenido en aluminio, ya que toleran concentraciones que son tóxicas para la mayoría de las plantas (Foy, 1997).

Debido al aumento en el uso de fertilizantes químicos, en la actualidad existen excelentes razones para incrementar la producción de leguminosas fijadoras de nitrógeno. Se ha descrito que la fertilidad residual de un cultivo de leguminosas esta entre 40-50kg N/ha (Ranalli, 1995), sin embargo, se ha comprobado que *Lupinus angustifolius* es capaz de dejar hasta 95kg N/ha para el cultivo siguiente (Armstrong *et al.*, 1997). En Australia durante la rotación de cultivos de cereal con leguminosa, sólo *L. angustifolius* fue capaz de proporcionar al trigo todo el nitrógeno que necesitaba para su desarrollo. A pesar de ser un cultivo nuevo, las excelentes cualidades de *L. angustifolius* han hecho que se cultiven cada año en Australia 1.4 millones de hectáreas (O'Connell, 2000).

1.3 ACTINOBACTERIAS

Las actinobacterias son microorganismos Gram positivos, con un contenido de guanina-citosina (GC) superior al 50% en su ADN. Presentan desde una morfología unicelular hasta filamentosa (Figura 5), la mayoría son aerobios (metabolismo oxidativo), aunque algunos de ellos son anaerobios facultativos u obligados (Magarvey *et al.*, 2004; Stackebrant y Schumann, 2006).

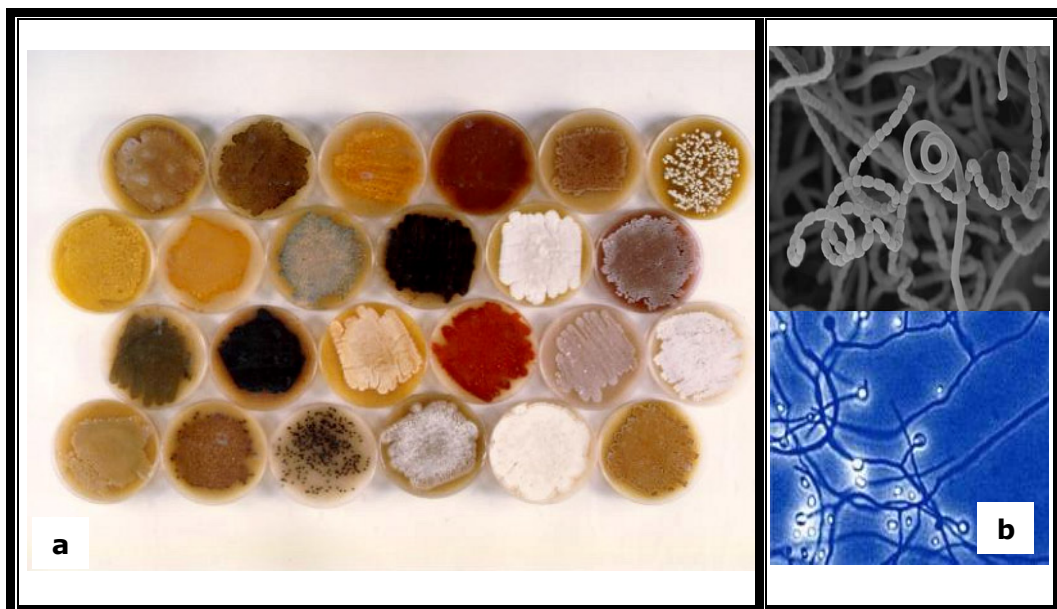


Figura 5. Morfología de algunos géneros de Actinobacterias. a) crecimiento en placa. b) micelio visto al microscopio electrónico y óptico.

Constituyen el Orden *Actinomycetales*, de la clase *Actinobacteria*. Dicho orden esta compuesto por más de 220 géneros y cientos de especies que constantemente son descritas, a las cuales se puede acceder en la página: www.bacterio.citc.fr.

Casi todos sus miembros desarrollan un micelio filamentososo que puede permanecer unido a la superficie del sustrato, al cual se le denomina micelio vegetativo o bien desarrollarse hacia la parte externa en cuyo caso se denomina micelio aéreo. Los filamentos individuales o hifas del micelio se subdividen en unidades, como producto del crecimiento de la pared celular hacia el interior de la hifa en intervalos regulares a lo largo de esta estructura. A este proceso se le denomina septación y cada una de las septas resultantes contiene una molécula de ADN (Holt *et al.*, 1994).

Una característica particular de las actinobacterias es que la reproducción lleva a la formación de esporas que son producidas en hifas especializadas, muchas de las cuales se desarrollan sobre el micelio aéreo. De manera general, estas estructuras carecen de movilidad aunque algunos géneros producen esporas flageladas. Las esporas producidas por la mayoría de las especies no son resistentes al calor y, la forma, número y disposición de éstas, es una característica específica en muchos géneros (Stackebrant y Schumann, 2006).

La mayoría de los géneros descritos corresponden a bacterias aisladas de suelos, sin embargo, en muchos casos no se ha estudiado cómo crecen y sobreviven en el medio ambiente. Son capaces de formar micelio sobre sustratos orgánicos asequibles, pero una vez agotados los nutrientes, inician nuevamente su diferenciación y la producción de esporas. La dispersión de las esporas por el ambiente va a depender de su forma e hidrofobicidad, de los artrópodos presentes en el suelo y del movimiento del agua intersticial. Así, las esporas hidrofílicas del género *Micromonospora* se separan y dispersan en el agua más fácilmente que las cadenas de esporas hidrófobas del género *Streptomyces* (Williams *et al.*, 1984).

Las actinobacterias se encuentran distribuidas en diferentes hábitats, sin embargo su reservorio natural es el suelo donde conforman aproximadamente el 20-60% de la población microbiana. En el suelo su función ecológica principal es la descomposición de la materia orgánica a través de las enzimas que producen y que les permiten hidrolizar diversos compuestos. Las actinobacterias son capaces de descomponer la lignocelulosa y se han descrito algunas especies productoras de celulasas, xilanasas o proteasas (Rivas *et al.*, 2003; Rivas *et al.*, 2004 a, b, c, d). El olor característico a tierra húmeda se debe a su actividad metabólica, a la producción de compuestos terpenoides (geosminas). Algunas especies son patógenos de humanos, animales o plantas, mientras que otras son fijadoras de nitrógeno (Williams *et al.*, 1984; Stackebrant y Schumann, 2006).

Además de la función ecológica, las actinobacterias han demostrado que son la fuente principal de metabolitos secundarios tales como antimicrobianos, antivirales, anticancerígenos, anticoagulantes, e inmunomoduladores entre otros (Bull *et al.*, 2000; Mincer *et al.*, 2002). Se estima que aproximadamente el 68% de estos productos son sintetizados por actinobacterias del género *Streptomyces*. Sin embargo, otros géneros entre los que destacan *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Nocardia*, y *Streptoverticillium* son fuentes valiosas de metabolitos bioactivos de aplicación terapéutica y agroquímica (Omura, 1992; Horan, 1994; Kokare *et al.*, 2004).

1.4 EI GÉNERO *Micromonospora*

Micromonospora (*Mikros* = pequeño, *mono* = una y *spora* = espora), es un género de bacterias que pertenecen a la familia *Micromonosporaceae*. Fue descrito por Ørskov en 1923 y las bacterias que en él se incluyen, se caracterizan porque poseen micelio vegetativo, esporas únicas sensibles al calor y carecen de micelio aéreo (Figura 6).

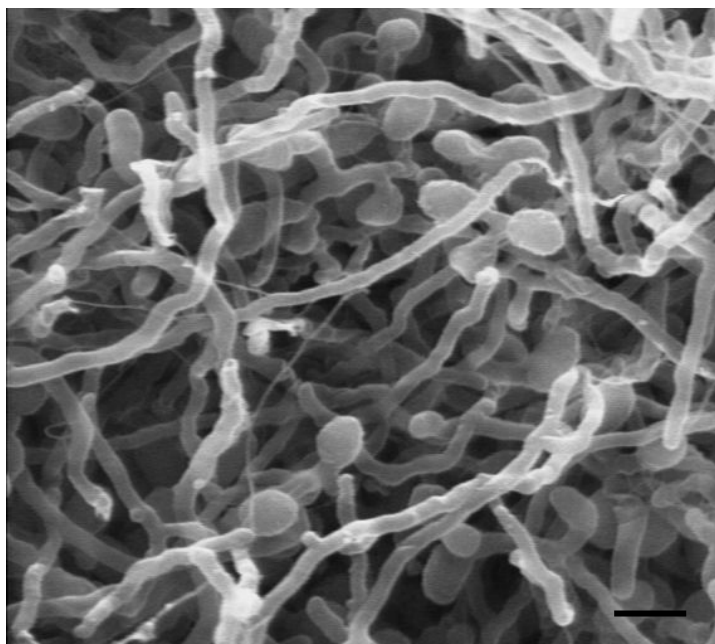


Figura 6. Morfología del género *Micromonospora*. Barra = 1 μm

Son bacterias aerobias estrictas, quimiorganótrofas y mesófilas, con crecimiento óptimo entre 20-40°C y una temperatura máxima tolerable de 50°C. Muchas cepas son altamente proteolíticas y celulolíticas. La tolerancia media al cloruro sódico es

del 3% y el máximo es 5%. No existe crecimiento por debajo de pH de 5,5 ni por encima de 9,5 (Kawamoto, 1989).

Las colonias que crecen en medios sólidos inicialmente tienen un color amarillo o naranja claro, que va cambiando a naranja, rojo, marrón, azul-verdoso o morado. Al madurar las colonias adquieren un color progresivamente más oscuro con la producción de esporas marrón-negras, verde-negras, o negras y se vuelven mucosas. La formación de esporas únicas en el micelio de sustrato es uno de los criterios que definen al género *Micromonospora*, pero el crecimiento del micelio y la morfología de las esporas tienen poco valor diagnóstico para las especies. Es muy raro encontrar esporas en parejas que aparezcan de forma longitudinal y más raro aún que aparezcan de forma múltiple y longitudinal (Luedemann y Casmer, 1973).

Algunas especies producen pigmentos, sin embargo, éstos también carecen de valor diagnóstico a la hora de reconocer especies. Hay dos pigmentos de micelio característicos conocidos como indicadores de pH, el pigmento marrón-morado de *Micromonospora echinospora* y el pigmento azul-verdoso de *Micromonospora coerulea* (Kawamoto, 1989).

Las fuentes de carbono utilizadas por la mayoría de las especies son glucosa, maltosa, sacarosa y almidón. Algunas especies son capaces de utilizar también D-xilosa, celobiosa, D-manosa y trehalosa, y no crecen o se obtiene un escaso crecimiento, si se cultivan en dulcitol, sorbitol, L-sorbosa o melecitosa. Otra característica útil a la hora de clasificar las bacterias pertenecientes al género *Micromonospora*, es que poseen pared celular de tipo II. Además, el peptidoglicano de la pared celular contiene *meso*-DAP, ácido murámico, glicolil, arabinosa, xilosa y glicina; y el porcentaje de G+C del ADN es de 71-73 mol% (Goodfellow *et al.*, 1984).

1.4.1 Clasificación taxonómica

En las listas aprobadas de los nombres de las bacterias del año 1980 (Skerman *et al.*, 1980), el género incluía 12 especies y siete subespecies que posteriormente fueron variando. Durante esa década se añadieron dos especies más, *Micromonospora olivasterospora* (Kawamoto *et al.* 1983) y *Micromonospora rosaria* (Horan y Brodsky, 1986); se reclasificó la especie *Micromonospora brunnea* en *Micromonospora purpureochromogenes* y se combinó *Micromonospora carbonacea*

subsp. carbonacea y *Micromonospora carbonacea subsp. aurantiaca* en *Micromonospora carbonacea* (Szabó y Fernández, 1984).

En los años noventa se incluyó la especie *Micromonospora chersina* (Tomita *et al.*, 1992) y la especie *Catellatospora matsumotoense* se transfirió al género *Micromonospora* como *Micromonospora matsumotoense* (Lee *et al.*, 1999).

A principios de este siglo, Kasai *et al.* (2000) realizaron la reclasificación del género, basándose en los análisis de la secuencia del gen de la girasa B (*gyrB*) y en experimentos de hibridación ADN-ADN. De esta manera, las subespecies *Micromonospora echinospora subsp. pallida* y *Micromonospora halophytica subsp. nigra* se redefinieron como especies, *Micromonospora pallida* y *Micromonospora nigra* respectivamente. Las especies *Micromonospora echinospora subsp. ferruginea*, *Micromonospora rhodorangea* y *Micromonospora purpurea* quedaron dentro de la especie *Micromonospora echinospora*.

En el año 2004 se describieron las especies *Micromonospora endolithica* (Hirsch *et al.*, 2004) y *Micromonospora aurantionigra* que fue renombrada en su validación como *Micromonospora auratinigra* (Thawai *et al.*, 2004). Durante el año 2005, se describieron diez especies más, *Micromonospora mirobrigensis* (Trujillo *et al.*, 2005), *Micromonospora citrea*, *Micromonospora echinaurantiaca*, *Micromonospora echinofusca*, *Micromonospora fulviviridis*, *Micromonospora inyonensis*, *Micromonospora peucetia*, *Micromonospora sagamiensis* *Micromonospora viridifaciens* (Kroppenstedt *et al.*, 2005) y *Micromonospora eburnea* (Thawai *et al.*, 2005). Durante el año 2006 otras dos nuevas especies se incorporaron al género, *Micromonospora siamensis* (Thawai *et al.*, 2006) y *Micromonospora coriariae* (Trujillo *et al.*, 2006).

En el año 2007 se aislaron a partir de suelo arenoso las especies *Micromonospora chokoriensis* y *Micromonospora coxensis* (Ara y Kudo, 2007), de pantano *Micromonospora narathiwatensis* (Thawai *et al.*, 2007) y de nódulos de la planta *Lupinus*, *Micromonospora lupini* y *Micromonospora saelicesensis* (Trujillo *et al.*, 2007). En el año 2008 se han publicado hasta el momento cuatro nuevas especies: *Micromonospora rifamycinica* (Huang *et al.*, 2008), *Micromonospora chaiyaphumensis*, *Micromonospora krabiensis* (Jongrungruangchok *et al.*, 2008) y *Micromonospora pattaloongensis* (Thawai *et al.*, 2008). De esta manera, en la actualidad se conocen 37 especies del género *Micromonospora* (Tabla 4).

Tabla 4. Especies del género *Micromonospora* descritas actualmente con sus códigos de acceso y sus fuentes de origen.

ESPECIE		ORIGEN	AUTOR Y AÑO
<i>Micromonospora aurantiaca</i>	DSM 43813 ^T	Suelo	Sveshnikova <i>et al.</i> , 1969
<i>Micromonospora auratinigra</i>	DSM 44815 ^T	Suelo	Thawai <i>et al.</i> , 2004
<i>Micromonospora carbonacea</i>	DSM 43168 ^T	Suelo	Luedemann y Brodsky, 1965
<i>Micromonospora chaiyaphumensis</i>	JCM 12873 ^T	Suelo	Jongrungruangchok <i>et al.</i> , 2008
<i>Micromonospora chalcea</i>	DSM 43026 ^T	Suelo, aire y medios acuáticos	(Foulerton 1905) Ørskov 1923
<i>Micromonospora chersina</i>	DSM 44151 ^T	Suelo	Tomita <i>et al.</i> , 1992
<i>Micromonospora chokoriensis</i>	MTCC 8535 ^T	Suelo arenoso	Ara y Kudo, 2007
<i>Micromonospora citrea</i>	DSM 43903 ^T	Fango de lago	Kroppenstedt <i>et al.</i> , 2005
<i>Micromonospora coerulea</i>	DSM 43143 ^T	Suelo	Jensen, 1932
<i>Micromonospora coriariae</i>	DSM 44875 ^T	Nódulos de <i>Coriaria sp.</i>	Trujillo <i>et al.</i> , 2006
<i>Micromonospora coxensis</i>	MTCC 8093 ^T	Suelo arenoso	Ara y Kudo, 2007
<i>Micromonospora eburnea</i>	DSM 44814 ^T	Suelo	Thawai <i>et al.</i> , 2005
<i>Micromonospora echinaurantiaca</i>	DSM 43904 ^T	Suelo	Kroppenstedt <i>et al.</i> , 2005
<i>Micromonospora echinofusca</i>	DSM 43913 ^T	Excremento de chukar	Kroppenstedt <i>et al.</i> , 2005
<i>Micromonospora echinospora</i>	DSM 43816 ^T	Suelo	Luedemann y Brodsky, 1964 emend. Kasai <i>et al.</i> , 2000
<i>Micromonospora endolithica</i>	DSM 44398 ^T	Arenisca de terraza	Hirsch <i>et al.</i> , 2004
<i>Micromonospora fulviviridis</i>	DSM 43906 ^T	Suelo	Kroppenstedt <i>et al.</i> , 2005
<i>Micromonospora halophytica</i>	DSM 43171 ^T	Charca salina	Weinstein <i>et al.</i> , 1968
<i>Micromonospora inositola</i>	DSM 43819 ^T	Suelo forestal	Kawamoto <i>et al.</i> , 1974

Tabla 4. Continuación

ESPECIE		ORIGEN	AÑO Y AUTOR
<i>Micromonospora inyonensis</i>	DSM 46123 ^T	Suelo	Kroppenstedt <i>et al.</i> , 2005
<i>Micromonospora krabiensis</i>	JCM 12869 ^T	Suelo	Jongrungruangchok <i>et al.</i> , 2008
<i>Micromonospora lupini</i>	DSM 44874 ^T	Nódulos de <i>Lupinus angustifolius</i>	Trujillo <i>et al.</i> , 2007
<i>Micromonospora matsumotoense</i>	IMSNU 220013 ^T	Suelo forestal	(Asano <i>et al.</i> 1989) Lee <i>et al.</i> , 1999
<i>Micromonospora mirobrigensis</i>	DSM 44830 ^T	Agua	Trujillo <i>et al.</i> , 2005
<i>Micromonospora narathiwatensis</i>	JCM 12394 ^T	Turba de suelo pantanoso	Thawai <i>et al.</i> , 2007
<i>Micromonospora nigra</i>	DSM 43818 ^T	Charca salina	(Weinstein <i>et al.</i> , 1968) Kasai <i>et al.</i> 2000
<i>Micromonospora olivasterospora</i>	DSM 43868 ^T	Arrozal	Kawamoto <i>et al.</i> , 1983
<i>Micromonospora pallida</i>	DSM 43817 ^T	Suelo	(Luedemann y Brodsky 1964) Kasai <i>et al.</i> , 2000
<i>Micromonospora pattaloongensis</i>	DSM 12833	Bosque de manglar	Thawai <i>et al.</i> , 2008
<i>Micromonospora peucetia</i>	DSM 43363 ^T	Suelo	Kroppenstedt <i>et al.</i> 2005
<i>Micromonospora purpureochromogenes</i>	DSM 43821 ^T	Suelo	(Waksman y Curtis, 1916) Luedemann, 1971a
<i>Micromonospora rifamycinica</i>	DSM 44983 ^T	Sedimento de manglar	Huang <i>et al.</i> , 2008
<i>Micromonospora rosaria</i>	DSM 803 ^T	-	Horan y Brodsky, 1986
<i>Micromonospora saelicesensis</i>	DSM 44871 ^T	Nódulos de <i>Lupinus angustifolius</i>	Trujillo <i>et al.</i> , 2007
<i>Micromonospora sagamiensis</i>	DSM 43912 ^T	Suelo	Kroppenstedt <i>et al.</i> , 2005
<i>Micromonospora siamensis</i>	TT2-4 ^T	Turba de bosque pantanoso	Thawai <i>et al.</i> , 2006
<i>Micromonospora viridifaciens</i>	DSM 43909 ^T	Suelo	Kroppenstedt <i>et al.</i> , 2005

1.4.2. Hábitat

Hasta hace poco el género *Micromonospora* se aislaba principalmente de lugares como el suelo, pero cada vez más se encuentran nuevas especies de muy diversos y variados hábitats. Jensen (1932) fue el primero que las describió en suelos de Australia y posteriormente Kriss (1939) en suelos rusos. A partir de 16 muestras de suelo en las que se consiguieron 5000 aislados, solo el 2.5% de la microbiota pertenecían al género *Micromonospora* (Lechevalier, 1964).

Sin embargo, son los ambientes acuáticos como lagos, lodos y sedimentos fluviales, donde hoy en día se aíslan con mas frecuencia (Leiva *et al.*, 2004, Thawai *et al.*, 2005). Del total de actinobacterias encontradas en arrozales del Japón, el 14% correspondían al género *Micromonospora* (Ishizawa *et al.* 1969). Además se han descrito aislados a partir de muestras de roca arenisca de la antártida (Hirsch *et al.*, 2004).

Cepas de este género se han aislado también de ambientes marinos, como arenas de playa (Watson y Williams, 1974, Zhao *et al.*, 2004), sedimentos de las profundidades marinas (Weyland, 1969), sedimentos del Mar Blanco y el Mar Negro (Solovieva, 1972; Solovieva y Singal, 1972) y recientemente de esponjas marinas (Zhang *et al.*, 2006). Se ha reportado cepas de *Micromonospora* a partir de charcas cercanas a minas de Uranio (Trujillo *et al.*, 2005).

1.5 INTERACCIÓN PLANTA-MICROORGANISMO

En el suelo conviven una gran cantidad de microorganismos como bacterias, hongos, protozoos y algas, que interactúan con las plantas, gracias a la transformación de la materia orgánica y a los compuestos minerales que sintetizan. De los grupos microbianos presentes en el suelo, las bacterias son las más abundantes, posiblemente porque crecen más rápido y porque pueden utilizar una gran variedad de compuestos como fuentes de carbono y de nitrógeno (Paul y Clark, 1989).

En 1904, Hiltner definió la rizosfera como aquella porción del suelo en torno a la raíz que tiene una elevada actividad microbiana, dada la concentración de nutrientes existentes en esta zona. Los microorganismos se localizan en la superficie de las partículas del suelo, donde pueden interactuar con la rizosfera de

las plantas en la que encuentran un ambiente favorable para su desarrollo. De hecho, la concentración de microorganismos en torno a las raíces es mucho mayor que en el resto del suelo (Lynch, 1990).

El entorno rizosférico viene determinado por la triple interacción suelo, planta y microorganismos, lo que definió Lynch (1990) como la trilogía del suelo. La planta durante su desarrollo va a influir en la microbiota edáfica ya que le proporciona nutrientes orgánicos y factores de crecimiento requeridos y además, mantiene condiciones relativamente constantes de pH y presión osmótica en el suelo, donde la presencia de nutrientes y agua puede variar enormemente. Los microorganismos a su vez, incrementan el reciclaje y la solubilización de nutrientes minerales, sintetizan vitaminas, aminoácidos, auxinas, citoquininas y giberelinas que estimulan el crecimiento de la planta (Grayston *et al.*, 1996).

La colonización de las raíces es el primer paso de la interacción planta-microorganismo, la cual depende de la capacidad que tengan las bacterias para establecerse en la rizosfera. Puesto que la microbiota está íntimamente relacionada con el sistema radicular, la interacción entre bacterias y raíces puede ser beneficiosa, perjudicial o neutra y en ocasiones varía según las condiciones del suelo (Azevedo, 2000). Por ejemplo, una bacteria fijadora de nitrógeno resulta beneficiosa en condiciones de escasa disponibilidad de este elemento, pero no en suelos abonados (Simons *et al.*, 1996).

Las bacterias que favorecen el crecimiento de las plantas se pueden clasificar en dos tipos: aquellas que se encuentran presentes en forma de vida libre y las que establecen simbiosis con determinadas especies de plantas (Frommel *et al.*, 1991).

A las bacterias beneficiosas de vida libre se las denomina PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper *et al.*, 1989; Kloepper, 1993) o YIB (Yield Increasing Bacteria) (Tang, 1994). Las PGPR influyen de forma directa en el crecimiento de la planta, a través de la síntesis de distintos compuestos o indirectamente, evitando o previniendo el ataque de organismos patógenos. Los mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal por parte de estas bacterias son la movilización de nutrientes (Zhoinska *et al.*, 1992), producción de fitohormonas (Bothe *et al.*, 1992), formación de sideróforos (Leong, 1986) y, producción de antibióticos y antimicóticos (Haas *et al.*, 1992).

1.5.1 Los microorganismos endofitos y su papel ecológico en la naturaleza

El término endofito hace referencia a los microorganismos que desarrollan toda o parte de su ciclo vital en los tejidos internos de la planta sin causar daño aparente. Los endofitos se introducen en la planta principalmente a través de la raíz al comienzo de la germinación o a través de las raíces secundarias. Existe una elevada biodiversidad entre los endofitos de plantas la cual depende de la especie, el género, el tipo de tejido y la etapa de desarrollo en la que se encuentra la planta, así como de la influencia que ejercen los factores ecológicos (Conn y Franco, 2004).

Los microorganismos endofitos que residen en los tejidos de las plantas vivas, han sido poco explorados como fuentes de productos naturales con aplicaciones para la medicina, agricultura e industria. De las casi 300.000 especies que habitan en la tierra y que albergan como mínimo un endofito por planta, sólo unas pocas especies han sido completamente estudiadas. Por lo tanto es muy alta la posibilidad de encontrar nuevas especies de microorganismos en un conjunto de plantas y ecosistemas que hasta el momento no se han explorado (Strobel y Daisy, 2003).

La asociación simbiótica producida entre la planta y la bacteria tiene gran importancia ecológica, pues la planta resulta favorecida de su interacción con los microorganismos de forma evidente en su salud y/o en su crecimiento. Bacterias endofitas de algunas plantas han mostrado ser beneficiosas en el control de infecciones fúngicas en cultivos de algodón (Chen *et al.*, 1995), guisante (Benhamou *et al.*, 1996), patatas (Sturz *et al.*, 1999) y trigo (Coombs *et al.*, 2003a). Además, estas bacterias pueden aumentar la fijación de nitrógeno en plantaciones de arroz y acelerar la germinación de semillas y el crecimiento de plantas (Nejad y Johnson, 2000).

Las relaciones endosimbióticas más estudiadas corresponden a los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium* con las fabáceas y a la actinobacteria *Frankia* con angiospermas no leguminosas. Estos microorganismos son capaces de fijar nitrógeno atmosférico, mediante la formación de nódulos en las raíces de las plantas con las que interaccionan. Otra simbiosis sumamente particular, es la que se establece entre rizobios y las plantas del género *Parasponia* (Familia *Ulmaceae*), esta relación es la única conocida entre un rizobio y una planta no leguminosa (Webster *et al.*, 1995).

Con relación al desarrollo del nódulo y la fijación de nitrógeno, se sabe que es un proceso complejo que requiere de señales entre la bacteria y las células de la planta. Los polisacáridos superficiales de *Rhizobium*, están implicados en el establecimiento de la simbiosis con distintas leguminosas (Leigh y Coplin, 1992), además están encargados de proteger al rizobio al suprimir los mecanismos de defensa de la planta. Por parte de la planta, se liberan algunos compuestos fenólicos conocidos como flavonoides, que atraen a los rizobios y activan a los genes de la nodulación (Dharmatilake y Bauer, 1992).

En los últimos años se han descrito actinobacterias endofitas pertenecientes a diversos géneros como *Streptomyces*, *Streptosporangium* o *Microbispora*, aislados de plantas sanas (Sardi *et al.*, 1992; Tokala *et al.*, 2002; Coombs y Franco, 2003b) y se ha sugerido que esta endobiota posee una actividad antimicrobiana muy importante (Taechowisan *et al.*, 2003).

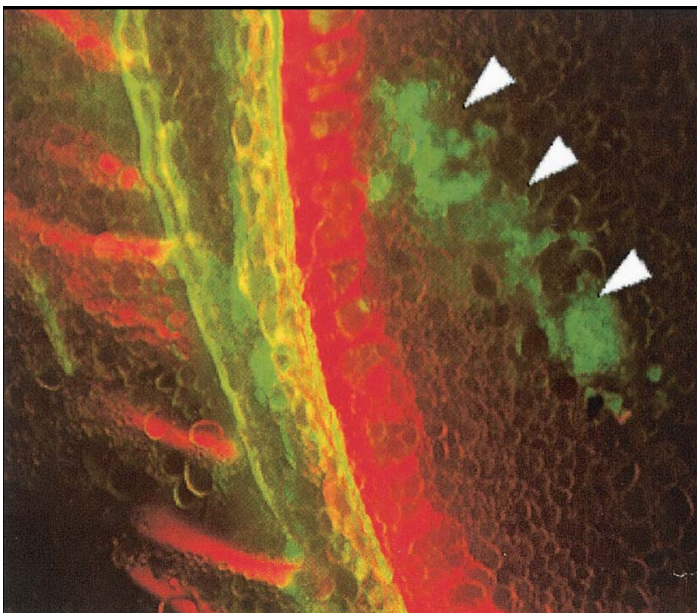


Figura 7. Microcolonias de *Streptomyces* en tejido de trigo, marcadas con GFP e indicadas en las flechas (Coombs y Franco, 2003a).

Sardi *et al.* (1992), trabajando con 28 especies de plantas diferentes, aislaron cepas del género *Streptomyces* como endofitas de raíces y visualizaron por microscopía electrónica las hifas dentro del tejido cortical, sugiriendo que estas bacterias promueven la protección natural a la planta.

En el estudio realizado por Coombs y Franco (2003a) aislaron actinobacterias filamentosas endofitas de raíces de trigo y lograron su visualización sobre el tejido radical, mediante el marcaje con proteína verde fluorescente (GFP) (Figura 7).

Otros trabajos han evaluado los efectos beneficiosos de la interacción *Streptomyces-Rhizobium* en la leguminosa *Pisum sativum* (Tokala *et al.*, 2002). Al coinocular *Streptomyces* y *Rhizobium* se produjo una mejora tanto en crecimiento como en la salud de las plantas, en comparación con las plantas control en las que

sólo se inoculó *Rhizobium*. Se observó un aumento en el tamaño medio de los nódulos, la frecuencia de nodulación y el vigor y número de bacteroides de *Rhizobium* en su interior, así mismo, se incrementó la asimilación de hierro y de otros nutrientes del suelo. De este modo, mediante la colonización de las raíces y los nódulos *Streptomyces* puede actuar como una bacteria promotora del crecimiento en plantas (Tokala *et al.*, 2002).

A partir de raíces de trigo (*Triticum aestivum*) se han descrito cepas estrechamente relacionadas con la especie "*Micromonospora yulongensis*" (Coombs y Franco, 2003b). La presencia de estos microorganismos que conviven en el interior de las plantas le confieren ciertas ventajas, ya que se ha encontrado que algunas cepas de *Micromonospora* pueden actuar contra hongos patógenos como *Pythium* y *Phytophthora* spp. Así mismo, se ha evaluado la resistencia que generan a las plantas contra el hongo *Fusarium oxysporum* (Conn y Franco, 2004; Conn *et al.*, 2008).

Otros estudios describen el hallazgo de estas bacterias a partir de nódulos de diversas plantas. Los datos aportados por Valdés *et al.* (2005) sobre la capacidad de fijación de nitrógeno en vida libre de una cepa aislada de nódulos de *Casuarina equisetifolia* y relacionada con *Micromonospora auratinigra*, sugieren la posibilidad de que un grupo muy selecto de actinobacterias, además de *Frankia*, sean capaces de fijar nitrógeno en interacción con plantas. Además, a partir de nódulos de la planta *Coriaria myrtifolia* se ha descrito recientemente la especie *Micromonospora coriariae* (Trujillo *et al.*, 2006).

Por otra parte, se ha comprobado que durante los trabajos de aislamiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* a partir de nódulos de leguminosas, aparecían colonias que presentaban una morfología típica del género *Micromonospora*. En el trabajo realizado por Fernández (2005), se obtuvieron 15 aislados caracterizados genotípicamente y fenotípicamente como *Micromonospora* spp., a partir de la planta *Lupinus angustifolius* recogidas de la localidad de Saelices (Salamanca). Además, el análisis del gen ribosómico 16S, sugirió que los microorganismos podrían constituir 3 nuevas especies del género *Micromonospora*. De los aislados de la planta *Lupinus angustifolius* se han descrito las especies *Micromonospora lupini* y *Micromonospora saelicesensis* (Trujillo *et al.*, 2007).

De igual manera, en el informe de trabajo de grado presentado por Carro (2007), se describe que por primera vez se realiza el aislamiento de cepas de *Micromonospora* a partir de nódulos de plantas de guisante (*Pisum sativum*) y que la mayoría de los 17 aislados a los que se les analizó el gen ribosómico 16S podrían representar nuevas especies.

La presencia de estas bacterias en nódulos de leguminosas, lleva a plantearnos la posibilidad de que bacterias del género *Micromonospora* aporten un efecto beneficioso a la planta de varias maneras: bien sea mediante la producción de metabolitos secundarios con actividad protectora frente a patógenos, como fijadores de nitrógeno o como promotores del crecimiento vegetal. Son éstas razones por las que es de gran interés abordar el trabajo en este tema.

1.6 MÉTODOS MOLECULARES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA

Se ha descrito que el 99% de la microbiota que se encuentra dispersa en la naturaleza es difícil de estudiar, debido en parte a la complejidad del hábitat y a los problemas que se presentan cuando se quieren obtener cultivos puros. En algunos casos se conoce parcialmente sus requerimientos metabólicos y en otros, se trata de microorganismos que requieren períodos de incubación prolongados. Sin embargo, en los últimos años se han descrito técnicas moleculares aplicadas a la ecología microbiana, las cuales han facilitado la identificación y clasificación de microorganismos que incluso se encuentran como saprofitos, comensales, simbioses, o endofitos de las plantas (Rademaker *et al.*, 2005).

Una vez se tiene suficiente información acerca de las características de un grupo microbiano, se puede proceder a identificarlo dentro de un taxón determinado. Existen básicamente dos maneras de construir un sistema de clasificación de los microorganismos. Uno de ellos consiste en agruparlos en función de sus características fenotípicas para construir un sistema fenético y el otro los agrupa con base en sus relaciones evolutivas, formando un sistema filogenético. El análisis de los datos obtenidos de la clasificación fenotípica, es conocido como taxonomía numérica y se define como la agrupación mediante métodos numéricos de unidades taxonómicas en taxones, sobre la base de sus rasgos característicos (Sneath y Sokal, 1973).

Desde la aparición en 1859 de "El origen de las especies" de Darwin, se comenzaron a desarrollar sistemas de clasificación filogenéticos o filéticos. En un principio este sistema resultó de difícil aplicación para bacterias y otros microorganismos, debido principalmente a la falta de un buen registro fósil. Sin embargo, en los últimos años la creación y desarrollo de metodologías basadas en el ADN, ha superado estos problemas y han permitido la detección, identificación y tipificación de los microorganismos (Rademaker *et al.*, 2005).

Colwell (1970) definió la "taxonomía polifásica" como el método taxonómico que recoge e integra diversos niveles de información, desde moleculares a ecológicos, para crear una taxonomía multidimensional. En la actualidad, la taxonomía polifásica hace referencia a un tipo de taxonomía consenso que apunta a la utilización de todos los datos posibles, genotípicos, fenotípicos y filogenéticos para la elaboración de grupos taxonómicos (Vandamme *et al.*, 1996).

La utilización de técnicas moleculares para la identificación taxonómica se aplica por la necesidad de establecer un sistema de identificación de nuevos microorganismos que complemente la identificación morfológica y química. El desarrollo de diferentes técnicas moleculares y la acumulación de información sobre la secuencia de varios genes de referencia, especialmente del gen ARNr 16S (Larsen *et al.*, 1993), han impulsado el diseño de una amplia variedad de métodos que se pueden aplicar al estudio de los microorganismos.

1.6.1 Filogenia derivada del empleo del gen ribosómico 16S

La identificación inequívoca de los microorganismos a nivel de especie, requiere necesariamente la utilización de técnicas de secuenciación de regiones de valor taxonómico como es el gen ARNr 16S. Los genes que codifican para el ARN ribosómico se encuentran en todos los organismos y están lo suficientemente conservados, lo cual permite su empleo en el estudio de las relaciones evolutivas (Barry *et al.*, 1991; Cedergren *et al.*, 1988; Jensen *et al.*, 1993).

En los procariotas, el operón ribosómico contiene los genes que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 16S y 23S. Tanto el ADN ribosómico 5S y 23S pueden ser utilizados para establecer relaciones filogenéticas, pero el tamaño pequeño del primero, unos 120 nucleótidos, limita la información que puede

obtenerse de él y la gran longitud del segundo, unos 3000 pares de bases, hace que resulte de difícil manejo.

Así, el más usado es el gen ribosómico 16S (Olsen *et al.*, 1986; Woese *et al.*, 1984; Woese, 1987) de aproximadamente 1500 nucleótidos, que además de tener regiones conservadas que permiten el estudio de las relaciones entre taxones distantes, contiene regiones muy variables que se utilizan en la diferenciación de géneros y especies (Ludwig y Schleifer, 1994; Roselló-Mora y Amann, 2000; Stackebrandt *et al.*, 2002).

Estos genes están separados por dos regiones intergénicas, ITS1, entre el gen ribosómico 16S y el 23S, e ITS2, entre el gen ribosómico 23S y el 5S. Ambas regiones muestran una gran variabilidad y pueden ser utilizadas para caracterizar grupos taxonómicos a nivel intraespecífico (Barry *et al.*, 1991; Guasp *et al.*, 2000; Gürtler y Stainisich, 1996; Lebuhn *et al.*, 2006; Riffard *et al.*, 1998).

El análisis filogenético del gen ARNr 16S, tiene cada vez mayor importancia en taxonomía. Así lo demuestran Stackebrandt *et al.* (1997) quienes basándose en relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S, propusieron una nueva clasificación para las actinobacterias hasta llegar a una nueva jerarquía, la clase *Actinobacteria*. Para que una cepa pueda pertenecer a esta nueva clase, debe mostrar valores de similitud de la secuencia del gen ARNr 16S, superiores al 80%. Esto deriva del sistema de clasificación, y por lo tanto se determina por los organismos que están presentes en cada grupo.

Además del gen ARNr 16S, se han propuesto otros genes con funciones conservadas, para establecer relaciones filogenéticas entre diferentes grupos de bacterias y validar las filogenias construidas con el gen ARNr 16S. (Feil *et al.*, 2004; Hanage *et al.*, 2005). Dentro de los genes que actualmente se utilizan están los genes *rpoB* (Mollet *et al.*, 1997) que codifican para la subunidad β de la ARN polimerasa y los genes *recA* encargados de la reparación del ADN (Lloyd y Sharp, 1993). El gen *gyrB* que codifica para la proteína girasa, se ha utilizado en la identificación de géneros como *Micromonospora* (Kasai *et al.*, 2000), *Acinetobacter* (Yamamoto *et al.*, 1999), o *Streptomyces* (Hatano *et al.*, 2003).

1.6.2 Métodos moleculares para la tipificación de microorganismos

Se han desarrollado una serie de técnicas basadas en la PCR, las cuales mediante la generación de perfiles de ADN permiten agrupar, a la vez que establecen diferencias entre dos cepas cercanamente relacionadas (Rademaker *et al.*, 2005).

Los perfiles moleculares se obtienen por técnicas como la rep-PCR, la cual amplifica regiones que aparecen repetidas a lo largo del genoma bacteriano (repetitive PCR), (Versalovic *et al.*, 1991). Dentro de esta técnica se encuentra BOX-PCR, que son elementos de 154 pares de bases repetidas en el genoma bacteriano. Con esta técnica se puso de manifiesto por primera vez elementos repetidos en un organismo Gram positivo. En principio se describieron tres subunidades diferentes para elementos de BOX, boxA (59 bp), boxB (45 bp) y box C (50 bp) (Martin *et al.*, 1992), aunque se encontró que solo el boxA aparecía altamente conservado en bacterias (Versalovic *et al.*, 1994).

Los patrones electroforéticos obtenidos mediante BOX-PCR reflejan una estructura genómica específica para cada cepa, de modo que los patrones se pueden comparar para estimar grados de similitud entre distintas cepas y ayudan a diferenciar las cepas aisladas que puedan ser clones (Versalovic *et al.*, 1994). La técnica de BOX-PCR se ha utilizado en el estudio de la población de actinobacterias endofitas de la planta *Paeonia lactiflora* (Gu *et al.*, 2006), en la descripción de nuevas especies de *Nocardia* y *Streptomyces* (Lee *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2004, Lanoot *et al.*, 2004); así mismo, ha sido útil en la agrupación de cepas de *Micromonospora* aisladas de diversos sedimentos acuáticos (Maldonado *et al.*, 2008).

Otra técnicas utilizadas como huellas moleculares son los perfiles de RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990), AP-PCR (Arbitrary Primed-PCR) (Welsh y McClelland, 1990) y DAF (DNA Amplified Fingerprinting) (Bassam *et al.*, 1992; Caetano-Anolles *et al.*, 1991), los cuales se basan en la amplificación del genoma partiendo cada una de ellas de oligonucleótidos de distinta longitud. Los patrones obtenidos permiten diferenciar entre cepas de una misma especie (Simons, 1996).

Los perfiles de TP-RAPD (Two Primers-RAPD) o de 879F-RAPD, constituyen una técnica en la que a diferencia de los RAPD convencionales, se realiza una

amplificación a partir de dos oligonucleótidos complementarios de regiones altamente conservadas del ADN ribosómico 16S (Iguar *et al.*, 2003; Rivas *et al.*, 2001; Rivas *et al.*, 2002a). Los TP-RAPD se han utilizado para analizar la diversidad de bacterias endofitas del parénquima medular de la caña de azúcar, con el que se logró que las cepas aisladas se agruparan en 17 grupos entre los que se encontraron actinobacterias de los géneros *Microbacterium*, *Micrococcus* y *Kocuria* (Velázquez *et al.*, 2008). De igual manera los TP-RAPD han sido útiles en la obtención de perfiles del género *Micromonospora* aisladas de nódulos de leguminosas (Fernández, 2005).

Además de estas técnicas, existen otras como los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Laguerre *et al.*, 1994) que combinan la PCR con el uso de enzimas de restricción. Esta técnica se ha utilizado con propósitos taxonómicos para agrupar e identificar distintas actinobacterias presentes en esponjas marinas. El análisis filogenético basado en el gen ARNr 16S mostró que los aislados pertenecían a los géneros *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Micromonospora* y *Verrucosipora* (Zhang *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007). Además, los RFLP se han empleado para estudiar la diversidad de especies de *Micromonospora* y *Streptomyces* aisladas de sedimentos (Zhao *et al.*, 2004).

Si se emplean enzimas que digieren el ADN total y sobre los fragmentos obtenidos se realiza una PCR, la técnica se denomina AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphic) (Lin y Kuo, 1995; Mougél *et al.*, 2002). En el proceso de amplificación se obtienen un gran número de fragmentos, algunos de los cuales son específicos de grupo y otros de cepas.

La técnica denominada micro/minisatélites (MSP-PCR), se basa en la amplificación de regiones de ADN repetidas y adyacentes denominadas microsátélites (repeticiones de 2 - 10 nucleótidos) o minisátélites (de 15 - 30 nucleótidos), las que se encuentran típicamente distribuidas a lo largo del genoma de los organismos eucariotas (Tautz, 1989) y procariotas (Zane *et al.*, 2002). Numerosos trabajos han demostrado la utilidad de la MSP-PCR para estudios de diversidad genética de diferentes géneros y especies. Fueron inicialmente descritos para estudiar enfermedades en humanos (Epplen *et al.*, 1997) y se han utilizado como marcadores en estudios de plantas (Rossetto *et al.*, 1999) y de microorganismos (Schwarzenbach, 2007). Los microsátélites tienen la particularidad de que el número de repeticiones de los motivos básicos que la conforma es muy variable y puede diferir de un individuo a otro, lo cual los constituye en una excelente herramienta cuando se quiere caracterizar cepas que representan la misma especie (Zane *et al.*, 2002).

2. OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo propuesto en este capítulo es el aislamiento y análisis taxonómico de cepas de *Micromonospora* a partir de nódulos de la leguminosa *Lupinus angustifolius* recolectada de la región de Extremadura.

Objetivos específicos

- ✓ Aislar poblaciones de *Micromonospora* a partir de la planta *Lupinus angustifolius* recolectada de la localidad de Extremadura, empleando el medio de cultivo YMA.
- ✓ Realizar la caracterización genotípica y fenotípica de las cepas de *Micromonospora* que sean aisladas.
- ✓ Secuenciar el gen ARNr 16S de algunas cepas seleccionadas con el fin de realizar su identificación al nivel de género, teniendo en cuenta las secuencias depositadas en las bases de datos.
- ✓ Mediante la elaboración de árboles filogenéticos, evaluar la relación que existe entre las cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos y las especies de *Micromonospora* validadas hasta el momento.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS A PARTIR DE NÓDULOS

3.1.1 Recolección de plantas



Las plantas de *Lupinus angustifolius*, a partir de las cuales se llevó a cabo el aislamiento de cepas con características del género *Micromonospora*, fueron recolectadas de suelos de la ciudad de Plasencia, ubicada en el norte de la provincia de Cáceres, a orillas del río Jerte, en la comunidad Autónoma de Extremadura (España).

3.1.2 Análisis de las muestras de suelo

Las muestras de suelo se analizaron en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Agrarias y Ambientales de la Universidad de Salamanca. Inicialmente el suelo fue secado y triturado hasta alcanzar un tamaño de partícula de 2 mm. El pH se midió en un potenciómetro (CRISON, modelo micropH 2001) preparando una suspensión de agua-suelo (1:1 p/v). La materia orgánica del suelo se determinó por el método de oxidación del dicromato de potasio, descrito por Walkley (1947), y el nitrógeno orgánico se analizó por el método de Kjeldahl (Bremner y Malvaney, 1982).

Para determinar la concentración de calcio, magnesio y potasio disponible, se hizo la extracción con acetato de amonio 1 M y los análisis se realizaron en un espectrofotómetro de emisión de plasma (ICP-OES modelo Jovin Yvon Ultima-2). La concentración de fósforo asimilable se midió por el método de Bray II, modificado por Bray y Kurtz (1945).

3.1.3 Aislamiento de cepas de *Micromonospora*

Con el fin de realizar el aislamiento de las bacterias presente en los nódulos, las diversas plantas de *Lupinus angustifolius* fueron procesadas en el laboratorio empleando el método de Vincent (1970):

- i. Las raíces se lavaron en agua destilada y los nódulos se cortaron realizando previamente el recuento en cada planta.
- ii. La superficie de los nódulos se esterilizó utilizando una solución de cloruro de mercurio (HgCl₂) al 2.5% durante dos minutos. Para eliminar los residuos de HgCl₂, los nódulos se lavaron cinco veces en agua destilada estéril.
- iii. Cada nódulo estéril, fue triturado con una varilla de vidrio añadiendo unas gotas de agua destilada estéril para facilitar la maceración del tejido. Se dejaron nódulos esterilizados sin triturar, los cuales servían como control de la esterilización.
- iv. El triturado se sembró en el medio de cultivo agar extracto de levadura manitol (YMA). Las placas se incubaron a 28°C durante 3 semanas.

Pasado el tiempo de incubación, se seleccionaron aquellas colonias que por su morfología podrían ser identificadas como actinobacterias. Con el fin de obtener cultivos puros, las colonias se sembraron en placas de medio SA1 y M-65 (ver anexo 1) y se incubaron a 28°C en un periodo de dos a tres semanas.

3.1.4 Condiciones de crecimiento y morfología de las colonias

Para determinar las condiciones óptimas de crecimiento y observar las características morfológicas de las colonias que incluían el color, borde, relieve, producción de micelio y de pigmentos difundibles, los microorganismos fueron cultivados en los siguientes medios de cultivo: YMA, avena, SA1, M65 y N-Z Amine (anexo 1). Los datos se recogieron a los 7, 14 y 21 días.

El análisis morfológico de las colonias se llevó a cabo mediante la observación en el microscopio estereoscópico. El empleo de la coloración de Gram permitió una primera caracterización de las cepas aisladas que fueron observadas en el microscopio óptico con objetivo 100X (Leica CTR Mic).

3.1.5 Mantenimiento y conservación de la microbiota aislada

El medio de cultivo SA1 se utilizó para el desarrollo y mantenimiento de los microorganismos. Las resiembras de las cepas bacterianas se realizaron en el mismo medio y se guardaban a 4°C. Los distintos nódulos así como las cepas aisladas fueron conservadas en congelación a -80°C, utilizando como agente crioprotector glicerol al 20%.

3.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

3.2.1 Obtención de células y extracción de ADN

Los microorganismos se cultivaron en la mayoría de los casos en el medio SA1 o en el medio en que los cultivos presentaron mejor crecimiento y se incubaron durante 96 h a 28°C. Pasado este tiempo, se recogió en tubos Eppendorf una cantidad aproximada de 0.1 g de células, posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5417C), durante 10 minutos. A continuación se eliminó el sobrenadante y las células obtenidas se guardaron en congelación a -20°C hasta su empleo.

3.2.1.1 Extracción del ADN

Se realizó el protocolo descrito por Sambrook y Russell (2000).

- i. Sobre las células recogidas previamente en tubos Eppendorf, se añadieron 500 µl de sarcosil (0,1%), se centrifugó a 14.000 rpm (Eppendorf centrifuge) durante 5 min y luego se eliminó el sobrenadante.
- ii. Se adicionaron 100 µl de la solución A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA) y 100 µl de la solución B (0,2 M NaOH, 1% SDS), se mezcló con el vortex suavemente y se incubó a 65°C durante 20 min, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- iii. 100 µl de la solución C (3 M acetato potásico, pH 5,5) se añadieron a la mezcla, se agitó suavemente y se centrifugó a 12.500 rpm durante 8 minutos a 4°C. Sin remover el precipitado, se transfirieron 250 µl del sobrenadante clarificado a un Eppendorf nuevo y se desechó el resto.

- iv. Se añadieron 150 μl de agua milliQ y se precipitó con 40 μl de acetato sódico 3 M (pH 7,0) y 310 μl de isopropanol, se centrifugó en frío (4°C) a 12.500 rpm (Eppendorf) durante 20 minutos, luego se eliminó el sobrenadante.
- v. El precipitado se lavó con 300 μl de etanol al 70% (sin resuspender), se centrifugó 5 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante.
- vi. Por último, se dejó secar al aire durante unos minutos y se resuspendió el ADN (pellet) en 20 μl de agua milliQ. El ADN obtenido de cada cepa se mantuvo congelado a -20°C hasta su utilización.

3.2.2 Caracterización de las cepas mediante la técnica de BOX-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se llevó a cabo utilizando un oligonucleótido universal diseñado para amplificar de forma selectiva las distintas regiones genómicas localizadas entre las secuencias de BOX (Bruijn *et al.*, 1996).

La secuencia del oligonucleótido empleado fue:

5' - CTACGGCAAGGCGACGCTGACG - 3'

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μl . La mezcla total y las concentraciones de los reactivos fueron las siguientes:

Reactivos (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR (μl)	Casa comercial
*Tampón (10x)	2.5	Perkin-Elmer
MgCl ₂ (25 mM)	6.0	Perkin-Elmer
dNTPs (10 mM)	0.75	Pharmacia
BSA (0,1% p/v)	1.0	Sigma
Oligonucleótido BOX A1R (20 μM)	2.5	Isogen
Agua milli-Q estéril	9.85	
Taq polimerasa (2 U/ μl)	0.4	Perkin-Elmer
ADN molde (100-150 ng)	2.0	

*El tampón 10X contiene MgCl₂ 15 mM; otros componentes incluyen Tris 100 mM (pH 8.3), KCl₂ 500 mM y gelatina 0.01 (p/v).

La solución anterior se agitó suavemente en un mezclador vortex antes de añadir el ADN molde. La reacción de amplificación del ADN se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), utilizando las siguientes condiciones:

Condiciones		Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Desnaturalización del ADN y activación de la polimerasa		95	9
30 ciclos	Desnaturalización	94	1
	Anillamiento	52	1
	Extensión	72	3
Extensión final		72	10

Los productos amplificados por PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando como tampón TBE 1X (Tris-borato EDTA), pH 8.5 (ver anexo 1) en una cubeta de 15 x 20 cm a 70V durante 3h. Como fuente eléctrica se utilizó Power PAC 300 (Bio Rad).

3.2.3 Agrupación de las cepas por el método de TP-RAPD

La PCR para amplificar regiones del gen ribosómico 16S se realizó con los oligonucleótidos 879F y 1522R. Dichos números corresponden a las posiciones que ocupan en la secuencia numerada del gen ribosómico 16S de *Escherichia coli* (Brosius *et al.*, 1978).

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizadas fueron:

849F: 5' – GCCTGGGGAGTACGGCCGCA – 3'

1522R: 5' - AAGGAGGTGATCCANCCRCA - 3'

Cada reacción se llevo a cabo en un volumen total de 25 μ l. Los componentes de la mezcla fueron los siguientes:

Reactivos (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR (μl)	Casa comercial
*Tampón (10x)	2.5	Perkin-Elmer
MgCl ₂ (25 mM)	5.9	Perkin-Elmer
dNTPs (10 mM cada uno)	0.5	Pharmacia
BSA (0,1% p/v)	1.0	Sigma
Oligonucleótido 849F (20 μ M)	2.5	Isogen
Oligonucleótido 1522R (20 μ M)	2.5	Isogen
Agua milli-Q estéril	7.7	
<i>Taq</i> polimerasa (2 U/ μ l)	0.4	Perkin-Elmer
ADN molde (100-150 ng)	2.0	

*El tampon 10X contiene MgCl₂ 15 mM; otros componentes incluyen Tris 100 mM (pH 8.3), KCl₂ 500 mM y gelatina 0.01 (p/v).

El termociclador utilizado fue el mismo que en el apartado anterior, teniendo en cuenta las siguientes condiciones de amplificación:

Condiciones		Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Desnaturalización del ADN y activación de la polimerasa		95	9
35 ciclos	Desnaturalización	94	1
	Anillamiento	50	1
	Extensión	72	2
Extensión final		72	7

Los productos amplificados por PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, con tampón TAE 1 X (Tris-Acetato EDTA) (Millipore, USA) en una cubeta de 15 x 20 cm a 75 V durante 2 h, usando el marcador de peso molecular XIV (Roche).

3.2.4 Caracterización de las cepas aisladas por el método de Microsatélites

Esta técnica basada en el uso de la PCR, consiste en la amplificación de fragmentos de secuencias simples y repetitivas presentes en el ADN empleando oligonucleótidos específicos (Zane *et al.*, 2002).

La secuencia utilizada fue la siguiente:

M13: 5´ - GAGGGTGGCGGTTCT - 3´.

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl. Las cantidades de los reactivos fueron las siguientes:

Reactivos (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR (µl)	Casa comercial
*Tampón (10x)	2.5	Perkin-Elmer
MgCl ₂ (25 mM)	5.9	Perkin-Elmer
dNTPs (10 mM cada uno)	0.5	Pharmacia
BSA (0,1% p/v)	1.0	Sigma
Oligonucleótido CSM13 (20 µM)	2.5	Isogen
Agua milli-Q estéril	7.7	
Taq polimerasa (2 U/µl)	0.4	Perkin-Elmer
ADN molde (100-150 ng)	2.0	

*El tampón 10X contiene MgCl₂ 15 mM; otros componentes incluyen Tris 100 mM (pH 8.3), KCl₂ 500mM y gelatina 0.01 (p/v).

Las condiciones de amplificación empleadas en el termociclador fueron:

Condiciones		Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Desnaturalización del ADN y activación de la polimerasa		95	9
40 ciclos	Desnaturalización	94	1
	Anillamiento	52	1
	Extensión	72	2
Extensión final		72	7

Los productos amplificados por PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa teniendo en cuenta las mismas condiciones descritas para TP-RAPD.

3.2.5 Análisis de los perfiles moleculares

Las imágenes que se obtuvieron de los perfiles de ADN por las técnicas RFLP, BOX-PCR, TP-RAPD y microsatélites, fueron analizados mediante el programa informático Bionumerics (Applied Math, Kortrijk, Belgium). Se elaboraron dendrogramas aplicando el coeficiente de Pearson y el método de agrupación UPGMA (Unweighted Pair Group Method), los cuales permitieron agrupar y establecer relaciones entre las cepas aisladas.

3.3 SECUENCIACIÓN DEL GEN RIBOSÓMICO 16S

Se amplificó enzimáticamente la secuencia comprendida entre las posiciones 27-1525 del ADN que codifica para el gen ARNr 16S, de algunas cepas seleccionadas que representaban a cada uno de los grupos genómicos obtenidos mediante las técnicas BOX-PCR, microsatélites, TP-RAPD y RFLP. La amplificación se realizó utilizando los oligonucleótidos SF1 y SR5, cuyas secuencias son:

SF1 (27F): 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3'

SR5 (1522R): 5'- AAGGAGGTGWTCCARCC - 3'

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 50 μ l. La mezcla total y las concentraciones de los reactivos fueron las siguientes:

Reactivos (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR (μ l)	Casa comercial
Tampón (10x)	5,0	Perkin-Elmer
MgCl ₂ (25 mM)	4,0	Perkin-Elmer
dNTPs (10 mM cada uno)	1,25	Pharmacia
BSA (0,1% p/v)	2,0	Sigma
Oligonucleótido SF1 (20 μ M)	0,5	Isogen
Oligonucleótido SR5 (20 μ M)	0,5	Isogen
Agua milli-Q estéril	31,95	
<i>Taq</i> polimerasa (2 U/ μ l)	0,8	Perkin-Elmer
ADN molde (100-150 ng)	4,0	

*El tampón 10 X contiene MgCl₂ 15 mM; otros componentes incluyen Tris 100 mM (pH 8.3), KCl₂ 500 mM y gelatina 0.01 (p/v).

La amplificación del gen ARNr 16S se realizó empleando las siguientes condiciones:

Condiciones		Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Desnaturalización del ADN y activación de la polimerasa		95	9
40 ciclos	Desnaturalización	94	1
	Anillamiento	56	1
	Extensión	72	2
Extensión final		72	7

Los productos amplificados por PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando tampón TAE 1 X (Tris-Acetato EDTA) (Millipore, USA) en una cubeta de 15 x 20 cm a 80 V durante 1 h. Como fuente eléctrica se utilizó Power PAC 300 (Bio Rad). Las bandas amplificadas se cortaron y se recogieron en tubos Eppendorf.

3.3.1 Purificación de los productos de PCR

Para la purificación de las bandas obtenidas en la electroforesis, se utilizó el kit comercial QIA-quick (gel extraction kit) de QIAGEN, el protocolo fue el descrito por la marca comercial.

- i. A cada una de las bandas cortadas, se añadió Tampón QG en una proporción 3:1 (3 µl de tampón: 1 mg de agarosa).
- ii. La mezcla se incubó a 50°C hasta disolver la agarosa, agitando cada minuto. Luego la mezcla se pasó a la columna de purificación y se centrifugó a 14.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5417C) durante 1 minuto.
- iii. El líquido del fondo de la columna fue eliminado y se adicionaron 500 µl de tampón QG, centrifugando a 14.000 rpm durante 1 minuto.
- iv. Se eliminó el líquido del fondo de la columna y se añadieron 750 µl de tampón PE, dejando la mezcla en reposo durante 5 minutos y luego se centrifugó a 14.000 rpm durante 1 minuto.

- v. Se descartó el líquido del fondo de la columna y nuevamente se centrifugó 1 minuto a 14.000 rpm. Luego la columna se pasó a un tubo Eppendorf.
- vi. Finalmente se añadieron 50 µl de tampón EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) directamente sobre la membrana, se dejaron 5 minutos de incubación y luego se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos. En el tubo Eppendorf se recogió el volumen final de la solución de tampón EB, con el ADN purificado.

Para determinar la concentración de ADN necesario en los procedimientos de secuenciación, el ADN purificado se cuantificó mediante electroforesis en gel de agarosa (1%) utilizando tampón TAE 1X a 70 V durante 1 h, empleando el marcador de peso molecular pGEM (100 ng/ µl).

3.3.2 Secuenciación de los productos de PCR purificados

Para la secuenciación completa del gen ribosómico 16S, se utilizaron los oligonucleótidos universales SR1, SR2, SR3, SR4 y SR5.

SR1: 5'-CTGCTG SYCCCGTAG-3	(posición 342R de <i>E. coli</i>)
SR2: 5'- GWATTACCGCGGCKGCTG - 3'	(posición 519R de <i>E. coli</i>)
SR3: 5'- CCGTCAATTCMTTTRAGTTT -3'	(posición 907R de <i>E. coli</i>)
SR4: 5'- GGGTTGCGCTCGTTG - 3'	(posición 1100R de <i>E. coli</i>)
SR5: 5'- AAGGAGGTGATCCANCCRCA -3'	(posición 1522R de <i>E. coli</i>)

Cada reacción de PCR de secuenciación contenía 100 ng de ADN y 3 picomoles del oligonucleótido, en un volumen de 8 µl completado si era necesario con agua milli-Q. La secuenciación automática de cada fragmento se llevó a cabo en el secuenciador capilar ABI PRISM (Applied Biosystems) de la Universidad de Salamanca, empleando "Big Dye Terminador v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (Applied Biosystems).

3.3.3 Análisis de los fragmentos secuenciados

Para corregir las secuencias obtenidas en el equipo de secuenciación, se utilizó el programa Chromas (McCarthy, 1998), mientras que el ensamblaje de la secuencia completa del gen se realizó con el programa Seqman II, incluido en el paquete de programas DNA Star (Lasergene).

Las secuencias obtenidas del gen ARNr 16S se compararon a través del programa BLASTn, versión 2.0, que contrasta la secuencia de nucleótidos desconocida, con una base de datos de secuencias de nucleótidos, mostrando un listado de aquellas que presentan mayor similitud (Brenner, 1995). Las secuencias generadas por las cepas en estudio, así como las de las cepas tipo se alinearon utilizando el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997; Jeanmougin *et al.*, 1998).

Finalmente los análisis filogenéticos de las secuencias obtenidas se llevaron a cabo mediante el programa Mega 3.1 (Kumar *et al.*, 2001). Las distancias evolutivas fueron calculadas de acuerdo con el método de Kimura 2-p (Kimura, 1980) y el árbol filogenético se elaboró utilizando el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). La confiabilidad de la predicción fue evaluada mediante 1000 réplicas al azar de los alineamientos (Bootstrap).

3.4 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE LAS CEPAS DE *Micromonospora*

Los rasgos fisiológicos y metabólicos incluyen datos de crecimiento en distintos sustratos, temperaturas, pH, concentraciones de sal, sustancias que actúan como agentes antimicrobianos, actividad enzimática, etc. (Vandamme *et al.*, 1996).

Preparación de inóculos

Con el fin de obtener células jóvenes, los microorganismos aislados se cultivaron en medio SA1 durante una semana. Posteriormente, se prepararon suspensiones en una solución de NaCl (0.85%) teniendo en cuenta el tubo N° 6 de la escala de MacFarland (1.8×10^9 UFC/ml). De cada suspensión microbiana se tomaron 10 μ l y se inocularon sobre el medio correspondiente a cada prueba descrita en la Tabla 5. La composición de los medios utilizados en las pruebas de degradación se especifica en el anexo 1.

a. Utilización de fuentes de carbono

Los microorganismos tienen la capacidad de emplear varias sustancias como fuente de carbono que utilizan en diversos procesos metabólicos. Este ensayo se realizó teniendo en cuenta la metodología descrita por Williams *et al.* (1983).

- i. Se prepararon soluciones acuosas de las fuentes de carbono a evaluar y se esterilizaron por tindalización a 100°C durante 30 min, tres días consecutivos. A continuación, se añadieron al medio basal de Stevenson (ver anexo 1).
- ii. A cada placa con su respectiva fuente de carbono así como a los controles, se adicionaron 10 μ l del inóculo y se incubaron a 28°C observando el crecimiento a los 7, 14, y 21 días.
- iii. Los datos del crecimiento se recogieron teniendo en cuenta los controles, de modo que, se consideraba un resultado positivo siempre que existiera un crecimiento superior al del control positivo y se consideraba negativo cuando había un crecimiento inferior al control negativo.
- iv. Como control positivo se utilizó glucosa y el control negativo fue el medio basal sin añadir ninguna fuente de carbono.

Tabla 5. Pruebas bioquímicas realizadas a las diferentes cepas aisladas.

Utilización de diversos sustratos como fuente de carbono			
Abreviatura	FUENTE DE CARBONO (1%, p/v)	Abreviatura	FUENTE DE CARBONO (1%, p/v)
ADO	Adonitol	GAL	Galactosa
ALM	Almidón	GEL	Gelatina
ARA	Arabinosa	GLU	Glucosa
CAS	Caseína	GTO	Gluconato de sodio
CELO	Celobiosa	MAL	Maltosa
CELU	Celulosa	MANI	Manitol
CIT	Citrato de sodio	RIB	Ribosa
FRU	Fructosa	SAL	Salicina
MAN	Manosa	SUC	Sucrosa
MEB	Melibiosa	SOL	Sorbitol
MEL	Melecitosa	SOR	Sorbosa
MIO	Mio-inositol	TRE	Trehalosa
PRO	Propionato de sodio	XNO	Xilano
RAM	Ramnosa	XOL	Xilitol
RAF	Rafinosa	XIL	Xilosa
Utilización de aminoácidos como fuente de carbono (0.1%, p/v)			
ALA	Alanina	PRO	Prolina
ARG	Arginina	SER	Serina
ASP	Asparagina	TIR	Tirosina
HIS	Histidina	VAL	Valina
LIS	Lisina		
Pruebas de degradación		Concentración (% p/v)	Crecimiento en
ALM	Almidón	1.0	Cloruro de sodio (% p/v)
ARB	Arbutina	0.1	
CAS	Caseína	1.0	
ESC	Esculina	0.1	
GEL	Gelatina	0.4	
NIT	Nitrato	1.0	pH
TIR	L-tirosina	0.5	
UR	Urea	2.0	
T-20	Tween 20	1.0	
T-80	Tween 80	1.0	
	Producción		Temperatura
	Catalasa		
	Oxidasa		

b. Producción de amilasas

Los polisacáridos como el almidón, son compuestos difíciles de transportar al interior de la célula por su gran longitud. Por esta razón las células microbianas excretan amilasas que hidrolizan este polímero hasta monosacáridos que pueden usar como sustrato para los diversos procesos metabólicos. En este trabajo, la hidrólisis de almidón se analizó en el medio SA1 suplementado con almidón. La prueba se leyó adicionando 5 gotas del reactivo lugol después de 14 días de incubación a 28°C. El almidón no hidrolizado toma un color azul oscuro al formar un complejo con el yodo, mientras que una zona clara adyacente al crecimiento bacteriano indica una prueba positiva. La ausencia de halo de hidrólisis indica una prueba negativa.

c. Prueba de la arbutina

Para comprobar en los microorganismos la presencia de la enzima β -glucosidasa, capaz de degradar el glucósido arbutina, se utilizó el medio diseñado por Williams (ver anexo 1). Se partió de un medio sólido que contiene arbutina y cloruro de hierro (III), los cultivos se incubaron a 28°C, realizando lecturas a los 7, 14 y 21 días. Si las bacterias son capaces de escindir la arbutina aparece una coloración oscura en el medio sólido lo cual se interpreta como un resultado positivo. Si el medio permanece del mismo color el resultado de la prueba es negativo.

d. Prueba de degradación de la caseína

Se evaluó la capacidad de los microorganismos aislados de utilizar dicha fosfoproteína presente en la leche (Collins *et al.*, 1989). En el estudio se inocularon las cepas en el medio base SA1 que contenía la caseína (ver anexo 1). El resultado de la prueba es positivo si se observa la aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano, si hay crecimiento pero no se observa el halo, el resultado es negativo. Se hicieron lecturas de resultados a los 7, 14 y 21 días.

e. Prueba de hidrólisis de la esculina

La esculina es un derivado cumarínico que se compone de glucosa y aglucona 7-hidroxycumarina. Las bacterias capaces de crecer en bilis y también de hidrolizar esculina producen glucosa y esculetina de aglucona (7,7 dihidroxycumarina). La esculetina reacciona con las sales de hierro y forma un complejo marrón oscuro

(Swan, 1954). La hidrólisis de la esculina se determinó según Cowan y Steel (1993) (ver anexo 1). Los tubos se inocularon con las cepas a evaluar, incubando a 28°C y con lecturas de resultados a los 7, 14 y 21 días. Una prueba se considera positiva si se observa ennegrecimiento en el medio de cultivo, si el tubo permanece del color inicial el resultado es negativo.

f. Prueba de degradación de la gelatina

La gelatina es una proteína que se obtiene por hidrólisis parcial del colágeno y proporciona un sustrato útil para determinar la acción de las enzimas proteolíticas de los microorganismos. El ensayo se realizó inoculando las cepas al medio SA1 que contenía gelatina al 0.4% (ver anexo 1) y se incubó a 28°C durante 14 días. Para observar el resultado de la prueba es necesario adicionar a los cultivos la solución de revelado que contiene HgCl₂. La aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano es característico de una prueba positiva, si hay crecimiento pero no se observa el halo, el resultado es negativo.

g. Reducción del nitrato

El medio de nitrato se inoculó con las diferentes cepas del estudio las cuales se incubaron a 28°C durante cinco días. Los microorganismos que reducen los nitratos, tienen la capacidad de obtener oxígeno de los nitratos para formar nitritos. La presencia de nitritos se detectó en el medio por la formación de un colorante rojo de diazonio, al añadir el reactivo de Griess-Llovays, que contiene α -naftilamina y ácido sulfanílico (ver anexo 1). Si no aparece coloración se añade Zinc metálico a todas las pruebas negativas. Los iones de Zn reducen los nitratos a nitritos y el desarrollo de un color tras agregar polvo de zinc indica la presencia de nitratos residuales y confirma la reacción negativa verdadera.

h. Hidrólisis de la tirosina

Para determinar la descomposición de la tirosina, las cepas aisladas fueron inoculadas en placas de Agar SA1 con tirosina al 0.4% (ver anexo 1), de acuerdo a las indicaciones de Claus y Berkeley (1986) y examinando el desarrollo bacteriano a los 7, 14 y 21 días. La hidrólisis de la tirosina se observó por la aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano.

i. Hidrólisis de Tween

Algunos microorganismos poseen una enzima lipasa que hidroliza el Tween (mono-oleato de polietilen sorbitan) en ácido oleico y sorbitol polioxetilado (Wayne *et al.*, 1964). Para el ensayo, las células microbianas se colocaron en el medio que contenía Tween 20 o Tween 80 y CaCl₂, incubando a 28°C durante 15 días. Si el microorganismo es capaz de hidrolizar el Tween aparece en el medio de cultivo un precipitado alrededor de las colonias debido a la combinación del Ca²⁺ y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis. Cuando la bacteria no posee la capacidad para hidrolizar el Tween no se observa ningún tipo de precipitado.

j. Degradación de la urea

Los microorganismos que poseen la enzima ureasa hidrolizan urea y liberan amoníaco y dióxido de carbono (Koneman *et al.*, 1997). Las cepas se cultivaron en medio sólido durante una semana y luego sirvieron para inocular los tubos con caldo de urea (Fluka) (ver anexo 1). Cuando se produce la degradación de la urea el amoníaco que se libera cambia el medio de rosa a púrpura, de modo que si a los quince días se observa color púrpura el resultado es positivo, si permanece el color rosa el resultado es negativo. Se utilizó *Escherichia coli* como control negativo y *Proteus mirabilis* como control positivo.

k. Tolerancia al pH

Cada organismo tiene un rango de pH muy bien definido dentro del cual es posible el crecimiento óptimo. En este ensayo se comprobó la capacidad de las cepas para crecer a pH 4.0, 4.5, 5.5, 8.0 y 9.0 utilizando medio base SA1 preparado con tampones, los cuales permitían mantener constantes los diversos pH del medio de cultivo (ver anexo 1). El medio y los tampones se esterilizaron por separado y se mezclaron de forma aséptica antes de servir las placas. Los cultivos se incubaron a 28°C y se observaron a los 7, 14 y 21 días, comparando el crecimiento con el cultivo control crecido a pH 7.2.

l. Tolerancia a la temperatura

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que afectan al crecimiento y a la supervivencia microbiana. Esta capacidad fue evaluada mediante el empleo de placas con medio SA1 e incubadas a 4°C, 12°C, 22°C, 37°C

y 44°C. El crecimiento en las placas se observó a los 7, 14 y 21 días, comparando con el cultivo control crecido a 28°C.

m. Tolerancia al NaCl

Se evaluó la capacidad de las cepas para crecer a diferentes concentraciones de cloruro de sodio empleando medio base SA1 suplementado con NaCl al 1%, 3%, 5%, 7% y 9%. Las placas se incubaron a 28°C y el crecimiento se observó a los 7, 14, y 21 días. Un resultado positivo presenta crecimiento en la placa, mientras que la ausencia indica un resultado negativo, siempre y cuando haya un correcto crecimiento en la placa control.

n. Prueba de la catalasa

El peróxido de hidrógeno es un residuo del metabolismo celular de muchos microorganismos, pero dada su toxicidad debe transformarse rápidamente en compuestos menos peligrosos. Para ello se usa con frecuencia la enzima catalasa que cataliza su descomposición en agua y oxígeno (McLeod *et al.*, 1923). En el ensayo se utilizaron cultivos en placa crecidos durante una semana, sobre las que se añadieron unas gotas de H₂O₂ al 30% (Panreac, España). La reacción es positiva si se producen burbujas de oxígeno sobre el cultivo microbiano.

o. Prueba de la oxidasa

En la prueba de citocromooxidasa se utilizan colorantes como el clorhidrato de *p*-fenilendiamina, que sustituye al oxígeno como aceptor de electrones. En estado reducido el colorante es incoloro; sin embargo, en presencia de citocromooxidasa y oxígeno atmosférico la *p*-fenilendiamina es oxidada y forma azul de indofenol (Steel, 1961). Para observar la reacción se añadieron unas gotas de una suspensión al 1% de N, N, N', N'-Tetrametil-1,4-fenilendiamina diclorhidrato (Fluka) sobre el cultivo fresco de los microorganismos. La reacción es positiva cuando se produce el viraje a un color violeta en menos de 20 segundos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL SUELO

Los resultados del análisis físico-químico del suelo aparecen descritos en la Tabla 6, donde se puede apreciar que los suelos tienen un pH ligeramente ácido (5.4 y 5.9), lo cual se corresponden con los valores mínimos de pH que se han descrito para el crecimiento del género *Micromonospora* (Kawamoto, 1989).

Tabla 6. Análisis Físico-Químico del suelo donde crecían las plantas.

Muestras	pH	Materia orgánica %	Nitrógeno %	Ca asimilable	Mg asimilable	K asimilable	P asimilable
SB1	5.9	1.31	0.098	17	37	68	6.59
SB2	5.4	1.92	0.121	13	31	42	4.54

Ca, Mg, K y P se expresan en mg/kg

Respecto al contenido de materia orgánica, los valores normales están entre 1.6% a 3.5% (Karma, 1993), por lo que se puede deducir que la muestra SB1, está ligeramente por debajo de estos porcentajes. La concentración de fósforo en la muestra de suelo SB1 se encuentra en los valores medios descrito para suelos (5.5-11 mg/Kg), mientras que para SB2 la concentración fue un poco menor (4.54 mg/Kg). Se ha demostrado la importancia que tiene el fósforo disponible en el suelo, el cual interviene en la nodulación, la fijación del nitrógeno y el crecimiento de las plantas (Gentili y Huss-Danell, 2003).

Con relación al nitrógeno, se encontró que ambas muestras están dentro de los valores normales (0.096%-0.126%), según los datos de suelos registrados por Moreno (1978). Algunos trabajos señalan que el nitrógeno puede inhibir la nodulación y la fijación del nitrógeno, aunque esto también depende de otros nutrientes como el fósforo (Huss-Danell, 1997; Wall *et al.*, 2000).

Con los resultados obtenidos se puede deducir que la concentración de nutrientes de las dos muestras de suelo recogidas en el municipio de Plasencia, están dentro de los valores normales lo cual favorece el crecimiento de las plantas así como de la microbiota presente. Algunos trabajos de ecología microbiana han demostrado que la adaptación de microorganismos a ambientes tan heterogéneos como es la rizosfera de las plantas, depende tanto de la diversidad genética de las bacterias (Roszak y Colwell, 1987), de la composición de micronutrientes en el

suelo y de los exudados excretados por las raíces, los cuales pueden variar incluso si la misma especie de planta es cultivada en diferentes lugares (Mavingui *et al.*, 1992).

4.2 AISLAMIENTO DE *Micromonospora*

A partir de los nódulos efectivos de las plantas recolectadas (Figura 8), se obtuvo una diversidad de colonias de las que se seleccionaron un total de 61 cepas que presentaban la morfología característica del género *Micromonospora* (Figura 9).

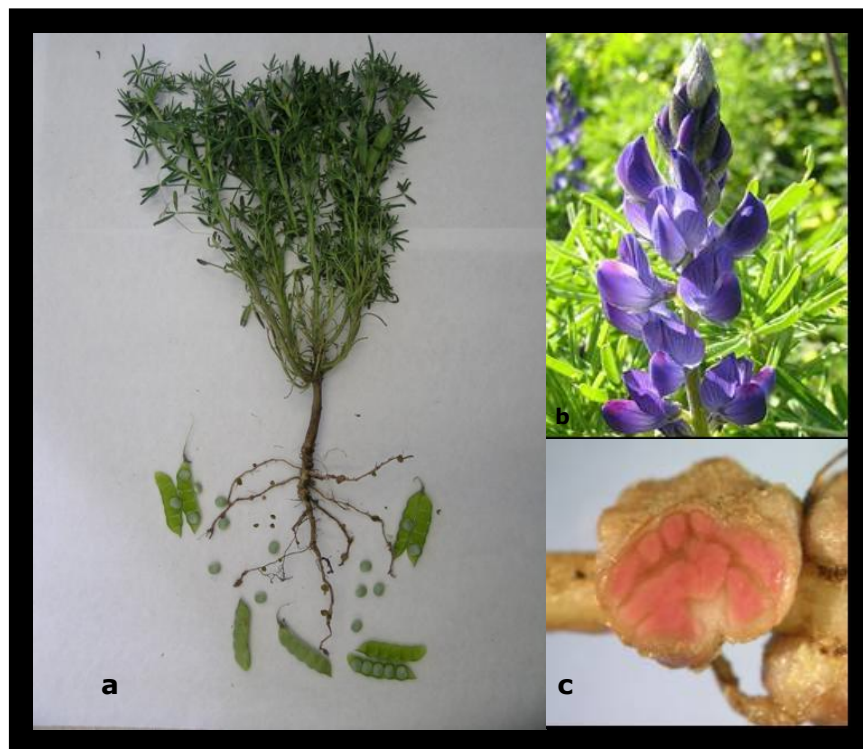


Figura 8. (a) *Lupinus angustifolius* crecida en Extremadura (b) flor de la planta y (c) nódulos efectivos.

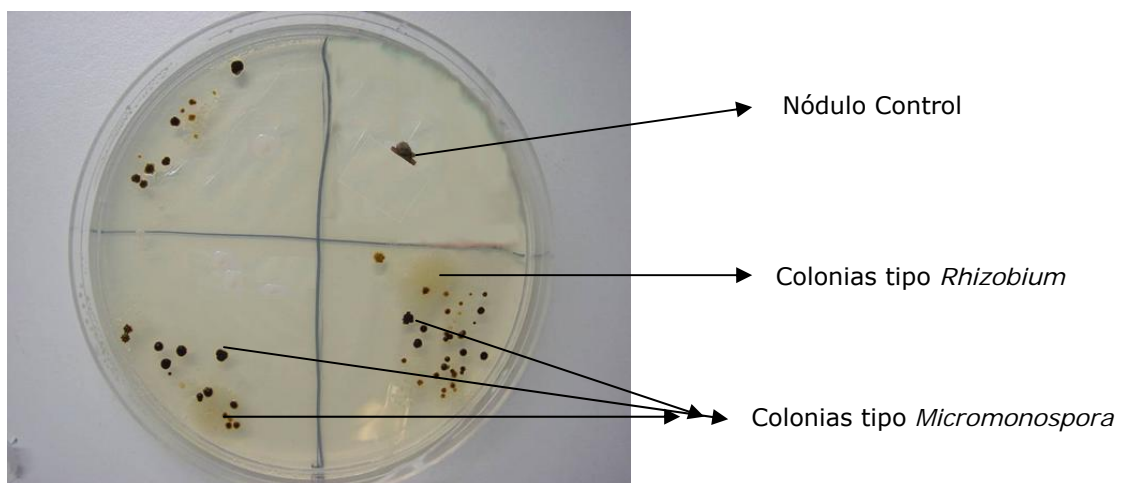


Figura 9. Placa de aislamiento de bacterias a partir de nódulos de *Lupinus*.

El medio de aislamiento (YMA) no contenía sustancias antimicrobianas, aun así, no hubo crecimiento de hongos o bacterias tipo *Streptomyces*, lo cual demuestra la efectividad del tratamiento de esterilización de los nódulos, el cual se realizó en superficie con cloruro de mercurio al 2.5%.

A las diferentes cepas que fueron aisladas, se les aplicó la nomenclatura de SB1 y SB2 que identifica los sitios de donde procedían las plantas utilizadas en el presente trabajo y que hacen referencia a la finca Santa Barbara ubicada en el Municipio de Plasencia. En la Tabla 7 se puede apreciar los nombres asignados a las 61 cepas, de los cuales 47 corresponden a SB1 y 14 a SB2.

Tabla 7. Nombre asignado a las cepas utilizadas en el presente estudio.

Cepas SB1			Cepas SB2
SB1-1	SB1-18	SB1-34	SB2-1
SB1-2	SB1-19	SB1-35	SB2-2
SB1-3	SB1-20	SB1-36	SB2-3
SB1-4	SB1-21	SB1-37	SB2-4
SB1-5	SB1-22	SB1-38	SB2-5
SB1-6	SB1-23	SB1-39	SB2-7
SB1-8	SB1-24	SB1-40	SB2-8
SB1-9	SB1-25	SB1-41	SB2-9
SB1-10	SB1-26	SB1-42	SB2-10
SB1-11	SB1-27	SB1-43	SB2-11
SB1-12	SB1-28	SB1-44	SB2-12
SB1-13	SB1-29	SB1-45	SB2-13
SB1-14	SB1-30	SB1-46	SB2-14
SB1-15	SB1-31	SB1-47	SB2-16
SB1-16	SB1-32	SB1-48	
SB1-17	SB1-33		

4.2.1 Morfología de las colonias

Las cepas aisladas se inocularon en diversos medios diseñados para cultivar actinobacterias. Los resultados se pueden observar en las Tablas 8 y 9. La mayoría de los microorganismos aislados, tanto de SB1 como SB2, presentaron los mejores crecimientos cuando fueron cultivados en los medios de cultivo: SA1, M-65 y N-Z amine. Con el medio YMA el crecimiento fue menor, mientras que con el medio de avena fue más lento, a la vez que más escaso.

Después de tres semanas de crecimiento las colonias presentaban texturas y contornos irregulares, con gran adherencia al medio de cultivo y de 5-8 mm de diámetro; algunas presentaban un aspecto mucoso debido a la producción de material extracelular (Figura 10). Al microscopio se observó micelio ramificado en todas las cepas y después de 4 semanas de incubación se pudo apreciar un elevado número de esporas que en la mayoría de los casos eran esporas únicas.



Figura 10. Características morfológicas de diversas cepas aisladas, crecidas en el medio M-65.

El estudio de los microorganismos en los distintos medios de cultivo (Tablas 8 y 9), permitió observar una gran diversidad morfológica, indicando que las poblaciones bacterianas recuperadas de los nódulos de *L. angustifolius* no eran clones.

Tabla 8. Crecimiento de las cepas **SB1** en diferentes medios de cultivo.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	cepa Medio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
		Crecimiento	SA1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
M-65	3		3	3	2	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	
N-Z AMINE	3		3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
AVENA	2		1	3	1	2	2	2	2	2	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	3	3	2	
YMA	2		3	3	2	2	3	3	2	2	3	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	3	
Color del micelio de sustrato	SA1	N	N	N	V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	V	NC	N	V	NC	N	NC	MN	M	N	NC	
	M-65	M	NC	N	B	N	N	M	NI	V	N	N	N	NI	NI	M	N	NC	NC	N	M	NC	NC	N	NC	
	N-Z-AMINE	M	M	M	NC	N	N	NC	N	N	G	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	N	N	NC	NC	N	NC	
	AVENA	M	B	N	B	M	M	B	M	N	N	M	M	B	B	B	B	B	B	B	B	B	NC	NC	M	B
	YMA	NC	NC	NC	NC	NI	NC	M	NC	M	M	M	NC	NC	G	NC	NC	NC	NI	NC	M	NI	NI	M	NC	
Pigmento difundible	N-Z-AMINE			Vi							Vi															
	AVENA					Ve				G	Ve															

Crecimiento: 0, inexistente, 1: escaso, 2: moderado, 3, abundante.

Color: B: Beige, G: gris, N: negro, NC: naranja claro, NI: naranja intenso, M: marrón, V: verde, Vi: violeta.

Tabla 8. Continuación

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	cepa	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	
	Medio																									
Crecimiento	SA1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3	3	
	M-65	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	3	3	3	3	0	3	3	3	3	2	
	N-Z AMINE	3	2	2	3	3	3	3	2	3	3	3	1	1	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	
	AVENA	2	2	3	1	1	1	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2	1	2	0	3	0	3	3	2	
	YMA	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	2	2	2	3	1	2	3	
Color del micelio de sustrato	SA1	N	NC	NC	N	MN	M	M	NC	N	M	N	NC	NC	M	M	N	M	N	M	N	Vi	N	N	V	
	M-65	M	NC	NC	V	MN	NI	M	NC	N	M	NI	NC	NC	NC	M	NC	NC	NC	NC	NC	N	Vi	N	M	NC
	N-Z-AMINE	NC	NC	NC	V	NI	NI	NI	NC	M	M	NI	B	B	NC	NI	M	NC	NI	B	MN	N	NC	M	NC	
	AVENA	B	M	M	B	NC	B	M	B	M	M	M	NC	NC	B	NC	G	B	V	B	N	G	N	N	B	
	YMA	M	NC	NC	G	NC	NI	NC	NC	M	M	M	M	G	V	NI	NC	NC	G	M	N	VI	G	NI	G	
Pigmento difundible	SA1																					Vi		Vi		
	N-Z-AMINE																			Vi		M		Vi		
	AVENA		M																		V			V		

Crecimiento: 0, inexistente, 1: escaso, 2: moderado, 3, abundante.

Color: B: Beige, G: gris, N: negro, NC: naranja claro, NI: naranja intenso, M: marrón, V: verde, Vi: violeta.

Tabla 9. Crecimiento de las cepas **SB2** en diferentes medios de cultivo.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	cepa	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	13	14	16
	medio														
Crecimiento	SA1	3	3	3	2	2	3	3	3	3	2	3	3	3	3
	YMA	3	3	3	2	2	3	2	3	3	2	2	3	3	3
	M-65	3	3	3	2	3	3	3	3	3	2	2	3	3	3
	N-Z AMINE	3	3	3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	AVENA	3	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2
Color del micelio de sustrato	SA1	N	NC	G	NC	M	N	N	V	V	B	V	N	N	N
	YMA	NI	NC	G	N	N	N	B	V	N	NC	NC	NG	NI	N
	M-65	NG	NI	G	NC	N	NG	NC	M	M	NC	B	NG	NC	N
	N-Z-AMINE	M	NI	NC	B	N	NC	NC	M	M	NC	NC	N	NI	NI
	AVENA	N	NC	B	B	B	B	B	G	G	B	B	M	NI	N
Pigmento difundible	SA1														
	YMA														M
	N-Z-AMINE												Vi	NC	NC
	AVENA	V											V		V

Crecimiento: 0, inexistente, 1: escaso, 2: moderado, 3, abundante;

Color: B: Beige, G: gris, N: negro, NC: naranja claro, NI: naranja intenso, M: marrón, V: verde, Vi: violeta.

Cabe señalar que a los pocos días de empezar a crecer, la mayoría de las colonias mostraban tonos amarillos, pasando a anaranjado y oscureciéndose después a marrón, llegando en algunos casos a presentar colonias negras mucosas. Un ejemplo del cambio de color del micelio a través del tiempo, se puede apreciar con la cepa SB1-35 cultivada en el medio SA1 (Figura 11).

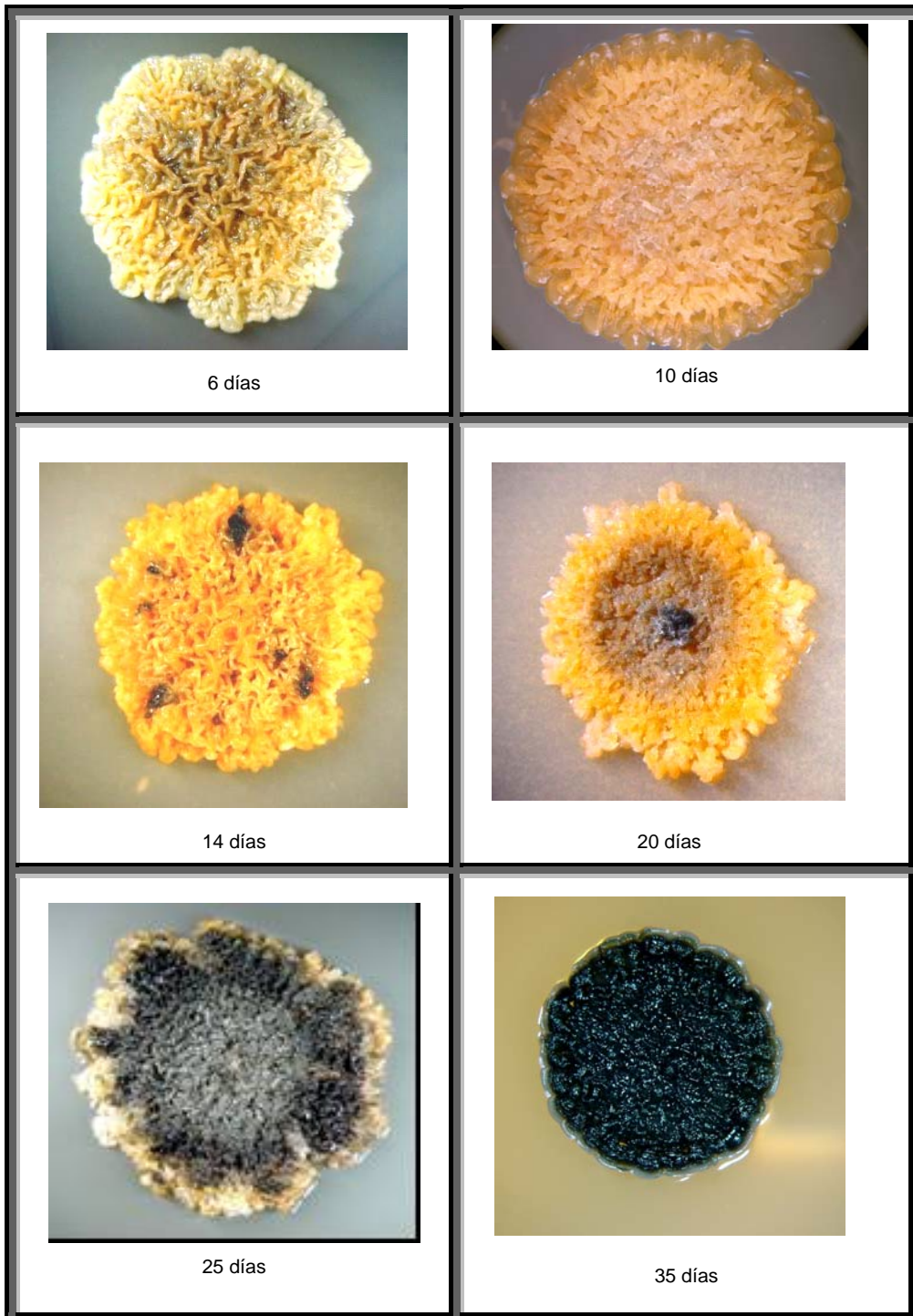


Figura 11. Crecimiento de la cepa SB1-35 en el medio SA1. Se puede apreciar el color que va tomando el micelio a través del tiempo de cultivo.

Con relación a los pigmentos difundibles producidas por las cepas en el medio de cultivo, los resultados se pueden observar en las Tablas 8 y 9.



Figura 12. producción de pigmento por la cepa SB1-47.

En el medio de avena es donde se presentó el mayor número de pigmentos. Las cepas SB2-1, SB1-5, SB1-10, SB2-13, SB2-16, SB1-44 y SB1-47 (Figura 12), produjeron una pigmentación verde, la cepa SB1-26 color marrón y la SB1-9 produjo un pigmento gris.

Las cepas SB1-3, SB1-10, SB1-43, SB1 47 y SB2-13, producen una pigmentación violeta en el medio N-Z amine, mientras que la cepa SB1-45

produce un color marrón y las cepas SB2-14 y SB2-16 un pigmento naranja claro en éste mismo medio. Las cepas SB1-45 y SB1-47 generan una pigmentación violeta en el medio SA1.

Los resultados de la caracterización morfológica indicaron que las cepas aisladas posiblemente pertenecen al género *Micromonospora*.

4.3 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LAS CEPAS DE *Micromonospora*

4.3.1 Perfiles de ADN mediante BOX-PCR

El empleo del oligonucleótido BOX-A1R, permite amplificar regiones que aparecen repetidas a lo largo del genoma bacteriano y permite discriminar las cepas aisladas por debajo del nivel de especie (Versalovic *et al.*, 1991).

La Figura 13, muestra los patrones electroforéticos obtenidos mediante la técnica de BOX-PCR. Se puede apreciar que los perfiles de BOX de las 61 cepas aisladas de nódulos presentan una buena distribución de las bandas de ADN a lo largo del gel. Este análisis permite observar un mínimo de 8 bandas (ej. SB1-2) hasta 18 bandas para la cepa SB1-38, con tamaños moleculares que oscilaron entre valores superiores a 0.1 kb y hasta 1.7 kb.

Los perfiles electroforéticos se analizaron mediante el programa informático Bionumerics, basado en la diferencia del tamaño molecular y el número de fragmentos, utilizando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Pearson. La Figura 14, muestra el dendrograma que se obtuvo al integrar los resultados de las 61 cepas aisladas.

Utilizando un porcentaje de similitud del 40%, se puede observar que las cepas se distribuyen en 6 grupos distintos, los cuales fueron denominados con las letras A hasta la F. Además, el dendrograma permite apreciar que algunas cepas se agrupan de manera conjunta en el árbol de acuerdo a su procedencia. El grupo más amplio fue el B con 28 cepas, que comprende 21 aislados procedentes de SB1 y 7 procedentes de SB2, luego le sigue el grupo D con 15 cepas todas SB1. Del grupo E, con 11 cepas, aparecen 6 aisladas de SB1 y 5 de SB2. Los grupos A y C tienen cada uno 3 cepas y finalmente en el grupo F únicamente se incluye la cepa SB1-39.

Con los resultados obtenidos (Figuras 13 y 14), se puede decir que las cepas presentan diferentes huellas moleculares, lo cual indica una elevada diversidad genética entre las cepas evaluadas. Resultados similares fueron obtenidos por Carro (2007), quien utilizando la técnica BOX-PCR encontró una gran diversidad de perfiles de *Micromonospora* con las cepas aisladas de nódulos de *Pisum sativum* de la provincia de Zamora.

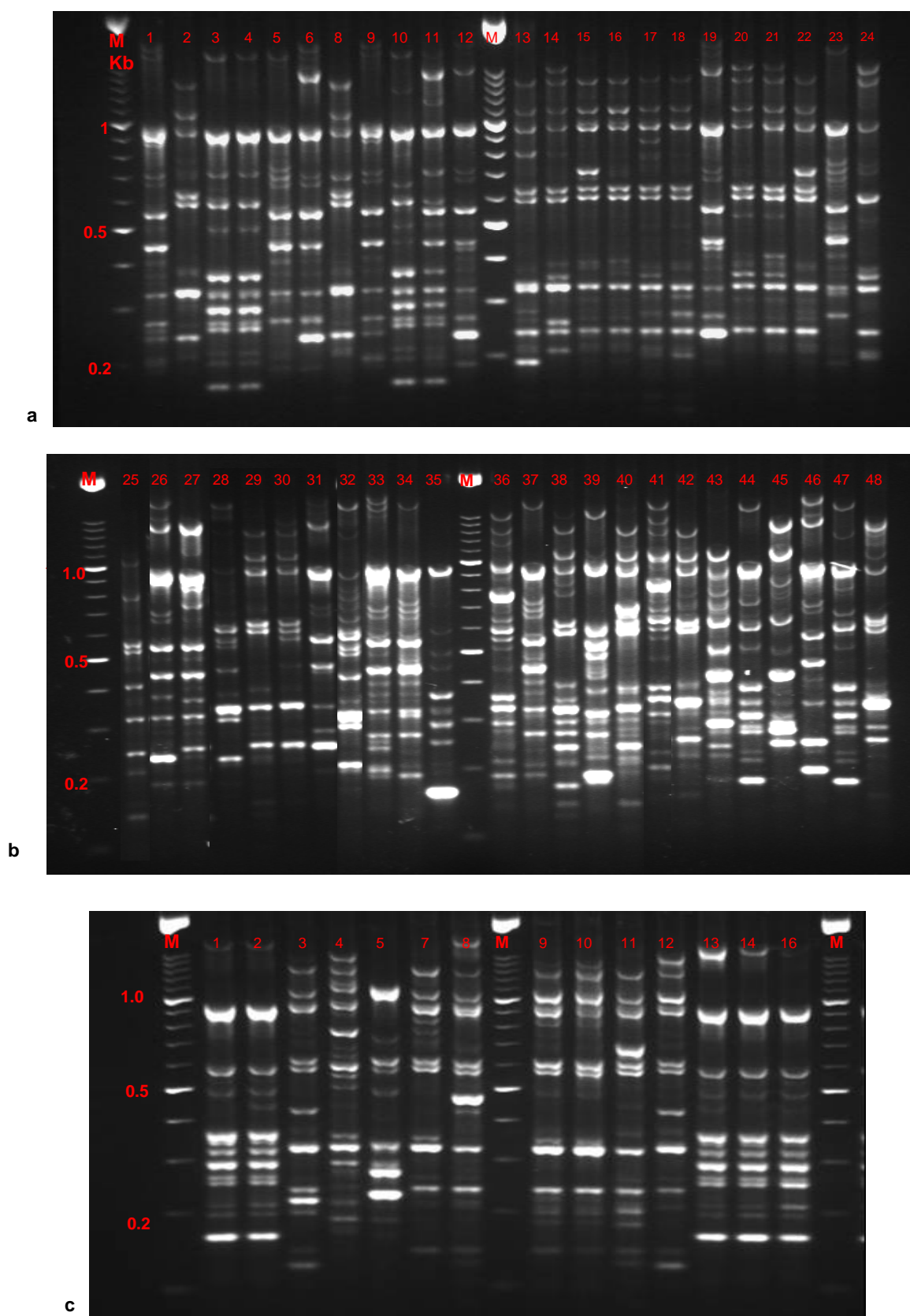


Figura 13. Análisis de los perfiles de BOX-PCR de las cepas procedentes de SB1 (a y b) y SB2 (c), aisladas de nódulos de *Lupinus angustifolius*. M: marcador (Kb).

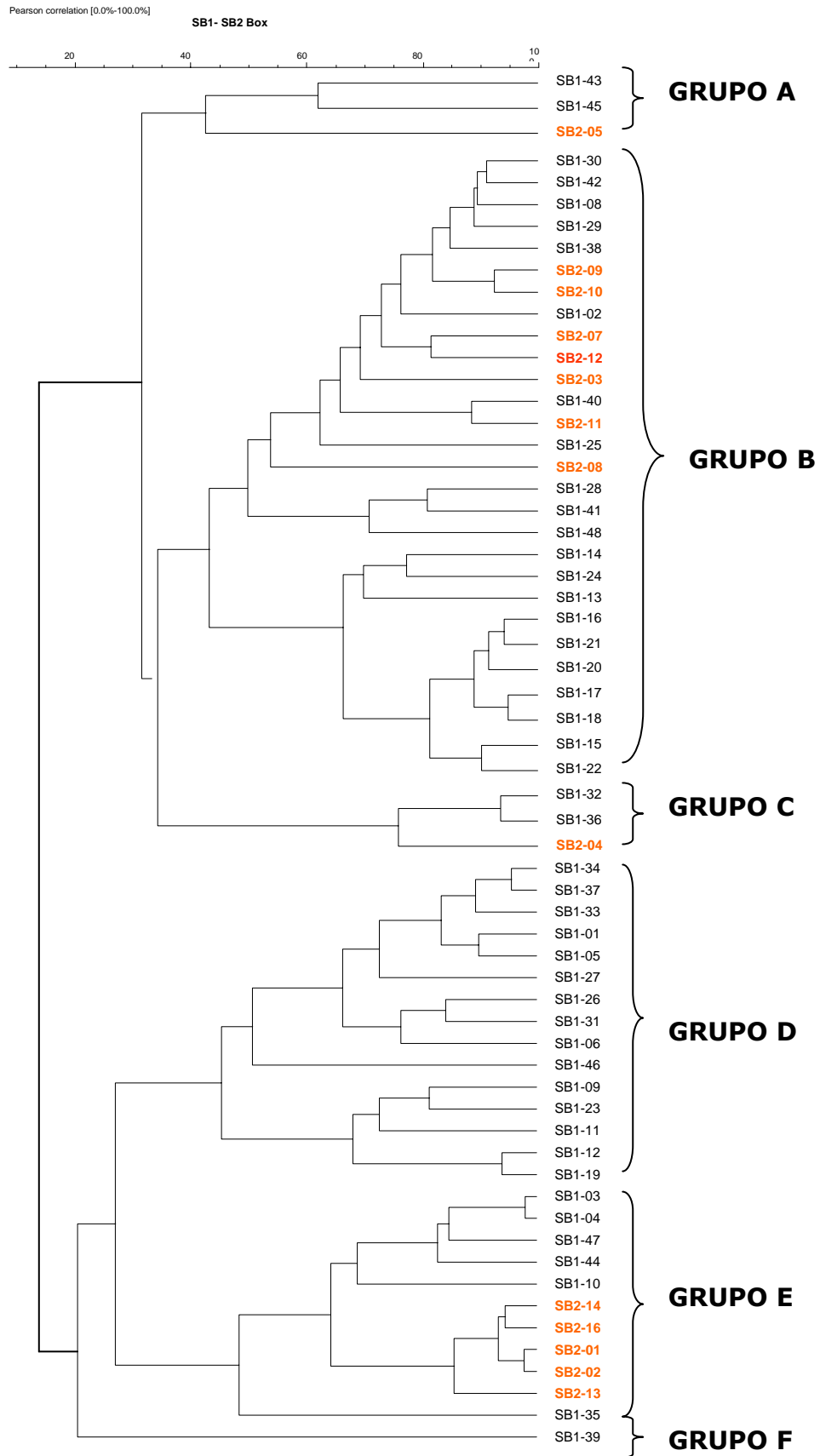


Figura 14. Dendrograma construido con el programa informático Bionumerics en el que se muestra el conjunto de cepas SB1 y SB2 analizadas por la técnica BOX-PCR.

Por otra parte, Lanoot *et al.* (2004) mediante el empleo de BOX-PCR, lograron diferenciar cepas de la misma especie dentro del género *Streptomyces*, encontrando una alta correlación entre los datos obtenidos con BOX y los resultados de homología ADN-ADN. En los estudios realizados por Gu *et al.* (2006) se aislaron 15 cepas de actinobacterias endofitas de hojas de las plantas *Paeonia lactiflora* y *Trifolium repens* y al comparar las características del cultivo y los perfiles obtenidos por BOX-PCR encontraron 12 genotipos diferentes.

En el trabajo recientemente publicado por Maldonado *et al.* (2008) se aislaron 206 representantes del género *Micromonospora*, los cuales fueron reunidos en 24 grupos basados en los perfiles de bandas obtenidos con los oligonucleótidos BOX-A1R y ERIC. Estos resultados junto con los obtenidos en nuestro trabajo indican que la técnica BOX-PCR permite una buena discriminación entre las poblaciones de actinomicetos aislados de diferentes hábitats.

4.3.2 Caracterización molecular mediante perfiles TP-RAPD

En el presente trabajo se utilizaron los cebadores 879F y 1522R, que tienen un alto contenido en G+C, y ya se han utilizado en otras ocasiones para analizar poblaciones bacterianas (Igual *et al.*, 2003; Velázquez *et al.*, 2008).

Los resultados de la Figura 15, muestra los perfiles obtenidos para los aislados SB1 y SB2. Se puede deducir que el número de bandas que se presenta con mayor frecuencia es 10, y con valores que oscilan entre 5 (ej. SB2-4) y 14 bandas (ej. SB1-8). Los tamaños moleculares están entre los 0.15 a 2.0 Kb.

El análisis realizado mediante el programa informático Bionumerics teniendo en cuenta un porcentaje de similitud del 40%, permitió separar a los microorganismos en 5 perfiles de TP-RAPD diferentes (Figura 16). Con relación a los grupos obtenidos, el grupo **a** fue el mayoritario con 29 cepas (21 de los aislamientos SB1 y 8 de SB2). El grupo **c** fue el segundo en cantidad reuniendo 22 cepas (17 de SB1 y 5 de SB2), en el grupo **d** se encuentran 7 aislados y el grupo **e** presenta las cepas SB2-5 y SB1-48. Finalmente, el grupo **b** contiene un perfil electroforético único que pertenece a la cepa SB1-39.

Estos resultados permiten concluir que tanto las cepas SB1 como las SB2 aisladas de la región de Plasencia, comparten patrones de TP-RAPD lo cual se observa en la distribución obtenida a lo largo del dendrograma. La variabilidad de perfiles con respecto a BOX se redujo, lo cual en cierta manera tiene ventajas en estudios de taxonomía, cuando se busca agrupamientos a niveles superiores a cepa.

En el presente estudio analizando las cepas aisladas de nódulos de *L. angustifolius* de la región de Extremadura, se obtuvo mediante TP-RAPD una alta diversidad genética entre los microorganismos aislados. Previamente, Fernández (2005), quien utilizó nódulos de la planta *Lupinus angustifolius* de la región de Saelices el Chico (Salamanca), obtuvo 8 perfiles TP-RAPD distintos para las 15 cepas aisladas. Este trabajo confirma una vez más la utilidad de los perfiles de TP-RAPD para agrupar cepas de *Micromonospora*, de las que se pueden seleccionar representantes para llevar a cabo el análisis del gen ribosómico 16S.

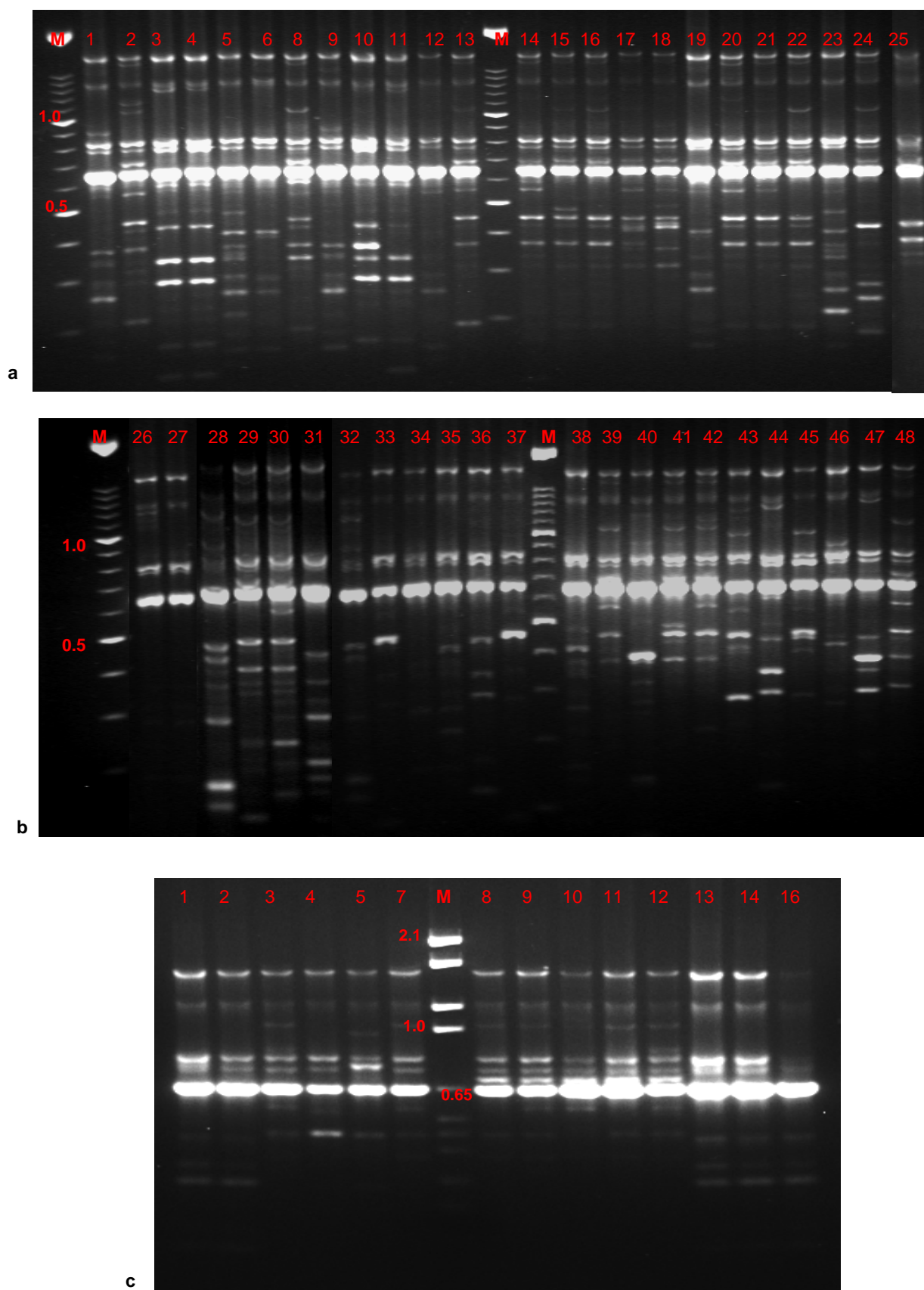


Figura 15. Análisis de los perfiles de TP-RADP de las cepas SB1 (a y b) y SB2 (c), aisladas de nódulos de *Lupinus angustifolius*. M: marcador (Kb).

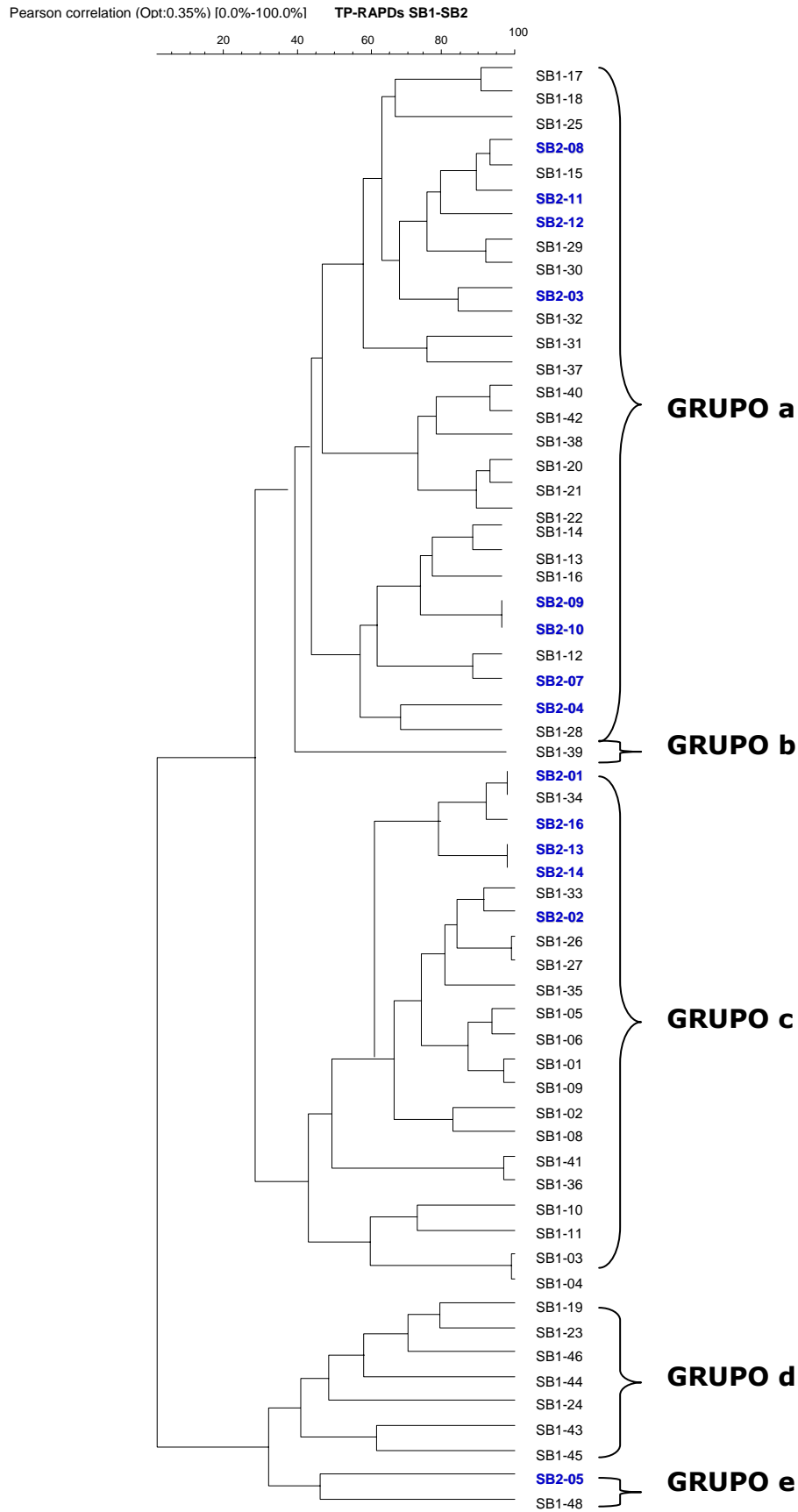


Figura 16. Dendrograma en el que se muestra el conjunto de cepas SB1 y SB2 analizadas por la técnica de TP-RAPD.

4.3.3 Caracterización molecular de las cepas mediante MICROSATÉLITES

La diversidad microbiana obtenida mediante la técnica de microsatélites resulta de las diferencias en el número de unidades repetidas y se cree que estas diferencias son causadas por errores en la replicación del ADN (Crouch *et al*, 1998), tales diferencias son detectadas en un gel donde migran a diferentes distancias de acuerdo con su tamaño (Jarne y Lagoda, 1996). La Figura 17, muestra los resultados obtenidos en el presente trabajo, en la que se aprecia que las bandas del perfil electroforético son de un tamaño molecular alto distribuidas entre los 0.4 Kb y 2.8 Kb. El número de bandas está entre 2 (ej. SB1-32) y 9 (SB2-8), siendo 4 bandas (ej. SB1-10) las que aparecen con mayor frecuencia.

Con la información derivada de los patrones electroforéticos, se generó un dendrograma por medio del análisis con el programa Bionumerics (Figura 18) que revela la variación genética entre las cepas aisladas. Se tomó un valor de corte de 40% de similitud, con el que las cepas se diferenciaron en 5 grupos principales.

El grupo V fue el que presentó mayor número de genotipos (30) siendo todos ellos diferentes. El grupo I reúne 14 cepas todas SB1, seguido por el grupo IV con 13 cepas. En los grupos II y III se agrupan 2 genotipos: SB1-45 y SB2-05 y, SB1-39 y SB1-43, respectivamente. El dendrograma sugiere que mientras las cepas procedentes de los aislados SB1 están distribuidas en todo el árbol, algunas de las cepas SB2 se agrupan en una misma rama, como por ejemplo las que se ubican en el grupo IV.

Como ya se ha comentado, se han utilizado técnicas de agrupación molecular como BOX-PCR o TP-RAPD (Fernández, 2005; Carro, 2007) para obtener perfiles de *Micromonospora* a partir de nódulos de plantas; sin embargo, esta es la primera vez que se realiza la caracterización de cepas aisladas de nódulos de *Lupinus angustifolius* empleando perfiles de microsatélites. Zane *et al.* (2002) describen que cada vez más existe una tendencia a utilizar los microsatélites como marcadores moleculares y que esto se debe a que proveen una alta incidencia de polimorfismo en relación con otras técnicas como RFLP y RAPD.

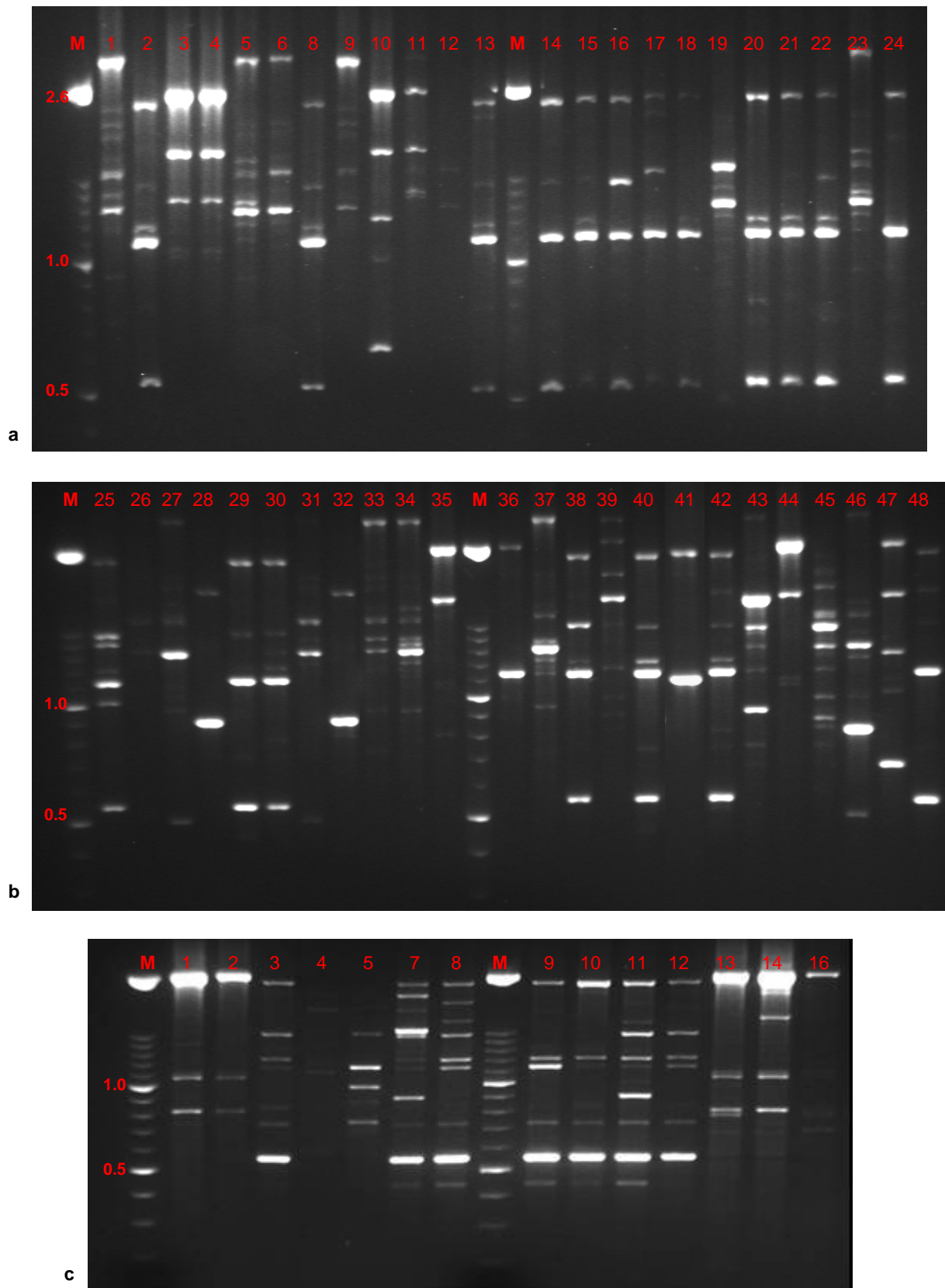


Figura 17. Patrón de bandas obtenida con MICROSATELITES de las cepas SB1 (a y b) y SB2 (c), aisladas de nódulos de *Lupinus angustifolius*. M: marcador (Kb).

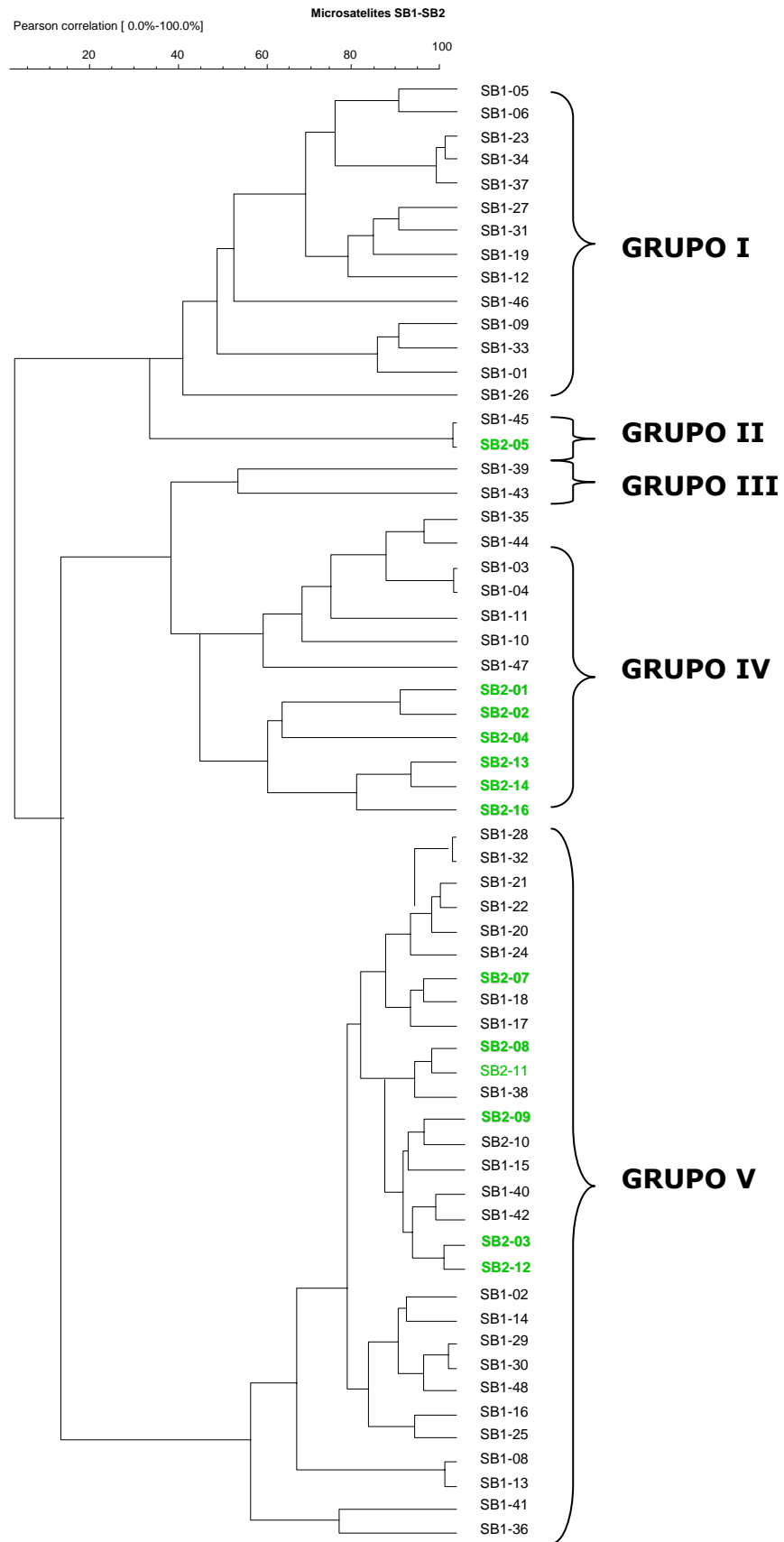


Figura 18. Dendrograma realizado mediante el método UPGMA de los patrones de bandas obtenidos con MICROSATELITES para las 61 cepas de SB1 y **SB2**. El índice de distancia se calculó según Pearson.

4.3.4 Integración de los resultados obtenidos mediante los perfiles BOX-PCR, TP-RAPD y microsatélites

En vista de que el empleo por separado de las técnicas BOX-PCR, TP-RAPD y microsatélites permitió obtener perfiles, se realizó un análisis manual integrando los datos obtenidos por las tres técnicas. Los resultados se muestran en la Tabla 10, en la que se puede observar que 23 cepas tanto de SB1 como SB2 son agrupadas como Tipo 1 y corresponden a los perfiles B-a- V, de BOX-PCR, TP-RAPD y microsatélites respectivamente. Los microorganismos agrupados como Tipo 2 fueron 10 y corresponden a los grupos E-c-IV, mientras que en el Tipo 3 se encuentran ubicadas 8 cepas que pertenecen a los grupos D-c-I de los dendrogramas obtenidos con las técnicas moleculares.

Las cepas que corresponden al Tipo 4 fueron SB1-12, SB1-31 y SB1-37, mientras que las cepas ubicadas en el Tipo 5 son SB1-19, SB1-23 y SB1-46. En el Tipo 6 se encuentran las cepas SB1-2 y SB1-8. Las demás cepas forman un solo tipo por separado ya que están ubicadas en perfiles distintos. Un ejemplo lo representa la cepa SB1-39 ubicada en el Tipo 18, la cual aparece sola en el perfil F de BOX-PCR y en el perfil b de los TP-RAPD, mientras que con microsatélites se agrupa con la cepa SB1-43 en el perfil III.

Por otra parte, los resultados indican que BOX-PCR fue la técnica que presentó mayor discriminación y polimorfismo entre cepas al reunir las en 6 grupos, mientras que en TP-RAPD y microsatélites se formaron cinco grupos. El mayor número de bandas fue 18 (SB1-38) obtenida con la técnica BOX-PCR, lo cual muestra la efectividad de este método, el cual amplifica regiones de ADN, repetitivas, altamente conservadas y presentes en múltiples copias a través del genoma bacteriano (Seurinck *et al.*, 2003).

En general, los resultados de caracterización de las cepas SB1 y SB2 por las metodologías utilizadas (BOX-PCR, TP-RAPD y microsatélites), presentaron una buena relación a pesar de que se encontraron algunas diferencias en los grupos formados. Diversos estudios han mostrado los beneficios que se obtienen cuando se utilizan varias técnicas moleculares para diferenciar entre bacterias presentes en un mismo hábitat. Dichos trabajos describen la caracterización de cepas que se hallaban estrechamente relacionadas, mediante el uso en conjunto de las técnicas ARDRA, BOX-PCR, y RAPD, entre otras (Selenska *et al.*, 1996; Delorme *et al.*, 2003; Reda, 2007).

Tabla 10. Tipo al que pertenecen las cepas SB1 y SB2 según los dendrogramas obtenidos por las técnicas BOX-PCR, TP-RAPD y microsatélite.

Tipo	Cepa	BOX-PCR	TP-RAPD	Microsatélite
1	SB1-13	B	a	V
	SB1-14	B	a	V
	SB1-15	B	a	V
	SB1-16	B	a	V
	SB1-17	B	a	V
	SB1-18	B	a	V
	SB1-20	B	a	V
	SB1-21	B	a	V
	SB1-22	B	a	V
	SB1-28	B	a	V
	SB1-29	B	a	V
	SB1-30	B	a	V
	SB1-38	B	a	V
	SB1-40	B	a	V
	SB1-42	B	a	V
	SB1-25	B	a	V
	SB2-3	B	a	V
	SB2-7	B	a	V
	SB2-8	B	a	V
	SB2-9	B	a	V
SB2-10	B	a	V	
SB2-11	B	a	V	
SB2-12	B	a	V	
2	SB1-3	E	c	IV
	SB1-4	E	c	IV
	SB1-10	E	c	IV
	SB1-35	E	c	IV
	SB1-47	E	c	IV
	SB2-1	E	c	IV
	SB2-2	E	c	IV
	SB2-13	E	c	IV
	SB2-14	E	c	IV
SB2-16	E	c	IV	
3	SB1-1	D	c	I
	SB1-5	D	c	I
	SB1-6	D	c	I
	SB1-9	D	c	I
	SB1-26	D	c	I
	SB1-27	D	c	I
	SB1-33	D	c	I
SB1-34	D	c	I	
4	SB1-12	D	a	I
	SB1-31	D	a	I
	SB1-37	D	a	I
5	SB1-19	D	d	I
	SB1-23	D	d	I
	SB1-46	D	d	I
6	SB1-2	B	c	V
	SB1-8	B	c	V
7	SB1-41	A	c	V
8	SB1-43	A	d	III
9	SB1-45	A	d	II
10	SB2-5	A	e	II
11	SB1-24	B	d	V
12	SB1-48	B	e	V
13	SB2-4	C	a	IV
14	SB1-32	C	a	V
15	SB1-36	C	c	V
16	SB1-11	D	c	IV
17	SB1-44	E	d	IV
18	SB1-39	F	b	III

Por otra parte, en la Figura 19 se presenta el análisis de las técnicas BOX-PCR, TP-RAPD y microsatélites empleando el programa informático Bionumerics teniendo en cuenta el método de agrupación UPGMA.

Se puede apreciar que el grupo I está conformado por 15 cepas todas ellas pertenecientes a SB1. El grupo II contiene 11 cepas (6 de SB1 y 5 de SB2), el grupo III únicamente la cepa SB1-39, el grupo IV está conformado por 32 cepas (24 de SB1 y 8 de SB2) y finalmente el grupo V con dos cepas, SB1-45 y SB2-05. Además, en el dendrograma se puede observar que las cepas tienden a mantenerse agrupadas de igual manera a como lo hicieron en los ensayos individuales. Existen cepas que se ubican en ramas independientes como por ejemplo SB1-45 y SB2-05 (grupo V) o la cepa SB1-39 (grupo III).

Teniendo en cuenta los datos presentados en la Tabla 10 y Figura 19, se encontró una alta correlación entre los resultados analizados manualmente y los obtenidos por el programa Bionumerics. El 100% de las cepas pertenecientes al Tipo 1 y Tipo 2, están en el grupo IV y V respectivamente del dendrograma de la Figura 19. Además, Todas las cepas agrupadas manualmente como Tipo 3, 4 y 5 están en el grupo I del dendrograma.

Investigaciones previas han realizado la caracterización genotípica de cepas del género *Micromonospora* aisladas a partir de nódulos. Fernández (2005) evaluó la diversidad de cepas en nódulos de *L. angustifolius* mediante TP-RAPD y en el estudio descrito por Carro (2007) los perfiles obtenidos de los aislados de nódulos de guisante, fueron hechos únicamente con BOX-PCR. A pesar de estos aportes, hasta el momento no se habían empleado en conjunto varias técnicas de obtención de huellas moleculares para describir la diversidad de cepas de *Micromonospora* que se encuentran en nódulos de *Lupinus angustifolius*, como los que se muestran en la presente memoria.

De acuerdo con el análisis de los resultados empleando diversas técnicas moleculares, se puede deducir que las cepas aisladas de nódulos de *Lupinus angustifolius* tienen un elevado polimorfismo y que, prácticamente ninguna de las cepas muestreadas presentó una huella idéntica a la otra lo que indica la alta diversidad entre ellas. A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron las cepas a las que se les secuenció el gen ARNr 16S.

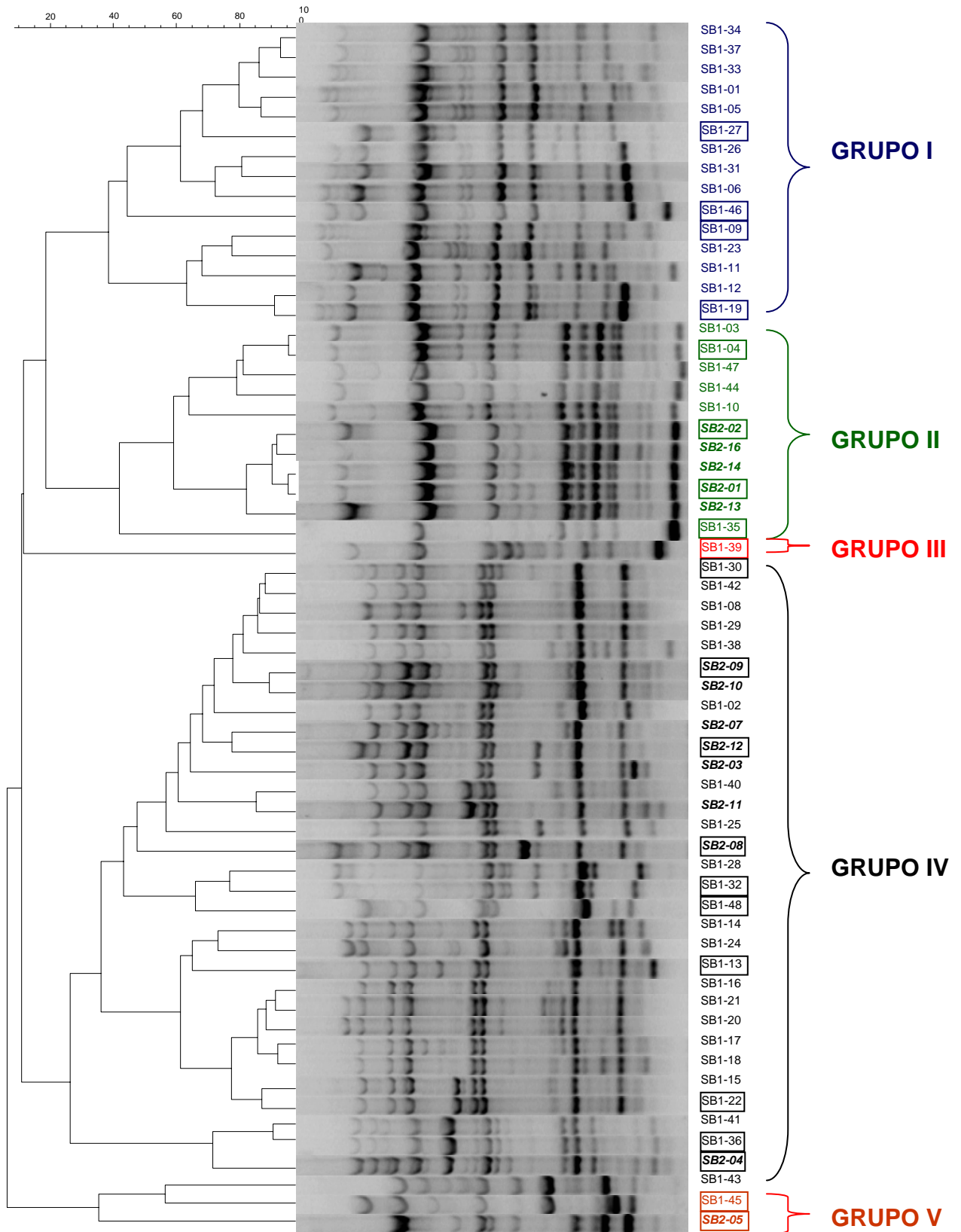


Figura 19. Dendrograma basado en el método de agrupación UPGMA y el coeficiente de Pearson para el conjunto de las cepas SB1 y SB2 (en cursiva), integrando los análisis de BOX-PCR, microsatélites y TP-RAPD. Las cepas marcadas en recuadros fueron las seleccionadas para secuenciar el gen ARNr 16S.

4.4 SECUENCIACIÓN DEL GEN RIBOSÓMICO 16S

La comparación de las secuencias del gen ribosómico 16S permite establecer relaciones filogenéticas entre los organismos, ya que contienen varias regiones altamente conservadas que resultan útiles para obtener alineamientos de secuencia y al mismo tiempo una variabilidad suficiente en otras regiones de la molécula para servir como cronómetros evolutivos (Woese, 1987).

Teniendo en cuenta los resultados de los perfiles obtenidos por BOX-PCR, TP-RAPD y microsatélites (Figura 19), se eligieron 22 cepas como representantes de cada uno de los grupos a los que se les secuenció el gen ARNr 16S. Las cepas seleccionadas fueron: Del grupo I (SB1-9, 19, 27 y 46), grupo II (SB1- 4, 35, 44 y SB2-1, 2), grupo III (SB1-39), grupo IV (SB1- 13, 22, 30, 32, 36, y 48; SB2-4, 8, 9 y 12) y del grupo V (SB1-45 y SB2-5).

Las secuencias obtenidas del gen ARNr 16S para cada una de las cepas tenían una longitud entre 1440 y 1455 nucleótidos. Dichas secuencias fueron comparadas con las depositadas en las bases de datos publicas GenBank NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information) y RDP (Ribosomal Database Project 2001). En la Tabla 11, se presentan los porcentajes de similitud obtenidos entre las cepas seleccionadas y las cepas tipo más próximas, donde se puede apreciar que todas las cepas evaluadas pertenecen al género *Micromonospora*, lo cual confirma los resultados morfológicos previamente expuestos.

Las cepas evaluadas se identificaron con una de las cuatro especies mostradas en la Tabla 11: *Micromonospora fulviviridis*, *Micromonospora chalybophumensis*, *Micromonospora olivasterospora* y *Micromonospora echinospora*. Los porcentajes de similitud con respecto a la especie más próxima oscilan entre el 98 y 99 % y con un número de diferencias en los nucleótidos desde 5 hasta 17, lo cual indica que algunos de los aislados pueden representar nuevas especies.

Es necesario destacar que se requiere de otras técnicas como la hibridación ADN-ADN en conjunto con el análisis de la secuencia del gen ARNr 16S, para establecer la relación entre secuencias de nucleótidos y definir las nuevas especies. Por otra parte, Stackebrandt *et al.* (2002) sugieren tener en cuenta otras técnicas como la secuenciación de genes que codifiquen funciones metabólicas (genes de mantenimiento), los cuales podrían ser empleados de manera alternativa para describir nuevas especies.

Tabla 11. Análisis de la secuencia del gen ARNr 16S de las cepas SB1 y SB2 comparadas con las depositadas en las bases de datos públicas.

Cepa	Organismo relacionado con la base de datos	Nucleótidos	Similitud	Número de diferencias
SB1- 4	<i>Micromonospora fulviviridis</i>	1419/1434	98%	15
SB1- 9	<i>Micromonospora chiyaphumensis</i>	1410/1418	99%	8
SB1- 13	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	1416/1431	98%	15
SB1- 19	<i>Micromonospora chiyaphumensis</i>	1423/1428	98%	5
SB1- 22	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	1415/1432	98%	17
SB1- 27	<i>Micromonospora chiyaphumensis</i>	1408/1415	99%	7
SB1- 30	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	1418/1431	99%	13
SB1- 32	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	1421/1437	98%	16
SB1- 35	<i>Micromonospora fulviviridis</i>	1428/1445	98%	17
SB1- 36	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	1414/1433	98%	19
SB1- 39	<i>Micromonospora echinospora</i>	1431/1446	98%	15
SB1- 44	<i>Micromonospora fulviviridis</i>	1430/1446	98%	16
SB1- 45	<i>Micromonospora echinospora</i>	1438/1446	99%	8
SB1- 46	<i>Micromonospora chiyaphumensis</i>	1423/1430	99%	7
SB1- 48	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	1419/1432	99%	13
SB2-1	<i>Micromonospora fulviviridis</i>	1430/1446	98%	16
SB2-2	<i>Micromonospora fulviviridis</i>	1433/1446	99%	13
SB2-4	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	1431/1446	98%	15
SB2-5	<i>Micromonospora echinospora</i>	1435/1445	99%	10
SB2-8	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	1432/1447	98%	15
SB2-9	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	1431/1447	98%	16
SB2-12	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	1418/1431	99%	13

4.4.1 Análisis filogenético

Con las secuencias de ADN de cada uno de los aislados seleccionados, se realizó un análisis de los microorganismos para conocer la relación filogenética entre éstos, así como la posición que ocupan con respecto a las especies de *Micromonospora* descritas hasta el momento. Inicialmente se utilizó el programa CLUSTAL X, con el que se alinearon las secuencias y se observaron las diferencias puntuales presentes entre ellas. Con el programa informático MEGA 3 (Kumar *et al.*, 2001), se calcularon las distancias evolutivas de las secuencias y se construyeron los árboles filogenéticos. El programa permite el análisis de los datos empleando varios métodos y algoritmos distintos, pudiendo así comparar los árboles obtenidos y determinar si la topología presentada es estable.

El árbol filogenético que se muestra en la Figura 20, se elaboró teniendo en cuenta las especies del género *Micromonospora* validadas hasta el momento (Tabla 4) y las 22 cepas secuenciadas en este trabajo. En este árbol se puede observar que las cepas de estudio quedan distribuidas a lo largo del mismo, lo que confirma la elevada variabilidad existente entre las cepas muestreadas. Adicionalmente, mediante el programa PHYDIT se realizaron matrices de similitud para comparar las cepas aisladas con las especies filogenéticamente más próximas (anexo 2).

Las cepas SB1-4, SB1-35, SB1-44 y SB2-1, SB2-2, que aparecen en la parte superior del árbol, mostraron entre sí porcentajes de similitud cercanos al 100%. La cepa tipo con la que presentaron mayor similitud fue *Micromonospora fulviviridis* DSM 43906^T, con valores que van entre 98.8% y 99.31%. La otra cepa tipo más cercana a este grupo fue *Micromonospora inositol*a DSM 43819^T con un porcentaje de identidad del 98.6%.

Las cepas SB2-5 y SB2-45 tienen una similitud entre sí del 99.79% y la cepa tipo más próxima fue *Micromonospora echinospora* DSM 43816^T con valores de 99.31% para SB2-5 y 99.45% para SB2-45. La cepa SB1-39, que aparece en una rama distinta, muestra una similitud de un 99.10% con respecto a las secuencias del gen ARNr 16S de las dos especies más próximas, *Micromonospora eburnea* DSM 44814^T y *M. echinospora* DSM 43816^T. Entre SB1-39 y *Micromonospora narathiwatensis* JCM 12394^T hay un 98.67% de identidad. Hay que señalar que entre las secuencias de las cepas tipo *M. narathiwatensis* y *M. eburnea* tienen porcentajes de similitud alto, del 99.35%.

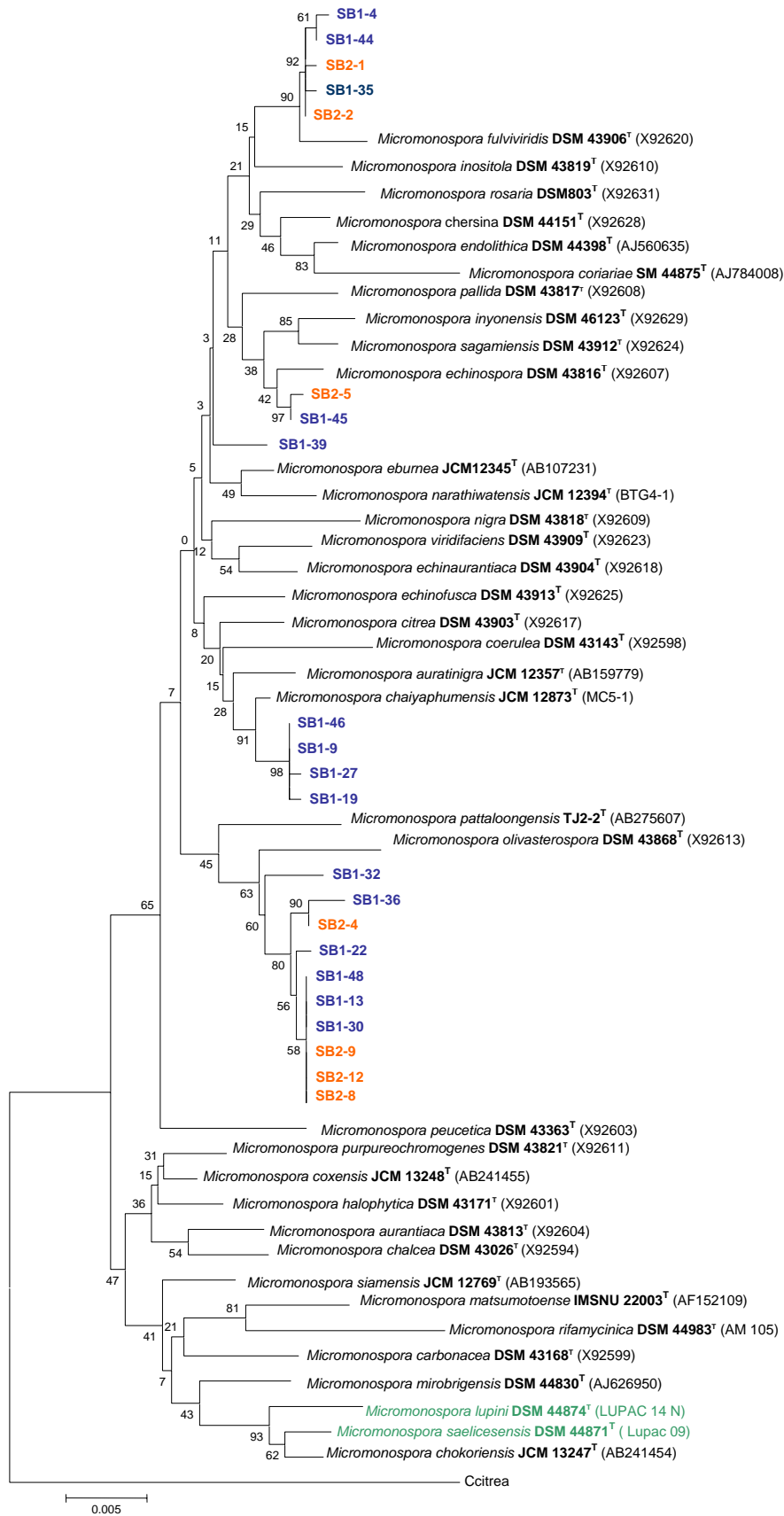


Figura 20. Relación filogenética de las cepas aisladas de nódulos de *Lupinus angustifolius* con las cepas tipo de *Micromonospora*. El dendrograma fue construido usando el algoritmo Neighbor-Joining y el método de estimación de distancia Kimura 2P. Los valores de Bootstrap generados de 1,000 replicas se muestran en los nodos. La escala representa el número de sustituciones por sitio.

Las cepas SB1-46, SB1-9, SB1-27 y SB1-19, presentaron entre sí valores de similitud que oscilan entre 99.72 y 99.86%. La especie más cercana fue la recientemente descrita *Micromonospora chaiyaphumensis* JCM 12873^T con porcentajes de identidad que van desde 99.40% para SB1-46 hasta 99.72 para SB1-19. Las otras especies con las que se relacionan estas cepas son *Micromonospora auratinigra* DSM 44815^T con 99.2% y *Micromonospora citrea* DSM 43903^T con un 99.1%.

Al comparar las cepas tipo *M. chaiyaphumensis* JCM 12873^T y *M. auratinigra* DSM 44815^T, se observa que poseen un 99.4% de similitud, que es el mismo encontrado entre *M. chaiyaphumensis* JCM 12873^T y la cepa SB1-46, lo cual podría indicar que la cepa SB1-46 represente una nueva especie aunque se necesitan de estudios adicionales para confirmarlo.

Del total de cepas secuenciadas, 10 quedaron agrupadas en una rama común y la cepa tipo más próxima fue *Micromonospora olivasterospora* DSM 43868^T con valores que oscilan entre 98.06% con respecto a SB1-32 y 99.12% con respecto a SB1-30. Otra cepa tipo cercana fue *M. chaiyaphumensis* con porcentajes de similitud que van de 98.01% (SB1-32 y SB1-48), a 98.71% (SB1-22, SB1-30, SB2-8).

Con la cepa tipo de la especie *M. eburnea* DSM 44814^T, se encontraron valores que oscilan entre 98.21% (SB1-36) y 98.82% (SB2-4). Finalmente, con la especie tipo *Micromonospora pattaloongensis* TJ2-2^T las similitudes están entre 97.32% (SB1-32) y 98.37% (SB2-8). Teniendo en cuenta los resultados anteriormente descritos, se puede decir que las cepas que se agrupan en esta rama del árbol podrían representar nuevas especies, lo cual requiere de estudios como la hibridación de ADN, entre otros, para confirmarlo.

Es importante destacar que hacia la parte inferior del árbol aparecen ubicadas dos cepas que corresponden a *Micromonospora lupini* DSM 44874^T y *Micromonospora saelicesensis* DSM 44871^T (Trujillo *et al.*, 2007), aisladas a partir de nódulos de *L. angustifolius* recolectadas en la localidad de Saelices (Salamanca). En el presente trabajo se utilizaron nódulos de la misma planta que crecían en la región de Extremadura, sin que ninguna de las cepas aisladas se ubicara cerca de las ya descritas. Esto confirma una vez más la variedad de especies de *Micromonospora* que se pueden encontrar, aún de la misma especie de planta, pero localizada en distintas regiones.

Esta parte del trabajo intenta explicar la relación de cepas presentes en nódulos mediante el análisis del gen ARNr 16S. Si bien es cierto que se realizaron 61 aislamientos de los nódulos de las plantas de *Lupinus angustifolius* y que las 22 cepas a las que se les secuenció el gen ARNr 16S se ubicaron cerca de cuatro especies de *Micromonospora*, tal vez estos aislados no constituyen una colección representativa de toda la región donde se obtuvieron. Es factible pensar que la diversidad genética es mucho mayor, lo que cambiaría probablemente el número de grupos así como la proporción de cepas representantes de cada grupo.

Vale la pena resaltar, que se han publicado diversas especies del género *Micromonospora* las cuales presentan similitudes en su secuencia del gen ARNr 16S superiores al 99%. En algunas de nuestras cepas aisladas, las identidades en la secuencia del gen ARNr 16S con respecto a las cepas tipo de las especies validadas más próximas, están entorno al 98%, lo cual podría indicar que representan nuevas especies del género *Micromonospora*.

Por otra parte, al comparar los resultados del dendrograma (Figura 19) con los obtenidos en el análisis filogenético (Figura 20), se puede deducir que hay una elevada correlación entre los datos obtenidos de las técnicas moleculares (BOX-PCR, TP-RAPD y microsatélites) y los resultados de la secuenciación del gen ARNr 16S. Sin embargo, para una identificación mas confiable de las cepas aisladas se debe tener en cuenta los datos que resulten de la taxonomía polifásica, la cual incorpora los análisis fenotípicos como la fisiología y la quimiotaxonomía, además de los datos moleculares como la hibridación ADN-ADN o la secuenciación de otros genes de mantenimiento celular (Stackebrandt *et al.*, 2002).

4.5 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE LAS CEPAS DE *Micromonospora*

La caracterización fenotípica de las 61 cepas se llevó a cabo mediante el análisis de 66 pruebas fisiológicas y bioquímicas que incluyeron la capacidad de crecer en diferentes fuentes de carbono, la degradación de compuestos, así como el crecimiento en distintas condiciones de pH, temperatura y salinidad. A continuación se presentan los resultados más relevantes, sin embargo, los datos obtenidos en cada una de las cepas, se muestran en detalle en las tablas que aparecen descritas en el anexo 3.

a. Fuentes de carbono

En la Figura 21, se muestra el porcentaje de las cepas que utilizaron las distintas fuentes de carbono. Se puede apreciar que todas las cepas aisladas crecieron en glucosa, sacarosa y trehalosa; mientras que el 80% de las cepas fue capaz de emplear arabinosa, caseína, celobiosa, gelatina, maltosa, manosa, melibiosa y rafinosa.

Por otra parte, ninguna cepa fue capaz de utilizar propionato de sodio (Pro-Na), únicamente el 10% creció en almidón y solo dos cepas utilizaron débilmente el citrato de sodio (SB1-46 y SB1-47). Con relación a la utilización de los aminoácidos, se puede apreciar que el 30% de las cepas creció en asparagina, 15% en valina y el 5% en tirosina, mientras que en alanina, histidina y serina, no crecieron la mayoría de las cepas (Figura 21).

En términos generales y basados en los resultados obtenidos, se puede decir que las cepas *Micromonospora* aisladas de nódulos, pueden utilizar diversos sustratos para crecer y tal vez sea esta una de las razones por la que estos microorganismos se encuentran dispersos en la naturaleza. En el trabajo presentado por Kawamoto *et al.* (1983) evaluaron el crecimiento de cepas de *Micromonospora* en diferentes fuentes de carbono, y describen que la habilidad para utilizar azúcares está relacionado con la presencia de enzimas como las β -galactosidasa y xilosidasas. Además indican que existe una relación entre la actividad de la α glucosidasa y la utilización de sacarosa y maltosa por bacterias del género *Micromonospora* (Kawamoto *et al.*, 1983).

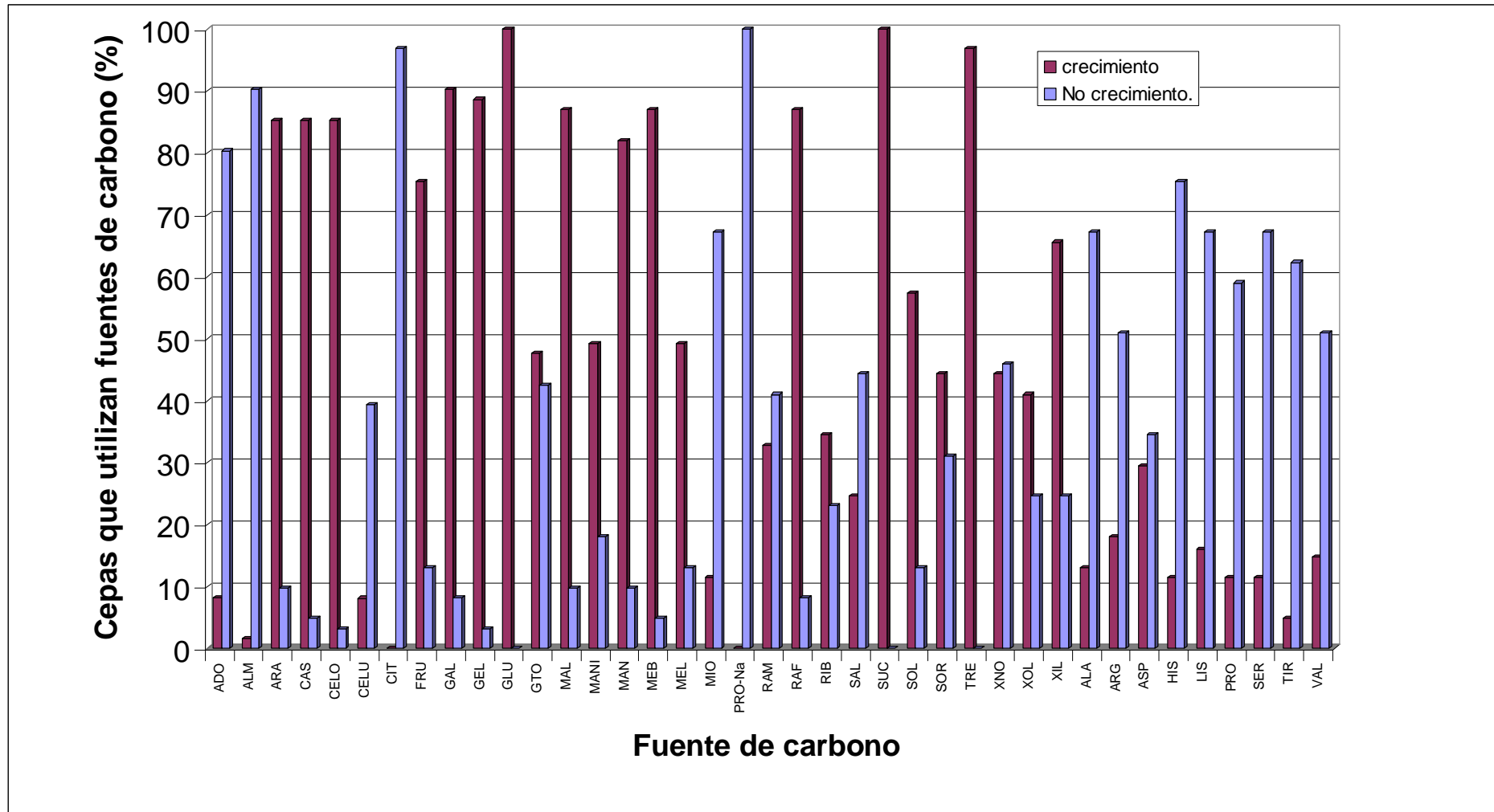


Figura 21. Utilización de las distintas fuentes de carbono por parte de las cepas SB1 y SB2 aisladas de nódulos.

b. Prueba de Hidrólisis, catalasa y oxidasa

Los resultados obtenidos para cada una de las cepas, se pueden observar con detalle en el anexo 3. Sin embargo, en la figura 22, aparecen resumidos los datos que se derivan del análisis de los resultados, los cuales se presentan como el porcentaje de cepas que degradan los sustratos.

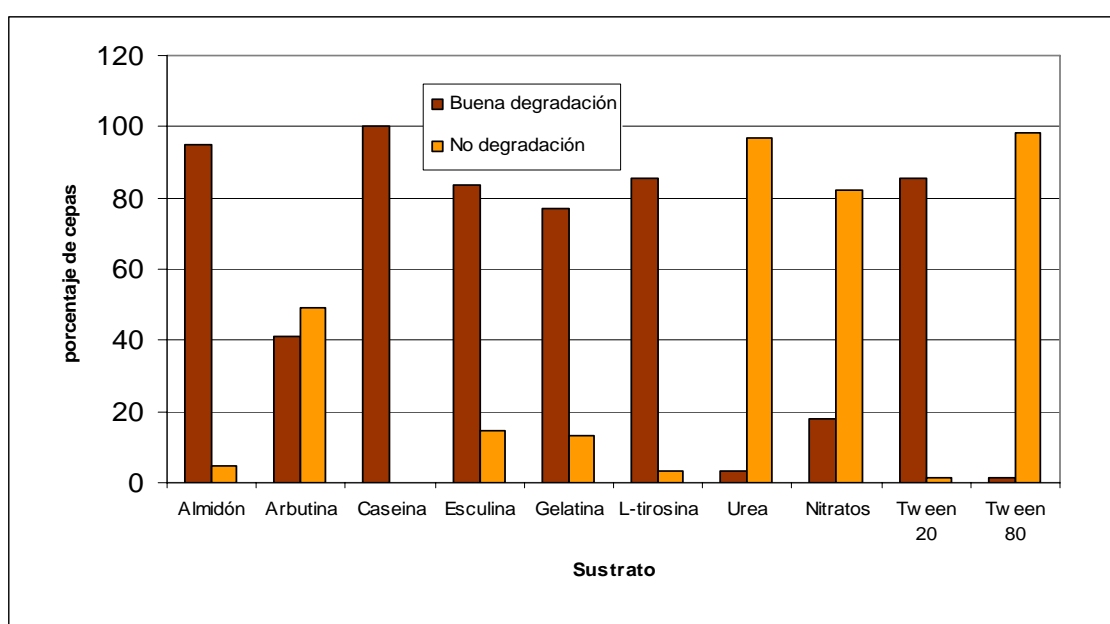


Figura 22. Porcentajes de cepas que degradan compuestos químicos.

Con relación a las pruebas de hidrólisis (Figura 22), se encontró que todas las cepas aisladas degradaron la caseína mientras que el 95% de las cepas hidrolizó el almidón. En el caso de L-tirosina y la esculina, cerca del 84% de las cepas fueron capaces de degradarlas y el 40% de las cepas consiguió utilizar la arbutina.

La reducción de nitratos se presentó en once cepas (18%), mientras que la hidrólisis de la urea la realizaron las cepas SB1-13 y SB1-48. Respecto a la degradación de ambos tipos de Tween, se puede apreciar que el Tween 20 fue degradado por el 85% de las cepas, mientras que únicamente la cepa SB2-12 hidrolizó el Tween 80.

Por otra parte, los resultados de producción de las enzimas catalasa y oxidasa, mostraron que el 79% de cepas que fueron catalasa positivo y el 90% de las cepas produjeron la enzima oxidasa.

c. Pruebas de resistencia al pH, temperatura y salinidad

En la Figura 23, aparecen consignados los resultados obtenidos con los valores de pH. Se puede apreciar que el pH óptimo para el crecimiento de todas las cepas fue 7.2, mientras que 28 cepas lograron crecer a pH 8.0. Vale la pena destacar que las cepas SB1-3 y SB2-13 crecieron a pH 5.5, mientras que las cepas SB1-28 y SB1-39 lo hicieron a pH 9.5.

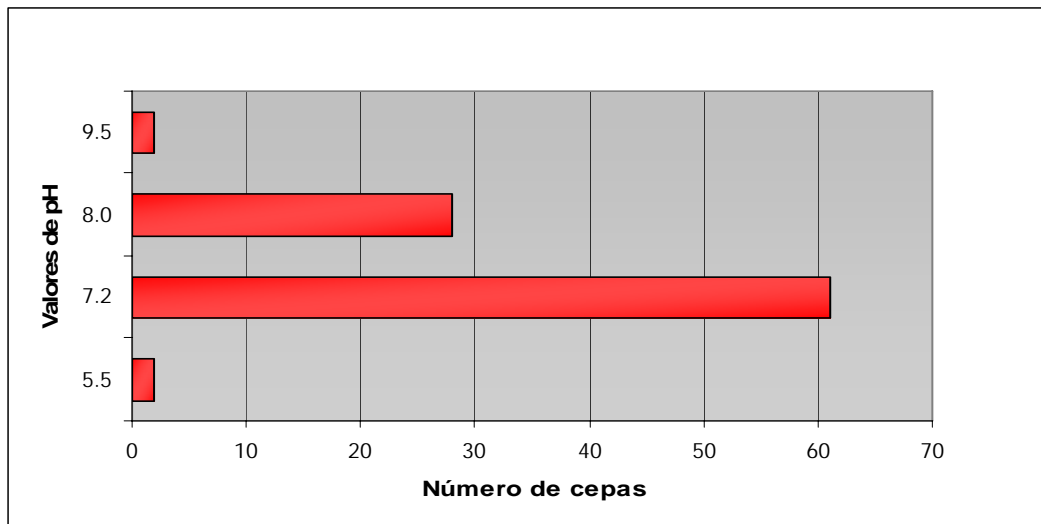


Figura 23. Número de cepas que crecen a diferentes valores de pH.

Respecto a los resultados obtenidos en el crecimiento de las cepas a diferentes temperaturas, se encontró que los mejores crecimientos estuvieron en el rango de 22°C a 37°C, sin embargo a la temperatura de 44°C fue capaz de crecer el 75% de las cepas (Figura 24).

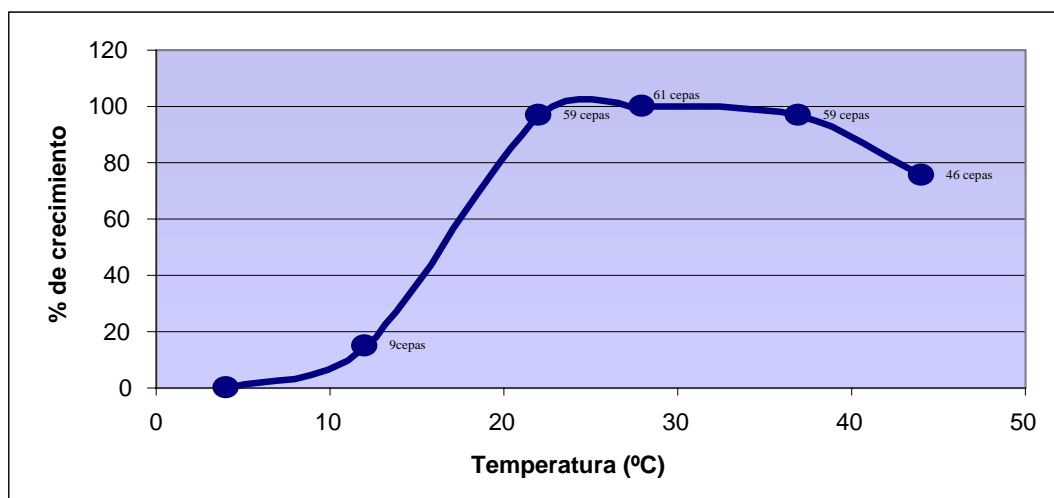


Figura 24. Crecimiento de las cepas a diferentes valores de temperatura.

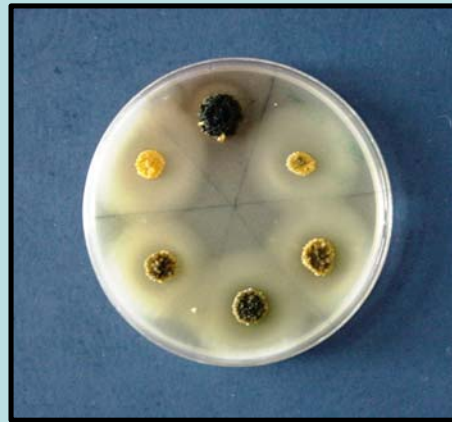
Con relación a la tolerancia de las cepas al cloruro de sodio, se encontró que todas crecieron bien en NaCl al 1%, el 74% creció en NaCl al 3%, pero por encima de esta concentración no se obtuvo crecimiento.

La susceptibilidad del género *Micromonospora* a condiciones ácidas y la tolerancia al cloruro de sodio ha sido descrita desde hace mucho tiempo (Luedemann, 1970, 1971), lo cual coincide con nuestros hallazgos en los que únicamente crecieron dos cepas a pH menores de 7.0 y ninguna creció en valores superiores al 3% de NaCl. La baja tolerancia de las cepas a estas condiciones, podría explicar la rara aparición de bacterias *Micromonospora* en algunos suelos (Kawamoto, 1989). Sin embargo, recientemente Jongrungruangchok *et al.* (2008) describieron la cepa *M. chaiyaphumensis* aislada de suelo, la cual puede crecer a pH de 4.0.

Finalmente, en las Figuras 25 y 26, se muestran las fotografías de algunas pruebas bioquímicas, donde se aprecia la diversidad de resultados obtenidos con las 61 cepas aisladas y que fueron evaluadas para 66 pruebas fisiológicas.



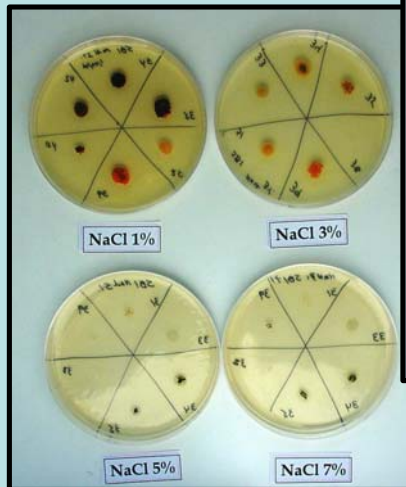
Degradacion de la gelatina



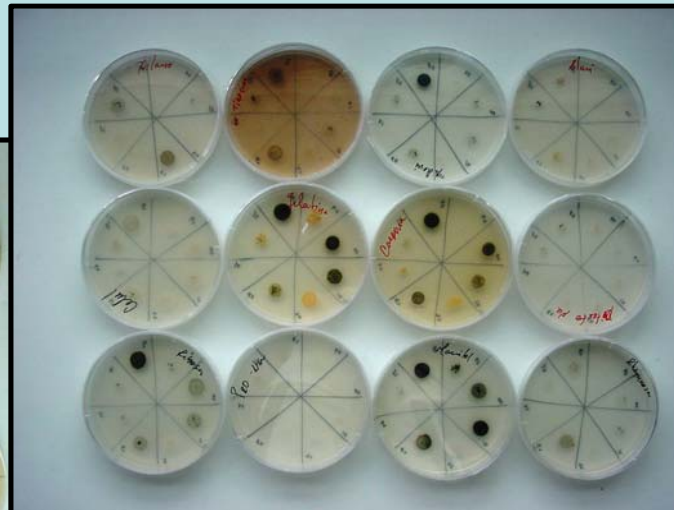
Crecimiento en N-Z amine



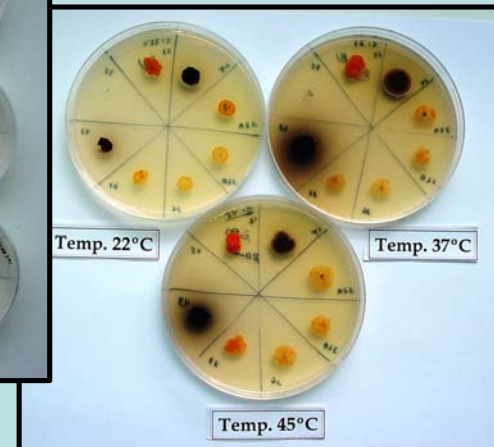
Degradacion de la caseina



Tolerancia al NaCl



Crecimiento en diversas fuentes de carbono

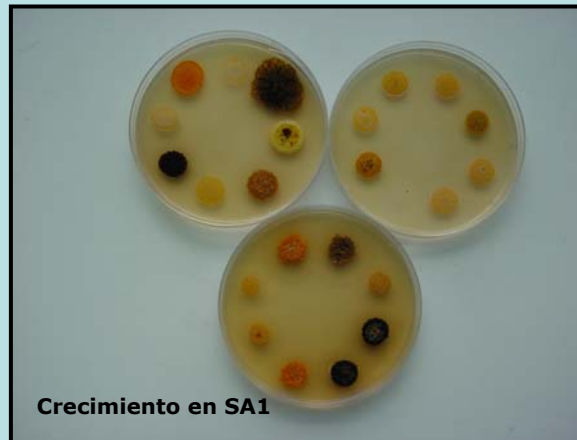


Ensayo de temperaturas

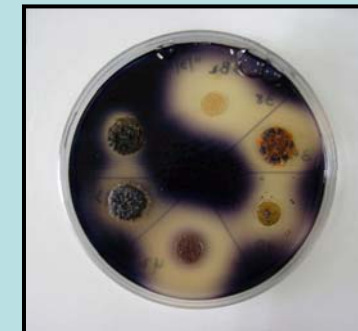
Figura 25. Pruebas fisiológicas y bioquímicas (a).



Utilización del Tween 20



Crecimiento en SA1



Degradación del almidón



Figura 26. Pruebas fisiológicas y bioquímicas (b)

4.5.1 Análisis de los resultados fisiológicos obtenidos de las cepas secuenciadas

Los análisis filogenéticos de las 22 cepas secuenciadas mostraron 4 grupos bien diferenciados (Figura 20), por lo tanto en este apartado, se presenta un análisis fisiológico de éstas cepas. Los resultados aparecen consignados en las Tablas 12, 13, 14 y 15, en las que se muestran los datos más significativos, mientras que en el anexo 3, se puede apreciar con más detalle los demás resultados.

Grupo I

Este grupo contiene las cepas SB2-1, SB2-2, SB1-4, SB1-35 y SB1-44, las cuales se relacionan con la especie *Micromonospora fulviviridis* DSM43906^T. Todas las cepas crecieron entre los 22°C y 37°C, mientras que SB1-4 y SB1-35 lograron crecer a 12°C. El pH óptimo estuvo entre 7.2-8.0, todas las cepas crecieron en NaCl al 1%, pero solo algunas cepas toleran el NaCl al 3% (Tabla 12).

Las cepas de este grupo utilizaron caseína, galactosa, maltosa, sacarosa o trehalosa entre otras fuentes de carbono. Ninguna creció en adonitol, citrato de sodio o en propionato de sodio (Tabla 13) y en la mayoría de los aminoácidos evaluados, se presentó un crecimiento escaso (Tabla 14). Todas degradan el almidón, caseína, esculina, gelatina, L-tirosina y Tween 20. Solamente la cepa SB1-4 fue capaz de hidrolizar el nitrato. Ninguna de las cepas transformó la urea ni el Tween 80 (Tabla 15).

Grupo II

El grupo está conformado por las cepas SB2-5, SB1-39 y SB1-45 y están ubicadas en el árbol cerca de la cepa tipo *Micromonospora echinospora* DSM 43816^T. Todas las cepas crecieron bien a 37°C, pH entre 7.2 y 8.0, y NaCl al 1%. Sin embargo, la cepa SB1-39 creció también a pH 9.5 y en una concentración de NaCl del 3.0% (Tabla 12).

La Tabla 13 muestra que las cepas de este grupo utilizaron celobiosa, glucosa, sacarosa y algunas crecieron débilmente en caseína, fructosa y xilosa; así como en los aminoácidos asparagina, o valina, entre otras fuentes de carbono (Tabla 14). Las tres cepas de este grupo degradaron el almidón, caseína, esculina, gelatina y L-tirosina. Únicamente la cepa SB1-45 hidrolizó la arbutina (Tabla 15).

Grupo III

Este grupo lo constituyen las cepas SB1-9, SB1-19, SB1-27 y SB1-46, ubicadas en el árbol filogenético cerca de la especie *Micromonospora chaiyaphumensis* JCM 12873^T. Respecto a las características fenotípicas presentadas, se encontró que todas crecieron entre los 22°C a 44°C, con la excepción de la cepa SB1-27 que no creció a 44°C. El pH óptimo para todas las cepas fue 7.2 y toleran una concentración de NaCl del 3% (Tabla 12).

La mayoría de las fuentes de carbono fueron utilizadas por este grupo de cepas, entre las cuales están: caseína, celobiosa, fructosa, rafinosa y trehalosa (Tabla 13). Algunas cepas crecieron bien en los aminoácidos asparagina, prolina, tirosina y valina, pero todas utilizaron la arginina (Tabla 14). En las pruebas de degradación se encontró que todas las cepas hidrolizaron almidón, caseína, esculina, gelatina, L-tirosina y el Tween 20. Únicamente la cepa SB1-46 transformó los nitratos y las cepas SB1-9 y SB1-19 hidrolizaron la arbutina (Tabla 15).

GRUPO IV

Este grupo ubicado en la parte inferior del árbol (Figura 20) lo conforman las cepas: SB2-4, SB2-8, SB2-9, SB2-12, SB1-13, SB1-22, SB1-30, SB1-32, SB1-36 y SB1-48, y están relacionadas con la cepa tipo *Micromonospora olivasterospora* DSM 43868^T. Todas crecieron a temperaturas entre los 22°C y 44°C, mientras que SB2-8 y SB1-30 también crecieron a 12°C. El pH óptimo para todas las cepas fue 7.2 y toleraron NaCl al 1% (Tabla 12).

Respecto al empleo de fuentes de carbono, se encontró que utilizaron caseína, celobiosa, galactosa (excepto SB1-32), glucosa, melibiosa, sacarosa y xilosa. Con escaso crecimiento de algunas cepas en celulosa. Solamente la cepa SB2-4 creció débilmente en almidón, mientras que las cepas SB2-12 y SB1-36 fueron las únicas que crecieron bien en ramnosa. Se presentó escaso crecimiento en la mayoría de los aminoácidos, sólo la cepa SB1-39 creció bien en algunos de ellos (Tabla 14).

La degradación de sustratos en este grupo de cepas, mostró que todas hidrolizan la caseína, L-tirosina y Tween 20. La cepa SB1-22 fue la única que no degradó la gelatina, mientras que la cepa SB2-4 fue la única que no hidrolizó el almidón. La transformación de la urea la realizaron las cepas SB1-13 y SB1-48, mientras que la arbutina fue hidrolizada por las cepas SB2-9 y SB2-12 (Tabla 15).

Tabla 12. Pruebas de crecimiento a diferentes a) temperatura, b) pH y c) NaCl, de las 22 cepas que fueron secuenciadas.

a. Prueba de temperaturas

	GRUPO I					M. fulvividis	GRUPO II			M. echinospora	GRUPO III				M. chalyaphu- mensis	GRUPO IV										M. olivasteros- pora										
	Sb2-1	Sb2-2	Sb1-4	Sb1-35	Sb1-44		Sb2-5	Sb1-45	Sb1-39		Sb1-9	Sb1-19	Sb1-27	Sb1-46		Sb2-4	Sb2-8	Sb2-9	Sb2-12	Sb1-13	Sb1-22	Sb1-30	Sb1-32	Sb1-36	Sb1-48											
4°C	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	nd	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12°C	-	-	+	+	-	nd	-	-	+	nd	-	-	-	-	nd	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22°C	+	+	+	+	+	nd	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
44°C	+	-	+	+	+	nd	-	-	+	nd	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

b. Crecimiento en pH

	GRUPO I					M. fulvividis	GRUPO II			M. echinospora	GRUPO III				M. chalyaphu- mensis	GRUPO IV										M. olivasteros- pora											
	Sb2-1	Sb2-2	Sb1-4	Sb1-35	Sb1-44		Sb2-5	Sb1-45	Sb1-39		Sb1-9	Sb1-19	Sb1-27	Sb1-46		Sb2-4	Sb2-8	Sb2-9	Sb2-12	Sb1-13	Sb1-22	Sb1-30	Sb1-32	Sb1-36	Sb1-48												
7.2	+	+	+	+	+	nd	+	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
8.0	+	+	+	+	+	nd	+	+	+	nd	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9.5	-	-	-	-	-	nd	-	-	+	nd	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

c. Crecimiento en NaCl

	GRUPO I					M. fulvividis	GRUPO II			M. echinospora	GRUPO III				M. chalyaphu- mensis	GRUPO IV										M. olivasteros- pora											
	Sb2-1	Sb2-2	Sb1-4	Sb1-35	Sb1-44		Sb2-5	Sb1-45	Sb1-39		Sb1-9	Sb1-19	Sb1-27	Sb1-46		Sb2-4	Sb2-8	Sb2-9	Sb2-12	Sb1-13	Sb1-22	Sb1-30	Sb1-32	Sb1-36	Sb1-48												
1.0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3.0%	-	-	+	+	+	nd	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0%	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+): Crecimiento de las cepas (-): No crecimiento (nd): No determinado.

Tabla13. Crecimiento en diferentes fuentes de carbono para las 22 cepas secuenciadas y organizadas por grupos según el árbol filogenético.

		GRUPO I					M. fulvividis	GRUPO II			M. echinospora	GRUPO III				M. chalyaphu- mensis	GRUPO IV										M. olivasteros- pora
		Sb2-1	Sb2-2	Sb1-4	Sb1-35	Sb1-44		Sb2-5	Sb1-45	Sb1-39		Sb1-9	Sb1-19	Sb1-27	Sb1-46		Sb2-4	Sb2-8	Sb2-9	Sb2-12	Sb1-13	Sb1-22	Sb1-30	Sb1-32	Sb1-36	Sb1-48	
ADO	ADONITOL	-	-	-	-	-	nd	-	+	-	nd	-	d	-	-	nd	+	-	-	-	-	-	-	+	+	d	nd
ALM	ALMIDON	-	-	d	-	-	nd	-	+	-	nd	-	-	-	-	nd	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CAS	CASEÍNA	+	+	+	+	+	nd	d	d	+	nd	+	+	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	nd
CELO	CELOBIOSA	+	d	-	+	+	nd	+	+	+	nd	+	+	+	+	nd	+	+	+	+	d	+	+	d	+	+	d
CELU	CELULOSA	d	-	d	d	+	nd	-	-	+	nd	d	-	d	+	nd	d	-	-	d	d	d	-	-	d	-	d
CIT	CITRATO DE SODIO	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	nd	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
FRU	FRUCTOSA	+	+	d	+	+	+	d	d	+	-	+	+	+	+	+	d	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
GAL	GALACTOSA	+	+	+	+	+	+	d	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
GEL	GELATINA	+	+	+	+	+	nd	-	d	+	nd	+	+	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	nd
GLU	GLUCOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAL	MALTOSA	+	+	+	+	+	nd	-	-	+	nd	+	+	+	+	nd	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
MANI	MANITOL	d	d	+	+	+	+	-	+	+	nd	d	d	-	-	-	d	+	+	+	+	d	-	+	+	-	-
MAN	MANOSA	+	+	+	+	+	-	d	-	-	-	+	+	+	+	nd	+	+	-	+	d	+	+	-	+	+	+
MEB	MELIBIOSA	+	+	+	+	+	nd	+	-	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	-
MEL	MELECITOSA	+	d	+	-	+	nd	-	+	d	nd	+	+	-	+	nd	+	d	d	-	d	+	+	d	+	+	-
MIO	MIO-INOSITOL	d	d	-	-	d	nd	-	-	-	nd	-	-	d	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRO	PROPIONATO DE Na	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	nd	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
RAM	RAMNOSA	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	d	-	-	-	d	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
RAF	RAFINOSA	+	+	-	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	d	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
SAL	SALICINA	d	+	d	-	-	nd	-	-	-	nd	-	+	d	-	+	+	-	+	-	d	d	-	d	d	-	-
SAC	SACAROSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOL	SORBITOL	+	+	-	+	+	nd	-	+	d	nd	+	+	+	+	nd	+	d	-	-	d	+	+	+	+	+	-
TRE	TREHALOSA	+	+	+	+	+	nd	+	+	d	nd	+	+	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+
XOL	XILITOL	-	-	+	+	+	nd	d	+	+	nd	+	d	d	+	nd	-	-	-	-	d	d	+	+	d	+	nd
XIL	XILOSIA	+	+	+	+	+	-	d	+	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	d	+	+

(+): Crecimiento de las cepas, (-): No crecimiento, (d): Crecimiento débil (escaso), (nd): no determinado.

Tabla 14. Evaluación de aminoácidos como fuente de Carbono para las 22 cepas secuenciadas.

		GRUPO I					GRUPO II			GRUPO III				GRUPO IV									
		Sb2-1	Sb2-2	Sb1-4	Sb1-35	Sb1-44	Sb2-5	Sb1-39	Sb1-45	Sb1-9	Sb1-19	Sb1-27	Sb1-46	Sb2-4	Sb2-8	Sb2-9	Sb2-12	Sb1-13	Sb1-22	Sb1-30	Sb1-32	Sb1-36	Sb1-48
ALA	ALANINA	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	+	d	d	-	-	-	-	d	-	d	-	-
ARG	ARGININA	-	-	-	-	-	d	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	d	d	-
ASP	ASPARAGINA	+	+	-	+	-	-	d	-	d	-	+	d	+	+	+	-	d	-	-	d	+	d
HIS	HISTIDINA	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
LIS	LISINA	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	+	d	-	+	-	-	-	-	d	d	-
PRO	PROLINA	-	d	-	-	d	-	-	-	+	-	+	d	d	-	-	-	d	-	-	-	d	-
SER	SERINA	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	d	-	-	-	-	d	d	-
TIR	TIROSINA	-	+	-	d	-	-	-	-	d	-	d	d	d	-	-	-	-	d	-	-	d	-
VAL	VALINA	d	+	-	d	-	-	-	d	+	-	d	+	d	-	-	d	-	-	-	d	d	-

(+): Crecimiento de las cepas (-): No crecimiento (d): Crecimiento débil (escaso)

Tabla 15. Pruebas de degradación de las cepas las 22 cepas secuenciadas.

		GRUPO I					M. fulvividis	GRUPO II			M. echinospora	GRUPO III				M. chalybaphumensis	GRUPO IV										M. olivasterospora						
		Sb2-1	Sb2-2	Sb1-4	Sb1-35	Sb1-44		Sb2-5	Sb1-45	Sb1-39		Sb1-9	Sb1-19	Sb1-27	Sb1-46		Sb2-4	Sb2-8	Sb2-9	Sb2-12	Sb1-13	Sb1-22	Sb1-30	Sb1-32	Sb1-36	Sb1-48							
ALM	ALMIDON	+	+	+	+	+	nd	+	+	+	nd	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAS	CASEÍNA	+	+	+	+	+	nd	+	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL	GELATINA	+	+	+	+	+	nd	d	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
TIR	L-TIROSINA	+	+	+	+	+	nd	d	+	+	nd	+	+	+	+	+	d	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
UR	UREA	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	nd	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
NITR	NITRATO	-	-	+	-	-	nd	-	-	-	d	-	-	-	+	nd	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ARB	ARBUTINA	-	+	+	+	-	nd	-	+	-	nd	d	+	-	-	nd	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
ESC	ESCLINA	+	+	+	+	+	nd	+	+	+	nd	+	+	+	+	nd	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	nd
T-20	TWEEN 20	+	+	+	+	d	nd	d	+	+	nd	+	d	+	+	nd	d	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
T-80	TWEEN 80	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	nd	-	-	-	-	nd	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd

(+): Crecimiento de las cepas, (-): No crecimiento, (d): Crecimiento débil (escaso), (nd): no determinado

Comparando los resultados de las cepas aisladas con la especie tipo más próxima, en la Tabla 13 se puede apreciar que las cepas del grupo I utilizan manosa, ramnosa y xilosa a diferencia de *M. fulviviridis*. Así mismo, las cepas que conforman el grupo II se diferencian de la especie *M. echinospora* en que utilizan fructosa, galactosa y xilosa, aunque no son capaces de reducir los nitratos (Tabla 15). Algunas cepas del grupo III presentaron buen crecimiento en rafinosa y un crecimiento escaso en manitol y ramnosa, mientras que la cepa con la que se relacionan, *M. chalyphumensis*, no fue capaz de utilizar estas fuentes de carbono (Tabla 13). Sin embargo, *M. chalyphumensis* creció a pH entre 4.0 y 9.0 mientras que las cepas de este grupo su pH óptimo fue 7.2 (Tabla 12).

Con relación a las cepas que conforman el grupo IV se encontró que utilizan manitol, melibiosa, melecitosa, ramnosa y sorbitol, a diferencia de la especie tipo *M. olivasterospora* que no creció en estos carbohidratos (Tabla 13). Sin embargo, *M. olivasterospora* transformó los nitratos mientras que la mayoría de las cepas del grupo IV no fueron capaces de degradarlo (Tabla 15).

Por otra parte, un análisis comparativo de las pruebas fenotípicas de las 22 cepas que fueron secuenciadas permite concluir que todas crecieron bien en caseína, celobiosa, glucosa, sacarosa, trehalosa y xilosa (Tabla 13). De los 4 grupos conformados únicamente la cepa SB1-45 del grupo II utilizó el almidón. En el caso de la ramnosa es utilizada por todas las cepas del grupo I, pero solo fue empleada por algunas cepas de los demás grupos. Ninguna cepa del grupo II fue capaz de crecer en salicina, mientras que en los demás grupos se presentó buen crecimiento por parte de algunas cepas (Tabla 13).

Respecto a la utilización de los aminoácidos (Tabla 14), la mayoría de las cepas no los emplean como fuentes de carbono. Solamente las cepas del grupo III crecieron bien en arginina y únicamente la cepa SB2-9 del grupo IV utilizó la histidina. Por otra parte, las 22 cepas degradaron el almidón, la caseína, la gelatina y la L-tirosina, ninguna cepa del grupo II fue capaz de hidrolizar los nitratos y únicamente la cepa SB2-12 del grupo IV degradó el Tween 80. Los mejores crecimientos se presentaron a temperaturas entre los 22°C a 37°C y pH de 7.2, con excepción de las cepas del grupo I y II que crecieron a pH de 8.0. Finalmente, ninguna de las cepas creció en concentraciones superiores al 3% de NaCl. La gran variabilidad de resultados encontrados en las pruebas bioquímicas, entre las cepas ubicadas en los distintos grupos y las especies tipo con las que se relacionan, apoya la idea que los microorganismos aislados corresponden a especies diferentes.

CONCLUSIONES CAPÍTULO I:

- ✓ Se obtuvieron 61 cepas con características del género *Micromonospora*, a partir de nódulos efectivos de *Lupinus angustifolius*. La biodiversidad encontrada de *Micromonospora*, muestra la amplia distribución de estas bacterias dentro de los nódulos de la leguminosa *Lupinus*.
- ✓ Los perfiles de BOX-PCR permitieron distribuir a las cepas en 6 grupos diferentes, lo cual indica la elevada diversidad genética entre las cepas evaluadas.
- ✓ La biodiversidad obtenida con la técnica de TP-RAPD también fue muy alta con la cual se logró separar a las 61 cepas aisladas en 5 grupos diferentes.
- ✓ Es la primera vez que se realiza la caracterización molecular de cepas de *Micromonospora* aislada de nódulos utilizando la técnica de microsatélites. Con dicha técnica se obtuvieron 5 perfiles distintos.
- ✓ En general, la caracterización de las cepas SB1 y SB2 por las metodologías utilizadas BOX-PCR, TP-RAPD y microsatélites, presentaron una buena relación a nivel intraspecífico con pequeñas diferencias en la formación de grupos genotípicos. Los resultados de dicha caracterización permitieron seleccionar 22 cepas a las que se les realizaron estudios de secuenciación del gen ARNr 16S.
- ✓ La secuenciación del gen ARNr 16S permitió identificar las cepas evaluadas con las cepas tipo *Micromonospora fulviviridis* DSM 43906^T, *Micromonospora chaiyaphumensis* JCM 12873^T, *Micromonospora olivasterospora* DSM 43868^T y *Micromonospora echinospora* DSM 43816^T. Los porcentajes de similitud con respecto a la cepa tipo más próxima oscilan entre el 98% y 99%, lo cual indica que algunas cepas pueden representar especies diferentes a falta de otros estudios como la hibridación ADN-ADN.
- ✓ Se encontró una buena correlación entre los datos alcanzados por la técnicas moleculares BOX-PCR, TP-RAPD y microsatélites y las secuencias obtenidas del gen ARN 16S.
- ✓ Los resultados de la caracterización fenotípica muestran una gran diversidad fisiológica en las cepas aisladas. La gran mayoría de cepas fueron capaces de asimilar una variedad de fuentes de carbono, degradar compuestos, crecer en diversas temperaturas, pH o NaCl, entre otras pruebas bioquímicas.

CAPÍTULO II

NODULACIÓN DE LA LEGUMINOSA *Lupinus albus* POR BACTERIAS DEL GÉNERO *Paenibacillus*

CAPÍTULO II

NODULACIÓN DE LA LEGUMINOSA *Lupinus albus* POR BACTERIAS DEL GÉNERO *Paenibacillus*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 BIODIVERSIDAD DE MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS EN LA FIJACIÓN DEL NITRÓGENO

Los procariotas que fijan nitrógeno (diazótrofos) están ampliamente distribuidos en el ambiente e incluyen a microorganismos aerobios, anaerobios, autótrofos, heterótrofos, metanótrofos, en vida libre o en simbiosis (Raymond *et al.*, 2004). En el caso de las arqueas, la fijación del nitrógeno se conoce solamente dentro del *phylum* Euryarchaeota en las clases Methanosarcinales, Methanobacteriales, Halobacteriales y Methanococcales (Mehta *et al.*, 2006).

En el dominio *Bacteria* la fijación de nitrógeno se presenta en 6 de los más de 25 *phyla* bacterianos descritos (Raymond *et al.*, 2004), estos son: las bacterias verdes del azufre, cianobacterias, bacterias Gram positivas de bajo y alto contenido de G+C, Spirochaetes, Firmicutes y Proteobacteria, siendo esta última, la división bacteriana más abundante y a la que pertenecen todos los rizobios (Rappé *et al.*, 2003). La presencia de genes *nif* en estos microorganismos corresponde a diazótrofos que han sido cultivados y la fijación de nitrógeno se ha demostrado bioquímicamente, o por la presencia del operón *nifHDK* que codifica para el complejo nitrogenasa o por la amplificación de su secuencia por PCR (Mehta *et al.*, 2003).

Con relación a la fijación simbiótica del nitrógeno, se presentan tres tipos de interacciones: i) cianobacterias heterocísticas que ocupan tejidos de hepáticas, helechos, cíadas y dicotiledóneas, ii) actinobacterias representados por bacterias del género *Frankia*, que forma nódulos con muchas plantas no leguminosas de varias familias que incluyen a los géneros *Alnus* y *Prusia* y, iii) los rizobios que forman nódulos en muchas leguminosas y excepcionalmente con una no leguminosa, como es la *Parasponia*, miembro de la familia *Ulmaceae* (Martínez y Phillips, 2000).

Lloret y Martínez-Romero (2005) señalan que la fijación de nitrógeno es muy compleja como para que hubiese surgido más de una vez en la evolución. La similitud de los genes *nifD* y *nifK* de la arquea *Methanobacterium thermoautotrophicum* y la bacteria *Bradyrhizobium japonicum* (Xiong *et al.*, 2000), sugiere un proceso de duplicación muy temprano de la nitrogenasa ancestral, que precedió a la diferenciación de los dominios *Bacteria* y *Archaea*.

La amplia distribución de organismos fijadores de nitrógeno se ha interpretado desde un enfoque clonal, al suponer que la capacidad de fijar nitrógeno fue una característica que se perdió cuando hubo cambio de la atmósfera primitiva de anoxigénica a oxigénica. Otra interpretación plantea la participación de la transferencia horizontal de genes de algunas cepas a otras que las integraron como parte de sus genomas, para quienes representó una ventaja adaptativa (Lloret y Martínez-Romero, 2005).

Un ejemplo que ilustra que la transferencia de genes *nif* puede ocurrir de manera transversal, lo representa *Chlorobium tepidum* TSL que pertenece a la división de bacterias verdes del azufre, el cual presenta un ordenamiento del operón de los genes de fijación de nitrógeno muy similar al de la arquea *Methanobacterium thermoautotrophicum*, lo que hace suponer que el grupo completo de genes pudo haber sido transferido lateralmente entre estos dos linajes (Eisen *et al.*, 2002). De igual manera se ha descrito que los genes *nif* de cepas de *Frankia* han sido adquiridos por transferencia horizontal, ya que están filogenéticamente más cerca de las cianobacterias que de otras bacterias Gram positivas (Normand *et al.*, 1988).

En el caso de las bacterias del género *Paenibacillus*, se ha encontrado que los genes *nif* de una cepa de *Paenibacillus azotofixans* están asociados con los genes *nifH* de miembros del dominio *Archaea* (*Methanothermococcus*) siendo la primera descripción que se realizaba de una bacteria Gram positiva altamente relacionada con diazótrofos metanógenos (Choo *et al.*, 2003). En el trabajo de Ding *et al.* (2005) se aisló la cepa G2 identificada como *Paenibacillus polymyxa* y el árbol filogenético generado de la secuencia parcial de los genes *nifH*, muestra su ubicación en el grupo de *Klebsiella pneumoniae* AAO85881.

En el trabajo realizado por Zakhia *et al.* (2006) se caracterizaron endofitos aislados de nódulos de diversas leguminosas entre los que hallaron cepas de *Paenibacillus*. Estas cepas no indujeron la formación de nódulos cuando fueron

inoculadas en la leguminosa *Macroptilium atropurpureum* (Siratro) y los genes *nodA* no se pudieron amplificar por PCR; sin embargo, obtuvieron la secuencia de los genes *nifH* la cual fue similar a la de *Sinorhizobium meliloti*.

Por otra parte, es importante destacar que desde hace mucho tiempo se han aislado bacterias del género *Paenibacillus* involucradas en la fijación de nitrógeno como *Paenibacillus polymyxa* (Grau y Wilson, 1962), *Paenibacillus macerans* (Witz *et al.*, 1967), *Paenibacillus azotofixans* (Seldin *et al.*, 1984), mientras que la reducción de acetileno, como un indicativo de la capacidad de fijación de nitrógeno, se ha detectado en especies como *Paenibacillus peoriae* (Vonderweid *et al.*, 2002) y en algunas cepas de *Paenibacillus massiliensis* (Ding *et al.*, 2005).

Recientemente se han descrito nuevas especies de *Paenibacillus* que contienen los genes *nifH* entre los que se encuentran: *Paenibacillus graminis* y *Paenibacillus odorifer* (Berge *et al.*, 2002), *Paenibacillus forsythiae*, *Paenibacillus zanthoxyli* y *Paenibacillus sabinae* aislados de la rizosfera de diversas plantas (Ma *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2007a; Ma y Chen, 2008). Así mismo *Paenibacillus donghaensis* (Choi *et al.*, 2008) aislado de sedimentos marinos, así como algunas especies de *Paenibacillus* encontradas en la rizosfera de sorgo (Coelho *et al.*, 2008).

1.2 LA NODULACIÓN EN EL *phylum Proteobacteria*

Las leguminosas han desarrollado asociaciones simbióticas con bacterias específicas del suelo, lo cual permite a la planta crecer y reproducirse en ambientes pobres en nitrógeno. A partir de la asociación que se presenta entre las plantas y los microorganismos, se forman órganos en la raíz llamados nódulos en los cuales la bacteria se diferencia en bacteroides fijadores de nitrógeno.

Debido a que las plantas no son móviles, para que se dé la formación del nódulo, el primer contacto lo inicia la bacteria de la rizosfera que se aproxima a la raíz. Las sustancias responsables de inducir la formación de los nódulos son oligómeros de N-acetil-D-glucosamina N-acilados, producidos por los rizobia y denominados factores de nodulación (factores Nod) (Lerouge *et al.*, 1990).

Los factores Nod se componen de una estructura básica y presentan modificaciones en los extremos reductor y no reductor (Figura 27). La estructura básica es sintetizada por el producto de los genes *nodABC* presentes en todos los

rhizobia y sus modificaciones incluyen: metilaciones, acetilaciones, sulfataciones y glucosilaciones que pueden variar en cada especie (Broughton *et al.*, 2000).

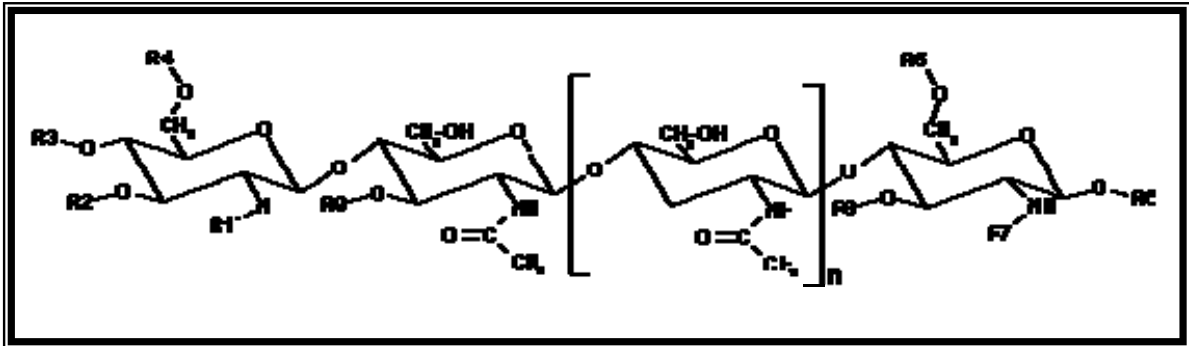


Figura 27. Modelo esquemático de los factores Nod. Rn: sitios de modificación. n: número variable de moléculas de N-acetil-glucosamina (de 3 a 6).

La enorme diversidad de factores Nod ha sido tema de varias revisiones (Debellé *et al.*, 2001; Van Rhijn y Vanderleyden, 1995), en las que se describe que más de 50 genes han sido identificados y relacionados con la nodulación los cuales están involucrados en la biosíntesis, modificación, regulación, transporte y secreción de los factores Nod.

El término "genes *nod*" se aplica de forma genérica a todos los genes involucrados en la nodulación y, conforme han sido identificados, se les han asignado letras del alfabeto. El número de letras del alfabeto no fue suficiente para nombrarlos a todos y fueron necesarias nuevas rondas y otra designación de código de tres letras. Los genes *nod* corresponden a la primera ronda del alfabeto, los genes *noi* son la segunda ronda, y posteriormente han sido descritos los genes *noe* (Lloret y Martínez-Romero, 2005).

Por otra parte, la capacidad de las bacterias diazótroficas de establecer simbiosis con las leguminosas, ha sido descrita principalmente en la clase α -Proteobacteria (Young, 1996), sin embargo, el hallazgo relativamente reciente de microorganismos clasificados en las β -Proteobacteria que nodulan leguminosas (Moulin *et al.*, 2001) amplió el inventario de diazótroficos capaces de nodular dentro del *phylum* *Proteobacteria* (Figura 28). En este grupo se describieron dos nuevas ramas de simbiosis, representados por *Burkholderia tuberum*, *Burkholderia phymatum* y *Ralstonia taiwanensis*, recientemente renombrada como *Wautersia taiwanensis* (Vanechoutte *et al.*, 2004).

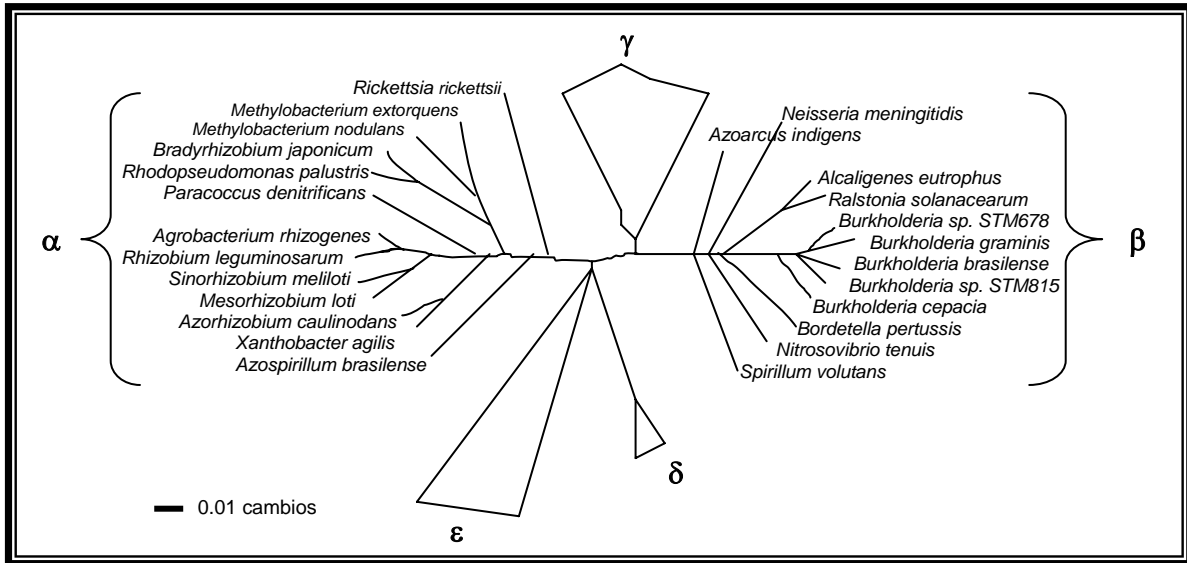


Figura 28. Árbol de las Proteobacterias basado en el gen ARNr 16S. Moulin *et al.*, 2001.

En los últimos años se han descrito *Methylobacterium nodulans* (Sy *et al.*, 2001), *Devosia neptuniae* (Rivas *et al.*, 2002), *Ochrobactrum lupini* (Trujillo *et al.*, 2005), *Phyllobacterium trifolii* (Valverde *et al.*, 2005), *Cupriavidus taiwanensis* (Chen *et al.*, 2001) y *Burkholderia cepacia* (Rasolomampianina *et al.*, 2005).

La presencia de genes de nodulación dentro del *phylum Proteobacteria* plantea dos hipótesis de su posible origen. Un enfoque clonal llevaría a suponer que la capacidad de los rizobios de nodular a las leguminosas pueda tener un origen único en la división *Proteobacteria* y que aún estén por descubrirse nuevas especies y géneros de simbioses dentro de las β -Proteobacterias. Además, se cree que también existe la posibilidad de encontrar bacterias dentro de las γ -Proteobacterias que por estructura primaria y secundaria del ARNr 16S, están muy relacionadas con las β -Proteobacterias (Balachandar *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2003).

El otro enfoque explica la capacidad de nodulación por las bacterias como el resultado de la transferencia lateral de los genes requeridos para la simbiosis, lo cual provocaría un salto cuántico en la evolución de algunos linajes dentro de las Proteobacterias (Chen *et al.*, 2003).

La presencia de diazótrofos dentro de α y β -Proteobacterias así como la ubicación de la información genética de la simbiosis dentro de plásmidos, hicieron suponer que la capacidad de fijar nitrógeno en simbiosis fue adquirida por

transferencia lateral y no por la vía de la herencia. Se cree que dicha transferencia provino de una α -Proteobacteria, clase en la que ha sido descrita hasta el momento la mayor diversidad de géneros y especies que poseen la capacidad de establecer simbiosis con las leguminosas (Moulin *et al.*, 2004; Lloret y Martínez-Romero, 2005).

1.2.1 ¿Nodulación sin genes *nod*?

Hasta el momento, los genes *nodABC* se habían identificado en todos los rhizobia estudiados en cientos de cepas en el mundo, lo que sugiere un mecanismo único de reconocimiento entre rhizobium y leguminosas. Sin embargo, Giraud *et al.* (2007) trabajando con un equipo de Francia (IRD, Génoscope, CEA, CIRAD, CNRS) y de Norte América (Universidades de Minnesota y Missouri) demostraron que algunas cepas de *Bradyrhizobium* tales como ORS278 y BTAi1 carecen de los genes *nodABC* canónicos y ponen en tela de juicio la universalidad de este mecanismo (Giraud *et al.*, 2007).

Varios estudios ya habían destacado el carácter especial de las bacterias *Bradyrhizobium* ORS278 y BTAi1, debido a que han sido las primeras bacterias fotosintéticas descritas entre los rhizobia (Giraud *et al.*, 2000). Además, estos microorganismos son capaces de inducir la formación de los nódulos en las raíces y tallos de ciertas leguminosas acuáticas tropicales, tales como *Aeschynomene*, facilitando a dichas plantas una capacidad excepcional de fijar nitrógeno (Figura 29).

A diferencia de otras leguminosas, la infección por la bacteria no se da por una distorsión de los pelos, sino directamente a las zonas de las lesiones causadas por la aparición de raíces secundarias o raíces adventicias presentes a lo largo del tallo. Las bacterias *Bradyrhizobium* también se encuentran naturalmente asociadas con las especies silvestres de arroz (*Oryza breviligulata*), que vive en algunos estanques temporales de Senegal con especies de *Aeschynomene*. Las bacterias prosperan en la superficie de la raíz de *Oryza*, y aunque no producen nódulos, aumentan el crecimiento de las plantas y la producción de arroz (Chaintreuil *et al.*, 2000).

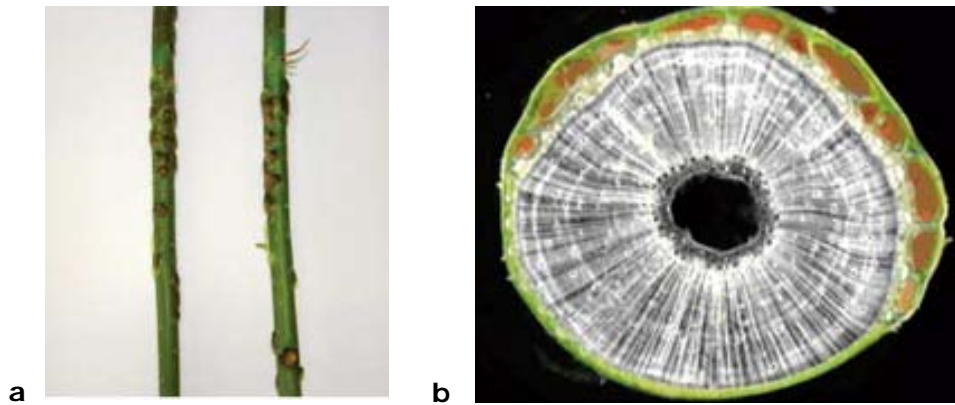


Figura 29. Nodulación de la planta de *Aeschynomene sensitiva* por la cepa *Bradyrhizobium* ORS278 a) Tallo de la planta en la que se ven los nódulos formados b) sección transversal del nódulo, el color rojo se debe a la leghemoglobina. Giraud *et al.*, 2007.

El análisis de la secuencia completa del genoma de las cepas de *Bradyrhizobium* fotosintéticos ORS278 y BTAi1, revela la ausencia de plásmidos o de islas simbióticas que contengan los genes *nod* (Giraud *et al.*, 2007). Las cepas *Bradyrhizobium* ORS278 y *Bradyrhizobium* BTAi1, son capaces de nodular las plantas *Aeschynomene indica*, *Aeschynomene sensitiva* y *Aeschynomene afraspera*.

En el análisis de las propiedades simbióticas empleando la cepa mutante ORS285 se encontró que este mutante había perdido su capacidad de nodular *A. afraspera*, pero que conservaba su capacidad de nodular *A. Indica* y *A. sensitiva*. Este último resultado, de acuerdo con el análisis genómico, era una prueba más que indicaba que la nodulación de ciertas especies de leguminosas se puede hacer a través de un proceso independiente de los genes *nod* (Giraud *et al.*, 2007).

Para responder a la pregunta ¿Cómo es posible que algunas cepas de *Bradyrhizobium* realicen simbiosis con leguminosas en ausencia de los factores Nod? Giraud *et al.* (2007) seleccionaron 9500 cepas ORS278 mutantes obtenidas por inserción al azar de un transposón, en busca de clones no inductores de la formación de nódulos. Una gran proporción de mutantes y seleccionados (14 de 27) se vieron afectados en diferentes genes implicados en la biosíntesis de la purina. Como las citocininas son derivados de la purina y hace poco se demostró un receptor de estas fitohormonas desempeñando un papel clave en la nodulación entre otras leguminosas (Tirichine *et al.*, 2007), los investigadores proponen que una citocinina producida por la cepa *Bradyrhizobium* ORS278 pone en marcha la organogénesis del nódulo en algunas plantas del género *Aeschynomene*.

Los genes *nodABC* han sido identificados y caracterizados desde hace mucho tiempo, lo cual indica que la nodulación de algunas leguminosas en ausencia de los "reglamentarios" genes *nod* es un fenómeno inusual. En este descubrimiento realizado por Giraud *et al.* (2007), se plantean grandes e interesantes preguntas:

- ¿Es el primer paso de reconocimiento el iniciado por los factores *nod* un simple "by pass" en algunas leguminosas, especialmente en aquellas en las que se produce la infección por la vía de los "cracks"?
- ¿Cuáles son las señales moleculares que desencadenan directamente la formación de nódulos en algunas leguminosas como la del género *Aeschynomene*?
- ¿Hay alguna relación entre los mecanismos moleculares utilizados por *Bradyrhizobium* fotosintéticos y otros organismos simbióticos como *Frankia* los cuales inducen nodulación en plantas no-leguminosas?

Además Giraud *et al.* (2007) sugiere que son necesarios estudios adicionales para confirmar cuales citocininas constituyen la nueva puerta a esta simbiosis. Sin embargo, este descubrimiento, demuestra una vez más que aún existe en la naturaleza una excepción para confirmar la regla, ya que abre nuevas vías para el estudio de las interacciones planta-bacteria.

1.3 EI GÉNERO *Paenibacillus*

En un análisis comparativo de las secuencias del gen ARNr 16S de diferentes especies del género *Bacillus*, Ash *et al.* (1993) definieron un nuevo género al que llamaron *Paenibacillus*. El género *Paenibacillus* fue creado con 11 especies y *Paenibacillus polymyxa* fue considerada la especie tipo del género. Desde su creación se han realizado transferencias de especies desde el género *Bacillus* y la descripción de nuevas especies de *Paenibacillus* se ha incrementado considerablemente en los últimos años, a tal punto que se ha pasado de 33 especies validadas en el año 2003, a 90 especies descritas a la fecha de escritura de esta memoria (www.bacterio.cict.fr/p/Paenibacillus.html).

Las bacterias del género *Paenibacillus* son bacilos Gram variables, aerobios o anaerobios facultativos y forman endosporas (Figura 30). Están ampliamente distribuidos en el ambiente apareciendo en suelos, agua, larvas de insectos y alimentos (Daane *et al.*, 2002), heces de vaca (Velázquez *et al.*, 2004), sedimentos

del ártico (Montes *et al.*, 2004), rizosfera (Rivas *et al.*, 2005), compost (Vaz-Moreira *et al.*, 2007) o suelos de campo de cultivo de *Ginkgo biloba* (Yoon *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008).

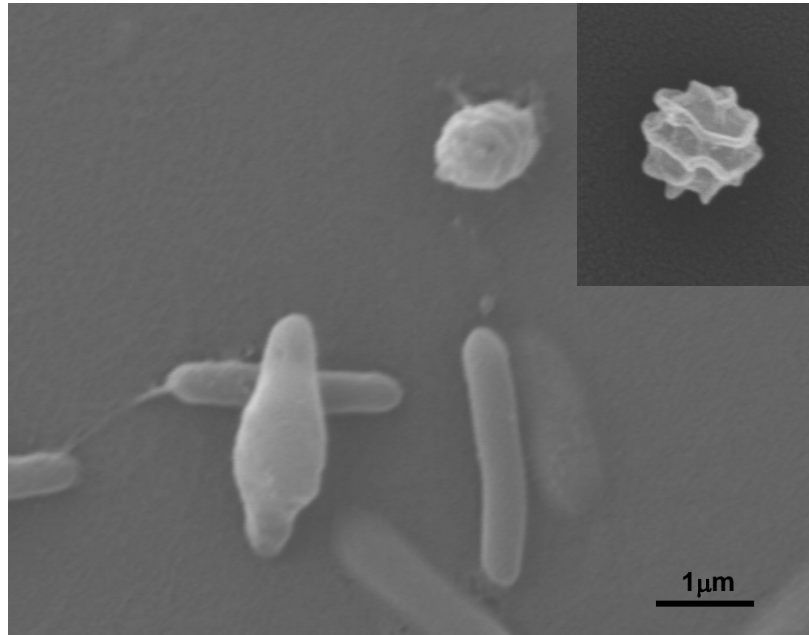


Figura 30. Morfología del género *Paenibacillus*. En el recuadro superior derecho se observa la forma de la endospora.

Estos microorganismos son importantes desde el punto de vista económico (Chung *et al.*, 2000) e incluyen cepas que son utilizadas en procesos de biorremediación de suelos contaminados con derivados del petróleo (Christopher *et al.*, 2004), así como en procesos de biodesulfurización de crudos, en los que con el empleo de especies termófilas de *Paenibacillus* se ha visto que se alcanzan mayores velocidades específicas de desulfuración, menores problemas de contaminación y mejoras en la estabilidad de los biocatalizadores (Onaka *et al.*, 2001).

Algunas especies de *Paenibacillus* son capaces de producir polisacáridos, aminoácidos, metabolitos secundarios o enzimas extracelulares como xilanasas, celulasas y amilasas (Choi *et al.*, 2008), de igual manera, algunas cepas de *Paenibacillus* son capaces de fijar nitrógeno atmosférico (Poly *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2005).

1.3.1 Empleo de bacterias del género *Paenibacillus* como promotoras del crecimiento vegetal

Muchas bacterias que habitan en la raíz y estimulan de manera significativa el crecimiento de plantas fueron definidas por Kloepper (1993) como PGPB (*promoting growth plant bacteria*). Los metabolitos producidos por las PGPB pueden suprimir e inhibir el crecimiento de microorganismos perjudiciales para el desarrollo de la planta (Glick, 1995) a través de la producción de sideróforos, antibióticos, la acción de enzimas líticas (glucanasas, quitinasas) o mediante la inducción de mecanismos de resistencia (Figura 31).

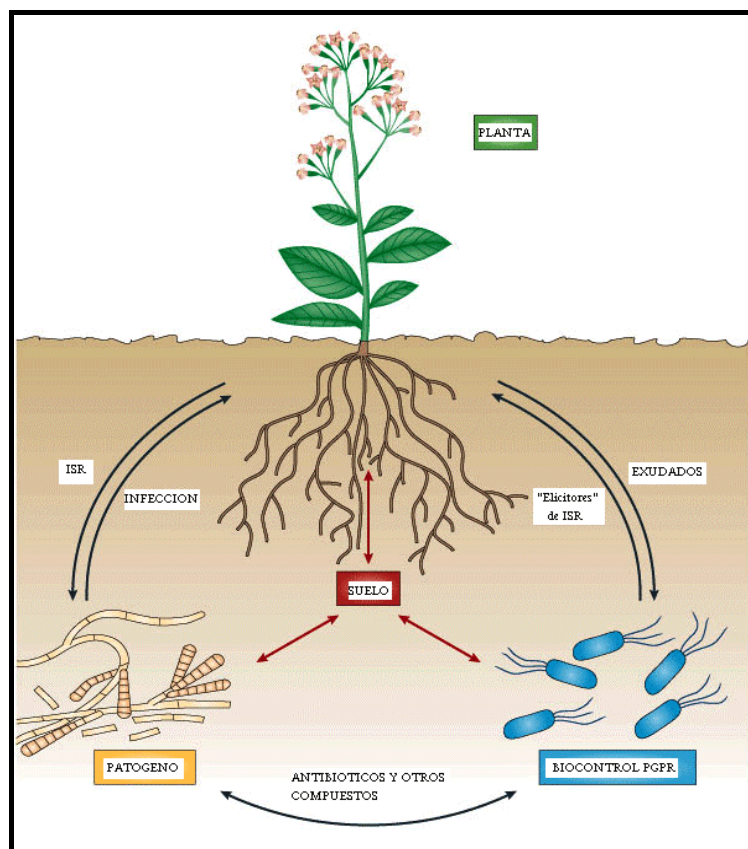


Figura 31. Interacción entre PGPB, plantas, patógenos y suelo. Hass y Défago, 2005.

Las PGPB también están relacionadas con el incremento de la nodulación y la fijación de nitrógeno, ya que mejoran la interacción que se da entre plantas y rizobia (Parmar y Dadarwal, 1999). La mayoría de bacterias presentes en los nódulos son rizobacterias de vida libre, sin embargo, algunas pueden ser endofitas y residen intercelular o intracelularmente en el tejido del huésped (Sturz *et al.*, 2000), del cual obtienen beneficios como el protegerse del estrés ambiental o de la competencia microbiana (Kobayashi y Palambo, 2000).

Teniendo en cuenta el incremento en el peso seco de la raíz y el número de nódulos, algunos trabajos realizados en invernadero muestran que cuando las plantas son coinoculadas con bacterias aisladas de nódulos presentan una mejor salud, crecimiento y productividad que cuando sólo son inoculadas con rhizobia (Bai *et al.*, 2002; Barea *et al.*, 2005).

Otros estudios han descrito el aislamiento de bacterias del género *Bacillus* como endofitos de plantas (Araujo *et al.*, 2001) las cuales se coinocularon con *Rhizobium* spp. en plantas de garbanzo y se observó una mejoría en el crecimiento, nodulación y fijación de nitrógeno (Parmar y Dadarwal, 1999). Así mismo, se ha utilizado *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii tanto con *Bacillus insolitus* como con *Bacillus brevis* (Sturz *et al.*, 1997) y se ha coinoculado *Bacillus* spp. con *Bradyrhizobium japonicum* (Bai *et al.*, 2003) en cultivos de soja. Rajendran *et al.* (2007) mejoraron el crecimiento y la nodulación de guisantes al coinocular *Bacillus* spp. con *Rhizobium* spp.

Por otra parte, se ha descrito que algunas especies del género *Paenibacillus* actúan como PGPB, ya que influyen de manera directa en el crecimiento de las plantas al producir fitohormonas, nutrientes, fijar nitrógeno y actuar contra microorganismos patógenos. Un ejemplo lo constituye el empleo de *Paenibacillus polymyxa*, el cual se ha encontrado en la rizosfera de diferentes cultivos y en la que tiene la habilidad de secretar sustancias que mejoran el crecimiento de la planta (Lebuhn *et al.*, 1997), de fijar nitrógeno y solubilizar los fosfatos (Holl y Chanway, 1992).

Así mismo, Izumi *et al.* (2008) estudiaron la diversidad de endofitos en tejidos de raíz, tallo y hojas de algunas coníferas, encontrando algunas especies de *Paenibacillus*. También se han aislado cepas de *Paenibacillus* endofitas de cultivos de trigo (Beneduzi *et al.*, 2008) y de la planta "ginkgo" donde se encontró que estas bacterias ejercían una actividad antifúngica (Cho *et al.*, 2007).

Petersen *et al.* (1996) coinocularon una cepa de *Paenibacillus* sp. con *Rhizobium etli* y observaron un efecto indirecto en la nodulación así como en el crecimiento de la planta *Phaseolus vulgaris*. Además otras especies de *Paenibacillus* fijadores de nitrógeno como *Paenibacillus azotofixans*, *Paenibacillus peoriae* y *Paenibacillus brasiliensis*, son importantes para el crecimiento de las plantas por la capacidad que tienen para fijar nitrógeno en suelos pobres que carecen de este nutriente (Da Silva *et al.*, 2003; Choo *et al.*, 2003; Barea *et al.*, 2005).

2. OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar bacterias fijadoras de nitrógeno diferentes del género *Bradyrhizobium* que se encuentren en nódulos de la leguminosa *Lupinus angustifolius* recolectadas de la localidad de Saelices el Chico (Salamanca).

Objetivos específicos

- ✓ Aislar y caracterizar las poblaciones bacterianas a partir de nódulos de la planta de *Lupinus angustifolius*.
- ✓ Estudiar la capacidad de nodulación de las cepas aisladas de *L. angustifolius* e inoculadas en la planta de *Lupinus albus* y determinar la fijación de nitrógeno a través de la reducción de acetileno en los nódulos.
- ✓ Evaluar el crecimiento de *Paenibacillus* en medios de cultivo con y sin nitrógeno.
- ✓ Determinar la presencia de los genes *nifH* y *nodD* que intervienen en los procesos de fijación de nitrógeno y nodulación respectivamente.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS A PARTIR DE NÓDULOS

Las plantas se recolectaron en el municipio de Saelices el Chico, el cual pertenece a la provincia de Salamanca (España). Los nódulos fueron tratados por el método de Vincent (1970), tal como se describió en la metodología del Capítulo I sección 3.1.3. A partir de las colonias que se formaron las cuales eran cremosas, de color blanquecino y borde irregular, se realizaron aislamientos en placas en el medio YMA (Yeast Mannitol Agar, ver anexo 1) con el fin de obtener cultivos puros. Las placas se incubaron a 28°C durante una semana.

Tinción de Gram

A las 24 h de cultivo se tomaron algunas colonias de las placas y se les realizó la coloración de Gram.

3.2 AGRUPACIÓN DE LAS CEPAS POR EL MÉTODO DE TP-RAPD

Las 23 cepas que se aislaron fueron agrupadas mediante la técnica de TP-RAPD, empleando los oligonucleótidos 879F y 1522R, tal como se describió en el Capítulo I sección 3.2.3. Las 23 cepas aisladas formaron 8 perfiles moleculares diferentes.

3.3 ENSAYO DE NODULACIÓN

Teniendo en cuenta los resultados de los perfiles moleculares de TP-RAPD, se seleccionó una cepa representante de cada grupo, para realizar estudios de nodulación utilizando como modelo la planta de *Lupinus albus*.

3.3.1 Preparación de las semillas y cultivo de las plantas

- i. La superficie de las semillas de *Lupinus albus* se esterilizó con hipoclorito sódico al 3.5% (p/v) durante 12 minutos y luego se lavaron de manera repetida con agua destilada estéril.
- ii. Para favorecer la germinación, las semillas se colocaron en placas Petri recubiertas en la base con papel filtro estéril humedecido suficientemente con agua destilada estéril.

- iii. Una vez germinadas las plantas se pasaron a macetas que contenían vermiculita estéril. Para el mantenimiento de las plantas se utilizó una solución nutritiva libre de nitrógeno (Rigaud y Puppo, 1975) (anexo 1).
- iv. En los primeros estadios de crecimiento de las plantas, se les aplicó 1 ml (1×10^8 UFC/ml) de la suspensión de bacterias. Se utilizaron cinco macetas por cada una de las 8 cepas evaluadas, además de los controles negativos sin inocular. Como control positivo de la nodulación, 5 plantas se inocularon con la cepa *Bradyrhizobium* Islu 65, la cual nodula *Lupinus* de las Islas Canarias (Jarabo-Lorenzo *et al.*, 2003).
- v. Las plantas se mantuvieron durante 6 semanas en una cámara de crecimiento climatizada, con mezcla de luz incandescente y fluorescente (cantidad de luz de $400 \mu\text{Einsteins} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y longitud de onda de 400 a 700 nm). El foto-periodo fue 16 horas de luz, seguido de 8 horas de oscuridad, temperatura de 25°C y una humedad relativa del 60%.

Pasado el tiempo de cultivo se verificó la presencia de nódulos en las diversas plantas los cuales se cortaron y se guardaron a -20°C en glicerol al 20%. Algunos nódulos fueron triturados y se hizo el reaislamiento de las bacterias los cuales también se conservaron a -20°C en glicerol al 20%.

3.4 IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA Lupsa 11

Del ensayo de nodulación en plantas, se seleccionó a la cepa Lupsa 11 a la cual se le extrajo el ADN tal como está descrito en el apartado 3.2.1.1 del Capítulo I. La amplificación y purificación de los productos de PCR, así como la secuenciación del gen ARNr 16S y el análisis de la secuencia se hicieron como figuran en el apartado 3.3 del Capítulo I de la presente memoria.

3.4.1 Hibridación de ADN-ADN

A la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 se le realizó el ensayo de hibridación del ADN, con *Paenibacillus favisporus* DSM 17253^T, empleando el método descrito por De Ley *et al.* (1970) y teniendo en cuenta las modificaciones descritas por Huss *et al.* (1983). El ensayo fue realizado en la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH" (DSMZ) utilizando un espectrofotómetro UV/VIS (Cary 100 Bio) equipado con un termostato "Peltier".

3.5 PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y FISIOLÓGICAS DE LA CEPA *Paenibacillus* Lupsa 11

Para evaluar el crecimiento de la cepa Lupsa 11 en diversos sustratos, se utilizaron las galerías comerciales API 20NE y 20E (bioMérieux) y mediante el kit Ident Bacillus (Microkit). Inicialmente se preparó el inóculo cultivando las bacterias en el medio YMA líquido durante 24 h a 28°C. Luego se prepararon suspensiones bacterianas (1×10^8 UFC/ml), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante y se inoculó cada uno de los pocillos de las galerías y de los tubos del kit, incubando a 28°C durante 72 h.

3.5.1 Resistencia natural a los antibióticos y reaislamiento de *Paenibacillus* de los nódulos de *L. albus*

Este ensayo se hizo con el fin de caracterizar y evaluar los antibióticos a los que es resistente la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 aislada a partir de nódulos de *Lupinus albus*. Como control se empleó la cepa *Bradyrhizobium* Islu 65, la cual se conoce que nodula comúnmente la planta de *Lupinus*. En la Tabla 16, aparece el listado de los antibióticos utilizados.

Tabla 16. Antibióticos empleados y sus concentraciones.

	Antibiótico	Concentración		Antibiótico	Concentración
AM	Ampicilina ¹	2 µg	N5	Neomicina ¹	5 µg
AK	Amikacina ²	30 µg	NET	Netilmicina ²	30 µg
AMC	Amoxicilina ²	20 µg	NOR	Norfloxacina ²	10 µg
CEC	Cefaclor ²	30 µg	NV	Novobiocina ²	5 µg
KF	Cefalotina ²	30 µg	OX	Oxacilina ²	1 µg
KZ	Cefazolina ²	30 µg	T	Oxitetraciclina ¹	30 µg
CTX	Cefotaxim ²	30 µg	P2	Penicilina ¹	2 U.I.
FOX	Cefoxitidina ²	30 µg	P10	Penicilina G ¹	10 U.I.
CAZ	Ceftadizima ²	30 µg	PRL	Piperacilina ²	100 µg
CRO	Ceftriaxon ²	30 µg	PB	Polimixina B ¹	300 U.I.
CXM	Cefuroxima ¹	30 µg	RD	Rifampicina ²	2 µg
CIP	Ciprofloxacina ¹	5 µg	STX	Sulfametoxazol-Trimetoprim ²	23,75 µg – 1,25 µg
CX	Cloxaciclina ¹	1 µg	TE	Tetraciclina ²	30 µg
E15	Eritromicina ²	15 µg	TOB	Tobramicina ²	10 µg
S50	Estreptomicina	50 µg	VA	Vancomicina ²	30µg
CN	Gentamicina ¹	10 µg			

¹Oxoid, ²BD Becton Dickinson

La sensibilidad y/o resistencia a los antibióticos fue evaluada sobre placas con medio YMA, al que se le redujo la concentración de agar del 2 al 1,5% lo cual facilita la difusión del antibiótico impregnado en los sensibilizadores descritos. Las placas fueron sembradas por separado con una suspensión de 1×10^8 UFC/ml de las cepas *Paenibacillus* Lupsa 11 y *Bradyrhizobium* Islu 65. Las placas se incubaron a 28°C durante 72 h, al cabo de las cuales se observó el halo de inhibición alrededor de los discos antibióticos.

3.5.1.1 Reaislamiento de *Paenibacillus* de los nódulos

Del ensayo de nodulación descrito en el apartado 3.6, se seleccionaron algunos nódulos para reaislar las bacterias *Paenibacillus* empleando los medios YMA y XED que contenían los antibióticos estreptomina 50 µg y tetraciclina 30 µg. A las bacterias que fueron reaisladas se les extrajo el ADN para determinar nuevamente la secuencia del gen ARNr 16S y la presencia del gen *nifH*.

3.5.2 Evaluación del crecimiento de la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 en medio con y sin nitrógeno

Para determinar la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico de la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11, se realizaron siembras en medio libre de nitrógeno. El medio se preparó en tubos con 9 ml de agua destilada con y sin agar, esterilizados en autoclave durante 20 min a los que se adicionó de forma aseptica una suspensión de 1 ml de la fuente de carbono (base de carbono para levadura: YCB, Difco) al 10% (p/v) esterilizada por filtración. Para el control positivo se añadió al medio anterior 1 ml de una suspensión de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 0,2% (p/v).

El inóculo de Lupsa 11 se preparó en el medio XED a partir del cual se hicieron suspensiones celulares en una solución estéril de NaCl al 0.85%. Posteriormente, se inocularon 3 tubos del ensayo con 10 µl de la suspensión bacteriana en el caso del medio líquido, y 3 tubos se sembraron con el asa recta en el medio sólido. Los tubos se incubaron a 28°C durante 7 días.

3.6 ENSAYO DE NODULACIÓN CON LA CEPA *Paenibacillus* LUPSA 11

Este ensayo se hizo para evaluar la eficiencia de la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 como inoculante de la planta de *Lupinus albus*. El estudio se hizo en cámara controlada y se empleó como control positivo la cepa *Bradyrhizobium* Islu 65 y como control negativo, plantas sin inocular.

La preparación de las semillas y el cultivo de las plantas de *Lupinus albus*, se realizó tal como está descrito en este capítulo en la sección 3.3.1 con algunas variaciones. En este caso durante la primera semana de crecimiento de las plantas, se les aplicó 1 ml (1×10^8 UFC/ml) de la suspensión de bacterias según el tratamiento utilizado: *Paenibacillus* Lupsa 11, *Bradyrhizobium* Islu 65 o la mezcla de los dos. Se emplearon siete macetas por cada tratamiento, además de los controles sin inocular. Este ensayo se realizó tres veces, en épocas diferentes.

Pasadas las 6 semanas de cultivo, se hizo el recuento del número de nódulos de cada planta, se midió el tamaño de cada una de ellas, se determinó el peso seco de la biomasa aérea (tallo y hojas) y se evaluó la reducción del acetileno. Los demás nódulos se guardaron a -20°C y con éstos se realizaron ensayos de microscopía electrónica, así como la identificación de las bacterias dentro del nódulo utilizando la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH).

Para analizar la infectividad de los aislados se realizó el recuento de nódulos de las plantas inoculadas y se obtuvo el promedio de los nódulos de todas las réplicas inoculadas con una misma cepa. La efectividad en la fijación simbiótica de nitrógeno se realizó de acuerdo con la siguiente fórmula descrita por Gibson (1987).

$$\% \text{ de efectividad de la simbiosis} = \frac{\text{Peso seco planta inoculada}}{\text{P. seco planta control positivo}} \times 100$$

3.6.1 Ensayo de la actividad nitrogenasa (ARA)

A los nódulos obtenidos en el ensayo de nodulación, se les midió la actividad de reducción del acetileno (ARA) por cromatografía de gas acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS), según la metodología descrita por Hardy *et al.* (1968). Los ensayos se realizaron en la Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada.

- i. Se colocaron los nódulos separados de las raíces, en recipientes cerrados a los que se substituyó el 10% de su atmósfera por acetileno.
- ii. Transcurridos unos minutos se tomó una muestra y se inyectó en un cromatógrafo de gases equipado con una columna de Porapak Q, trabajando en las condiciones adecuadas para la correcta resolución entre el acetileno y etileno.
- iii. La actividad nitrogenasa se determinó por la aparición de picos correspondientes al acetileno y etileno, la cual era proporcional al etileno producido. Se hicieron medidas a varios tiempos para conocer la cinética de la reducción.

3.7 AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *nifH*

La amplificación del gen *nifH* se llevó a cabo mediante el empleo de "Nested-PCR". En la primera reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos MGR y MGF descritos por Gtari *et al.* (2007). A partir de los productos de la PCR obtenidos, se realizó la segunda reacción empleando los cebadores ELA 1 (Gtari *et al.*, 2007) y POL R (Poly *et al.*, 2001). Como control positivo se usó una preparación de ADN proveniente de la cepa *Frankia alni* ACN14a y como control negativo la bacteria *Escherichia coli* UTI89.

Las secuencias de los oligonucleótidos empleados en la primera PCR fueron:

MGR: 5'-TGA AGC TTC TCG ATG ACC GTC ATC CG-3'

MGF: 5'- CAC GGA TCC GCA AGG GTG GTA TT-3'

Las secuencias de los oligonucleótidos empleados en la segunda PCR fueron:

ELA1: 5' ATG GCK GCC ATG GCC GAG-3'

POL R: 5'- ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA-3'

Cada una de las reacciones de PCR se llevó a cabo en un volumen de 25 µl. La mezcla total y las concentraciones de los reactivos fueron las siguientes:

Reactivos (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR (µl)	Casa comercial
¹ Tampón (10X)	2.5	Perkin-Elmer
MgCl ₂ (25 mM)	2.0	Perkin-Elmer
dNTP (10 mM)	0.75	Pharmacia
BSA (0,1% p/v)	1.0	Sigma
² Oligonucleótido 1	0.25	Isogen
³ Oligonucleótido 2	0.25	Isogen
Agua milli-Q estéril	16.85	
Taq polimerasa (2U/µl)	0.4	Perkin-Elmer
ADN molde (100-150 ng)	1.0	

¹El tampón 10X contiene MgCl₂ 15 mM; otros componentes incluyen Tris 100 mM (pH 8.3), KCl₂ 500mM y gelatina 0.01 (p/v). Según fuera la primera o segunda PCR, ²el oligo 1 corresponde a MGR o ELA1, ³el oligo 2 corresponde a MGF o POL R.

La solución anterior se agitó suavemente en un mezclador vortex antes de añadir el ADN molde. La reacción de amplificación del ADN se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) utilizando las siguientes condiciones:

Condiciones		Primera PCR Oligos MGR-MGF		Segunda PCR Oligos ELA 1-POL R	
		Temp. (°C)	minutos	Temp. (°C)	minutos
Desnaturalización del ADN y activación de la polimerasa		95	9	95	9
35 ciclos	Desnaturalización	94	1	94	1
	Anillamiento	60	1	57	1
	Extensión	72	2	72	2
Extensión final		72	7	72	7

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS A PARTIR DE NÓDULOS

A los nódulos de la leguminosa *Lupinus angustifolius* recolectada en la localidad de Saelices (Figura 32), se les realizó el aislamiento de los microorganismos en el medio de cultivo YMA tal como se describió en la metodología. Después de 7 días de incubación se obtuvieron 23 cepas a las cuales se les denominó Lupsa, por el nombre de la planta *Lupinus* (lup-) y la localidad de Saelices (-sa).

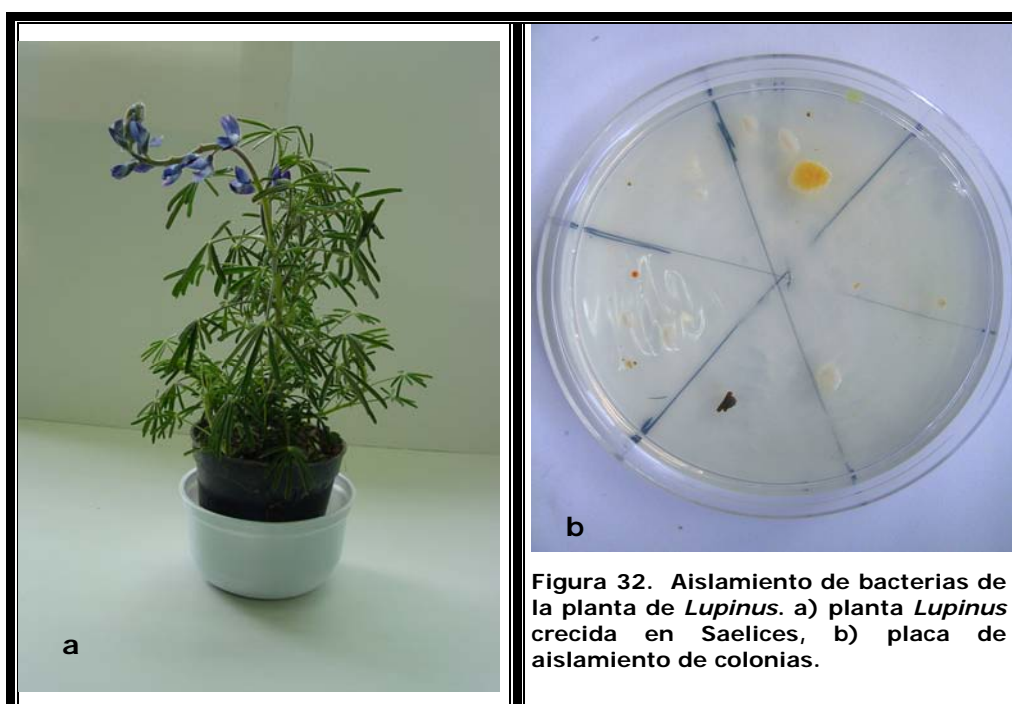


Figura 32. Aislamiento de bacterias de la planta de *Lupinus*. a) planta *Lupinus* crecida en Saelices, b) placa de aislamiento de colonias.

Las diversas colonias aisladas en el medio YMA presentaban una morfología circular y eran planas y/o convexas, cremosas, brillantes, de borde definido y de 1 a 4 mm de diámetro (Figura 32). Al microscopio se observaron formas bacilares provistas de endosporas elipsoidales localizadas en la parte central y subterminal (Figura 33), las bacterias eran Gram variables o Gram positivas dependiendo de la etapa del cultivo.

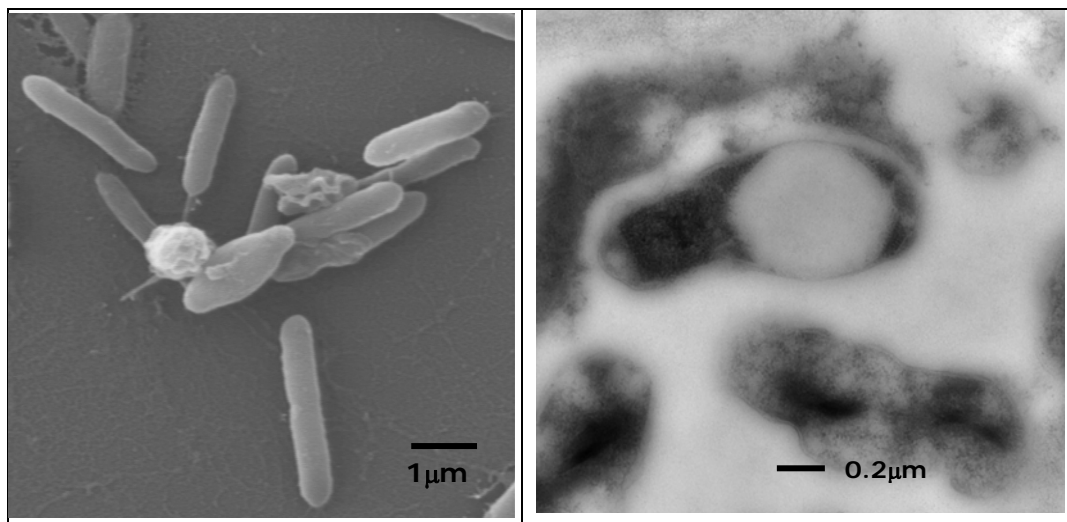


Figura 33. Imágenes de Microscopía electrónica de la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 a) Microscopía electrónica de barrido, b) Microscopía de transmisión. En ambas microfotografías se puede observar las endosporas.

4.2 AGRUPACIÓN DE LAS CEPAS POR TP-RAPD

Los resultados de la Figura 34, muestran los perfiles de TP-RAPD obtenidos para la diversidad de cepas aisladas de los nódulos. El análisis realizado mediante el programa informático Bionumerics permitió distribuir a los microorganismos en 8 perfiles diferentes que se muestran en la Tabla 17.

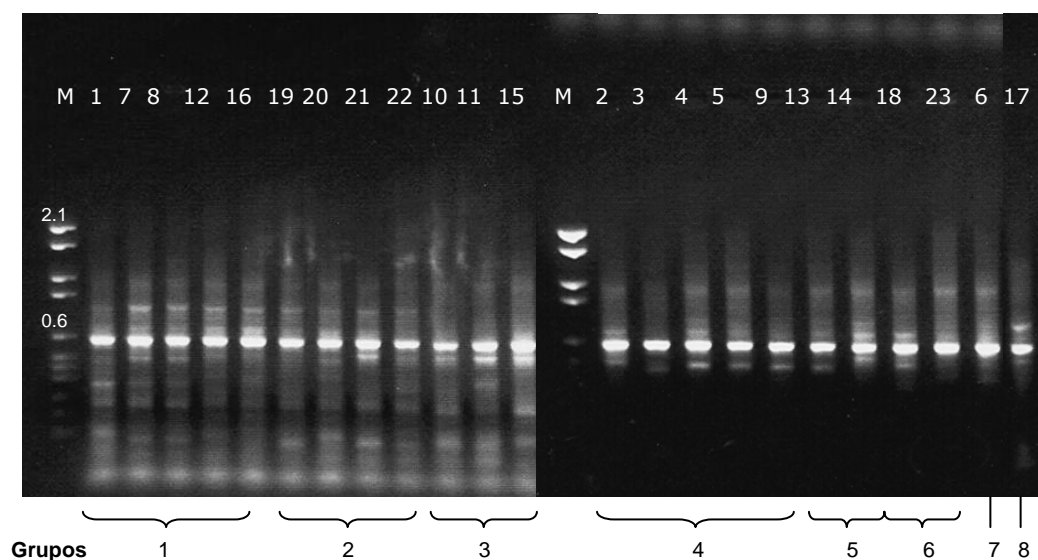


Figura 34. Perfiles TP-RAPD de las cepas Lupsa aisladas de nódulos de *Lupinus angustifolius*. M: Marcador (Kb).

Tabla 17. Agrupación de las cepas de acuerdo con los perfiles TP-RAPD.

	Nombre de la cepa
Perfil 1	Lupsa 1, Lupsa 7 , Lupsa 8, Lupsa 12, Lupsa 16
Perfil 2	Lupsa 19, Lupsa 20, Lupsa 21 , Lupsa 22
Perfil 3	Lupsa 10, Lupsa 11 , Lupsa 15
Perfil 4	Lupsa 2 , Lupsa 3, Lupsa 4, Lupsa 5, Lupsa 9
Perfil 5	Lupsa 13 , Lupsa 14
Perfil 6	Lupsa 18, Lupsa 23
Perfil 7	Lupsa 6
Perfil 8	Lupsa 17

De acuerdo con estos resultados, se puede deducir que existe una alta diversidad entre las cepas Lupsa que se aislaron de nódulos de *Lupinus angustifolius*. De cada perfil obtenido se seleccionó una cepa representante la cual se utilizó en estudios de nodulación de las plantas.

4.3 ENSAYO DE NODULACIÓN CON LAS CEPAS Lupsa

A partir de los perfiles TP-RAPD se escogieron las cepas: Lupsa 2, Lupsa 6, Lupsa 7, Lupsa 11, Lupsa 13, Lupsa 17, Lupsa 21 y Lupsa 23 (Tabla 17), para evaluar si éstas cepas podrían reinfestar y formar nódulos en la planta de *Lupinus albus*. Las cepas fueron inoculadas en las plantas crecidas en la cámara de crecimiento controlada tal como se describió en la metodología.

Los resultados obtenidos después de 6 semanas de cultivo permitieron observar que todas las cepas inoculadas fueron capaces de reinfestar *Lupinus albus* y producir nódulos efectivos. Sin embargo, las plantas inoculadas con la cepa **Lupsa 11** fueron las que presentaron mayor número de nódulos efectivos, por lo que esta cepa fue la escogida como modelo para continuar con los demás ensayos.

Por otra parte, los nódulos obtenidos con los distintos inóculos bacterianos fueron cortados y procesados para hacer reaislamiento de las bacterias empleando el medio YMA que contenía los antibióticos estreptomomicina 50 µg y tetraciclina 30 µg (apartado 4.5.1). Los resultados al cabo de una semana mostraron que las colonias y las bacterias obtenidas presentaban una morfología idéntica a las que fueron inoculadas.

4.4 IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA Lupsa 11

El análisis filogenético basado en la secuencia del gen ARNr 16S, mostró que la cepa Lupsa 11, pertenecía al género *Paenibacillus* (Figura 35). Al comparar las secuencias del gen ARNr 16S de Lupsa 11 con las descritas en las bases de datos, y luego mediante la elaboración del árbol filogenético, se observó que Lupsa 11 está estrechamente relacionada con las cepas tipo *Paenibacillus cineris* LMG 18439^T, *Paenibacillus favisporus* 17253^T y *Paenibacillus rhizosphaerae* LMG 21995^T.

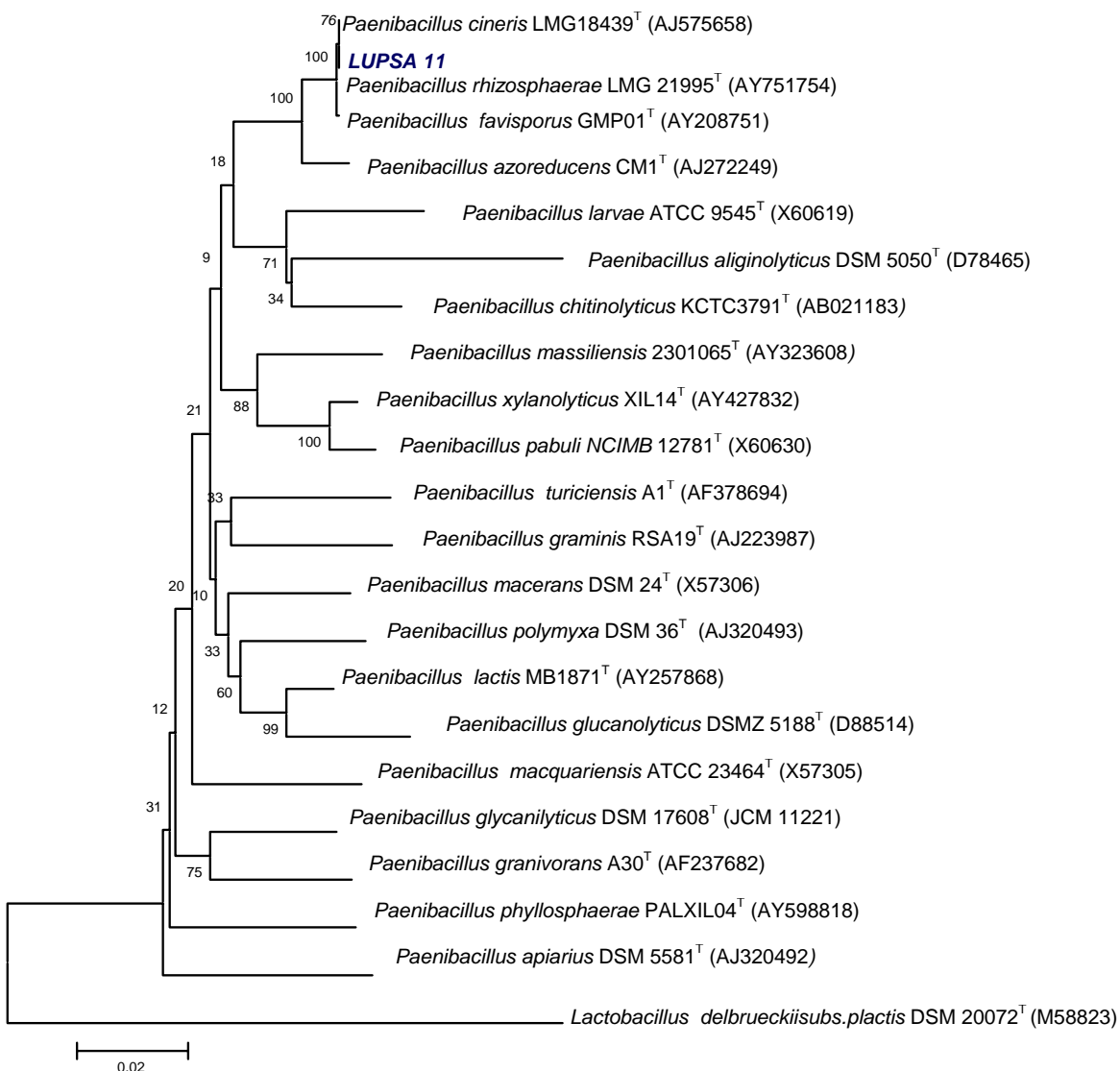


Figura 35. Relación filogenética de la cepa Lupsa 11 con algunas cepas tipo de *Paenibacillus*. El dendrograma fue construido usando el algoritmo Neighbor-Joining y el método de estimación de distancia Kimura 2P. Los valores de bootstrap generados de 1,000 réplicas se muestran en los nodos.

En la Tabla 18, se muestran los resultados del análisis de similitud realizado con el paquete informático PHYDIT (Chun, 1995), en el que se encontró que las especies *P. cineris* LMG 18439^T y *P. favisporus* 17253^T tenían con respecto a la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 porcentajes de similitud del 99.9%, mientras que *P. rhizosphaerae* LMG 21995^T un 99.5%.

Tabla 18. Porcentajes de similitud de la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 con respecto a las especies tipo más cercanas.

	Lupsa 11	<i>P. cineris</i>	<i>P. favisporus</i>	<i>P. rhizosphaerae</i>
Lupsa 11	-			
<i>P. cineris</i>	99.9	-		
<i>P. favisporus</i>	99.9	99.8	-	
<i>P. rhizosphaerae</i>	99.5	99.8	99.5	-

De acuerdo con estos resultados posiblemente la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 corresponde a una de estas tres especies. Los estudios de hibridación ADN-ADN se realizaron con *Paenibacillus favisporus* DSM 17253^T con el que se encontró un nivel de reasociación del 95.9%. Por otra parte y teniendo en cuenta los porcentajes de similitud de las demás especies, posiblemente *P. cineris* LMG 18439^T, *P. favisporus* 17253^T y *P. rhizosphaerae* LMG 21995^T correspondan a una misma especie, por lo que se deben completar los estudios de hibridación entre éstos microorganismos.

4.5 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Las galerías comerciales API 20E y API 20NE están diseñadas para la identificación de bacterias clínicas; sin embargo, pueden ser utilizadas para la caracterización de cualquier aislado bacteriano, ya que es un sistema rápido que presenta la ventaja de permitir la estandarización de los resultados y, además, ya han sido empleados para caracterizar bacterias del género *Paenibacillus* aislados de diversos ambientes como suelos, agua o compost (Rodríguez *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2007; Vaz-Moreira *et al.*, 2007). El sistema IDENT-Bacillus incluye pruebas discriminatorias para diferenciar especies de bacilos Gram positivos esporulados de acuerdo con los métodos descritos en el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Claus y Berkeley, 1986).

Los resultados obtenidos de los análisis fisiológicos y bioquímicos de la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11, mediante el empleo de las galerías comerciales, aparecen resumidos en la Tabla 19. Es un bacilo anaerobio facultativo, catalasa y oxidasa positivo. La temperatura mínima a la que crece es 12°C y la máxima 45°C con una óptima de 32°C. Tolerancia hasta un 7% de NaCl y un rango de pH entre 5.7 a 9.0.

Tabla 19. Pruebas bioquímicas de la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11.

Pruebas de asimilación		Producción de:	
Almidón	+	β-galactosidasa	+
Arabinosa	+	Arginina dehidrolasa	-
Caprato	-	Lisina decarboxilasa	-
Citrato	-	Ornitina decarboxilasa	-
Dipato	-	Producción de H ₂ S	-
Fenil acetato	-	Triptofano desaminasa	-
Glucosa	+	Carboxi metil celulosa	+
Gluconato	+	Indol	-
Inositol	-	Voges-Proskauer	+
N-acetil glucosamina	+	Fenil alanina	+
Maltosa	+	Propionato	-
Manosa	-	Celulasas	-
Manitol	+	Amilasa	-
Malato	-		
Sorbitol	-	Otras pruebas	
Xilosa	+	Crecimiento anaerobio	-
Xilano	+	Crecimiento en 2% NaCl	+
		5 % NaCl	+
		7 % NaCl	+
Reducción de nitratos	+	pH 5.7	+
Triptofano desaminasa	-	pH 6.8	+
Fermentación glucosa	-	pH 9.0	+
Arginina dehidrolasa	-	Posición espora	central-subterminal
Ureasa	+	Crecimiento a 45°C	+
Hidrólisis de esculina	+		
Hidrólisis de gelatina	-	Oxidasa	+
Hidrólisis de caseína	-	Catalasa	+

(+) Crecimiento, (-) No crecimiento

Paenibacillus Lupsa 11 es capaz de utilizar los carbohidratos almidón, arabinosa, glucosa, maltosa, manitol, xilano y xilosa. Además, hidroliza la esculina y produce las enzimas β -galactosidasa y ureasa, y es capaz de reducir los nitratos a nitritos.

Por otra parte, se compararon los resultados de las pruebas fenotípicas de la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 con las de las especies con las cuales está filogenéticamente relacionada. La Tabla 20, resume los resultados en los que se puede apreciar que existen diferencias entre Lupsa 11 y las cepas tipo de *Paenibacillus cineris* LMG 18439^T, *Paenibacillus favisporus* 17253^T y *Paenibacillus rhizosphaerae* LMG 21995^T.

Tabla 20. Diferencias en las pruebas bioquímicas de la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 con las especies filogenéticamente relacionadas.

Prueba	Lupsa 11	<i>P. cineris</i> LMG 18439 ^T	<i>P. favisporus</i> 17253 ^T	<i>P. rhizosphaerae</i> LMG 21995 ^T
L-arabinosa	+	+	-	+
D-manosa	-	d	+	-
meso-inositol	-	+	-	-
Sacarosa	+	+	+	+
Ramnosa	-	-	+	+
D-manosa	-	d	+	-
Ureasa	+	-	+	-
Celulasas	-	nd	+	nd
Crecimiento en 5% NaCl	+	-	d	+
Crecimiento anaerobio	-	+	+	-

+. Crecimiento, -. No crecimiento, d. reacción débil, nd. No determinado.

En la Tabla 20, se aprecia que todas las cepas de *Paenibacillus* utilizan la sacarosa y *P. favisporus* 17253^T fue la única especie que no creció en arabinosa. La cepa Lupsa 11 junto con *P. favisporus* 17253^T producen la enzima ureasa y, *P. cineris* LMG 18439^T a diferencia de las demás especies crece en meso-inositol. El azúcar ramnosa es utilizado por *P. favisporus* 17253^T y *P. rhizosphaerae* LMG 21995^T, pero no por la cepa Lupsa 11 ni por *P. cineris* LMG 18439^T. La cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 al igual que *P. favisporus* 17253^T no crecieron en condiciones de anaerobiosis.

4.5.1 Resistencia Natural a los Antibióticos

Diversos trabajos muestran la tolerancia que tienen algunas especies de *Paenibacillus* a los antibióticos (Miyagi *et al.*, 2000; Ingham y Furneaux, 2000; Ingham y Jacob, 2008). Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 21, en los que se compara la resistencia a los antibióticos que presentan las cepas *Paenibacillus* Lupsa 11 y *Bradyrhizobium* Islu 65.

Tabla 21. Resistencia de las cepas *Paenibacillus* Lupsa 11 y *Bradyrhizobium* Islu 65 a diversos antibióticos.

	Antibiótico	<i>Paenibacillus</i> Lupsa 11	<i>Bradyrhizobium</i> Islu 65
AM	Ampicilina	R	R
AK	Amikacina	S	S
AMC	Amoxicilina	R	R
CEC	Cefaclor	R	R
KF	Cefalotina	R	R
KZ	Cefazolina	R	R
CTX	Cefotaxim	S	R
FOX	Cefoxitidina	R	R
CAZ	Ceftadizima	R	R
CRO	Ceftriaxon	S	R
CXM	Cefuroxima	S	R
CIP	Ciprofloxacina	S	R
CX	Cloxaciclina	R	R
E15	Eritromicina	S	S
S50	Estreptomicina	R	S
CN	Gentamicina	S	S
N5	Neomicina	R	R
NET	Netilmicina	S	S
NOR	Norfloxacina	S	R
NV	Novobiocina	S	R
OX	Oxacilina	R	R
OTC	Oxitetraciclina	R	S
P2	Penicilina	R	R
P10	Penicilina G	R	R
PRL	Piperacilina	S	R
PB	Polimixina B	R	R
RD	Rifampicina	R	S
STX	Sulfametoxazol- Trimetoprim	S	R
TE	Tetraciclina	R	S
TOB	Tobramicina	S	R
VA	Vancomicina	S	R

En la Tabla 21, se puede apreciar que la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 es resistente a la tetraciclina (30 μg), estreptomycin (50 μg), rifampicina (2 μg) y oxitetraciclina (30 μg), mientras que la cepa *Bradyrhizobium* Islu 65 es sensible a dichos antibióticos. Los resultados obtenidos con Lupsa 11 concuerdan con lo descrito para la cepa tipo *Paenibacillus cineris* LMG 18439^T (Logan *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este ensayo, se preparó el medio YMA, al cual se le adicionaron los antibióticos estreptomycin y/o tetraciclina, para aislar la cepa de *Paenibacillus* Lupsa 11 a partir de nódulos de plantas de *Lupinus albus* que fueron inoculadas con este microorganismo (Cap. II sección 4.3).

4.5.2 Evaluación del crecimiento en medio con y sin nitrógeno

El nitrógeno (N) es un elemento fundamental para la vida ya que es un componente básico de aminoácidos, ácidos nucleicos, azúcares aminados y los polímeros que estas moléculas forman. La fijación del N desde el estado gaseoso (N_2) a la forma asimilable por los seres vivos, se lleva a cabo biológicamente por microorganismos de algunos géneros como por ejemplo *Bacillus*, *Frankia* o *Rhizobium* y por cianobacterias, que convierten el N_2 en otras formas químicas como amonio y nitratos. Los resultados obtenidos en este ensayo (Figura 36) después de 7 días de cultivo, muestran que la cepa de *Paenibacillus* Lupsa 11 fue capaz de crecer tanto en el medio con nitrógeno, como en el medio que contenía únicamente la fuente de carbono YCB (yeast carbon base).

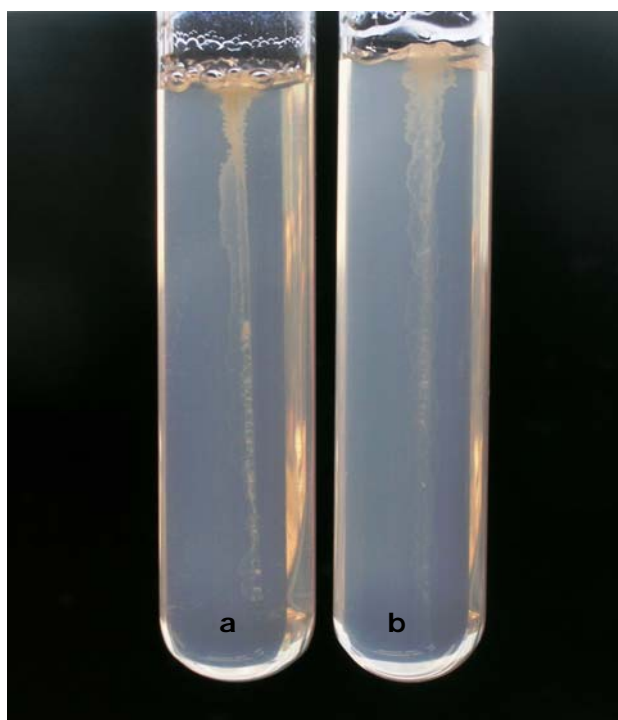


Figura 36. Crecimiento de *Paenibacillus* Lupsa 11 en medio de cultivo: a. con nitrógeno b. sin nitrógeno.

Estos resultados indican que la cepa Lupsa 11 es capaz de obtener el nitrógeno del ambiente y reducirlo a nitrógeno orgánico útil en su metabolismo. Al igual que se ha descrito en otros miembros de la familia *Paenibacillaceae* (Achouak *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 2005), la cepa de *Paenibacillus* Lupsa 11 es capaz de crecer en medio libre de nitrógeno, deduciéndose por tanto su potencial para fijar el nitrógeno atmosférico.

4.6 ENSAYOS DE NODULACIÓN CON LA CEPA *Paenibacillus* Lupsa 11

La infectividad y efectividad de la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 se valoró mediante la inoculación en plantas de *Lupinus albus*, cultivadas sin aporte de nitrógeno durante 6 semanas. Al final del periodo de cultivo se midieron varios parámetros indicativos de la efectividad simbiótica de las cepas: número de nódulos, peso seco de la planta y reducción del acetileno (ARA). Se utilizó como control positivo de la nodulación la cepa *Bradyrhizobium* Islu 65 y como control negativo plantas sin inocular, además se cultivaron plantas a las que se les aplicaron ambos inóculos: *Paenibacillus* Lupsa11 y *Bradyrhizobium* Islu 65.

Las observaciones realizadas a las plantas a través de las seis semanas de crecimiento y desarrollo, permitieron apreciar que las plantas de *Lupinus albus* que fueron inoculadas con las distintas cepas bacterianas presentaron una buena salud la cual se reflejó en la vigorosidad, el tamaño de las plantas y el color de las hojas (Figura 37).

Es importante destacar que las plantas de *Lupinus albus* inoculadas únicamente con la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 desarrollaron nódulos efectivos. El patrón de nodulación fue similar en todas las plantas en las cuales se obtuvieron nódulos esféricos que en algunos casos se agrupaban alrededor de la raíz tendiendo a formar nódulos en collar (Figura 38a), la coloración interna de la mayoría de los nódulos era roja o rosada.



Figura 37. Crecimiento de las plantas de *Lupinus albus* inoculadas con *Paenibacillus* Lupsa 11, *Bradyrhizobium* Islu 65 y la mezcla de los inóculos *Paenibacillus* Lupsa 11 y *Bradyrhizobium* Islu 65. a) Plantas crecidas en macetas, b) Raíces y nódulos de las plantas.

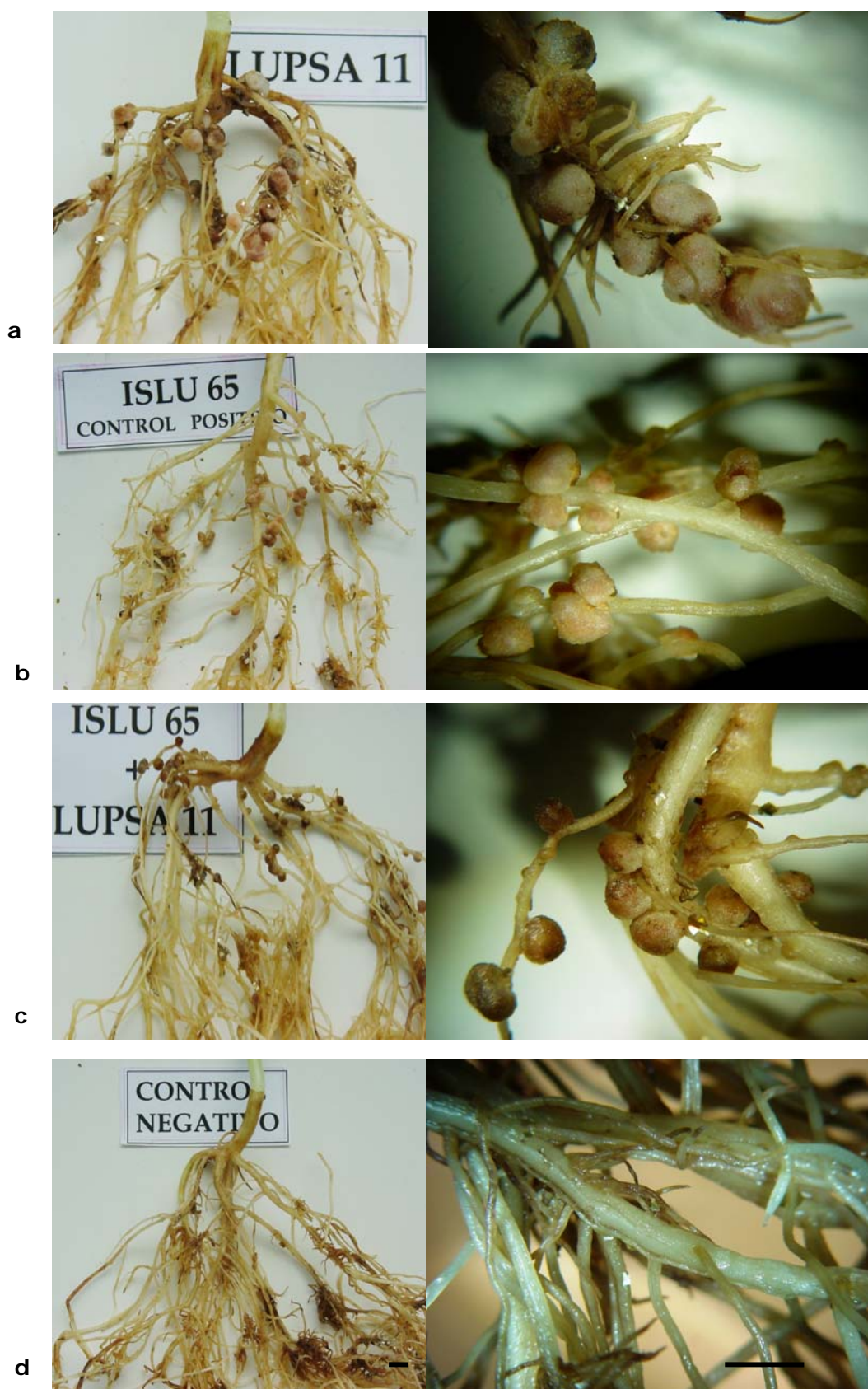


Figura 38. Nódulos y raíces de las plantas de *Lupinus albus* obtenidos con diferentes inóculos: a) *Paenibacillus* Lupsa 11, b) *Bradyrhizobium* Islu 65, c) *Paenibacillus* Lupsa11 y *Bradyrhizobium* Islu 65, d) plantas sin inocular. Barra 5 mm.

El promedio de nódulos por planta obtenidos al inocular la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 fue 28 (Tabla 22), el tamaño oscilaba entre 2 a 5 mm y con un peso seco individual de nódulo de 6.5 a 8.0 mg.

Tabla 22. Parámetros evaluados en el ensayo de nodulación*.

Cepa	Número de nódulos	Peso parte aérea (g)	Eficiencia simbiótica	Tamaño parte aérea (cm)	Aspecto de los nódulos
<i>Paenibacillus</i> Lupsa 11	28	0.61	100%	36	En racimos, Tamaño variable de color rosado
<i>Paenibacillus</i> Lupsa 11 + <i>Bradyrhizobium</i> Islu 65	55	0.66	108%	35	Diversos tamaños de color rosado
<i>Bradyrhizobium</i> Islu 65	35	0.61	100%	36	Pequeños y rosados
Control negativo (sin inóculo)	-	0.37	-	30	

* Estos valores son el resultado del promedio obtenido con las 7 plantas estudiadas por cada tratamiento, en tres épocas distintas.

Con relación al tamaño de la parte aérea de las plantas inoculadas con *Paenibacillus* Lupsa 11, se encontró que medían en promedio 36 cm, similar a los tamaños obtenidos al inocular la cepa *Bradyrhizobium* Islu 65 o la mezcla de Lupsa 11 e Islu 65 (Tabla 22). Teniendo en cuenta los valores del peso seco de la parte aérea, los resultados indican que con la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 se presentó un incremento considerable del peso con respecto a las plantas del control negativo (sin inóculo bacteriano), mientras que con relación al control positivo (*Bradyrhizobium* Islu 65) el peso seco de las plantas era muy parecido.

Por otra parte, en el ensayo donde las plantas fueron inoculadas con las dos cepas *Paenibacillus* Lupsa 11 y *Bradyrhizobium* Islu 65, se obtuvo un promedio de 55 nódulos, lo cual representa un 37% y 45% más de nódulos si se compara con los ensayos en los que únicamente se les inoculó *Paenibacillus* Lupsa 11 o *Bradyrhizobium* Islu 65 (Tabla 22). Además, las plantas a las que se les aplicaron ambos inóculos de las cepas Lupsa 11 e Islu 65, superaron en un 44% y 7.5% al peso de las plantas del control negativo y control positivo respectivamente.

Como ya se comentó anteriormente, las plantas inoculadas sólo con la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 formaron un buen número de nódulos efectivos en las

plantas de *Lupinus*, sin embargo, los ensayos realizados para identificar los genes *nod* en este microorganismo no fueron exitosos. Una de las razones por las que no se pudieron encontrar los genes *nod*, se debió tal vez a que las sondas de oligonucleótidos utilizadas fueron las diseñadas para bacterias Gram negativas como las que describe Laguerre *et al.* (2001).

Es importante destacar que, Giraud *et al.* (2007) identificaron bacterias fotosintéticas del género *Bradyrhizobium* que no poseían los genes *nod* y fueron capaces de nodular plantas del género *Aeschynomene*. La secuenciación del genoma completo de las dos cepas estudiadas BTAi1 y ORS278, demostró que los genes simbióticos no se encontraban ni en islas ni en plásmidos. Los datos hallados señalan que la nodulación de algunas leguminosas como *Aeschynomene sensitiva* por la cepa de *Bradyrhizobium* ORS278 ocurre en ausencia de los genes *nodABC* y lipoquitos-oligosacáridos, lo cual indica que posiblemente existen otras estrategias de señalización que permiten desencadenar la formación de nódulos en algunas leguminosas. El análisis mutacional mostró que estas bacterias usan vías alternas para iniciar la simbiosis, en el que un derivado de la purina sería la clave fundamental que llevaría a desencadenar la formación del nódulo (Giraud *et al.* 2007).

Para evaluar la efectividad de la fijación de nitrógeno, se comparó el peso de la planta inoculada con el peso del control positivo, según lo describe Gibson (1987). Aunque este dato es una medida indirecta de la fijación de nitrógeno, los datos obtenidos (Tabla 22) muestran que con el empleo de la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 se obtuvo una eficiencia igual a la presentada por el control positivo que fue del 100%. Al emplear los inóculos *Paenibacillus* Lupsa 11 + *Bradyrhizobium* Islu 65, se originó un incremento considerable de la eficiencia simbiótica respecto a los controles utilizados.

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que la inoculación simultánea de rizobia junto con algunas bacterias de la rizosfera incrementa tanto la nodulación como el crecimiento de algunas leguminosas, si se compara con las plantas que sólo fueron inoculadas con rizobia (Bai *et al.*, 2002; Barea *et al.*, 2005). A pesar de los estudios presentados, hasta el momento no se había descrito el empleo de bacterias del género *Bradyrhizobium* coinoculadas con cepas de *Paenibacillus* en *Lupinus albus*. La utilización de *Bradyrhizobium* Islu 65 junto con *Paenibacillus* Lupsa 11 mejoró el crecimiento de la planta y se obtuvo un mayor número de nódulos, así como una mejor eficiencia simbiótica (Tabla 22).

Esta es la primera vez que se describe la formación de nódulos por parte de bacterias del género *Paenibacillus*. El hallazgo de nódulos en las plantas al inocular con la cepa Lupsa 11, puede estimular la investigación que permita comprender mejor las estrategias que se presentan al establecer la simbiosis en la interacción planta-microorganismo.

4.6.1 Ensayo de la actividad nitrogenasa (ARA)

Se evaluó la efectividad de la fijación de nitrógeno mediante la determinación de la actividad nitrogenasa por reducción del acetileno a etileno (ARA), en los nódulos de las plantas de *Lupinus albus* que fueron inoculadas con las cepas *Paenibacillus* Lupsa 11, *Bradyrhizobium* Islu 65 y el inóculo en el que se empleó la mezcla de las cepas Lupsa 11 e Islu 65.

En las Figuras 39, 40 y 41, se presentan los resultados de ARA en los que se puede observar los porcentajes de reducción del acetileno a través del tiempo. Estos datos demuestran que en todos los casos hay fijación de nitrógeno lo cual se traduce en un desarrollo saludable de las plantas, tal como se puede apreciar en la Figura 37.

El análisis en conjunto de los parámetros estudiados de nodulación y fijación de nitrógeno permiten relacionar la infectividad y efectividad simbiótica. Es así que las plantas que fueron inoculadas con la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 se destacaron por presentar un elevado número de nódulos (28 por planta), lo cual se corresponde con los buenos resultados obtenidos por ARA (Figura 39).

Por otra parte, la fijación simbiótica de nitrógeno así como la capacidad de nodulación, son criterios importantes que permiten apreciar la eficacia de la asociación bacteria-leguminosa. En nuestro estudio, el análisis de la fijación simbiótica del nitrógeno mediante el ensayo de ARA ha demostrado la existencia de variaciones entre los distintos tratamientos utilizados (Figuras 39, 40, 41).

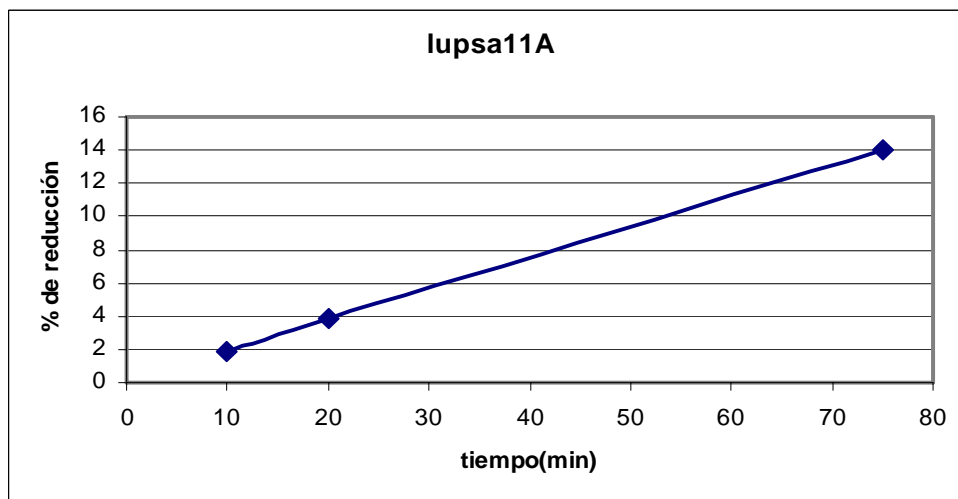


Figura 39. Reducción del acetileno en nódulos, empleando la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11.

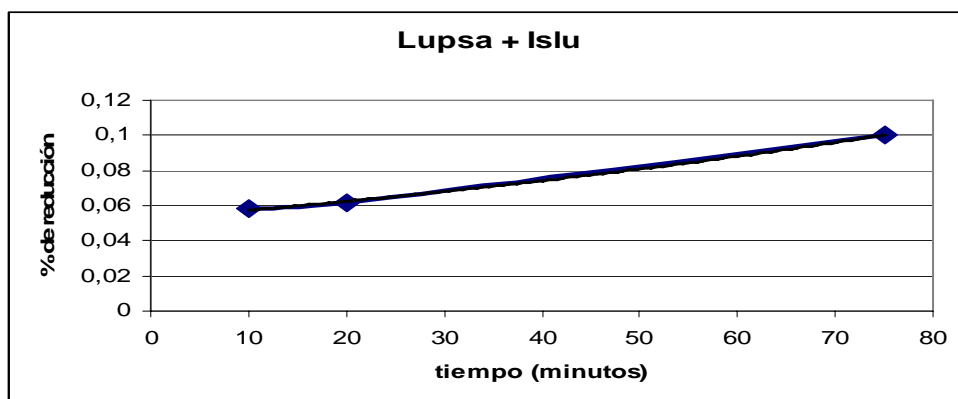


Figura 40. Reducción del acetileno en nódulos, empleando el coinoculo *Paenibacillus* Lupsa 11 y *Bradyrhizobium* Islu 65.

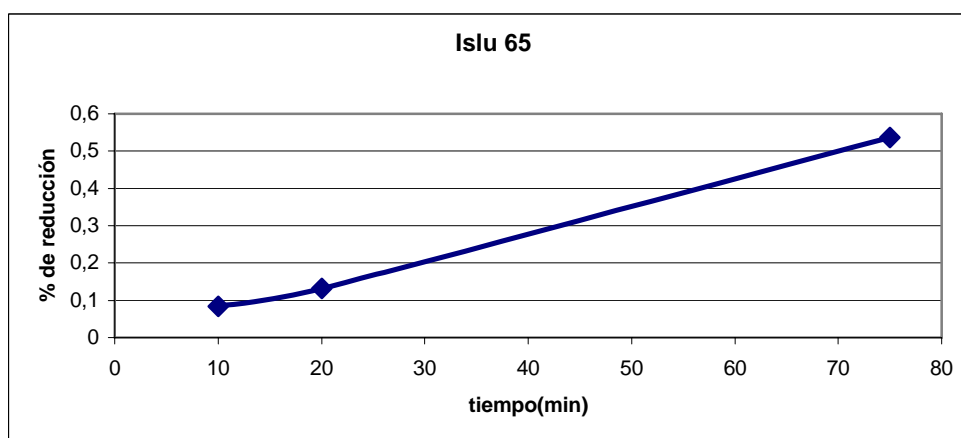


Figura 41. Reducción del acetileno en nódulos, empleando la cepa control *Bradyrhizobium* Islu 65.

4.7 DETECCIÓN DEL GEN *nifH* EN *Paenibacillus* Lupsa 11

Los genes relacionados con la fijación de nitrógeno se han conservado a través de la evolución y están ampliamente distribuidos entre eubacterias y arqueas. El proceso de fijación consiste en la reducción del nitrógeno atmosférico (N_2) a amoníaco (NH_3) mediante la acción de una enzima conocida como nitrogenasa. La síntesis de esta enzima está codificada por tres genes llamados *nifH*, *nifD*, *nifK*, los cuales están localizados en un operón (Young, 1992).

Los resultados de este ensayo en los que se empleó una "Nested-PCR" utilizando dos pares de oligonucleótidos (MGR-MGF y ELA 1-POL R), permitió identificar el gen *nifH* en la bacteria *Paenibacillus* Lupsa 11. La secuencia parcial del gen *nifH* de la cepa Lupsa 11 mostró un 99.9% de similitud con respecto al gen *nifH* de la cepa *Frankia alni* ACN14a (Figura 42).

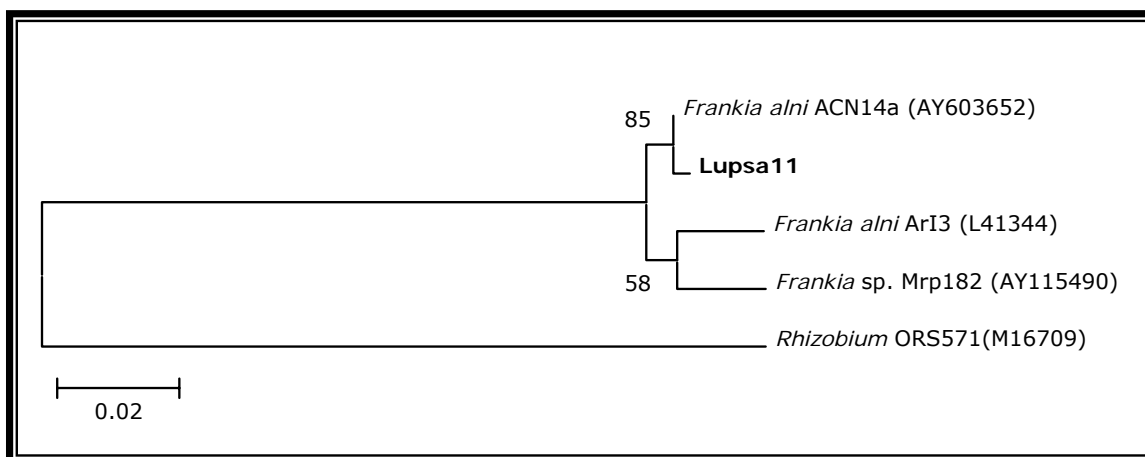


Figura 42. Relación filogenética de la cepa Lupsa 11 con las cepas de *Frankia* que tienen genes *nifH*. El dendrograma fue construido usando el algoritmo Neighbor-Joining y el método de estimación de distancia Kimura 2P. Los valores de bootstrap generados de 1,000 réplicas se muestran en los nodos.

La presencia de los genes *nifH* de *Frankia alni* en *Paenibacillus* Lupsa 11, puede haberse dado como consecuencia de una transferencia horizontal. A este respecto, es importante destacar algunos estudios que demuestran que los genes *nifH* de *Paenibacillus* se encuentran relacionados con diversos grupos microbianos. Un ejemplo es el descrito por Choo *et al.* (2003) quienes caracterizaron genes *nifH* de varias cepas de *Paenibacillus azotofixans* encontrando, mediante el análisis

filogenético, que las secuencias de sus genes *nifH* se agrupaban con las de la cianobacteria *Trichodesmium* y con arqueas metanógenas.

Por otra parte, el análisis de las secuencias del gen *nifH* de *Frankia*, ha revelado que este gen se parece más al gen *nifH* de la cianobacteria *Anabaena* que a los genes *nif* de otros fijadores Gram positivos como *Clostridium* (Normand *et al.*, 1988). La ubicuidad de los genes *nifH* en las bacterias del género *Paenibacillus*, apoyaría la hipótesis de que estos genes se han transmitido horizontalmente de *Frankia alni* a Lupsa 11 y no verticalmente de un ancestro común.

5. CONCLUSIONES CAPÍTULO II

- ✓ Se aislaron 23 cepas del género *Paenibacillus* a partir de nódulos de la planta de *Lupinus angustifolius*, las cuales se caracterizaron por la técnica de TP-RAPD en 8 grupos distintos.
- ✓ Es la primera vez que se describe la nodulación en bacterias del género *Paenibacillus*. Los resultados del ensayo de nodulación en plantas con las 8 cepas Lupsa evaluadas, permitieron observar que todas las cepas fueron capaces de reinfestar *Lupinus albus* y producir nódulos efectivos. Sin embargo, las plantas inoculadas con la cepa Lupsa 11 fueron las que presentaron mayor número de nódulos efectivos, por lo que esta cepa fue la seleccionada como modelo para continuar con los demás ensayos.
- ✓ El análisis del gen ARNr 16S de la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11, la ubica con las especies *Paenibacillus favisporus* DSM 17253^T, *Paenibacillus cineris* LMG 18439^T y *Paenibacillus rhizosphaerae* LMG 21995^T con porcentajes de similitud superiores al 99%. El ensayo de hibridación del ADN realizado con la cepa tipo *P. favisporus* DSM 17253^T presentó un nivel de reasociación del 95.9%.
- ✓ Las plantas de *Lupinus albus* inoculadas con *Paenibacillus* Lupsa 11, fueron capaces de formar nódulos en las raíces. Los nódulos tenían la capacidad de fijar nitrógeno tal como se demostró en el ensayo de reducción del acetileno.
- ✓ La cepa *Paenibacillus* Lupsa 11, fue capaz de crecer en un medio de cultivo sin nitrógeno.
- ✓ A pesar de la formación de nódulos en la planta *Lupinus albus* empleando la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11, no se pudieron amplificar los genes *nod* en esta cepa con los oligonucleótidos utilizados.
- ✓ La cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 contiene el gen *nifH*. El análisis filogenético de la secuencia lo agrupó con un 99% de similitud con el gen *nifH* de *Frankia alni* ACN14a.
- ✓ La utilización de *Paenibacillus* Lupsa 11 junto con *Bradyrhizobium* Islu 65, mejora el crecimiento de la planta, se obtiene un mayor número de nódulos así como, una mejor eficiencia simbiótica. Además, hasta el momento no se había descrito el empleo de bacterias del género *Paenibacillus* coinoculadas con *Bradyrhizobium* en *Lupinus albus*.

CAPÍTULO III

LOCALIZACIÓN *In Situ* de *Paenibacillus* y *Micromonospora* EN TEJIDOS DE *Lupinus* *angustifolius*

CAPÍTULO III

LOCALIZACIÓN *In Situ* de *Paenibacillus* y *Micromonospora* EN TEJIDOS DE *Lupinus angustifolius*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA TÉCNICA DE FISH

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) es una técnica que emplea sondas de oligonucleótidos marcadas con un fluorocromo y que van dirigidas hacia secuencias específicas del ácido ribonucleico ribosómico (ARNr), lo cual permite la identificación rápida y específica de células microbianas ya sea que estén como células individuales o se encuentren agrupadas en su ambiente natural (Amann y Ludwig, 2000).

La técnica de FISH permite que la secuencia de ácidos nucleicos sea detectada dentro de la célula sin alterar la morfología celular o la integridad de sus compartimentos. El uso de hibridación *in situ* para "contar e identificar organismos" fue propuesto por Olsen *et al.* (1986), pero la técnica fue introducida a la Bacteriología por Giovannoni *et al.* (1988) quien fue el primero en utilizar sondas de oligonucleótidos marcados radiactivamente y dirigidos al ARN, para la detección microscópica de bacterias.

Con el desarrollo de marcadores fluorescentes (Landegent *et al.*, 1984) los marcadores radioactivos fueron sustituidos por colorantes no isotópicos. En 1989, DeLong *et al.* (1989) fueron los primeros en usar oligonucleótidos marcados con fluorocromos para detectar células microbianas individuales. Comparada con las sondas radiactivas, las sondas fluorescentes son seguras, tienen mayor resolución y no necesitan ningún paso adicional para su detección. Además, las sondas fluorescentes se pueden marcar con colorantes de diferente emisión de longitud de onda, permitiendo de esta manera la detección de la secuencia diana en un solo paso de hibridación (Pernthaler *et al.*, 2004).

1.1.1 ARN ribosómico 16S como molécula diana para FISH

En Microbiología la molécula diana más usada para FISH es el gen ARNr 16S (Amann y Ludwig, 2000) debido a que se puede encontrar en todos los organismos vivos y son relativamente estables. Además, presentan un elevado número generalmente algunos miles de copias de ARNr 16S por célula y tienen secuencias tanto variables como muy conservadas (Woese, 1987).

El incremento de secuencias del gen ARNr 16S que aparecen en las bases de datos (Maidak *et al.*, 2000; Leveau *et al.*, 2004) ha facilitado la identificación por FISH de la mayoría de microorganismos, especialmente cuando se quiere identificar poblaciones microbianas que no se pueden cultivar. El alto número de copias del gen ARNr 16S en cada replicación y en células metabólicamente activas, ofrecen suficientes moléculas diana que permiten visualizar células bacterianas individuales, aun cuando se encuentren formando parte de consorcios.

1.1.2 Sondas y marcaje

En la selección de sondas para FISH se debe considerar la especificidad, la sensibilidad y la facilidad para penetrar los tejidos. Una sonda típica de oligonucleótidos presenta entre 15-30 bases de longitud y se construye en un sintetizador automatizado. Un ejemplo es la sonda universal EUB 338, que es específica para la mayoría de células del dominio *Bacteria* (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') (Amann *et al.*, 2001).

Hay diferentes vías de marcaje. La marcación con fluorescencia directa (Figura 43a), es la más común y también la vía más rápida, económica y fácil ya que no requiere ningún paso de detección luego de la hibridación. Una o más moléculas teñidas con el compuesto fluorescente, son unidas directamente al oligonucleótido, tanto químicamente durante la síntesis, a través de uniones amino al extremo 5' de la sonda o enzimáticamente usando transferasas terminales que se unen al extremo 3' del nucleótido (Figura 43b) (Moter y Gobel, 2000).

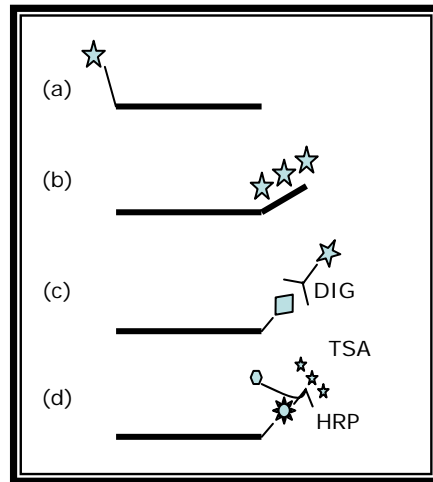


Figura 43. Marcaje de las sondas. (a) y (b) Directo. (c) y (d) indirecto, usando Digoxigenina (DIG), Peroxidasa de rábano (HRS) o amplificando la señal con tiramida (TSA).

Algunos estudios muestran que en la detección indirecta, la sensibilidad del FISH se incrementa al unir la sonda a moléculas como digoxigenina (DIG), la cual es luego detectada por un anticuerpo fluorescente (Figura 43c) (Zarda *et al.*, 1991). De igual manera, el empleo de enzimas amplifican la señal y por ende la sensibilidad del FISH. En este caso, los oligonucleótidos son marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP) que usa fluoresceína tiramida (TSA) como sustrato (Figura 43d). La TSA incrementa entre 10-20 veces la intensidad de la señal (Schönhuber *et al.*, 1997).

1.1.3 Marcadores fluorescentes

El uso de fluorocromos de diferente longitud de onda de excitación y máxima emisión permite la detección simultánea de dos o más microorganismos, para esto se debe contar con un microscopio que permita observar los diversos espectros de colores del FISH. El empleo combinado de fluorocromos debe tener picos de emisión en los que no se presente solapamiento de espectros entre las sondas. Los marcadores que sean más fotoestables se deben usar en muestras con baja cantidad de sitios diana.

Dentro de los marcadores más usados en FISH para estudios microbiológicos (Tabla 23) están los derivados de la fluoresceína, Fluoresceína Isotiocianato (FITC) y 5-(6) carboxifluoresceína-N-Hidroxisuccimida Ester (FluoX). Dentro de los derivados de la rodamina están la Tetrametil Rodamina Isotiocianato (TRITC) y el rojo Texas (Moter y Gobel, 2000).

Tabla 23. Propiedades espectrales de algunos fluorocromos utilizados para la detección de microorganismos por FISH.

Fluorocromo	Longitud de onda (nm)		Color
	Excitación	Emisión	
AMCA (7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid)	351	450	Azul
FITC (Fluoresceína Isotiocianato)	492	528	Verde
FluoX 5-(-6-)carboxifluoresceína -N-hidroxisuccimida – ester	488	520	Verde
Tetrametil Rodamina Isotiocianato (TRITC)	557	576	Rojo
Rojo Texas	578	600	Rojo
Derivados de la Indocianina			
Cy3 indocarbocyanine	550	570	Rojo/naranja
Cy5.5 benzindodicarbocyanine	675	694	Infrarojo
Cy7 indotricarbocyanine	743	767	

Entre los colorantes de cianina (Tabla 23), se incluye el derivado Cy5.5 (benzindodicarbocyanine) de amplia longitud de onda, que se pueden excitar en la región roja del espectro (675 nm) y emite en el rojo lejano (694 nm) (Figura 44). Estos fluoróforos permiten observar un brillo intenso y son fotoestables (Cullander 1999).

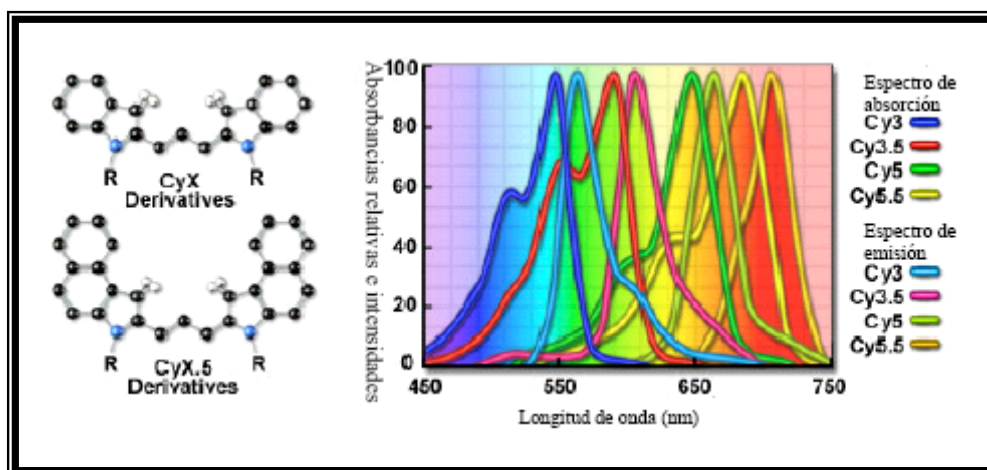


Figura 44. Estructura y perfiles espectrales de algunos fluoróforos de cianina.

La selección de un sitio específico del gen ARNr y el diseño de la sonda se deben realizar con sumo cuidado, generalmente las sondas son diseñadas empleando la información de la secuencia de la bases de datos y mediante paquetes informáticos como el ARB (Ludwing *et al.*, 2004).

1.1.4 Aspectos metodológicos de FISH

Un protocolo típico para FISH incluye 4 pasos: fijación y permeabilización de la muestra, hibridación, lavado y la detección de las células marcadas en el microscopio de epifluorescencia o confocal (Figura 45) (Moter y Gobel, 2000).

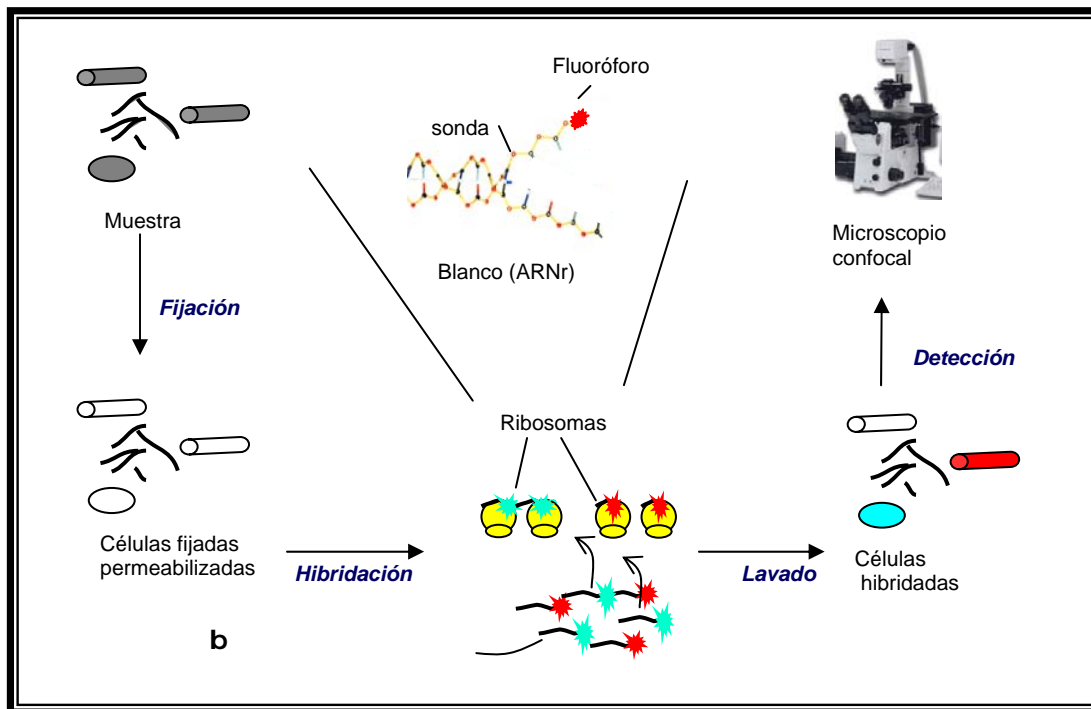


Figura 45. Diagrama de un procedimiento típico de FISH.

a. Fijación y Permeabilización

Antes de la hibridación, los microorganismos deben ser fijados y permeabilizados para facilitar la penetración de la sonda fluorescente dentro de la célula y para proteger al ARN de la degradación por ribonucleasas endógenas. La fijación puede emplear agentes precipitantes como etanol o metanol, agentes que forman entrecruzamientos como aldehídos o una mezcla de ellos.

Las condiciones de fijación pueden variar dependiendo del organismo y del tipo de muestra o de tejido. Aunque la fijación es un paso crucial para obtener resultados satisfactorios a veces resulta difícil de optimizar. Una buena fijación debe permitir una penetración eficiente de la sonda, retener la máxima cantidad de moléculas ARNr y mantener la integridad de la célula y sus detalles morfológicos.

En general el empleo de formaldehído o paraformaldehído entre un 3-4% (v/v) es suficiente para fijar la mayoría de bacterias Gram negativas. Para organismos Gram positivos se recomienda el empleo de etanol (50%) o etanol-formalina (9:1 v/v) o el tratamiento con calor (Roller *et al.*, 1994).

Con el fin de mantener las muestras en las laminas de vidrio, se recomienda cubrir la superficie con ciertos compuestos como gelatina (Amann *et al.*, 1990b) Poly-L-lisina (Lee *et al.*, 1999) o hidruro de silicio (IV) (Moter y Gobel, 2000). Cuando se trabaja con una suspensión bacteriana una vez fijadas se colocan en la lámina, se dejan secar al ambiente y luego son deshidratadas en soluciones crecientes de alcohol (50-70-96%).

En algunos casos, por ejemplo al emplear bacterias Gram positivas se debe realizar un tratamiento enzimático con lisozima o lisostafina que permita abrir la capa de peptidoglicano (Schönhuber *et al.*, 1997, Krimmer *et al.*, 1999). En microorganismos que contienen en su pared ácido micólico, como en *Mycobacterium* o *Nocardia*, se debe realizar la permeabilización empleando una hidrólisis ácida con HCl 1M o tratarlas con mutanolisina o 1,4 ditio-L-treitol (Macnoughton *et al.*, 1994; Carr *et al.*, 2005), en otros casos se ha empleado una mezcla de lisozima y acromopeptidasa (Sekar R, *et al.*, 2003).

Al emplear FISH en cortes de tejidos, los pretratamientos se aplican para incrementar el acceso de la sonda al objetivo específico y disminuir las uniones a los sitios no específicos. En cortes realizados en tejidos incluidos en parafina primero se debe realizar el procedimiento de desparafinado empleando xileno y alcohol (Boye *et al.*, 1998) y después un pretratamiento empleando proteinasa K. En los últimos años se ha usado la técnica de FISH en tejidos que han sido incluidos en cierto tipo de resinas poliméricas. En estas se obtienen una excelente conservación histológica, así como una eficiente visualización de las bacterias, sin que se requiera de ningún pretratamiento de digestión (Ercolini *et al.*, 2003).

b. Hibridación

Es el proceso en el que a la muestra desnaturalizada se le añade la sonda de interés que se unirá a la secuencia escogida del ARNr. La hibridación se puede llevar a cabo bajo condiciones astringentes para obtener un óptimo anillamiento, en este caso, el tampón de hibridación es precalentado y luego es aplicado a la muestra que contiene la sonda marcada. El nivel de astringencia se puede ajustar variando tanto la concentración de formamida o la temperatura de hibridación.

La función que cumple la formamida es la de disminuir la temperatura de fusión del ADN al debilitar las uniones de hidrogeno, permitiendo de esta manera que se pueda bajar la temperatura de anillamiento al incrementar el nivel de astringencia (Moter y Gobel, 2000). La hibridación se realiza en la oscuridad en una cámara húmeda, con temperaturas entre 37°C a 50°C y con tiempos que oscilan entre 30 minutos y varias horas.

c. Lavado

Pasado el tiempo de hibridación las láminas son lavadas con agua destilada para remover la sonda que no se unió. Si se requiere se puede realizar un lavado poshibridación en condiciones astringentes, en este caso el tampón de lavado se debe preparar variando la concentración de sales (Lathe, 1985) en lugar de usar formamida, esto con el fin de disminuir la cantidad de desechos tóxicos.

Finalmente las laminas portaobjetos son lavadas con agua destilada una vez más y secadas al ambiente. Para evitar la perdida de fluorescencia antes de observar al microscopio se debe adicionar al montaje compuestos como el gelvatol.

d. Visualización

Se requiere de un microscopio de epifluorescencia equipado con diversos filtros para los distintos espectros de color. El empleo de una cámara acoplada al microscopio (CCD) y de un paquete informático apropiado para el análisis de imágenes, permite la digitalización y manipulación de imágenes. Este sistema es muy sensible y es de gran ayuda en muestras críticas, donde se presenta una baja intensidad de la señal.

Otro equipo usado para FISH es el microscopio láser confocal (CLSM). Al restringir la señal a una sección fina de la muestra que se investiga, la fluorescencia desenfocada es removida, lo cual genera imágenes mas definidas. Este método es usado para muestras densas como lodos, biopelículas o cortes de tejidos. Debido a la perdida rápida de fluorescencia, el uso de CLSM a menudo requiere de una elevada señal fluorescente (Manser *et al.*, 2005)

1.1.5 Inconvenientes al aplicar la técnica FISH

Ciertos problemas se pueden presentar durante el desarrollo de la técnica de FISH:

a. Autofluorescencia

Algunos microorganismos producen autofluorescencia la cual enmascara la señal que emite la propia muestra en estudio. Esto ha sido descrito en una variedad de mohos y levaduras (Margo y Bombardier, 1985), en bacterias del género *Pseudomonas* (Brown y Lowbury, 1996), *Rhodospirillum centenum* (Albrecht Buehler, 1996), cianobacterias (Schönhuber *et al.*, 1999) y en algunas especies de arqueas metanógenas (Sorensen *et al.*, 1997).

La autofluorescencia también se puede encontrar en el material que rodea las células microbianas, por ejemplo el tejido de las plantas, lo cual es una fluorescencia biológica natural. Además se presenta en muestras ambientales como lodos activados o plantas de tratamiento de aguas y esta fluorescencia es causada por los desechos inorgánicos (Vesey *et al.*, 1997).

Son escasos los estudios que se centran en el análisis del fenómeno de autofluorescencia y como evitar la interferencia con FISH, sin embargo, se ha encontrado que el medio de crecimiento, los métodos de fijación y el medio de montaje influyen en la intensidad de la señal (Sorensen *et al.*, 1997). Una forma de evitar la autofluorescencia es mediante el empleo de FISH con otra técnica de detección o, mediante el procesamiento digital de la imagen (Van de lest *et al.*, 1995). Otros autores recomiendan el empleo de filtros y sistemas que permitan amplificar la señal (Sorensen *et al.*, 1997).

b. Especificidad de la sonda

La exactitud y fiabilidad de los resultados obtenidos por FISH depende de lo específica que sea la sonda de oligonucleótidos. El diseño así como la evaluación exhaustiva de nuevas sondas, son pasos críticos que se deben tener en cuenta. Además, cada experimento debe incluir controles tanto positivos como negativos, en los controles negativos se deben emplear sondas dirigidas hacia cepas relacionadas filogenéticamente con la cepa en estudio (Moter y Gobel, 2000).

A pesar de que la sonda haya sido bien diseñada y probada se puede presentar la unión a microorganismos que no se hayan descrito hasta el momento, especialmente cuando se analizan bacterias de una población. Para permitir que un organismo específico sea detectado, se deben usar 2 sondas específicas marcadas con diferentes fluorocromos que vayan dirigidas a distintas posiciones del gen ARNr 16S y de este modo, las células que se detecten con ambas sondas y exhiban doble fluorescencia, se pueden considerar como los organismos que son objeto de estudio (Neef *et al.*, 1996).

c. Dificultad de acceso de la sonda al sitio diana

Una baja intensidad de la señal puede darse como consecuencia de la insuficiente penetración de la sonda dentro de la célula bacteriana, lo cual depende de la estructura de su pared celular. Las bacterias Gram negativas generalmente no tienen ningún problema, ya que su pared es permeable a la sonda de oligonucleótidos. En microorganismos Gram positivos, en particular los que presentan cadenas de ácidos micólicos, es necesario realizar tratamientos especiales de fijación y permeabilización (Sekar *et al.*, 2003).

En el estudio realizado por Yilmaz y Noguera (2005) desarrollaron un modelo termodinámico de la hibridación el cual provee los mecanismos para calcular la afinidad de la sonda al sitio específico del ARNr, la cual está definida sobre todo por los cambios que se presentan en la energía libre de Gibbs.

d. Estructuras de orden superior

Debido a la forma tridimensional del ARNr, la formación de horquillas así como las interacciones proteína-ARNr, hacen que la secuencia de oligonucleótidos que conforma la sonda en muchas ocasiones tenga dificultad de acceder al sitio específico, impidiendo de esta manera la hibridación. Esto explica el porque sondas que han presentado buena hibridación empleando ARN o ADN desnaturalizado, no dan resultados satisfactorios en FISH (Frischer *et al.*, 1996).

Un estudio sistemático dirigido a evaluar este problema, fue publicado por Fuchs *et al.* (1998). En el estudio se crearon más de 200 sondas de oligonucleótidos específicos, para diferentes posiciones en el gen ARNr 16S de *E. coli* y se midió la intensidad de la señal emitida por FISH, usando citometría de flujo. Con relación a la intensidad luminosa emitida por la sonda, se clasificaron los oligonucleótidos en 6

clases y se pudo elaborar un mapa de acceso al gen ARNr 16S de *E. coli*. Como el gen ARNr 16S es altamente conservado, gracias a este estudio se facilitó el diseño adecuado de la sonda no solo de *E. coli* sino de otros microorganismos.

Debido a que la sonda puede tanto anillarse como formar horquillas por si mismas, lo que conlleva a una baja señal de intensidad, se hace indispensable el diseño de nuevos oligonucleótidos empleando un paquete informático adecuado (Moter y Gobel, 2000).

e. Bajo contenido de ARNr

Normalmente el contenido de ARNr de bacterias puede variar considerablemente no solo entre especies, sino dentro de células de una misma cepa, lo cual depende del estado fisiológico que a la vez se correlaciona con la tasa de crecimiento (DeLong *et al.*, 1989). Una baja actividad celular debida a factores nutricionales llevan a una baja intensidad luminosa y por ende a resultados falsos negativos.

En el caso de especies de lento crecimiento, se recomienda emplear marcadores que produzcan una gran intensidad de luz fluorescente como es el Cy3. También se puede usar 2 o mas sondas específicas marcadas con el mismo fluorocromo, que permitan aumentar el número de moléculas fluorescentes por célula (Lee *et al.*, 1999).

f. Pérdida de fluorescencia

Muchos fluorocromos se pueden decolorar rápidamente al ser excitados, lo cual conlleva a una pérdida irreversible de la fluorescencia. Con tiempos de exposición de algunos segundos o minutos, esto puede tener un efecto crítico particularmente cuando se desea obtener microfotografías. Para superar este inconveniente, se aconseja el uso de una serie de filtros de banda estrecha, así como de marcadores fotoestables y reactivos que evitan la perdida de color como el citifluor AF1 o gelvatol (Moter y Gobel, 2000).

g. Uso de sondas bacterianas

Una alternativa para evaluar si se presentan problemas metodológicos y así mismo resultados falsos negativos, es mediante el empleo de la sonda bacteriana universal. Si la hibridación con la sonda universal da resultados satisfactorios en

FISH, se puede deducir que la fijación, la penetración de la sonda y contenido de ARNr de células bacterianas no son los factores limitantes.

La sonda universal EUB 338 (de eubacterias) es la sonda de uso común para este propósito, sin embargo en algunos phyla como por ejemplo *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia* esta sonda no es útil. Debido a que la sonda EUB 338 se usa como rutina para cuantificar miembros del dominio *Bacteria*, ha sido mejorada por 2 sondas más: la EUB 338 II y EUB 338 III, que van dirigidas hacia bacterias que no son detectadas por la EUB 338 (Daims *et al.*, 1999). Para tener un control de la unión no específica de la sonda eubacteria al ARNr 16S o a otros componentes celulares como los ácidos nucleicos, se puede usar la sonda complementaria NON 338, la cual no deberá dar ninguna señal con FISH.

1.1.6 Aplicaciones de FISH

El empleo de FISH tiene una amplitud de aplicaciones en la identificación de microorganismos de diferentes muestras ambientales. Uno de los usos es el recuento microscópico de células totales, el cual supera al número de bacterias que logran crecer en un medio de cultivo (Watt *et al.*, 2006). Debido a que FISH permite obtener una imagen detallada de los microorganismos en su microhábitat, sin ningún paso de purificación selectiva o amplificación, la técnica se ha utilizado en el campo de la investigación de la diversidad ambiental (Pernthaler y Amann, 2004).

FISH se ha utilizado en el estudio de la diversidad de las poblaciones en hábitats acuáticos (Sekar *et al.*, 2004), además, en la oxidación de hierro ferroso a férrico mediante el empleo de *Acidothiobacillus ferroxidans* (Mahmoud *et al.*, 2005). También se han diseñado sondas para cuantificar miembros específicos de una comunidad microbiana que habita en el hielo como *Octadecabacter*, *Glaciacola* y *Polaribacter* (Brinkmeyer *et al.*, 2003). El uso de sondas específicas para la Familia *Geodermatophilaceae* ha sido útil en la detección de cepas que colonizan superficies de las rocas y están involucradas en procesos de biodeterioro de monumentos (Urzi *et al.*, 2004).

En los últimos años se han descrito nuevas sondas de oligonucleótidos específicos para el estudio de arqueas hipertermófilas procedentes de sedimentos

hidrotermales (Ariesyady *et al.*, 2007), sedimentos acuíferos (Detmers *et al.*, 2004) o lodos activados (Zang *et al.*, 2008).

Simbiosis

Algunos microorganismos que realizan simbiosis son difíciles de aislar en cultivos puros, en estos casos FISH se convierte en una herramienta que facilita la identificación de microorganismos asociados a plantas y animales al revelar la localización del microorganismo dentro del huésped. La técnica de FISH se ha aplicado a la detección de bacterias intracelulares en yemas de pino escocés (Pirttila *et al.*, 2000), de igual manera para mostrar la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno en la caña de azúcar (Franke *et al.*, 2000).

Perspectivas

Recientemente sondas de ácidos nucleicos para péptidos (PNA) se han introducido dentro de las técnicas de hibridación. PNAs son análogos del ADN con un esqueleto de poliamida no cargado en lugar del azúcar fosfato. Ellos son estables a la degradación, hibridan a secuencias complementarias con una alta afinidad y tienen diferentes características de hibridación. Generalmente las sondas de PNAs son más cortas que los oligonucleótidos convencionales, requeridos para uniones específicas (Lundin *et al.*, 2006).

Debido a su esqueleto de carga neutra, los PNAs difunden a través de paredes celulares hidrofóbicas y permiten la detección de bacterias *Mycobacterium* por FISH sin que se requiera ningún pretratamiento (Lefmann *et al.*, 2006).

Se prevé realizar identificación *in situ* de las bacterias, con la información del estado funcional, así como la expresión de genes, metabolismo o antígenos. El uso de FISH combinado con microsensores permitirá estudiar y monitorear la actividad metabólica, cambios en las poblaciones y el crecimiento de la biopelícula a través del tiempo (Ariesyady *et al.*, 2007).

Finalmente vale la pena recalcar que la técnica de FISH provee información acerca de la presencia, número, morfología y distribución espacial de los microorganismos y, que el número de organismos detectados es superior al reportado por alguna otra técnica microscópica.

2. OBJETIVOS

En la presente memoria de tesis los diversos aislamientos realizados a partir de nódulos corresponden a microorganismos esporulados. Es posible que las bacterias se unieran a la superficie de los nódulos y hubieran sobrevivido al procedimiento de esterilización de la superficie.

Por esta razón mediante el empleo de hibridación *in situ* con sondas específicas marcadas con fluorocromos se busca:

- Demostrar la colonización interna de bacterias del género *Paenibacillus* en nódulos de la planta *Lupinus albus* cultivada en cámara de crecimiento controlado.
- La detección *in situ* del género *Micromonospora* en tejidos de los nódulos de plantas silvestres de *Lupinus angustifolius*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 OBTENCIÓN DE LOS NÓDULOS

Para demostrar por medio de la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia la presencia de bacterias del género *Paenibacillus* en el interior de los nódulos, se utilizaron nódulos de *Lupinus* obtenidos por inoculación con *Paenibacillus* Lupsa 11 (capítulo II, sección 4.6).

En el caso de la identificación *in situ* de *Micromonospora*, se utilizaron nódulos de plantas recolectadas en la región de Saelices el Chico.

3.2 MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE LOS NÓDULOS

Los nódulos de la planta *Lupinus albus* cultivada en el laboratorio y de *Lupinus angustifolius* crecido en el campo, se observaron por microscopía electrónica de barrido. Para el análisis se llevo a cabo el siguiente procedimiento:

Los nódulos se cortaron por la mitad y se colocaron en la solución de fijación (glutaraldehído al 0,2%, paraformaldehído al 2,0% en tampón fosfato 0.2M, pH 7.0), y se les realizó vacío (Speed vac, Savant) durante 20 minutos, antes de incubarlos toda la noche a 4°C. Posteriormente, se eliminó la solución de fijación y se lavaron tres veces con tampón fosfato (50 mM, pH 7), finalmente se deshidrataron con etanol en concentraciones ascendentes (25, 50, 75 y 100%), sumergiendo la muestra 10 min en cada una de ellas.

También se analizaron muestras de cultivo puro. En este caso las bacterias se cultivaron durante una semana en YMA a 28°C y se les realizó el mismo procedimiento que se describe para los nódulos, excepto que a las células bacterianas del cultivo puro, no se les hizo el paso inicial de vacío en el Speed vac (Savant). Una vez deshidratadas las muestras tanto de cultivo puro como de los nódulos, en el servicio de microscopía electrónica de la Universidad de Salamanca, se llevaron a cabo los procesos de secado al punto crítico y revestimiento con una fina capa (10 µm) de oro. Las muestras se analizaron en un microscopio de barrido Zeiss DSM 490 (Germany).

3.3 DETECCIÓN DE BACTERIAS POR FISH

Para realizar la técnica de FISH se llevaron a cabo 4 pasos que comprendieron la fijación, hibridación, lavado y visualización de las muestras.

3.3.1 Fijación de las muestras

A continuación se describen los procedimientos de fijación tanto de los microorganismos crecidos en cultivo puro, como de los nódulos de las plantas de *Lupinus albus* y *Lupinus angustifolius*.

3.3.1.1 Pretratamiento de cultivos puros

Para evaluar la efectividad de las diversas sondas, se utilizaron cultivos puros de *Paenibacillus Lupsa* 11 y *Micromonospora lupini* DSM 44874^T, además de la cepa *Bradyrhizobium* Islu 65 empleada como control. El procedimiento de fijación de las bacterias fue el siguiente:

- i. Se mezclaron 200 μ l de cultivo (1×10^9 UFC/ml) con 600 μ l de tampón de fijación que contenía paraformaldehído al 4% (ver anexo 4).
- ii. Las bacterias se incubaron en el tampón de fijación a 4°C durante 12 h.
- iii. La solución de fijación se eliminó y la muestra se lavó dos veces con 1 X PBS, a 12000 rpm (Eppendorf centrifuge), a 4°C, durante 5 minutos.
- iv. Las células bacterianas se resuspendieron en 300 μ l de 1 X PBS y 300 μ l de etanol.
- v. Posteriormente, se aplicaron 5 μ l de las bacterias fijadas a cada pocillo de las láminas portaobjetos (Erie Scientific Company) dejándolas secar durante 20 minutos a 37°C. Dichas láminas previamente se habían recubierto con una capa de Poly-L-Lisina al 0.01% (p/v) la cual permite la adherencia de las células.

3.3.1.2 Pretratamiento de cortes de nódulos

- i. Inicialmente los nódulos se partieron por la mitad y se colocaron en tubos Eppendorf. A cada tubo se le adicionó 1 ml de la solución de fijación compuesta por paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.5% (ver Anexo 4).

- ii. A los nódulos contenidos en la mezcla anterior se les realizó vacío (Speed vac, Savant) durante 20 minutos. Pasado este tiempo las muestras se incubaron a 4°C toda la noche.
- iii. Se eliminó la solución de fijación y los nódulos se lavaron dos veces con 1 X PBS a 12000 rpm (Eppendorf centrifuge) a 4°C, durante 5 minutos.
- iv. Los nódulos se resuspendieron en 300 μ l de 1 X PBS y 300 μ l de etanol y se guardaron a -20°C.

Obtención de los cortes

Los nódulos anteriormente fijados se incluyeron en parafina en un dispensador (Sakura, Tissue Tek) y se realizaron cortes en micrótopo (Microm HM 310) de un tamaño micrométrico de 2 μ m. Cada sección del tejido se colocó en láminas portaobjetos que contenían 10 pocillos (Erie Scientific Company).

Posteriormente, se realizó el desparafinado de los tejidos. Las muestras se colocaron en una estufa a 60°C durante 15 minutos, pasado este tiempo se dejaron dos veces en xilol durante 10 minutos. Se realizó una hidratación en concentraciones descendentes de etanol 100°, 90°, 70° y 50° dejándolas 5 minutos en cada uno de estos y finalmente se lavaron con agua destilada. Algunas preparaciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina (anexo 1).

3.3.1.3 Empleo de diferentes agentes permeabilizantes

Para facilitar la penetración de la sonda a las células bacterianas, se evaluaron diferentes procedimientos de permeabilización en cultivos puros, empleando la sonda universal EUB338.

- A. Tratamiento enzimático empleando lisozima, de acuerdo con lo descrito por Pernthaler y Amann (2004). Se adicionó a las muestras 30 μ l de lisozima (Sigma, preparada en 0.1 M Tris-HCL y 50 mM EDTA, pH 8.0) de tres concentraciones distintas: 1, 5 y 10 mg/ml. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 25°C.
- B. Tratamiento enzimático con la enzima proteinasa K. A cada pocillo se añadió por separado 20 μ l de proteinasa K (0.1 M Tris-HCL y 50 mM EDTA pH 7.2) de las concentraciones 1, 5 y 7 μ g/ml. Las muestras se incubaron a 25°C durante 10 minutos.

- C. Tratamiento enzimático con lisozima y proteinasa K. En este caso, primero se adicionaron 30 μ l de lisozima (5 mg/ml) incubando durante 10 minutos a 25°C, luego se lavó la muestra con agua destilada y se añadieron 20 μ l de proteinasa K (5 μ g/ml) dejando 10 minutos a 25°C.
- D. Hidrólisis ácida. Se realizó de acuerdo con el método descrito por Macnaughton *et al.* (1994), dejando los portaobjetos que contenían las muestras en HCl 1 M durante 15 minutos a 25°C. Este método se utilizó especialmente en bacterias filamentosas.
- E. Combinación de la hidrólisis ácida y tratamiento enzimático. Las muestras se trataron inicialmente con HCl 1 M tal como se describió en D, seguido por el tratamiento con lisozima (5 mg/ml) como está descrito en A, o con proteinasa K (5 μ g/ml) descrito en B.

Después de cada tratamiento de permeabilización, las muestras se lavaron con agua destilada y se deshidrataron secuencialmente en etanol (50, 70, y 100%) durante 3 minutos cada uno.

3.3.2 Hibridación con sondas marcadas con fluorocromos

3.3.2.1 Sondas utilizadas

En la Tabla 24, aparecen consignadas las secuencias de las sondas utilizadas y los fluorocromos con los que se marcaron. (i) Para los ensayos de FISH con *Paenibacillus* tanto en cultivo puro como en tejidos de nódulos se emplearon las sondas denominadas LupsaCy3 y LupsaCy55, además se utilizó la sonda Islu Cy5 como control, la cual iba dirigida a bacterias del género *Bradyrhizobium*. (ii) En los estudios del género *Micromonospora* tanto en nódulos silvestres como en cultivo puro, se utilizaron las sondas MicromFITC y MicromCy55. La especificidad de las sondas diseñadas se evaluó mediante el programa "Probe Match" incluido en el Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp>).

Para evaluar los diversos métodos de permeabilización de los microorganismos se empleó la sonda universal EUB338 (Daims *et al.*, 1999) marcada con Fluoresceína Isotiocianato (FITC). Las sondas Lupsa y Microm diseñadas en el laboratorio de microbiología de la Universidad de Salamanca, fueron elaboradas por la empresa "Isogen Life Science" y marcadas con FITC y con derivados de la carbocianina (Cy3, Cy5 y Cy5.5).

Tabla 24. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en el estudio.

Nombre de la sonda	Marcaje del fluorocromo	secuencia	Microorganismo al cual va dirigido
LupsaCy3	Cy3	5'- GTCTTTCATCATCCCCTCA- 3'	<i>Paenibacillus</i>
LupsaCy55	Cy5.5	5'- GTCTTTCATCATCCCCTCA- 3'	<i>Paenibacillus</i>
IsluCy3	Cy3	5'- AGGGTTGCGCCCATTGTCC-3'	<i>Bradyrhizobium</i>
IsluCy5	Cy5	5'- AGGGTTGCGCCCATTGTCC-3'	<i>Bradyrhizobium</i>
EUB 338	FITC	5'- GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	Mayoría de eubacterias
MicromFITC	FITC	5'- CTGCGAGTTTTGCGGCCA-3'	<i>Micromonospora</i>
Microm Cy55	Cy5.5	5'- CTGCGAGTTTTGCGGCCA-3'	<i>Micromonospora</i>

3.3.2.2 Hibridación

- Una vez realizada la permeabilización, a cada pocillo que contenía las muestras se les adicionó 9 µl de tampón de hibridación (NaCl 0.9 M, 20 mM Tris-HCl pH 7.4 y 0.1% SDS) (Anexo 4).
- En seguida se aplicó 1 µl de la sonda, de una concentración entre 25 a 50 ng, dependiendo del tratamiento realizado.
- Las láminas se colocaron dentro de placas Petri que contenían papel filtro humedecido con agua destilada. Las preparaciones se incubaron a 46 °C entre 2 a 4 horas.

3.3.3 Lavado

- Pasado el tiempo de hibridación, las láminas se colocaron en placas Petri que contenían la solución de lavado (5 M NaCl; Tris-HCl 20 mM, pH 7.4; 50 mM de EDTA, pH 8.0 y 0.1% SDS) previamente precalentado a 48 °C. Las muestras se dejaron en el tampón de lavado durante 20 minutos a 48 °C.
- Las láminas se lavaron tres veces con agua destilada y finalmente se dejaron secar antes de observar al microscopio.

3.3.4 Visualización de las muestras fluorescentes

- Para minimizar la pérdida de fluorescencia, a las preparaciones se les adicionó una gota de gelvatol (polivinil alcohol, Fluka).
- Los microorganismos crecidos en cultivos puros se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Leika DMRXA) equipado con filtros para Cy3 y para FITC.
- Las muestras tanto de cultivo puro como de los nódulos, se observaron en un microscopio laser confocal (LSM 510 Axiovert 100M, Zeiss) equipado con un láser de argón emitiendo a 488 nm y con dos láser de helio-neón emitiendo a 543 nm y 633 nm para excitar los fluorocromos FITC, Cy3 y Cy5 respectivamente. La superposición de las imágenes se realizó con el software del microscopio Zeiss LSM 510, versión 3.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PERMEABILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS BACTERIANAS

Los ensayos se realizaron en cultivos puros de *Paenibacillus* Lupsa 11, *Micromonospora lupini* DSM 44874^T y *Bradyrhizobium* Islu 65 en los que se evaluaron diversos tratamientos de permeabilización. En la Tabla 25, se describen los mejores resultados obtenidos de la hibridación *in situ* fluorescente en los que se utilizó la sonda universal EUB338 marcada con FITC y en los que la señal fluorescente se determinó como fuerte, débil o ausente.

Tabla 25. Resultados de los diversos métodos de permeabilización utilizados.

Protocolo de permeabilización	<i>Paenibacillus</i> Lupsa 11	<i>Bradyrhizobium</i> Islu 65	<i>Micromonospora</i> <i>lupini</i> DSM 44874 ^T
Fijación con paraformaldehído	-	-	-
Lisozima (5 mg/ml)	+	++	-
Proteinasa k (5 µg/ml)	+	++	+
Lisozima (5 mg/ml) Proteinasa K (5 µg/ml)	++	++	++
HCl 1 M	+	++	+
HCl 1 M y Lisozima (5 mg/ml)	++	++	++
HCl 1 M y Proteinasa K (5 µg/ml)	++	++	+

(+) fluorescencia débil. (++) fluorescencia fuerte. (-) sin fluorescencia.

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 25, los métodos de permeabilización más efectivos en las cepas evaluadas fueron la combinación del tratamiento enzimático de proteinasa K (5 µg/ml) con lisozima (5 mg/ml), y el empleo de la hidrólisis ácida (HCl 1 M) con la lisozima (5 mg/ml). Sin embargo, en bacterias de *Bradyrhizobium* todos los tratamientos fueron efectivos. El empleo en conjunto de HCl 1 M y proteinasa K (5 µg/ml) permitió que en *Paenibacillus* se presentara una elevada fluorescencia.

La combinación de hidrólisis ácida y proteinasa K, así como el solo empleo de proteinasa K (7 µg/ml) generó una degradación de las células bacterianas en cultivos puros y la destrucción del tejido en los ensayos realizados con cortes de nódulos. Por otra parte, cuando se hizo FISH en las bacterias que fueron fijadas en paraformaldehído y glutaraldehído sin ningún otro tratamiento de permeabilización, se encontró que la sonda EUB338 hibridó y produjo una señal débil en la cepa *Bradyrhizobium* Islu 65.

Al emplear únicamente la hidrólisis ácida (HCl 1 M) se obtuvo una escasa señal fluorescente en *Paenibacillus* Lupsa 11 y *Micromonospora lupini* DSM 44874^T. Esto se puede deber a que la configuración de la pared celular de estos microorganismos es Gram positiva, la cual está compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano y por lo tanto no favoreció la penetración de la sonda.

De acuerdo con los resultados obtenidos en estos ensayos, se seleccionó el tratamiento de permeabilización en el que se combina lisozima (5 mg/ml) con proteinasa K (5 µg/ml) para realizar los demás experimentos.

4.2 DETECCIÓN DE BACTERIAS DEL GÉNERO *Paenibacillus* EN NÓDULOS DE *Lupinus albus* EMPLEANDO LA TÉCNICA FISH

4.2.1 Microscopía Electrónica de Barrido

Con el fin de observar el interior de los nódulos que se obtuvieron al inocular la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 en *Lupinus albus*, se realizó el análisis de los nódulos por microscopía electrónica de barrido tal como se describió en el apartado 3.2.

La Figura 46a, muestra la conformación de las células internas del nódulo, en las que se puede apreciar que están completamente infectadas por bacterias. En un acercamiento a una de las células vegetales (microfotografía Figura 46b) se observa la morfología que tienen las bacterias con un tamaño entre 2 µm a 4 µm, mientras que en la Figura 46c, se aprecia algunas zonas del nódulo que no fueron infectadas.

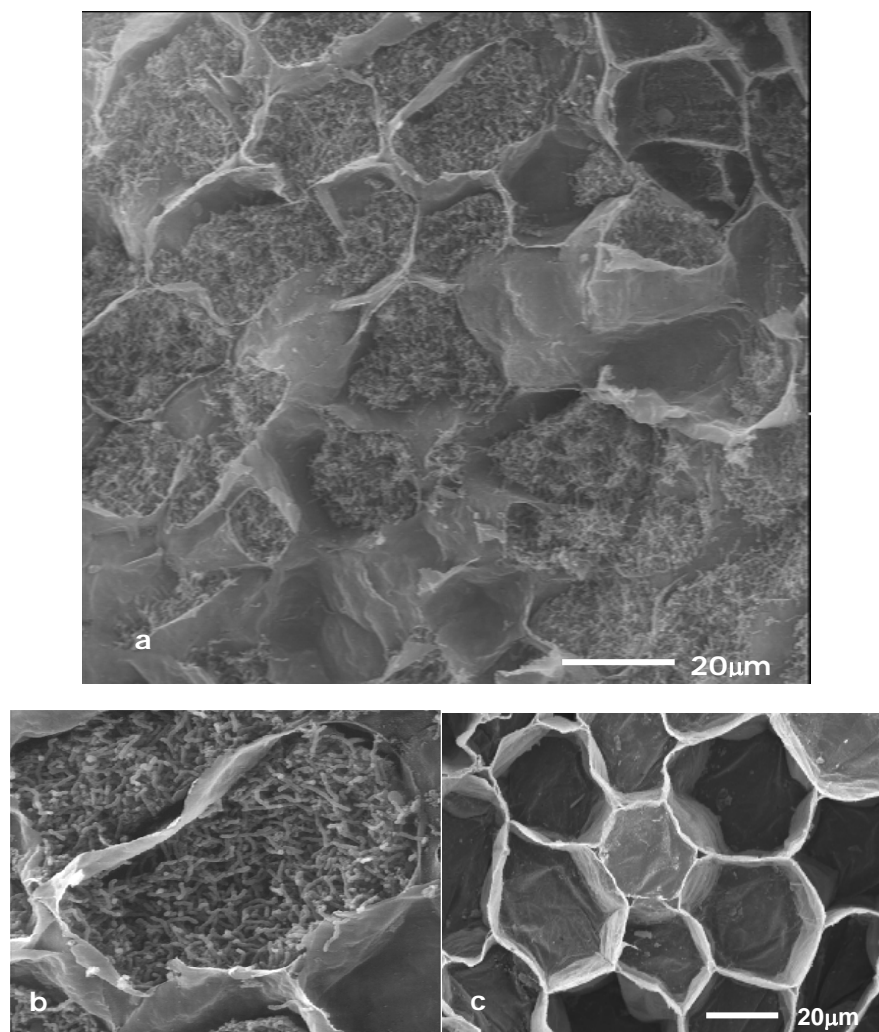


Figura 46. Microscopía electrónica de barrido del interior de un nódulo de *Lupinus albus*. El nódulo se obtuvo al inocular las plantas con *Paenibacillus* Lupsa 11. a) Células del córtex interno repletas de bacterias. b) ampliificación de una célula vegetal en la que se observan las bacterias *Paenibacillus*. c) células vegetales no infectadas.

4.2.2 FISH en cultivo puro de *Paenibacillus* con las sondas Cy3 y Cy5.5

Para evaluar la eficacia de las sondas Lupsa (marcadas con Cy3 y Cy5.5) y las sondas Islu (marcadas con Cy3 y Cy5) se utilizaron cultivos puros de los microorganismos *Paenibacillus* Lupsa 11 y *Bradyrhizobium* Islu 65.

Inicialmente se realizó FISH empleando las sondas LupsaCy3 e IsluCy3 en cultivos puros de las bacterias *Paenibacillus* Lupsa 11 y *Bradyrhizobium* Islu 65 respectivamente. Las muestras se observaron en el microscopio de epifluorescencia en el cual se detectó una alta señal fluorescente con las sondas utilizadas, lo cual indica que hubo una buena permeabilización, y que las sondas hibridaron de manera específica para cada microorganismo (Figura 47).

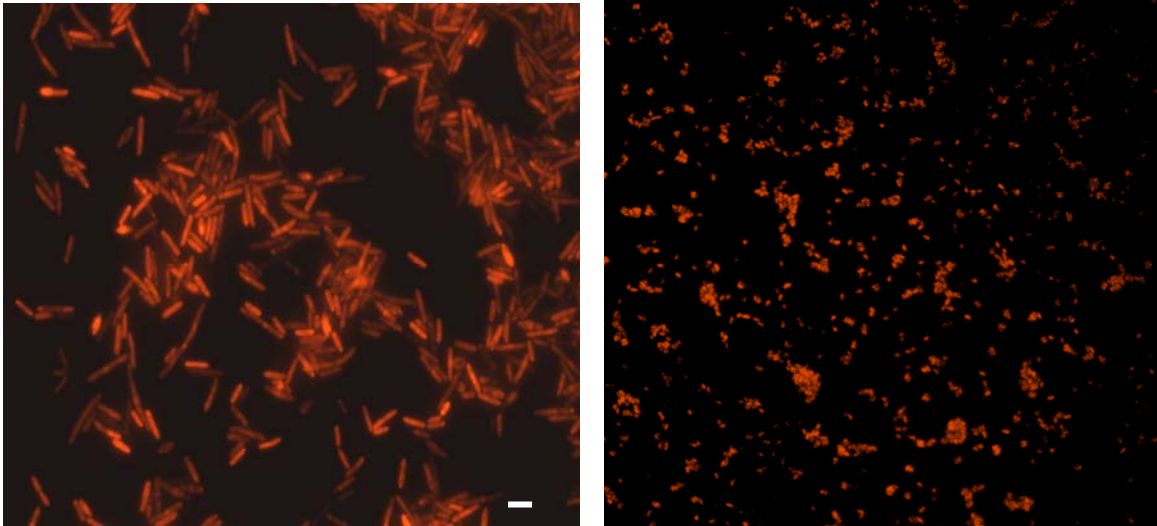


Figura 47. FISH en cultivo puro. La imagen de la izquierda corresponde a las bacterias *Paenibacillus* Lupsa 11 con la sonda LupsaCy3 y la imagen de la derecha *Bradyrhizobium* Islu 65 con la sonda IsluCy3. Barra, 2 μ m.

En otro ensayo en el que se realizó la técnica de hibridación *in situ* fluorescente, se empleó una mezcla de bacterias *Paenibacillus* Lupsa11 y *Bradyrhizobium* Islu65 y se utilizó únicamente la sonda LupsaCy3. En la Figura 48, se muestran las microfotografías que se obtuvieron en las que se aprecia que la sonda Lupsa Cy3 hibridó específicamente con las bacterias *Paenibacillus* las cuales presentaron una buena señal fluorescente (Figura 48b) a diferencia de las bacterias *Bradyrhizobium* Islu 65 en donde la sonda no hibridó y por lo tanto no hubo señal.

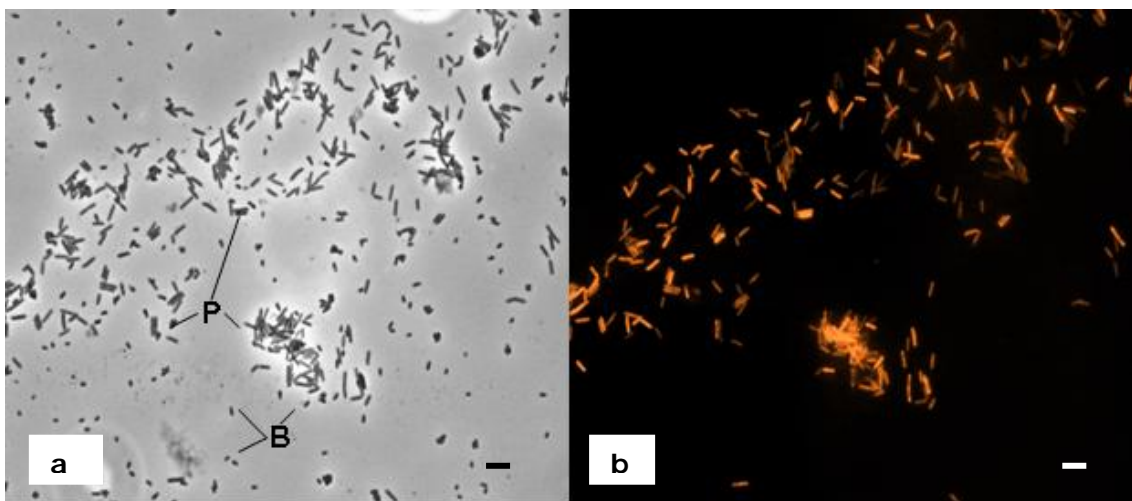


Figura 48. FISH en una mezcla de los cultivos puros de *Paenibacillus* Lupsa11 (P) y *Bradyrhizobium* Islu 65 (B). a. Microscopía de contraste en la que se observan las dos morfologías bacterianas. b. Hibridación de *Paenibacillus* con la sonda Lupsa Cy3. Barra, 2 μ m.

Por otra parte, con el fin de determinar si las sondas LupsaCy55 e IsluCy5 eran selectivas únicamente para los microorganismos en los cuales se habían diseñado y de esta manera tener certeza en los resultados de la fluorescencia emitida, se realizaron ensayos cruzando las sondas, es decir, se evaluó la sonda LupsaCy5 (específica de *Paenibacillus*) en bacterias *Bradyrhizobium* Islu 65; así mismo, la sonda IsluCy5 (específica para *Bradyrhizobium*) se ensayó en un cultivo puro de *Paenibacillus* Lupsa 11.

Las muestras se observaron en el microscopio confocal y los resultados se presentan en las Figuras 49 y 50. Bajo las condiciones utilizadas de hibridación a 46°C, se encontró que las sondas fueron altamente selectivas y específicas para cada microorganismo. En las Figuras 49a y 50a, se puede apreciar la fluorescencia emitida por las sondas que hibridaron, mientras que en los ensayos cruzando las sondas no se presentó fluorescencia (Figura 49b y 50b), con lo que se demuestra que las sondas reaccionan únicamente con las cepas que fueron diseñadas.

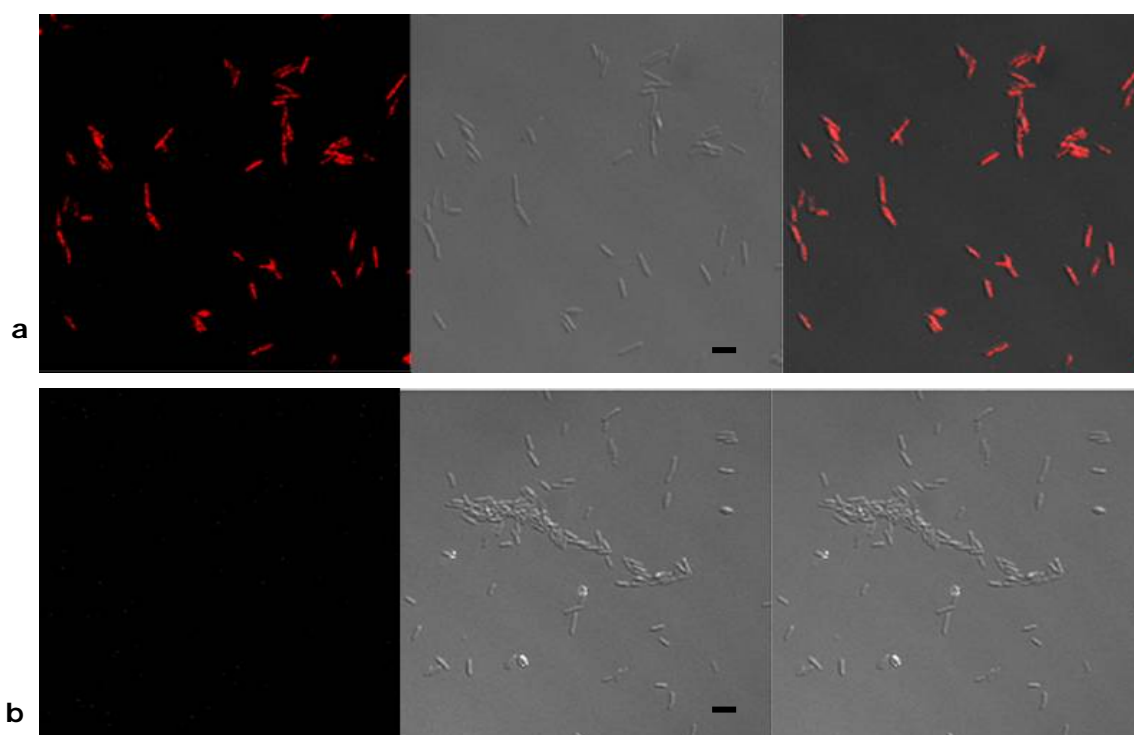


Figura 49. FISH de cultivo puro de *Paenibacillus* Lupsa 11 analizado por microscopía confocal. a) Empleo de la sonda LupsaCy55, donde se observa hibridación de la sonda b) Empleo de la sonda IsluCy5, nótese que no hay hibridación. La secuencia de imágenes es la siguiente, izquierda: hibridación de la sonda, centro: imagen de las bacterias en contraste de fases. Derecha: superposición de las imágenes. Barra, 2 μm .

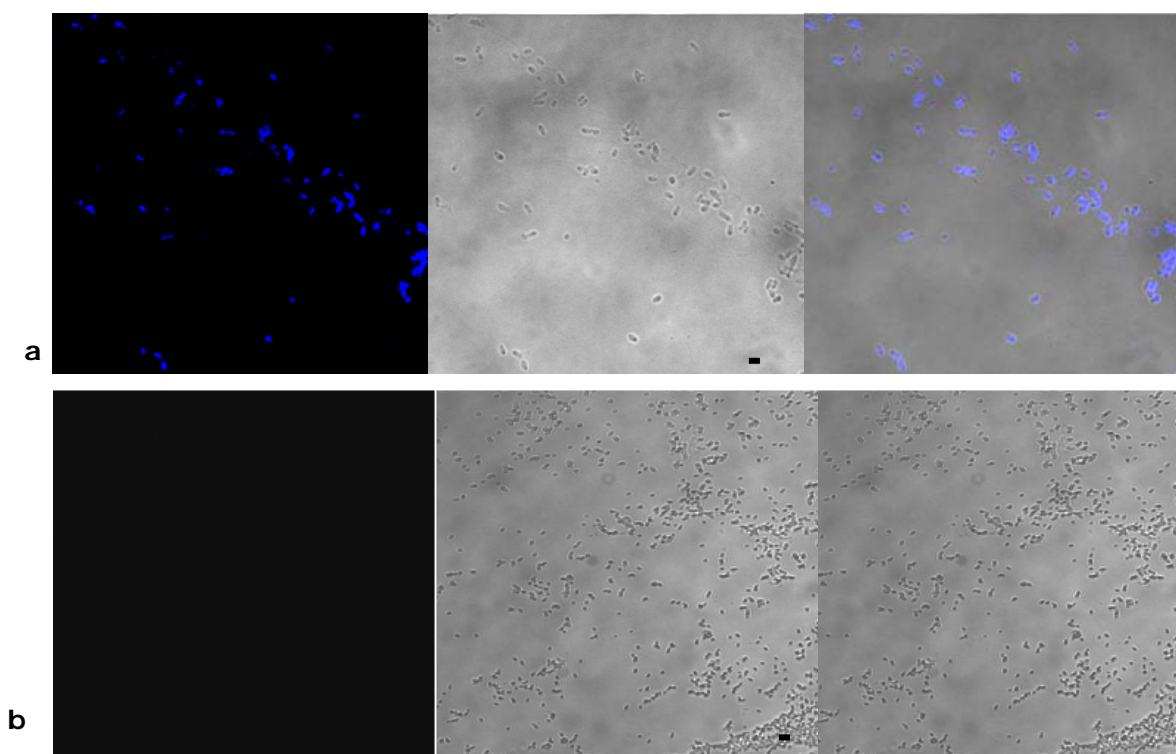


Figura 50. FISH de cultivo puro de *Bradyrhizobium* Islu 65 analizado por microscopía confocal. a) Empleo de la sonda IsluCy5, donde se observa hibridación de la sonda b) Empleo de la sonda LupsaCy5, nótese que no hay hibridación. La secuencia de imágenes es la siguiente, izquierda: hibridación de la sonda, centro: imagen de las bacterias en contraste de fases. Derecha: superposición de las imágenes. Barra, 2 μm .

4.2.3 Identificación de bacterias del género *Paenibacillus* en nódulos por FISH

4.2.3.1 Obtención de cortes histológicos

Los cortes histológicos obtenidos de nódulos de *Lupinus albus* tenían un grosor de 2 μm , fueron desparafinados y teñidos con el colorante de hematoxilina- eosina tal como se describió en el apartado 3.3.1.2. En la Figura 51a, se puede apreciar la morfología de un corte histológico de un nódulo Lupsa obtenido al inocular la planta *Lupinus albus* con *Paenibacillus* Lupsa 11, mientras que en la Figura 51b se observa el tejido del nódulo Islu que se obtuvo al inocular la planta con *Bradyrhizobium* Islu 65.

La conformación interior del nódulo permite ver las células corticales, las cuales tienen un color más intenso, además de zonas más claras que las delimitan y que corresponden a los espacios intercelulares. Tal como se pudo observar por microscopía electrónica de barrido (Figura 46), la zona más intensa corresponde al sitio donde se encuentran ubicadas las bacterias que nodulan la planta.

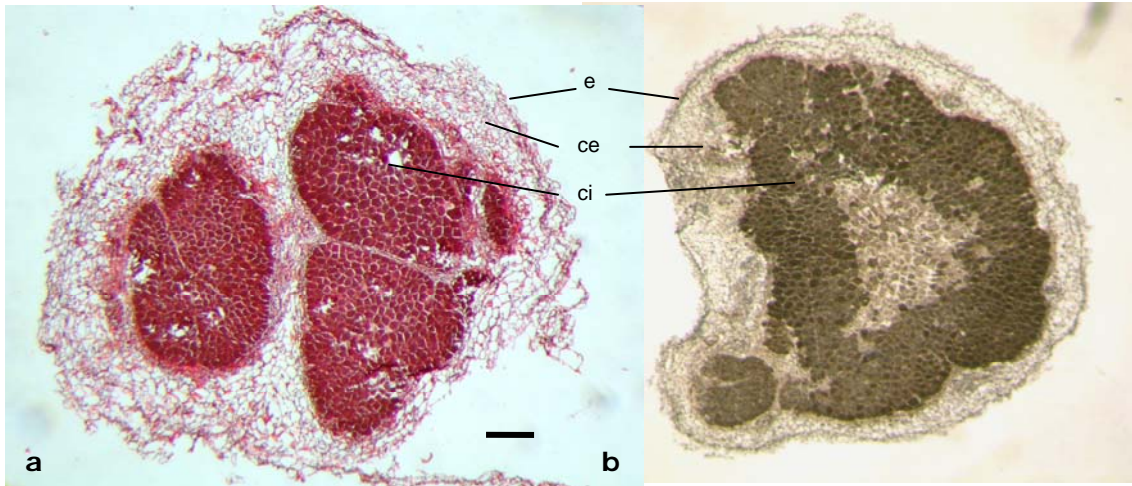


Figura 51. Cortes histológicos transversales de los nódulos de la planta *Lupinus albus*. a) nódulos obtenidos al inocular la planta con *Paenibacillus* Lupsa 11. b) nódulos obtenidos al inocular con *Bradyrhizobium* Islu 65. e, epidermis; ce, cortex externo; ci, células corticales internas las cuales contienen bacterias. Barra, 500 μ m.

En la Figura 52, se presenta una secuencia de fotografías tomadas en el microscopio estereoscópico a diferentes secciones de un nódulo de la planta *Lupinus albus* inoculada con la cepa de *Paenibacillus* Lupsa 11 y teñidos con hematoxilina- eosina. Los cortes histológicos se realizaron de manera vertical y este tipo de cortes fueron utilizados posteriormente en los diversos ensayos de hibridación, para detectar la presencia de *Paenibacillus* dentro del nódulo.

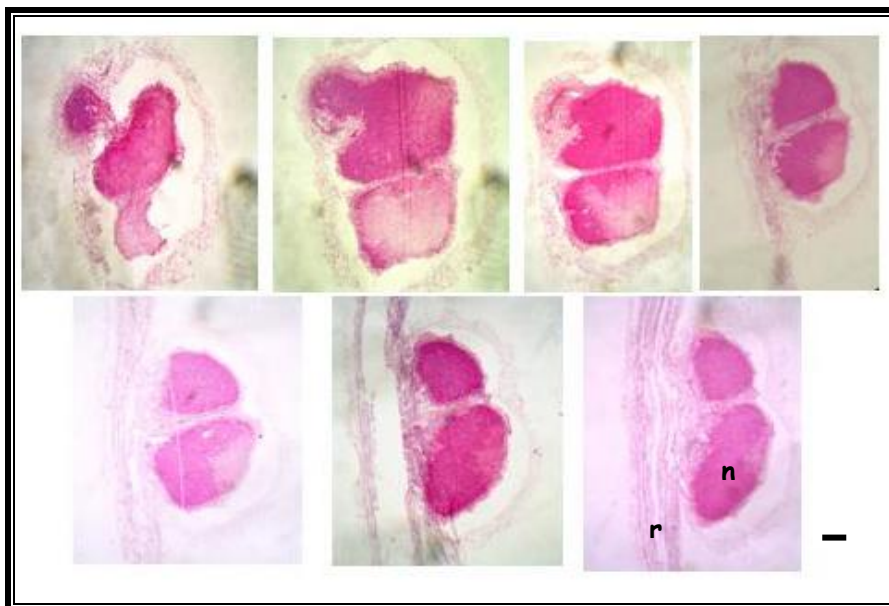


Figura 52. Secuencias del corte vertical realizado al nódulo Lupsa. r, raíz; n, nódulo. Barra, 500 μ m.

4.2.3.2 FISH en cortes histológicos de nódulos

La técnica de hibridación *in situ* fluorescente se realizó en cortes de nódulos con el fin de demostrar la presencia de *Paenibacillus*. En total se analizaron por FISH 85 cortes de los nódulos Lupsa que se obtuvieron al inocular la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 en la planta *Lupinus albus*. En cada ensayo se utilizaron tejidos a los cuales no se les adicionó la sonda, estos cortes sirvieron como control para determinar la autofluorescencia generada por el nódulo.

Inicialmente se hicieron ensayos de hibridación con la sonda LupsaCy3 que fueron analizados en el microscopio de epifluorescencia. Los resultados que se muestran en las microfotografías (Figura 53), indican que se logró detectar el ARN bacteriano en el tejido de los nódulos, las bacterias dan una buena señal fluorescente y la señal se hace más intensa cuando las bacterias se encuentran agrupadas.

Vale la pena señalar que mediante la observación en el microscopio de epifluorescencia se presentó "background" fluorescente del tejido vegetal el cual no impidió interpretar las observaciones microscópicas, ya que, se puede apreciar claramente las bacterias *Paenibacillus* Lupsa 11 entre los restos autofluorescentes del tejido del nódulo (Figura 53).

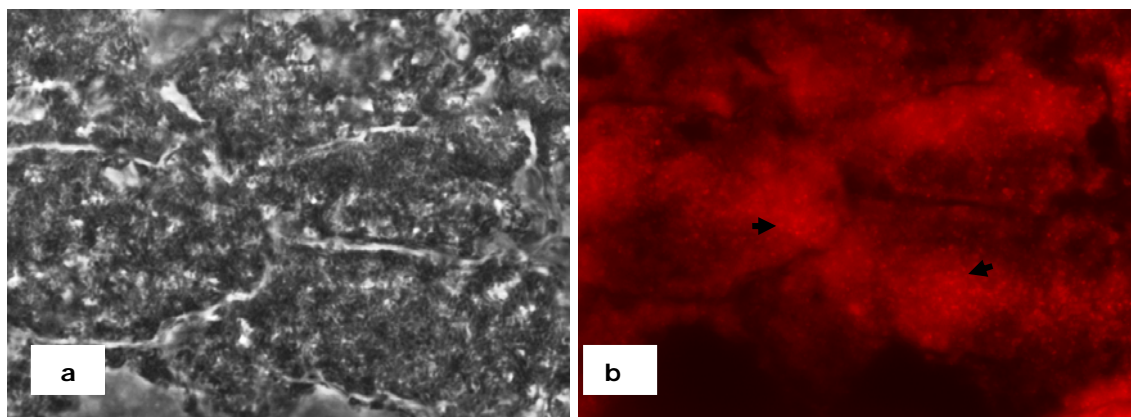


Figura 53. FISH de nódulos Lupsa con la sonda LupsaCy3 en microscopio de epifluorescencia. a. Tejido visto en contraste de fases, b. Se aprecia la fluorescencia emitida por las bacterias la cual es mas intensa (lo indica las flechas), que la autofluorescencia del tejido vegetal.

Para evitar las interferencias causadas por la autofluorescencia del nódulo los demás ensayos se realizaron empleando las sondas marcadas con Cy5, Cy5.5 que emiten en el rojo lejano y en el cual no presenta espectro de fondo. En este caso, las muestras se analizaron en un microscopio confocal.

En las Figuras 54 y 55 se presentan las microfotografías de cortes histológicos de nódulos Lupsa e Islu que se obtuvieron al inocular en *Lupinus albus* las cepas *Paenibacillus* Lupsa 11 y *Bradyrhizobium* Islu 65 respectivamente. En dichos cortes se realizó FISH cruzando las sondas de manera similar al que se hizo con las bacterias en cultivo puro, es decir, se utilizaron las sondas LupsaCy55 específica para *Paenibacillus* Lupsa 11, así como la sonda IsluCy5 específica para *Bradyrhizobium* Islu 65.

En el caso del empleo de la sonda LupsaCy55 en cortes de nódulos Lupsa, los resultados encontrados (microfotografía Figura 54a) permiten apreciar que la sonda LupsaCy55 hibridó de manera específica con las bacterias *Paenibacillus* presentes en los tejidos del nódulo. En la superposición de las imágenes se puede observar una exacta localización de la señal obtenida dentro de las células vegetales donde se encuentran las bacterias.

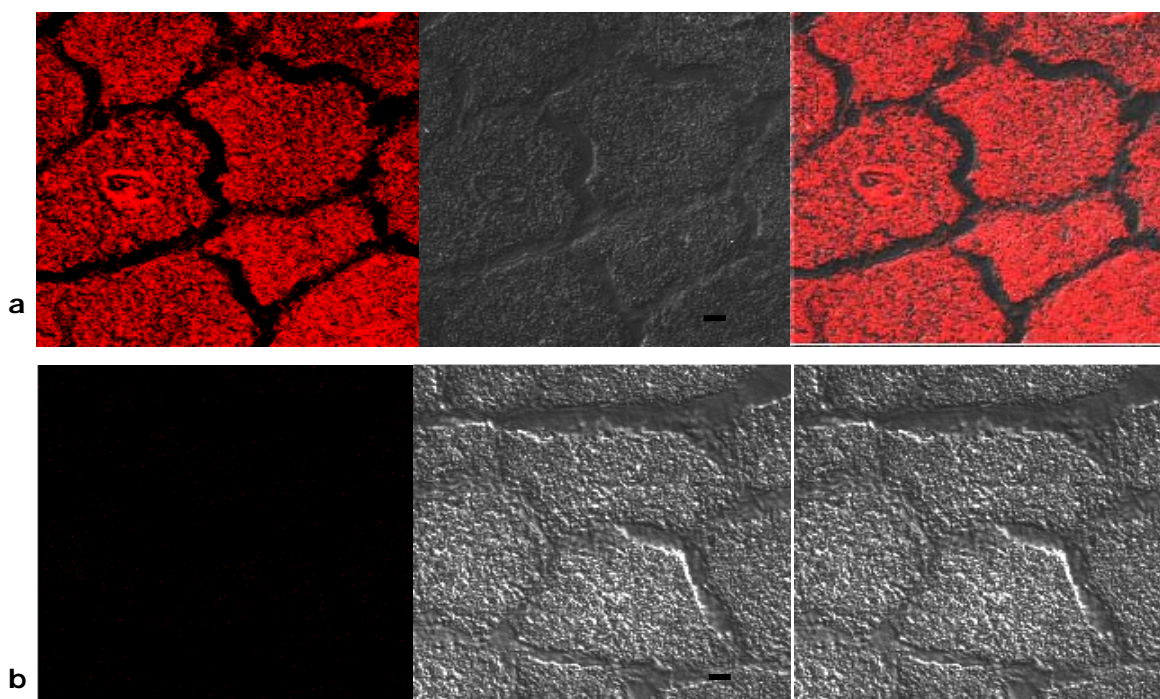


Figura 54. FISH en tejidos de nódulos de *Lupinus albus*, obtenidos al inocular con *Paenibacillus* Lupsa 11 y analizados por microscopía confocal. a) Empleo de la sonda LupsaCy5, donde se observa hibridación de la sonda b) Empleo de la sonda IsluCy5 como control, se aprecia que no hay hibridación. La secuencia de imágenes es la siguiente, izquierda: hibridación de la sonda, centro: imagen de las células en contraste de fases. Derecha: superposición de las imágenes. Barra, 4 μm .

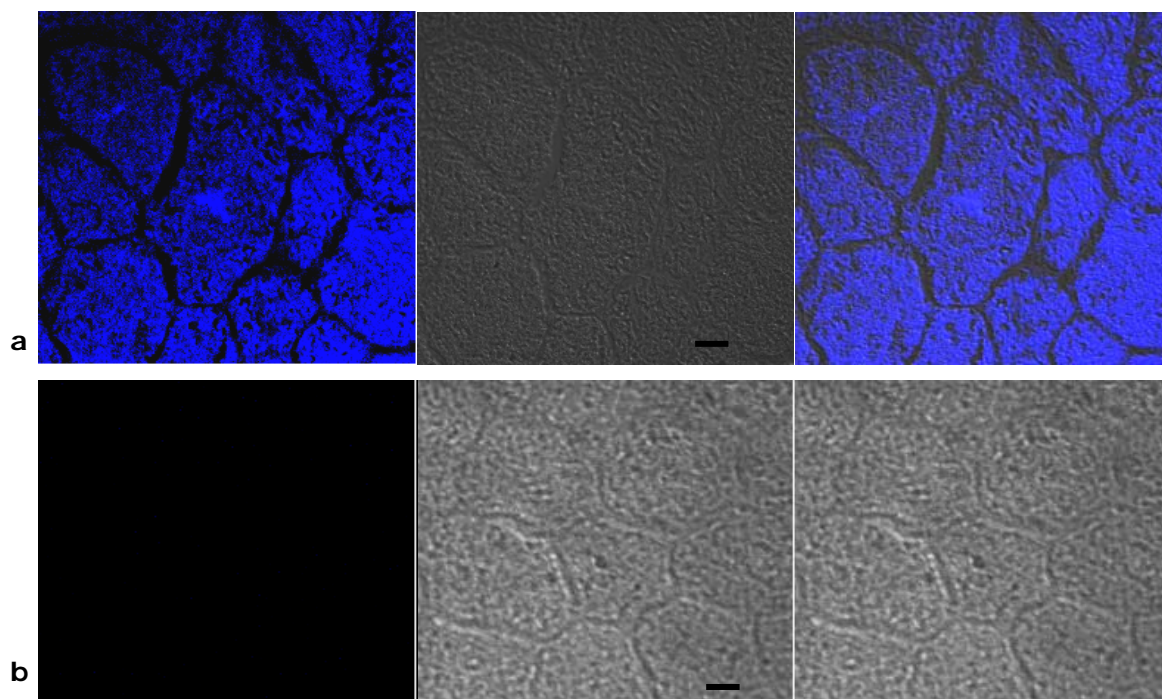


Figura 55. FISH en tejidos de nódulos de *Lupinus albus*, obtenidos al inocular con *Bradyrhizobium* Islu 65 y analizados por microscopía confocal. a) Empleo de la sonda IsluCy5, donde se observa hibridación de la sonda b) Empleo de la sonda LupsaCy5 como control, se aprecia que no hay hibridación. La secuencia de imágenes es la siguiente, izquierda: hibridación de la sonda, centro: imagen de las células en contraste de fases. Derecha: superposición de las imágenes. Barra, 5 μ m.

Cuando se utilizó la sonda IsluCy5 en los cortes del nódulo Lupsa, no se presentó ningún tipo de señal fluorescente lo cual indica que la sonda no encontró ARNr de *Bradyrhizobium* para hibridar. Estos resultados se pueden observar en la secuencia de imágenes (Figura 54b).

Por otra parte, La Figura 55 muestra los resultados de la hibridación en los que se evaluó las sondas IsluCy5 y LupsaCy55 en cortes de nódulos Islu, obtenidos al inocular la cepa *Bradyrhizobium* Islu 65 en *Lupinus albus*. Las tres microfotografías de la Figura 55a, permiten apreciar la fluorescencia que se obtuvo con la sonda IsluCy5 específica de *Bradyrhizobium* Islu 65, mientras que al emplear la sonda LupsaCy5, (microfotografías de la Figura 55b) no se detectó la presencia del ARNr de la bacteria *Paenibacillus* Lupsa 11 y por lo tanto no hubo fluorescencia.

Estos resultados demuestran que las sondas eran altamente específicas, tal como se había encontrado en los ensayos de FISH realizados en cultivos puros. La especificidad de las hibridaciones realizadas en este estudio se pueden certificar por las siguientes apreciaciones:

- i) La selectividad de las sondas demostró que únicamente se presenta fluorescencia en las cepas a partir de las cuales fueron diseñadas las sondas y no hay hibridación en otros grupos bacterianos.
- ii) La fluorescencia emitida de manera específica por las bacterias dentro del tejido del nódulo.
- iii) La coherencia en el marcaje, lo cual se aprecia en las microfotografías de superposición de imágenes (Figuras 54 y 55).

De acuerdo con los resultados de la Figura 54a en los que se encontró una señal elevada en las células internas del nódulo, demuestra que dichas células corticales contenían un número elevado de microorganismos y por lo tanto se presentó una buena señal fluorescente. La presencia de la gran cantidad de bacterias *Paenibacillus* dentro del cortex interno ya se había demostrado por microscopía electrónica de barrido, tal como se presentó en la Figura 46.

Es necesario destacar que no se detectó señal fluorescente en el tejido vascular ni en los espacios intercelulares (Figura 54a) tal como se observó en las distintas secciones realizadas con el microscopio confocal, lo cual demuestra que no se presentaron uniones inespecíficas de la sonda LupsaCy55 y que ésta solamente hibridó en los sitios donde encontraba la bacteria *Paenibacillus* Lupsa 11.

En la mayoría de los ensayos de FISH en nódulos no se utilizaron los fluorocromos FITC y Cy3, debido a la autofluorescencia que presentan con el tejido vegetal (Figura 53); estos fluorocromos tienen un alto coeficiente de extinción molar y son excitados por longitudes de onda entre el verde y el naranja (490 nm y 550 nm), longitudes en las cuales también se presenta fluorescencia por compuestos del tejido vegetal tales como la lignina y la celulosa. Por esta razón, las muestras fueron analizadas con fluorocromos como el Cy5.5 el cual se excita en la región roja del espectro (675 nm) y emite en el rojo lejano (694 nm), longitudes en las cuales no se presentó la interferencia causada por la autofluorescencia de los tejidos del nódulo.

Por otra parte, en algunos casos mediante la aplicación de imágenes espectrales se logró separar con éxito la autofluorescencia producida por el tejido vegetal del nódulo, de la fluorescencia producida por la sonda hibridada en las bacterias, superando de este modo el problema de autofluorescencia. Según Schuppler (1998), el uso del microscopio confocal mejora la detección de las bacterias en muestras ambientales ya que elimina la fluorescencia "desenfocada". Además, con

el incremento del contraste digital y la eliminación de secciones sin ninguna información, facilita la visualización de las bacterias que dan una señal débil dentro de los tejidos (Watt *et al.*, 2006).

De acuerdo con los resultados obtenidos de los ensayos realizados con la técnica de hibridación *in situ* fluorescente, demostramos la presencia de bacterias del género *Paenibacillus* dentro de los nódulos de la planta *Lupinus albus*. Las sondas Lupsa Cy3 y LupsaCy5 hibridaron exitosamente el ARNr de las bacterias que se encontraban en el tejido cortical de los nódulos.

4.3 DETECCIÓN DE *Micromonospora* EN NÓDULOS DE *Lupinus angustifolius* MEDIANTE FISH

Los nódulos se obtuvieron de plantas recolectadas en la región de Saelices el Chico a las cuales se les realizó la técnica de hibridación *in situ* fluorescente para detectar las bacterias del género *Micromonospora* en el interior de los nódulos.

4.3.1 Microscopía electrónica

Los nódulos que fueron observados por microscopía electrónica de barrido se procesaron tal como se describió en el apartado 3.2. La Figura 56a, muestra la sección microscópica de un nódulo de *Lupinus angustifolius* en los que se puede apreciar la capa externa de la epidermis y dentro de la parte interna de esta capa se encontraron estructuras ramificadas de 1 μm de grosor dispersas a lo largo de la capa externa del nódulo.

De igual manera, las microfotografías de la Figura 56b, muestran la corteza externa del nódulo en los que una vez mas se pueden apreciar estructuras ramificadas. En un acercamiento de la imagen se observa que el micelio tiende a introducirse en las capas mas profundas del nódulo, dichas estructuras ramificadas podría corresponder a bacterias del género *Micromonospora*, por lo que se realizó la técnica de FISH para identificar *in situ* estos microorganismos.

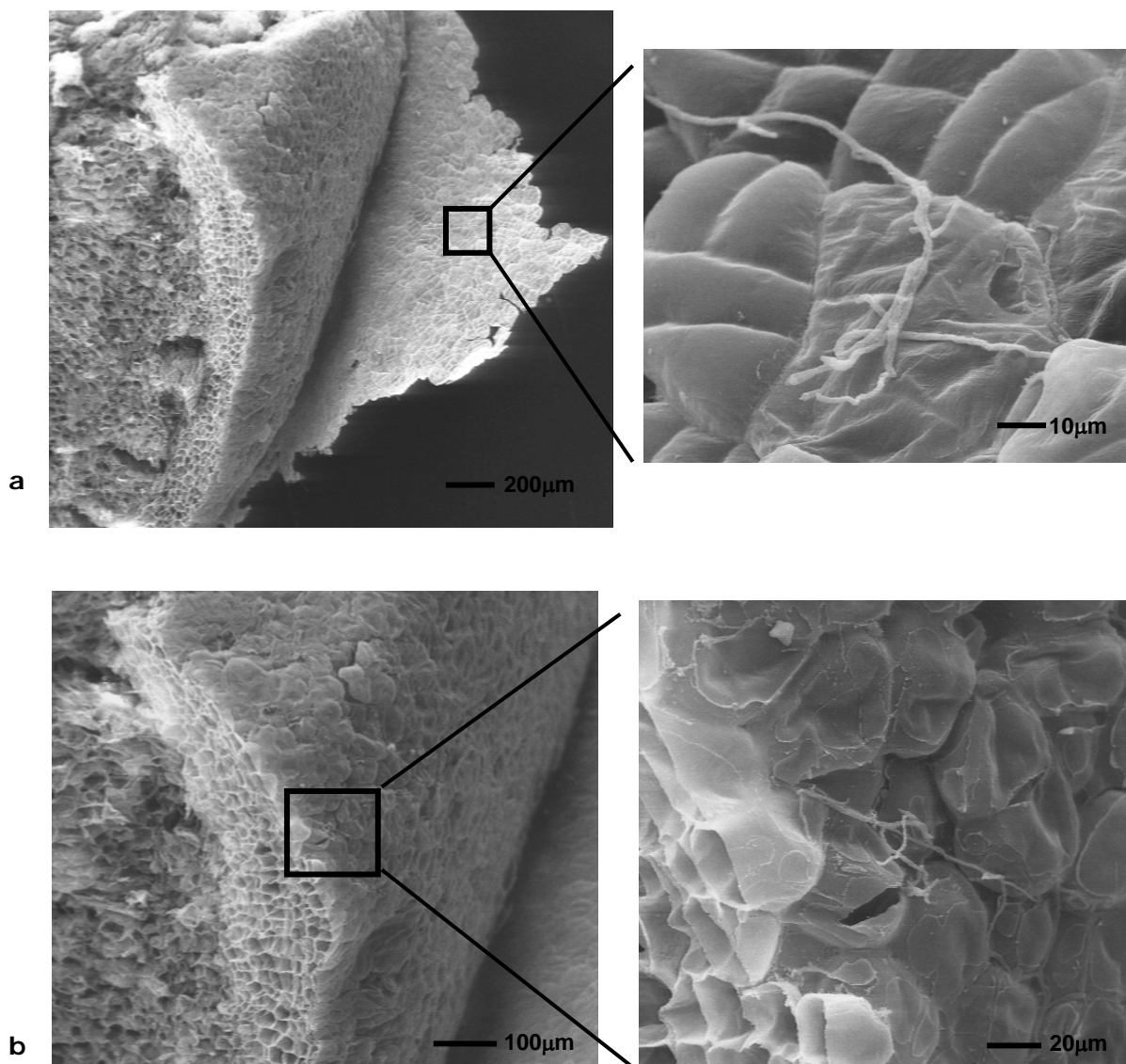


Figura 56. Microscopía electrónica de barrido de un nódulo de *Lupinus angustifolius* en los que se aprecian estructuras ramificadas posiblemente *Micromonospora* tanto en la capa más externa de la epidermis (a), así como en la corteza externa (b).

La observación que se realizó al cortex interno del nódulo (Figura 57) permitió apreciar que las células del nódulo contenían en su interior microorganismos de forma bacilar, así como estructuras de morfología oval y redonda.

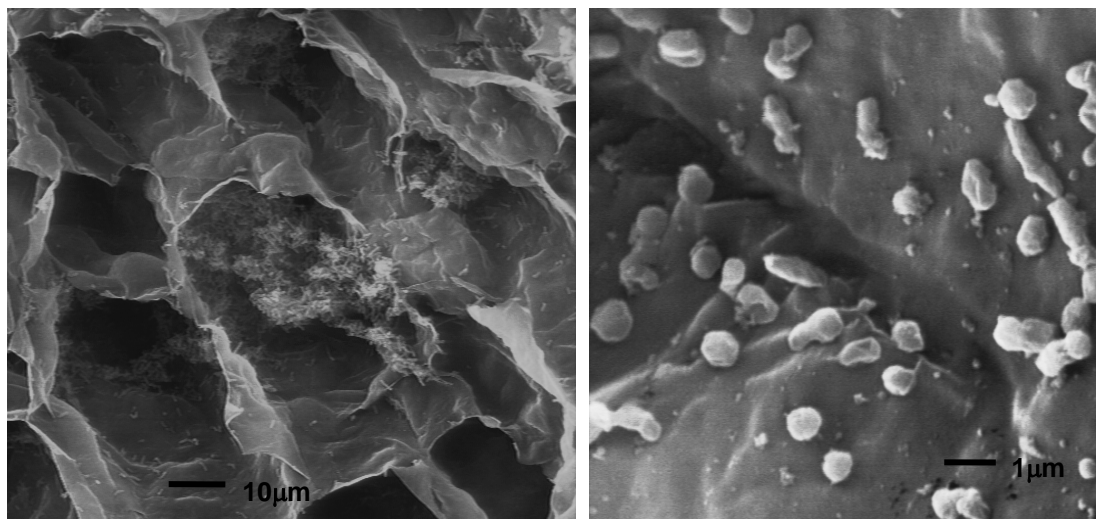


Figura 57. Microscopía electrónica de barrido del interior del nódulo. Se observa la morfología de bacilos (a), y estructuras similares a esporas (b).

4.3.2 FISH en cultivo puro de *Micromonospora*

Los resultados que se muestran en la Figura 58, corresponden a la hibridación *in situ* fluorescente realizada en cultivos puros de la cepa *Micromonospora lupini* DSM 44874^T con la sonda MicromFITC y vista al microscopio de epifluorescencia. En la permeabilización de las células se utilizó la mezcla de proteinasa K (5 µg/ml) y lisozima (5 mg/ml), de acuerdo con los resultados que se presentaron en la Tabla 25.

En las microfotografías tomadas con el microscopio de contraste (Figura 58 a y b), se puede observar el micelio y las esporas de la bacteria *Micromonospora* en los que después de realizar FISH se aprecia claramente la intensidad de la señal fluorescente emitida tanto por el micelio como por las esporas. Esto demuestra que el tratamiento de permeabilización fue efectivo y que la sonda MicromFITC hibridó correctamente.

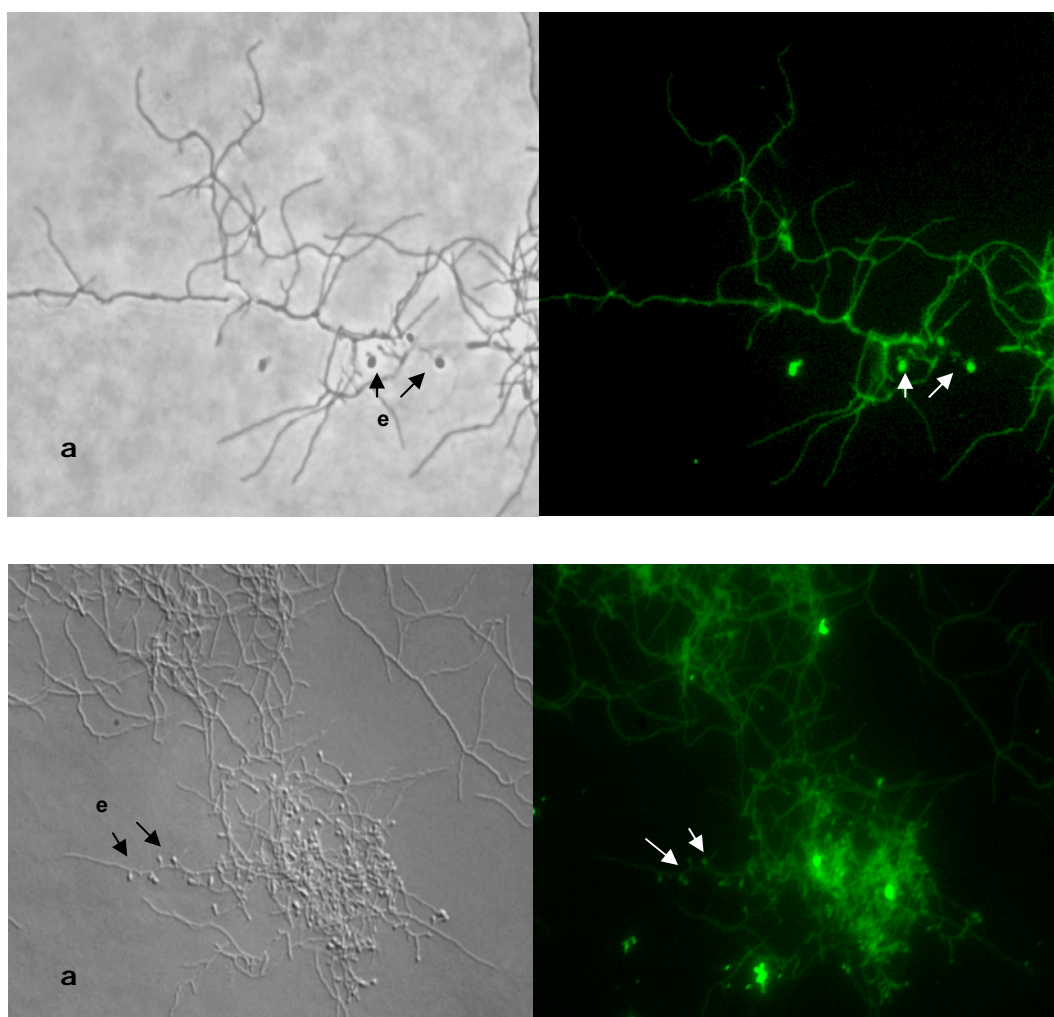


Figura 58. FISH en cultivo puro de *Micromonospora lupini* DSM 44874^T empleando la sonda MicromFITC. Tanto en a) como en b) se puede apreciar la fluorescencia que emite el micelio donde la sonda hibridó. Foto de la izquierda contraste de fases y a la derecha de epifluorescencia. e: esporas.

En otros experimentos llevados a cabo en cultivo puro de *Micromonospora lupini* DSM 44874^T se utilizó la sonda MicromCy55 y, además se utilizó la sonda IsluCy5 específica de bacterias *Bradyrhizobium* debido a que son los microorganismos que se han descrito que nodulan las plantas de *Lupinus*. Las muestras se observaron en el microscopio confocal y los resultados se pueden ver en la Figura 59.

Una vez más la sonda MicromCy55 hibridó de manera específica con las bacterias del género *Micromonospora* (Figura 59a), se puede ver una localización exacta de la señal fluorescente en donde se encuentra el micelio bacteriano. Por otra parte, la sonda MicromCy55 fue evaluada en un cultivo puro de *Bradyrhizobium* Islu 65 (Figura 59b) sin que se presentara ningún tipo de señal, lo cual demuestra que la sonda micromCy55 es selectiva para *Micromonospora*.

Además, se realizó otro ensayo de FISH para corroborar la especificidad de las sondas. En este caso se utilizó la sonda IsluCy5 (específica para bacterias *Bradyrhizobium*) en un cultivo puro de bacterias *Micromonospora*. Los resultados obtenidos (Figura 59c) indican que no hubo hibridación de la sonda IsluCy5 en *Micromonospora* y por lo tanto no se obtuvo ningún tipo de señal fluorescente.

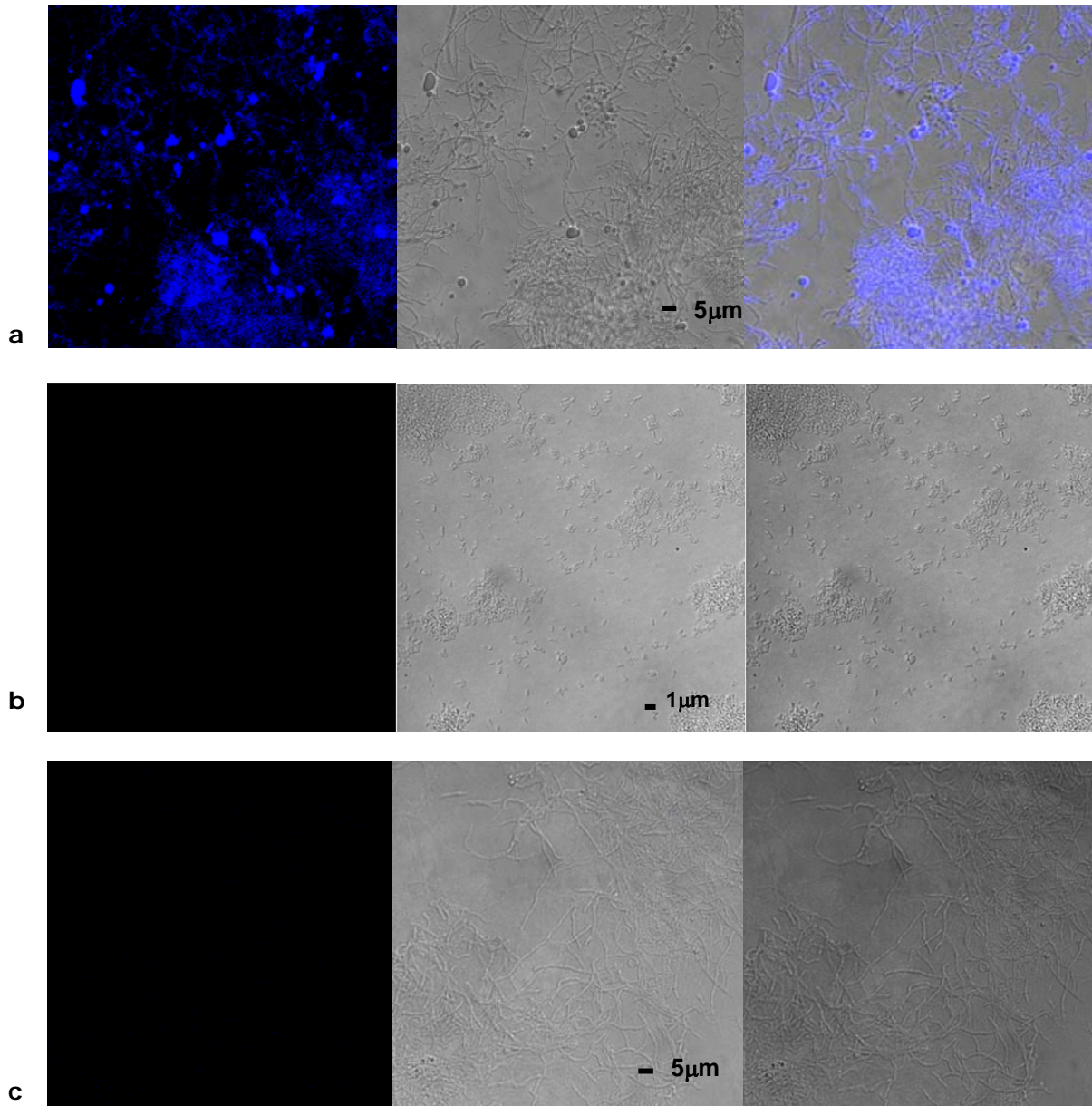


Figura 59. FISH en cultivo puro de *Micromonospora Lupini* DSM 44874^T y *Bradyrhizobium* Islu 65. a) empleo de la sonda MicromCy55 en los que se observa hibridación de la sonda con el micelio de *M. lupini*, b) *Bradyrhizobium* Islu 65 con la sonda MicromCy5, no hay fluorescencia. c) con empleo de la sonda IsluCy5 en cultivo puro de *M. lupini* DSM 44874^T, no se presentó hibridación de la sonda. La secuencia de imágenes es la siguiente, izquierda: hibridación de la sonda, centro: imagen de las bacterias en contraste de fases. Derecha: superposición de las imágenes.

4.3.3 Detección de *Micromonospora* en cortes histológicos de nódulos silvestres

Los cortes histológicos de 2 μm de grosor se obtuvieron tal como se describió en la metodología (sección 3.3.1.2). En la Figura 60 se presentan los resultados de la hibridación *in situ* fluorescente utilizando la sonda micromCy55, en los que se puede apreciar la fluorescencia que emiten las bacterias que hibridaron con la sonda, las cuales se hallan dentro de las células vegetales y que posiblemente correspondan a bacterias del género *Micromonospora* (microfotografía Figura 60a).

Para conocer la fluorescencia emitida por el tejido vegetal se hizo un barrido de longitudes de onda en el microscopio confocal entre los 450 nm y 620 nm. La microfotografía de la Figura 60b, muestra la autofluorescencia que emite el tejido del nódulo y en la Figura 60d se presenta la superposición de imágenes de la fluorescencia obtenida con la sonda micromCy55 (en color azul) y la autofluorescencia del tejido (en color verde). Se puede apreciar que la señal es más intensa con la sonda específica de *Micromonospora* respecto a la propia fluorescencia del tejido.

En un análisis de imágenes realizado en el microscopio confocal se restó la autofluorescencia del tejido del nódulo a la microfotografía obtenida en la superposición de imágenes y de esta manera, se obtuvo la fluorescencia específica debida a *Micromonospora* presente en las células vegetales (Figura 60e).

Se realizaron varios ensayos más con la sonda micromCy55 en cortes de nódulos, los cuales se pueden observar en la Figura 61, en las que solo se muestra la fluorescencia de la sonda emitida al hibridar con las bacterias del género *Micromonospora* y sin la autofluorescencia del tejido.

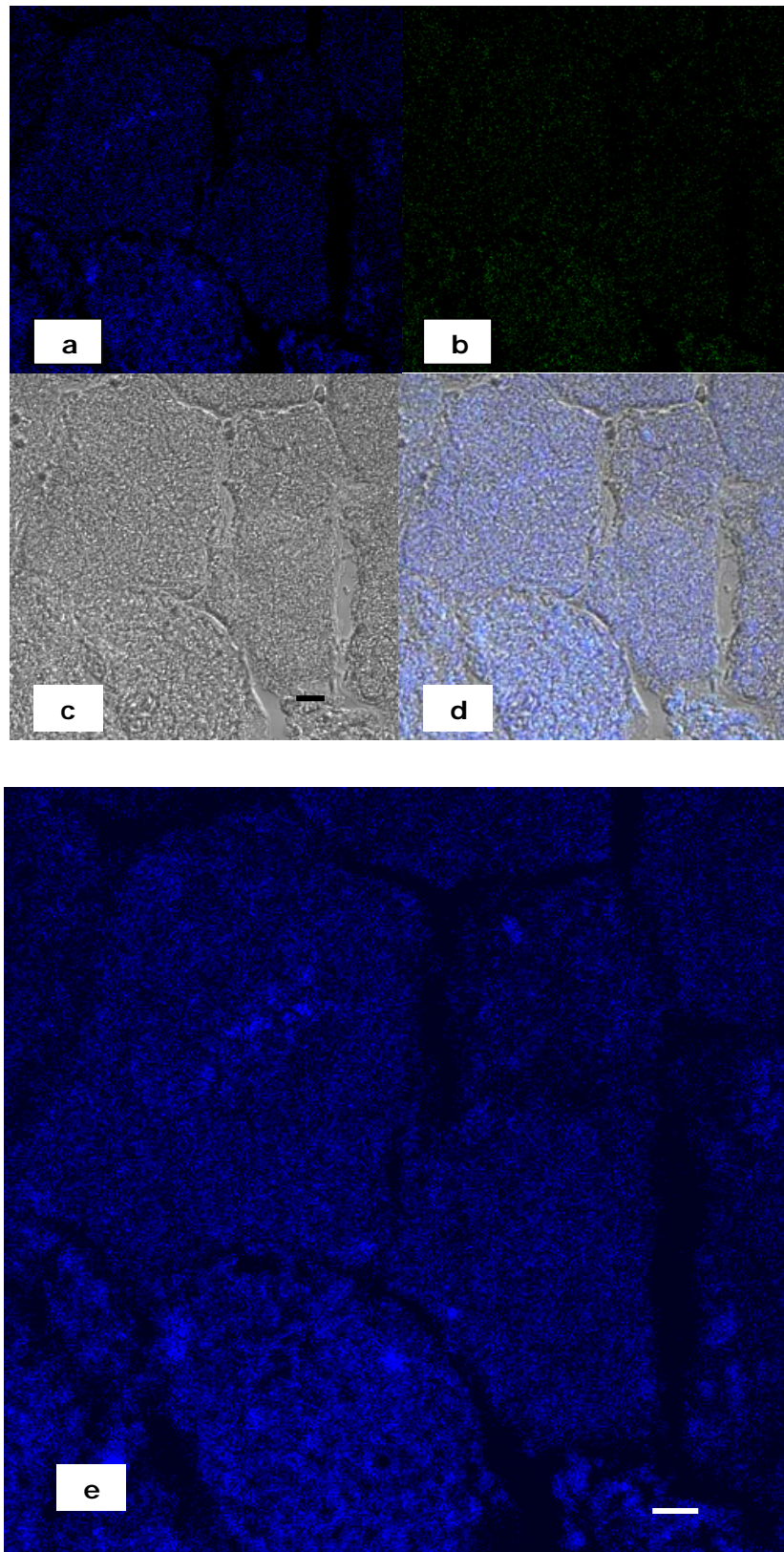


Figura 60. FISH en tejidos de nódulos de *Lupinus angustifolius* con la sonda micromCy55. a) fluorescencia emitida por hibridación con la sonda Cy55. b) autofluorescencia del tejido, c) corte visto en contraste de fases, d) superposición de las imágenes a, b y c, se observa mayor fluorescencia por la sonda micromCy55 (color azul), e) imagen obtenida luego de restar la autofluorescencia. Barra, 5 μm .

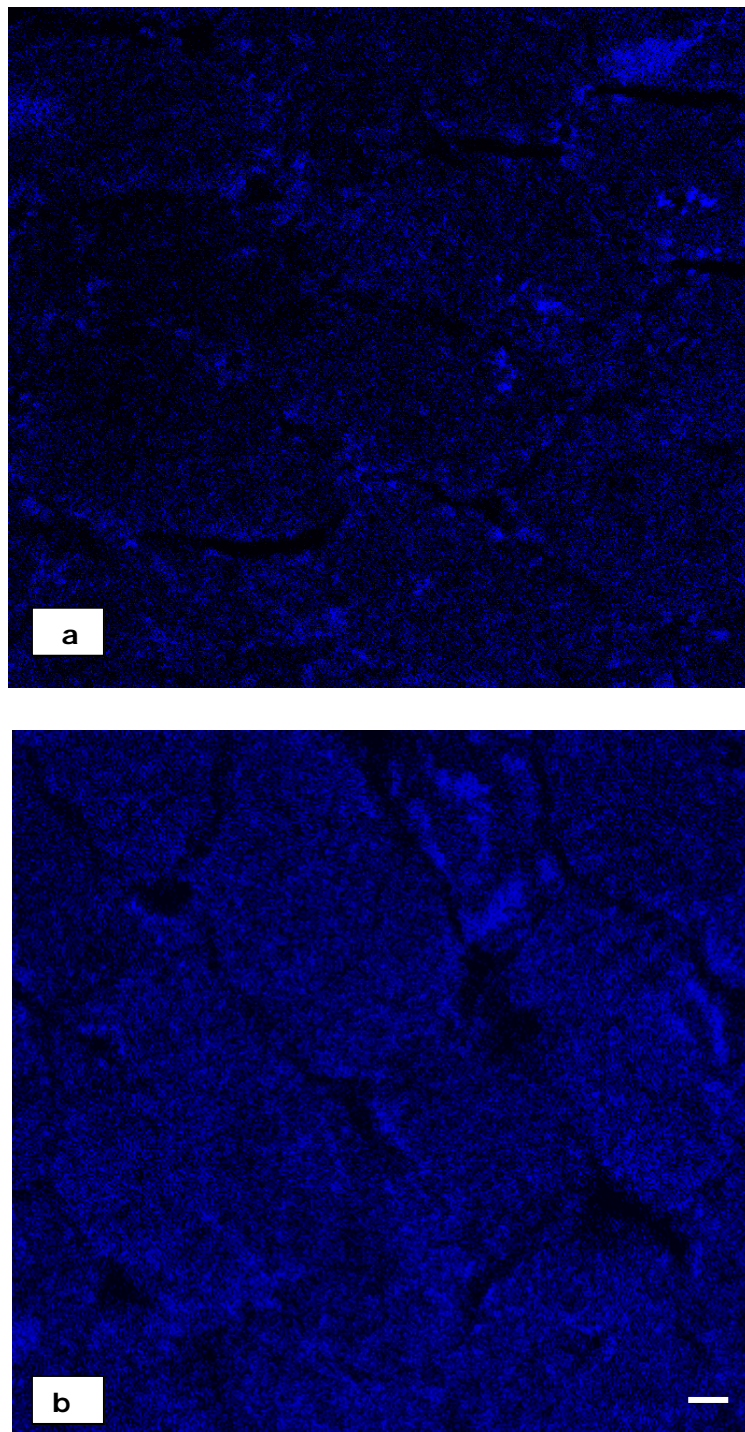


Figura 61. FISH en tejidos de nódulos de *Lupinus angustifolius* con la sonda micromCy5.5. a) y b) corresponden a la imagen del tejido al quitarle la autofluorescencia, dejando únicamente la fluorescencia emitida por la hibridación de las bacterias con la sonda micromCy5.5. Barra, 5 μm .

Debido a que las bacterias del género *Bradyrhizobium* son los microorganismos que se sabe nodulan *Lupinus*, se hizo un ensayo de FISH empleando las dos sondas: IsluCy5 y Microm Cy55 para detectar en el nódulo tanto bacterias *Bradyrhizobium* como de *Micromonospora*. La microfotografía que se presenta en la Figura 62a, muestra una menor fluorescencia en el tejido del nódulo cuando solo se utilizó la sonda IsluCy5, a diferencia de la fluorescencia cuando se utilizaron ambas sondas (Figura 62b), lo cual demuestra que tanto bacterias *Micromonospora* como *Bradyrhizobium* están presentes en el interior del nódulo.

Es necesario señalar que las sondas hibridaron de manera específica con los microorganismos que se hallaban presentes dentro de las células vegetales y no se unieron a otros sitios como el tejido intercelular. Cabe destacar que en este experimento se tuvieron en cuenta las mismas condiciones tanto del laboratorio como del microscopio confocal, sin embargo, debido a que ambas sondas emiten a la misma longitud, no fue posible diferenciar por colores la fluorescencia emitida por cada una de las sondas.

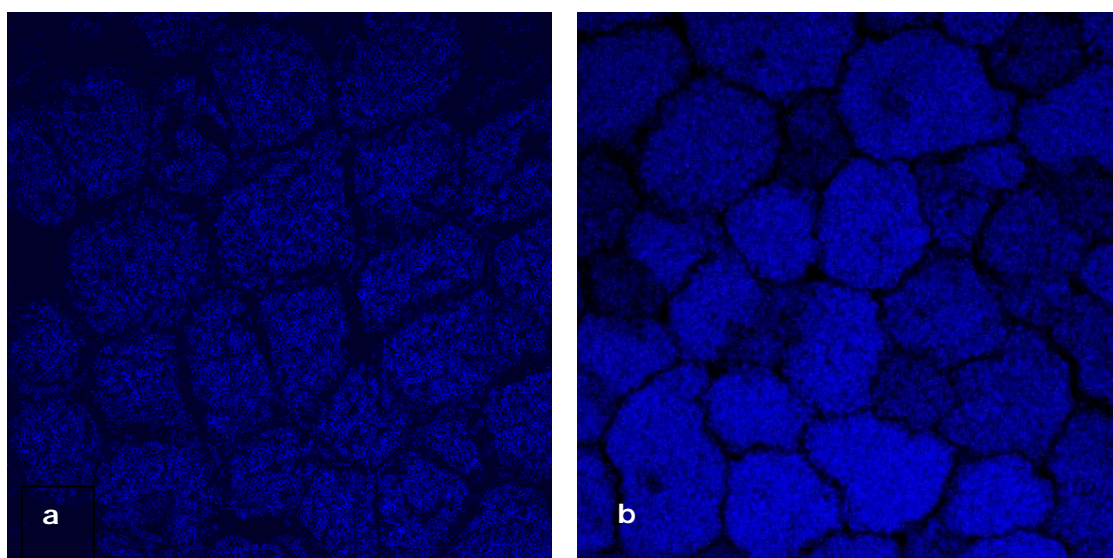


Figura 62. FISH en nódulos empleando la sonda IsluCy5 (a) y la mezcla de las sondas Islu Cy5 y microm Cy55 (b). Bajo las mismas condiciones utilizadas se aprecia mayor fluorescencia al emplear ambas sondas, lo que indica la presencia tanto de bacterias *Micromonospora* como de *Bradyrhizobium* dentro del nódulo.

Con los resultados obtenidos del ensayo de hibridación *in situ* fluorescente en cortes histológicos de nódulos, se confirma la presencia de bacterias del género *Micromonospora* en el interior de los nódulos de *Lupinus*, tal como se había demostrado en los ensayos de aislamiento de bacterias a partir de nódulos esterilizados en superficie, los estudios morfológicos y bioquímicos y, mediante la identificación del gen ARNr 16S de las cepas aisladas, resultados que se presentan en el capítulo I de esta memoria de tesis.

Es necesario destacar que estos hallazgos permiten abrir nuevas líneas de investigación, dirigidos hacia la búsqueda de microorganismos que se encuentren como endofitos de nódulos de distintas leguminosas. En el caso de *Micromonospora*, es necesario continuar con estudios tendientes a conocer el ciclo de vida que realiza la bacteria dentro del nódulo, la generación de metabolitos útiles a la planta, la fijación de nitrógeno o la morfología en la que se encuentra en el nódulo, si es en forma de esporas o de micelio.

5. CONCLUSIONES CAPÍTULO III

- ✓ En este trabajo de investigación se ha puesto a punto la técnica de hibridación *in situ* fluorescente FISH, para identificar de manera precisa microorganismos que se encuentran en el interior de nódulos fijadores de nitrógeno.
- ✓ Se demostró la presencia de bacterias del género *Paenibacillus* dentro de los nódulos de la planta *Lupinus albus* mediante los ensayos realizados con la técnica de hibridación *in situ* fluorescente. Las sondas Lupsa Cy3 y LupsaCy5 hibridaron exitosamente con el ARNr de las bacterias que se encontraban en el tejido cortical de los nódulos.
- ✓ De igual manera, se confirmó la presencia de bacterias del género *Micromonospora* en el interior de los nódulos de *Lupinus angustifolius* mediante ensayos de FISH con las sondas MicromFITC y MicromCy5. En ambos casos, las sondas hibridaron de manera específica con los microorganismos que se hallaban presentes dentro de las células vegetales y no se unieron a otros sitios como el tejido intercelular.

CONCLUSIONES GENERALES

- ✓ A partir de nódulos de la leguminosa *Lupinus angustifolius* recolectados de la región de Extremadura, se aislaron 61 cepas con características morfológicas del género *Micromonospora*. La variabilidad fisiológica se pudo apreciar por la utilización de diversos sustratos, el color de las colonias y el pigmento producido por algunas cepas en los medios de cultivo.
- ✓ Se han empleado de manera integrada las técnicas de BOX-PCR, TP-RAPD y microsatélites, para la caracterización molecular de las cepas aisladas de *Micromonospora*. La aplicación de dichas técnicas permitió agrupar las cepas en función de la similitud de los perfiles moleculares, además se encontró que prácticamente ninguna de las cepas presenta una huella idéntica a la otra, lo cual demuestra la elevada diversidad genética de las cepas encontradas en los nódulos de *Lupinus*.
- ✓ La secuenciación del gen ARNr 16S de las 22 cepas seleccionadas presentan porcentajes de similitud entre el 98.1% y 99.4% con respecto a las cepas tipo *Micromonospora fulvividis* DSM 43906^T, *Micromonospora chalybophumensis* JCM 12873^T, *Micromonospora olivasterospora* DSM 43868^T y *Micromonospora echinospora* DSM 43816^T. Los resultados indican que algunas cepas aisladas pueden representar especies diferentes lo cual requiere de otros estudios complementarios.
- ✓ Es la primera vez que se describe la formación de nódulos en *Lupinus albus* empleando como inoculante bacterias Gram positivas del género *Paenibacillus*. Originalmente las bacterias se aislaron de plantas silvestres de *Lupinus angustifolius* y se seleccionó a la cepa *Paenibacillus* Lupsa 11 como modelo, por ser la cepa con mayor capacidad de nodulación.
- ✓ El reisolamiento de *Paenibacillus* en medio con antibióticos a partir de nódulos de plantas cultivadas en ambiente axénico, demostró la presencia del microorganismo en el interior de los nódulos. Además, éste resultado fue confirmado mediante la secuenciación del gen ARNr 16S de la cepa reisolada.

- ✓ Con relación al análisis filogenético basado en el gen ARNr 16S se encontró que *Paenibacillus* Lupsa 11 presenta porcentajes de similitud superiores al 99.5% con las cepas tipo *Paenibacillus favisporus* DSM 17253^T, *Paenibacillus cineris* LMG 18439^T y *Paenibacillus rhizosphaerae* LMG 21995^T, lo cual indica que posiblemente *Paenibacillus* Lupsa 11 pertenezca a una de éstas tres especies.
- ✓ El análisis del gen *nifH* de *Paenibacillus* Lupsa 11 tiene un porcentaje de similitud del 99% con el gen *nifH* de *Frankia alni* ACN14a. Estos datos sugieren una posible transferencia horizontal de este gen entre ambos microorganismos.
- ✓ Se ha puesto a punto la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia FISH, para detectar la presencia de bacterias dentro de nódulos de *Lupinus*. La selectividad de las sondas se demostró por la hibridación específica que presentaron dichas sondas en las bacterias para las cuales fueron diseñadas y por los ensayos de hibridación cruzada.
- ✓ Mediante la técnica de FISH se pudo determinar que *Micromonospora* al igual que *Bradyrhizobium* se encuentran en nódulos silvestres de *Lupinus angustifolius*.
- ✓ *Paenibacillus* forma nódulos similares a los producidos por *Bradyrhizobium*. Por medio de la técnica de FISH sólo se detectó la presencia de *Paenibacillus* y se excluyó la presencia de *Bradyrhizobium*.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

Achouak, W., Normand, P. & Heulin, T. (1999). Comparative phylogeny of *rrs* and *nifH* genes in the *Bacillaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:961-967.

Albrecht-Buehler, G. (1996). Autofluorescence of live purple bacteria in the near infrared. *Exp. Cell. Res.* 236:43-50.

Amann, R.I. & Ludwig, W. (2000). Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS. Microbiol. Rev.* 24:555-565.

Amann, R.I., Fuchs, B.M. & Behrens, S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 231-236.

Amann, R.I., Krumholz, L. & Stahl, D.A. (1990b). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172:762-770.

Anjali, T., Tripathi, A.K., Verma, S.C., Agrawal, N. & Gopal, N. (2001). Application of PCR fingerprinting techniques for identification and discrimination of *Salmonella* isolates. *Current Science.* 8:1049-1052.

Ara, I. & Kudo, T. (2007). Two new species of the genus *Micromonospora*: *Micromonospora chokoriensis* sp. nov. and *Micromonospora coxensis* sp. nov., isolated from sandy soil. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53:29-37.

Araújo, W.L., Maccheroni, W. Jr., Aguilar-Vildosa, C.I., Barroso, P.A.V., Saridakis, H.O. & Azevedo, J.L. (2001). Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissue of citrus rootstocks. *Can. J. Microbiol.* 47:229-236.

Ariesyady, H.D., Ito, T. & Okabe, S. (2007). Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester. *Water Res.* 41:1554-68.

Armstrong, E.A., Heenan, D.P., Patej, S. & Unkovich, M.J. (1997). Potential and realized nitrogen benefits of lupins, field pea and chickpea to wheat in south-eastern Australia. *Aust. J. Agric. Res.* 48:39-47.

Asano, K., Masunaga, I. & Kawamoto, I. (1989). *Catellatospora matsumotoense* sp. nov. and *Catellatospora tsunoense* sp. nov., *Actinomyces* found in woodland soils. *J. Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:309-313.

Ash, C., Priest, F. G. & Collins, M. D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 64:253-260.

Azevedo, K. L., Maccheroni, J. R. & Pereira, J.O. (2000). Endophytic microorganisms, a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic J. Biotech.* 3:41-67.

Bai, Y., D'Aoust, F., Smith, D.L. & Driscoll, B.T. (2002). Isolation of plant growth promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. *Can. J. Microbiol.* 48: 230-238.

- Bai, Y., Zhou, X. & Smith, D.L.** (2003). Crop ecology, management and quality. Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop. Sci.* 43:1774– 1781.
- Balachandar, D., Raja, P. Kumar, K. & Sundaram, S.P.** (2007). Non-rhizobial nodulation in legumes. *Biotech. Mol. Biol. Reviews.* 2:49-5.
- Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcón, R. & Azcón-Aguilar, C.** (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56:1761–1778.
- Barry, T., Glennon, C. M., Dunican, L. K. & Gannon, F.** (1991). The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl* 1, 149.
- Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G. & Gresshoff, P.M.** (1992). DNA amplification fingerprinting of bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:70-76.
- Beneduzi, A., Peres, D., Da Costa, P.B., Bodanese, M.H. & Passaglia, L.M.** (2008). Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil. *Res. Microbiol.* Apr 8. (in press).
- Benhamou, N., Kloepper, J.W., Quadt-Hallman, A. & Tuzun, S.** (1996). Induction of Defense-Related Ultrastructural Modifications in Pea Root Tissues Inoculated with Endophytic Bacteria. *Plant Physiol.* 112:915-919.
- Berge, O., Guinebretière, M.H., Achouak, W., Normand, P. & Heulin, T.** (2002). *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:607-16.
- Bjarne, K., Thomas, K., Mikael, F., Henrik, S., Michael, H., Alex, A., Hans, E., Mikkil, D., Jakob, B., Peter, J. S., Sørensen. M., Torben, L. & Roald, F.** (2007). CLC Free Workbench *Bioinformatics program for basic DNA and protein sequence analysis.* Version 3.0.3 www.clcbio.com.
- Bolland, M.D.A.** (1992). The current and residual value of superphosphate with oats and wheat on a deep loamy sand. *Fert. Res.* 31:319-329.
- Bórquez, A. & Alarcón, P.** (2002). *Reemplazo parcial de harina de pescado por harina de lupino en dietas para salmón del atlántico.* Escuela de Acuicultura, Universidad Católica de Temuco. *Salmonicultura.* 4, N°28.
- Bothe, H., Körsgen, H., Lehmacher, T. & Hundeshagen, E.** (1992). *Differential effects of Azospirillum, auxin and combined nitrogen on growth of the roots of wheat.* *Symbiosis.* 13:167-179.
- Boye, M., Jensen, T.K., Moller, K., Leser, T.D. & Jorsal, S.E.,** (1998). Specific detection of the genus *Serpulina*, *S. hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* in porcine intestines by fluorescent rRNA *in situ* hybridization. *Mol. Cell. Probes* 12:323–330.
- Bray, R.H. & Kurtz, I.T.** (1945). Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* 59:39-45.
- Bremner, J.M. & Mulvaney, C.S.** (1982). Nitrogen total, pp. 621-622 in A.L. Page, R.H. Miller (editor). *Methods of soil analysis Part 2, chemical and microbiological properties.* Second edition. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.

- Brenner, S. E.** (1995). BLAST, Blitz, BLOCKS and BEAUTY: sequence comparison on the net. *Trends. Genet.* 11:330-331.
- Brinkmeyer, R., Knittel, K., Jurgens, J., Weyland, H., Amann, R. & Helmke, E.** (2003) Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6610-9.
- Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.S. & Noller, H.F.** (1978). Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceeding of National Academic Societ, USA.* 75:4801-4805
- Brown, V.I. & Lowbury, E.J.L.** (1996). Use of an improved cetrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Pathol.* 18:752-756.
- Broughton, W.J., Jabboury, S. & Perret, X.** (2000). Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.* 182:5641-5652.
- Bruijn, F. J., Rademaker, J., Schenider, M., Rossbach, U. & Louws, F.J.** (1996). Rep-PCR Genomic Fingerprinting of Plant-Associated Bacteria and Computer-Assisted Phylogenetic Analyses. *Biology of Plant-Microbe Interaction.* APS Press. 497-502.
- Bull, A.T., Stach, J.E., Ward, A.C. & Goodfellow, M.** (2005). *Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions.* *Antonie Van Leeuwenhoek.* 87:65-79.
- Bull, A.T., Ward, A.C. & Goodfellow, M.** (2000). Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:573-606.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B. J. & Gresshoff, P. M.** (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology.* 9:553-557.
- Carr, E.L., Eales, K., Soddell, J. & Seviour, R.J.** (2005). Improved permeabilization protocols for fluorescence *in situ* hybridization (FISH) of mycolic-acid-containing bacteria found in foams. *J. Microbiol. Methods.* 61:47-54.
- Cedergren, R., Gray, M. W., Abel, Y. & Sankoff, D.** (1988). The evolutionary relationships among known life forms. *J. Mol. Evol.* 28:98-112.
- Carro, L.** (2007). Análisis de poblaciones de *Micromonospora* aisladas de nódulos de la rizosfera de *Pisum sativum*. Trabajo de grado. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.
- Chaintreuil, C., Giraud, E., Prin, Y., Lorquin, J., Bâ A., Gillis, M., De Lajudie, P. & Dreyfus, B.** (2000) Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5437-47.
- Chen, C.** (1995). Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytec bacteria. *Biological control.* 5:83-91.
- Chen, W.M., Laevens, S., Lee, T.M., Coenye, T., Vos, P.D., Mergeay, M. & Vandamme, P.** (2001). *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1729 - 1735.

- Chen, W.X., Moulin, L., Bontemps, C., Vandamme, P., Béna, G. & Boivin-Masson, C.** (2003). Legume symbiotic nitrogen fixation by β -proteobacteria is widespread in nature. *J. Bacteriol.* 185:7266-7272.
- Cho, K.M., Hong, S.Y., Lee, S.M., Kim, Y.H., Kahng, G.G., Lim, Y.P., Kim, H. & Yun, H.D.** (2007). Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. *Microb. Ecol.* 54:341-51.
- Choi, J.H., Im, W.T., Yoo, J.S., Lee, S.M., Moon, D.S., Kim, H.J., Rhee, S.K. & Roh, D.H.** (2008). *Paenibacillus donghaensis* sp. nov., a Xylan-degrading and Nitrogen-fixing Bacterium Isolated from East Sea Sediment. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18:189-93.
- Choo, Q.C., Samian, M.R., & Najimudin N.** (2003). Phylogeny and characterization of three *nifH*-homologous genes from *Paenibacillus azotofixans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3658-62.
- Christiansen, J.L., Jornsrgard, B., Buskov, S. & Olsen, C.E.** (1997). Effect of drought stress on content and composition of seed alkaloids in narrow-leaved lupin, *Lupinus angustifolius* L. *Eur. J. Agron.* 7:307-314.
- Christopher, W., Kaplan, R. & Christopher, L.** (2004). Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1777-1786.
- Chun, J.** (1995). Computer assisted classification and identification of actinomycetes. Ph. D. Thesis. University of Newcastle.
- Chung, Y.R., Kim, C.H., Hwang, I. & Chun, J.** (2000). *Paenibacillus koreensis* sp. nov., a new species that produces an iturin-like antifungal compound. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:495-500.
- Claus, D. & Berkeley, R. C. W.** (1986). Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.2, pp. 1105-1140. Edited by Sneath, P. H. A, Mair, N.S., Sharpe, M. E. & Holt, J. G.. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Coelho, M.R., de Vos M., Carneiro, N.P., Marriel, I.E., Paiva, E., & Seldin, L.** (2008). Diversity of *nifH* gene pools in the rhizosphere of two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor*) treated with contrasting levels of nitrogen fertilizer. *FEMS Microbiol. Lett.* 279:15-22.
- Colwell, R. R.** (1970). Polyphasic taxonomy of the genus *vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J Bacteriol.* 104:410-433.
- Collins, C.H. & Lyne, P. M.** (1989). Métodos microbiológicos. Editorial Acribia. Zaragoza.
- Conor, McCarthy.** (1998). Chromas. Version 1.45. School of health Science. Griffith University Gold Coast Campus. Southport, Queensland Australia.
- Conn, V.M. & Franco, C.M.** (2004). Analysis of the Endophytic *Actinobacterial* Population in the Roots of Wheat (*Triticum aestivum* L.) by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequencing of 16S rRNA Clones. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1787-1794.

- Conn, V.M., Walker, A.R. & Franco, C.M.** (2008). Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 21: 208-18.
- Coombs, J.T & Franco, C.M.** (2003a). Visualization of an endophytic *Streptomyces* species in wheat seed. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4260-2.
- Coombs, J. T. & Franco, C.M.** (2003b). Isolation and Identification of actinobacteria from surface sterilized wheat roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5603-5608.
- Cowan, S.T. & Steel, L.J.** (1993). Manual for the Identification of Medical Bacteria, 3rd edn. Edited and revised by G.I. Barrow & R.K.A. Feltham. Cambridge University Press.
- Cruz-Sanchez, J.M., Velázquez, E., Mateos, P.F. & Martínez-Molina, E.** (1997). Enhancement of resolution of low molecular weight RNA profiles by staircase electrophoresis. *Electrophoresis* 18:1909-1911.
- Cullander, C.** (1999) Fluorescent probes for confocal microscopy. *Methods. Mol. Biol.* 122:59-73. Review.
- Daane, L.L., Harjono, I., Barns, S.M., Launen, L.A., Palleroni, N.J. & Haggblom, M.M.** (2002). PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. And description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:131-139.
- Daims, H., Bruhl, A., Amann, R. & Schleifer, K.H.** (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22:434-444.
- Da Silva, K.R., Salles, J.F, Seldin, L. & Van Elsas, J.D.** (2003). Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. *J. Microbiol. Methods.* 54: 213-31.
- Debellé, F., Moulin, L., Mangin, B., Denarie, J. & Boivin, C.** (2001) *nod* genes and *nod* signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Acta Biochim. Pol.* 48:359-65.
- De Ley, J., Cattoir, H. & Reynaerts, A.** (1970). The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* 12:133-142.
- DeLong, E.F., Wickham, G.S. & Pace, N.R.** (1989). Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. *Science* 243:1360-1363.
- Delorme, T.A., Gagliardi, V., Angle, S.J., van Berkum, P. & Chaney, R.L.** (2003). Phenotypic and diversity of rhizobia isolated from nodules of clover grown in a zinc and cadmium contaminated soil. *Soil Sci. Soc. American J.* 67:1746-1754.
- Detmers, J., Strauss, H., Schulte, U., Bergmann, A., Knittel, K. & Kuever, J.** (2004) FISH shows that *Desulfotomaculum* spp. are the dominating sulfate-reducing bacteria in a pristine aquifer. *Microb. Ecol.* 47:236-42.

De Witt, H.A. (1994). Elaboración de Extruidos a base de mezclas de Lupino-cereales. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales., Escuela de Agronomía. Tesis de Grado. 70pp.

Dharmatilake, A.J. & Bauer, W.D. (1992). Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards nodulation gene-inducing compounds from alfalfa roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1153-1158.

Ding, Y., Wang, J., Liu, Y., & Chen, S. (2005). Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *J. appl. Microbiol.* 99:1271-1281.

Diouf, A., De Lajudie, P., Neyra, M., Kersters, K., Gillis, M., Martínez-Romero, E. & Gueye, M. (2000). Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 50:159-170

Eckhardt, T. (1978). A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid.* 1: 584-588.

Eisen, J.A., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Heidelberg, J.F., Wu, M., Dodson, R.J., Deboy, R., Gwinn, M.L., Nelson, D.H., Haft, E.K., Hickey, J.D., Peterson, A.S., Durkin, J.L., Kolonay, F., Yang, I., Holt, L.A., Umayam, T., Mason, M., Brenner, T.P., Shea, D., Parksey, W.C., Nierman, T.V., Feldblyum, C.L., Hansen, M.B., Craven, D., Radune, J., Vamathevan, H., Khouri, O., White, T.M., Gruber, K.A., Ketchum, J.C., Venter, H., Tettelin Bryant, D.A. & Fraser, C.M. (2002). The complete genome sequence of *Chlorobium tepidum* TLS, a photosynthetic, anaerobic, green-sulfur bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:9509-9514.

Epplen, C., Santos, E.J., Mäueler, W., Van Helden, P. & Epplen, J.T. (1997). On simple repetitive DNA sequences and complex diseases. *Electrophoresis.* 18:1577-85.

Ercolini, D., Hill, P.J. & Dodd, C.E. (2003). Development of a fluorescence *in situ* hybridization method for cheese using a 16S rRNA probe. *J. Microbiol. Methods.* 52:267-71.

Euzéby, J. (2007). List of prokaryotic names with standing in nomenclature; <http://www.bacterio.cict.fr>

FEDNA (2003). Composición y valor nutritivo de alimentos para la formulación de piensos compuestos (2ª ed.). C. de Blas, G.G. Mateos y P.Gª. Rebollar (eds.). Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España. 423 pp.

Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P. & Spratt, B. G. (2004). eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data *FEMS Microbiol. Rev.* 186:1518-1530.

Fernández, C. (2005). Análisis de la diversidad de *Actinomicetos* asociados a raíces de *Lupinus angustifolius*. Trabajo de grado. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.

Foy, C.D. (1992). Soil chemical factors limiting plant root growth. *Adv. Soil Sci.* 19: 97-131.

- Foy, C.D.** (1993). Role of the soil scientist in genetic improvement of plants for problem soils. En: J.W. Maranville, C. Baligar, R.R. Duncan y J.M. Yohe (eds), INTSORMIL Publication Nº 94-2. University of Nebraska, Lincoln, NE.
- Foy, C.D.** (1997). Tolerances of lupin species and genotypes to acid soil and coal mine spoil. *J. Plant Nut.* 20: 1095-1118.
- Franke, I.H, Fegan, M., Hayward, C., Leonard, G. & Sly, L.I.** (2000) Molecular detection of *Gluconacetobacter sacchari* associated with the pink sugarcane mealybug *Saccharicoccus sacchari* (Cockerell) and the sugarcane leaf sheath microenvironment by FISH and PCR. *FEMS microbiology* 31:61-71
- Frischer, M.E., Floriani, P.J. & Nierzwicki-Bauer, S.A.** (1996). Differential sensitivity of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes used for fluorescence *in situ* hybridization is a result of higher order structure. *Can. J. Microbiol.* 42:1061-1071.
- Frommel, M.I., Nowak, J. & Lazarovits, G.** (1991). Growth Enhancement and development modification of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by an nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol.* 96:928-936.
- Gdala, J. & Buraczewska, L.** (1996). Chemical composition and carbohydrate content of seeds from several lupin species. *J. Anim. Feed Sci.* 5:403-416.
- Gentili, F. & Huss-Danell, K.** (2003). Local and systemic effects of phosphorus and nitrogen on nodulation and nodule function in *Alnus incana*. *J. Exp. Bot.* 54: 2757-2767.
- Gerke, J., Roemer, W. & Jungk, A.** (1994). The excretion of citric and malic acid by proteid roots of *Lupinus albus* L.: Effects on soil solution concentrations of phosphate, iron and aluminum in the proteid rhizosphere in samples of a oxisol and aluvisoll. *Zeit. Pflanzenernar. Bodenk.* 157:289-294.
- Gibson, A.H.** (1987). Evaluation of nitrogen fixation by legumes in the greenhouse and growth chamber. In *Symbiotic Nitrogen Fixation Technology* pp. 321-363. New York: Marcel Dekker.
- Giovannoni, S.J., DeLong, E.F., Olsen, G.J. & Pace, N.R.** (1988). Phylogenetic group-specific oligo deoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* 170:720-726.
- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J.C., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuillet, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., Segurens, B., Dossat, C., Franck, W.L., Chang, W.S., Saunders, E., Bruce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, D., Stacey, G., Emerich, D., Verméglio, A., Medigue, C. & Sadowsky, M.** (2007). Legumes symbioses: Absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science.* 316:1307-1312.
- Giraud, E., Hannibal, L., Fardoux, J., Verméglio, A. & Dreyfus, B.** (2000). Effect of *Bradyrhizobium* photosynthesis on stem nodulation of *Aeschynomene sensitiva*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 26:14795-800.
- Gladstones, J. S.** (1998) Distribution, origin, taxonomy, history and importance. In: *Lupins as crop plants: biology, production and utilization*. Editors: Gladstones, J. S., Atkins, C. A. & Hamblin, J. 1-37. pp. CAB Internacional.

- Glencross, B., Curnow, J. & Hawkins, W.** (2003). Evaluation of the variability in chemical composition and digestibility of different lupin (*L. angustifolius*) kernel meals when fed to rainbow trout (*O. mykiss*). *Aquaculture Nutrition*. 9:305-315.
- Glick, B.R.** (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.
- Goodfellow, M. & O'Donell, A. G.** (1993). Roots of bacterial systematics. In *Handbook of new bacterial systematics*, pp. 3-54. Edited by M. Goodfellow, O'Donell, A.G. London, U.K.: Academic Press Ltd.
- Goodfellow, M., Mordarski, M., & Williams, S.T.** (1984). The Biology of the Actinomycetes. *Academic Press*. 14-17. pp.
- Grau, F. H. & Wilson, P. W.** (1962). Physiology of nitrogen-fixation by *Bacillus polymyxa*. *J. Bacteriol.* 83:490-496.
- Grayston, S.J., Vaughan, D. & Jones, D.** (1996). Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl. Soil Ecol.* 5:29-56.
- Grimont, P. A. D.** (1981). Use of DNA reassociation in bacterial classification. *Can. J. Microbiol.* 34:541-546.
- Gtari, M., Daffonchio, D. & Boudabous, A.** (2007). Assessment of the genetic diversity of *Frankia* microsymbionts of *Eleagnus angustifolia* L. plants growing in a Tunisian date-palm oasis by analysis of PCR amplified *nifD-K* intergenic spacer. *Can. J. Microbiol.* 53:440-445.
- Gu, Q., Liu, N., Qiu, D.H., Liu, Z.H. & Huang, Y.** (2006). Isolation, classification and antimicrobial activity of endophytic actinomycetes from plant leaves. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 5:778-82.
- Guasp, C., Moore, E. R., Lalucat, J. & Bennisar, A.** (2000). Utility of internally transcribed 16S-23S rDNA spacer regions for the definition of *Pseudomonas stutzeri* genomovars and other *Pseudomonas* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 4:1629-1639.
- Gürtler, V. & Stainisich, V.A.** (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology.* 142:3-16.
- Haas, D. & Défago, G.** (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads *Nat. Rev. Microbiol.* 3:307-319.
- Haas, D., Keel, C., Laville, J., Maurhofer, M., Oberhansli, T., Schnider, U., Voisard, C., Wuthrich, B. & Defago, G.** (1992). Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* strain ChaO involved in the suppression of root diseases. In: Hennecke, H., Verma D. P. S. (eds.) *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 450-456 pp.
- Hanage, W. P., Kaijalainen, T., Herva, E., Syrjänen, R. & Spratt, B. G.** (2005). Using Multilocus Sequence Data To Define the *Pneumococcus*. *J. Bacteriol.* 187: 6223-6230.
- Hardy, R.W., Holsten, R. D., Jackson, E. K. & Burns, R. C.** (1968). The acetylene ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43:1185-1207.

- Hatano, K., Nishii, T. & Kasai, H.** (2003). Taxonomic re-evaluation of whorl-forming *Streptomyces* (formerly *Streptoverticillium*) species by using phenotypes, DNA-DNA hybridization and sequences of *gyrB*, and proposal of *Streptomyces luteireticuli* (Kato and Arai 1957) corrig, sp. nov., nom. Rev. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1519-1529.
- Hiltner, L.** (1904). Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundungung und Brache. *Arb. Dsch. Landwirt. Ges.* 98:59-78.
- Hirsch, P., Mevs, U., Kroppenstedt, R.M., Schumann, P. & Stackebrandt, E.** (2004). *Cryptoendolithic Actinomycetes* from Antarctic Sandstone Rock Samples: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two Isolates Related to *Micromonospora coerulea* Jensen 1932. *Syst. Appl. Microbiol.* 27:166-174.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Stanley, J. T. & Williams, S.T.** (1994). *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 9th Edition. The Williams & Wilkins Co. Baltimore, Maryland. USA. 532p.
- Holl, F.B. & Chanway, C.P.,** (1992). Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Can. J. Microbiol.* 38:303-308.
- Horan, A. C. & Brodsky, B. C.** (1986). *Micromonospora Rosaria* sp. nov. nom. rev., the rosaramicin producer. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36:478-80.
- Horan, A.C. & Gullo, V. P.** (editor) (1994). *Aerobic actinomycetes a continuing source of novel natural products. The discovery of Natural products with therapeutic potential.* Butterworth-heinemann, USA.
- Huang, H., Ly, J., Hu, Y., Fang, Z., Zhang, K. & Bao, S.** (2008): *Micromonospora rifamycinica* sp. nov., a novel actinomycete from mangrove sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:17-20.
- Huang, Y., Li, W., Wang, L., Lanoot, B., Vancanneyt, M., Rodriguez, C., Liu, Z., Swings, J. & Goodfellow, M.** (2004). *Streptomyces glauciniger* sp. nov., a novel mesophilic streptomycete isolated from soil in south China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:2085-9.
- Huss-Danell, K.** (1997). Actinorhizal symbioses and their N₂ Fixation. Tansley Review No. 93. *New Phytologist.* 136:375-405.
- Huss, V. A. R., Festl, H. & Schleifer, K. H.** (1983). Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridisation from renaturation rates, *Syst. Appl. Microbiol.* 4:184-192.
- Igual, J. M., Valverde, A., Rivas, R., Mateos, P. F., Rodríguez-Barrueco, C., Martínez-Molina, E., Cervantes, E. & Velázquez, E.** (2003). Genomic fingerprinting of *Frankia* by PCR-based techniques. Assessment of a primer based on the sequence of 16S rRNA gene of *Escherichia coli*. *Plant and Soil.* 9:115-123.
- Ingham, C.J. & Furneaux, P.A.** (2000). Mutations in the beta subunit of the *Bacillus subtilis* RNA polymerase that confer both rifampicin resistance and hypersensitivity to NusG. *Microbiology.* 146:3041-3049.
- Ingham, C.J., & Jacob, E.B.** (2008). Swarming and complex pattern formation in *Paenibacillus vortex* studied by imaging and tracking cells *BMC. Microbiology.* 8:1-16.

- Ishizawa, S., Araragi, M. & Suzuki, T.** (1969). Actinomycete flora of Japanese soils III. Actinomycete flora of paddy soils. *Soil Sci. Plant Nutr.* 15:104-112.
- Izumi, H., Anderson, I.C., Killham K. & Moore, E.R.** (2008). Diversity of predominant endophytic bacteria in European deciduous and coniferous trees. *Can. J. Microbiol.* 54:173-179.
- Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., Donate-Correa, J., Rivas, R., Velázquez, E., Hernández, M., Temprano, F., Martínez-Molina, E., Ruiz-Argüeso, T. & León-Barrios, M.** (2003). Genetic diversity of bradyrhizobial populations from diverse geographic origins that nodulate *Lupinus* spp. and *Ornithopus* spp. *Syst. Appl. Microbiol.* 4:611-623.
- Jarne, P., & Lagoda, P.J.L.** (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends. Ecol. Evol.* 11:424-429.
- Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D.G. & Gibson, T. J.** (1998). Multiple sequence alignment with ClustalX. *Trends. Biochem. Sci.* 23:403-405.
- Jensen, H.L.** (1932). Contributions to our knowledge of the actinomyetes. III. Further observations on the genus *Micromonospora*. *Proc. Linnean Soc. N.S.W.* 57:173-180.
- Jensen, M. A., Webster, J. A. & Straus, N.** (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:945-952.
- Jiang, S., Sun, W., Chen, M., Dai, S., Zhang, L., Liu, Y., Lee, K.J. & Li, X.** (2007). Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 4:405-16.
- Johnson, J.F., Allan, D.L. & Vance, C.R.** (1994). Phosphorus stress-induced proteid roots show altered metabolism in *Lupinus albus* L. *Plant Physiol.* 104:657-665.
- Jongrungruangchok, S., Tanasupawat, S. & Kudo, T.** (2008). *Micromonospora chaiyaphumensis* sp. nov., isolated from Thai soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:924-928.
- Jongrungruangchok, S., Tanasupawat, S. & Kudo, T.** (2008). *Micromonospora krabiensis* sp. nov., isolated from marine soil in Thailand. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 54:127-33.
- Karma, A.** (1993). Chemical properties of organic soils. In: Soil sampling and methods of analysis. Martin R. Carter Editor. Canadian Society of Soil Science. Lewis Publishers. 459-471 pp.
- Kasai, H., Tamura, T. & Harayama, S.** (2000). Intra-genetic relationships among *Micromonospora* species deduced from *gyrB*-based phylogeny and DNA relatedness. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:127-134.
- Kawamoto, I.** (1989). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 4. Section 28: actinoplanetes. Genus *Micromonospora*, 2442-2450.
- Kawamoto, I., Oka, T. & Nara, T.** (1983). Carbon and nitrogen utilization by *Micromonospora* strains. *Agr. Biol. Chem.* 47:203-215.

- Kawamoto, I., Okachi, R., Kato, H., Yamamoto, S., Takahashi, I., Takasawa, S. & Nara, T.** (1974). The antibiotic XK-41 complex. I. Production, isolation and characterization. *J. Antibiot.* 27:493-501.
- Kawamoto, I., Oka, T. & Nara, T.** (1982). Spore resistance of *Micromonospora olivasterospora*, *Micromonospora sagamiensis*, and related organisms. *Agric. Biol. Chem.* 46:221-231.
- Kawamoto, I., Yamamoto, M. & Nara, T.** (1983). *Micromonospora olivasterospora* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33:107-112.
- Kim, M.K., Kim, Y.A., Park, M.J. & Yang, D.C.** (2008). *Paenibacillus ginsengihumi* sp. nov., a bacterium isolated from soil in a ginseng field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:1164-1168.
- Kloepper, J.W.** (1993). Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: Metting, F.B., Jr. (Ed.), *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker Inc., NY, USA. 255-274 pp.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R. & Zablutowicz, R.M.** (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7:39-43.
- Kobayashi, D.Y. & Palumbo, J.D.** (2000). Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: James, C.W., White, J.F., Jr. (Eds.), *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Kokare, C.R., Mahadik, K.R., Kadam, S.S. & Chopade, B.A.** (2004). Isolation of bioactive marine actinomycetes from sediments isolated from Goa and Maharashtra coastlines (west coast of India). *Indian J. Mar. Sc.* 248-256.
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell V.R., Janda, W. M. & Sommers, H. M.** (1997). Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Editorial médica panamericana. 881p.
- Krimmer, V., Merkert, H., von Eiff, C., Frosch, M., Eulert, J., Lohr, J.F., Hacker, J. & Ziehebur, W.** (1999). Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in clinical samples by 16S rRNA-directed *in situ* hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 37:2667-2673.
- Kriss, A.E.** (1939). *Micromonospora* actinomycete-like organism (*Micromonospora globosa*). *Mikrobiologiya* 8:178-175.
- Kroppenstedt, R.M., Mayilraj, S., Wink, J.M., Kallow, W., Schumann, P., Secondini, C. & Stackebrandt, E.** (2005). Eight new species of the genus *Micromonospora*, *Micromonospora citrea* sp. nov., *Micromonospora echinaurantiaca* sp. nov., *Micromonospora echinofusca* sp. nov., *Micromonospora fulviviridis* sp. nov., *Micromonospora inyonensis* sp. nov., *Micromonospora peucetia* sp. nov., *Micromonospora sagamiensis* sp. nov., and *Micromonospora viridifaciens* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 28:328-39.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. & Nei, M.** (2001). MEGA 2, molecular evolutionary genetics análisis software. *Bioinformatics.* 17:1244-1245.
- Kurlovich, B.S., Stankevich, A.K. & Stepanova, S.I.** (2002). The review of de genus *Lupinus*. In: Kurlovich, B.S (ed). *Geography, classification, genetic resources*

and breeding. Department of leguminous crop of N.I. Vavilov Institute of Plant Industry, Publishing house "Intan", St. Petersburg. 468p.

Laguerre, G., Allard, M. R., Revoy, F. & Amarger, N. (1994). Rapid Identification of Rhizobia by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:56-63.

Laguerre G, Nour, S.M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P. & Amarger, N. (2001). Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology.* 147:981-93

Landegent, J.E., Jansen, W.N., Baan, R.A., Hoeijmakers, J.H.J. & van der Ploeg, M. (1984). 2-Acetylaminofluorene-modified probes for the indirect hybridocytochemical detection of specific nucleic acid sequences. *Exp. Cell. Res.* 153:61-72.

Lanoot, B., Vancanneyt, M., Dawyndt, P., Cnockaert, M., Zhang, J., Huang, Y., Liu, Z. & Jean, S. (2004). BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*. Emended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 27:84-92.

Lathe, R. (1985). Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical considerations. *J. Mol. Biol.* 183:11-12.

Laurent, F., Carlotti, A., Boiron, P., Villard, J. & Freney, J. (1996). Ribotyping: a tool for Taxonomy and identification of the *Nocardia asteroides* complex species. *J. Clin. Microbiol.* 34:1.079-1.082.

Lavin, M., Herendeen, P.S. & Wojciechowski, M.F. (2005). Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary. *Syst. Biol.* 54:575-94.

Lebuhn, M., Bathe, S., Achouak, W., Hartmann, A., Heulin, T. & Schloter, M. (2006). Comparative sequence analysis of the internal transcribed spacer of *Ochrobactrum* species. *Syst. Appl. Microbiol.* 29:265-275.

Lebuhn, M., Heulin, T., & Hartmann, A. (1997). Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22:325-334.

Lechevalier, H.A. (1964). Principles and application in aquatic microbiology. In Heukelekan and Dondero (Editors). The Actinomycetes, John Wiley & Sons, New York, 230-250.

Lee, N., Nielsen, P.H., Andreasen, K.H., Juretschko, S., Nielsen, J.L., Schleifer, K.H. & Wagner, M. (1999). Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1289-1297.

Lee, S.D., Goodfellow, M. & Hah, Y.C. (1999). A phylogenetic analysis of the genus *Catellatospora* based on 16S ribosomal DNA sequences, including transfer of *Catellatospora matsumotoense* to the genus *Micromonospora* as *Micromonospora matsumotoense* comb. sp. Nov. *FEMS Microbiol. Lett.* 178:349-354.

- Lee, S.D., Lee, D.W. & Kim, J.S. (2008). *Nocardioides hwasunensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:278-281.
- Lefmann, M., Schweickert, B., Buchholz, P., Göbel, U.B., Ulrichs, T., Seiler, P., Theegarten, D. & Moter, A. (2006). Evaluation of peptide nucleic acid-fluorescence *in situ* hybridization for identification of clinically relevant mycobacteria in clinical specimens and tissue sections. *J. Clin. Microbiol.* 44:3760-3767.
- Leigh, J.A. & Coplin, D.L. (1992). Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:307-346.
- Leiva, S., Yañez, M. & Zaror, L. (2004). Actividad antimicrobiana de actinomicetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Rev. Med. Chile* 132:151-159.
- Leong, J. (1986). Siderophores their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24:187-209.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C. & Denarié, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344:781-784.
- Leveau, J.H., Gerards, S., De Boer, W. & Van Veen, J.A. (2004) Phylogeny-function analysis of (meta) genomic libraries: screening for expression of ribosomal RNA genes by large-insert library fluorescent *in situ* hybridization (LIL-FISH). *Environ. Microbiol.* 6:990-8.
- Lin, J.J. & Kuo, J. (1995). AFLPTM: A novel PCR-based assay for plant and bacteria DNA fingerprinting. *Focus* 17:52-56.
- Lloret, L., & Martínez-Romero, E. (2005). Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Rev. Latin. Microb.* 47:43-60.
- Lloyd, A. T. & Sharp, P. M. (1993). Evolution of the *recA* gene and the molecular phylogeny of bacteria. *J. Mol. Evol.* 37:399-407.
- Logan, N.A., De Clerck, E., Lebbe, L., Verhelst, A., Goris, J., Forsyth, G., Rodríguez-Díaz, M., Heyndrickx, M. & De Vos, P. (2004). *Paenibacillus cineris* sp. nov. and *Paenibacillus cookii* sp. nov., from Antarctic volcanic soils and a gelatin-processing plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1071-6.
- López, B.L., López, G., Fuentes, F.J., Castillo, M. & Fernández, E.J. (1997). Influence of tillage, crop rotation and nitrogen fertilization on soil organic matter and nitrogen under rainfed Mediterranean conditions. *Soil & Tillage Research* 43:277-293.
- Loy, J.K., Dewhirst, F.E., Weber, W., Frelief, P.F., Garbar, T.R., Tasca, S.I., Templeton, J.W. (1996). Molecular phylogeny and *in situ* detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3439-3445.
- Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 15:155-173.

- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. & Schleifer, K. H. (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis*. 19:554-568.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhu, K., Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. & Schleifer, K.-H. (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32:1363-1371.
- Luedemann, G.M. (1970). *Micromonospora* taxonomy. *Adv. in Appl. Microbiol.* 11: 101-133.
- Luedemann, G.M. (1971). Species concepts and criteria in the genus *Micromonospora*. *Trans. Acade. Sci.* 33:207-218.
- Luedemann, G. M. (1971a). *Micromonospora purpureochromogenes* (Waksman and Curtis, 1916) comb. nov. (subjective synonym: *Micromonospora fusca* Jensen, 1932). *J. Int. J. Syst. Bacteriol.* 21:240-247.
- Luedemann, G. M. & Brodsky, B. C. (1964). Taxonomy of gentamycin-producing *Micromonospora*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 161:116-124 p.
- Luedemann, G. M. & Brodsky, B. C. (1965). *Micromonospora carbonacea* sp. nov., an everninomicin-producing organism. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1964:47-52.
- Luedemann, G.M. & Casmer, C. J. (1973) Electron microscope study of whole mounts and thin section of *Micromonospora chalcea* ATCC 12452. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23:243-255.
- Lundin, K.E, Good, L., Strömberg, R., Gräslund, A. & Smith, C.I. (2006) Biological activity and biotechnological aspects of peptide nucleic acid. *Adv. Genet.* 56:1-51.
- Lui, W.-T., Marsh, T.L., Cheng, H. & Forney, L.J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4516-4522.
- Lynch, D.H. & Smith, D.L. (1993). Soybean (*Glycine max*) nodulation and N₂-fixation as affected by exposure to a low root-zone temperature. *Phys. Plant.* 88: 212-220.
- Macnaughton, S.J., O'Donnel, A.G. & Embley, T.M. (1994). Permeabilization of mycolic-acid-containing actinomycetes for *in situ* hybridization with fluorescently labelled oligonucleotide probes. *Microbiology.* 140:2859-2865.
- Magarvey, N.A., Keller, J.M., Bernan, V., Dworkin, M. & Sherman, D.H. (2004). Isolation and characterization of novel marine derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7520-7529.
- Mahmoud, K.K., Leduc, L.G. & Ferroni, G.D. (2005). Detection of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in acid mine drainage environments using fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *J. Microbiol. Methods.* 61:33-45.

- Maidak, B.L., Cole, J.R., Lilburn, T.G., Parker, Jr. C.T., Saxman, P.R., Stredwick, J.M., Garrity, G.M., Olsen, G.J., Pramanik, S., Schmidt, T.M. & Tiedje, J.M.** (2000). The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Res.* 28:173-174.
- Maldonado, L.A., Stach, J.E., Ward, A.C., Bull, A.T. & Goodfellow, M.** (2008). Characterisation of *Micromonosporae* from aquatic environments using molecular taxonomic methods. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 94:289-98.
- Mandel, M. & Marmur, J.** (1968). Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. *Methods Enzymol.* 12:184-195.
- Manser, R., Muche, K., Gujer, W. & Siegrist, H.** (2005). A rapid method to quantify nitrifiers in activated sludge. *Water Res.* 39:1585-93.
- MAPA.** Ministerio de agricultura pesca y alimentación -España. 2007. Producción nacional de semillas, serie histórica. <http://www.mapa.es>.
- Margo, C.E., & Bombardier, T.** (1985). The diagnostic value of fungal autofluorescence. *Surv. Ophthalmol.* 29:374-376.
- Ma, Y.C. & Chen, S.F.** (2008). *Paenibacillus forsythiae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from rhizosphere soil of *Forsythia mira*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:319-23.
- Ma, Y., Xia, Z., Liu, X. & Chen, S.** (2007a). *Paenibacillus sabinae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere soils of shrubs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:6-11.
- Ma, Y., Zhang, J. & Chen, S.** (2007). *Paenibacillus zanthoxyli* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Zanthoxylum simulans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 20:873-877.
- Martínez-Romero, E. & Phillips, D.** (2000). Biological Nitrogen Fixation. In: Encyclopedia of Microbiology. 2° ed. Academic Press. Vol.1 , 492-505 pp.
- Mavingui, P., Laguerre, G., Berge, O. & Heulin, T.** (1992). Genetic and phenotypic diversity of *Bacillus polymyxa* in soil and in the wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1894-1903.
- McLeod, M.B. & Gordon, J.** (1923) Catalase production and sensitiveness to hydrogen peroxide amongst bacteria with a scheme of classification based on these principles. *J. Pathol. Bacteriol.* 26:326-331.
- Mehta, M.P. & Baross, J.A.** (2006). Nitrogen fixation at 92°C by a hydrothermal vent archaeon. *Science.* 15:1691-1702.
- Mehta, M.P., Butterfield, D.A. & Baross, J.A.** (2003). Phylogenetic diversity of nitrogenase (*nifH*) genes in deep-sea and hydrothermal vent environments of the Juan de Fuca Ridge. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:960-970.
- Meredith, H.L.** (1988). Lupin field nutrition studies. In: Proceedings 5th International Lupine Conference. Institute Plant Breeding and Acclimatization, Radzikow, Poland. 482-493 pp.

- Mesbah, M. & Whitman, W. B.** (1989). Measurement of deoxyguanosine/thymidine ratios in complex mixtures by high-performance liquid chromatography for determination of the mole percentage guanine + cytosine of DNA. *J. Chromatogr.* 479:297-306.
- Mincer, T.J., Jensen, P.R., Kauffman, C.A. & Fenical, W.** (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5005-5011.
- Miyagi, T., Peng, C.Y.S., Chuang, R.Y., Mussen, E.C., Spivak, M.S. & Doi, R.H.** (2000). Verification of oxytetracycline-resistant American Foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* 75:95-96.
- Mole, S. & Joern, A.** (1994). Feeding behavior of graminivorous grasshoppers in response to host-plant extracts, alkaloids and tannins. *J. Chem. Ecol.* 20:3097-3109.
- Mollet, C., Drancourt, M. & Raoult, D.** (1997). *RpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol. Microbiol.* 26:1005-1011.
- Montes, J. M., Mercadé, E., Bozal, N. & Guinea, J.** (2004). *Paenibacillus antarcticus* sp. nov., a novel psychrotolerant organism from the Antarctic environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1521-1526.
- Moreno, D.R.** (1978). Clasificación de pH del suelo, contenido de sales y nutrientes asimilables. *INIA-SARH*. México D.F.
- Moreno, M.T.** (1983). Las leguminosas de grano: una visión de conjunto. En: leguminosas de grano. J.I. Cubero; M.T. Moreno. (Eds) Leguminosas de grano. Mundi-Prensa. Madrid. 15-34 pp.
- Moter, A. & Gobel, U.B.** (2000). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microb. Methods.* 41:85-112.
- Mougel, C., Thioulouse, J., Perrière, G., & Nesme, X.** (2002). A mathematical method for determining genome divergence and species delineation using AFLP. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:573-586.
- Moulin L., Munive A., Dreyfus B. & Boivin-Masson C.** (2001). Nodulation of legumes by members of the β subclass of Proteobacteria. *Nature.* 411:948-950.
- Moulin, L., Béna, G., Boivin-Masson, C. & Stepkowski, T.** (2004). Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Mol. Phylog. Evol.* 30:720-732.
- Moxon, E.R. & Wills, C.** (1999). DNA microsatellites: agents of evolution? *Scientific American.* 8:72-77.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods. Enzymol.* 155:335-350.
- Neef, A., Zaglauer, A., Meier, H., Amann, R., Lemmer, H. & Schleifer, K.H.** (1996). Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and *in situ* identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4329-4339.

- Nejad, P. & Johnson, P.A.** (2000). Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. *Biol. Control*. 18:208-215.
- Normand, P. Simonet, P. & Bardin, R.** (1988). Conservation of *nif* sequences in *Frankia*. *Mol. Gen. Genet.* 213:238-246.
- O'Connell, L.** (2000). Grain Yearbook. (Australian Grain: Toowoomba). 20 pp.
- Onaka, T.J., Konishi, J., Ishii, Y. & Maruhashi, K.** (2001). Desulfurization characteristics of thermophilic *Paenibacillus* sp. Strain a11-2 against asymmetrically alkylated dibenzothiophenes". *J. Biosci. Bioeng.* 92:193-196.
- Olive, D.M. & Bean, P.** (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37:1.661-1.669.
- Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Pace, N.R. & Stahl, D.A.** (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 337-365.
- Omura, S.** (1992). The expanded horizon for microbial metabolites a review. *Gene*. 115: 141-149.
- Ørskov, J.** (1923). Investigations into the morfology of the Ray Fungi. Copenhagen: Levin & Munksgaard.
- Parmar, N. & Dadarwal, K.R.** (1999). Stimulation of nitrogen fixation and induction of flavonoid-like compounds by rhizobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 86:36-64.
- Pascual Terrats, H.** (1986). Altramuces de la península Ibérica e islas Baleares, taxonomía, área, autoecología, aprovechamiento y aspectos agronómicos. Comunicaciones I.N.I.A. Serie: Producción Vegetal N°67.
- Paul, A. & Clark, F.E.** (1989). Occurrences and distribution of soil organics. In: *Soil Microbiol. Biochem.* Academic Press, San Diego. 81-84 pp.
- Pernthaler, A. & Amann, R.** (2004). Simultaneous fluorescence *in situ* hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5426-5433.
- Petersen, D.J., Srinivasan, M. & Chanway, C.P.** (1996). *Bacillus polymyxa* stimulates increased *Rhizobium etli* populations and nodulation when co-resident in the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris*. *FEMS Microbiol. Lett.* 142: 271- 276.
- Petterson, D.S. & Mackintosh, J.B.** (1994). The chemical composition of lupin seed grown in Australian. In: Proceedings First Australian Lupin Technical Symp. Dept. of Agric. Perth, Western Australian. 39-48 pp.
- Pirttilä, A.M., Laukkanen, H., Pospiech, H., Myllylä, R. & Hohtola, A.** (2000) Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3073-3077.
- Poly, F., Jocteur-Monrozier, L. & Bally, R.** (2001). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nif* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res. Microbiol.* 152:196-103.

- Oasem, J.A., Khan, Z.U., Mustafa, A.S. & Chugh, T.D.** (1999). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis and plasmid profile of soil and clinical isolates of *Nocardia*. *Microbiol. Res.* 154:157-65.
- Rademaker, J.L., Aarts, J.H. & Vinuesa, P.** (2005). Molecular typing of environmental isolates. In: Mark Osborn and Cindy Smith (eds) *Molecular Microbial Ecology*. Chap. 4, 97-134 pp.
- Rahman, M.S. & Gladstones, J.S.** (1987). Differences among *Lupinus* species in field response to superphosphate. *Aust. J. Exp. Agr.* 14:214-223.
- Rajendran, G., Sing, F., Desai, A.J. & Archana, G.** (2007). Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp. *Bioresource Technology*. 99: 4544-4550.
- Ranalli, P.** (1995). Improvement of pulse crops in Europe. *Eur. J. Agron.* 4:151-166.
- Rasolomampianina, R., Bailly, X., Fetiariison, R., Rabevohitra, R., Bena, G., Ramaroson, L., Raherimandimy, M., Moulin, L., DeLajudie, P. & Dreyfus, B.** (2005). Nitrogen fixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia* spp) endemic to Madagascar host seven different genera belongs to α and β Proteobacteria. *Mol. Ecol.* 14: 4135-4146.
- Raymond, J., Siefert, J.L., Staples, C.R. & Blankenship, R.E.** (2004). The natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.* 21:541-554.
- Reda, A.I. & Abou-Shanab.** (2007). Characterization and 16S rDNA Identification of Thermo-tolerant Bacteria Isolated from Hot Springs. *J. Appl. Sci. Res.* 3:994-1000.
- Riffard, S., Lo Presti, F., Normand, P., Forey, F., Reyrolle, M., Etienne, J. & Vandenesch, F.** (1998). Species identification of *Legionella* via intergenic 16S-23S ribosomal spacer PCR analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 723-730.
- Rigaud, J. & Puppo, A.** (1975). Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 88:223-28.
- Rivas, R., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. & Velázquez, E.** (2005). *Paenibacillus phyllosphaerae* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from the phyllosphere of *Phoenix dactylifera*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:743-746.
- Rivas, R., Sánchez, M., Trujillo, M.E., Zurdo-Piñeiro, J.L., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. & Velázquez, E.** (2003). *Xylanimonas cellulosityca* gen. nov., sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from a decayed tree (*Ulmus nigra*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 99-103
- Rivas, R., Trujillo, M.E., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. & Velázquez, E.** (2004a). *Cellulomonas xylanilytica*, sp. nov., a cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from a decayed elm tree. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:533-536
- Rivas, R., Trujillo, M.E., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. & Velázquez, E.** (2004b). *Agromyces ulmi* sp. nov., xylanolytic bacteria from *Ulmus nigra* in Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1987-1990.
- Rivas, R., Trujillo, M.E., Schumann, P., Kroppenstedt, R.M., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. & Velázquez, E.** (2004c). *Xylanibacterium ulmi* gen. nov.,

sp. nov., a novel xylanolytic member of the family *Promicromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:557-561.

Rivas, R., Trujillo, M.E., Sánchez, M., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. & Velásquez, E. (2004d). *Micromonospora ulmi* sp. nov., a xylanolytic, phosphate-solubilizing bacterium isolated from sawdust of *Ulmus nigra*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:513-517.

Rivas, R., Velásquez, E., Valverde, A., Mateos, P.F. & Martínez-Molina, E. (2001). A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis* 22: 1086-1089.

Rivas, R., Velásquez, E., Palomo, J. L., Mateos, P.F., García-Benavides, P. & Martínez-Molina, E. (2002). Rapid identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* using two primers random amplified polymorphic DNA (TP-RAPD) fingerprints. *Eur. J. Plant. Pathology.* 108:179-184.

Rivas, R., Willems A., Subbarao, N.S., Mateos, P.F., Dazzo, F.B., Kroppenstedt, R.M., Martínez-Molina, E., Gillis, M. & Velásquez E. (2003). Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Syst. Appl. Microbiol.* 26:47-53.

Rodríguez, M., Lebbe, L., Rodelas, B., Heyrman, J., De Vos, P. & Logan, N.A. (2005). *Paenibacillus wynnii* sp. nov., a novel species harbouring the nifH gene, isolated from Alexander Island, Antarctica International. *J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:2093-2099.

Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W. & Schleifer, K.-H., (1994). *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA.G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology*, 140:2849-2858.

Roselló-Mora, R. & Amann, R. (2000). The species concept for prokaryotes. *FEMS. Microbiol. Rev.* 25:39-67.

Roszak, D.B. & Colwell, R.R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* 51:365-379.

Sambrook, J. & Russell, D.W. (2000). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.

Sajnaga, E. & Malek, W. (2001). Numerical taxonomy of *Sarothamnus scoparius* rhizobia. *Curr. Microbiol.* 42: 26-31.

Sardi, P., Saracchi, M., Quaroni, Q., Petrolini, B. Borgonovi, G. E., & Merli, S. (1992). Isolation of Endophytic *Streptomyces* Strains from Surface-Sterilized Roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2691-2693.

Schramm, A., Santegoeds, C.M., Nielsen, H.K., Ploug, H., Wagner, M., Pribyl, M., Wanner, J., Amann, R. & de Beer, D. (1999). On the occurrence of anoxic microniches, denitrification, and sulfate reduction in aerated activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4189-96.

- Schönhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S. & Amann, R.** (1997). Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3268-3273.
- Schönhuber, W., Zarda, B., Eix, S., Rippka, R., Herdmann, M., Ludwig, W. & Amann, R.** (1999). *In situ* identification of Cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1259-1264.
- Schwarzenbach, K., Widmer, F. & Enkerli, J.** (2007). Cultivation-independent analysis of fungal genotypes in soil by using simple sequence repeat markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6519-25.
- Sekar, R., Pernthaler, A., Pernthaler, J., Warnecke, F., Posch, T. & Amann, R.** (2003). An improved protocol for quantification of freshwater Actinobacteria by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2928-35.
- Seldin, L., Van Elsas, J.D. & Penido, E.G.C.** (1984). *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen-fixing species from brazilian soils and grass roots. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:451±456.
- Selenska-Pobell, S., Evguenieva-Hackenberg, E., Radeva, G. & Squartini, A.** (1996). Characterization of *Rhizobium 'hedysar'* by RFLP analysis of PCR amplified rDNA and by genomic PCR fingerprinting. *J. Appl. Bacteriol.* 80:517- 528.
- Seurinck, S., Verstraete, W. & Siciliano, S.D.** (2003). Use of 16S-23S rRNA intergenic Spacer Region PCR and Repetitive Extragenic Palindromic PCR Analysis of *Escherichia coli* Isolates to Identify Nonpoint Fecal Sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4942-4950.
- Simons, M., Van Der Bij, A.J., Brand, I., De Weger, L.A., Wijffelman, C.A. & Lugtenberg, B.J.J.** (1996). Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth promoting *Pseudomonas* bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:600-607.
- Singh, J.P, Verma, R. & Chaudhuri, P.** (2006). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains in India. *J. Vet. Sci.* 7: 181-187.
- Sitte, P., Weiler, E.A., Kadereit, J. W.** (2004). Strasburger tratado de botánica 9a. ed. castellana. Ed.Omega, Barcelona.
- Skerman, V.B.D., Mc Gowan, V. & Sneath, P.H.A.** (1980). Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:225-340.
- Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R.** (1973). Numerical Taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco, U.S.A: W.H. Freeman.
- Solovieva, N.K.** (1972). Actinomycetes of littoral and sub. Littoral zones of the White Sea. *Antibiotiki* 17:778-781.
- Solovieva, N.K. & Singal, E.M.** (1972). Some data on ecology of *Micromonospora*. *Antibiotiki.* 17:387-392.

- Sorensen, A.H., Torsvic, V.L., Torsvic, T., Poulsen, L.K. & Ahring, B.K.** (1997). Whole-cell hybridization of *Methanosarcina* cells with two new oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3043–3050.
- Sprent, J.I.** (2001). Nodulation in legumes London, UK: Royal Botanic Gardens Kew.
- Sprent, J.I.** (2008). 60Ma of legume nodulation: What's new? What's changing? *J. Exp. Botany.* 59:1081-1084.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kämpfer, P., Maiden, M.C., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper HG, Vauterin L, Ward, A.C. & Whitman, W.B.** (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1043-1047.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. M.** (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 44: 846-849.
- Stackebrandt, E. & Liesack, W.** (1993). Nucleic acids and classification. In *Handbook of new bacterial systematics*, pp. 151. Edited by M. Goodfellow, O'Donell, A.G. London, U.K. Academic Press Ltd.
- Stackebrandt, E., & Schumann, P.** (2006). Introduction to the taxonomy of *Actinobacteria*. In: Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (eds) *The Prokaryotes* 3rd edn. Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. New York: Springer.
- Steel, K.J.** (1961). The oxidase reaction as a taxonomic tool. *J. Gen. Microbiol.* 25:297-306.
- Strobel, G & Daisy, B.** (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:491-502.
- Sturz, A.V., Christie, B.R., Matheson, B.G. & Nowak, J.** (1997). Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol. Fertil. Soil.* 25:13-19.
- Sturz, A.V., Christie, B.R., Matheson, B.G., Arsenault, W.J. & Buchanan, N.A.** (1999). Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant. Pathol.* 48:360–370.
- Sturz, A.V., Christie, B.R. & Nowak, J.** (2000). Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19: 1–30.
- Summerfield, R.J. & Bunting, A.H.** (1980). *Advances in legume science*. Kew. Royal Botanical Gardens. 667pp.
- Sveshnikova, M.A., Maksimova, T.S. & Kudrina, E.S.** (1969). The species of the *Micromonospora* Ørskov, 1923 and their taxonomy. *Mikrobiologiya.* 38:883-893.
- Swan, A.** (1954). The use of bili-aesculin medium and of Maxted's technique of lancefield grouping in the identification of enterococci, group D *Streptococci*. *J. Clin. Pathol.* 7:160-163.

- Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., García, N., Willems, A., DeLajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C. & Dreyfus, B.** (2001). Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* 183:214-220.
- Szabó, Z. & Fernández, C.** (1984). *Micromonospora brunnea*. Sveshnikova, Madsimova, and Kudrina 1969, is a junior subjective synonym of *Micromonospora Purpureochromogenes* (Waksman and Curtis 1916) Luedemann 1971. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:463-4.
- Taechowisan, T., Peberdy, J.F. & Lumyong, S.** (2003). Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World J. Microbiol. Biotech.* 19:381-385.
- Tang, W.H.** (1994). Yield-increasing bacteria (YIB) and biocontrol of sheath blight of rice. En: *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*, (M.J. Ryder, P.M. Stephens y G.D. Bowen, eds.). Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Adelaide, Australia, 267-278 pp.
- Tautz, D.** (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17:6463-6471
- Teira, E., Reinthaler, T., Pernthaler, A., Pernthaler, J. & Herndl, G.J.** (2004). Combining catalyzed reporter deposition-fluorescence *in situ* hybridization and microautoradiography to detect substrate utilization by bacteria and Archaea in the deep ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4411-4.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K. & Kudo, T.** (2004). *Micromonospora auratinigra* sp. nov., isolated from a peat swamp forest in Thailand. *Actinomycetologica*, 18:8-14.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K. & Kudo, T.** (2005). *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 55:417-422.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K. & Kudo, T.** (2006). *Micromonospora siamensis* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 51:229-234.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Itoh, T. & Kudo, T.** (2007). *Micromonospora narathiwatensis* sp. nov., from Thai peat swamp forest soils. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53:287-293.
- Thawai, C., Tanasupawat, S. & Kudo, T.** (2008): *Micromonospora pattaloongensis* sp. nov., isolated from a Thai mangrove forest. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:1516-21.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G.** (1997). The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res.* 25:4876-4882.
- Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Albrektsen, A.S., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S. & Stougaard, J.** (2007) A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science.* 315:104-107.

- Tokala, R. K. , Strap, J. L., Jung C. M., Crawford, D.L, Salove, M.H., Deobald, L. A., J., Bailey, J. F. & Morra, M.J.** (2002). Novel Plant-Microbe Rhizosphere Interaction Involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the Pea Plant (*Pisum sativum*). *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2161-2171
- Tomita, K., Hoshino Y., Ohkusa, N. & Miyaki, T.** (1992). *Micromonospora chersina* sp. nov., *Actinomycetol.* 6:21-28.
- Trujillo, M.E., Fernández-Molinero, C., Velázquez, E., Kroppenstedt, R.M., Schumann, P., Mateos, P.F. & Martínez-Molina, E.** (2005). *Micromonospora mirobrigensis* sp. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:877-80.
- Trujillo, M.E., Kroppenstedt, R.M., Schumann, P., Carro, L. & Martínez-Molina, E.** (2006). *Micromonospora coriariae* sp. nov. isolated from root nodules of *Coriaria myrtifolia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:2381-2385.
- Trujillo, M.E., Kroppenstedt, R.M., Fernández-Molinero, C., Schumann, P. & Martínez-Molina, E.** (2007). *Micromonospora lupini* sp. nov. and *Micromonospora saelicesensis* sp. nov. isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2799-2804.
- Trujillo, M.E., Willems, A., Abril, A., Planchuela, A.M., Rivas, R., Ludena, D., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. & Velázquez, E.** (2005). Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1318-1327.
- Urzi, C., La Cono, V. & Stackebrandt, E.** (2004). Design and application of two oligonucleotide probes for the identification of *Geodermatophilaceae* strains using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Environ. Microbiol.* 6:678-685.
- Valdés, M., Pérez, N., Estrada-de los Santos, P., Caballero-Mellado, J., Peña-Cabriales, J.J., Normand, P. & Hirschs, A.M.** (2005). Non-Frankia Actinomycetes Isolated from Surface-Sterilized Roots of *Casuarina equisetifolia* Fix Nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:460-466.
- Valverde, A., Velázquez, E., Santos, F.F., Vizcaino N., Rivas, R., Mateos, P.F., Molina, E.M., Igual, J.M. & Willems, A.** (2005). *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1985-1989.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. & Swings, J.** (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60:407-438.
- Van de Lest, C.H., Versteeg, E.M., Veerkamp, J.H. & Van Kuppevelt, T.H.** (1995). Elimination of autofluorescence in immunofluorescence microscopy with digital image processing. *J. Histochem. Cytochem.* 43:727-30.
- Vanechoutte, M., Kämpfer, P., De Baere, T., Falsen, E. & Verschraegen, G.** (2004). *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:317-327.
- Vaz-Moreira, I., Faria, C., Nobre, M.F, Schumann, P., Nunes, O.C. & Manaia, C.M.** (2007). *Paenibacillus humicus* sp. nov., isolated from poultry litter compost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2267-2271.

- Van Rhijn, P. & Vanderleyden, J.** (1995). The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* 59:124-142.
- Velázquez, E., Calvo, O., Cervantes, E., Mateos, P. F., Tamame, M. & Martínez-Molina, E.** (2000). Staircase electrophoresis profiles of stable low-molecular-weight RNA a new technique for yeast fingerprinting. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 (2):917-923.
- Velázquez, E., de Miguel, T., Poza, M., Rivas, R., Rosselló-Mora, R., & Villa, T.G.** (2004). *Paenibacillus favisporus* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from cow faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:59-64.
- Velázquez, E., Martínez-Romero, E., Rodríguez-Navarro, D.N., Trujillo, M. E., Daza, A., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. & van Berkum, P.** (2001). Characterization of rhizobial isolates of *Phaseolus vulgaris* by staircase electrophoresis of low-molecular-weight RNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1008-1010.
- Velázquez, E., Rojas, M., Lorite, M.J., Rivas, R., Zurdo-Piñeiro, J.L., Heydrich, M. & Bedmar, E.J.** (2008). Genetic diversity of endophytic bacteria which could be found in the apoplastic sap of the medullary parenchyma of the stem of healthy sugarcane plants. *J. Basic. Microbiol.* 48:118-24.
- Versalovic, J., Koeth, T. & Lupski, J.R.** (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic. Acids. Res.* 19:6823-6831.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F.J. & Lupski, J.R.** (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth. Mol. Cell. Biol.* 5:25-40.
- Vesey, G., Deere, D., Gauci, M.R., Griffiths, K.R., Williams, K.L. & Veal, D.A.** (1997). Evaluation of fluorochromes and excitation sources for immunofluorescence in water samples. *Cytometry.* 29:147-154.
- Vincent, J. M.** (1970). A manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford, U.K.: Blackwell Scientific Publications. 176 pp.
- Von der Weid, I., Paiva, E., Nobrega, A., van Elsas, J. D. & Seldin, L.** (2000). Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of maize planted in Cerrado soil. *Res. Microbiol.* 151:369-381.
- Walkley, A.** (1947). A critical examination of rapid method for determining organic carbon soil-effect of variations in digestion condition and inorganic soil constituents. *Soil Sci.* 63: 251-264.
- Wall, L.G., Hellsten, A. & Huss-Danell, K.** (2000). Nitrogen, phosphorus, and the ratio between them affect nodulation in *Alnus incana* and *Trifolium pratense*. *Symbiosis* 29:91-105.
- Watson, E.T. & Williams, S.T.** (1974). Studies on the ecology of actinomycetes in soil. VII. Actinomycetes in a coastal sand belt. *Soil Biol. Biochem.* 6:43-52.
- Watt, M., Hugenholtz, P., White, R. & Vinall, K.** (2006). Numbers and locations of native bacteria on field-grown wheat roots quantified by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Environ. Microbiol.* 8:871-884.

- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P., Trüper, H.G. (1987). Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bact.* 37:463-464
- Wayne, L.G., Dubek, J.R. & Russell, R.L. (1964). Classification and identification of *Mycobacteria*. I. Test employing Tween 80 as substrate. *Am. Rev. Respir. Dis.* 90:588-597
- Webster, G., Poulton, P. R., Cocking, E. C. & Davey, M. R. (1995). The nodulation of micro-propagated plants of *Parasponia andersonii* by tropical legume rhizobia. *J. Exp. Botany.* 9:1131-1137.
- Weinstein, M.J., Luedemann, G.M., Oden, E.M. & Wagman, G.H. (1967) Halomicin, a new *Micromonospora*-produced antibiotic. *Ant. Agent. Chem.* 8:435-441.
- Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic. Acids. Res.* 18:7213-7218.
- Weyland, H. (1969). Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean sediments. *Nature*, Lond. 223:858.
- Williams, J.G.K., Kubelic, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic. Acids. Res.* 18:6531-6535.
- Williams, S.T., Lanning, S. & Wellington, E.M.H. (1984). Ecology of actinomycetes, p. 481-528. In M. Goodfellow, M. Mordarky and ST Williams (ed.), *The biology of the actinomycetes*. Academic Press Ltd., London, United Kingdom.
- Williams, S.T., Sharpe, M.E. & Holt, J.G. (1989). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4. Williams & Wilkins Co. Baltimore, Maryland.
- Williams, W. & McGibbon, R. (1980). Environmental effect on seed oil percentage and fatty acid composition in white lupin. *J. Agric. Sci.* 95:597-602.
- Wink, M. (1992). *Insect-Plant Interactions*. E.A. Bernays, E.A (ed.) Vol IV, CRC-Press, Boca Raton, Florida. 131-166 pp.
- Wink, M. (1993). The alkaloids. J. Cordell (ed.), Vol.43, pp. 1-104. Academic Press, Nueva York.
- Wink, M., Meißner, C. & Witte, L. (1995). Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochemistry.* 38:139-153.
- Witz, D.F., Detroy, R.W. & Wilson, P.W. (1967). Nitrogen fixation by growing cells and cell-free extracts of the *Bacillaceae*. *Arch. Mikrobiol.* 55:369-381.
- Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271.
- Woese, C.R., Stackebrandt, E., Weisburg, W.G, Paster, B.J, Madigan, M.T, Fowler, V.J, Hahn, C.M, Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K.H, Fox, G.E. (1984) The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* 5:315-326.

- Xiong, J., Fischer, W.M., Inoue, K., Nakahara, M. & Bauer, C.E.** (2000). Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis. *Science*. 289:1724-1730.
- Yamamoto, S., Bouvet, P. J. & Harayama, S.** (1999). Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:87-95.
- Yilmaz, L.S. & Noguera, D.R.** (2004) Mechanistic approach to the problem of hybridization efficiency in fluorescent *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7126-7139.
- Yoon, M.H, Ten, L.N. & Im, W.T.** (2007). *Paenibacillus ginsengarvi* sp. nov., isolated from soil from ginseng cultivation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:1810-4.
- Young-Kil, P., Gill-Han, B. & Sang-Jae, K.** (2000). Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from countries in the Western Pacific region. *J. Clin. Microbiol.* 38:191-197.
- Young, J.P.W.** (1992). Phylogenetic classification of Nitrogen-fixing organisms. In: Biological Fixation. Stacey, G., Burris, H.R. & Evans, H.J. (eds.). Chapman and Hall, New York. 43-79 pp.
- Young, J.P.W.** (1996). Phylogeny and taxonomy of rhizobia. *Plant Soil.* 186:45-52.
- Zakhia, F., Jeder, H., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B. & De Lajudie, P.** (2006). Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for *nifH*-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microb. Ecol.* 51:375-93.
- Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T.** (2002). Strategies for microsatellite isolation: A review. *Mol. Ecol.* 11:1-16.
- Zang, K., Kurisu, F., Kasuga, I., Furumai, H. & Yagi, O.** (2008). Analysis of the phylogenetic diversity of estrone-degrading bacteria in activated sewage sludge using microautoradiography-fluorescence *in situ* hybridization. *Syst. Appl. Microbiol.* 31:206-214.
- Zarda, B., Amann, R., Wallner, W. & Schleifer, K.-H.** (1991). Identification of single bacterial cells using digoxigenin-labelled, rRNA-targeted oligonucleotides. *J. Gen. Microbiol.* 137:2823-2830.
- Zhang, H., Lee, Y.K., Zhang, W. & Lee, H.K.** (2006). Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2:159-169.
- Zhao, H., Kassama, Y., Young, M., Kell, D.B. & Goodacre, R.** (2004). Differentiation of *Micromonospora* isolates from a coastal sediment in Wales on the basis of fourier transform infrared spectroscopy, 16S rRNA sequence analysis, and the amplified fragment length polymorphism technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6619-6627.
- Zhoinska, E., Lejczak, B. & Kafarsi, P.** (1992). Organophosphate utilization by wild-type strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2993-2999.

ANEXOS

ANEXO 1.

MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

1. Medios de cultivo

Los diferentes medios de cultivo se preparan con agua destilada. La esterilización se realiza en autoclave durante 15 minutos a 15 psi de presión (121°C).

<p>Medio YMA (g/L)</p> <p>Manitol 10 Extracto de levadura 3 K₂HPO₄ 0,2 MgSO₄ 0,2 Agar 20 Agua destilada 1 L</p>	<p>Medio basal SA1 (g/L)</p> <p>Glucosa 10 Extracto de levadura 3 Tristona 5 Almidón 2 Triptosa 2 CaCO₃ 0,1 CoCl₂ trazas Citrato de hierro trazas Agar 18 Agua destilada 1 L</p>
<p>Medio N-Z- Amina. Hidrolizado de caseína (g/L)</p> <p>Glucosa 10 Almidón soluble 20 Extracto de levadura 5 N-Z- amina 5 CaCO₃ 1 Agar 15 Agua destilada 1 L pH 7,2</p>	<p>Medio Avena (g/L)</p> <p>Copos de avena 20 Agar 12 Solución de sales 1 ml Agua destilada 1 L</p> <p>La avena se lleva a ebullición durante 20 minutos, se filtra y luego se adiciona el agar junto con 1 ml de la solución de sales.</p>
<p>Ácido húmico (g/L)</p> <p>Extracto de levadura 1 Ácido húmico 0,2 Agar 18 Agua destilada 1 L</p> <p>Al final de la esterilización del medio, se añade cicloheximida 50 mg/L.</p>	<p>Solución de sales (g/L)</p> <p>FeSO₄ .7H₂O 0.1 MnCl₂ .4H₂O 0.1 ZnSO₄ .7H₂O 0.1 Agua destilada 1 L</p>

2. Medios empleados en las pruebas Bioquímicas

Medio basal de Stevenson's (1967)

- i. Las diferentes fuentes de carbono fueron preparadas y esterilizadas por tinalización
- ii. una solución concentrada (10 X) de levadura como nitrógeno base YNB (Difco), fue preparada disolviendo 67 g en 1 L de agua estéril. La solución fue suplementada con 100 mg de ácido casamino (Difco), y esterilizada por filtración.
- iii. 200 ml de K₂HPO₄ al 10% (p/v) estéril, se añadieron a 800 ml de la solución de nitrógeno base.

- iv. Por otra parte se preparó agar (Oxoid # 1) esterilizado a 121 °C durante 20 minutos, y 100 ml de la solución de nitrógeno base se adicionaron de manera aséptica por cada litro de agar.
- v. Para obtener la concentración final de la fuente de carbono (1% para carbohidratos y 0.1% para aminoácidos, p/v), se adicionaron 50 ml y 5 ml respectivamente de la fuente de carbono esterilizada por cada litro de la mezcla que contenía agar y el nitrógeno base.

<p>Pruebas arbutina (g/L)</p> <table border="0"> <tr><td>Arbutina</td><td>1</td></tr> <tr><td>Citrato amónico-férrico</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>Extracto de levadura</td><td>3</td></tr> <tr><td>Agar</td><td>7,5</td></tr> <tr><td>Agua destilada</td><td>1 L</td></tr> </table> <p>Se ajusta a pH de 7,2. Se preparan tubos con 2 ml de medio los cuales se esterilizan en el autoclave.</p>	Arbutina	1	Citrato amónico-férrico	0,5	Extracto de levadura	3	Agar	7,5	Agua destilada	1 L	<p>Hidrólisis de la esculina (g/L)</p> <table border="0"> <tr><td>Esculina</td><td>1</td></tr> <tr><td>Citrato amónico-férrico</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>Extracto de levadura</td><td>3</td></tr> <tr><td>Agar</td><td>7,5</td></tr> <tr><td>Agua destilada</td><td>1 L</td></tr> </table> <p>De forma general la hidrólisis de la esculina libera glucosa y esculetina y esta última se detecta porque reacciona con el ión férrico del medio dando unos precipitados negros que lo oscurecen.</p>	Esculina	1	Citrato amónico-férrico	0,5	Extracto de levadura	3	Agar	7,5	Agua destilada	1 L		
Arbutina	1																						
Citrato amónico-férrico	0,5																						
Extracto de levadura	3																						
Agar	7,5																						
Agua destilada	1 L																						
Esculina	1																						
Citrato amónico-férrico	0,5																						
Extracto de levadura	3																						
Agar	7,5																						
Agua destilada	1 L																						
<p>Medio de urea (g/L)</p> <table border="0"> <tr><td>Urea</td><td>20</td></tr> <tr><td>Extracto de levadura</td><td>0.1</td></tr> <tr><td>K₂HPO₄</td><td>9.5</td></tr> <tr><td>KH₂PO₄</td><td>9.1</td></tr> <tr><td>Rojo fenol</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>Agua destilada</td><td>1L</td></tr> </table> <p>Disolver los ingredientes sin calentar. Ajustar el pH a 7.2+/- 0.2. Esterilizar por filtración utilizando membrana millipore de 0.45 µm. Distribuir 2 ml en tubos estériles.</p>	Urea	20	Extracto de levadura	0.1	K ₂ HPO ₄	9.5	KH ₂ PO ₄	9.1	Rojo fenol	0.01	Agua destilada	1L	<p>Caldo de nitratos (g/L)</p> <table border="0"> <tr><td>Peptona</td><td>5</td></tr> <tr><td>Extracto de carne</td><td>3</td></tr> <tr><td>KNO₃</td><td>1</td></tr> <tr><td>Glucosa</td><td>5</td></tr> <tr><td>Agua destilada</td><td>1L</td></tr> </table> <p>El medio se coloca en tubos con 2 ml y se esteriliza. El revelado de la prueba se realiza con el reactivo de Griess-Ilosvay que contiene naftilamina y ácido sulfanílico.</p>	Peptona	5	Extracto de carne	3	KNO ₃	1	Glucosa	5	Agua destilada	1L
Urea	20																						
Extracto de levadura	0.1																						
K ₂ HPO ₄	9.5																						
KH ₂ PO ₄	9.1																						
Rojo fenol	0.01																						
Agua destilada	1L																						
Peptona	5																						
Extracto de carne	3																						
KNO ₃	1																						
Glucosa	5																						
Agua destilada	1L																						
<p>Hidrólisis del Tween 20, 80 (g/L)</p> <table border="0"> <tr><td>Bacto-peptona</td><td>10</td></tr> <tr><td>NaCl</td><td>5</td></tr> <tr><td>CaCl₂ (H₂O)</td><td>0.1</td></tr> <tr><td>Agar</td><td>15</td></tr> <tr><td>Agua destilada</td><td>1L</td></tr> </table> <p>El Tween 20 y el Tween 80 se esterilizan por separado en autoclave a 110°C durante 20 minutos y se adicionan al medio basal hasta obtener una concentración final del 1.0%(v/v).</p>	Bacto-peptona	10	NaCl	5	CaCl ₂ (H ₂ O)	0.1	Agar	15	Agua destilada	1L	<p>Degradación de la gelatina</p> <table border="0"> <tr><td>Solución de revelado</td><td></td></tr> <tr><td>HgCl₂</td><td>12.5 g</td></tr> <tr><td>HCl</td><td>16.8 ml</td></tr> <tr><td>Agua destilada</td><td>83.2 ml</td></tr> </table> <p>Se prepara medio SA1, al que se añade gelatina al 0.4%. Para observar el resultado de esta prueba, las placas se deben cubrir con la solución de revelado, la cual se deja durante 15 minutos.</p>	Solución de revelado		HgCl ₂	12.5 g	HCl	16.8 ml	Agua destilada	83.2 ml				
Bacto-peptona	10																						
NaCl	5																						
CaCl ₂ (H ₂ O)	0.1																						
Agar	15																						
Agua destilada	1L																						
Solución de revelado																							
HgCl ₂	12.5 g																						
HCl	16.8 ml																						
Agua destilada	83.2 ml																						

Medio almidón

Se prepara de igual manera que el medio SA1, pero cambiando la cantidad de almidón, en este caso 10 g/L. El revelado de la prueba se realiza por adición de Lugol de Gram.

Degradación de la caseína

Se esterilizan 100 ml de leche desnatada al 10% (p/v) durante 10 minutos a 110°C, luego se añaden al medio SA1 estéril, para obtener una concentración final de 1% (p/v).

3. Tampones

Solución tampón ácido cítrico - hidrogenofosfato disodio

Las soluciones de ácido cítrico 0,2 M (monohidratado) y Na_2HPO_4 0,4 M (deshidratado), se esterilizan en autoclave durante 15 min. a 121°C , se mezclan en las cantidades indicadas según el pH deseado y la mezcla se vierte sobre 100 ml de medio SA1 de doble concentración, previamente esterilizado.

pH	X ml de ácido cítrico	Y ml de Na_2HPO_4
4.0	56.0	44.0
4.5	54.6	45.4
5.5	43.1	56.9

Solución tampón de Tris (hidroximetil aminometano)

Se preparan soluciones de Tris 0,2 M y HCl 0,2 M las cuales se esterilizan en autoclave 15 minutos a 121°C . De la solución de Tris se toman 50 ml y se añaden al volumen de HCl según el pH que se requiera y se lleva a un volumen final de 100 ml con agua destilada estéril. Esta preparación se vierte sobre 100 ml de medio estéril SA1 de doble concentración.

pH	X ml HCl
8	29,2
9	0,2

Tampón TBE

	Concentración (mM)	Cantidad (g/L)
Tris (Fluka)	100	12,11
H_3BO_3 (Fluka)	83	5,13
EDTA (Fluka)	1	0,37
Agua destilada	-	1 L

Tampón de carga

Reactivos	Concentración (%)
Sacarosa	40
Azul de bromofenol	0,05

Solución Fijadora para muestras de Microscopía electrónica de Barrido

Tampón de fosfato 0.2 M (pH 7.0)

Glutaraldehído 0.2%

Paraformaldehído 2.0%

Solución de Rigaud para el mantenimiento de las plantas (Rigaud & puppo, 1975).

KH_2PO_4 (Panreac)	0,2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Panreac)	0,2 g
KCL (Panreac)	0,2 g
EDTA Fe Na_2 (Sigma)	0,025 g
Na_2Mo_4 (Panreac)	0,004 g
H_3BO_3 (Panreac)	0,018 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Panreac)	0,02 g
ZnSO_4 (Panreac)	0,003 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Panreac)	0,002 g
Agua destilada c.s.p.	1L

ANEXO 2.

Resultados del análisis fisiológico de las cepas SB1 y SB2 aisladas de nódulos

Crecimiento de las cepas SB1 en diferentes fuentes de carbono.

FUENTES DE CARBONO		CEPA																							
		1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
ADO	ADONITOL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	
ALM	ALMIDÓN	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ARA	ARABINOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	
CAS	CASEÍNA	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
CELO	CELOBIOSA	+	+	+	-	+	+	d	+	+	+	+	d	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	-	
CELU	CELULOSA	d	-	d	d	d	d	d	d	d	-	d	-	-	d	-	-	-	d	d	d	d	d	d	
CIT	CITRATO DE SODIO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
FRU	FRUCTOSA	+	+	+	d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	-	+	-	
GAL	GALACTOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
GEL	GELATINA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
GLU	GLUCOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
GTO	GLUCONATO DE SODIO	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-		
MAL	MALTOSA	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	d	
MANI	MANITOL	d	d	+	+	+	d	d	d	+	-	-	+	+	+	+	+	d	d	+	+	d	+	d	
MAN	MANOSA	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	

(+): Crecimiento de las cepas, (-): No crecimiento, (d): Crecimiento escaso

Crecimiento de las cepas SB1 en diferentes fuentes de carbono.

FUENTES DE CARBONO		CEPA																							
		1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
MEB	MELIBIOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	
MEL	MELECITOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	d	d	d	d	d	d	d	+	+	d	+	+	d	
MIO	MIO-INOSITOL	+	-	+	-	d	+	-	-	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	d	-	
PRO	PROPIONATO DE Na	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
RAM	RHAMNOSA	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	d	-	-	-	-	d	-	-	-	d	-	
RAF	RAFINOSA	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
RIB	RIBOSA	+	-	-	-	-	-	-	-	d	d	d	d	d	d	d	-	d	d	d	d	d	d	d	
SAL	SALICINA	d	d	-	d	+	+	-	-	+	+	-	d	d	-	-	-	-	+	+	-	d	+	-	
SUC	SUCROSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SOL	SORBITOL	+	+	+	-	+	+	+	+	d	d	d	d	d	d	d	d	d	+	+	d	+	+	+	
SOR	SORBOSA	+	+	+	d	+	+	-	+	d	+	d	+	d	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	
TRE	TREHALOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
XNO	XILANO	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	
XOL	XILITOL	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	d	d	-	-	-	-	d	d	d	d	d	d	d	
XIL	XILOSA	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	

(+): Crecimiento de las cepas, (-): No crecimiento, (d): Crecimiento escaso

Crecimiento de las cepas SB1 en diferentes fuentes de carbono.

FUENTES DE CARBONO		CEPA																							
		25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
ADO	ADONITOL	d	-	-	+	-	-	d	+	-	-	-	+	d	-	-	-	d	-	-	-	+	-	-	d
ALM	ALMIDÓN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ARA	ARABINOSA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAS	CASEÍNA	-	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	+	d	+	+	d
CELO	CELOBIOSA	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CELU	CELULOSA	d	d	d	-	d	-	-	-	d	d	d	d	d	-	+	-	-	-	-	+	-	+	d	-
CIT	CITRATO DE SODIO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	d	-
FRU	FRUCTOSA	-	-	+	-	d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+
GAL	GALACTOSA	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
GEL	GELATINA	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	d	-	d	+	d	+	+	d
GLU	GLUCOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GTO	GLUCONATO DE SODIO	-	+	+	+	+	-	+	d	+	+	+	d	d	-	d	-	-	-	d	+	+	+	+	-
MAL	MALTOSA	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
MANI	MANITOL	+	-	-	+	-	-	+	+	+	d	+	+	+	+	+	d	+	+	-	+	+	-	d	-
MAN	MANOSA	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+

(+): Crecimiento de las cepas, (-): No crecimiento, (d): Crecimiento escaso

Crecimiento de las cepas SB1 en diferentes fuentes de carbono.

FUENTES DE CARBONO		CEPA																							
		25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
MEB	MELIBIOSA	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	d	+	d	+	d	+	-	+	-	+	+	+
MEL	MELECITOSA	d	d	-	d	+	+	+	d	+	d	-	+	+	+	d	+	d	+	-	+	+	+	+	+
MIO	MIO-INOSITOL	-	d	d	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-
PRO	PROPIONATO DE Na	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAM	RHAMNOSA	-	-	-	d	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	d	-	-	+	-	-	+	-
RAF	RAFINOSA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	d	+	+	+
RIB	RIBOSA	+	d	d	+	+	-	d	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	d	-	+	+	d	+	d
SAL	SALICINA	-	d	d	-	-	-	+	d	+	+	-	d	d	d	-	-	+	d	-	-	-	-	-	-
SUC	SUCROSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOL	SORBITOL	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	d	d	d	+	+	+	+	+
SOR	SORBOSA	-	d	d	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	d	d	d	+	+	+	+	-
TRE	TREHALOSA	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XNO	XILANO	-	d	d	d	-	d	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	d	d	-
XOL	XILITOL	d	d	d	+	+	+	d	+	+	+	+	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+
XIL	XILOSA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	+	d	+	-	+	+	+	+	+	+	+

(+): Crecimiento de las cepas, (-): No crecimiento, (d): Crecimiento escaso.

Crecimiento de las cepas SB2 en diferentes fuentes de carbono.

FUENTES DE CARBONO		CEPAS SB2													
		1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	13	14	16
ADO	ADONITOL	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ALM	ALMIDÓN	-	-	-	d	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-
ARA	ARABINOSA	d	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	d	d
CAS	CASEÍNA	+	+	+	+	d	+	+	+	d	+	+	+	+	+
CEL	CELOBIOSA	+	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CELU	CELULOSA	d	-	-	d	-	d	-	-	+	-	d	d	d	d
CIT	CITRATO DE SODIO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FRU	FRUCTOSA	+	+	+	d	d	+	+	+	+	+	-	+	+	+
GAL	GALACTOSA	+	+	-	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL	GELATINA	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLU	GLUCOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GTO	GLUCONATO DE SODIO	+	+	-	d	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
MAL	MALTOSA	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
MANI	MANITOL	d	d	d	d	-	+	+	+	d	d	+	-	d	d
MAN	MANOSA	+	+	d	+	d	+	+	-	+	+	+	+	+	+

(+): Crecimiento de las cepas, (-): No crecimiento, (d): Crecimiento escaso.

Crecimiento de las cepas SB2 en diferentes fuentes de carbono.

FUENTES DE CARBONO		CEPAS SB2													
		1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	13	14	16
MEB	MELIBIOSA	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MEL	MELECITOSA	+	d	-	+	-	d	d	d	-	-	-	+	d	d
MIO	MIO-INOSITOL	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	d
PRO	PROPIONATO DE Na	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAM	RHAMNOSA	+	+	-	d	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
RAF	RAFINOSA	+	+	+	-	+	+	+	+	d	+	-	+	+	+
RIB	RIBOSA	+	d	d	+	-	d	d	+	d	d	+	+	+	d
SAL	SALICINA	d	+	d	+	-	+	-	+	+	-	-	d	d	d
SUC-	SUCROSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOL	SORBITOL	+	+	+	+	-	-	d	-	d	-	-	d	-	-
SOR	SORBOSA	+	d	-	d	+	d	-	-	-	-	-	d	-	-
TRE	TREHALOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XNO	XILANO	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
XOL	XILITOL	-	-	d	-	d	-	-	-	-	-	-	d	-	-
XIL	XILOSA	+	+	+	+	d	d	+	+	+	+	d	+	+	+

(+): Crecimiento de las cepas, (-): No crecimiento, (d): Crecimiento escaso.

Evaluación de aminoácidos como fuente de carbono, cepas SB1.

Aminoácido		CEPAS																								
		1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
ALA	ALANINA	+	-	+	-	+	+	-	-	d	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	d	-	-	
ARG	ARGININA	+	-	d	-	+	+	-	+	d	+	+	-	d	-	-	-	d	+	-	-	-	d	-	-	
ASP	ASPARAGINA	d	d	d	-	d	d	d	d	-	+	+	d	d	-	-	-	-	-	d	-	-	d	d	-	
HIS	HISTIDINA	+	-	-	-	-	d	-	-	+	-	+	-	d	-	-	-	d	-	-	-	-	-	d	d	
LIS	LISINA	d	d	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
PRO	PROLINA	+	-	+	-	d	d	-	+	d	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	d	
SER	SERINA	d	-	-	-	d	d	-	-	+	d	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
TIR	TIROSINA	d	-	d	-	d	d	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	d	-	-	
VAL	VALINA	+	-	d	-	d	d	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	

(+): Crecimiento de las cepas, (-): No crecimiento, (d): Crecimiento escaso.

Evaluación de aminoácidos como fuente de carbono, cepas SB1.

Aminoácido		CEPAS																						
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
ALA	ALANINA	+	+	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	d	-	-	d	d	-	-	-	d	-	-
ARG	ARGININA	+	+	-	-	-	+	d	d	d	-	d	d	d	-	-	d	d	d	-	-	+	-	-
ASP	ASPARAGINA	+	+	-	-	-	+	d	+	d	+	+	d	d	d	d	+	d	-	-	-	d	-	d
HIS	HISTIDINA	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	d	-	-	-	d	-	-	-	-	-
LIS	LISINA	d	-	-	-	-	+	d	-	+	-	d	d	-	-	-	d	-	d	-	-	+	-	-
PRO	PROLINA	d	+	-	-	-	+	-	d	-	-	d	d	d	-	-	d	d	-	d	-	d	-	-
SER	SERINA	d	-	-	-	-	+	d	+	+	-	d	d	-	-	-	d	-	-	-	-	d	-	-
TIR	TIROSINA	d	d	-	-	-	+	-	d	d	d	d	d	d	-	-	d	-	-	-	-	d	-	-
VAL	VALINA	d	d	-	-	-	+	d	d	+	d	d	d	d	-	-	d	d	-	-	d	+	d	-

(+): Crecimiento de las cepas, (-): No crecimiento, (d): Crecimiento escaso.

Evaluación de aminoácidos como fuente de carbono, cepas SB2.

Aminoácidos		CEPAS													
		1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	13	14	16
ALA	ALANINA	-	-	d	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARG	ARGININA	-	-	d	-	d	d	-	+	d	-	-	d	-	-
ASP	ASPARAGINA	+	+	d	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
HIS	HISTIDINA	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	d	-	-
LIS	LISINA	-	-	-	d	d	-	-	+	-	-	-	-	-	-
PRO	PROLINA	-	d	-	d	-	-	-	-	-	d	-	-	-	d
SER	SERINA	-	d	-	-	-	-	-	d	-	-	-	d	+	-
TIR	TIROSINA	-	+	-	d	-	-	-	-	-	+	-	-	d	d
VAL	VALINA	d	+	-	d	-	-	-	-	-	-	d	-	d	d

(+): Crecimiento de las cepas, (-): No crecimiento, (d): Crecimiento escaso.

Ensayos de degradación de diversos compuestos por las cepas SB1.

Pruebas de degradación		CEPAS SB1																							
		1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
ALM	ALMIDÓN	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
CAS	CASEÍNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
GEL	GELATINA	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	-	d	+	+	+	+	-	-	-	+	-	
TIR	L-TIROSINA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	
UR	UREA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
NITR	NITRATOS	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ARB	ARBUTINA	+	-	+	+	+	+	-	d	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	d	
ESC	ESCULINA	+	-	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
T-20	TWEEN 20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	+	+	+	d	+	+	+	d	+	
T-80	TWEEN 80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

(+): Degradación, (-): No degradación (d): Degradación débil

Ensayos de degradación de diversos compuestos por las cepas SB1.

Pruebas de degradación		CEPAS SB1																							
		25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
ALM	ALMIDÓN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAS	CASEÍNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL	GELATINA	+	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	nd	+	+	+	+	+	+
TIR	L-TIROSINA	+	+	+	nd	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
UR	UREA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
NITR	NITRATOS	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
ARB	ARBUTINA	+	-	-	-	d	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	d	-	+	-	d	-
ESC	ESCULINA	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
T-20	TWEEN 20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	-	+
T-80	TWEEN 80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+): Degradación, (-): No degradación (d): Degradación débil.

Ensayos de degradación de diversos compuestos por las cepas SB2.

Pruebas de degradación		CEPAS SB2													
		1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	13	14	16
ALM	ALMIDÓN	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
CAS	CASEÍNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL	GELATINA	+	+	+	+	d	+	+	+	-	+	+	+	+	+
TIR	L-TIROSINA	+	+	+	d	d	+	+	+	-	+	+	+	+	+
UR	UREA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NIT	NITRATOS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
ARB	ARBUTINA	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
ESC	ESCULINA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T-20	TWEEN 20	+	+	+	d	d	+	+	d	-	+	+	+	+	+
T-80	TWEEN 80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

(+): Crecimiento de las cepas, (-): No crecimiento, (d): Crecimiento escaso.

Producción de las enzimas catalasa y oxidasa por las cepas en estudio.

Cepas SB1

	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
CATALASA	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
OXIDASA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+

	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	
CATALASA	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
OXIDASA	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Cepas SB2

	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	13	14	16
CATALASA	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
OXIDASA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+): Producción de la enzima (-): No produce la enzima.

Crecimiento en diversos pH para las cepas SB1 y SB2.

pH	CEPAS SB1																								
	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
4.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5.5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
8.0	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	
9.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

pH	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8.0	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
9.5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

pH	CEPAS SB2															
	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	13	14	16		
4.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
5.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-		
7.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
8.0	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-		
9.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

(+): Crecimiento de las cepas, (-): No crecimiento

Crecimiento de las cepas en diferentes concentraciones de NaCl.

NaCl %	CEPAS SB1																								
	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
1.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3.0	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	
5.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

NaCl %	CEPAS SB1																							
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	
1.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3.0	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	
5.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

NaCl %	CEPAS SB2															
	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	13	14	16		
1.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+		
3.0	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-		
5.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
7.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

(+): Crecimiento de las cepas, (-): No crecimiento.

Crecimiento en diferentes temperaturas con las cepas SB1 y SB2

Temperatura °C	CEPAS SB1																								
	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
4.0	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12	-	-	-	+	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
44	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Temperatura °C	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
4.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
44	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

CEPAS SB2

Temperatura °C	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	13	14	16
4.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
44	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-

(+): Crecimiento de las cepas, (-): No crecimiento.

ANEXO 3.

HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA (FISH)

1. FIJACIÓN DE LAS MUESTRAS Y PREPARACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS

Reactivos:

- Paraformaldehído (en polvo)
- NaOH 1 M
- 10X PBS (1.3 M NaCl, 70 mM Na₂HPO₄, 30 mM NaH₂PO₄, pH: 7.2)
- HCl
- Agua destilada
- Etanol 100%
- Sulfato Crómico potásico KCr(SO₄)₂ (10%)
- EDTA lizozima para permeabilización celular (0.1 mg/ml lizozima en 100 mM Tris-HCl y 50 mM EDTA pH 8.0)

Material.

- Portaobjetos con capa de teflón y seis pocillos de 8 mm de diámetro.
- Gelatina.
- Agua destilada y Milli Q estériles.
- Tubos tipo Falcón de 50 ml.

Protocolo

1.1 Preparación del Tampón de fijación

- Calentar 40 ml de agua destilada a 55-65 °C.
- Añadir 2 g de paraformaldehído y 150 µl NaOH 1 M.
- Mantener a 55-65 °C hasta la completa disolución del paraformaldehído (agitar de vez en cuando).
- Añadir 5 ml de 10 X PBS.
- Ajustar el pH a 7.2-7.4 con HCl y enrasar a 50 ml con agua destilada.
- Guardar en la nevera y usarlo siempre fresco (mantener máximo dos días en la nevera para evitar la autofluorescencia).

1.2 Fijación de cultivos puros y muestras de lagos

- Mezclar unos 200 µl de cultivo/muestra (+/-10⁹ cel/ml= con 600 µl de tampón de fijación (1:3 V/V).
- Incubar 3-16 h a 4 °C.
- Lavar dos veces con 1X PBS (resuspender-centrifugar-resuspender-centrifugar) a 12000 rpm/5min a 4 °C.
- Resuspender en 300 µl de 1X PBS y 300 µl de etanol.
- Guardar a -20 °C (se mantienen entre 3 meses y 1 año sin problemas).

1.3 Fijación de muestras de suelo o sedimentos

- Mezclar aproximadamente 1 g de tierra con 5 ml de tampón de fijación.
- Incubar 3-16 h a 4 °C.
- Lavar dos veces con 1X PBS.
- Resuspender en 500 µl de 1X PBS y añadir 500 µl de etanol.
- Guardar a -20 °C (se mantiene entre tres meses y 1 año sin problemas).

1.4 Preparación de portaobjetos

- Preparar gelatina al 0.1% en 50 ml de agua calentando a 60 °C. Añadir 0.01% de sulfato crómico de potasio (0.05 g de gelatina en 50 ml de agua y 50 µl de sulfato crómico potásico).
- Mezclar y utilizar inmediatamente introduciendo los portaobjetos durante unos momentos.
- Secar los portaobjetos verticalmente sobre un trozo de papel secante.

1.5 Aplicación de las muestras en los portaobjetos

- Aplicar 5 µl de la muestra fijada en cada pocillo y dejarlo secar durante al menos 2 h a temperatura ambiente (o 20 minutos a 37 °C).
- Se puede realizar un paso de permeabilización de células con 30 ml de EDTA-Lisozima en cada pocillo e incubando 20 min. en hielo (cuarto frío), (el tiempo de la enzima depende del microorganismo a evaluar).
- Lavar con agua destilada.
- Deshidratar secuencialmente en etanol (50, 70, y 100%, 3 minutos cada uno).

2. HIBRIDACIÓN CON SONDAS MARCADAS CON FLUOROCROMOS

Reactivos

Tampón de Hibridación

- 180 µl de NaCl 0.9 M.
- 20 µl Tris-HCl 1M, pH 7.4
- 1 µl SDS 10%
- X µl de formamida (en función de la astringencia requerida en cada caso, ver Tabla 1)
- Agua milli-Q hasta 1 ml

Tampón de Lavado

- X µl NaCl 5 M (en función del porcentaje de formamida usado, ver Tabla 1)
- 1 ml de 1 M Tris-HCl pH 7.4
- 0.5 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0
- 50 µl SDS 10%
- Enrasar a 50 ml con agua milliQ

Sondas

Sondas marcadas con fluorocromos (Cy3, Cy5.5, fluoresceína)

DAPI (4'-6'-Diamidino -2-phenylindole 2HCL) 10 mg/ml (=0.001%)

Tabla 1. Utilización de la formamida

% de formamida en tampón hibridación	NaCl (mM)	NaCl 5M (μl)
0	900	8900
5	636	6260
10	450	4400
15	318	3080
20	225	2150
25	159	1490
30	112	1020
35	80	700
40	56	460
45	40	300
50	28	180
55	20	100
60	14	40

Hibridación

- Aplicar 9 μl de tampón de hibridación a cada pocillo.
- Seguidamente aplicar 25-50 ng de sonda a cada uno ($V=1 \mu\text{l}$) y 1 μl de la solución de DAPI 0.001% anteriormente preparada.
- Incubar la preparación a 46°C durante mínimo dos horas en condiciones de humedad (es importante que no se sequen los pocillos y mantener el portaobjetos horizontal para evitar las mezclas de los contenidos de los distintos pocillos).

3. LAVADO

- Colocar el portaobjetos dentro de un tubo Falcón con tampón de lavado previamente precalentado a 48°C e incubar 20 minutos.
- Sacarlo con cuidado usando pinzas y lavar con agua destilada.
- Dejar secar los portaobjetos inclinados sobre un papel secante.

4. OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO

Reactivos

- Solución de gelvatol.
- Cubreobjetos.
- Aceite de inmersión.
- Microscopio de epifluorescencia o microscopio confocal, equipado con los filtros correspondientes a los fluorocromos que se están utilizando.

Protocolo

- Para minimizar la pérdida de fluorescencia las preparaciones se montan en gelvatol (una gota de gelvatol entre el portaobjetos y el cubreobjetos).
- Observar primero cada campo con el filtro correspondiente al fluorocromo que se esté utilizando y posteriormente (si se ha utilizado) con el DAPI para evitar la pérdida de fluorescencia (bleaching) del fluorocromo mientras se observa con DAPI.