



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de posgrado

**RESPUESTA DE LA SUPERFICIE CELULAR DE LA
BACTERIA PROMOTORA DE CRECIMIENTO DE PLANTAS
Azospirillum spp. A ESTIMULOS EXTERNOS.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Ecología)

p r e s e n t a

Thelma Rosa Castellanos Cervantes

La Paz, B.C.S. Abril 1998

Tesis de doctorado en ciencias
En el uso manejo y preservación de los recursos naturales

Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Comité tutorial

Tutor principal: Dr. Yoav Bashan
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste CIBNOR
Co-tutor: Dr. Felipe Ascencio Valle
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste CIBNOR
Co-tutor: Dr. Fernando García Carreño
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste CIBNOR
Co-tutor: Dr. Federico Sánchez
Instituto de Biotecnología, UNAM
Co-tutor: Dr. David Ianson
Portland, Oregon, USA

Comité revisor de tesis

Dr. Yoav Bashan
Dr. Felipe Ascencio
Dr. Fernando García
Dr. Federico Sánchez
Dr. David Ianson

Miembros del jurado de examen doctoral

Dr. Yoav Bashan
Dr. Felipe Ascencio
Dr. Fernando García
Dr. Federico Sánchez
Dr. David Ianson



Dr. Sergio Hernández Vázquez
Coordinador del Programa de Estudios de Posgrado

Agradecimientos

El presente trabajo se llevo a cabo en el departamento de Microbiología y Patología Marina del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. y el departamento de Biología Molecular de Plantas en el Instituto de Biotecnología, Cuernavaca.

Agradezco a CONACYT por la beca # 87149, y al CIBNOR por la extensión de beca otorgadas.

Mi más sincero agradecimiento a los miembros de mi comité tutorial: Dr. Yoav Bashan, Dr. Felipe Ascencio, Dr. Federico Sánchez, Dr. Fernando García y Dr. David Ianson, por su participación en mi desarrollo como científico.

Mi sincero agradecimiento al Dr. Felix Córdoba por obsequiarme amablemente lectina de maíz, a la Dr. Kay Scheets por proveerme las células en suspensión de maíz y al Ing. Juan Bosco quien me suministró semillas de maíz cada vez que se las solicité.

Tambien quiero agradecer a mis colegas en el departamento de Microbiología especialmente a María Esther Puente, por toda su ayuda y amistad y a Angel Carrillo, y Paty Vázquez.

A todos mis colegas en el departamento de Patología Marina por su excelente apoyo técnico, especialmente a María de Jesús Romero, Ariel Cruz, Arturo Sierra, Adriana Green y Norma Hernández por algunos trucos técnicos y discusiones de resultados.

A todo el personal del laboratorio del Dr. Federico Sánchez y Carmen Quinto, por su excelente colaboración técnica, y un ambiente de trabajo amistoso y divertido, especialmente a Xochitl Alvarado, Gabriel Guillen, Edgar y Armando.

Al Dr. Ellis Glazier por la revisión de la versión en Inglés de esta tesis y al Dr. Felipe Ascencio y Dr. Bertha Arredondo por la version en Español.

A Aldo J. Vargas y Sergio Rosas por el trabajo fotográfico y a Oscar Armendáriz por la edición de las fotografías de los geles.

Finalmente, mi sincero agradecimiento a todas las personas que me ayudaron con mis problemas en computación, especialmente Eduardo Ruíz, Horacio Sandoval y Carlos Pacheco quienes siempre ponían en orden todo lo que la computadora hacia "sin ordenárselo".

A Jose Luis, Adrián y Gabriel

Respuesta de la superficie celular de la bacteria promotora de crecimiento de plantas *Azospirillum* sp. a estímulos externos.

por

Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Departamento de Microbiología, División de Biología Experimental, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) Apartado Postal # 128, La Paz, Baja California Sur, 23000, México.

Esta tesis está basada en los siguientes artículos científicos, los cuales serán referidos en base sus números romanos.

- I Castellanos, T., F. Ascencio, and Y. Bashan. 1997. Cell-surface hydrophobicity and cell-surface charge of *Azospirillum* spp. **FEMS Microbiology Ecology** 24: 159-172.
- II Castellanos, T., F. Ascencio, and Y. Bashan. 1998. Cell-surface lectins of *Azospirillum* spp. **Current Microbiology** 36: 241-244
- III Castellanos, T., F. Ascencio, and Y. Bashan. 1998. Starvation-induced changes in the cell-surface of *Azospirillum lipoferum*. Submitted to **Applied and Environmental Microbiology**.(enviado).
- IV Castellanos, T., F. Ascencio, and Y. Bashan. 1997. Bacterial cel-surface hydrophobicity, charge, and lectins as possible means for the initial attachment of *Azospirillum* spp. to surfaces. **In Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present status and future prospects.** eds. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo and S. Akino. Published by: Hokkaido University, Sapporo, Japan. pp. 389-393.
- V Castellanos, T., F. Sanchez, X. Alvarado, and Y. Bashan. 1988. Initial adsorption of *Azospirillum lipoferum* 1842 and *Azospirillum brasilense* Cd to corn roots visualized by the green fluorescent protein marker. (manuscrito)

Resumen.

Una de las metas más importantes en la agricultura actual, es obtener altos rendimientos en producción. Por esta razón la atención científica se ha enfocado buscar alternativas biológicas que estimulen el desarrollo de las plantas como *Azospirillum*, bacterias de rizosfera fijadoras de nitrógeno conocidas como bacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPB). Sin embargo, la impredecibilidad de la inoculación reclama el estudio para un claro entendimiento de los mecanismos de interacción bacteria-planta, como son la identificación de las estructuras y componentes microbianos involucrados en el proceso de adhesión y colonización. En el presente trabajo se investigó la hidrofobicidad, carga, y lectinas de la superficie celular de *Azospirillum*, así como la afinidad de esta bacteria a lectinas de plantas. Otro aspecto que se investigó fue la sobrevivencia de la bacteria y los cambios de hidrofobicidad, presencia de lectinas, y proteínas en la superficie celular bajo condiciones de estrés nutricional.

Los resultados obtenidos nos muestran que *Azospirillum*, posee una hidrofobicidad media comparada con cepas patógenas humanas. La carga e hidrofobicidad son más altas cuando la bacteria es cultivada en medio sólido que en líquido; tratamientos químicos, térmicos, y enzimáticos cambian la carga y el grado de hidrofobicidad de la superficie celular. Se aisló y se purificó parcialmente una proteína hidrofóbica (hidrofobina) de 43 kDa que es abundante y homóloga en la superficie celular de *A. lipoferum* 1842, *A. brasilense* Cd y *A. brasilense* 245. Se puso de manifiesto la presencia de lectinas en la superficie celular de *Azospirillum* mostrando afinidad por varios carbohidratos principalmente por los mismos que secreta la raíz de maíz. La hidrofobina previamente aislada también presenta afinidad por los mismos carbohidratos. Sin embargo *Azospirillum* mostró muy poca reactividad hacia lectinas de plantas.

Se evaluaron tres regímenes de estrés nutricional y su efecto en las características de la superficie celular de *A. lipoferum* 1842, mostrando que la bacteria sobrevive sin multiplicarse por siete días, la hidrofobicidad decrece inicialmente pero recupera sus valores iniciales entre las 24 y 48 horas dependiendo del medio. El estrés nutricional ocasiona una disminución en la afinidad por manosa y glucosa. Las proteínas de la superficie celular mostraron varios cambios en su concentración sin embargo no se observó inducción de nuevas proteínas, la bacteria de 43 kDa permaneció inalterable durante los primeros días disminuyendo paulatinamente su concentración hasta no ser detectada.

Se realizó la transformación de *A. lipoferum* 1842 y *A. brasilense* Cd para expresar la proteína verde fluorescente y observar la adhesión a raíz de maíz por microscopía confocal. Las primeras bacterias adheridas fueron observadas en pelos radiculares, posteriormente formación de agregados en los pelos radiculares y bacterias en la superficie de la raíz alineándose principalmente entre las células de la epidermis al inicio y posteriormente formando también agregados.

Objetivos

El objetivo general de este estudio es contribuir al conocimiento sobre la interacción entre *Azospirillum* spp. y raíces de maíz.

Los objetivos específicos son:

i) Medir el grado de hidrofobicidad y carga de la superficie celular de cepas representativas del género *Azospirillum* y determinar el efecto de las condiciones de cultivo en la expresión de dichos fenotipos.

ii) Determinar el efecto de compuestos químicos, temperatura y tratamientos enzimáticos en el grado de hidrofobicidad y carga de la superficie celular de cepas de *Azospirillum*.

iii) Aislamiento y caracterización parcial de la(s) proteína(s) hidrofóbicas asociadas a la superficie celular de *Azospirillum lipoferum*.

iv) Detectar la presencia de lectinas en la superficie celular de cepas de *Azospirillum* spp.

v) Cuantificar el efecto del estrés nutricional en la hidrofobicidad, carga, composición protéica y la expresión de la proteína(s) hidrofóbica(s) de la superficie celular de cepas de *Azospirillum*.

vi) Transformación de células de *Azospirillum* spp por la incorporación del plásmido que codifica la expresión de la proteína verde fluorescente para el análisis del proceso de adhesión entre *Azospirillum* spp. y raíz de *Zea mays* mediante microscopía confocal.

Contenido

Agradecimientos	i
Dedicatoria	ii
Prefacio	iii
Resumen	iv
Objetivos	v
1. Introducción General	1
El género de <i>Azospirillum</i>	1
Ecología de <i>Azospirillum</i>	2
Exudados de raíz y su interacción con <i>Azospirillum</i>	3
2. Adhesión	4
Adhesión de <i>Azospirillum</i> a superficies sólidas	5
3. Carga e hidrofobicidad de superficies celulares de bacterias	6
Hidrofobicidad y carga de cepas de <i>Azospirillum</i>	7
4. Lectinas	9
Lectinas bacterianas	9
Lectinas de <i>Azospirillum</i>	10
Lectinas de plantas	11
Receptores de <i>Azospirillum</i> para lectinas de origen vegetal	11
5. Expresión de hidrofobicidad, lectinas y proteínas en <i>Azospirillum lipoferum</i> 1842 bajo condiciones de estrés nutricional	12
6. Adhesión de <i>Azospirillum</i> a raíz de <i>Zea mays</i> (maíz)	14
7. Conclusiones	16
8. Referencias	19

Introducción General.

Una de las metas más importantes en la agricultura actual, es obtener altos rendimientos de producción. Por esta razón la atención científica ha sido enfocada en bacterias que estimulan el crecimiento de plantas como *Azospirillum*. El género *Azospirillum* está comprendida dentro de las bacterias de rizosfera de vida libre fijadoras de nitrógeno y que forma parte del grupo de bacterias que produce efectos benéficos en el crecimiento de plantas, llamadas bacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPB) (Bashan y Holguin 1998).

Existen dos tipos de PGPBs; (i) bacterias que incrementan el crecimiento de las plantas vía supresión de patógenos (Biocontrol-PGPB), y (ii) bacterias que directamente intervienen en el mecanismo fisiológico de la planta, vía excreción de metabolitos de la bacteria como fitohormonas (PGPB).

El género de *Azospirillum* se asocia a muchas especies de pastos incluyendo cultivos importantes como trigo, arroz y maíz, así como a muchas otras variedades de plantas, tales como tomate, algodón, zanahoria y cactus (Bashan and Holguin 1995; 1997a,b). La promoción del crecimiento en plantas ha sido demostrada tanto en experimentos en invernaderos como en cultivos experimentales en el campo; sin embargo, los mecanismos por los cuales dichas bacterias promueve este crecimiento han sido atribuidos a fijación de nitrógeno y producción de auxinas (revisión Bashan y Holguin 1997a; Bashan y Holguin 1997b).

La primera generación de inoculantes de *Azospirillum* están ya en el mercado, sin embargo, los resultados en producción que se han obtenido en campo con la aplicación de dichos biofertilizantes han sido impredecibles y contrastantes (Okon y Labandera-González 1994). No obstante ello, el uso de estas bacterias como inoculantes es de gran interés porque aunque no reemplaza la aplicación de fertilizantes incrementa la habilidad de la planta para aprovecharlo y por lo tanto, se requiere de menos aplicaciones de fertilizante. Como consecuencia, los costos de producción y la contaminación por químicos en suelo se reducen. Estos son dos aspectos importantes que la agricultura enfrenta particularmente en países en desarrollo como México.

La impredecibilidad en la inoculación de cultivos agrícolas con *Azospirillum* reclama el estudio para un claro entendimiento de los mecanismos de interacción bacteria-planta, así como de la identificación de las estructuras y componentes microbianos involucrados en el proceso de adhesión. Este conocimiento puede conducirnos a una mejor tecnología de inoculación así como promover y mejorar la productividad de la planta.

1. El género *Azospirillum*

La primera especie de este género, llamada originalmente *Spirillum lipoferum*, fue aislada de muestras de suelo en Holanda en 1925 (Beijerinck 1925); olvidada por más de cincuenta años, *Azospirillum* fue redescubierta en los setentas cuando se buscaban bacterias fijadoras de nitrógeno en raíces de *Digitaria* y *Zea mays* en Brasil

(Von Bulow y Döbereiner 1975; Day y Döbereiner 1976). Desde entonces, se han aislado cepas de *Azospirillum* asociadas a raíz de numerosas plantas silvestres y cultivadas, así como de diferentes tipos de suelo de todas partes del mundo (Bashan y Holguin 1997). Hasta la fecha, cinco especies han sido caracterizadas dentro del género *Azospirillum*: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, y *A. irakense* (Tarrand et al. 1978; Magalhaes et al. 1983; Reinhold et al. 1987; Khammas et al. 1989).

Azospirillum es un bacilo Gram-negativo de 1 μm de diametro, posee un flagelo peritrico de corta longitud que usa para moverse en enjambre y un flagelo polar que usa para nadar (Zhulin y Armitage 1993). La mayor parte de la célula bacteriana esta llena de gránulos de poli- β -hidroxibutirato (Fallik y Okon 1996). *Azospirillum* prolifera tanto en condiciones aeróbicas como anaerobicas, pero es preferencialmente microaerofílica en presencia o ausencia de N_2 en el medio.

Ecología de *Azospirillum* en el suelo y en la rizosfera.

Azospirillum es una bacteria de amplia distribución, puede ser encontrada en áreas tropicales, en áreas de climas templados y frios (Döbereiner et al. 1976; Haahtela et al. 1981), e inclusive, en tundras y sitios semidesérticos del casquete polar artico (Nosko et al. 1994).

Azospirillum ha sido aislada particularmente de la rizósfera de la superficie de la raíz y en menor grado del interior de la raíz. Se conoce bien su relación con las plantas (Bashan y Holguin 1997 a) pero poco acerca de la amplitud de su nicho ecológico y si es capaz de multiplicarse sin estar asociada a la planta.

En la literatura, existen reportes de que cepas de *Azospirillum* aisladas de suelos pero no de que tan abundante es. En experimentos de campos inoculados con *Azospirillum*, De Coninck et al. (1988) encontró de 10 a 100 veces mas *Azospirillum* en muestras de rizosfera que en muestras de suelo. En Brasil, *Azospirillum* ha sido colectada rutinariamente de muestras de suelo (Baldani et al. 1983), aunque también se ha reportado de que existen áreas en donde difícilmente se encuentra *Azospirillum* (Smith et al. 1984).

La sobrevivencia de *Azospirillum* en suelos ha sido reconocida como una de las preguntas básicas a responder, debido a la inconsistencia de las evidencias reportadas. Recientemente, se evaluó la sobrevivencia de *A. brasilense* Cd y Sp-245 en la rizosfera de plantas de trigo y tomate en 23 tipos de suelos provenientes de un amplio rango de ambientes de Israel y México (Bashan et al. 1995). Sus conclusiones fueron que *A. brasilense* sobrevive pobremente en la mayoría de los suelos por períodos de tiempo prolongados y que fuera de la rizósfera, la cantidad de arena y calcio determinan el grado de sobrevivencia de la bacteria en el suelo. La eliminación de plantas en suelos inoculados con *Azospirillum* afecta directa y rapidamente los niveles de población de la bacteria (Bashan et al. 1995; Bashan et al. 1988).

Estudios sobre la fisiología de la bacteria han sugerido la existencia de alternativas fisiológicas que podrían operar a fin de que *Azospirillum* sobreviva bajo

condiciones ambientales desfavorables, como son enquistamiento, acumulación de poli- β -hidroxibutirato, producción de melanina, o protección dentro de esporas micorrísicas (Del Gallo y Fendrik 1994).

Durante la década de los '70 y 80s, se consideraba que el rango de hospederos de *Azospirillum* era específico para especies de cereales, sin embargo, posteriormente se encontró que abarca el sistema radicular de una variedad amplia de especies vegetales (Bashan et al. 1989b; Crossman y Hill 1987; Mascarua et al. 1988; Hadas and Okon 1987; Puente y Bashan 1993; Rao et al. 1990; Zaady et al. 1993).

Bashan y Holguin (1995) reportaron sobre la habilidad de *A. brasilense* Cd y 245 para colonizar al menos 64 especies de plantas, de las cuales 48 son especies de maleza. Aunque los reportes de aislamiento de *Azospirillum* de plantas gramíneas son más comunes, otros reportes muestran que la bacteria es también habitante natural de muchas plantas no gramíneas, como palmas de coco (George 1990), y contenido en nódulos de tallo y raíz de *Aeschynomene indica*, *A. aspera* (Singh 1992), así como de otras especies de no gramíneas (Gamo y Ahn 1991).

Otros aislamientos curiosos fueron de troncos, vainas y hojas (además de la raíz) de varias plantas gramíneas de campos de cultivo como *Eleusine coracana* y *Setaria italica* (Agarwala-Dutt et al. 1991) y en hojas de plantas de mangle (Chaudhury y Sengupta 1991).

Exudados de raíz y su interacción con *Azospirillum*

Los procesos biológicos que tienen lugar en la rizósfera están influenciados principalmente por los exudados de la planta. Una raíz intacta durante su período activo de crecimiento produce hasta 10 mg de exudados solubles por gramo de peso seco de raíz (Del Gallo y Fendrik 1994). En plantas de maíz, el 65 % del total de exudados son de origen carbohidrato, un 33 % son ácidos orgánicos (principalmente fumárico, oxaloacético y ácido málico) y un 2 % de amino ácidos (Krafczyk et al 1984).

La superficie de la raíz forma la interfase entre la planta, el suelo y los microorganismos del suelo. La cofia de la raíz y posiblemente las células epidermales, producen y secretan un mucílago que cubre la superficie de la raíz y forma un sitio de colonización primaria. Análisis químicos del mucílago secretado por raíces de maíz, indican que está compuesto por monosacáridos de fucosa, arabinosa, xylosa, galactosa y glucosa.

Gochnauer et al.(1990) ha sugerido que las cofias que se desprenden de las raíces están activamente involucradas en el establecimiento de la microflora bacteriana característica de la rizosfera.

Azospirillum es quimotácticamente atraído hacia azúcares, ácidos orgánicos, compuestos aromáticos y amino ácidos presentes en los exudados de raíz; sin embargo, las diferentes especies de *Azospirillum* difieren en su reacción hacia los atrayentes químicos. Por ejemplo, se ha observado que existe una atracción específica de *A. lipoferum* 4B (cepa aislada de raíces de arroz) hacia la rizósfera de arroz pero no es atraída por el mucílago de maíz, mientras *A. lipoferum* B7C (cepa aislada de rizosfera de maíz), es claramente atraída por el mucílago de raíces de maíz. La cepa de *A. brasilense* Sp 7, aislada de *Digitaria*, es más fuertemente atraída por el mucílago

de maíz que la cepa aislada de arroz *A. lipoferum* 4B (Mandinba et al. 1986). *A. brasilense* JM6A2, aislada de raíz de maíz es atraída fuertemente por malato, que esta presente en grandes cantidades en la raíz de maíz (Neyra y Hageman 1976). *A. brasilense* SpT60, aislada de raíz de trigo, es atraída fuertemente por citrato, aspartato y oxalato, siendo este último el ácido orgánico más abundante en los exudados de trigo. *A. lipoferum* ER15 aislado de *Leptochloa fusca* (pasto Kallar), es atraída más fuertemente por malato, el mas abundante ácido orgánico exudado por *L. fusca* (Kloss et al. 1984).

Los exudados de alto peso molecular aislados de *L. fusca* también atraen a *A. lipoferum* ER15 (Reinhold et al. 1985), sin embargo, Fedi et al. (1992) no pudieron detectar ninguna especificidad en la atracción de *Azospirilla* hacia los exudados de las plantas de donde fueron originalmente aisladas. Por lo tanto, la especificidad de cepas de *Azospirillum* en respuestas de quimiotaxis podrían reflejar una adaptación al micromedio ambiente creado por la planta hospedera.

El efecto de quimiotaxis de una substancia no siempre corresponde a la habilidad de la bacteria para metabolizarlo, como lo demuestra Heinrich y Hess (1985) en *A. lipoferum* Sp108 que aunque su mayor atrayente fue sacarosa no puede metabolizarlo.

El mecanismo de salida de protones que opera en raíces de trigo intactas ha sido identificado y cuantificado (Bashan y Levanony 1989). Inoculación de raíces de trigo con *A. brasilense* Cd alteran significativamente su estructura por raíz (Bashan et al. 1989a) y cambia su potencial de membrana. Este flujo de electrones está relacionado con el aumento en la toma de minerales (Okon 1994).

2. Adhesión

Evidencias experimentales han puesto de manifiesto que los microorganismos tienen primero que adherirse a células o tejidos vegetales o animales para poder colonizar. El éxito de la colonización o de la infección dependerá de la habilidad que tenga el microorganismo para adherirse a una superficie sólida. Las estructuras o componentes de los microorganismos que comúnmente están involucrados en el proceso de adhesión son: fimbria, flagelo, lectinas, lipopolisacáridos, hidrofobinas (Ofek y Doyle 1994).

El dogma central de la adhesión bacteriana requiere que el componente, estructura, apéndice, o molécula involucrada (adhesina) funcione en la superficie de la bacteria. En la mayoría de los casos, las adhesinas están ensambladas en la superficie celular, aunque en algunos casos las adhesinas son inicialmente secretadas y posteriormente se asocian a la superficie de la bacteria en un mecanismo que responde a transporte de nutrientes (Tuomanen 1986). En cualquiera de los dos casos, la adhesina debe acoplarse o anclarse en la superficie de la bacteria antes de poder participar en un proceso de adhesión o de comunicación celular. Debido a que la adhesión es una propiedad de la mayoría de las bacterias, especialmente de aquellas especies colonizadoras de tejidos, se deduce que la

evolución ha seleccionado estructuras específicas que funcionan como factores de adhesión o receptores celulares (Ofeck y Doyle 1994).

Adhesión de *Azospirillum* a superficies sólidas.

Se ha sugerido que la unión de *Azospirillum* a raíces involucra dos fases distintas: adsorción y anclaje (Michiels et al. 1991). Sin embargo, no está claro como se lleva a cabo la adhesión inicial o adsorción de *Azospirillum* a raíces de pastos u otras plantas, aunque la etapa de anclaje está mucho mejor caracterizada (Gafny et al. 1986; Umali Garcia et al. 1980; Assmus et al. 1995; Bashan et al. 1986; Reinhold et al. 1985; Michiels et al. 1991). Componentes de la cápsula de la bacteria como glicoproteínas, polisacáridos y organelos como fimbria y flagelo se supone están involucrados en los procesos de anclaje (Bashan y Levanoy 1988, b, c; Del Gallo et al. 1990; Sadasivan y Neyra 1985; De Torch y Vanderlayden 1996; Madi et al. 1988). Los polisacáridos fueron las primeras moléculas que se reportaron como candidatos involucrados en los procesos de adhesión de *Azospirillum* a tejidos vegetales, e inclusive, para formar agregados celulares de ella misma bajo ciertas condiciones de cultivo en medios ricos en fructosa como fuente de carbono y KNO_3 como fuente de nitrógeno (Sadasivan y Neyra 1987). Los autores creen que está relacionado con la producción de polímeros exocelulares, particularmente β - polisacáridos y que posiblemente también estuvieran involucrados en la adhesión a otras superficies.

Posteriormente, Madi y Henis (1989) encontraron que compuestos de naturaleza protéica estaban involucrados en procesos de adhesión celular, al observar *A. brasilense* Cd forma agregados conectados por proteínas.

Por otro lado, se determinó que tratamientos de *A. brasiliense* con enzimas proteolíticas y agentes como EDTA, disminuyen la adhesión a raíces de maíz (Gafny et al. 1986), hecho que sugiere también que los componentes de la superficie celular de la bacteria que están involucrados en el proceso de adhesión son de naturaleza protéica.

Bashan y Levanony (1988 a, b) sugieren que la adsorción de *A. brasilense* Cd a arena de cuarzo es un proceso débil y activo, posiblemente llevado a cabo vía puentes de proteínas producidas por la bacteria y controlado usualmente por la cantidad de nutrientes disponibles (Bashan et al. 1991). Bashan y Holguin (1993) también encontraron que *A. brasilense* Cd se une en significativamente mayor número a raíces de trigo que a poliestireno.

Del Gallo y Haegi (1990) llevaron a cabo la caracterización de exopolisacáridos en *A. brasilense* y *A. lipoferum*, encontrando que estos polisacáridos sirven como receptores para lectinas de plantas como aglutinina de germen de trigo (WGA) (Del Gallo et al. 1989). Por otro lado, se aislaron de la superficie celular de *A. brasilense* dos compuestos (nombrados lipopolisacárido-proteína y polisacárido-lípido) que ocasionan deformación de pelos radiculares en plantulas de trigo vía unión a WGA, (Skvortsov et al. 1995).

Michiels et al. (1991) han propuesto que existen dos etapas diferentes de adhesión de *A. brasilense* a raíces de trigo. La primera etapa (llamada adsorción) estaría mediada por proteínas, siendo una interacción débil; en tanto que la segunda

etapa (llamada anclaje) es mas fuerte y probablemente mediada por polisacáridos de la superficie celular. Para demostrar esta hipótesis, Michiels et al (1991) obtuvieron dos tipos de mutantes: una, deficiente en la producción de un polisacárido de la superficie de *Azospirillum*, ($Ads^+ Anc^-$) que pierde completamente la capacidad de anclarse; la segunda mutante ($Ads^- Anc^+$), que es deficiente en adsorción, reduce su adsorción en veinte órdenes de magnitud. Posteriormente el mismo equipo de trabajo propuso que el flagelo polar de *A. brasilense* estaba involucrado en el proceso de adhesión mostrando que mutantes no móviles reducen drásticamente la adhesión a raíces de trigo (Cross et al. 1991, 1993).

3. Carga e hidrofobicidad de superficies celulares de bacterias.

La adhesión de bacterias a raíces de plantas puede ser dividido en dos clases de mecanismos generales: (1) adhesión no específica, la cuál es mediada por interacciones hidrofóbicas, electrostáticas, o fuerzas de Vander Vals y (2) adhesión específica, la cual es mediada por estructuras, componentes o moléculas (adhesinas) localizadas en la superficie celular de la bacteria y que reconoce receptores en la superficie celular de la planta (Rosenberg y Doyle 1990).

Sin embargo, el segundo tipo de adhesión no excluye la posible importancia de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas entre adhesina y receptor. Interacciones específicas pueden ser subsecuentemente divididas en adhesión huésped específica y adhesión huésped no específica. En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos de los diferentes tipos de adhesión.

Tabla 1.

Bacteria	Asociada a	Proceso	Referencia
<i>R.leguminosarum</i> <i>bv trifolii</i>	Trébol	Huésped específica	Downie et al. 1983
<i>R.leguminosarum</i> <i>bv viciae</i>	Chícharo, lenteja	huésped no específica	Smit et al. 1986
<i>Klebsiella</i> <i>Enterobacter</i>	Pastos	Inespecífica unión hidrofóbica	Korhonen et al. 1983 Haahtela et al. 1985, 1986
<i>P. syringae</i> <i>Patógena</i>	Frijol	receptor específico para fimbria en la estomata	Romanschuk y Bamford 1986

Los métodos mas utilizados para determinar el grado de hidrofobicidad bacteriana incluye entre otros (Rosenberg y Doyle 1990; Ofek y Doyle 1994) adhesión microbiana a hidrocarburos como hexadecano, octano o xileno (MATH); medición del ángulo de contacto (CAM) que puede ser usado en capas de bacterias lo

más homogéneas, planas, suaves y secas; sistema de partición en dos fases acuosas (TPP) usualmente dextrán-polietilenglicol (descrito en publicación I); cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) que mide adsorción a octil o fenil-Sepharosa que originalmente fue desarrollada para separación de proteínas y la prueba de agregación celular por sulfato de amonio (SAT).

Tales pruebas de hidrofobicidad pueden separarse en dos categorías: la primera categoría mide las propiedades hidrofóbicas de la superficie celular externa del microorganismo, estas pruebas incluyen CAM y TPP. La segunda categoría mide la hidrofobicidad de la bacteria en términos de adhesión celular. Estas técnicas incluyen MATH, HIC y adhesión a superficies de poliestireno u otras superficies sólidas hidrofóbicas. Técnicas como SAT en las que las sales como el sulfato de amonio son usados para inducir agregación de células en suspensión, están consideradas entre ambas categorías.

Debido a que algunas técnicas miden la hidrofobicidad completa de la célula y otras solo algunos parches hidrofóbicos expuestos en la superficie celular, ciertos tipos de bacterias como *E.coli*, analizada por diferentes pruebas no dan los mismos resultados (Rosemberg 1984). Una bacteria cuya envoltura celular neta no sea hidrofóbica, por ejemplo, que posea fimbrias hidrofóbicas puede resultar hidrofóbica si se analiza por MAT, HIC y positiva a la prueba de adhesión a superficies de poliestireno, pero resultaría no hidrofóbica si se analiza por técnicas como CAM o TPP. Así mismo, bacterias que tienden a autoagregarse podrían dar valores desproporcionadamente altos de hidrofobicidad en técnicas como SAT comparadas con otras (Rosemberg y Kjelleberg 1986).

Debido a que las bacterias tienen generalmente una carga neta negativa en la superficie celular, podría esperarse que existiera una correlación inversa entre carga de la superficie e hidrofobicidad. Conforme la carga se incrementa, más baja la hidrofobicidad. Sin embargo, frecuentemente se encuentra que entre más electronegativa sea la bacteria, más alto el grado de hidrofobicidad se observaría (Rosemberg y Doyle 1990).

Hidrofobicidad y carga de cepas de *Azospirillum*.

En el presente trabajo de investigación usamos el método de partición de dos fases, en un sistema acuoso de polietilenglicol-dextrán (Johansson 1974) para determinar la hidrofobicidad y carga de la superficie celular de las bacterias. Se seleccionó esta técnica debido a que deseábamos conocer la hidrofobicidad de la célula completa; otra razón para usar este método es que las bacterias no son sometidas a ninguna condición severa. Sin embargo, es una de las técnicas menos utilizadas. Se determinaron las propiedades hidrofóbicas y de carga de diez cepas de *Azospirillum* spp. Los resultados obtenidos muestran que bajo las condiciones de cultivo utilizadas, la hidrofobicidad de la superficie celular de las cepas es moderada comparada con *Vibrio cholerae* (Faris et al. 1982), observando también, que tanto el grado de hidrofobicidad como de carga neta de la superficie celular de *Azospirillum* son dependientes de las condiciones de cultivo (Publicación I y IV). En general, los valores de carga e hidrofobicidad aumentaron cuando las bacterias fueron cultivadas

en medio sólido. Las cepas de *A. brasiliense* fueron mas homogéneas en su comportamiento que las cepas de *A. lipoferum*. Las superficies celular de *A. halopraeferans* y *A. irakense* no mostraron un carácter hidrofóbico ni una carga neta negativa independientemente del medio de cultivo utilizado.

En adición, ambos parámetros tienen la tendencia a incrementarse cuando la bacteria es sometida a condiciones de estrés nutricional (Publicación III).

Adicionalmente, se empleó cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) para separar las proteínas hidrofóbicas de la superficie celular de *Azospirillum* (Publicación I). Se obtuvieron anticuerpos policlonales de conejo y ratón contra una proteína aislada por HIC.

Con esta técnica aislamos una proteína hidrofóbica que es abundante y homóloga en la superficie celular de cepas de *A. lipoferum* 1842, *A. brasiliense* Cd y *A. brasiliense* Sp 245. Esta proteína no pudo ser secuenciada debido a que está bloqueada en su parte amino terminal, sin embargo una fracción interna de la proteína, generada por digestión enzimática, se pudo secuenciar, indicándonos la presencia de varios amino ácidos hidrofóbicos (Publicación I y III).

Bachhawat y Ghosh (1987) encontraron una proteína en la superficie celular de 42 kDa que constituye aproximadamente el 60 % del total de la membrana externa de *A. brasiliense* RG. No sabemos si estas dos proteínas son similares ya que hay pocos datos para comparar, las únicas similitudes es que son abundantes y su peso molecular. La abundancia así como la confirmación de la presencia de esta proteína en la superficie celular de *A. lipoferum* 1842, *A. brasiliense* Cd y Sp245, mediante análisis por Western blot, podría sugerirnos la presencia de una proteína constitutiva en el género *Azospirillum*.

Comparando los resultados de hidrofobicidad que obtuvimos con los dos trabajos reportados en la literatura tenemos que en un estudio previo se midió la hidrofobicidad de *A. brasiliense* Cd en un sistema de partición de dos fases agua: n-hexano y fue reportada como relativamente no-hidrofóbica, aunque en la presencia de cetrimida (bromuro de hexadecil-trimetil), la hidrofobicidad aumenta (Arumakumari et al. 1992).

Recientemente Dufrêne y Rouxhet (1996), reportaron sobre el incremento de hidrofobicidad en *A. brasiliense* Sp7 cuando es cultivada en un medio nutritivo Luria-Bertani, así mismo, encontraron una correlación en cuanto a hidrofobicidad y la adhesividad de las células a vidrio y poliestireno. Arumakumari et al. 1992 encontraron mediante un análisis de partición en dos fases (agua; n-hexano), que *A. brasiliense* Cd es no hidrofóbico, sin embargo, cuando se cultivan en el mismo medio de cultivo pero en presencia de cetrimida (bromuro de hexadecil-trimetil) la bacteria adquiere un carácter hidrofóbico.

Es difícil comparar estos resultados de hidrofobicidad con los nuestros por varias razones: i) en ambos estudios sólo se analizó una cepa de *Azospirillum* y no fué la misma, Arumakumari et al. 1992 usaron *A. brasiliense* Cd, y Dufrêne y Rouxhet, *A. brasiliense* Sp7. Nosotros usamos 10 cepas y mostramos que la hidrofobicidad, además de depender del medio de cultivo, también era cepa dependiente. ii) Los métodos utilizados fueron diferentes Arumakumari et al. 1992 utilizaron adhesión a hidrocarbano (hexadecano), un método (MATH) y Dufrêne y Rouxhet usaron el método

de ángulo de contacto (CAM), en tanto que nosotros utilizamos el sistema de partición en dos fases acuosas (TPP).

Sin embargo hay algunas concordancias, Arumakumari et al. 1992 reportaron a *A. brasilense* como relativamente no hidrofóbica, nosotros también observamos lo mismo en varias cepas cuando eran cultivadas bajo ciertas condiciones de cultivo; la presencia de cetrimida en el medio de cultivo favorece un aumento de la hidrofobicidad, nosotros observamos también el mismo efecto en *A. brasilense* y algunas otras cepas cuando agregamos químicos con el mismo efecto que cetrimida (Publicación I). Dufrêne y Rouxhet mostraron incremento en hidrofobicidad durante el crecimiento obteniendo el máximo a las 25 h. Nosotros obtenemos la misma tendencia cuando medimos la hidrofobicidad de *A. lipoferum* 1842 a varios tiempos, aunque en un medio de cultivo pobre en nutrientes (Publicación IV). En ninguno de los tres estudios *Azospirillum* muestra una hidrofobicidad alta.

Los anticuerpos policlonales que se obtuvieron a partir de la hidrofobina aislada de cepas de *Azospirillum* fueron subsecuentemente utilizados en varios experimentos; i) inmunoblots de extractos de proteínas de la superficie celular de *A. lipoferum* 1842, *A. brasilense* Cd, *A. brasilense* Sp245. ii) Wester blots de geles de doble dimensión en el análisis de proteínas de superficie celular de *A. lipoferum* en condiciones de estrés nutricional (Publicación III), y iii) en adhesión de *Azospirillum* a raíces de *Zea mays* (Publicación V).

4. Lectinas.

Las lectinas están definidas como proteínas que aglutinan células y tienen especificidad por ciertos azúcares. Por muchos años, investigadores buscaron lectinas exclusivamente en plantas. En las últimas décadas, las lectinas se han encontrado en una gran variedad de organismos que incluyen toda la escala vegetal y zoológica incluyendo bacterias, hongos, levaduras, parásitos y virus. Entre las lectinas más ampliamente estudiadas están concanavalina A, aglutinina de germen de trigo (WGA), lectina de soja, lectina de lenteja y lectina de *Helix pomatia* (para revisión ver Liener et al. 1986).

Lectinas bacterianas.

Se ha sugerido que proteínas con propiedades tipo lectina, encontradas en superficies de bacterias, pueden servir como moléculas de adhesión (adhesinas) que unen a la bacteria con células epiteliales (Ofek 1977). Las adhesinas de muchos microorganismos patógenos de humanos se piensa que son proteínas tipo lectinas que se reconocen carbohidratos de las células epiteliales del huésped (Duguid y Old 1980; Nilsson et al. 1983; Saitoh et al. 1991). Aunque algunos miembros del género *Staphylococcus* y *Streptococcus* parecen expresar adhesinas que carecen de actividad de lectina, otros miembros de los mismos géneros se sabe que poseen adhesinas en la superficie con función de lectina (Levine et al. 1978). Las lectinas que tienen función de adhesinas puede estar asociadas con la pared celular, la membrana externa, o con estructuras de fimbria (Aly y Levit 1987; Duguid et al 1976; Layh-Schnitt et al. 1989).

Lectinas en *Azospirillum*

La existencia de lectinas en la superficie celular de *Azospirillum* no ha sido reportada previamente. Aunque se sabe que *Azospirillum* es capaz de interactuar con lectinas de plantas como la aglutinina de gérmen de trigo (Antoyuk et al. 1995; Karpati et al. 1995) y lectina de arroz (Tabary et al. 1984).

En este estudio, analizamos siete cepas de *Azospirillum* para detectar la presencia de lectinas en la superficie celular que pudieran estar involucradas en facilitar la adhesión de la bacteria a la raíz de plantas. La presencia de lectinas fué determinada por el método de aglutinación de partículas de látex cubiertas con neoglicoproteínas, en tanto que su especificidad se determinó mediante pruebas de inhibición de la aglutinación con monosacáridos y confirmada por Western blot utilizando neoglicoproteínas (albúmina bovina-carbohidrato) marcadas con peroxidasa de rábano.

Nuestros resultados indican que *Azospirillum* spp. tiene varias proteínas con afinidad por los carbohidratos de diferentes neoglicoproteínas, tales como BSA-fucosilamida, BSA-glucosilamida, BSA-galactosamida, BSA-N-acetil β -D-glucosamina, N-acetil D-manosa (Publicación II). Es importante señalar que *Azospirillum* presentó, mayor reactividad a fucosa, glucosa y manosa, que son los monosacáridos más abundantes exudados por las raíces de *Zea mays* (Bacic et al. 1986). Varias raíces de plantas secretan los mismos monosacáridos aunque no en las mismas proporciones que maíz. Estas lectinas le confieren a *Azospirillum* la posibilidad de adherirse a una gran variedad de plantas (para revisión de plantas a las que se puede adherir: Bashan y Holguin 1997).

Los resultados sobre la especificidad de las lectinas de *Azospirillum*, mediante pruebas de inhibición de aglutinación de las microesferas de latex cubiertas con neoglicoproteínas, fueron variables entre las tres cepas seleccionadas (*A. brasilense* Sp245, *A. lipoferum* 1842, y *A. lipoferum* 779). Completa inhibición de la aglutinación de *A. brasilense* Sp245 con las cinco neoglicoproteínas probadas se logró solo con arabinosa. Otros monosacáridos inhiben la aglutinación solo por D-manopiramosa, N-acetil- β -D-galactosamina y N-acetil- β -D-glucosamina. En las dos cepas de *A. lipoferum*, la inhibición de aglutinación se debe a la presencia de N-acetil- β -D-galactosamina y N-acetil- β -D-glucosamina.

Análisis por Western blot de proteínas de la superficie celular de *A. lipoferum* 1842 y la hidrofobina de 43 kDa parcialmente purificada de *A. lipoferum* 1842, revelan que HRP-BSA-galactosamida, HRP-BSA-manopiranososa, y HRP-BSA-fucosamida se unen fuertemente a la proteína inmovilizada de 43 kDa de *A. lipoferum* 1842 y en menor grado, se unen a proteínas de diferentes masas moleculares de los extractos totales de *A. lipoferum* 1842, *A. brasilense* Sp245 y Cd, lo que nos indica que *Azospirillum* spp. puede interactuar con varios residuos de carbohidratos. Así mismo, estos experimentos, utilizando neoglicoproteínas marcadas, revelan la presencia de varias lectinas en la superficie celular de *Azospirillum*, lo que significaría que

Azospirillum está capacitado para reconocer diferentes residuos de carbohidratos en superficies radiculares.

Lectinas de plantas

Una gran variedad de lectinas de plantas han sido aisladas, las cuales han probado ser herramientas útiles en el estudio de proteínas, glicoproteínas, glicolípidos y polisacáridos, en estudios sobre la arquitectura de células animales (Nicolson 1974; Rapin y Burger 1974). También, las lectinas de plantas han sido utilizadas como un importante método para tipificar cepas bacterianas en estudios epidemiológicos (Ascencio et al. 1990).

Se ha sugerido que las lectinas de plantas están involucradas en interacciones planta-bacteria. La interacción más estudiada es la de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* - trébol, en donde el proceso de adhesión se propone está mediado por una lectina de planta trifolin A (Dazzo 1984; Kijne et al. 1992).

Trabajos sobre el papel que juegan las lectinas en la interacción *Azospirillum* y plantas ha sido muy reducido. Yagoda-Shagam et al. (1988) llevaron a cabo un estudio sobre la interacción de siete lectinas de plantas con células de *A. brasilense* Sp7 mediante análisis de citometría de flujo y de aglutinación bacteriana con lectinas marcadas con isotiocianato de fluoresceína. Los resultados obtenidos indicaron que la capacidad de unión más alta fue para la aglutinina *Griffonia simplicifolia* II (específica para N-acetil-glucosamina), seguida por *Griffonia simplicifolia* I (específica para α -D-galactosa), *Triticum vulgare* (específica para N-acetilglucosamina), *Glycine max* (específica para N-acetil galactosamina), *Concanavalina ensiformis* (específica para α -D-manosa y α -D-glucosa), *Limax flavus* y *Lotus tetragolobus* (específicas para α -L-fucosa). En otros estudios con la lectina de *Triticum vulgare* (WGA), se encontró que la presencia de la lectina en cultivos con *A. brasilense* Sp245 favorecen un incremento en la fijación de nitrógeno, excreción de amonía, producción de ácido indol acético y biosíntesis de proteínas en las bacterias. Los autores proponen que WGA puede servir como una molécula de señal en la interacción *Azospirillum*-trigo incrementando los dos procesos que son más significativos para la promoción del crecimiento de la planta (fijación de nitrógeno y producción de fitohormonas) (Antonyuk et al. 1995). Por otro lado, se ha encontrado que *A. lipoferum* SpBr17 expresa dos receptores a nivel de cápsula, una proteína-glicoproteína de 25 kDa y un complejo protéico de aproximadamente 100 kDa, que pueden interactuar con la WGA. (Karpati et al. 1995).

Receptores en *Azospirillum* para lectinas de origen vegetal

En el presente trabajo, se evaluó la afinidad de 21 lectinas de plantas a cuatro cepas de *A. lipoferum* y tres cepas de *A. brasilense*. Los resultados mostraron que ninguna de las cepas de *A. brasilense* tienen afinidad por el panel de lectinas ensayados, sólo tres de las cepas de *A. lipoferum* mostraron ligera afinidad con cuatro de las lectinas probadas las cuales fueron *Crotalaria juncea*, *Concanavalina A*, *Helix*

pomatia, y *codium fragile* (ver Tabla 1, Anexo 1). La especificidad de la interacción lectina-*Azospirillum* se evaluó mediante experimentos de inhibición, utilizando monosacáridos en solución obteniéndose aglutinaciones exactamente en orden decreciente a sus afinidades, las cuales fueron, para *C. juncea* galactosa> lactosa> melobiosa>L-rafinosa>N-acetil-galactosamina, para *Con A*, manosa y glucosa y para *H. pomatia* N-acetil galactosaminatambien se realizaron experimentos tratando a las bacterias que mostraron aglutinación con químicos que alteran los carbohidratos (Tabla 2 y 3 Anexo 1).

Debido a que *A. lipoferum* 1842 fue originalmente aislada de raíces de maíz, teníamos particular interés en el posible reconocimiento de la lectina de maíz. Basándonos en el hecho de que *A. lipoferum* SpBr17 se aisló de raíces de maíz y debido a que reconoció específicamente la lectina de trigo, podría existir la posibilidad de que reconociera específicamente a la lectina de maíz.

Lectinas de *Zea mays* (maíz) no han sido estudiadas a profundidad como se ha hecho con lectinas de otros cereales de importancia económica como trigo, arroz y cebada. Solo cuatro reportes en lectinas de maíz se conocen (Markow and Khavkin 1982; Newburg y Cocon 1985; Lepekhin et al. 1986; Jankovic et al. 1990). Recientemente, Martinez et al. (1993) y Merida et al. (1996) aislaron y purificaron una lectina de maíz. Nosotros usamos esta misma lectina para evaluar su posible afinidad *A. lipoferum*, mediante técnicas de microscopía de fluorescencia y de aglutinación celular (Fig. 1, Anexo 1). Nuestros resultados indicaron que la lectina se pega a la bacteria, sin embargo, no es capaz de provocar una aglutinación celular. Similares resultados fueron observados con la lectina de trigo en *A. lipoferum* SpBr17 (M. Del Gallo, E. Karpati comunicación personal). No obstante, los experimentos de inhibición en donde las bacterias fueron incubadas con lactosa, resultaban en una inhibición parcial de la adhesión de la lectina a la bacteria.

5. Expresión de hidrofobicidad, carga y lectinas en *Azospirillum lipoferum* 1842 bajo condiciones de estrés nutricional.

No obstante que se ha avanzado en algunos campos de la fisiología y genética del género *Azospirillum*, aun quedan varios aspectos de su fisiología que no han sido abordados, como es el caso de la expresión fenotípica bajo condiciones de estrés nutricional, condiciones de lento crecimiento, o factores ambientales que asemejen mas las condiciones de su vida natural.

Las características especiales y mecanismos adaptativos que las bacterias han desarrollado para persistir en temporal o crónico medioambiente desprovisto de nutrientes, es un tema científico con muchas implicaciones para la investigación microbiológica tanto básica como aplicada. Por ejemplo, dentro del campo de biotecnología industrial, los mecanismos reguladores que son inducidos durante estados de estres nutricional, podrían ser explotados para la producción y aislamiento de metabolitos o proteínas de la fase de crecimiento (Tuner et al. 1992).

En aplicaciones como desintoxicación o remediación *in situ*, tratamientos de aguas residuales, etc. se demanda el monitoreo, predicción y control de la

sobrevivencia y dispersión de microorganismos y genes modificados en el ecosistema natural, por lo tanto se requiere de conocimiento acerca de los cambios a los que están expuestos y los mecanismos por los cuales sobreviven.

Dado nuestro interés de utilizar *Azospirillum* como inoculante en campos agrícolas, resulta fundamental conocer cual sería el comportamiento fisiológico de la bacteria a condiciones de estrés nutricional a fin de asegurar una alta sobrevivencia de la bacteria en las condiciones de cultivo y de que se pueda adherir, establecer y colonizar las plantas de cultivo.

Se sabe que *Azospirillum* sobrevive bien en suelos tropicales (Döbereiner et al. 1976), y probablemente también en suelos templados (De Coninck et al. 1988) y semiaridos (Bashan et al. 1995); sin embargo, muchos suelos están caracterizados por su baja disponibilidad de nutrientes, por lo que resulta lógico pensar de que la sobrevivencia de *Azospirillum* en dichos suelos pobres en nutrientes debe de estar regulada por un poza génica que debe de expresar fenotipos específicos ante tales circunstancias particulares.

Aunque algunos trabajos se han realizado para estudiar floculación y formación de enquistamientos bajo diversas condiciones de estrés, tales como el estrés nutricional (Sadasivan y Neyra 1987), exposición a metales tóxicos (Gowri y Sarivastava 1996), estrés hídrico (Bashan et al. 1991). Así mismo, se han realizados estudios para evaluar diferentes condiciones de cultivo en la producción de polisacáridos, sin embargo, no existe ningun trabajo previo que ponga de manifiesto cambios fenotípicos en *Azospirillum* como respuesta a un estrés nutricional. El único estudio en relación con este trabajo es Bachhawat y Ghosh (1987) en el que caracterizaron las proteínas de la membrana externa de *Azospirillum* encontrando la inducción de cuatro proteínas en condiciones de crecimiento limitantes de fierro.

En este estudio, utilizamos *A. lipoferum* 1842 para determinar los posibles cambios en la superficie celular de la bacteria inducidos bajo condiciones de cultivo pobres en nutrientes (carbono, nitrógeno, o limitación total de nutrientes), determinando que ocurrían cambios en la hidrofobicidad, composición de proteínas de la superficie celular y la expresión de lectinas (Publicación III) las cuales pudieran estar relacionadas con la adhesión inicial de la bacteria a los tejidos radiculares de plantas en cultivo.

Se evaluaron tres regímenes de estrés nutricional: un medio de cultivo deficiente en fuente de carbón; una solución amortiguadora y agua destilada. La bacteria sobrevive en todos los medios de estrés nutricional, aunque no se divide durante los primeros 7 días. La hidrofobicidad de la superficie celular disminuye pero recupera sus valores iniciales entre las 24 y 48 h, aunque los períodos de recuperación dependen del medio de estrés nutricional.

El estrés nutricional afecta la afinidad de la superficie celular de *Azospirillum* hacia azúcares, principalmente hacia p-aminofenil- α -D-manopiranososa y en menor grado, a glucosa pero no a la de otros carbohidratos evaluados. El estrés nutricional también cambia la concentración de varias de las proteínas de la superficie celular, pero no se detectó la inducción de proteínas nuevas. En contraste, Bachhawat y Ghosh (1987) en estudios bajo condiciones de estrés de fierro detectaron la inducción de cuatro proteínas, las cuales son pocas comparando con la inducción de 20 a 40

nuevas proteínas detectadas en *E. coli* bajo condiciones de estrés nutricional (Groat et al. 1986; Matin 1990).

La hidrofobina de 43 kDa de *A. lipoferum* 1842, permaneció sin ser afectada por ningún tratamiento de estrés nutricional, sin embargo, después de 48 hrs de estrés nutricional dicha proteína no fue detectada por análisis electroforético. Estos resultados concuerdan con la gradual disminución de la afinidad por los carbohidratos. Una posible explicación a ello sería que durante el estrés nutricional el contenido de proteína disminuye y no es detectado, o bien de que la proteína podría ser modificada hecho que explicaría también porqué se detectan tres isoformas de la hidrofobina por análisis de electroenfoque, o también que la proteína sea degradada enzimáticamente.

El aumento en la concentración de proteínas de la superficie celular y la hidrofobicidad durante el crecimiento de *A. brasilense* se relacionó con el incremento de la adhesividad a vidrio y a poliestireno, aunque en medio nutritivo (Dufrêne y Rouxhet 1996). En *R. leguminosarum*, la limitación de nutrientes favorece una mejor adhesión de la bacteria a la raíz y el tipo de ayuno determina si la lectina del hospedero participa en el proceso de adhesión (Smit et al. 1986). Nuestros resultados con *A. lipoferum* 1842 mostraron un decremento en la expresión de lectinas y sólo un pequeño aumento en la cantidad y tipo de las proteínas de la superficie celular; por lo tanto, existe la necesidad de mostrar si estos cambios afectan la adhesión de *A. lipoferum* a raíces.

6. Adhesión de *Azospirillum* a raíz de *Zea mays*.

Varias técnicas como, utilización de anticuerpos monoclonales fluorescentes, sistema reportero GUS, fusión de Lac Z, han sido utilizados para marcar *Azospirillum* para poder realizar estudios *in situ* en la rizósfera, así como de colonización de *Azospirillum* en suelo, rizosfera y raíces (Assmus et al. 1995; Assmus et al. 1997; Schank et al. 1979; Vande Broek et al. 1993).

A través de dichos estudios se ha podido comprobar que *Azospirillum* no induce la formación de nódulos o la inducción de otro tipo de estructuras en la superficie de la raíz como la interacción de *Rhizobium* con leguminosas. Los sitios de adhesión observados, son los pelos radiculares, sitios de surgimiento de raíces laterales, que coinciden con los sitios de exudación más activa.

Estudios previos sobre interacción de *Azospirillum* con raíces de plantas se han realizado por microscopía de luz y de fluorescencia (Schank et al. 1979), microscopía de barrido y transmisión de electrones, junto con marcado inmunológico de partículas de oro (Berg et al. 1979; Levanony et al. 1989; Bashan et al. 1991) microscopía de luz, utilizando el sistema reportero GUS (Vande Broek et al. 1993) y microscopía confocal detectando sondas de oligonucleótidos y anticuerpos fluorescentes (Assmus et al. 1995; Assmus et al. 1997).

Recientemente, Gage et al. (1996) describe el uso de la proteína verde fluorescente (GFP) de la medusa *Aequorea victoria* como marcador para visualizar los eventos iniciales de la simbiosis entre *Rhizobium meliloti* y alfalfa.

Nosotros estudiamos la adhesión cualitativa de *A. lipoferum* 1842 y *A. brasilense* Cd a raíces de maíz, utilizando en dicho estudio, cepas de *Azospirillum*

transformadas con un plásmido construido por Gage et al. (1996) que contiene el gene para la expresión de una proteína verde fluorescente (GFP), mismo que introducimos por conjugación a *A. brasilense* Cd, Sp245 y *A. lipoferum* 1842, para visualizar la adhesión de las cepas a raíces de maíz por microscopía confocal y epifluorescencia.

Nuestras observaciones muestran algunos patrones y tendencias (Publicación V) previamente reportados en *Azospirillum* (Assmus et al. 1995; Arsene et al. 1994; Vande Broek et al. 1992) así como en *Rhizobium meliloti* (Gage et al. 1996). No se observaron bacterias en la cápsula de la raíz de maíz no obstante que es el sitio de más activa exudación. La adhesión fue observada siempre en la zona de elongación y en los pelos radiculares donde las bacterias forman agregados.

A diferencia de la adhesión bacteriana a pelos radiculares, en la superficie de la raíz las bacterias muestran un arreglo lineal y principalmente en las uniones de las células epiteliales y posteriormente mas bacterias se van adhiriendo formando agregados. Estas observaciones han sido reportadas por Vande Broek et al. (1993) en *A. brasilense* en la superficie de raíz de trigo y por Gage et al. 1996 en *Rhizobium meliloti* y alfalfa.

Para estudiar la influencia de varias de las alteraciones en la superficie celular de *Azospirillum* en el proceso de adhesión, basamos nuestro trabajo en estudios previos donde se demuestra la adhesión de *Azospirillum* a células vegetales desdiferenciadas (Eyers et al. 1988; Umali-Garcia et al. 1980).

Realizamos dos tipos de experimentos: 1) *Azospirillum* marcado con isotiocianato de fluoresceína fue incubado con células en suspensión de maíz y la adhesión se observó por microscopio de epifluorescencia; y 2) *Azospirillum* transformado con el plasmido que codifica la GFP fueron incubados con células en suspensión de maíz y la adhesión se observó a diferentes niveles de profundidad por microscopía confocal.

Nuestros resultados muestran que en ambas metodologías las bacterias se adhieren a células desdiferenciadas como previamente había sido observado (Eyers et al. 1988; Umali Garcia et al. 1980), sin embargo, nuestros experimentos con *Azospirillum* transformado con el plasmido de la GFP muestra que, además de la adhesión a la superficie de las células de maíz, las bacterias penetran al interior de las células (ver Anexo 2).

Una posible explicación de estos resultados, podría ser el origen de el cultivo en suspensión, el cual fué obtenido para regenerar fácilmente a protoplasto, por lo tanto es necesario repetir estos experimentos usando otro cultivo en suspensión como control.

Un estudio previo, utilizando *A. brasilense* Sp7, Sp245 y 7030 marcada radioactivamente e inoculada a células en suspensión de *Triticum monococcum* y observadas en microscopio electrónico de barrido, muestra solo bacterias adheridas a la superficie de las células en suspensión (Eyers et al. 1988). Nuestras observaciones de bacterias que penetraron las células de maíz difieren de los publicados por varias razones: primero, los cultivos vegetales en suspensión tienen diferentes orígenes. Segundo, nosotros utilizamos diferentes cepas de *Azospirillum* (*A. lipoferum* 1842). Adicionalmente, con microscopía de barrido no es posible hacer observaciones dentro de la célula, a menos que se preparen cortes.

Conclusiones.

1. Bajo condiciones de cultivo estándar, los cultivos del género de *Azospirillum* poseen una moderada hidrofobicidad en la superficie celular, aunque esta cambia con condiciones nutricionales moderadas, extremas, o de estrés nutricional. Dado el grado de hidrofobicidad de la superficie celular de *Azospirillum*, es posible que esta propiedad por si sola no determine la adhesión de la bacteria a células de raíces, sin embargo, puede cooperar simultáneamente con otros factores de adhesión a fin de asegurar la adhesión de la bacteria a la planta.
2. La hidrofobina, aislada y caracterizada parcialmente de la superficie celular de *A. lipoferum* 1842, es una proteína que parece tener tres isoformas, la cual está también presente en la superficie celular de *A. brasilense* Cd y Sp245 y además tiene afinidad por varios azúcares (actividad lectina).
3. *Azospirillum* posee varias lectinas asociadas con la superficie celular y que poseen afinidad por varios residuos carbohidratos. Esta característica le puede conferir a *Azospirillum* la capacidad para adherirse a las raíces de diferentes especies de plantas.
4. *A. lipoferum* 1842 sobrevive muy bien bajo condiciones de estrés nutricional sin desarrollar formas de resistencia. La bacteria mantiene su afinidad por los carbohidratos, aunque en menor grado. La proteína hidrofóbica también está presente aunque su concentración se ve disminuída con el tiempo.
5. Aunque el modo de acción de *Azospirillum* difiere del de otras asociaciones como *Rhizobium*-leguminosas, existen algunas similitudes en el proceso de adhesión a como ocurre en la adhesión de *Rhizobium* a raíces, como por ejemplo, el embeberse en el mucílago que rodea la raíz, el adherirse primero a los pelos radiculares y en la superficie de la raíz, en las uniones de dos células epidermales, independientemente de la bacteria y raíz de planta que se trate.
6. De acuerdo con los resultados que encontramos en la presente investigación y en base a la literatura disponible, propongo un modelo hipotético alternativo al modelo propuesto por Del Gallo (1994).
 - a) Modelo hipotético de adhesión de *Azospirillum* a raíces de Del Gallo (1994).
 1. La planta por quimiotaxis atrae a la bacteria. Una proteína presente en el exudado de raíz está involucrada.
 2. *Azospirillum* se mueve hacia la raíz. La bacteria se une a la superficie de la raíz, el flagelo y algunos componentes del glicocalix están involucrados. Lectinas de planta se unen a algunos componentes exocelulares de la bacteria. Fase I de la adhesión.
 3. Mensajes desconocidos entre la bacteria y la planta. Podrían ser la unión de otras lectinas y polisacáridos, o flavonoides como en el caso de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas.
 4. *Azospirillum* produce fibrillas de celulosa, que adhieren más fuertemente a la bacteria. Fase II de la adhesión (anclaje).
 5. Otros intercambios, desconocidos hasta la fecha, se llevan a cabo y la asociación entre la bacteria y la planta se establece. La bacteria produce sustancias

promotoras de crecimiento de la planta y un estímulo de la producción de hormonas endógenas de la planta se inicia.

b) Modelo hipotético de Adhesión de *Azospirillum* a raíces modificado de acuerdo a los resultados que encontramos en la presente investigación y en base a la literatura disponible (fig. 1 y 2).

1. *Azospirillum* se mueve inespecíficamente hacia la raíz, flagelo y fimbria están involucrados (Croes et al. 1993; Madi et al. 1988).
2. *Azospirillum* entra en contacto con la raíz, primero con el flagelo y después con la fimbria, que tiene propiedades hidrofóbicas (Irvin 1990). Esta es una interacción débil.
3. Proteínas tipo lectinas expuestas en la superficie celular están involucradas en reconocer residuos de carbohidrato en la raíz de la planta (Castellanos et al. 1998).
4. *Azospirillum* empieza a agregarse, entre ellas mismas por medio de la actividad de polisacáridos secretados por la bacteria y forma una red de material fibrilar (Bashan et al. 1991).
5. *Azospirillum* obtiene suficientes nutrientes de los exudados de raíz y empieza a dividirse y colonizar produciendo moléculas benéficas para la planta como fitohormonas (Picoli y Bottini 1994).

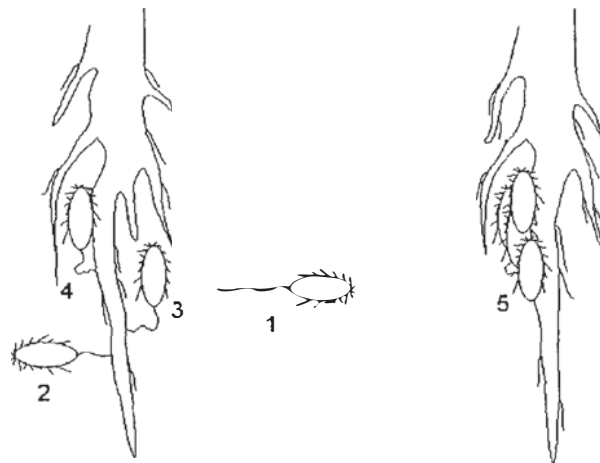


Fig. 1 Modelo hipotético de la adhesión de *Azospirillum* a raíces. Los números representan cada uno de los pasos del proceso descrito en el texto.

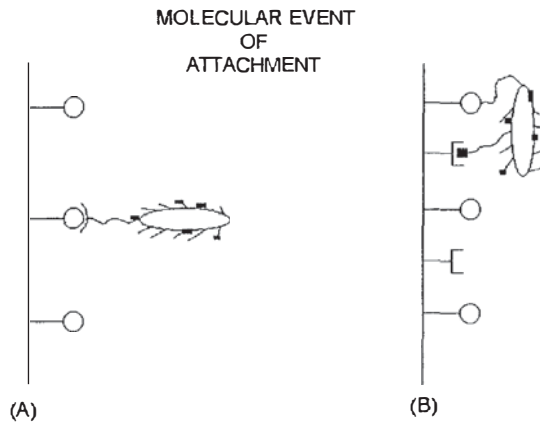


Figura 2. Eventos moleculares de la adhesión de *Azospirillum* a raíces.
 ○ carbohidrato ■ lectina □ carbohidrato

Son necesarios datos adicionales para establecer una clara visión del proceso inicial de adhesión. Se ha establecido que la carga y la hidrofobicidad de la superficie celular depende de varios parámetros como son condiciones de cultivo o nutrientes. El estudio de los factores de adhesión resultan fundamentales para el entendimiento de los factores que controlan el proceso de asociación y colonización de plantas por *Azospirillum*, que nos permitirán mejorar la forma y presentación en que biofertilizantes son preparados a base de bacterias para obtener mejores inoculantes.

La importancia de la presente investigación al campo de la adhesión de *Azospirillum* a raíces, reside en la evidencia de que proteínas tipo lectinas en la superficie celular de *Azospirillum* con afinidad por varios monosacáridos exudados por raíz.

Estudios futuros son necesarios para determinar el grado en el que estas proteínas tipo lectinas están involucradas en los procesos iniciales de adhesión celular.

References

- Agarwala-Dutt, R., K.V.B.R. Tilak, and J.P.S. Rana. 1991. Isolation of *Azospirillum* from the interior of various parts of some graminaceous plants. *Z. Mikrobiol.* 146: 217-219.
- Aly, R., and S. Levit. 1987. Adherence of *Staphylococcus aureus* to squamous epithelium: role of fibronectin and teichoic acid. *Rev. Infect. Dis.* 9:S341-S350.
- Antonyuk, L.P., O.R. Fomina, A.V. Kalinina, S. Semenov, M. Nesmeyanova, and V.V. Ignatov. 1995. Wheat lectine possibly serves as a signal molecule in the *Azospirillum*-wheat association, p. 319-324. *In* NATO ASI series vol. G37 I. Fendrick, M. del Gallo, J. Vanderleyden and M. de Zamaroczy (ed). *Azospirillum* VI and Related Microorganisms, Genetic-physiology-ecology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Arsène, F., S. Katupitiya, I.R. Kennedy, and C. Elmerich. 1994. Use of *lacZ* fusions to study the expression of *nif* genes of *Azospirillum brasilense* in association with plants. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 7: 748-757.
- Arunakumari, A., R.B. Lamm, and C.A. Neyra-Estens. 1992. Changes in cell-surface properties of azospirilla in relation to cell pleomorphism and aggregation. *Symbiosis* 13:291-305.
- Ascencio F., J.L.Guruge, A. Ljungh, F. Megraud, S. Wei, and T. Wadstrom. 1990. Lectin typing of *Helicobacter pylori*. *In* *Helicobacter pylori*, gastritis and peptid ulcer. Ed. P. Malfertheiner and H. Ditschuneit. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Assmus, B., P. Hutzler, G. Kirchhof, R. Ammann, J.R. Lawrence and A. Hartmann. 1995. *In situ* localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1013-1019.
- Assmus B., M. Schloter, G. Kirchhof, P. Hutzler, A. Hartmann. 1997. Improved *In situ* tracking of rhizosphere bacteria using dual staining with fluorescence-labeled antibodies and rRNA-targeted oligonucleotides. *Microb. Ecol.* 33: 32-40.
- Bachhawat, A., and S. Ghosh. 1987. Isolation and characterization of the outer membrane proteins of *Azospirillum brasilense*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1751-1758.
- Bacic, A., Moody, S.F., and Clarke, A.E. 1986. Structural analysis of secreted roots slime from Maize (*Zea mays*). *Plant Physiol.* 80:771-777.
- Baldani, V.L.D., M.A. Alvarez, J.I. Baldani, and J. Döberainer. 1986. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant and Soil* 90: 35-46.

- Baldani, V.L.D., J.I. Baldani, and J. Döbereiner. 1983. Effect of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Can. J. Microbiol.* 29:924-929.
- Bashan, Y., and G. Holguin. 1993. Anchoring of *Azospirillum brasilense* to hydrophobic polystyrene and wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* 139: 379-385.
- Bashan, Y., and G. Holguin. 1995. Inter-root movement of *Azospirillum brasilense* and subsequent root colonization of crop and weed seedlings growing in soil. *Microb. Ecol.* 29: 269-281.
- Bashan, Y., and G. Holguin. 1997a. *Azospirillum*-plant relationship: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* 43: 103-121.
- Bashan, Y., and G. Holguin. 1997b. Short and medium-term avenues for *Azospirillum* inoculation. In; Plant growth-promoting rhizobacteria. Present status and future prospects. p.130-149. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino. Eds., Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo Japan.
- Bashan, Y., and G. Holguin. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology & Biochem.* (In press).
- Bashan, Y., and H. Levanony. 1988a. Adsorption of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd to soil, sand and peat particles. *J. Gen. Microbiol.* 134:1811-1820.
- Bashan, Y., and H. Levanony. 1988b. Active attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to quartz sand and to light-textured soil by protein bridging. *J. Gen. Microbiol.* 134: 2269-2279.
- Bashan, Y., and H. Levanony. 1988c. Interaction between *Azospirillum brasilense* Cd and wheat root cells during early stages of root colonization. In W. Klingmüller (ed). *Azospirillum* IV. Genetic-physiology-ecology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Bashan, Y., and H. Levanony. 1989. Effect of root environment on proton efflux in wheat root. *Plant soil.* 119: 191-197.
- Bashan, Y., H. Levanony, and G. Mitiku. 1989a. Changes in proton efflux of intact wheat roots induced by *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.* 35: 691-697.
- Bashan, Y., G. Mitiku, R.E. Whitmoyer, and H. Levanony. 1991. Evidence that fibrillar anchoring is essential for *Azospirillum brasilense* Cd attachment to sand. *Plant. Soil* 132: 73-83.

Bashan, Y., M.E. Puente, M.N. Rodriguez-Mendoza, G. Toledo, G. Holguin, R. Ferrera-Cerrato, and S. Pedrin. 1995. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1938-1945.

Bashan, Y., Y. Ream, H. Levanony, and A. Sade. 1989b. Non-specific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Bot.* 67: 1317-1324.

Bashan, Y., M. Singh, and H. Levanony. 1989c. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. *Can. J. Bot.* 67: 2429-2434.

Beijerinck, M.W. 1925. Uber ein *Spirillum* welches freien stickstoff binden Kann?. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Abt.* 63: 353.

Berg, R.H., V. Vasil and I.K. Vasil. 1979. The biology of *Azospirillum-sugarcane* association. *Protoplasma* 101: 143-163.

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

Chaudhury, S., and A. Sengupta. 1991. Association of nitrogen fixing bacteria with leaves of *Avicennia officinalis* L. a tidal mangrove tree of Sundarban. *Indian J. Microbiol.* 31: 321-322.

Cross, C.L., S. Moens, E. van Bastelaere, J. Vanderleyden, and K.W. Michiels. 1993. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2261-2269.

Cross, C., E. Van Bastelaere, E. DeClercq, M. Eyers, J. Vanderlayden and K. Michiels. 1991. Identification and mapping of loci involved in motility, adsorption to wheat roots, colony morphology, and growth in minimal medium on the *Azospirillum brasilense* Sp7 90-Mda. *Plasmid* 26:83-93.

Crossman, S.M., and W.A. Hill. 1987. Inoculation of sweet potato with *Azospirillum*. *Hort. Sci.* 22: 420-422.

Day, JM. and J. Döbereiner. 1976. Physiological aspects of N₂ fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. *Soil Biol. Biochem.* 8:45-

Dazzo, F.B., G.L. Truchet, J.E. Sherwood, E.M. Hrabak, M. Abe, S.H. Pankratz. 1984. Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifoli* -clover symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:1140-1150.

De Coninck, K., S. Horemans, S. Randoz, and K. Vlassak. 1988. Occurrence and survival of *Azospirillum* spp. in temperate regions. *Plant Soils*. 110: 213-218.

Del Gallo, M., and I. Fendrik. 1994. The rhizosphere and *Azospirillum*. In *Azospirillum* plant associations. Edited by Y. Okon. CRC Press. Boca Raton, Fla. pp. 57-75.

Del Gallo, M., and A. Haegi. 1990. Characterization and quantification of extracellular polysaccharides of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Symbiosis* 9: 155-161.

Del Gallo, M., E. Negi, and C.A. Neyra. 1989. Calcofluor and lectine binding extracellular polysaccharides of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.* 171: 3504-3510.

De Torch, P., and J. Vanderlayden. 1996. Surface properties and motility of *Rhizobium* and *Azospirillum* in relation to plant root attachment. *Microbiol. Ecol.* 32: 149-169.

Döbereiner, J., I.E. Marriel, and M. Nery. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22: 1464-1473.

Downie, J.A., G. Hombrecher, Q.S. Ma, C.D. Knight, B. Wells, and A.W.B. Johnston. 1983. Cloned nodulation genes of *Rhizobium leguminosarum* determine host-range specificity. *Mol. Gen. Genet.* 190: 359-365.

Dufrêne, Y.F., and P.G. Rouxhet. 1996. Surface composition, surface properties, and adhesiveness of *Azospirillum brasilense*. -Variations during growth. *Can. J. Microbiol.* 42: 548-556.

Duguid, J.P., R.M. Darekar, and D.W.F. Weather. 1976. Fimbriae and infectivity in *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* 9: 459-473.

Duguid, J.P., and D.C. Old. 1980. Adhesive properties of *Enterobacteriaceae*. In: B.H. Beachey, (ed.), *Bacterial adherence (Receptors and Recognition, Vol. 6)*. Chapman and Hall, London, pp. 185-217.

Eyers, M., J. Vanderleyden, and A. Van Gool. 1988. Attachment of *Azospirillum* to isolated plant cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 49: 435-439.

Fallik, E., and Y. Okon. 1996. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. *Soil Biol. Biochem.* 28: 123-126.

Fallik, E., Okon, Y., Epstein, E., Goldman, A., and Fischer, M. 1989. Identification and Quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense*-inoculated maize roots. *Soil Biol. Biochem.* 21: 147-153.

- Faris, A., M. Lindahl, and T. Wadström. 1982. High surface hydrophobicity of hemagglutinating *Vibrio cholera* and other vibrios. *Curr. Microbiol.* 7: 357-362.
- Fedi, S., P. Montaini, and F. Favilli. 1992. Chemotactic response of *Azospirillum* towards root exudates of C₃ and C₄ plants. *Symbiosis* 13: 117-118.
- Gafny, R., Y. Okon, and Y. Kapulnik. 1986. Adsorption of *Azospirillum brasilense* to corn roots. *Soil Biol. Biochem* 18: 69-75.
- Gage, D.J., T. Bobo, and S.R. Long. 1996. Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*). *J. Bacteriol.* 178: 7159-7166.
- Garcia de Salomone, I., and J. Döbereiner. 1996. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biol. Fertil. Soils.* 23: 193-196.
- Garcia de Salomone, I.E., J. Döbereiner, and S. Urquiaga. 1996. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ¹⁵N isotope dilution technique. *Biol. Fertil. Soils.* 23: 249-256.
- Gamo, T., and S.B. Ahn. 1991. Growth-promoting *Azospirillum* spp. isolated from the roots of several non-gramineous crops in Japan. *Soil. Sci. Plant Nut.* 37: 455-461.
- George, M. 1990. *Azospirillum* for nitrogen fixation in coconut (a research note). *Philipp. J. Coconut Stud.* 15: 1-3.
- Gochnauer, M.B., L.J. Sealey, and E. McCully. 1990. Do detached root-cap cells influence bacteria associated with maize roots. *Plant Cell Environ.* 13: 793-801.
- Gowri, P.M., and S. Srivastava. 1996. Encapsulation as a response of *Azospirillum brasilense* Sp 7 to zinc stress. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 319-322.
- Groat, R.G., J.E. Schultz, E. Zychlisky, A. Bockman and A. Matin. 1986. Starvation proteins in *Escherichia coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival. *J. Bacteriol.* 168: 486-493.
- Haahtela, K., T. Laakso, and T.K. Korhonen. 1986. Associative nitrogen fixation by *Klebsiella* spp.: adhesion sites and inoculum effects on grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 1074-1079.
- Haahtela, K., E. Tarkka, and T.K. Korhonen. 1985. Type 1 fimbria-mediated adhesion of enteric bacteria to grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1182-1185.

Haahtela, k., T.Wartiovaara, V. Sundman, and J. Skujins. 1981. Root-associate N₂ fixation (acetylen reduction) by *enterobacteriaceae* and *Azospirillum* strain in cold-climates. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 203-206.

Hadas, R., and Y. Okon. 1987. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedling. *Biol. Fertil Soils* 5: 241-247.

Henrich, D., and D. Hess. 1984. Chemotactic attraction of *Azospirillum lipoferum* y wheat roots and characterization of some attractants. *Can. J. Microbiol.* 31: 26-31.

Irvin, R.T. 1990. Hydrophobicity of proteins and bacterial fimbriae. In: *Microbial cell-surface hydrophobicity*. M. Rosenberg and R.J. Doyle eds. pp.137-177. American Society for Microbiology, Washington, D C.

Jankovic, M., M. Cuperlovic, and L. Hadjukovic. 1990. Salt-soluble lectins of corn grain. *Plant Physiol.* 93:1659-1662.

Johansson, G. 1974. Partition of proteins and microorganisms in aqueous biphasic systems. *Mol. Cell Biochem.* 4:169-180.

Karpati, E., P. Kiss, M. Afsharian, F. Marini, S. Buglioni, I. Fendrik, and M. Del Gallo. 1995. Molecular study of the interaction of *Azospirillum lipoferum* with Wheat Gern Agglutinin. p. 213-221. *In* NATO ASI series Vol. G37 I. Fendrick, M. del Gallo, J. Vanderleyden and M.de Zamaroczy (ed). *Azospirillum* VI and Related Microorganisms, genetics-physiology- ecology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Khammas, K.M., E. Ageron, P.A.D. Grimont, and P. Kaiser. 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res. Microbiol.* 140:679-693.

Kijne, J.W., B.J.J. Lugtenberg, and G. Smit. 1992. Attachment, lectine, and initiation of infection in (*Brady*) *Rhizobium*-legume interaction. *In*: *Molecular Signals in plant-microbe communications*. (D.P.S. Verma ed.) p 281-294. CRC Press, Boca Raton, Fl.

Kloss, M., K-H. Iwannek, I. Fedrik, E-G. Niemann. 1984. Organic acid in the root exudates of Kallar grass (*Diplachne fusca* (Linn.) Beauv.) *Biologia* 26:107-112.

Korhonen., T.K., E. Tarkka, H. Ranta, and H. Haahtela. 1983. Type 3 fimbriae of *Klebsiella* spp.: molecular characterization and role in bacterial adhesion to plant roots. *J. Bacteriol.* 155: 860-865.

Krafczyk, I., G. Trolldenier, and H. Beringer. 1984. Soluble exudates of maize: influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 16: 315-322.

Layh-Schmitt, G., S. Schmitt, and T.M. Buchanan. 1989. Interaction of non-piliated *Neisseria gonorrhoeae* strain 7122 and protein 1A with an epithelial cell monolayer. *Int. J. Med. Microbiol.* 271:158-170.

Lepekhin, E.A.S., A.J. Yalajov, and V.I. Rybak. 1986. *Fiziologiya/rastenij (URSS)* 33: 390-394.

Levanony, H., Y. Bashan, R. Romano, and E. Klein. 1989. Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* Cd on and within wheat root by immunogold labeling. *Plant and soil.* 117: 207-218.

Levine, M.J., M.C. Herzberg, M.S. Levine, S.A. Ellison, M.W. Stinson, and T. Van Dyke. 1978. Specificity of salivary-bacteria interaction: role of terminal sialic acid residues in the interaction of salivary glycoproteins with *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 19:107-115.

Liener, I.E., N. Sharon, and I.J. Goldstein. 1986. *The lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine.* Academic Press, London and Florida.

Madi, L., and Y. Henis. 1989. Aggregation in *Azospirillum brasilense* Cd: conditions and factors involved in cell-to-cell adhesion. *Plant Soil* 115:89-98.

Madi, L., M. Kessel, E. Sadovnik, and Y. Henis. 1988. Electron microscopic studies of aggregation and pellicle formation in *Azospirillum* spp. *Plant soil.* 109: 115-121.

Magalhaes, F.M. M. , J.L. Baldani, S.M. Souto, J.R. Kuykendall, and J. Döbereiner. 1983. A new acid tolerant *Azospirillum* species. *An. Acad. Bras. Cienc.* 55: 417-430.

Mandimba G., T. Heulin, R. Bally, A. Guckert, and J. Balandreau. 1986. Chemotaxis of free-living bacteria towards maize mucilage. *Plant Soil* 90: 129-139.

Markov, E.Y., E.E. Khavkin. 1982. *Biochim. Phisiol. Planz.* 177: 739-746.

Martinez, M.A., E. Zenteno, and F. Cordoba. 1993. Partial purification and characterization of corn coleoptile lectins. *In: Lectines: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry- Vol 8.* pp. 132-136. E. Van Driessche, H. Franz, S. Beeckmans, U. Pfuller, A. Kallikorm, T.C. Bøg-Hansen, (eds.). Textop, Hellerup, Denmark.

Mascarua-Esparza, M.A., R. Villa-Gonzalez, and J. Caballero-Mellado. 1988. Acetylene reductio and indolacetic acid production by *Azospirillum* isolated from Cactaceous plants. *Plant Soil* 106: 91-95.

Matin, A. 1990. Molecular analysis of the starvation stress in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74: 185-196.

Merida, A., L. Vasquez, M. Martinez, T. Aquino, E. Perez-Campos, and F. Cordoba. 1996. Dextran raffinose derivative assay for affinity purified corn coleoptile lectine. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60:2064-2065.

Michiels, K.W., C.L. Croes and J. Vanderleyden. 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat root. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2241-2246.

Newburg, D.S. and J.M. Concon. 1985. Lectins in rice and corn endosperm. *J. Agric. Food Chem.* 33: 685-687.

Neyra, C.A., A. Atkinson, and O. Olubayi. 1995. Coaggregation of *Azospirillum* with other bacteria: basis for functional diversity. *In: Azospirillum VI and Related Microorganisms* (Fendrik, I., Del-Gallo, M., Vanderleyden, J., and de Zamaroczy, M., eds), pp. 429-439. Springer, Heidelberg.

Neyra, C.A., and R.G. Hageman. 1976. Relationship between carbon dioxide, malate, and nitrate accumulation and reduction in corn (*Zea mays* L.) Seedlings. *Plant Physiol.* 58: 726-730.

Nicolson, G.L. 1974. The interaction of lectins with animal cell-surfaces. *Int. Rev. Cytol.* 39: 89-190.

Nilsson, G., S. Svensson, and A.A. Lindberg. 1983. The role of carbohydrate portion of glycolipids for the adherence of *Escherichia coli* K88⁺ to pig intestine. *In: M.A. Chester, D. Heinegard, A. Lundbead, and S. Svensson (eds.)*, pp. 637-638.

Nosko, P., L.C. Bliss and F.D. Cook. 1994. The association of free-living nitrogen-fixing bacteria with the root of High Arctic graminoids. *Arct. Alp. Res.* 26: 180-186.

Ofek, I., and R.J. Doyle. 1994. Bacterial adhesion to cells and tissues. Chapman & Hall New York.

Ofek, I., D. Mirelman, and N. Sharon. 1977. Adherence of *E. coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature* 265:625.

Okon, Y. 1994. *Azospirillum* plant association. CRC Press, Boca Raton, Fl.

Okon, Y., and C.A. La Bandera-Gonzalez. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1591-1601.

Piccoli, P., and R. Bottini. 1994. Effects of C/N ratio, N content, pH, and incubation time on growth and gibberellin production by *Azospirillum lipoferum*. *Symbiosis* 17: 229-236.

Puente, M.E., and Y. Bashan. 1993. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedling of the giant columnar Cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). *Symbiosis* 15: 49-60.

Rao, P.S.K., V. Arrunachalan, and K.V.B.R. Tilak. 1990. Genotype dependent response to *Azospirillum* treatment in yield and nitrogenase activity in *Brassica juncea* L. *Curr. Sci.* 59: 607-609.

Rapin, A.M.C., and M.M. Burger. 1974. Tumor cell-surfaces: general alterations detected by agglutinins. *Adv. Cancer Res.* 20:1-91.

Reinhold, B., T. Hurek, and I. Fendrik. 1985. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. *J. Bacteriol.* 32: 829-834.

Tarrand, J.J., N.R. Krieg, and J. Döbereiner. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) sp. nov. and *Azospirillum brsasilense* sp. nov. *Can J. Microbiol.*, 33: 670-678.

Tunner, J.R., C.R. Robertson, S. Schippa, and A. Matin. 1992. Use of glucose starvation to limit growth and induce protein production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioengin.* 40: 271-279.

Tuomanen, E. 1986. Piracy of adhesins: Attachment of superinfecting pathogens to respiratory cilia by secreted adhesins of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 54: 905-908.

Umali-Garcia, M., D.H. Hubbell, M.H. Gaskins, and F.B. Dazzo. 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl. Environ Microbiol.* 39: 219-226.

Vande Broek, A., J. Michiels, A. Van Gool, and J. Vanderleyden. 1993. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *nif* H gene during association. *Mol. Plant-microbe Interact.* 6: 592-600.

Von Bulow, J.G.D. and J. Döbereiner. 1975. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brasil. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 2389-2393.

Yagoda-Shagam, J., L.L. Barto, W.P. Reed, and R. Chiovetti. 1988. Fluorescein isothiocyanate-labeled lectin analysis of the surface of the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense* by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1831-1837.

Zhulim, I.B., and J.P. Armitage. 1993. Motility, chemokinesis, and methylation-independent chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 37: 451-459.

Anexo 1

Tabla 1. Aglutinación con lectinas.

Lectin	<i>A. brasiliense</i>			<i>A. lipoferum</i>			
	245	7030	6	1842	33	37	779
<i>Lotus tetragonolobus</i>	-	-	-	-	-	-	-
WGA	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vicia villosa</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lens culinaris</i>	-	-	-	-	-	-	-
Peanut	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pisum sativum</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Crotalaria juncea</i>	-	-	-	-	++	++	-
Concanavalin A	-	-	-	-	+	-	+
<i>Vicia ervilia</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Helix pomatia</i>	-	-	-	-	+	+	+
<i>Codium fragile</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Bauhinia purpurea</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Anguilla anguilla</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Datura stramonium</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Micoplasma gallisepticum</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cicer arietinum</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Limulus polyphemus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phytolacca americana</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vicia fava</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Zea mays</i>	-	-	-	-	-	-	-

Ninguna de las cepas de *A. brasiliense* aglutino con ninguna de las lectinas probadas, y *A. lipoferum* aglutino solo con cuatro de las lectinas probadas.

Las bacterias que mostraron aglutinación fueron tratadas con los azúcares por los que tiene afinidad las lectina que los aglutino para por inhibición mostrar la afinidad.

Ademas también fueron tratadas con químicos como NaBH_4 , NaIO_4 y H_2SO_4
Crotalaria funcia es una lectina de una leguminosa que tiene afinidad por: D-galactosa > D-lactosa>D-melobiosa>L-rafinosa>D-N-acetil-galactosamina.
Helix pormatia: D-N-acetil galactosamina.

Tabla 2

Lectina	<i>A. lipoferum</i> Sp-33			<i>A. lipoferum</i> Sp-37		
	NaBH_4	NaIO_4	H_2SO_4	NaBH_4	NaIO_4	H_2SO_4
<i>Crotalaria juncea</i>	++	-	+	+	+	+

Tabla 3.

	<i>A. lipoferum</i> Sp-779		
	NaBH_4	NaIO_4	H_2SO_4
<i>Helix pormatia</i>	-	-	-

Concanavalina A es una lectina aislada defrijol (*Canavalina ensiformis*) y tiene especificidad por α -mannose y α -glucose.

Helix pormatia aglutina celulas bacterianas (Prokop et al. 1968) como cepas de *E. coli* O_{26} , O_{86} , O_{111} , and O_{126} , algunas *Salmonella* de los grupos B, C, D, y E, *Corynebacterium diphtheriae* del tipo grave, medio e intermedio, la mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus*, y *Streptococci* de los grupos C y H, otros *streptococci* no presentan reacción.

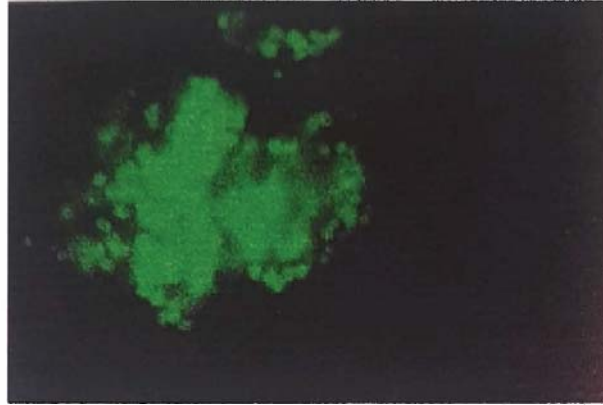


Figura 1. *A. lipoferum* 1842 incubada con lectina de maíz marcada con isotiocianato de fluoresceína, observada en microscopia de epifluorescencia.

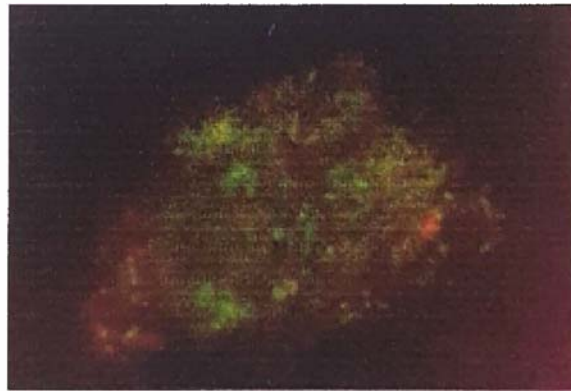
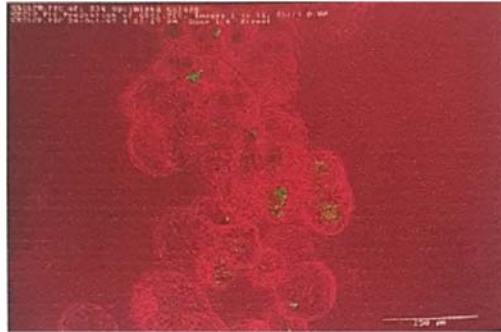


Figura 2. *A. lipoferum* 1842 incubada previamente con lactosa y posteriormente con la lectina de Maíz. La inhibición no fue total, las bacteria se marcaron aunque tenuemente y continuaron agregándose.

Anexo 2

A



B

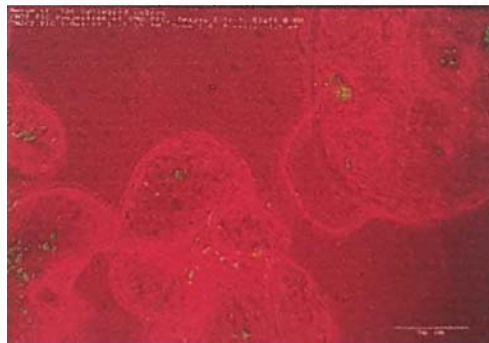


Fig.1. Imagen de microscopía confocal mostrando células de maíz incubadas con *A. lipoferum* 1842. Las bacterias (color verde) están dentro de las células. A) aumento 10X B) aumento 40 X