

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE FARMACIA
INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN DEL AGUA



PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA FUNDAMENTAL Y DE
SISTEMAS

**Mejora en la tolerancia a la sequía de plantas con interés
biotecnológico en zonas de secano**

**Enhancement in drought tolerance of plants with
biotechnological interest in rainfed areas**

Juan Ignacio Vílchez Morillas

Tesis Doctoral. Granada. 2016

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Juan Ignacio Vilchez Morillas
ISBN: 978-84-9125-881-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/43709>

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE FARMACIA
INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN DEL AGUA

**‘MEJORA EN LA TOLERANCIA A LA SEQUÍA DE
PLANTAS CON INTERÉS BIOTECNOLÓGICO EN
ZONAS DE SECANO’**

**‘ENHANCEMENT IN DROUGHT TOLERANCE OF
PLANTS WITH BIOTECHNOLOGICAL INTEREST IN
RAINFED AREAS’**

Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor con mención internacional por el
Licenciado en Ciencias Ambientales D. Juan Ignacio Vílchez Morillas

Fdo. D. Juan Ignacio Vílchez Morillas

Director de la Tesis:

Fdo. D. Maximino Manzanera Ruiz

Profesor Titular

Departamento de Microbiología

Universidad de Granada

El doctorando Juan Ignacio Vílchez Morillas y el director de la tesis Maximino Manzanera Ruiz, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del director de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada a 19 de Enero de 2016

Director de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

Fdo.:

Maximino Manzanera Ruiz

Juan Ignacio Vílchez Morillas

A mis padres, Juan Antonio y M^a del Carmen

A mis abuelas, Isabel y Carmen

“En el campo de la investigación el azar no favorece más que a los espíritus preparados”

Louis Pasteur

“Es de importancia para quien desee alcanzar una certeza en su investigación, el saber dudar a tiempo”

Aristóteles

"Y una vez que la tormenta termine, no recordarás como lo lograste, como sobreviviste. Ni siquiera estarás seguro si la tormenta ha terminado realmente. Pero una cosa si es segura. Cuando salgas de esa tormenta, no serás la misma persona que entró en ella. De eso se trata la tormenta"

Haruki Murakami

“Cada fracaso enseña al hombre algo que necesitaba aprender”

Charles Dickens

“No podemos elegir los tiempos en los que nos toca vivir, lo único que podemos hacer es decidir qué hacer con el tiempo que se nos ha dado”.

Gandalf en el ‘El Señor de los Anillos’

John Ronald Reuel Tolkien

“Imposible es como lo llaman hasta que alguien lo logra”

[...]

ÍNDICE

Agradecimientos	
Figuras y Tablas	
Siglas y Abreviaturas	
Resumen	
OBJETIVOS	1
INTRODUCCIÓN	5
1. La sequía.....	7
1.1. Efectos e impactos.....	7
1.2. La agricultura como caso de gestión del agua.....	7
2. Biofertilizantes y la sequía.....	9
2.1. Rizosfera.....	9
2.2. Los microorganismos y las plantas. Interacciones positivas.....	10
2.3. BPCPs y sus mecanismos de acción.....	13
2.3.1. Reguladores del crecimiento vegetal (RCV) o Fitohormonas.....	14
A. Ácido indol-acético (AIA). Auxinas.....	15
B. Giberelinas (GAs).....	16
C. Citoquininas (CKs).....	17
D. Brasinoesteroides (BS).....	17
E. Ácido abscísico (ABA).....	18
F. Etileno.....	19
a. Ácido aminocicloporpano-carboxilato (ACC).....	20
G. Ácido jasmónico (JA).....	21
H. Ácido salicílico (SA).....	21
2.4. Bacterias xerotolerantes. Protección frente a la sequía en plantas.....	22
2.4.1. Bacterias rizosféricas ante el estrés por desecación.....	22
2.4.2. Cepas xerotolerantes como biofertilizantes.....	23
2.4.3. Mecanismos de acción.....	23
A. Fitohormonas.....	23
B. Osmoprotectores, solutos compatibles y osmolitos.....	25
C. Moléculas anti-especies reactivas del oxígeno (ERO o ROS).....	26
D. Protección de estructuras.....	26
E. Señalización.....	27

3. Bioinoculantes contra el estrés. Condicionantes de uso.....	28
3.1. Función bioinoculante.....	28
3.2. Formulaciones.....	30
3.3. Bioseguridad.....	31
3.4. Monitorización.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
1. Cepas bacterianas.....	37
2. Medios de cultivo.....	38
2.1. Medios enriquecidos.....	39
2.2. Medios mínimos.....	39
2.2.1. Medio mínimo M9.....	39
2.2.2. Medio mínimo-triptófano.....	39
2.2.3. Medio mínimo con ácidos casamínicos (CAB).....	39
2.2.4. Medio Murashige y Skoog (MS).....	40
2.2.5. Medio PDA.....	40
2.3. Condiciones de cultivo.....	40
2.4. Conservación de cepas.....	40
3. Manipulación de ácidos nucleicos.....	41
3.1. Extracción de ADN o ARN total y cuantificación.....	41
3.2. Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa.....	41
3.3. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR).....	42
3.4. Conjugación de cepas con <i>gfp</i>	43
3.5. Amplificación y cuantificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real.....	43
4. Promoción del crecimiento y protección frente a la desecación en plantas.....	44
4.1. Especímenes vegetales.....	44
4.2. Pregerminado de semillas de plantas.....	45
4.3. Cultivo y cuidados de plantas.....	45
4.4. Protocolo de preparación de inóculos bacterianos para plantas.....	46
4.5. Toma de muestras de las plantas.....	47
5. Pruebas bioquímicas. Determinación de producción de fitohormonas.....	48
5.1. Determinación de trehalosa intracelular.....	48
5.2. Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT).....	48
5.3. Determinación de la producción de ácido indolacético (AIA).....	49

5.4. Determinación de la producción de ácido giberélico (GA ₃) y ácido abscísico (ABA).....	50
5.5. Determinación de la producción de ácido salicílico (SA).....	51
5.6. Medidas de etileno.....	52
5.7. Determinación de la actividad enzimática de la ACC desaminasa.....	52
6. Rutas involucradas en los estudios de proteómica.....	53
6.1. Obtención de biomasa de raíz inoculada.....	53
6.2. Análisis de la proteómica en la relación raíz-cepa bacteriana.....	53
6.2.1. Preparación de la muestras para análisis proteómico.....	53
6.2.2. Isoelectroenfoque (IEE o IEF).....	54
6.2.3. Electroforesis de la segunda dimensión.....	55
6.2.4. Adquisición y análisis de imagen y escisión del gel.....	55
6.2.5. Digestión de las proteínas en gel.....	56
7. Rutas involucradas en los estudios de metabolómica.....	57
7.1. Obtención de biomasa de raíz inoculada.....	57
7.2. Análisis metabolómico de raíces.....	57
7.2.1. Extracción, cuantificación e identificación de metabolitos secundarios.....	57
7.2.2. Cromatografía por GC-MS.....	58
8. Pruebas de bioseguridad.....	59
8.1. Ensayos de sensibilidad y metabolismo microbiano sobre <i>E. coli</i> MC4100 y <i>V. fischeri</i>	59
8.2. Ensayo de patogenicidad basado en <i>Caenorhabditis elegans</i>	60
8.3. Ensayos de ecotoxicidad en crisopas (<i>C. carnea</i>) y mariquitas (<i>A. bipunctata</i>).....	61
8.4. Ensayo de ecotoxicidad en lombrices de tierra (<i>Eisenia foetida</i>).....	61
8.5. DaphToxKit®: Bioensayo de toxicidad con <i>Daphnia magna</i>	62
8.6. Ensayo de patogenicidad con ratones (<i>Mus musculus</i> CD1).....	62
8.7. Efectos bacterianos sobre plantas de pimiento (<i>Capsicum annuum</i>).....	63
9. Formulación y monitorización de los efectos de protección y promoción del crecimiento en plantas...64	
9.1. Plásmido de entrega y plásmido auxiliador.....	64
9.2. Introducción de plásmidos y marcado de una bacteria.....	64
9.3. Comprobación del etiquetado.....	64
9.4. Visualización en microscopio de fluorescencia y de láser confocal de fluorescencia.....	65
9.5. Visualización en microscopio electrónico de barrido de presión variable (VP-SEM).....	65
9.6. Formación y cuantificación de biopelículas.....	66
9.7. Formulaciones de alginato.....	66
10. Programas informáticos utilizados y procesado estadístico.....	67

RESULTADOS.....	69
CAPÍTULO I.....	71
1. Promoción de crecimiento de plantas por acción bacteriana.....	73
2. Xeroprotección de plantas de pimiento por acción bacteriana.....	90
3. Protección de plantas por cepas taxonómicamente cercanas.....	109
3.1. Análisis taxonómico de las cepas tolerantes a la sequía. Árbol filogenético.....	109
3.2. Tolerancia a la desecación.....	110
3.3. Ensayos comparativos de protección frente a la sequía contra cepas tipo más cercanas....	112
4. Producción de compuestos protectores y fitohormonas por las cepas xerotolerantes.....	116
4.1. Compuestos xeroprotectores.....	116
4.1.1. Producción de trehalosa.....	116
4.1.2. Actividad superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT).....	118
4.2. Fitohormonas.....	121
4.2.1. Auxinas/ácido indolacético (IAA).....	122
4.2.2. Ácido giberélico (GA ₃) y ácido abscísico (ABA).....	123
4.2.3. Producción de ácido salicílico (SA).....	125
4.2.4. Producción de etileno y sus precursores.....	126
4.2.4.1. Emisión de etileno por plantas inoculadas.....	127
4.2.4.2. Actividad ACC-desaminasa.....	128
4.3. Análisis de correlación.....	129
CAPÍTULO II.....	131
1. Proteómica de la interacción planta-microorganismo.....	134
1.1. Proteómica en raíces de pimiento (<i>C. annuum</i>)	134
1.2. Proteómica de <i>Microbacterium sp</i> , 3J1 en sequía (PEG).....	143
2. Metabolómica de la interacción planta-microorganismo.....	149
2.1. Metabolómica de raíces de pimiento (<i>C. annuum</i>).....	149
2.2. Metabolitos producidos por la cepa <i>Microbacterium sp</i> , 3J1 en sequía.....	165

CAPÍTULO III.....	177
1. Ensayos con organismos vivos.....	179
1.1. Ensayos de sensibilidad microbiana con <i>E.coli</i> MC4100.....	179
1.2. Ensayo de patogenicidad con <i>Caenorhabditis. elegans</i>	181
1.3. Ensayos de ecotoxicidad con crisopas y mariquitas.....	186
1.3.1. Bioensayos con crisopas(<i>Chrysoperla carnea</i>).....	186
1.3.2. Bioensayos con mariquitas (<i>Adalia bipunctata</i>).....	189
1.4. Ensayo de ecotoxicidad con lombrices de tierra (<i>Eisenia foetida</i>).....	192
1.5. Ensayo de análisis de la toxicidad por Microtox®: <i>Vibrio fischeri</i>	198
1.6. Ensayo de toxicidad por DaphToxKit®: <i>Daphnia magna</i>	200
1.7. Ensayo de patogenicidad con ratones de laboratorio (<i>Mus musculus</i> CD1).....	202
1.8. Ensayo de efectos bacterianos sobre plantas de pimiento (<i>C. annuum</i>).....	206
2. Índice de seguridad ambiental y humana (ISAH).....	211
CAPÍTULO IV.....	219
1. Ensayos en invernadero.....	221
1.1. Ensayos en invernadero.....	221
1.2. Xeroprotección de plantas de pimiento por acción bacteriana.....	227
2. Ensayos de campo.....	234
2.1. Promoción de crecimiento de plantas por acción bacteriana.....	235
2.2. Xeroprotección de plantas de pimiento por acción bacteriana.....	241
CAPÍTULO V.....	247
1. Mecanismos de interacción planta-microorganismo.....	250
1.1. Interacción planta-microorganismo por microscopía electrónica de barrido de presión variable (VP-SEM).....	250
1.2. Formación de biopelículas por la cepa <i>Microbacterium sp.</i> 3J1.....	266
1.3. Seguimiento de la colonización.....	268
1.3.1. Conjugación y visualización de cultivos puros.....	269
1.3.2. Interacción del microorganismo en la planta por análisis de microscopía de fluorescencia.....	271
1.3.3. Detección de <i>Microbacterium sp.</i> 3J1 en la planta por microscopía confocal de láser de barrido (CLSM).....	272
2. Comparación de las formulaciones inoculantes.....	278

3. Seguimiento de la cepa <i>Microbacterium sp.</i> 3J1.....	283
3.1. Seguimiento de la bacteria en suelo por amplificación cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) del gen <i>gfp</i>	283
3.1.1. Cultivos puros.....	283
3.1.2. Suelo.....	285
3.1.3. Planta.....	287
 DISCUSIÓN.....	 289
 CONCLUSIONES.....	 321
 BIBLIOGRAFÍA.....	 325
 FINACIACIÓN.....	 357
 PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	 361

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar agradeciendo a Dios que haya hecho posible todo esto. Parecía imposible, pero fue...sino, no se explica.

Especialmente quiero agradecer a la doctora Concepción Calvo Sainz, como directora del Instituto del Agua, y al doctor Jesús Juan González López, como responsable del grupo RNM-270, el haberme permitido hacer uso de las instalaciones del centro y de la financiación del grupo para llevar a cabo la investigación reflejada en esta tesis. En este centro me he sentido como en casa gracias al trato atento y personal dispensado desde las autoridades del mismo hasta cada uno de mis compañeros y técnicos de laboratorio.

A Maximino Manzanera, mi tutor y mentor. Te agradezco las horas, días, meses y años de dedicación y confianza desde que en mayo de 2009 decidiera comenzar a cimentar mi carrera investigadora con el trabajo fin de carrera. Ahora, casi siete años después, puedo afirmar que volvería a hacerlo. Dicen que si no acabas cabreado con tu director de tesis, no ha sido una buena tesis. Corroboro que no sólo puede hacerse llevando una cordialidad sana, sino también siendo amigos y compañeros. Muchas gracias, Maxi.

A Ginés, nuestro técnico. Por los momentos juntos y el buen rollo, por estar ahí y darme ánimos, muchas gracias, tío. A Pedro, gracias por los roscos navideños, las risas y las charlas. Más que un proveedor, un amigo.

A todos mis compañeros del Instituto del Agua, tanto a los que estuvieron en mis inicios, como a los que me ven acabar este periplo. Soy lo que soy gracias a ellos. Mis compañeros Juan Jesús, Rafa, Andrea, Imane, Luis, Lucía, Cadilla, Álex, Patri, Paula, María y Cinta me vieron dar mis primeros pasos, torpes en su mayoría, pero tuvieron paciencia para enseñarme. De esas enseñanzas hice uso para enseñar a otros, pero nunca dejé de aprender de los compañeros que fueron llegando como Alfonso, Tatiana, Vania, Lucero, Eli, Bea, Alessandra, Chiara e Isa. Os doy las gracias a todos por vuestra confianza y cariño. Para el final dejo a mi compañera Cristina. No puedo negar que sea mi ojito derecho y es que con poca gente puedo haberme entendido tan bien, haberme reído tanto y haber superado mejor los malos momentos, gracias compi, eres muy grande.

También quiero agradecer el apoyo y confianza de compañeros de otros centros en los que he trabajado, como a Eli, Olga y Bea de la EEZ, gracias a vosotras aprendía muchas técnicas y a preparar cupcakes. A Richad, John, Oifa, Guio, David, Kieran y todos mis compañeros del IT Carlow (Irlanda) por cuidarme y ayudarme tanto en mi primera estancia de investigación en el extranjero y por mostrarme su maravilloso país del que

Agradecimientos

aún hoy en día sigo enamorado. A Maren y Karsten de la Universität Bielefeld (Alemania), por enseñarme tanto en tan poco tiempo y acogerme como a uno más. Gran mundial el que os llevasteis en 2014 y que celebré como uno más. Por otra parte, agradecer a mis técnicos y técnicas (Patri, Fran, Andrés, los Manolos, Diego, etc.). Tanto os he enseñado como he aprendido de vosotros/as, muchísimas gracias por vuestro tiempo y paciencia, espero haberos inculcado bien cómo se debe trabajar en un laboratorio. También quiero agradecer a mis alumnos y alumnas de prácticas de Farmacia y de Tecnología de los alimentos por ayudarme a crecer como profesor y por tantos momentos curiosos y divertidos, especialmente a Juanjo y a Bea, que siempre tendrán un hueco especial en mis vidas como amigos.

A mis amigos de toda la vida, Ferrándiz, Gerardo, Javi, Edu, Cristian, Ye, Luis, Álex, Ramiro, Xavi, Guille, Celia... siempre estáis ahí aunque haya épocas en las que nos vemos menos, siempre habéis sido mi punto de apoyo y el grupo al que acudir. Muchísimas gracias por todo, nos tomaremos varias birras a vuestra salud.

A toda mi buena gente del baile. Para mí era un mundo desconocido y que no quería explorar, ahora ya casi no sé vivir sin él. Gracias especialmente a Javi 'El Chino', Ester, Raquel, Fer, David, María, Lucía, Eva, Juan, Javi, Ale, Andrea, Patri, Antonio, Britt, Gianni, Marina, Silvia, etc. Gracias por descubrirme este mundo y por los grandes momentos que ya nunca podremos olvidar. Especialmente a Cris y a Dennis, gracias por aguantar lo repetido que he sido con mi tesis y mis follones, por esas noches de cine y esas fiestas, por tanto momentos, ¡os quiero retards!

Por último, a toda mi familia, papá, mamá, Javi e Inma. A mi tías Inma, Elena, M^a Trini y Mercedes, y a mis tíos Salva, Eduardo, Carlos... A todos mis primos y primas Inés, Raquel, Edu, Fran, Álex, Adrián, Elena, Esmeralda, Luis, Carlos, Manolo, Isa, Jesús, Pepe, Susana, Miriam, Alicia, Margari, Jesús, Pablo, Bea... somos muchos en esta gran familia, gracias a eso nunca me han faltado palabra de aliento y ánimo. Me habéis hecho ser la persona que soy y todo este trabajo que aquí recojo, en parte, también es vuestro. Por todos vosotros me he mantenido fuerte y constante. Sé que siempre vais a estar ahí por mí. Todos estaréis siempre en mi corazón, os estaré siempre agradecido y en deuda. Tita Inma, tú la que más, y lo sabes. Por último quiero agradecer a Cristina. Por ti, para ti y contigo. Muchas gracias. Te quiero.

FIGURAS Y TABLAS

Índice de Figuras

- Figura 1. Zonas de influencia de microorganismos beneficiosos.** (Pág. 12).
- Figura 2. Biosíntesis de AIA por bacterias.** (Pág.15).
- Figura 3. Biosíntesis de Giberelinas.** (Pág. 16).
- Figura 4. Biosíntesis de la zeatina.** (Pág. 17).
- Figura 5. Biosíntesis de brasinoesteroides.** (Pág. 18).
- Figura 6. Biosíntesis de ácido abscísico.** (Pág. 18).
- Figura 7. Ciclo de Yang.** (Pág. 19).
- Figura 8. Degradación de la molécula de ACC.** (Pág. 20).
- Figura 9. Biosíntesis del ácido jasmónico.** (Pág. 21).
- Figura 10. Biosíntesis del ácido salicílico.** (Pág. 21).
- Figura 11. Principales fitohormonas aportadas por BPCPs en condiciones de estrés hídrico.** (Pág. 25).
- Figura 12. Esquematización de los tansposones en mini-Tn7.** (Pág. 43).
- Figura 13. Detalle de las distintas tomas de parámetros.** (Pág. 47).
- Figura 14. Estado a los 33 días de las plantas inoculas e incubadas en condiciones de riego.** (Pág. 75).
- Figura 15. Altura tallo de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego.** (Pág. 77).
- Figura 16. Longitud de la raíz de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego.** (Pág. 79).
- Figura 17. Peso fresco de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego.** (Pág. 80).
- Figura 18. Peso seco de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego.** (Pág. 82).
- Figura 19. Peso totalmente túrgido de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego.** (Pág. 83).
- Figura 20. Potencial de recuperación de agua de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. (**)** (Pág. 85).
- Figura 21. Contenido relativo de agua en plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego.** (Pág. 87).

Figura 22. Índice de retención de agua de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes a los diferentes tiempos del ensayo en condiciones de riego. (Pág. 89).

Figura 23. Aspecto de plantas inoculadas, a los 33 días sin riego. (Pág. 91).

Figura 24. Peso fresco de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. (Pág. 94).

Figura 25. Peso seco de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes a los diferentes tiempos del ensayo en condiciones de sequía. (Pág. 96).

Figura 26. Peso totalmente túrgido de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. (Pág. 98).

Figura 27. Potencial de recuperación de agua (PRA) de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. (Pág. 100).

Figura 28. Contenido relativo de agua (CRA) en plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. (Pág. 102).

Figura 29. Índice de Recuperación de agua de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. (Pág. 104).

Figura 30. Altura del tallo de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de estrés hídrico. (Pág. 106).

Figura 31. Longitud de la raíz de las plantas de pimiento inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. (Pág. 108).

Figura 32. Árbol filogenético por método del vecino más próximo para las cepas con mejores efectos de protección frente a la sequía en plantas. (Pág. 110).

Figura 33. Tolerancia a la desecación de las cepas filogenéticamente más cercanas a las cepas en estudio. (Pág. 111).

Figura 34. Peso fresco de plantas de pimiento inoculadas en condiciones de estrés hídrico. (Pág. 113).

Figura 36. Peso seco de plantas inoculadas con cada cepa en condiciones de estrés hídrico. (Pág. 114).

Figura 37. Contenido relativo de agua en plantas inoculadas con las las cepas en estudio y su cepas taxonómicamente más cercanas. (Pág. 115).

Figura 38. Producción de trehalosa por las cepas xerotolerantes. (Pág. 118).

Figura 39. Actividad superóxido dismutasa por las cepas xerotolerantes. (Pág. 120).

Figura 40. Actividad catalasa en las cepas xerotolerantes. (Pág. 121).

Figura 41. Producción de ácido indolacético-auxinas por las cepas xerotolerantes. (Pág. 123).

Figura 42. Producción de ácido giberélico-giberelinas de los cultivos bacterianos. (Pág. 124).

Figura 43. Producción de ácido abscísico por las cepas xerotolerantes. (Pág. 125).

Figura 44. Producción de ácido salicílico por las cepas xerotolerantes. (Pág. 126).

Figura 45. Producción de etileno por plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes y sometidas a sequía. (Pág. 128).

Figura 46. Producción de α -cetobutirato en cultivos con cepas xerotolerantes. (Pág. 129).

Figura 47. Análisis de correlación estadística. (Pág. 130).

Figura 48. Proteomas promedio en geles 2D SDS-PAGE. (Pág. 136).

Figura 49. Selección e identificación de los *spots* sobre geles 2D. (Pág. 137).

Figura 50. Proteomas promedio en geles 2D SDS-PAGE. (Pág. 144).

Figura 51. Selección e identificación de los *spots* sobre geles 2D. (Pág. 145).

Figura 52. Cromatogramas de las raíces de pimiento. (Pág. 150).

Figura 53. Metabolomas de concentraciones relativas de cada condición sometida a sequía. (Pág. 152).

Figura 54. Identificación y cuantificación de metabolitos. (Pág. 155).

Figura 55. Análisis de componentes y funciones de los metabolitos detectados en la interacción planta-microorganismo. (Pág. 163).

Figura 56. Cuantificación de metabolitos identificados. (Pág. 167).

Figura 57. Análisis de componentes y funciones de los metabolitos detectados en cultivos puros de *Microbacterium* sp. 3J1 expuestos a PEG. (Pág. 173).

Figura 58. Supervivencia de *E. coli* MC4100 a la exposición de sobrenadantes de cultivos de aislados bacterianos durante 1,5h. (Pág. 180).

Figura 59. Número de huevos de *C. elegans* en presencia de distintas cepas microbianas. (Pág. 182).

Figura 60. Número de juveniles de *C. elegans* en presencia de distintas cepas microbianas. (Pág. 183).

Figura 61. Número de adultos de *C. elegans* en presencia de distintas cepas microbianas. (Pág. 184).

Figura 62. Número de individuos muertos de *C. elegans* en presencia de distintas cepas microbianas. (Pág. 185).

Figura 63. Peso de crisopas alimentadas con dieta suplementada con las cepas en ensayo. (Pág. 187).

Figura 64. Longitud de crisopas alimentadas con dieta suplementada con las cepas en ensayo. (Pág. 188).

Figura 65. Mortalidad en crisopas alimentadas con dieta suplementada con las cepas en ensayo. (Pág. 189).

Figura 66. Peso de mariquitas alimentadas con dieta suplementada con las cepas en ensayo. (Pág. 190).

Figura 67. Longitud de mariquitas alimentadas con dieta suplementada con las cepas en ensayo. (Pág. 191).

Figura 68. Mortalidad en mariquitas alimentadas con dieta suplementada con las cepas en ensayo. (Pág. 192).

Figura 69. Peso de *Eisenia foetida* expuesta a las diferentes condiciones de ensayo. (Pág. 194).

Figura 70. Longitud de *Eisenia foetida* incubada en presencia de distintas cepas bacteriana. (Pág. 195).

Figura 71. Número de neonatos de *Eisenia foetida* incubada en presencia de distintas cepas bacteriana. (Pág. 196).

Figura 72. Número de ootecas contabilizadas de *Eisenia foetida* incubada en presencia de distintas cepas bacteriana. (Pág. 198).

Figura 73. EC₅₀ sobre *Vibrio fischeri* obtenido en ensayo de Microtox® para los diferentes sobrenadantes empleados en el ensayo. (Pág. 200).

Figura 74. EC₅₀ sobre *Daphnia magna* obtenido en ensayo de DaphToxKit® para los diferentes sobrenadantes empleados en el ensayo. (Pág. 202).

Figura 75. Peso de ratones (*Mus musculus* CD1) inoculados. (Pág. 204).

Figura 76. Incremento de peso en ratones (*Mus musculus* CD1) inoculados con las cepas xerotolerantes. (Pág. 205).

Figura 77. Muertes en ratones (*Mus musculus* CD1) inoculados con las cepas xerotolerantes. (Pág. 206).

Figura 78. Peso seco (PS) de plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) inoculadas con cultivos bacterianos. (Pág. 208).

Figura 79. Altura de tallo al final el ensayo de plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) inoculadas con cultivos bacterianos. (Pág. 209).

Figura 80. Contenido relativo de agua (CRA) alcanzado a punto final el ensayo por plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) inoculadas con cultivos bacterianos. (Pág. 210).

Figura 81. Índice de Seguridad Ambiental y Humana (ISAH) para cepas usadas como BPCP. (Pág. 217).

Figura 82. Estado a los 60 días de las plantas inoculadas e incubadas en condiciones de riego. (Pág. 222).

Figura 83. Humedad registrada en los maceteros bajo riego periódico. (Pág. 223).

Figura 84. Altura del tallo de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. (Pág. 224).

Figura 85. Longitud de la raíz de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. (Pág. 224).

Figura 86. Peso fresco de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. (Pág. 225).

Figura 87. Peso seco de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. (Pág. 226).

Figura 88. Peso totalmente túrgido de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. (Pág. 226).

Figura 89. Contenido relativo de agua en plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. (Pág. 227).

Figura 90. Estado a los 60 días de las plantas inoculadas e incubadas en condiciones de sequía. (Pág. 228).

Figura 91. Humedad registrada en los maceteros en condiciones de sequía. (Pág. 229).

Figura 92. Peso fresco de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. (Pág. 230).

Figura 93. Peso seco de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. (Pág. 230).

Figura 94. Peso totalmente túrgido de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. (Pág. 231).

Figura 95. Contenido relativo de agua en plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. (Pág. 232).

Figura 96. Altura del tallo de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. (Pág. 233).

Figura 97. Longitud de la raíz de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. (Pág. 233).

Figura 98. Vista aérea de las zonas de siembra en campo. (Pág. 234).

Figura 99. Distribución de la siembra en campo. (Pág. 235).

Figura 100. Humedad registrada en suelo bajo riego periódico. (Pág. 236).

Figura 101. Altura del tallo de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. (Pág. 237).

Figura 102. Longitud de la raíz de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. (Pág. 238).

Figura 103. Peso fresco de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. (Pág. 238).

Figura 104. Peso seco de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. (Pág. 239).

Figura 105. Peso totalmente túrgido de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. (Pág. 240).

Figura 106. Contenido relativo de agua en plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. (Pág. 241).

Figura 107. Humedad registrada en suelo bajo condiciones de sequía. (Pág. 242).

Figura 108. Peso fresco de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. (Pág. 243).

Figura 109. Peso seco de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. (Pág. 243).

Figura 110. Peso totalmente túrgido de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. (Pág. 244).

Figura 111. Contenido relativo de agua en plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. (Pág. 245).

Figura 112. Altura del tallo de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. (Pág. 246).

Figura 113. Longitud de la raíz de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. (Pág. 246).

Figura 114. Micrografías electrónicas de barrido de raíces de pimiento inoculadas con *P. putida* KT2440 a las 1-2 h. (Pág. 254-255).

Figura 115. Micrografías electrónicas de barrido de raíces de pimiento inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 a las 1-2h. (Pág. 256-257).

Figura 116. Micrografías electrónicas de barrido de raíces de pimiento inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 a las 1-2 h. (Pág. 258-259).

Figura 117. Micrografías electrónicas de barrido de raíces de pimiento inoculadas con *P. putida* KT2440 a las 3-5 h (A y B) y a las 24 h (C y D). (Pág. 260-261).

Figura 118. Micrografías electrónicas de barrido de raíces de pimiento inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 a las 3-5 h. (Pág. 262-263).

Figura 119. Micrografías electrónicas de barrido de raíces de pimiento inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 a las 24 h. (Pág. 264-265).

Figura 120. Biopelículas de las cepas estudiadas adheridas en tubos de ensayo. (Pág. 267).

Figura 121. Absorbancia de las biopelículas formadas en relación con la absorbancia del cultivo. (Pág. 267).

Figura 122. Fluorescencia de la cepa transformada. (Pág. 269).

Figura 123. PCR del gen *gfp*. (Pág. 270).

Figura 124. Identificación de *Microbacterium sp.* 3J1-GFP en por microscopía de fluorescencia. (Pág. 272).

Figura 125. Microscopía confocal de una raíz de pimiento inoculada con *Microbacterium sp.* 3J1-GFP. (Pág. 274).

Figura 126. Micrografías confocal y óptica de raíces de pimiento inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1. (Pág. 276-277).

Figura 127. Aspecto externo de las esferas de alginato. (Pág. 279).

Figura 128. Peso fresco (1), contenido relativo de agua (2) y longitud del tallo (3) de plantas de pimiento inoculadas con diferentes formatos. (Pág. 282).

Figura 129. Rectas patrón de ADN. (Pág. 284).

Figura 130. Concentración de ADN amplificado por punto de muestreo en suelo. (Pág. 286).

Figura 131. UFC de *Microbacterium sp.* 3J1-GFP por gramo de suelo. (Pág. 287).

Figura 132. Seguimiento de *Microbacterium sp.* 3J1-GFP en plantas en macetero con inoculante por RT-qPCR. (Pág. 288).

Figura 133. Posibles alternativas al ciclo de Yang mediadas por *Microbacterium sp.* 3J1. (Pág. 299).

Figura 134. Ruta de producción de trehalosa en pimiento. (Pág. 301).

Figura 135. Producción de trehalosa en sequía. (Pág. 303).

Figura 136. Ruta de producción de mio-inositol en pimiento. (Pág. 304).

Figura 137. Ruta de producción de prolina en pimiento. (Pág. 305).

Figura 138. Rutas predichas para fitohormonas desde el genoma de *Microbacterium* sp. 3J1. (Pág. 309).

Figura 139. Ruta de los ácidos felúrico y sinápico. (Pág. 313).

Índice de Tablas

Tabla 1. Cepas control. (Págs. 37-38).

Tabla 2 - Oligonucleótidos utilizados en PCR, qPCR y RT-qPCR. (Pág. 42).

Tabla 3. Proteoma identificado de las raíces no inoculadas e inoculadas bajo condiciones de sequía. (Pág. 141).

Tabla 4. Proteoma identificado de los cultivos puros de *Microbacterium sp.* 3J1 con PEG 5% y PEG 50% como condiciones artificiales de sequía. (Pág. 147).

Tabla 5. Metabolitos concentrados en raíces inoculadas respecto a no inoculadas por grupos químicos y función de respuesta ante sequía. (Pág. 158).

Tabla 6. Metabolitos concentrados en raíces no inoculadas respecto a inoculadas por grupos químicos y función de respuesta ante sequía. (Pág. 159).

Tabla 7. Metabolitos concentrados en los sobrenadantes de los cultivos expuestos a PEG 5% y PEG 50% por grupos químicos y función de respuesta ante la sequía. (Pág. 168).

Tabla 8. Metabolitos concentrados la Fracción intracelular de los cultivos expuestos a PEG 5% y PEG 50% por grupos químicos y función de respuesta ante la sequía. (Pág. 169).

Tabla 9. Puntuación máxima y organización de categorías y parámetros integrados en el cálculo de ISAH. (Pág. 213).

Tabla 10. Índice de Seguridad Ambiental y Humana (ISAH). (Págs. 215-216).

Tabla 11. Patrones para qPCR. (Pág. 283).

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ABA – Ácido abscísico

Abs. – Absorbancia

ACC – Ácido aminociclopropano carboxílico

ACCD – ACC desaminasa

ACP o PCA – Análisis de componentes principales o *Princial components analysis*

ADN o DNA – Ácido desoxirribonucleico

ADNc – Ácido desoxirribonucleico complementario

AIA o IAA – Ácido indolacético o *Indoleacetic acid*

ANCOVA – Análisis de la covarianza o *Analysis of co-variance*

ANOVA – Análisis de la varianza o *Analysis of variance*

ARN o RNA – Ácido ribonucleico

ARNm – Ácido ribonucleico mensajero

ARNr – Ácido ribonucleico ribosómico

ARNt – Ácido ribonucleico de transferencia

ARN-Seq – Secuenciación de ARN o *RNA Sequencing*

ATPasa – Adenosin trifosfato hidrolasas

BCA – Bicarbonato amónico

BHT – Hidroxitolueno butilado

BLAST – *Basic local alignment search tool*

BPCP – Bacteria promotora del crecimiento en plantas

BRHEP – Bacterias de reguladoras de la homeostasis en estrés de plantas

BS – Brasinoesteroides

BTDP o *RDTE* – Bacterias que mejoran la tolerancia a la desecación en plantas o *Rhizobacterial drought tolerance enhancers*

CAB – Medio Mínimo con ácidos casamínicos

CAT – Catalasa

CE – Comisión europea

CHCA – Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico

CIB – Centro de investigaciones biomédicas

CIC – Centro de instrumentación científica

CK – Citoquininas

CLSM – Microscopio de escaneo por láser confocal o *Confocal laser scanning microscopy*

Col. – Colaboradores

Cp – Punto de corte (o cruce) o *Crossing point*

CoA – Coenzima A

CRA – Contenido relativo de agua

CSIC – Consejo superior de investigaciones científicas

CVDO₆₀₀ – Densidad óptica a 600 nm en cristal violeta

DAPI – 4', 6'-diamino-2-fenilindol

DE – Desviación estándar

DMSZ – *Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig*

dNTP – Desoxinucleótidos fosfato o *Deoxynucleotide phosphate*

DO – Densidad óptica

DO₆₀₀ – Densidad óptica a 600 nm

DTT – Ditioneitol

E – Evaporación

Ea – Esferas de alginato

EC₅₀ – Concentración efectiva máxima media o *Half maximal effective concentration*

EEZ – Estación experimental Zaidín

EDTA – Ácido etildiaminotetraacético o *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EMBL-EBI – *European molecular biology laboratory-european bioinformatics institute*

EPS – Exopolisacáridos

ERO – Especies reactivas del oxígeno

ET – Evapotranspiración

FID – Detector de ionización de llama o *Flame ionization detector*

FPKM – Fragmentos por kilobases del exón por millón de fragmentos mapeados o asignados o *Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped*

GA o GA₃ – Ácido giberélico

GABA – Ácido gamma-aminobutírico

GC-MS – Cromatografía de gases masas o *Gas chromatography-mass spectrometry*

GFP – Proteína verde fluorescente o *Green fluorescent protein*

GRAS – Generalmente reconocida como segura o *Generally recognised as safe*

HPLC – Cromatografía líquida de alta eficacia o *High performance liquid chromatography*

IAA – Iodacetamida o *Isoelectric focusing*

IEE o IEF – Isoelectroenfoque

IPBLN – Instituto de parasitología y biomedicina ‘López-Neyra’

IRA – Índice de retención de agua

ISAH o *EHSI* – Índice de seguridad humana y ambiental o *Environmental and Human Safety Index*

JA – Ácido jasmónico

MA – Micorriza arbuscular

MALDI-TOF/TOF – Análisis matricial de desorción por laser con inoización basada en tiempo de vuelo y tiempo de vuelo o *Matrix Assists in Laser Desorption/Ionization based on Time Of Flight-Time Of Flight*

Min. – Minutos

MM-M9 – Medio mínimo M9

MS – Medio mínimo ‘Muracshige y Skoog’

MS – Masas

MS/MS – Masas-Masas

NCBI – *National center for biotechnology information*

NBT – Nitro azul de tetrazolium

NIST – National Institute of Standards and Technology

OECD – Organización para la cooperación y el desarrollo económicos u *Organisation for economic co-operation and development*

ORF – Marcos de lectura abiertos u *Open reading frame*

Pá./Págs. – Página/s.

PAL – Fenilalanina amonio-liasa

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa o *Polymerase chain reaction*

PDA – Medio *Potato dextrose agar*

PEG – Polietilenglicol

PF – Peso fresco

PGPR – *Plant growth-promoting rhizobacteria*

PMF – Identificación por huella peptídica o *Peptide mass fingerprinting*

PP2A – Fosfatasas tipo 2A

PSHB – *Plan stress homeostasis-regulating bacteria*

PS – Peso seco

PRA – Potencial de recuperación de agua

PTT – Peso totalmente túrgido

qPCR o RT-qPCR – Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real o *Real time quantitative polymerase chain reaction*

RCV – Regulador del crecimiento vegetal

RDTE – *Rhizobacterial drought tolerance enhancers*

ROS – *Reactive oxygen species*

SA – Ácido salicílico

SDS-PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico o *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*

SAM – S-adenosilmetionina

SAH – S-adenosilhomocisteína

SOD – Superóxido dismutasa

T – Transpiración

TAE – Tampón tris-acetato-EDTA

TLC – Cromatografía de capa fina o *Thin layer chromatography*

TSA – Medio *Tryptone soya agar*

TSB – Medio *Tryptone soya broth*

U_{CAT} – Unidades de enzima catalasa

UFC – Unidades formadoras de colonia

UGR – Universidad de Granada

U_{CAT} – Unidades de enzima superóxidodismutasa

VP-SEM o ESEM – Microscopio de barrido electrónico de presión variable (o ambiental) o *Variable pressure (environmental) scanning electron microscope*

RESUMEN

En la presente tesis doctoral hemos estudiado la mejora a la tolerancia a la sequía de plantas con interés agrícola mediante herramientas biotecnológicas.

A lo largo del presente trabajo se comprobó el efecto de una colección de bacterias xerotolerantes sobre plantas como inoculantes, para estudiar si existe una correlación entre el nivel de tolerancia a la falta de agua del microorganismo, con el nivel de protección frente a la sequía que transfiere el microorganismo a la planta. Para este estudio se analizó la capacidad de promover el crecimiento de las plantas por parte de los microorganismos en ausencia de estrés hídrico (su actividad como Bacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas o BPCP), así como de protección de las mismas frente a la sequía (Bacterias Potenciadoras de la Tolerancia a Sequía o BPTS). Para este estudio se emplearon las cepas microbianas *Microbacterium sp.* 3J1, *Arthrobacter koreensis* 5J12A, *Rhodococcus sp.* 4J2A2, *Leucobacter sp.* 4J7B1 y *Arthrobacter siccitolerans* 4J27, por presentar una elevada supervivencia a la desecación de más del 20%. Para evaluar los efectos de promoción del crecimiento de plantas y de protección de estas plantas contra la sequía sobre distintas especies vegetales se emplearon plantas de pimiento (*Capsicum annuum* var. *annuum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), maíz (*Zea mays*) y soja (*Glycine max*). Así mismo, se identificaron las cepas taxonómicamente más cercanas a aquellas que mayor protección contra la sequía sobre las plantas generaban y se estudió de nuevo si existía una correlación entre aquellas cepas más tolerantes a la sequía con aquellas que más protegían a las plantas contra la falta de agua. Por último, se realizó un estudio bioquímico del perfil de moléculas implicadas en procesos de fitoprotección frente a la sequía por parte de microorganismos (trehalosa, actividades superóxido dismutasa y catalasa, ácido indolacético, ácido abscísico y otras fitohormonas) para identificar si existe una correlación entre la producción de las mismas y los efectos observados en las plantas.

Posteriormente se estudiaron los mecanismos moleculares por los que las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 alcanzaron un elevado grado de promoción en su crecimiento y resistencia frente a la sequía. Este estudio se realizó mediante análisis proteómico y metabolómico. De entre las cuatro especies vegetales estudiadas en el capítulo anterior, seleccionamos la planta de pimiento como modelo tanto por contar con amplia difusión en la literatura científica en proteómica y metabolómica, como por contar con su genoma completamente secuenciado y accesible.

Los estudios de proteómica se llevaron a cabo mediante ensayos basados en geles bidimensionales (SDS-PAGE 2D), mientras que los estudios de metabolómica se realizaron mediante cromatografía de gases masas (GC-MS). Gracias a ambos tipos de estudios se pudo caracterizar las rutas involucradas en la resistencia a la sequía. Tanto los estudios de proteómica como los de metabolómica se realizaron sobre plantas de pimiento, en condiciones de sequía, y en presencia del microorganismo *Microbacterium sp.* 3J1. En estas condiciones se utilizaron cultivos adicionados de polietilen glicol (PEG) al 5% y al 50% para simular condiciones de escasez de agua propias de un suelo no encharcado y de una sequía intensa, respectivamente.

Más adelante, se analizó el grado de bioseguridad de las cepas xerotolerantes estudiadas, ya que cualquier producto microbiológico que se libere al medio ambiente debe ser inocuo y seguro tanto para el ser humano como para el medio ambiente. Dada la diversidad de pruebas propuestas y la falta de un marco regulador que indique los análisis necesarios para garantizar la inocuidad de microorganismos que han de usarse como agente inoculante sobre plantas, se planteó combinar una serie de ensayos basados en modelos de organismos presentes en el medio ambiente que pudieran verse potencialmente afectados, así como de modelos de infección para el ser humano. La combinación de ensayos de bioseguridad con organismos tales como *Caenorhabditis elegans*, *Eisenia foetida*, *Mus musculus* o *Daphnia magna*, sirvieron de modelo para reconocer posibles interferencias a cualquier nivel trófico del suelo, incluido el humano, que pudiera causar el uso de las cepas en estudio en el caso de liberarse al medio ambiente. Como resultado final establecimos un valor numérico indicativo del nivel de seguridad de las cepas que se denominó Índice de Seguridad Humana y Ambiental (ISHA). Como controles para los distintos ensayos descritas como bacterias promotoras del crecimiento en plantas se emplearon así mismo las cepas *Pseudomonas putida* KT2440, *Burkholderia cepacia* CC-A174, *Serratia marcescens* CTC 10211, *Serratia entomophila* CIP 102919, *Serratia proteamaculans* NCTN 394 y *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Además de estas cepas se incluyó una colección de cepas descritas como promotoras del crecimiento de plantas tales como *Pseudomonas fluorescens* IABPF05, *Azotobacter vinelandii* IABAV02, *Rhizobium leguminosarum* IABRL05 y *Bacillus subtilis* IABBS05.

Tras comprobar que las cepas estudiadas mostraron unos niveles de bioseguridad altos, se decidió llevar a cabo ensayos de invernadero y campo. Como planta modelo, se

empleó el maíz (*Zea mays*) al tratarse de una de las especies ensayada con mejores resultados, así como una de las plantas con mayor implicación en sectores agrícolas, por su interés tanto alimenticio como bioenergético. En estos ensayos en invernadero así como en los ensayos de campo se emplearon las cepas xerotolerantes con mejores resultados en laboratorio (*Microbacterium* sp. 3J1 y *A. koreensis* 5J12A, empleando cápsulas plásticas sobre semillas como formato de inoculación, tanto para los ensayos de invernadero como para la siembra en campo.

Los resultados de promoción del crecimiento y protección frente a la sequía en plantas por parte de las cepas xerotolerantes obtenidos en laboratorio (en condiciones ambientales controladas) no coincidieron con los obtenidos en invernadero y campo (donde el control ambiental está más limitado). Para la mejora de los resultados en condiciones ambientales poco controladas se buscó una formulación alternativa a la formulación líquida, donde la conservación del número de células viables en el tiempo, la contaminación y el almacenamiento del producto resultan en peores resultados. Para identificar qué formulación alternativa se adaptaba mejor al microorganismo *Microbacterium* sp. 3J1, se estudió los mecanismos de interacción y colonización del microorganismo sobre la planta. Además, para identificar el microorganismo en su interacción con la planta y el tipo de relación que mantenían se marcó a las bacterias con proteína verde fluorescente. Con este marcaje pudimos determinar el tiempo mínimo de presencia del inoculante en el suelo, las condiciones en que se lleva a cabo dicho contacto y los tiempos empleados en las distintas fases de colonización e interacción con la planta. Como alternativa de inoculación se empleó alginato, y se estudió la calidad del inoculante mediante el análisis del número de células viables en el tiempo.

Along this thesis we studied the improvement to the drought tolerance of plants with agricultural interest using biotechnological tools based on several bacterial strains.

Our studies were based on a collection of bacteria isolated as drought tolerant as all of them had been isolated employing a selective method developed in our lab. This method consist in alter growth conditions of isolates (obtained from roots and closer soil) by applying chloroform in contact as desiccant selective agent. Throughout this work the effect of these strains as growth promoters and as drought protectors over plants as inoculants were found. We studied whether there is a correlation between the levels of tolerance in the strains, and the levels of protection against drought transferred by the microorganism to the plant. For this study, the ability to promote the growth of plants by microorganisms in the absence of water stress (his activity as growth-promoting bacteria or PGPR), as well as protecting them against drought was analyzed. For this study the microbial strains *Microbacterium sp.* 3J1, *Arthrobacter koreensis* 5J12A, *Rhodococcus sp.* 4J2A2, *Leucobacter sp.* 4J7B1 and *Arthrobacter siccitolerans* 4J27 were used, since they present a high survival desiccation of over 20%. To evaluate the effects of plant growth promotion and protection of these plants against drought different plant species like pepper plants (*Capsicum annuum* var. *annuum*), tomato (*Solanum lycopersicum*), corn (*Zea mays*) and soybeans (*Glycine max*), clover (*Trifolium repens*), etc., were employed. Likewise, strains taxonomically closer to those greater protection against drought on plants generated were identified and studied again in order to discern if there was a correlation between those strains more tolerant to drought with those most protected the plants against lake of water. Finally, a biochemical profile study of molecules involved in processes of plant protection against drought by microorganisms (trehalose, catalase and superoxide dismutase activities, indole acetic acid, abscisic acid and other plant hormones) was performed to identify whether there is a correlation between the production thereof and the effects observed in plants. Trehalose shown to be the most determinant molecule to control physiological parameters in plants.

Subsequently the molecular mechanisms by which plants inoculated with *Microbacterium sp.* 3J1 as it was the strain that reached a high degree of growth promotion and resistance to drought in plants. This study was performed using proteomic and metabolomic analysis. Of the plant species studied in the previous chapter, we selected the pepper plant as a model therefore have widely in the scientific literature in proteomics and metabolomics, as have its genome fully sequenced and accessible. Proteomic studies were performed by methods based on two-dimensional gels (2D SDS-PAGE) tests, while metabolomic studies were performed by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). Both proteomic studies such as metabolomics were performed on pepper plants in drought conditions and in the presence of the microorganism *Microbacterium sp.* 3J1 and on *Microbacterium sp.* 3J1 separately. Under this last condition, strain cultures added with polyethylene glycol (PEG) of 5% and 50% to simulate stress conditions typical of a not waterlogged soil and intense dried soil, were carried out. With both types of studies could characterize the pathways involved in drought resistance.

Later, the level of biosecurity on drought tolerant strains studied was analyzed, as any microbiological product release to the environment must be safe for both humans and the environment. Given the diversity of proposed evidence and the lack of a regulatory framework that indicates the analyzes necessary to ensure the safety of micro-organisms to be used as inoculant on plants, it was proposed to combine a series of organisms model-based trials that could potentially be affected, as well as models of infection for humans. The combination of biosafety tests with bodies such as *Caenorhabditis elegans*, *Eisenia foetida*, *Mus musculus* or *Daphnia magna*, served as models for possible interference recognize any trophic level ground,

including man, which could cause the use of the strains under study in the case of use massively in the environment. As a final result we established a numerical value indicative of the level of safety of the strains was called Environmental and Human Security Index (EHSI).

After confirming that the strains studied showed high levels of biosafety, it was decided to undertake greenhouse and field trials. As a model plant, corn (*Zea mays*) was used to being one of the best performing species tested, as well as plants with greater involvement in agricultural sectors, both food and bioenergy interest. In these trials in greenhouse and field trials carried out with the drought tolerant strains with better results in the laboratory (*Microbacterium sp.* 3J1 and *A. koreensis* 5J12A) using plastic capsules as seed inoculation format for both the greenhouse tests were used as for planting in the field. The results of promoting growth and protection against drought in plants by the drought tolerant strains obtained in laboratory (under controlled conditions) did not coincide with those obtained in greenhouse and field (where environmental control is more limited).

To improve results in poorly controlled environmental conditions sought an alternative to the liquid s capsuled-seed formulation, where the conservation of the number of viable cells over time, pollution and storage of the product formulation resulted in worse outcomes. To identify alternative formulation is better suited to the microorganism *Microbacterium sp.* 3J1, the mechanisms of interaction and colonization of the microorganism on the plant was studied by microscopy. The contact type, symbiosis modifications and the area where the strain is established in the root were detected by using VP-SEM and TEM. In addition, to identify the organism in its interaction with the plant and the type of relationship they had, it was labeled with green fluorescent protein (GFP) and by using laser confocal microscopy. With this label we could determine the minimum residence time of the inoculant on the ground, the conditions under which such contact takes place and the time spent on the various stages of colonization and interaction with the plant. All these techniques were confirmed by using qPCR and RT-PCR. Alternatively inoculation alginate was used, and the quality of inoculant was studied by analyzing the number of viable cells in time. We devolved a different formulation able to maintain stable the strains population in the inoculated substrate and, therefore, plant contact and interaction was notable extended. This time was extended from a pair of weeks in soil and close to a month in plants, to more than six weeks in soil and more than two month in plants.

Finally, studies in transcriptomics and with negative mutant strains are being carried out in order to develop and consider better alternatives to improve routes involved and to achieve better formulations.

OBJETIVOS

Objetivos:

El objetivo principal de la presente tesis doctoral consiste en determinar los mecanismos de interacción planta-microorganismo por los cuales una colección de cepas bacterianas tolerantes a la desecación protegen a las plantas modelo empleadas contra la sequía.

Para lograr dicho objetivo principal, se proponen los siguientes objetivos parciales:

- 1.- Determinar la capacidad de promoción del crecimiento y de la protección contra la sequía en diversos tipos de plantas, por parte de una colección de cepas microbianas xerotolerantes.
- 2.- Identificar los mecanismos moleculares que utilizan las cepas microbianas para la protección de la planta contra la sequía tanto a nivel proteómico, como metabolómico.
- 3.- Evaluar el nivel de seguridad de dichas cepas sobre el medio ambiente y sobre los seres humanos para su uso como inoculante.
- 4.- Analizar la eficacia de la protección de plantas contra la sequía por parte de las cepas xerotolerantes en ensayos de invernadero y de campo.
- 5.- Mejorar la formulación del inoculante para su uso en ensayos de campo.

INTRODUCCIÓN

1. La sequía

La sequía es el desastre natural más costoso y difícil de gestionar a lo largo de las últimas décadas por sus efectos generalizados, incluidas situaciones de crisis de agua y alimentos (Gleick, 1993, Vörösmarty *et al.*, 2000, Oki & Kanae, 2006, Li *et al.*, 2009, Mishra & Singh, 2010).

Incluso en países de latitudes altas, tradicionalmente consideradas húmedas, como Francia, Alemania o Canadá, están comenzando a sufrir drásticas pérdidas de cosecha en los años de falta de agua y el fuerte aumento de temperaturas. A esta situación hay que añadir que el empleo de cultivares poco adaptados a este estrés produce un agravamiento en los efectos (Beier *et al.*, 2004, Ciais *et al.*, 2005, Grayson, 2013).

1.1. Efectos e impactos

En determinados países con periodos de sequía estacional e incluso ciclos de años especialmente secos, como ocurre en la cuenca mediterránea, este fenómeno hace que actividades agrícolas y ganaderas, de mantenimiento forestal, suministro de alimentos o incluso la gestión del agua disponible, sean cada vez más complejos de gestionar (Hoddinott & Kinsey, 2001). Por otra parte, según los informes del IPCC, los efectos del cambio climático sobre el nivel de precipitaciones y el aumento de las temperaturas y evapotranspiración indican que estos se agravan significativamente año a año, haciendo que un buen manejo de los efectos de la sequía sea más importante si cabe (Hoddinott & Kinsey, 2001, Rounsevell *et al.*, 2006).

1.2. La agricultura como caso de gestión del agua

Uno de los usos que conlleva mayor consumo de agua por parte del ser humano es la agricultura, siendo por ello la actividad más expuesta a la sequía. Para evitar llegar a situaciones de desertificación, pérdida de suelos fértiles y cosechas, deudas de potencial hídrico y desecación de ecosistemas ligados al agua, debe fomentarse una serie de herramientas biotecnológicas claves que permitan volver a gestionar terrenos a nivel agrícola o similar. Estas herramientas incluyen el uso de cultivos con mayor resistencia a la sequía (Rounsevell *et al.*, 2006, Buchholz *et al.*, 2007, Groom *et al.*, 2008, Karp & Shield, 2008, Versteegen *et al.*, 2012, Kang *et al.*, 2013).

Las soluciones que se han dado habitualmente se basan en el uso de cultivares resistentes o más adaptados (Hall & Cook, 2007, Perry, 2007). Sin embargo, se están desarrollando también nuevas tecnologías para aumentar la tolerancia de las plantas a la sequía. Entre ellas se puede destacar el uso de algunos cultivares modificados genéticamente para tolerar altas temperaturas, crecer con poca agua o incluso repeler una radiación solar intensa, aunque esta tecnología aún tiene baja implantación (Stewart et al., 2003, Andow & Zwahlen, 2006, Sato & Yokoya, 2008, Ashraf, 2010, Gaudin et al., 2013).

Así, es necesario conocer el alcance de términos como evapotranspiración (ET) en los sistemas agrícolas, que es el agua utilizada por un cultivo para el crecimiento y los propósitos de enfriamiento, los cuales se reflejan en pérdidas de agua por evaporación (E) o transpiración (T). Así, la transpiración es el agua transpirada o devuelta a la atmósfera por los estomas de las hojas. La evaporación, por su parte, se considera el agua devuelta desde la tierra húmeda y la superficie de la planta a la atmósfera. Es de interés conocer en profundidad las causas principales de la pérdida de agua en los cultivos por la situación de estrés que esta pérdida puede generar ante una mala gestión. El uso del agua del cultivo (ET) está influenciado por las condiciones meteorológicas, el agua disponible en el suelo, las especies de cultivo y la etapa de crecimiento. En la cobertura total, un cultivo tendrá la máxima tasa de ET si el agua del suelo no se limita. Un cultivo se considera sometido a estrés hídrico cuando supera ciertos niveles de ET sin regeneración de sus fuentes de agua disponibles (McKenney & Rosenberg, 1993).

Hay que considerar que la lucha contra la sequía por parte de la planta supone un esfuerzo complejo, que repercute en el crecimiento de las plantas de múltiples formas, de modo que sean capaces de adaptarse o mitigar estas tensiones. Entre estas medidas se incluyen el exudado de compuestos ricos en carbono como polisacáridos o ceras (para favorecer la retención de la humedad en las hojas, el quelado de metales tóxicos y evitar la falta de aireación del suelo), levantamiento hidráulico, aumento en el número de raíces y cambios en su distribución, producción de señales radiculares para controlar el comportamiento fisiológico del resto de la planta, etc. Sin embargo en muchas circunstancias un estrés abiótico como el causado por un déficit hídrico, si se prolonga considerablemente, puede causar daños que la planta es incapaz de recuperar por haber superado su sistema de respuesta. Pese a ello, los ecosistemas rizosféricos pueden surtir a las plantas de una defensa adicional eficaz ante estos estreses tanto en periodos de corta duración como en

periodos más prolongados (Li *et al.*, 2009, Marulanda, 2009, Whitmore & Whalley, 2009, Yamaguchi *et al.*, 2010, Jogaiah *et al.*, 2013).

2. Biofertilizantes y la sequía

La relación entre plantas y microorganismos del entorno es el resultado de una coevolución ambiental cercana y prolongada. Por esto, las interacciones negativas, positivas y neutras entre ambos se han ido especializando con el tiempo, llegándose incluso a dar cambios de categoría a lo largo de dicho periodo evolutivo. Incluso la interacción negativa ha llegado a dar lugar a interacciones de control de relaciones patógenas, interacciones mutualistas y/o simbióticas sin las cuales los ecosistemas actuales no podrían entenderse. Los distintos tipos de interacción coinciden en la comunicación previa que se establece, mediada por taxis y receptores específicos. Así, dependiendo del grado y tipo de comunicación logrado, existen relaciones epifíticas o endofíticas (Yang *et al.*, 2007, Kristin & Miranda, 2013).

2.1. Rizosfera

El término rizosfera fue utilizado por primera vez por Hiltner en 1904 para describir la zona de tierra que se encuentra bajo la influencia de las raíces, normalmente considerada dentro de los primeros 5 mm de tierra cercana a las mismas (Philippot *et al.*, 2013). Para un microorganismo del suelo, la rizosfera es un medio altamente beneficioso. En comparación con las condiciones de déficit de nutrientes de la mayor parte del suelo, la rizosfera es el lugar donde los nutrientes se concentran (Kardol *et al.*, 2007). Esto se da tanto por las secreciones radiculares como por una mejor disposición hídrica. En este entorno las condiciones fisicoquímicas para la vida microbiana están más controladas y son más favorables, con lo que los microorganismos proliferan con facilidad (Ibekwe *et al.*, 2002).

Existen múltiples factores que pueden influir en el tamaño de la rizosfera así como en su capacidad de acoger una cantidad y un tipo de vida microbiana determinada (Kennedy, 1999). Uno de los factores más importantes es la humedad de esta zona, ya que afecta a la colonización microbiana (Moore, 1991). Las células de la superficie de la raíz pueden experimentar cambios profundos con variaciones en el potencial de agua del suelo

(diferencia de energía por centímetro cúbico que existe entre el agua en un punto del suelo y el agua libre a igual presión y temperatura). Así, en suelos de $-0,2$ MPa o con valores más negativos (lejos de la capacidad de campo, $-0,03$ MPa), el potencial de agua en el suelo cercano a la raíz puede estresar a las células microbianas en la rizosfera ya que con un potencial de agua bajo en el suelo, la movilidad y la difusión de nutrientes puede verse reducida (Moore, 1991). Así, altos potenciales de agua del suelo pueden no ser beneficiosos, ya que el espacio poroso con oxígeno es igualmente importante para planta y microorganismo y puede convertirse en factor limitante (Moore, 1991, Kennedy, 1999).

Así mismo, la textura del suelo puede afectar al transporte y a la colonización de las raíces por los microorganismos. En general, las bacterias recorren mayores distancias a lo largo de la raíz en suelos de textura gruesa que en suelos de textura fina. Por su parte, la temperatura puede desempeñar un papel relevante en la colonización de los microorganismos, sobre todo en cuanto al tipo de microorganismo que coloniza. Las posibles diferencias se deben a la menor competencia de la microbiota autóctona a temperaturas más bajas o a una reducción en la tasa de crecimiento de las raíces, lo que permite una mayor colonización de raíz por parte de otros microorganismos (Zhang *et al.*, 2000, Braker *et al.*, 2010).

Sin embargo, el pH del suelo es probablemente el factor que más altera la capacidad de supervivencia y competitividad de los microorganismos. La producción de H^+ , HCO_3^- o de compuestos orgánicos, inducida por la raíz y su posterior liberación en la rizosfera, afectan a la absorción de iones y por lo tanto alteran el pH de la rizosfera. Las fluctuaciones en el pH de la rizosfera pueden llegar a ser de hasta una unidad de pH y pueden modificar el pH general de un volumen considerable del suelo cercano. La magnitud y la dirección de los cambios en el pH de la rizosfera depende principalmente de la presencia de nitrógeno, pero las relaciones simbióticas y la actividad microbiana también influyen en los cambios de pH, lo que puede determinar cambios drásticos en la composición de las poblaciones microbianas (Hultgren *et al.*, 2002).

Por último, los propios microorganismos también afectan a la rizosfera. Podemos encontrar entre 10^6 y 10^9 organismos por gramo de suelo rizosférico, aunque representan sólo una pequeña porción de la biomasa total, debido a su pequeño tamaño. En el caso de las bacterias del suelo, existen muchos grupos que tienen un alto coeficiente entre rizobacterias (R) y bacterias libres (L) (relación R/L), lo que indica una marcada

interacción con la rizosfera. Entre otras por ejemplo, las bacterias del género *Pseudomonas* y otras bacterias Gram-negativas son especialmente competitivas en la rizosfera y ocupan una gran parte de la población total de bacterias de la raíz (Thomashow, 1996, Somers *et al.*, 2004).

Igualmente, se ha de considerar la influencia de organismos depredadores, como el caso de nematodos bacteriófagos. Determinados organismos superiores predan sobre las diferentes comunidades microbianas influyendo en la proporción y organización de las mismas (Ellis *et al.*, 1984). De tal modo, las poblaciones naturales de nematofauna, de amebas, pequeños artrópodos y anélidos detritívoros, sedimentívoros o filtradores son capaces de crear y modificar patrones demográficos tal y como ocurre en escalas superiores entre herbívoros-carnívoros (Bergsma-Vlami *et al.*, 2005).

2.2. Los microorganismos y las plantas. Interacciones positivas

Se estima que entre el 1-2% de las bacterias son capaces de mantener una interacción positiva con plantas. En la mayoría de los casos la relación establecida se considera interna o endofítica, si bien existen algunas cepas de interacción superficial o epifítica, o simplemente de vida libre en la rizosfera. En el caso de las endofíticas, al ser más íntima la relación establecida, la interacción suele ser más prolongada y más efectiva, de este modo, más estables. Por ello, afectan a los mecanismos de regulación de la plantas, ayudándola así tanto a mejorar a nivel de desarrollo y crecimiento, como a mejorar su resistencia a la desecación, permitiéndoles superar periodos prolongados de estrés sin que pongan en riesgo su supervivencia (Antoun & Kloepper, 2001, Santamaria & Bayman, 2005, Rosenblueth & Martinez-Romero, 2006, Ryan *et al.*, 2008, Nongkhilaw & Joshi, 2014).

Conviene resaltar que existen también más entornos ligados a la relación planta-microorganismo, como es el caso de la filosfera, o zona de influencia de las hojas y folíolos de una planta o la antosfera o zona de influencia de las flores e inflorescencias vegetales, donde pueden establecerse microorganismos igualmente beneficiados (figura 1) (Osono, 2008, Kristin & Miranda, 2013).

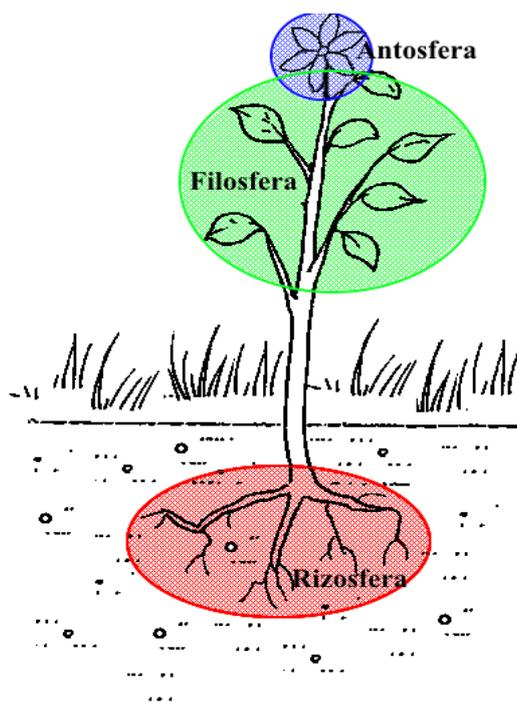


Figura 1. Zonas de influencia de microorganismos beneficiosos. Se muestran las zonas de colonización preferente para la interacción planta-microorganismo: en rojo, la rizosfera; en verde, la filosfera; y en azul, la antosfera.

En algunos casos estas relaciones se han llegado a especializar fuertemente como en el caso de algunos hongos micorrícicos que crean arbusculos dentro de las células vegetales (MA, micorriza arbuscular, como las formadas por el género *Glomus*) y/o bacterias que únicamente son capaces de realizar simbiosis con un tipo específico de planta hasta el nivel de tener estructuras especializadas para dicha relación (nódulos, ensanchamientos de la raíz, etc.). En otros casos, el microorganismo es capaz de establecer relaciones más amplias en número de plantas como ocurre con algunas cepas de los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter* o *Azospirillum*, pudiendo suponer un inoculante de mayor interés a nivel comercial, ya que aportan mecanismos de captación de nutrientes válidos para un amplio rango de plantas (Rothballer *et al.*, 2003, Couillerot *et al.*, 2010). Por su parte, las plantas suelen aportar una mejora del hábitat y una serie de nutrientes o sustancias compatibles que facilitan la resiliencia de los microorganismos rizosféricos. Por tanto, la condición *quid pro quo* es siempre una constante para estas interacciones (Schweitzer *et al.*, 2008, Bonfante & Anca, 2009, Lambers *et al.*, 2009).

En el caso de los hongos, estos suelen modificar con éxito la arquitectura radicular (aumentan la lateralidad para acceder a todas las fuentes de agua) y resistencia al estrés ambiental; sin embargo, normalmente se trata de especies con dificultades en cuanto a la

producción para uso en campo a nivel comercial o de distribución, ya que requieren del uso de raíces frescas *in vitro* para su réplica y mantenimiento (Koltai, 2010). Igualmente presenta dificultades de colonización ante suelos fertilizados con fosfatos (Nouri *et al.*, 2014). Por su parte las bacterias son muy eficientes en sus simbiosis con plantas y presentan menos dificultades de producción y distribución (Nelson, 2004). Por contra, los medios de cultivo suelen ser más caros y no todas afrontan igual largos periodos de almacenaje. De cualquier forma, ambos tipos de microorganismos pueden ser recomendables dependiendo de cada caso e incluso hay situaciones en las que los mejores resultados se obtienen coinoculando ambos (Bonfante & Anca, 2009, Koltai, 2010).

2.3. BPCPs y sus mecanismos de acción

Kloepper definió las BPCP o PGPR (bacterias promotoras del crecimiento en plantas, de *plant growth promoting rhizobacteria*, por sus siglas en inglés) a finales de los 70 (Kloepper & Schroth, 1978). Estas bacterias son capaces de interactuar con plantas mejorando su crecimiento, desarrollo e incluso su reproducción (Kloepper, 1978, Kloepper & Schroth, 1981).

El uso comercial de estas cepas está teniendo un gran impacto socioeconómico por su mayor compatibilidad con el medio y por su poder fertilizante comparable al de los procesados químicos y, por supuesto, al ser enormemente más seguros a nivel ambiental y humano. Tanto es así que, actualmente, las cifras de mercado a nivel global elevan por encima de los 5 millones de dólares los ingresos de las empresas que comercializan con productos biofertilizantes basados en microorganismos (Markestandmarkets, 2013). Se espera de hecho superar los 10 millones de dólares para antes de 2020 según los últimos informes. Esta relevancia económica va en auge con las políticas agrarias sostenibles y en consonancia con la tendencia internacional creciente de los productos ambientalmente sostenibles o de agricultura ecológica. (Markestandmarkets, 2013).

Estos organismos afectan al crecimiento de la planta de formas muy variadas. por síntesis y la cesión de compuestos específicos para las plantas, facilitando la absorción de determinados nutrientes del medio ambiente, protegiendo las plantas de ciertas enfermedades y/o por eliminar compuestos tóxicos del suelo que de no ser eliminados impedirían el buen crecimiento de la planta (Vilchez & Manzanera, 2011). Por otra parte, las BPCPs también aumentan el crecimiento de las plantas a través de la síntesis de

enzimas específicas, que inducen cambios fisiológicos en las plantas (Kloepper, 1978, Glick *et al.*, 1995, Vogel *et al.*, 1998, Hasan, 2002, Khan *et al.*, 2002, Gray & Smith, 2004).

El caso de las fijadoras de nitrógeno, las bacterias aumentan el crecimiento de las leguminosas porque fijan N₂ atmosférico, elevan la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera, aumentan la superficie radicular, mejoran otras simbiosis beneficiosas del hospedador y reducen o previenen los efectos nocivos de organismos fitopatógenos. Estos organismos pueden ser tanto de vida libre como adheridas, formando en algunos casos estructuras de interacción complejas (Khan *et al.*, 2002, Zaidi *et al.*, 2004).

Por otra parte, existen otro tipo de mecanismos que facilitan la adquisición de nutrientes, como son la solubilización de fosfatos inorgánicos y la quelación de iones metálicos mediante sideróforos (Hider & Kong, 2009). En el primero de los mecanismos, los microorganismos solubilizadores se valen de enzimas fosfatasas para hacer soluble y disponible el fosforo para las plantas, formas poco accesibles del nutriente fosfato, como los fosfatos cálcicos. Por su parte, algunos microorganismos se valen del uso de agentes quelantes o sideróforos, capaces de retener iones metálicos en su estructura que, de otra forma, no estarían tan disponibles en el suelo por el pH del mismo. El ferricromo o la enterobactina son algunos de los más comunes (Rodríguez *et al.*, 2006, Vilchez & Manzanera, 2011).

Sin embargo, el mecanismo más descrito entre los microorganismos beneficiosos es el aporte de reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas. Se trata de sustancias que influyen sobre el crecimiento y desarrollo general de las plantas. A continuación se exponen de manera más concreta algunos de los más estudiados (Gray, 2004, Cassán *et al.*, 2009, Sokolova *et al.*, 2011).

2.3.1. Reguladores del crecimiento vegetal (RCV) o Fitohormonas

Existen siete grandes tipos de fitohormonas. auxinas, giberelinas, citoquininas, brasinoesteroides, ácido abscísico, etileno y sus reguladores, y el conjunto ácido jasmónico-ácido salicílico, las cuales participan en la regulación del crecimiento, desarrollo y defensa de la planta. Dentro de los cinco primeros tipos se encuadran los reguladores que modifican el crecimiento y desarrollo, mientras el ácido jasmónico y el

salicílico están involucrados en la defensa de la planta y mejora de su resistencia sistémica (Kende & Zeevaart, 1997, Tanimoto, 2005).

A. Ácido indol-acético (AIA). Auxinas

Las funciones de las auxinas en los tejidos vegetales están estrechamente ligadas a la elongación celular, fototropismo, geotropismo, dominancia apical, iniciación de la formación de la raíz, producción de etileno y al desarrollo de los frutos. El fototropismo está influenciado por el transporte de las auxinas y acúmulo de las mismas hacia un lado del tallo, generando el movimiento en respuesta a estímulos de luz (Wickremesinhe & Arteca, 1996). Por su parte, el geotropismo responde de igual forma a la acumulación de las auxinas en las hojas y el tallo en respuesta a la fuerza de la gravedad. El ácido indolacético es una de las auxinas más comunes y se biosintetiza a partir del triptófano, como se muestra en la figura 2 (Ahemad & Kibret, 2014).

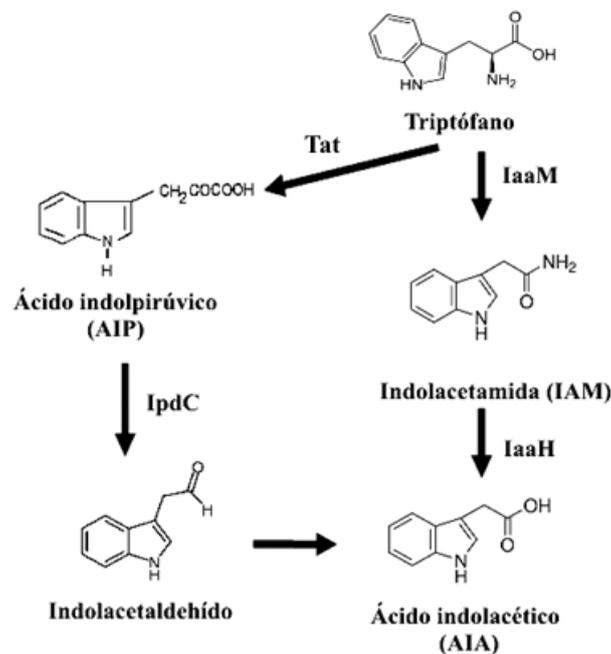


Figura 2. Biosíntesis de AIA por bacterias. Rutas de síntesis de AIA por IAM y por AIP. Tat, corresponde al enzima triptófano aminotransferasa; IaaM, corresponde al enzima triptófano-2-monooxigenasa; IaaH, corresponde al enzima indol-3-acetamida hidrolasa; e IpdC, corresponde al enzima indol-3-piruvato descarboxilasa (Modificada de Yang y colaboradores (Yang *et al.*, 2007)).

La dominancia apical está relacionada con el transporte que reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo. El AIA promueve el desarrollo radicular al estimular la lateralización de la raíz en esquejes y su diferenciación, lo cual es evidente con la aplicación exógena de auxinas (Salisbury, 1994, Wickremesinhe & Arteca, 1996, Karadeniz *et al.*, 2006, Lecube *et al.*, 2014).

B. Giberelinas (GAs)

Las giberelinas regulan la elongación del tallo, modifican los procesos reproductivos, participan en el control de la inducción de la floración y también colaboran en la producción, crecimiento y desarrollo de los frutos. Así mismo, algunas de estas moléculas sustituyen los requerimientos de luz o frío que precisan muchas de las semillas para germinar. Su biosíntesis se muestra en la figura 3 (Hilton, 1966, Hasan, 2002, Tanimoto, 2005, Karadeniz *et al.*, 2006, Akter *et al.*, 2014).

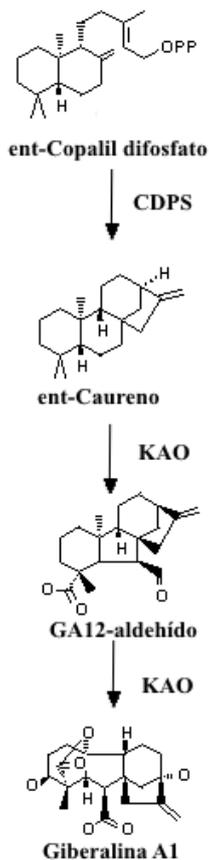


Figura 3. Biosíntesis de Giberelinas. Se muestra la ruta de producción de giberelinas. Las siglas CDPS, corresponden con el enzima ent-Copalil difosfato oxidasa; KAO, corresponde con el enzima ácido ent-Caureno oxidasa.

C. Citoquininas (CKs)

Las citoquininas estimulan la formación de brotes, promueven la división celular, ayudan a la germinación, inhiben el alargamiento del tallo, estimulan el crecimiento de los brotes laterales y retardan el envejecimiento de las hojas. Se encuentran en altas concentraciones en los meristemos y los tejidos en crecimiento hasta donde son trasladados por el xilema desde las raíces, desde donde probablemente es sintetizado por la ruta bioquímica de síntesis de la adenina (figura 4). La citoquinina más conocida es la zeatina, descubierta en la planta de maíz (*Zea mays*) y se suele estudiar su equilibrio con el ácido abscísico para controlar la apertura de los estomas (Hilton, 1966, Purves *et al.*, 2002, Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013, Reguera *et al.*, 2013, Akter *et al.*, 2014).

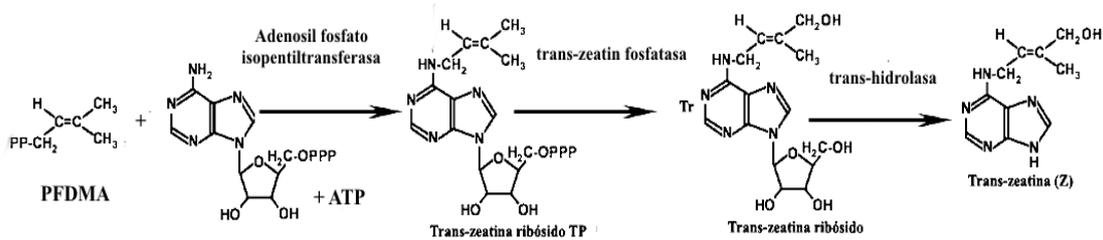


Figura 4. Biosíntesis de la zeatina. Se muestra la ruta de producción de la zeatina (Z) a partir de la ruta de producción de adenina (modificado de Koning, 1994). PFDMA, corresponde con el enzima pirofosfato de dimetilalilo.

D. Brasinoesteroides (BS)

Estos reguladores se han caracterizado en las últimas décadas. Los brasinoesteroides estimulan el alargamiento celular, el alargamiento del tubo polínico y la diferenciación del tejido vascular. También inhiben el alargamiento de la raíz. Estos polihidroxiesteroides están presentes en todos los tejidos vegetales (figura 5). Para promover el crecimiento de las plantas, es suficiente un tratamiento con nanogramos de brasinoesteroides, por lo que serán de importancia en la agricultura, al aumentar los rendimientos de cultivos. (Leadem, 1987, Purves *et al.*, 2002, Yuan *et al.*, 2010).

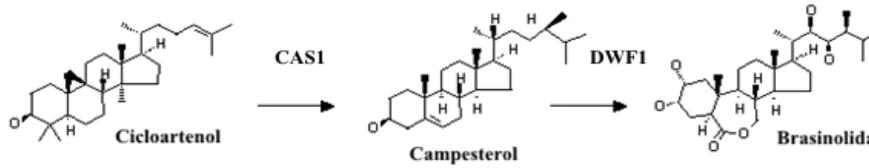


Figura 5. Biosíntesis de brasinoesteroides. Se muestra la ruta de biosíntesis de la brasinolida como brasinoesteroide más común. CAS 1, corresponde con el enzima cicloartenol sintasa 1; DWF1, corresponde con el enzima delta-esterol reductasa.

E. Ácido abscísico (ABA)

El ácido abscísico promueve la acumulación de las proteínas de almacenamiento en semillas. Suele estar presente en altas concentraciones en los brotes y semillas latentes, y es el inhibidor más común de la germinación de las semillas. También inhibe el alargamiento del tallo y regula el intercambio de gases (CO_2 y vapor de agua) entre las hojas y la atmósfera mediante sus efectos sobre los estomas, ya que estimulan el cierre de los mismos conjuntamente con las citoquininas. Generalmente inhiben la función de otras enzimas como sucede con las giberelinas (Tran *et al.*, 2007). Su producción aumenta en condiciones de estrés y por las bajas temperaturas (Leadem, 1987, Purves *et al.*, 2002, Yuan *et al.*, 2010). Su biosíntesis se muestra en la figura 6.

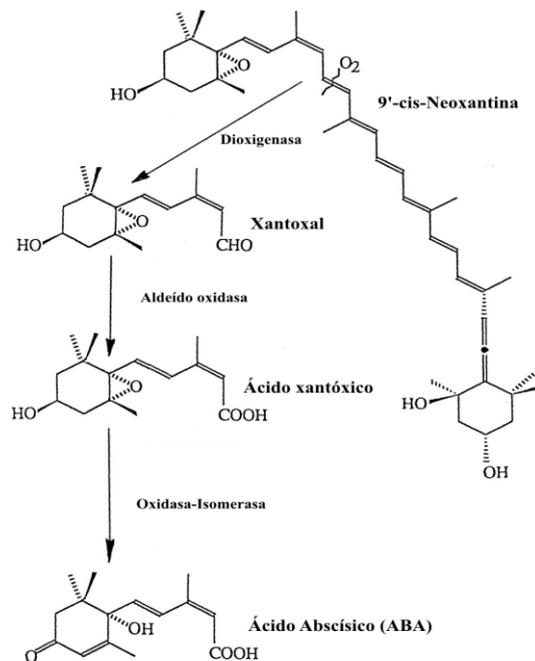


Figura 6. Biosíntesis de ácido abscísico. Se muestra la ruta de biosíntesis de ABA en cloroplastos a partir de 9'-cis-Neoxantina como sustrato (modificado de Milborrow, 2001).

F. Etileno

El etileno es de naturaleza gaseosa y promueve la senescencia. El etileno se produce en todas las partes de la planta y está involucrado en la maduración de los frutos, interviene en el mantenimiento del polo apical en plántulas, en la diferenciación de la raíz y las hojas, en la formación de raíces adventicias, etc. Además, una alta concentración de etileno en los tallos provoca la inhibición de diversos procesos y la alteración de funciones fisiológicas tales como la asimilación neta de agua, la transpiración y la conductancia estomática. El etileno se sintetiza a partir del aminoácido metionina, aunque también se puede sintetizar a partir del el ácido aminociclopropano carboxílico (ACC) a partir del ciclo de Yang, como se muestra en la figura 7. Este compuesto está presente en todos los tejidos de la planta, aunque está más asociado a los frutos (Pallas & Kays, 1982, Leadem, 1987, Purvers *et al.*, 2002, Manavella *et al.*, 2006).

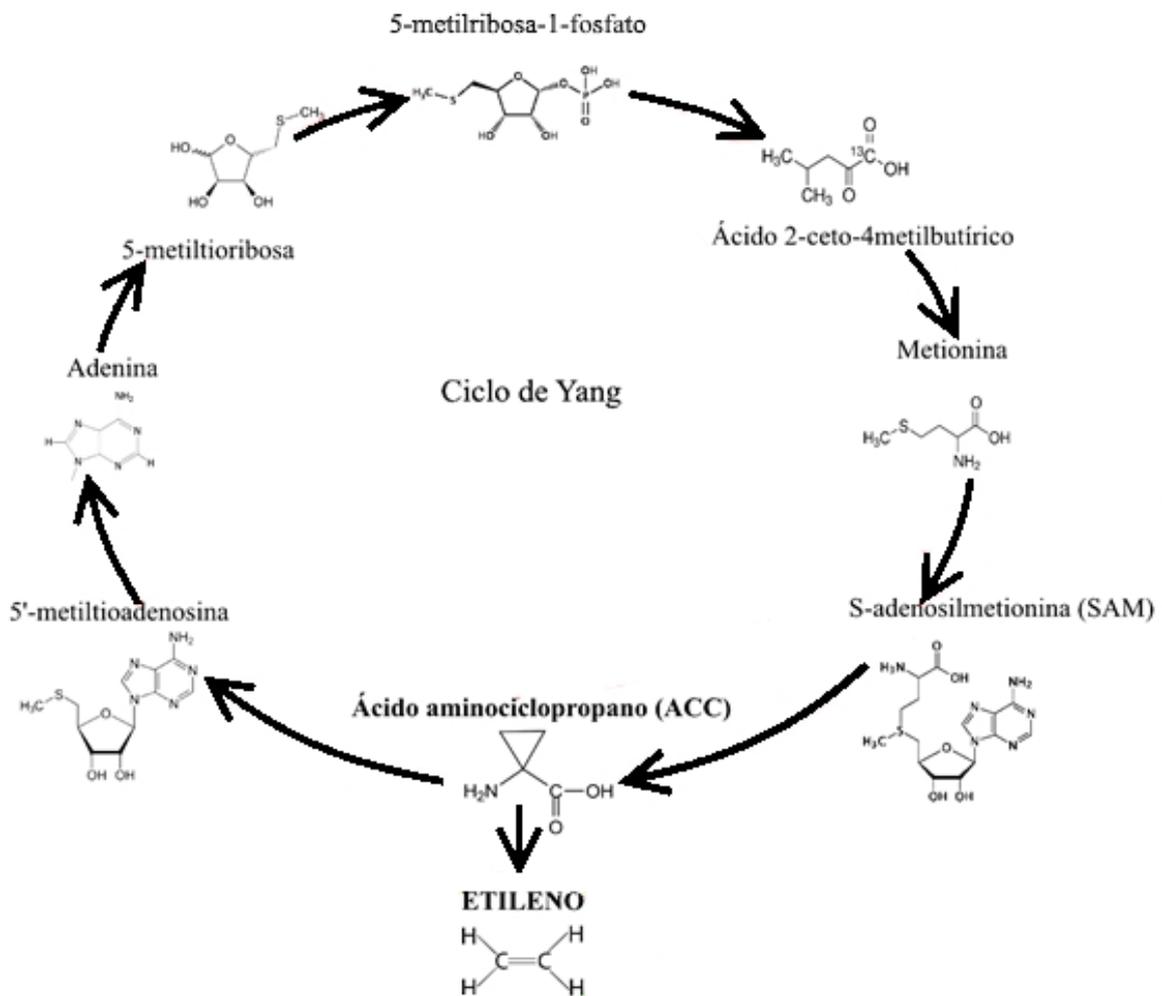


Figura 7. Ciclo de Yang. Se muestra el ciclo de biosíntesis de etileno empleando el ACC como precursor y salida del ciclo.

Sin embargo, pese a sus efectos positivos, bajo condiciones de estrés su acumulación se considera perjudicial para las plantas, produciendo daños generalizados. Se le considera el principal inhibidor del crecimiento en condiciones de sequía en plantas. Las inundaciones, el frío, las lesiones y el ataque de patógenos también pueden inducir la formación de etileno en la planta. Estos estímulos exógenos conducen a la síntesis de ACC, el cual se transporta hacia las hojas, donde se oxida produciendo etileno, el cual produce epinastia de las hojas (curvatura y marchitamiento), reduciendo su capacidad fotosintética y dando lugar a los procesos de inhibición del crecimiento citados, así como, en último término a la muerte de la planta si el estrés no revierte (Klee *et al.*, 1991, Grichko & Glick, 2001, Li *et al.*, 2009, Plett *et al.*, 2009).

a. Ácido aminocicloporpano-carboxilato (ACC)

El ACC es fundamental para la biosíntesis del etileno, siendo su principal precursor. El ACC se produce por la enzima ACC sintasa a partir de metionina y se convierte en etileno por el enzima ACC oxidasa (Yang & Hoffman, 1984, Kende, 1989, Kende, 1993).

Las bacterias pueden descomponer el ACC obtenido de plantas a través de un proceso de desaminación irreversible, mediado por la ACC-desaminasa (enzima que no poseen de manera natural las plantas) dando lugar a amoniaco y α -cetobutirato, como puede observarse en la figura 8 (Klee *et al.*, 1991, Penrose *et al.*, 2001, Munne-Bosch *et al.*, 2002, Plett *et al.*, 2009).

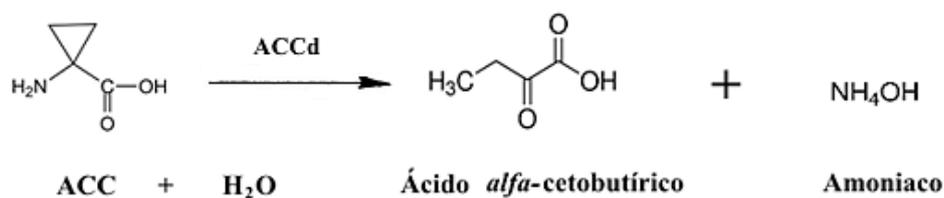


Figura 8. Degradación de la molécula de ACC. Se muestra el efecto de la ACC desaminasa sobre el sustrato ACC, dando cetobutirato alfa y amoniaco como resultado.

G. Ácido jasmónico (JA)

El ácido jasmónico y el jasmonato de metilo tienen un papel importante dentro de las respuestas al estrés y de defensa. También se ha comprobado que estos compuestos pueden modular procesos como la viabilidad del polen, la maduración de frutos y el crecimiento de la raíz (figura 9) (Hilton, 1966, Purves *et al.*, 2002, de Ollas *et al.*, 2013).

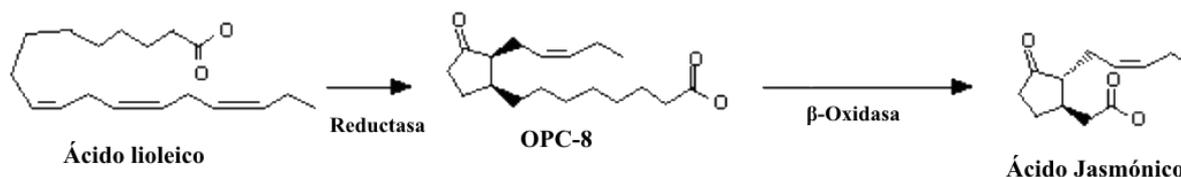


Figura 9. Biosíntesis del ácido jasmónico. Se muestra la ruta de síntesis desde uno de los sustratos más comunes, el ácido linoleico. OPC-8, corresponde con la molécula intermediaria ácido (1R, 2S)-3-oxo-2-[(Z)pent-2-enil]-ciclopentano-1-octanoico.

H. Ácido salicílico (SA)

El ácido salicílico tiene una gran importancia en la resistencia natural de las plantas contra patógenos e insectos herbívoros, así como en funciones de desarrollo estructural, germinación de semillas e incluso controlando otras fitohormonas. Por otra parte, también está involucrada en procesos de resistencia al estrés abiótico controlando expresión de genes de senescencia y la apertura-cierre de estomas (Vlot *et al.*, 2009, Fayez & Bazaid, 2014, Jing *et al.*, 2015). Su biosíntesis se muestra en la figura 10.

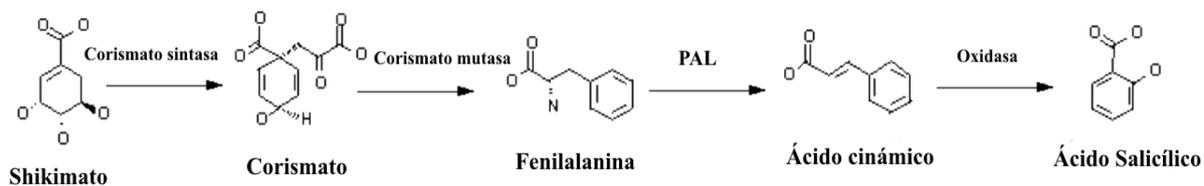


Figura 10. Biosíntesis del ácido salicílico. Se muestra la ruta de síntesis desde el sustrato shikimato. PAL, corresponde con el enzima fenilalanina amonio-liasa.

2.4. Bacterias xerotolerantes. Protección frente a la sequía en plantas

Los microorganismos son el conjunto de seres vivos que con mayor eficiencia logra superar periodos de sequía así como otros múltiples estreses abióticos ambientales. Entre ellos se encuentran algunas de las formas de vida más resistentes, ante la falta de agua, que se denominan anhidrobiontes. Así pues, los organismos anhidrobiontes serían aquellos capaces de sufrir una desecación total o casi total, suspender sus procesos vitales y volver a recuperar los mismos una vez el agua vuelva a estar accesible. Entre ellos, hongos y bacterias son grupos altamente resistentes, por lo que son un recurso interesante a la hora de tratar de paliar los efectos de la misma sobre plantas, principalmente en agricultura y silvicultura. (Chen & Alexander, 1973, Marulanda *et al.*, 2009, Garcia, 2011).

En nuestro grupo se ha puesto a punto el aislamiento de cepas bacterianas tolerantes a la desecación, mediante tratamiento con disolventes orgánicos como agentes selectivos. El cloroformo y la acetona disuelven las membranas celulares de los microorganismos que no están protegidos por xeroprotectores insolubles en solventes orgánicos, lo que permite simular condiciones de alto estrés ambiental (Manzanera *et al.*, 2002, Vílchez *et al.*, 2008). Con esta metodología, se llevó a cabo un aislamiento de microorganismos de las proximidades de raíces de adelfa (*Nerium oleander*) en un suelo que no había recibido riego ni lluvia en más de tres meses. En este estudio se aislaron las cepas bacterianas, *Microbacterium sp.* 3J1, *Arthrobacter koreensis* 5J12A, *Rhodococcus sp.* 4J2A2, *Leucobacter sp.* 4J7B1 y *Arthrobacter siccitolerans* 4J27, entre otras que mostraron niveles de tolerancia a desecación muy altos. Todas ellas fueron asignadas taxonómicamente a la clase *Actinobacteriae* y al orden *Actinomycetales*, que representan uno de los taxones más resistentes a desecación (Narváez-Reinaldo *et al.*, 2010).

2.4.1. Bacterias rizosféricas ante el estrés por desecación

Este tipo de bacterias se englobaría dentro de las llamadas bacterias de reguladoras de la homeostasis en estrés de plantas o BRHEP (PSHB, *plan stress homeostasis-regulating bacteria*, por sus siglas en inglés) (Cassán *et al.*, 2009, Bashan & de-Bashan, 2010).

Se conoce poco sobre el número de cepas capaces de auxiliar a la planta ante condiciones abióticas estresantes. De igual modo, los mecanismos involucrados están aún por describirse a nivel proteómico, metabolómico y transcriptómicos, lo que ayudaría a

comprender mejor las interacciones y establecer posibles modificaciones futuras para aprovechar más eficientemente este tipo de relaciones beneficiosas (Bakker *et al.*, 2013, Timmusk *et al.*, 2014).

2.4.2. Cepas xerotolerantes como biofertilizantes

Se han caracterizado determinadas cepas xerotolerantes por ser capaces de aportar a las plantas una serie de estimulantes, incluyendo la producción de ciertas fitohormonas, producción de xeroprotectores, etc., para determinadas condiciones estresantes. Dichos estímulos externos pueden estimular la producción de mecanismos de resistencia, el crecimiento de determinadas estructuras vegetales e incluso tener un uso más eficiente del agua. A continuación describimos con más detalle algunos de estos mecanismos (Glick, 1995, Sziderics *et al.*, 2007, Marulanda *et al.*, 2009, Reinhold-Hurek & Hurek, 2011).

2.4.3. Mecanismos de acción

A. Fitohormonas

Normalmente, bajo condiciones normales, las fitohormonas están relacionadas con procesos de promoción de crecimiento y desarrollo, así como con procesos de floración y fructificación. Sin embargo, en condiciones de estrés intenso, las fitohormonas asumen funciones importantes en el control de las pérdidas de agua, mejora de la eficiencia de las estructuras foliares y radicales o mejora en el acceso a distintas fuentes de agua (Gibson, 2004, Skirycz & Inzé, 2010).

Los mecanismos de emergencia son los más habituales, pero no suelen ser suficientes para superar determinados eventos; sin embargo, existen tipos de fitohormonas que alteran determinadas rutas metabólicas y la producción de ciertos metabolitos para gestionar más eficientemente el agua disponible, así como para evitar su pérdida (Schmelz *et al.*, 2003, Gibson, 2004).

Como se refleja anteriormente, algunas cepas bacterianas son capaces de modificar la concentración de estas fitohormonas para hacer que la planta crezca y se desarrolle más rápidamente; adicionalmente, bajo condiciones de sequía, pueden alterar sus funciones

habituales para mejorar la resistencia de la planta. Así, como podemos observar de manera esquemática en la figura 11, algunas cepas son capaces de controlar uno o varios de los sistemas de regulación vegetal:

- **ACCd-Etileno.** Las bacterias que disponen de la enzima ACC deaminasa son capaces de intervenir en el ciclo del etileno consumiendo el precursor, el ácido aminociclopropano carboxílico (ACC). De esta forma evitan altas concentraciones de etileno y efectos deletéreos a medio-largo plazo (Munne-Bosch *et al.*, 2002, Onofre-Lemus *et al.*, 2009).
- **Balances.** También son capaces de ejercer un efecto sobre las rutas de resistencia típicas, sobreexpresando determinados intermediarios como ocurre con los equilibrios del ácido abscísico-citoquininas para controlar la apertura-cierre de los estomas. En este caso, las bacterias son capaces de producir mayor cantidad de abscísico o citoquininas para regular las concentraciones de los mismos más eficientemente y adaptarlos según los niveles de estrés ambiental (Karadeniz *et al.*, 2006, Tran *et al.*, 2007, de Ollas *et al.*, 2013).
- **Aporte a rutas.** El aporte de otras fitohormonas habituales como los brasinoesteroides, auxinas o giberelinas bajo condiciones de estrés es un mecanismo recurrente. Los brasinoesteroides son capaces de mejorar la elongación de las células y mejorar la conductancia, haciendo que el contenido de agua no se pierda innecesariamente. Por su parte, las auxinas como el ácido indolacético inducen a la planta a mejorar su la arquitectura foliar para disminuir la exposición y las pérdidas por transpiración; de igual modo, son capaces de mejorar la lateralización y estructura de captación de agua a nivel radicular. Por último, las giberelinas mejoran la producción radicular terciaria para acceder a fuentes de agua menos accesibles (Tanimoto, 2005, Yuan *et al.*, 2010, Akter *et al.*, 2014).

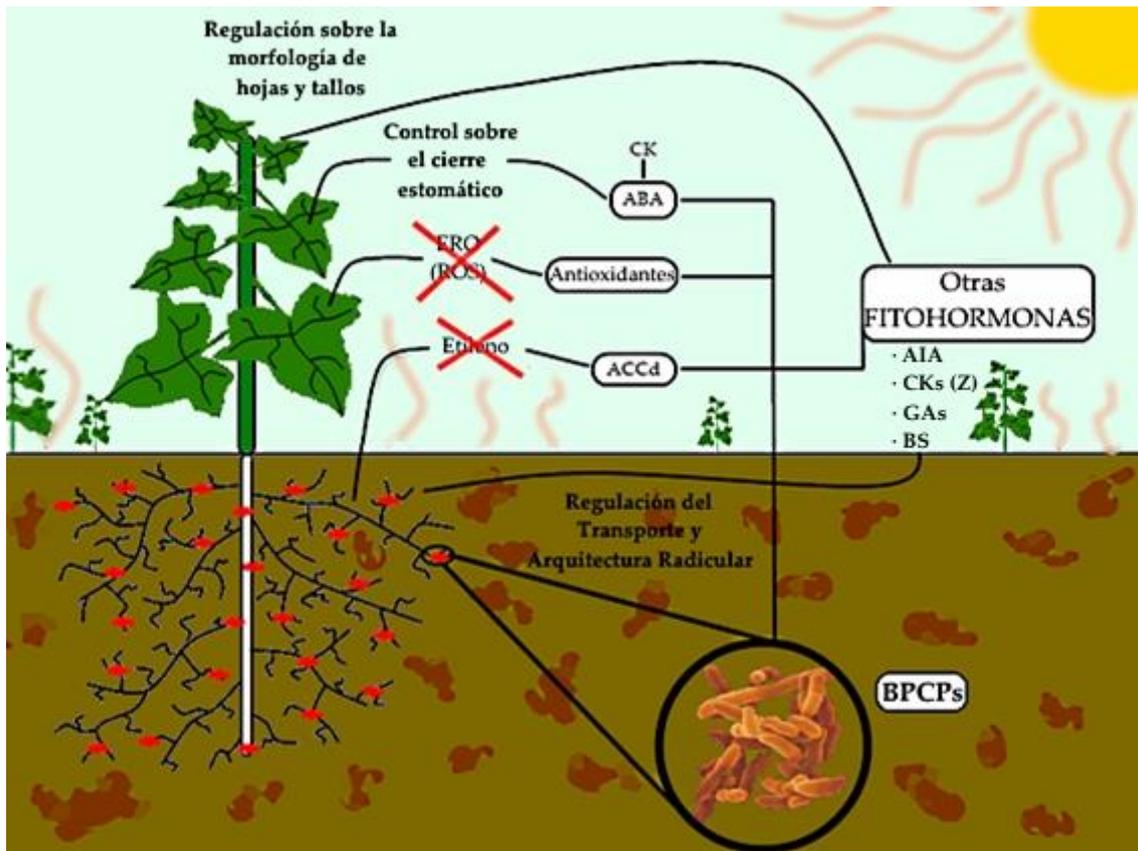


Figura 11. Principales fitohormonas aportadas por BPCPs en condiciones de estrés hídrico. Efectos de las fitohormonas más comunes aportados por BPCPs ante situaciones de sequía y su influencia en la homeostasis de la planta (Modificado de Yang y colaboradores, 2009).

B. Osmoprotectores, solutos compatibles y osmolitos

La producción de solutos compatibles es la opción más común en la mayoría de plantas contra sequía, la congelación y, sobre todo, frente a la alta concentración de sales. Las moléculas que protegen a las plantas contras estreses incluyen azúcares, polialcoholes, aminoácidos o solutos metilados. Algunas de dichas combinaciones son exclusivas de cada tipo de planta, pero la mayoría suelen ser combinaciones comunes. Como en el caso de las fitohormonas, estas mezclas varían enormemente en efectividad y, normalmente, las que sintetizan plantas no tolerantes a la desecación suelen ser más costosas de producir y menos eficientes. Sin embargo, en ocasiones pueden producir otros tipos de combinaciones al carecer de determinados enzimas o de rutas completas. En estas ocasiones, el aporte bacteriano puede ser de vital importancia (Yoshida *et al.*, 1997, Chaves *et al.*, 2009).

Por otra parte, estas moléculas no solo mantienen equilibrios homeostáticos y retienen agua, sino que participan de otros procesos como la lucha contra las especies reactivas del oxígeno o la protección de estructuras vitales y secundarias de la planta. De este modo, moléculas como la trehalosa, a parte de un potente osmorregulador, se trata de una molécula reguladora de otras fitohormonas e incluso regula la expresión de genes involucrados en funciones antioxidantes (Schluepmann *et al.*, 2004, Bae *et al.*, 2005, Nounjan *et al.*, 2012). Nuevamente, el tipo de combinación o una ligera variación en las concentraciones de la misma, pueden ayudar a mejorar la resistencia en plantas con baja tolerancia mediante el aporte de sustratos iniciales, metabolitos intermediarios o incluso productos finales inaccesibles para las plantas por su fondo genético (Rodríguez-Salazar *et al.*, 2009, Sandhya *et al.*, 2010).

C. Moléculas anti-especies reactivas del oxígeno (ERO o ROS)

La falta de agua provoca daños causados por especies reactivas del oxígeno, sobre todo en los sistemas de respiración, rutas metabólicas básicas, estabilidad genómica, de membranas u orgánulos. En situaciones de estrés, aumenta la expresión de enzimas relacionadas con la respiración y con la regulación de moléculas oxidantes (ATPasas, transferasas) o de metabolitos para contrarrestar el efecto de dichos oxidantes (ácido felúrico o el L-aspartato) (Wingler *et al.*, 1999, Mathew & Abraham, 2004).

Las plantas resistentes acumulan menos moléculas antioxidantes, siendo la mayoría de estas moléculas muy especializadas como chalconas, diadzeina, apigenina, isoleucina, prolina, N-acetilglucosamina, ácido cafeico, quínico o maolico o incluso azúcares multifunción como la rafinosa. Estas moléculas estabilizan las estructuras celulares de manera más eficiente. De esta forma, el gasto energético para evitar daños sobre moléculas y estructuras se controla mejor y evita excesos innecesarios por parte de la planta (Tattini *et al.*, 2004, Dao *et al.*, 2011).

D. Protección de estructuras

Las plantas inoculadas con determinadas cepas bacterianas acumulan sustancias específicamente relacionadas con el control del tamaño y la división celular (menor superficie expuesta a pérdida de agua), así como en la formación de estructuras más resistentes ante eventos de estrés por desecación. En plantas no tolerantes se encuentran

altas concentraciones de moléculas protectoras como el sinapaldehído o el ácido *p*-cumárico, que normalmente conducen a la formación de estructuras más afinadas y las vuelven más rígidas. Sin embargo, en plantas tolerantes, las moléculas sintetizadas, además, suelen tener otras funciones como osmolitos o anti-ROS, como ocurre con el ácido sinápico o el ácido glucurónico (Bohnert *et al.*, 1995, Anastassiadis & Morgunov, 2007, Alvarez *et al.*, 2008, Kaur *et al.*, 2012).

E. Señalización

Los sistemas de señalización ante la sequía son los mecanismos implicados en transmitir la información del estado del medio externo al medio interno para que la planta sea capaz de ejecutar una respuesta tal que garantice su supervivencia. Para llevar a cabo dichas respuestas, la planta debe contar con un sistema de receptores y efectores bien adaptados a la escasez de agua. De no ser así, las respuestas genéricas serían la única barrera ante los estímulos estresantes del medio. De la especificidad de estos mecanismos va a depender en buena parte la viabilidad y perdurabilidad de la planta ante la sequía. De hecho, las plantas más tolerantes son también aquellas que mejor y más eficientemente regulan sus sistemas de señalización. Así, no sólo va a ser importante tener buenos mecanismos de homeostasis, sino una serie de mecanismos de detección y canalización de los eventos externos. Sin embargo, en general, los mecanismos que se dan en condiciones de interacción planta microorganismo han de describirse con más profundidad. Algunos ejemplos muy interesantes son los estudios sobre las altas concentraciones de moléculas como leucina, adenosina y otras sustancias relacionadas con la respuesta rápida y la activación de rutas, como la del ABA o de ciclos energéticos (glucólisis, Krebs), cuando dichas plantas son inoculadas con microorganismos. De igual modo, la concentración de determinados azúcares o ácidos orgánicos puede actuar también como señal externa para atraer microorganismos beneficiosos, como ocurre con la producción de naringenina en condiciones de estrés abiótico (Weretilnyk *et al.*, 2001, Kang *et al.*, 2002, Lee, 2008).

Algunas de dichas moléculas diana involucradas son la serina, la histidina (promueve el cierre drástico de los estomas desequilibran el balance ABA-CK) o la ribosa (molécula señal relacionada con la síntesis de ABA). En el caso de la serina, ante condiciones de sequía, forma parte de sistemas de fosforilación-defosforilación específicos (por

fosfatasa tipo 2A o PP2A), que regulan cascadas de señalización relacionadas con la producción de proteínquinasas e incluso con la represión o activación de determinados genes relacionados con el estrés abiótico mediante factores de transcripción como últimos componentes de dichas cascadas. Sin embargo, la principal molécula señal detectada en estas condiciones es el ácido gamma-aminobutírico o GABA, que se ha descrito como la molécula señal de plantas más común ante sequía intensa. El GABA es un osmolito efectivo, pero si su concentración aumenta y se acumula en las células a lo largo de un proceso de sequía, puede convertirse en un mal regulador ya que favorece la activación del ciclo de etileno, mediante la regulación de la síntesis de su principal precursor en casos de estrés, el ACC (Kathiresan *et al.*, 1997, Roberts, 2007, Tran *et al.*, 2007, País *et al.*, 2009, Akcay *et al.*, 2012).

3. Bioinoculantes contra el estrés. Condicionantes de uso

3.1. Función bioinoculante

Las BPCPs pueden usarse como inoculantes para mejorar la eficacia en el desarrollo y resistencia de vegetales. Sin embargo, la interacción planta-microorganismo va a depender de la especie vegetal, condiciones del suelo, estreses ambientales, etc., incluso dentro de estas condiciones, existen grandes diferencias entre cada cepa y entre el efecto generado. Lo más habitual es encontrar productos por cultivares con cierta cercanía filogenética, como por ejemplo las cepas del género *Bacillus* para el tratamiento de las plantas del género *Solanum*, o incluso para familias de plantas, como ocurre con los inoculantes para leguminosas (Ellis *et al.*, 1984, Van Rhijin & Vanderleyden, 1995, Kokalis-Burrelle *et al.*, 2002, Mayak *et al.*, 2004, Prell *et al.*, 2009).

La especificidad de la interacción de la planta con el microorganismo puede deberse a una mayor afinidad y facilidad de colonización de la bacteria, o bien a que las cepas pueden tener mecanismos mejores para reconocer determinadas señales de una planta en concreto; o incluso existen otros puntos de colonización, ya sean radiculares, foliares u otros. Por su parte, a nivel de microorganismo, casi cada cepa va presentar distinta eficiencia ante las mismas situaciones (Ellis *et al.*, 1984, van Elsas & Heijnen, 1990, Paul & Lade, 2014).

Los niveles de expresión de fitohormonas como ácido indolacético o ácido giberélico varían mucho entre especie. Sin embargo, estos niveles pueden depender fuertemente de

las condiciones ambientales o del nivel nutricional de la cepa. De este modo, por ejemplo, muchas cepas son capaces de producir ACC desaminasa, como *Pseudomonas putida* KT2440, y, pese a ello, no reflejan un buen aporte de la misma bajo estrés por sequía bajo la interacción con una planta hospedadora ya que no toleran bien las dichas condiciones (Fahad *et al.*, 2015). Esto se debe a que en numerosas ocasiones intervienen varias rutas simultáneamente, ya que, en su mayoría, las rutas relacionadas con la resistencia, pueden ser parte de otras que cubran necesidades metabólicas ajenas al estrés. A mayor número de rutas implicadas y mayor relación entre ellas, más probable es que la tolerancia a la sequía del organismo sea mayor (Fahad *et al.*, 2015).

Para un uso comercial se han de superar los ensayos de laboratorio y de invernadero, esto implica el empleo de uso de sustratos y ambientes no estériles, luminosidad y humedad no controlada, y exposición a agentes biológicos (Liddell & Parke, 1989, Beneduzi *et al.*, 2012, Jarak *et al.*, 2012). De igual modo, se han de llevar a cabo una serie de ensayos de campo (al menos en tres años distintos) que garanticen una aplicación realista. En estas situaciones, el control sobre los factores ambientales es muy bajo, siendo la fase más compleja y difícil de superar (Olmedo & Thuar, 2000, Jarak *et al.*, 2012). Las condiciones de liberación, la competencia y la dispersión en sustratos naturales van a influenciar definitivamente en los resultados que se obtengan (Liddell & Parke, 1989, Martínez-Viveros *et al.*, 2010

En los ensayos de campo los agentes biológicos son más variados y su efecto más intenso. Las condiciones atmosféricas de temperatura, intensidad lumínica, humedad relativa y viento, son prácticamente incontrolables y van a afectar severamente a la interacción planta-microorganismo (Babalola, 2010). Sin embargo el pH, la carga de microorganismos indígenas, las poblaciones de organismos antagonistas, etc., van a ser las que más afecten a la estabilidad del inoculante. Las variaciones en todos los parámetros citados, a lo largo del año exigen un estudio a lo largo de varios periodos diferentes de tiempo, entendiéndose un mínimo de 3 años consecutivos con buenos resultados como requisito necesario para asegurar un inoculante como biofertilizante y, como protector efectivo contra estreses abióticos (Çakmakçi *et al.*, 2006). Es conveniente emplear diferentes combinaciones de microorganismos, cada uno con características nutricionales específicas más adecuadas para las diferentes fases fenológicas del cultivo (Schippers *et al.*, 1987, Malusá & Vassilev, 2014).

Los estudios de persistencia en el medio permiten un mejor uso de los inoculantes ya que, pese a aislarse del suelo, no todas las cepas responden igual a las poblaciones preexistentes, por masiva que sea su introducción en el medio, llegando a ser contraproducente. Así, es necesario asegurar un buen contacto con la planta y un tiempo mínimo en el medio que asegure una buena interacción (Ellis *et al.*, 1984, De Leij *et al.*, 1995, Bergsma-Vlami *et al.*, 2005, Kokalis-Burelle *et al.*, 2006).

3.2. Formulaciones

La formulación es fundamental para el correcto funcionamiento de un inoculante. Las formas de aplicación más comunes son líquido, gel, turba-esfagno o polvo, que se pueden aplicar recubriendo semillas o como aporte directo al suelo, dependiendo de la facilidad de empleo de la maquinaria a utilizar o la época del año en que se suministren (Smith, 1995, Stephens & Rask, 2000, Trivedi *et al.*, 2005, Malusá *et al.*, 2012).

Las formulaciones líquidas de base acuosa u oleosa suelen ser las más costosas por la necesidad habitual de refrigeración, por el almacenamiento y el transporte y por el precio en sí del disolvente o caldo, así como por verse más afectadas por contaminaciones o desecación; sin embargo, son a su vez las más fáciles de aplicar por ajustarse bien a la distribución con camiones y sembradoras (Stephens & Rask, 2000). Los basados en turba no son tan comunes pero supusieron las primeras formulaciones con cierto éxito de aplicación (Nobbe & Hiltner, 1896). Se comenzaron a usar en Estados Unidos muy temprano y durante muchos años fueron la única formulación comercial para uso en campo. Pese a ser casi inerte, orgánico y biodegradable, tiene problemas como la dificultad de ajustar los inoculantes en número propicio, así como que el aglutinante necesario (leche en polvo, miel, refresco de cola) requiere ajustes continuos ya que no existe uno de uso general que funcione bien en todas las condiciones. Por su parte las semisólidas o en forma de polvo o granulares permiten una inoculación de precisión desde la semilla o para su aplicación directa al suelo como aporte externo. Existen multitud combinaciones de cargadores o coadyuvantes a nivel comercial, como carboximetil celulosa, almidón, arcillas inocuas, alginato, leche en polvo, talco, etc. Sin embargo, su efectividad va a depender fuertemente de la capacidad de la cepa de regenerarse desde la cápsula, pastilla o gránulo. Pese a ello, son habitualmente formulaciones costosas en su fabricación, no así en su mantenimiento-transporte. En cualquier caso, toda formulación debe adaptarse a las necesidades homeostáticas y nutritivas de la cepa, para garantizar un

tiempo mínimo de resiliencia en el suelo, así como a las condiciones específicas de planta y medio. Existe gran variedad de formulaciones y preparados para corto y medio plazo que se ajustan bien a periodos de reinoculación. Sin embargo, existen pocas preparaciones a largo plazo debido a la dificultad de mantener la viabilidad y efectividad (Nobbe & Hiltner, 1896, Bashan, 1998, Chakraborty *et al.*, 2009, Fernandes Junior *et al.*, 2009).

Cuando se emplean inoculantes para la protección frente a sequía, los procedimientos de reinoculación deben ajustarse aún más específicamente. En esta situación, debe reinocularse ‘a demanda’, de forma que se garantice inoculante sin emplear en exceso, dado que eso no va a mejorar su efectividad. Monitorizar el estado de los inoculantes tanto en las plantas como en el suelo es la mejor forma de planificar los tiempos de reinoculación (Smith, 1995, Stephens & Rask, 2000, Malusá & Vassilev, 2014).

3.3. Bioseguridad

Pese a que se está empezando a trabajar por aunar los conceptos alrededor de qué se considera un biofertilizante a nivel legal, así como en la calidad de los mismos, apenas existen reseñas a la seguridad de su aplicación. El Reglamento Europeo (CE) No. 2003/2003 tiene por objeto regular el uso correcto de los materiales destinados principalmente para proporcionar nutrientes a las plantas. Algunas propuestas como la de Malusá y Vassilev en 2014, recomiendan recoger en el etiquetado de los productos información adicional y/o precauciones en caso de ser necesario ya que hay poco control sobre los efectos ambientales. Actualmente la legislación se encuentra en proceso de cambio y tanto el Parlamento Europeo como el Consejo de la Unión Europea están trabajando para llegar a uniformar una legislación para el año 2017. Este creciente interés surge de la necesidad de desarrollar conceptos como los recogidos en el Reglamento Europeo (CE) No. 1107/2009, donde se hace referencia a ‘los productos fitosanitarios que pueden entrañar riesgos y peligros para los seres humanos, los animales y el medio ambiente, en particular si se comercializan sin haber sido controlado y autorizado, o si se utiliza incorrectamente’. Además reconoce la necesidad de aunar criterios a la hora de hacer un uso eficiente y controlado de dichos productos (Pliego *et al.*, 2011, Malusá & Vassilev, 2014).

Pese a la efectividad de muchas cepas fertilizantes, y del conocimiento cada vez mayor de los mecanismos implicados en la promoción del crecimiento en plantas, existe otro factor más a controlar antes de una aplicación real, la bioseguridad de dichas cepas tanto a nivel ambiental como animal y humano (Wynne, 1992, Berg *et al.*, 2005, Berg, 2009, Selvakumar *et al.*, 2014, OECD, 2015).

Las cepas susceptibles de convertirse en inoculante se identifican taxonómicamente, principalmente con técnicas ligadas al ADN del microorganismo (identificación por gen codificante del ARNr 16S), para posteriormente clasificarse por grupos de riesgo, los cuales indican su grado de seguridad (Berg *et al.*, 2005). El trabajo sólo continuaría con las cepas clasificadas como de riesgo 1. Sin embargo, antes de registrarse como producto debe asegurarse su inocuidad real mediante pruebas de patogenicidad y ecotoxicidad con objeto de evitar usar cepas que entrañen el mínimo riesgo sobre la salud o el medio ambiente. Entre dichos ensayos, destaca el de *Caenorhabditis elegans* como modelo para evaluar el potencial patógeno de las cepas a inocular. Actualmente este último ensayo se ha venido usando sobre todo con aquellas cepas con características aptas para el control biológico. Además de dichas pruebas, hay que conocer bien si las cepas se valen de mecanismos como la producción de antibióticos o de otros compuestos tóxicos o perniciosos a varios niveles ecológicos (Egamberdieva *et al.*, 2008, Zachow *et al.*, 2009).

A nivel de ecosistema que puede afectarse, se incluyen una amplia gama de organismos micro y macroscópicos involucrados, desde microfauna bacteriana y fúngica, protozoos, nematofauna, anélidos, insectos y otros invertebrados, pequeños mamíferos y escalones superiores (Stephens & Rask, 2000, Kohler, 2008).

Numerosos estudios que muestran como plantas y microorganismos transgénicos son capaces de mejorar la resistencia ante la desecación. Ante esta situación, también se han tratado de identificar posibles efectos en el medio que confirmen su seguridad (transferencia horizontal de genes, influencia en el desarrollo de plantas silvestres, etc.) (Andow & Zwahlen, 2006, Ashraf, 2010, Gaudin *et al.*, 2013). Sin embargo, estos estudios son escasos para las cepas promotoras empleadas como inoculantes y como protectoras frente a desecación. La mayoría de los estudios evalúan la influencia del inoculante sobre las poblaciones bacterianas. Algunos de los estudios más completos han usado como cepas de referencia algunas de los géneros *Bacillus*, *Burkholderia* o *Pseudomonas* (De Leij *et al.*, 1995, Bergsma-Vlami *et al.*, 2005). El uso de aquellas cepas

con producción de sustancias tóxicas o sustancias antibióticas (por ejemplo, el complejo Bcc de género *Burkholderia*), deben estar especialmente controladas (Bergsma-Vlami *et al.*, 2005, Fernando *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2013)

Debe considerarse así mismo la posibilidad de que se produzcan los lixiviados y drenajes, sobre todo en casos de uso excesivo o mal planificado. Dichos eventos pueden alcanzar los sistemas ecológicos acuáticos, pudiendo verse afectados otras bacterias, hongos, algas o pequeños invertebrados por los inoculantes empleado (Wynne, 1992, Kriebel *et al.*, 2001, Purvers *et al.*, 2002, Berg, 2009).

3.4. Monitorización

La persistencia de un inoculante en el medio es un parámetro básico a nivel de seguridad y efectividad. Así, el recuento de células viables tras una inoculación sería la técnica más básica y menos precisa. Una técnica más refinada consiste en marcar las cepas con algún gen bioluminiscente o con etiquetado de fluorescencia (genes *luc* o codificantes para proteínas fluorescentes), aunque esta técnica no puede usarse fuera de un ambiente controlado y es orientativa. Por último, puede acudir a la amplificación de genes específicos aplicando la técnica de amplificación cuantitativa o qPCR. En el caso de situaciones de estrés por sequía, se puede elegir genes relacionados con la resistencia a la misma que sean específicos para la evaluación (Bohlool & Schmidt, 1973, Ellis *et al.*, 1984, Miethling *et al.*, 2000, Henry *et al.*, 2004, Fierer *et al.*, 2005, Belimov *et al.*, 2007, Acosta-Martínez *et al.*, 2008, Couillerot *et al.*, 2010, Rolli *et al.*, 2015).

Con la combinación de varias técnicas relativamente sencillas y rápidas, se puede poner a punto un sistema de monitorización adecuado que permita predecir cambios importantes y, de este modo, facilitar que se apliquen las medidas necesarias de puesta a punto. Esta situación permite actuar con anticipación y dar una respuesta rápida en un proceso de inoculación para protección vegetal efectivo (Miethling *et al.*, 2000, Kokalis-Burelle *et al.*, 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas empleadas en la experimentación llevada a cabo en esta tesis fueron aisladas por Narváez-Reinaldo y colaboradores (Narváez-Reinaldo *et al.*, 2010) como cepas tolerantes a la desecación, e incluyeron a las cepas *Microbacterium sp.* 3J1, *Arthrobacter koreensis* 5J12A, *Rhodococcus sp.* 4J2A2, *Arthrobacter siccitolerans* 4J27 y *Leucobacter sp.* 4J7B1. Las cepas control empleadas en los diferentes ensayos se resumen en la tabla 1.

Cepa	Ensayo	Control	Referencia
<i>Escherichia coli</i> MC4100	Sensibilidad microbiana	Negativo	Small y col. 1994
<i>Vibrio fischeri</i> NRRL B-11177	Microtox	Negativo	Onorati y col. 2004
<i>Escherichia coli</i> OP50	Patogenicidad sobre <i>C. elegans</i>	Negativo	Darby y col. 1999
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	Patogenicidad sobre <i>C. elegans</i> Microtox Ecotoxicidad sobre <i>Daphnia magna</i> Patogenicidad sobre <i>Mus musculus</i>	Positivo	Ruiz-Díez y col. 2003 Stelma y col. 1987
<i>Serratia marcescens</i> BS 303	Promoción crecimiento en plantas	Positivo	Nongkhaw y Joshi 2014
<i>Serratia proteamaculans</i> PADG 3630	Sensibilidad microbiana Patogenicidad sobre <i>C. elegans</i> Ecotoxicidad sobre <i>C. carnea</i> Ecotoxicidad <i>A. bipunctata</i> Microtox Ecotoxicidad sobre <i>Daphnia magna</i> Patogenicidad sobre <i>Mus musculus</i> Promoción crecimiento en plantas	Positivo	Meca y colaboradores 2009 Nongkhaw y Joshi 2014
<i>Serratia entomophila</i> CIP102919	Ecotoxicidad sobre <i>C. carnea</i> Ecotoxicidad <i>A. bipunctata</i> Ecotoxicidad sobre <i>E. foetida</i> Promoción crecimiento en plantas	Positivo	Meca y col. 2009 Rosenheim 1998 Nongkhaw y Joshi 2014
<i>Pseudomonas fluorescens</i> IABPF05	Bioseguridad-Promoción crecimiento	Positivo	Este trabajo
<i>Bacillus subtilis</i> IABBS05	Bioseguridad-Promoción crecimiento	Positivo	Este trabajo
<i>Azotobacter vinelandii</i> IABAV02	Bioseguridad-Promoción crecimiento	Positivo	Este trabajo
<i>Rhizobium leguminosarum</i> IABRL05	Bioseguridad-Promoción crecimiento	Positivo	Este trabajo
<i>Microbacterium foliourum</i> P333/02 (DSM 12966)	Taxonómicamente cercana a <i>Microbacterium sp.</i> 3J1	Positivo	Este trabajo
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> P369/06 (DSM 13468)	Taxonómicamente cercana a <i>Microbacterium sp.</i> 3J1	Positivo	Este trabajo

<i>Arthrobacter koreensis</i> CA15-8 (DSM 16760)	Taxonómicamente cercana a <i>A. koreensis</i> 5J12A	Positivo	Este trabajo
<i>Arthrobacter luteolus</i> CF25 (DSM13067)	Taxonómicamente cercana a <i>A. koreensis</i> 5J12A	Positivo	Este trabajo
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Ecotoxicidad sobre <i>Daphnia magna</i> Promoción crecimiento en plantas Solubilización de fosfatos, sideróforos, fitohormonas, formación de biopelículas - Sensibilidad microbiana Ecotoxicidad sobre <i>C. carnea</i> Ecotoxicidad <i>A. bipuctata</i> Ecotoxicidad sobre <i>E. foetida</i> Microtox Patogenicidad sobre <i>Mus musculus</i>	Positivo - Negativo	Manzanera y col. 2002 Nelson y col. 2002 Vílchez y col. 2008 Wang y col. 2014 Vílchez y col. 2015
<i>Burkholderia cepacia</i> CC-A174	Sensibilidad microbiana Patogenicidad sobre <i>C. elegans</i> Microtox Ecotoxicidad sobre <i>Daphnia magna</i> Patogenicidad sobre <i>Mus musculus</i> Promoción crecimiento en plantas Solubilización de fosfatos, sideróforos, fitohormonas - Ecotoxicidad sobre <i>C. carnea</i> Ecotoxicidad <i>A. bipuctata</i> Ecotoxicidad sobre <i>E. foetida</i>	Positivo - Negativo	Nacamulli y col. 1997 Baldwin y col. 2004 Li y col. 2013 Vílchez y col. 2015

Tabla 1. Cepas control. Se muestran las cepas empleadas como controles en los diferentes ensayos y del tipo que son, positivo o negativo, para cada uno de ellos.

2. Medios de cultivo

La composición de los medios de cultivo utilizados durante el desarrollo de este trabajo se describe a continuación. Todos ellos se esterilizaron en autoclave por calor húmedo a 120°C durante 30 min. y 1 atmósfera de presión, o por filtración usando filtros de 0.22 µm de diámetro de poro.

2.1. Medios enriquecidos

Como medios habituales de crecimiento de las cepas bacterianas se utilizaron *Tryptone soya agar* (TSA) como medio sólido y *Tryptone soya broth* (TSB) como medio líquido (OXOID). La composición de TSA fue la siguiente. triptona, 15 g; peptona de soja, 5 g; cloruro sódico, 5 g; agar, 15 g y H₂O hasta 1 litro. La composición del medio líquido TSB fue. digerido pancreático de caseína, 17 g; digerido papaico de harina de soja, 3 g; fosfato potásico di-básico, 2,5 g; cloruro sódico, 5 g; glucosa, 2,5 g y H₂O hasta 1 litro.

2.2. Medios mínimos

2.2.1 Medio mínimo M9

Para el cultivo de las células en medio mínimo se utilizó una modificación del medio M9, cuya composición fue la siguiente: solución 10xM9, 100 ml; solución A9 (“Goodies”), 2,5 ml; MgSO₄ 1M, 1 ml; citrato férrico amónico 6‰ (p/v), 1 ml y H₂O hasta 1 litro (Abril *et al.*, 1989). Las soluciones utilizadas en este medio se prepararon y esterilizaron en el autoclave por separado. Para cultivo en sólido, se añadió agar al 2,25%.

La composición del 10xM9 fue. Na₂HPO₄ x 7H₂O, 70 g; KH₂PO₄, 30 g; NH₄Cl, 10 g; NaCl 5 g; y H₂O hasta 1 litro. La solución de A9 (“goodies”) se compuso de. HBO₃, 300 mg; ZnCl₂, 50 mg; MnCl₂ x 4H₂O, 30 mg; CoCl₂, 200 mg; CuCl₂ x 2H₂O, 10 mg; NiCl₂ x 6H₂O, 20 mg; NaMoO₄ x 2H₂O, 30 mg y H₂O hasta 1 litro.

2.2.2 Medio mínimo-triptófano

Para comprobar la producción de AIA de las cepas en estudio, empleamos una modificación del medio descrito por Bano y Musarrat en la que al medio mínimo M9 anteriormente citado se le adicionó L-Triptófano en una concentración de 500 µg/ml (Bano & Musarrat, 2003).

2.2.3 Medio mínimo con ácidos casamínicos (CAB)

Para la determinación de la producción de ácido salicílico fue necesario adicionar a la fórmula básica de la solución salina 1xM9, una concentración final de 2% de ácidos casamínicos (CAS), la cual facilita la producción de dicho compuesto.

2.2.4 Medio Murashige y Skoog (MS)

Como fertilizante para las plantas se usó medio Murashige y Skoog (SIGMA-ALDRICH, M7150) (Murashige & Skoog, 1962), diluido 1/10 (v/v). La composición del medio concentrado se muestra a continuación: NH_4NO_3 , 1.650 mg; H_3BO_3 , 6,2 mg; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 440 mg; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,025 mg; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 370 mg; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0,025 mg; KH_2PO_4 , 170 mg; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 27,8 mg; KNO_3 , 1,9 g; $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 22,3 mg; KI, 0,83 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,25 mg; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 8,6 mg; $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$, 37,2 mg; y H_2O hasta 1 litro.

Los aditivos orgánicos comunes de la composición fueron: (i-Inositol, 100 mg; Vitamina B3 o Niacina, 0,5 mg; Vitamina B6 o Piridoxina · HCl, 0,5 mg; Vitamina B1 o Tiamina · HCl, 0,1 mg; IAA, 20 mg; Kinetina, 1 mg; Glicina (recristalizada), 2 g; Edamina (etano-1,2-diamina), 1 g; Sacarosa, 20 g; y Agar, 10 g y H_2O hasta 1 litro.

2.2.5. Medio PDA

Medio específico para el crecimiento y mantenimiento en colonia del nematodo *Caenorhabditis elegans*. Su composición por litro de medio preparado fue: dextrosa, 20 g; extracto de patata, 4 g; agar, 15 g; agua destilada hasta completar 1 L (SIGMA).

2.3. Condiciones de cultivo

Todas las cepas se cultivaron a 30°C, excepto cuando se indique lo contrario en el texto. Los cultivos líquidos se incubaron en agitación a 150 rpm en agitador orbital (Infors HT Multitron, Infors AG CH-4103, Bottmingen) con adaptadores para matraces de distintos volúmenes y para tubos de ensayo con inclinación variable.

2.4. Conservación de cepas

La conservación de cepas a corto plazo se realizó en cultivos en estría en placas de medios enriquecidos a 4°C. Para la conservación a largo plazo se realizaron dos copias de cultivos líquidos en 40% (v/v) de glicerol por cepa, quedando cada una de las copias en congeladores a -20°C y -80°C.

3. Manipulación de ácidos nucleicos

3.1. Extracción de ADN o ARN total y cuantificación

La extracción de ADN total de las bacterias en cultivo puro se llevó a cabo mediante el Kit *Extraction Blood & Tissue* siguiendo el protocolo descrito en la guía de uso del Kit de extracción de ADN para bacterias (Qiagen, Países Bajos).

Por su parte, para la extracción de ADN de suelo se utilizó el kit específico *FavorPrep Soil DNA Isolation Kit* (Favorgen Biotech Corp., Austria), y para la extracción de ADN de plantas, se empleó el kit específico *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Países Bajos). En ambos casos se siguieron los protocolos habituales y las modificaciones indicadas para condiciones de uso y su adaptación para bacterias Gram positivo en su caso. Por otra parte, la extracción del ARN total se llevó a cabo empleando el kit *RNeasy Mini Kit* (Quiagen, USA).

La cuantificación de la concentración del ADN o ARN total extraído se llevó a cabo usando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) y su software asociado. Los valores se indicaron en ng/μl y la calidad de la muestra de ácido nucleico se calculó en base a la relación de Absorbancias a las longitudes de onda 260 y 280.

3.2. Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa

La separación y visualización tanto de fragmentos de PCR, así como de ADN cromosómico se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Por cada 5 μl de muestra a analizar se añadió 1 μl de tampón de carga, y esta mezcla se depositó en un pocillo de gel de agarosa al 0,7% (p/v) en tampón Tris/acetato/EDTA (TAE), sumergido en una cubeta con el mismo tampón de corrida.

Para fragmentos de ADN o ARN inferiores a 0,5 kb, la concentración de agarosa en el gel fue de 1% (p/v). La separación se realizó por electroforesis horizontal sumergida a un voltaje entre 70-90 V. Las moléculas de ADN o ARN se tiñeron con GelRed (MBL), del que se añadió 0.5 μl al 1% (p/v) a 30 ml de solución de agarosa en TAE previamente fundida. El ADN se visualizó mediante exposición del gel a luz ultravioleta (254 nm de longitud de onda) usando un equipo ChemiDoc MP Imagin System (Biorad, CA, USA). El tampón de carga 5X empleado se preparó en agua con la siguiente composición (p/v): azul bromofenol, 0,025%; xileno cianol, 0,025% y glicerol, 30%.

3.3. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR)

Éste método se utilizó para comprobar la presencia de genes codificantes para la determinación de la presencia o ausencia del gen *gfp*.

La reacción de amplificación contuvo. ADN molde, 0,2 µg de ADN cromosómico; cebadores, 50-100 pmoles; Taq ADN-polimerasa, 0,5 U/100 µl; H₂O hasta 100 µl. Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes. Fase de inicialización a 95°C durante tres min., que fue seguida por 25 ciclos compuestos de fase de desnaturalización (30 segundos a 95°C), fase de hibridación con los cebadores (30 segundos a 4°C por debajo de la media de la temperatura de fusión de los cebadores), y fase de elongación.

Finalmente se incluyó un paso de 10 minutos a 72°C para terminar de extender posibles cadenas incompletas. La conservación del producto de PCR en la termocicladora se realizó a 15°C. El modelo de la termocicladora utilizado fue Eppendorf Mastercycler proS vapo.protect (Eppendorf, Alemania). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación quedan reflejados en la tabla 2.

Cebador	5'→3' secuencia	Referencia
GFP-Fw1	GTCAGTGGAGAGGGTGAAGG	Lally <i>et al.</i> 2011, No publicado
GFP-Rv2	ACGGGAAAAGCATTGAACAC	Lally <i>et al.</i> 2011, No publicado
3J1treZ-Fw	CGCGAGTACATCATCGAGAA	Este trabajo
3J1treZ-Rv	GTTGACCTGAGCGGAGAGAG	Este trabajo
3J1rpoB-Fw	GAGATCCGCATCGCGACCGATGA	Este trabajo
3J1rpoB-Rv	AGACGACGCTTGTGGTCAGA	Este trabajo

Tabla 2 - Oligonucleótidos utilizados en PCR, qPCR y RT-qPCR. Se muestran los oligonucleótidos empleados en las amplificaciones de los genes *gfp*, *treZ* y *rpoB*.

3.4. Conjugación de cepas con *gfp*

Para insertar el gen *gfp* codificante para la proteína verde fluorescente se usó un transposón mini-Tn7 (figura 12) capaz de insertarse en un sitio específico y situado en el terminador de la transcripción de los genes GLM, y que permite que las secuencias insertadas se mantengan de manera estable durante un elevado número de generaciones sin afectar a la expresión de otros genes. El sistema de etiquetado mini-Tn7 se basa las construcciones desarrolladas por Koch y colaboradores (Koch *et al.*, 2001).

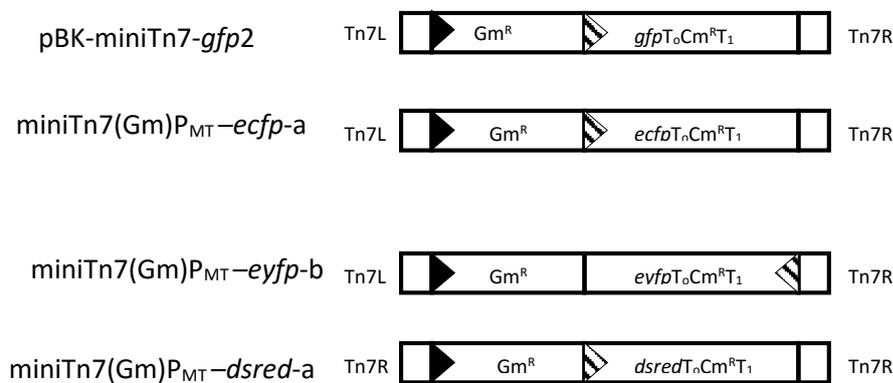


Figura 12. Esquemática de los transposones en mini-Tn7. Se describen las construcciones portadoras de los distintos plásmidos portadores de proteínas fluorescentes empleadas. GFP2, eCFP, eYFP y dsRED.

3.5. Amplificación y cuantificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real

Para identificar y cuantificar el número de copias del gen *gfp* tanto del ADN extraído del suelo como obtenido de raíces u otros tejidos de planta, se llevó a cabo una PCR cuantitativa tiempo real (qRT-PCR) según las indicaciones de Liu y colaboradores (Liu *et al.*, 2010) con algunas modificaciones (Couillerot *et al.*, 2010, Quecine *et al.*, 2012). Para poder estimar el número de copias, se prepararon curvas de ADN a partir de diluciones de ADN puro extraído de cultivos cuyas concentraciones se determinaron previamente con un equipo NanoDrop 2000 (Fisher Scientific, USA). Las curvas de calibración se emplearon como patrón de cuantificación para el ADN extraído de cada uno de los suelos inoculados.

La qRT-PCR se realizó con el equipo LightCycler Nano (Roche Life Science, USA) empleando el kit comercial FastStart essential DNA Green Master (Roche) con un preparado de Mezcla Maestra con SYBRGreen como agente intercalante fluorescente. Las mezclas maestras contenían 6 µl de H₂O calidad PCR, 10 µl de la mezcla comercial (que contenía tampón 10X, dNTPs 200 µM, 1x SYBERGreen y MgCl₂ 3mM), 1 µl de cada cebador y 2 µl de ADN molde en un volumen final de 20 µl. El programa para la amplificación y cuantificación en tiempo real fue el siguiente: desnaturalización inicial de 95°C durante 5 min., fase de amplificación de 45 ciclos con una fase de desnaturalización de 95°C (30 segundos), una fase anillamiento a 58°C (15 segundos) y otra de desnaturalización a 72°C (30 segundos), curva de fusión con un único ciclo de 95°C (5 segundos), 65°C (1 minuto) y 95°C (5 segundos), y finalización con enfriamiento a 37°C (30 segundos). La adquisición de la intensidad de fluorescencia se registró al final de cada ciclo de anillamiento.

4. Promoción del crecimiento y protección frente a la desecación en plantas

4.1. Especímenes vegetales

Las plantas seleccionadas para comprobar la actividad de promoción del crecimiento y de protección frente a la sequía de las cepas bacterianas candidatas, fueron pimientos de la variedad Dulce italiano (*Capsicum annuum*) y tomates de la variedad Marmande (*Solanum lycopersicum*). Por otra parte, también se llevaron a cabo ensayos de inoculación y seguimiento con cepas de Trébol blanco (*Trifolium repens* var. Aran), maíz (*Zea mays*) y soja (*Gycine max*).

Las semillas para pregerminación propia fueron obtenidas de Semillas Fitò (Barcelona, España), salvo las semillas de trébol, obtenidas por cortesía del reservorio irlandés de variedades y cepas de trébol, Teagasc (The Agriculture and Food Development Authority, Oak Park, Co. Carlow, Irlanda).

Para ensayos de estadios más tardíos, se emplearon plantas de vivero, de cada una de las variedades citadas anteriormente, producidas por Saliplant (Carchuna y Sanfa Fe, Granada, España).

4.2. Pregerminado de semillas de plantas

Las semillas de pimiento se esterilizaron por inmersión durante 3 minutos en una solución de hipoclorito sódico al 5% (v/v). Tras tres lavados con agua destilada estéril se incubaron en un último lavado durante 2 horas para eliminar cualquier resto de hipoclorito sódico.

Se depositaron entre 75-100 semillas en cada bandeja de polipropileno blanco de 11x15x6 cm con vermiculita genérica de calibre 2-3 esterilizada en autoclave 30 min. a 1 atmósfera de presión y 121°C. La cantidad de vermiculita empleada no superó la mitad de la capacidad de la bandeja y la humedad de la misma se mantuvo en torno al 20% (v/v). El grado de humedad se registró con una sonda de suelo modelo Hydra-Probe II Stevens POGO Soil Sensor. Sobre la misma, a una profundidad de aproximadamente 2 cm y con un espaciado de entre 1-2 cm, se introdujeron las semillas.

El proceso de siembra se llevó a cabo en campana de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad. Tras esto se envolvieron las bandejas empleadas en papel de aluminio para conservar la humedad y se introdujeron, dentro de una bolsa de polietileno, en un horno a 30°C durante 48 horas. Con esta metodología de pregerminado se llegó a obtener una germinación en torno al 75% de las semillas.

4.3. Cultivo y cuidados de plantas

Una vez germinadas las plantas, estas se dejaron en la bandeja con un riego periódico de 40 ml de agua destilada y estéril calculado para mantener la humedad del macetero torno al 40% (v/v) durante al menos 2 semanas hasta que las plantas alcanzaron una altura mínima de entre 1,-2 cm para asegurar el máximo de supervivencia tras el trasplante a macetas. Las macetas utilizadas fueron de polipropileno negro con una capacidad de 0,4 L, y se llenaron de vermiculita estéril hasta los 0,35 L, o 50% v/v con sustrato vegetal dependiendo del caso de estudio.

4.4. Protocolo de preparación de inóculos bacterianos para plantas

Los inóculos de las bacterias a ensayar y sus respectivos controles, se obtuvieron a partir de cultivos frescos incubados en medio sólido de TSA durante 24 horas a 30°C. Desde estas placas se tomó una única colonia que se inoculó en un tubo de ensayo con 5 ml de medio TSB (preinóculo). Tras 24 horas de crecimiento a 30°C en agitación a 150 rpm, se traspasó íntegramente a un matraz de con 50 ml de TSB para permitir un mayor crecimiento. Dependiendo de las necesidades se siguió escalando la cantidad de cultivo en las mismas condiciones. El cultivo obtenido fue centrifugado a 20.000 x g y durante 15 min en una centrífuga Beckman Avanti Centrifuge J-25 (Beckman, USA), o bien 4.696 x g durante 15-20 min en una centrífuga SL 16R Centrifuge (Thermo Scientific, USA) dependiendo de las cantidades necesarias de inóculo de cada cepa para obtener una absorbancia de 1 a 600 nm al resuspender el producto del centrifugado en solución salina M9 (lo que supuso una cantidad de entre 1×10^8 - 1×10^{10} UFC/ml dependiendo de cada cepa). La medida de la absorbancia se obtuvo tras dilución de muestras 1/10 (v/v) en un espectrofotómetro modelo Shimadzu UV1800. Tras obtener el volumen necesario, se inocularon por irrigación las plántulas con un volumen de 1:10 aproximadamente respecto al volumen de sustrato presente en el macetero.

Estos maceteros se incubaron en una cámara de crecimiento Modelo GROW de Ing. Climas, durante el resto del proceso experimental o alternativamente en una habitación de condiciones controladas. Las condiciones de humedad relativa durante la incubación fueron de 50-60%. La iluminación de la cámara se basó en ciclos diurnos y nocturnos de 12 horas con aumento y reducción de la luminosidad progresiva para simular amanecer y anochecer. Esta constó en ciclo diurno de 66 Watt/cm \cdot s² (aproximadamente 1.400-1.500 lux) y de 33 Watt/cm \cdot s² durante las fases de amanecer y anochecer. La temperatura se mantuvo entre 18-20°C en ciclo nocturno y entre 20-25°C en ciclo diurno. Las plántulas se mantuvieron dos semanas con riego periódico (40 ml) cada 72-86 horas en los maceteros. Al día 7 de pasar las plantas a las macetas se inocularon con las cepas bacterianas y al día 14 tras pasarlas a maceta se les añadieron 40 ml de fertilizante MS (Murashige & Skoog, 1962). Transcurrido este período se inició el experimento contando este día como tiempo 0, bien para ensayos sin riego, bien para ensayos de irrigación periódica.

4.5. Toma de muestras de las plantas

Al inicio del experimento se midió la altura de las plántulas una semana antes de la primera extracción. Cada semana se extrajeron 3 plántulas inoculadas con cada una de las cepas, a las cuales se les midió en el momento de la extracción la altura de la plántula, así como el peso fresco (PF) en una balanza de precisión. Tras esto se incubaron durante 48 horas en oscuridad y a una humedad del 100% para medir el peso totalmente túrgido (PTT). Por último se determinó el peso seco (PS) para lo cual se introdujeron las plantas en un horno a 75-80°C durante 48 horas para obtener este valor (Bashan & de-Bashan, 2005). Con estos datos se calculó el contenido relativo de agua, CRA, según la siguiente ecuación. $CRA = (PF-PS)/(PTT-PS)$ (Mayak *et al.*, 2004). En la figura 13 pueden observarse detalles del proceso de toma de datos.

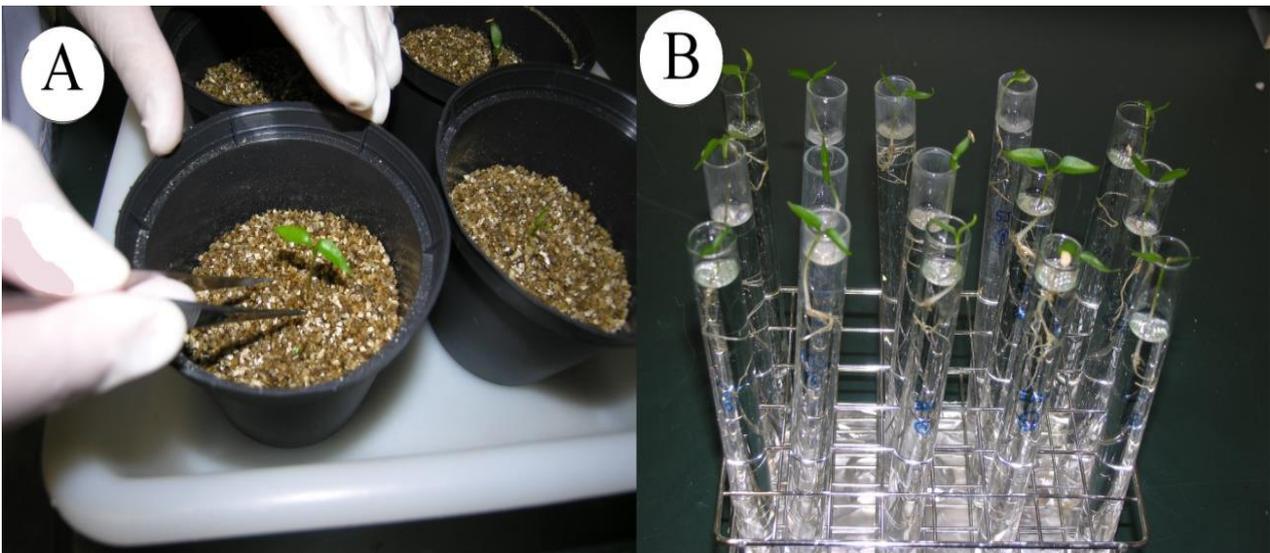


Figura 13. Detalle de las distintas tomas de parámetros. A Se muestra el proceso de extracción de las plántulas de pimiento para realizar la medida de Peso Fresco (PF). B Gradilla de tubos de ensayo marcados, preparados para la medida del Peso Totalmente Túrgido (PTT).

5. Pruebas bioquímicas. Determinación de producción de fitohormonas

5.1. Determinación de trehalosa intracelular

La trehalosa intracelular se determinó de acuerdo con Manzanera y colaboradores (2002) (Manzanera *et al.*, 2002) con ligeras modificaciones. Se tomaron muestras de 1ml de cultivos en fase de crecimiento exponencial. Estas se centrifugaron y lavaron empleando medio mínimo 1xM9 sin fuente de carbono. Los sedimentos bacterianos se lisaron y extrajeron con etanol 70% (p/v) a 80°C durante 1 hora. Las muestras se volvieron a centrifugar y se recogió únicamente el sobrenadante, al que se añadieron 50 µl de sacarosa 1 mg/ml como patrón interno. Las muestras fueron desecadas para evitar picos de etanol en la cromatografía.

La cromatografía de gases fue llevado a cabo en un sistema de cromatografía de iones de alto rendimiento 940 professional IC Vario 2 (Metrohm, Suiza) con una columna Metrostep Carb 2 de copolímero de poliestireno-divinilbenceno (con grupos de amonio cuaternario) de 250 mm por 4,0 mm (Metrohm, Suiza). La temperatura de la columna se fijó en 30°C a una presión de 130 atmósferas (1911 psi). Las concentraciones de trehalosa se calcularon respecto a una curva estándar de referencia, calculando la eficiencia el proceso respecto a la sacarosa detectada con referencia a los recuentos de células viables.

5.2. Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT)

La actividad SOD se determinó usando la técnica de Beauchamp y Fridovich ((Beauchamp & Fridovich, 1971)). Éste es un método colorimétrico indirecto que utiliza la conversión de nitro azul de tetrazolium (NBT) a NBT-diformazán vía radical superóxido. La riboflavina al ser expuesta a la luz se descompone dando ion superóxido. La velocidad de reducción del NBT por acción del ion superóxido está linealmente relacionada con la descomposición de la riboflavina y se ve inhibida por la SOD. Por lo tanto una unidad específica de SOD fue definida como la cantidad de enzima capaz de causar un 50% de descenso de la reducción del NBT (1 mg/ml en buffer fosfato de sodio 50 mM (pH 7,7)) por g total de proteína en la muestra. Para cada muestra se colocó en un eppendorf 1 ml de esta mezcla, 10 µl de una solución de 0,4 mg/ml de riboflavina (Fluka, Estados Unidos) en buffer fosfato de sodio y 20 µl de la muestra correspondiente o blanco (buffer). Se colocaron 200 µl de esta mezcla de reacción por cuadruplicado en cada

pocillo de una microplaca de 96 pocillos, que fue mantenida a 20 cm de distancia de un tubo de luz blanca (20 watts) de 32 mm de diámetro y 60 cm de largo (Goodyear, China), y a los 0, 10, 20, 30 y 60 min se leyó la absorbancia a 560 nm en un lector de microplacas. Los resultados se contrastaron con una curva patrón colorimétrica. Se seleccionó el punto de máxima actividad para cada cepa.

La actividad catalasa de las cepas a ensayar se determinó usando el método de Aebi (1984) (Aebi, 1984) midiendo la descomposición del H_2O_2 directamente por el descenso de la absorbancia a 240 nm como fue descrito por Beers y Sizer (1952) (Beers & Sizer, 1952). Para esta medición, se realizó previamente una curva estándar de H_2O_2 haciendo diluciones seriales a partir de una solución de H_2O_2 30 mM en buffer fosfato de potasio monobásico 50 mM (pH 7,0). Luego se leyó la absorbancia de las distintas diluciones realizadas a 240 nm. De esta manera se obtuvo una recta que posteriormente fue utilizada para determinar la cantidad de H_2O_2 presente en la muestra expresada en mmol. En una cubeta de cuarzo se coloca una alícuota de cada una de las muestras sin diluir (50 μ l) o blanco (buffer) en presencia de 3 ml de una solución de H_2O_2 30 mM en buffer fosfato de potasio monobásico. Así se registró espectrofotométricamente el descenso de la absorbancia a 240 nm a los 0, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 seg. Una unidad específica de actividad catalasa se definió como la cantidad de enzima que degrada 1 mmol de H_2O_2 por min y por g total de proteína en la muestra. Se seleccionó el punto de máxima actividad para cada cepa.

5.3. Determinación de la producción de ácido indolacético (AIA)

La producción de ácido indolacético (AIA) por las cepas bacterianas en estudio se determinó según el método de Bano y Musarrat (Bano & Musarrat, 2003). Para este ensayo las cepas se inocularon en medio mínimo M9 suplementado con 0,5% (p/v) de glucosa y 500 μ g/ml de triptófano y se incubaron a 24 h a 150 rpm y 30°C. Se extrajo una parte del cultivo (5 ml) de cada tubo y se centrifugó a 4.800 x g (centrífuga SL 40 Centrifuge Series, Thermo Scientific, USA) durante 15 min. Se transfirieron 2 ml del sobrenadante a un tubo nuevo con 100 μ l de ácido ortofosfórico 10 mM y 4 ml de reactivo de Salkowsky (1 ml de $FeCl_3$ 0,5 M en 50 ml de $HClO_4$ al 35%). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 25 min y se registró la absorbancia a 530 nm.

Para llevar a cabo el estudio colorimétrico del AIA producido por las cepas objeto de estudio recurrimos a la realización de una curva de calibrado o regresión de AIA puro a distintas concentraciones con un software específico proporcionado por la web de Current Protocols, denominado “*Colorimetric Assay Calculation Tool*” (<http://www.currentprotocols.com/tools/colorimetric-assay-calculation-tool>).

5.4. Determinación de la producción de ácido giberélico (GA₃) y ácido abscísico (ABA)

Las determinaciones de ambas fitohormonas producidas por las cepas candidatas se hizo siguiendo los protocolos cualitativos por cromatografía de capa fina o TLC, y cuantitativos por cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC según Karadeniz y colaboradores (Karadeniz *et al.*, 2006), con ligeras modificaciones tomadas de Ünyayar y colaboradores y de Rose y colaboradores (Ross *et al.*, 1987, Unyayar *et al.*, 1996).

Las bacterias se cultivaron en TSB a 120 rpm a 30°C hasta que alcanzaron el final de la fase exponencial de crecimiento. Se extrajeron 100 ml de los cultivos y, posteriormente se centrifugaron a 4.800 x g durante 15 min. y se filtraron para esterilizar los sobrenadantes. También se les añadió 1 ml de hidroxitolueno butilado (BHT) para evitar la oxidación de las hormonas. Tras esto se llevó a cabo la extracción con etilacetato y concentración con rotavapor, para poder someter a las muestras a cromatografía de capa fina (TLC). Esta cromatografía se realizó en una mezcla de isopropanol:amoníaco:agua destilada (10:1:1, v/v/v) en placas Silicagel TLC (60F254 TLC, Merck). Las bandas de GA₃ y ABA y los valores de R_f, entendidos como la distancia de la muestra desde el origen respecto a la distancia del eluyente desde el origen en la placa, fueron visualizados bajo luz UV a 254 nm, respecto a patrones estándar.

Las bandas detectadas se extrajeron de las placas de TLC, se disolvieron en metanol y se analizaron por HPLC. Para separarlas se usó una columna de 25 cm x 4,6 mm, LC-18 fase Supelcosil en un cromatógrafo WATERS modelo ALLIANCE 2690, con un detector de fluorescencia WATERS modelo M-474 (Centro de Instrumentación Científica - UGR). Las muestras se analizaron en condiciones isocráticas con un 30% de metanol (ajustado a pH 3,0 con 0,1 M de H₃PO₄) para GA₃, y 55% de metanol (0,1 M en ácido

acético ácido) para ABA. Las longitudes de onda del detector UV fueron 208 y 265 nm respectivamente. El tiempo total de ejecución para las separaciones fue de aproximadamente 15 min. a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Las hormonas se cuantificaron por referencia al área del pico obtenido para sus correspondientes controles estándar.

5.5. Determinación de la producción de ácido salicílico (SA)

La determinación cualitativa mediante cromatografía de capa fina o TLC se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Buysens y colaboradores (Buysens *et al.*, 1996), mientras que la determinación cuantitativa se llevó a cabo por colorimetría según las indicaciones de De Mayer y Hofte (De Meyer & Hofte, 1997).

Para conocer si las cepas candidatas eran capaces de producir ácido salicílico, se hicieron crecer estas en medio mínimo con ácidos casamínicos (CAB) durante 24 h a 150 rpm y a la temperatura óptima de cada cepa. De este cultivo se centrifugaron 25 ml a 2.800 x g durante 15 min. Se hicieron 3 extracciones con etilacetato (1:3, v:v) y se secó completamente en rotavapor. La muestra se resuspendió en 1 ml de metanol y se depositó 1-2 µl de la mezcla en la placa de cromatografía Silicagel TLC (60F254 TLC, Merck, Alemania), empleando un control de SA estándar (1 mg/ml). La carga de la TLC se hizo en base a una mezcla de cloroformo:ácido acético:etanol (90:5:2.5, v/v/v) y se dejó correr durante 30 min. La placa se reveló bajo luz ultravioleta y la región con SA se identificó por su color azul ($\lambda=302$ nm), al igual que en el caso del control. Además, dicha región se volvió violeta al rociarla con 0,1 M de FeCl₃ en 0,1N HCl. El R_f se resolvió en torno a 0,6.

Para determinar la concentración, se centrifugaron nuevamente 25 ml del cultivo a 2.800 x g durante 15 min. Nuevamente, se realizaron la extracción y concentración como se indica anteriormente. Se añadieron 5 µl de 2 M FeCl₃ y 3 ml de agua destilada de 1 ml del extracto concentrado. El complejo hierro-SA se volvió púrpura en la fase acuosa, lo que permitió medir su absorbancia diferencial a 527 nm. Los resultados se compararon con una curva patrón de SA disuelto en etilacetato (tratado igualmente con 2 M FeCl₃ y H₂O destilada).

5.6. Medidas de etileno

Para conocer la producción de etileno de las plantas inoculadas en estudio se siguieron las indicaciones de Yeang y colaboradores, con leves modificaciones (Yeang *et al.*, 1980). Las plantas se introdujeron en viales de vidrio de 30 ml de volumen sellados con tapón de goma y cierre de argolla de aluminio prensada. Una vez cerrados herméticamente se extrajo de cada vial 1 ml del volumen total a los tiempos 0, 2 y 4 horas. El etileno producido se detectó en un cromatógrafo de gases HP 5890, con un detector de ionización de llama (Flame Ionization Detector, FID, por sus siglas en inglés) con una mezcla de gases a presión compuesta por aire (2 bares) e hidrógeno (1 bar), y una columna específica *Stainless-Steel* (columna empaquetada) Poropak R de 180 cm de longitud total, 3.2 mm de sección y 150-180 micrones de ancho de malla. Como gas portador para el cromatógrafo, se utilizó nitrógeno molecular (N₂) con un flujo de 55 ml/min. Las condiciones de la cromatografía de gases fueron 65°C de temperatura para la columna, 120°C para el inyector y 105°C para el detector.

5.7. Determinación de la actividad enzimática de la ácido aminociclopropano carboxílico desaminasa (ACCd)

Se determinó espectrofotométricamente la producción de α -cetobutirato como indicador de catabolismo del ACC mediante ACC desaminasa de las cepas siguiendo las indicaciones de Penrose y colaboradores (Penrose *et al.*, 2001, Penrose & Glick, 2003). Tras un cultivo en medio mínimo, los sedimentos de células bacterianas obtenidas por centrifugado a 14.000 rpm durante 5 min, se resuspendieron en 1 ml de Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6, y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. El contenido se centrifugó a 16.000 x g durante 5 min y se retiró el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 600 μ l de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5. Posteriormente se añadieron 30 μ l de tolueno a la suspensión celular y se agitó durante 30 s. Doscientos microlitros de la mezcla de células con tolueno se colocaron en un tubo de microcentrífuga nuevo donde se añadieron también 20 μ l de ACC 0,5 M. La mezcla se agitó brevemente y después se incubó a 30°C durante 15 min. Tras esto, se añadió 1 ml de HCl 0,56 M, se agitó la mezcla en agitador mecánico y se centrifugó a 16.000 x g durante 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 800 μ l de HCl 0,56 M a un mililitro del sobrenadante y se agitó durante 5

seg. Entonces, se añadieron 300 µl de reactivo de 2,4-dinitrofenilhidrazina (0,2% de 2,4-dinitrofenilhidrazina en HCl 2 M) y después se incubó la mezcla a 30°C durante 30 min. Después de la adición y mezcla de 2 ml de NaOH 2 N, la absorbancia de la mezcla se registró a 540 nm. El número de µmol de α-cetobutirato producido se determinó comparando la absorbancia a 540 nm de una muestra con una curva patrón de α-cetobutirato.

6. Rutas involucradas en los estudios de proteómica

6.1. Obtención de biomasa de raíz inoculada

Las plantas se obtuvieron siguiendo los protocolos indicados anteriormente en el apartado 2 (Cultivo y cuidado de plantas). Para estos ensayos se extrajeron al menos 3 plantas por cada condición del sustrato y se limpiaron de suelo empleando varios enjuagues con agua destilada. Para preservarlos hasta el momento del análisis y la extracción de proteínas/metabolitos, se introdujeron 0,5 g de muestra de raíz se mantuvieron en bolsas de aluminio y se sumergieron en nitrógeno líquido por al menos 5 min. Tras este congelado rápido se mantuvieron en bolsas de aluminio a -80°C hasta su uso.

6.2. Análisis de la proteómica en la relación raíz-cepa bacteriana

6.2.1. Preparación de la muestras para análisis proteómico

Los protocolos aplicados para la extracción, análisis e identificación de proteínas se basaron en las indicaciones de Jing y colaboradores con leves modificaciones (Berkelman, 2008, Thulasiraman *et al.*, 2010, Jing *et al.*, 2015). Las muestras congeladas fueron resuspendidas en tampón de lisis cuya composición fue Tris-HCl 500 mM, pH 6,8, SDS al 4% (w/v), glicerol al 30% (v/v), EDTA 1 mM, PMSF 5 mM, DTT 200 mM y Benzonasa® Nucleasa al 0.01% (v/v) (Roche).

Los sedimentos se disgregaron y homogeneizaron mediante vibración mecánica en base a tres ciclos de tres ciclos de 40 s a 6.5 m/s con un equipo FastPrep (MP Biomedicals, USA). El lisado se centrifugó a 20.000 x g durante 15 min a 4°C, y el sobrenadante se recuperó para la cuantificación de proteínas mediante el método Bradford. Para el análisis posterior se precipitaron al menos 200 µg de proteína soluble.

La precipitación de las proteínas se llevó a cabo mediante la adición de TCA frío al 50% (v/v) hasta obtener una concentración de un 10% y se incubó en hielo durante 15 min. Las muestras se centrifugaron a 20.000 x g durante 15 min a 4°C. El sedimento de proteína se lavó con 1 ml de acetona helada y se volvió a centrifugar a 20.000 x g durante 5 min a 4°C. Este lavado se repitió al menos tres veces para eliminar cualquier resto de TCA. Los tubos con las muestras permanecieron abiertos hasta la evaporación total de la acetona. Una vez secas las muestras, se almacenaron a -20°C hasta el momento de uso.

6.2.2. Isoelectroenfoque (IEE o IEF)

Con el fin de separar proteínas de peso molecular semejante se recurrió a la técnica de isoelectroenfoque para la separación adicional de proteínas en base a su punto isoeléctrico. Para ello, el sedimento de proteínas secas se disolvió en 300 µl de tampón de rehidratación BR, a 200 rpm durante 2 h a 15°C. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 20.000 x g durante 15 min a 4°C. La composición del tampón de rehidratación BR fue. Urea 8 M, Tiourea 2M, Chaps al 2% (v/v), PMSF 0,5 mM, Ditiotreitól (DTT) 20 mM, 0,5% (v/v) de Biolitos Anfólitos (Biorad, CA, USA) y trazas de azul de bromofenol.

Los sobrenadantes de las muestras, que contenían la fracción soluble de proteínas, se depositaron sobre tiras de IPG (ReadyStrips, Biorad, CA, USA) para la separación por punto isoeléctrico. El rango de pH elegido para las tiras fue de 3-10 para una mayor resolución. Las tiras se rehidrataron activamente mediante electroforesis a 50 V durante 14 h. El proceso de IEF se llevó a cabo a temperatura estable de 20°C usando Protean i12 IEF System (Biorad, CA, USA) con el siguiente programa. un paso inicial de 100 V durante 5 h, cuatro pasos de gradientes de 300 V durante 30 min, 500 V durante 7h, 1.000V hasta los 500 V/h y 8.000 V hasta los 13.500 V/h. Al final se aplicó un paso de 8.000 V hasta alcanzar los 45.000 V/h. Al final del proceso se suministraron 64.076 V/h.

6.2.3. Electroforesis de la segunda dimensión

Tras someter a las proteínas a una separación en base a su punto isoeléctrico en las tiras de IPG, éstas se equilibraron durante 15 min en 15 ml de un tampón de equilibrado de reducción (Tris HCl 75 mM, pH 8,8, urea 6 M, glicerol al 30% (v/v), SDS al 2% (p/v), DTT 10 mg/ml y trazas de azul de bromofenol), seguido por otros 15 min de incubación en 5 ml de un tampón de equilibrado alcalino (Tris HCl 75 mM, pH 8,8, urea 6 M, glicerol al 30% (v/v), SDS al 2% (p/v), iodoacetamida 25 mg/ml, y trazas de azul de bromofenol). El gel SDS-PAGE para la segunda dimensión se realizó utilizando un equipo PROTEAN II xi Basic Electrophoresis System (Biorad, CA, USA) con unas condiciones de electroforesis de 1 mA/gel y 100 V a 15°C, durante 12-14 horas hasta que el indicador de frente de azul de bromofenol alcanzase el fondo del gel. Todo el proceso de electroforesis se llevó a cabo en condiciones de oscuridad.

Tras la electroforesis, los geles se tiñieron durante dos horas con solución 1X Oriol fluorescente (Biorad, CA, USA), evitando el contacto con la luz directa y con agitación continua.

6.2.4. Adquisición y análisis de imagen y escisión del gel

Los geles recién teñidos, se observaron a longitudes de onda de excitación/emisión de 270/604 nm mediante un equipo ChemiDoc MP Imagin System (Biorad, CA, USA). La imagen del gel se capturó y editó cuando fue necesario, usando el programa informático ImageLab con un protocolo de captura 24,5 cm de ancho y exposición automática.

Las imágenes se analizaron con el paquete informático PDQuest Basic Software (Biorad, CA, USA). Los puntos expresados diferencialmente fueron seleccionados bajo dos criterios distintos: puntos cualitativos (presencia/ausencia), y puntos cuantitativos que presentaron una intensidad de al menos el doble con respecto al valor de referencia ($p \leq 0,05$).

Aquellos puntos que contenían proteínas de interés fueron extraídos del gel usando un equipo EXQuest Spot Cutter (Biorad, CA, USA).

6.2.5. Digestión de las proteínas en gel

Los fragmentos de gel que contenían las proteínas de interés se digirieron usando un equipo DigestPro MS (Intavis) donde las proteínas se incubaron con ditioneitol (DTT) 10 mM en bicarbonato amonico (BCA) 50 mM a 56°C durante una hora para que alcanzaran su estado reducido, y posteriormente se alcalinizaron iodoacetamida (IAA) 55 mM en BCA 50 mM durante 30 min. Finalmente se incubaron con tripsina a 0,2 µg/µl (Gold Mass Spectrometry Grade, Promega) durante 10 h a 37°C. Los péptidos resultantes se eluyeron con ácido trifluoroacético (TFA) 0.2% y aceto nitrilo (AcN) 30%.

Para la caracterización de las proteínas se realizó un análisis de espectrometría de masas llevado a cabo de acuerdo con el protocolo recomendado en el centro de análisis (Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra-CSIC, Granada, España). Para ello, los productos eluidos se pasaron directamente a la placa de lectura de objetivos AchorChip (Bruker-Daltonics) con una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA). Los espectros de MS y MS/MS se obtuvieron por espectrómetro de masas UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF (Bruker-Daltonics) en modo automático usando Felx Control v3.4 (Bruker-Daltonics) y se procesaron con el paquete informático ProteinScape v3.1.3 (Bruker-Daltonics), para identificar por huella peptídica o PMF (del inglés *Peptide Mass Fingerprinting*) (la proteína a identificar se hidroliza con tripsina en pequeños péptidos cuyas masas absolutas que son comparadas con una base de datos biológica de proteínas) y MALDI-TOF/TOF (en inglés *Matrix Assists in Laser Desorption/Ionization based on Time Of Flight-Time Of Flight*) (el analizador de masas separa los iones hidrolizados de las proteínas a identificar en función del tiempo de vuelo a los largo de los dos analizadores de masas en tándem (MS/MS); este proceso puede proporcionar información adicional para la elucidación estructural del analito). Los espectros de los péptidos se adquirieron usando el modo reflectrón (2.000 disparos láser por espectro). Los espectros se calibraron externamente usando un compuesto de péptidos de calibración (angiotensina II, angiotensina I, sustancia P, bombesina, ACTH 1-17, ACTH 19-39 y somatostaina 28) estándar predeterminado de la casa Bruker. Para obtener los datos de MS/MS, se hicieron hasta un total de 2.500 disparos del láser. La huella dactilar o marca de las masas de los péptidos y la búsqueda para MS/MS se llevó a cabo en la base de datos de NCBI para Viridiplantae y *Capsicum annuum*, y en la base de datos SwissProt al compararse con

todos los organismos, usando las bases de datos y el paquete informático MASCOT v2.4.0 de manera integrada junto con ProteinScape (Bioinformatic Platform, Bruker-Daltonics). Los parámetros usados para el motor de búsqueda fueron. precisión de masa para péptido monoisotópico de 50 ppm, precisión de fragmento de masa a $\pm 0,5$ Da; máximo de una única escisión perdida por medida, carbamidometilación de cisteína como modificación típica fija y oxidación parcial de metionina como modificación típica variable. No se realizaron restricciones con respecto a la masa de las proteínas ni a su punto isoeléctrico. El filtrado de picos se preparó para advertir picos de tripsina autocatalíticos; el ratio de la señal de umbral de ruido se estableció en 2. El umbral de significancia se fijó a $p < 0,05$.

7. Rutas involucradas en los estudios de metabolómica

7.1. Obtención de biomasa de raíz inoculada

Las plantas se obtuvieron siguiendo los protocolos indicados anteriormente en el apartado 2 (Cultivo y cuidado de plantas). Para estos ensayos se extrajeron al menos 3 plantas por cada condición del sustrato y se limpiaron de suelo empleando varios enjuagues con agua destilada. Para preservarlos hasta el momento del análisis y la extracción de proteínas/metabolitos, se introdujeron 0,5 g de muestra de raíz se mantuvieron en bolsas de aluminio y se sumergieron en nitrógeno líquido por al menos 5 min. Tras este congelado rápido se mantuvieron en bolsas de aluminio a -80°C hasta su uso.

7.2. Análisis metabolómico de raíces

7.2.1. Extracción, cuantificación e identificación de metabolitos secundarios

Para la toma de muestras se emplearon raíces de tres plantas de pimiento dulce italiano (*Capsicum annuum*). Para analizar dichas muestras, se homogeneizaron conjuntamente con micropistilos en tubos de 1,5 ml para evitar desviaciones entre muestras. Para la extracción y derivatización de las mismas se llevó a cabo el protocolo descrito por Roessner y colaboradores (Roessner *et al.*, 2000) con leves modificaciones de Barsch y colaboradores (Barsch *et al.*, 2004).

A 10-30 mg de muestra seca y se les añadió 1 ml de metanol al 80% con 1 μM de ribitol (como estándar interno) en tubos de agitación de 1,5 ml y cierre con goma (StarLab-E1420-2320-Natural). Una vez en este soporte, se añadieron 0,5 g de bolitas de cerámica de un diámetro no superior a 0,5 mm (Zirconia/silica beds-Cat.No. 11079105z- BioSpec Products). Para homogeneizar el tejido se sometió a tres ciclos de un programa de 6,5 m/s durante 45 s en un homogeneizador FastPrep (MP Biomedicals, USA). Tras dichos ciclos, las muestras se incubaron a 70°C durante 15 min y 1.400 rpm ($\sim 1.200 \times g$) en un termobloque. A continuación se centrifugaron durante 20 min a 18.500 $\times g$, se retiró únicamente el sobrenadante más claro y se colocó en viales de evaporación para secarlo completamente con flujo de nitrógeno (~ 1 mbar de presión de flujo).

Para derivatizar los grupos funcionales de los metabolitos, se añadieron 100 μl de una solución 20 mg/ml de clorhidrato de metoxilamina en piridina (2 mg de MetOx en 100 μL de piridina por muestra) y se incubaron a 37°C durante 90 min con agitación continua. Los protones acídicos se protegieron con grupos trimetilsil tratando la mezcla con 50 μl de *N*-metil-*N*-(trimetilsili) trifluoroacetamida a 37°C durante 30 min. También se añadieron 20 μl de una mezcla madre de compuestos alcanos (pentano, hexano, heptano y octano) para usarlos como control interno de cromatografía. Tras esto se centrifugó la muestra 5 min a 4.800 $\times g$ y 20°C, se retiró el sobrenadante con cuidado de no arrastrar sedimento para llevarlo a un tubo de lectura de cromatografía adaptado con un vial de vidrio para evitar la dispersión de la muestra.

7.2.2. Cromatografía por GC-MS

El análisis de gases-masas (GC-MS) se llevó a cabo con un cromatógrafo de gases Thermo Trace GC (o Trace GC Ultra) y con un espectrofotómetro de gases con trampa de iones PolarisQ (o ITQ900), equipado con un automuestreador AS2000. Para el análisis cromatográfico se inyectó 1 μl de muestra tratada y derivatizada a 250°C. El cromatógrafo se equipó con una columna de 30 m \times 25 mm (Equity-5, Sigma-Aldrich) con un revestimiento de 0,25 μm de 5% difenil/95% dimetilsiloxano (Supelco, Bellfonte, Calif.-US). La temperatura de interfase se ajustó a 250°C y la de la fuente iónica a 200°C. Se usó helio como gas de carga a flujo constante de 1 ml/min. Después de 3 min manteniendo

constante la temperatura a 80°C, la temperatura del horno se elevó a 300°C empleando una rampa de 3°C/min. Para equilibrar el sistema para la siguiente inyección, la temperatura se mantuvo a 80°C durante 5 min. El espectro de masas se recogió por duplicado, con un rango de escaneo de 50-550 *m/z*. La evaluación de los cromatogramas se llevó a cabo con el software Xcalibur 2.0 (Thermo Finigan, USA). Los metabolitos se identificaron por comparación con las bases de datos de NIST98 (NIST, Gaithersburg, Md.) y con estándares purificados. La cuantificación automática de picos de los metabolitos seleccionados se llevó a cabo empleando las condiciones predeterminadas por el software Xcalibur. También se llevaron a cabo fragmentaciones virtuales con el software Mass Frontier 2.0 (Thermo Finnigan, USA).

El análisis de componentes principales (ACP, *PCA* por sus siglas en inglés) se llevó a cabo con el software Pirouette 3.02 (Infrometrix, Woodinville, Wash., US) como se describe en Fiehn y colaboradores (Fiehn *et al.*, 2000), usando datos transformados con logaritmo en base 10 (\log_{10}) y validación cruzada. Se usó el algoritmo de la *t*-Student de Excel para determinar si las observaciones fueron significativamente diferentes ($P < 0,1$).

8. Pruebas de bioseguridad

8.1. Ensayos de sensibilidad y metabolismo microbiano sobre *E. coli* MC4100 y *Vibrio fischeri*

Los ensayos de sensibilidad microbiana en *E. coli* MC4100 se llevaron a cabo de acuerdo con Small y colaboradores 1994 (Small *et al.*, 1994), con ligeras modificaciones (Peters *et al.*, 2003). Se emplearon 0,5 ml de cultivos saturados de las cepas a estudiar esterilizados por filtración (0,22 μm de poro). Se mezclaron con 5 ml de una suspensión de *E. coli* MC4100 en tampón estéril M9, conteniendo aproximadamente 10^8 - 10^9 células recolectadas del cultivo en fase semilogarítmica. La combinación se mezcló por inversión y se incubó durante 1,5 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas seguidas de siembra en placas de TSA de la suspensión mezcla con *E. coli* MC4100 para estimar el número de UFC/ml resultantes tras el tratamiento. Se comparó con un conteo de UFC/ml previo al tratamiento para obtener un porcentaje de supervivencia al mismo. Como control negativo, se incluyeron muestras de TSB estéril.

La emisión de luz por *V. fischeri* está íntimamente relacionada con el metabolismo de los microorganismos. Para detectar metabolitos secundarios con un efecto negativo sobre el metabolismo celular, independientemente de su potencial letal o no, se llevaron a cabo experimentos de acuerdo con técnica Microtox[®] usando 1 ml del sobrenadante estéril mencionado anteriormente, siguiendo las indicaciones de Onorati y colaboradores (Onorati & Mecozzi, 2004). Se hizo una medida inicial de la intensidad lumínica ofrecida por *V. fischeri* (con un mínimo de 10⁸ UFC/ml) sobre un control sin sobrenadante como control del ensayo. Los sobrenadantes fueron diluidos cuatro veces en proporciones 1:1 con el diluyente comercial y se pusieron en contacto con la bacteria bioluminiscente. Tras un periodo de contacto de 5 min. se llevó a cabo la medición final para comparar con la intensidad inicial. El software propio de análisis de Microtox[®] permitió calcular la EC₅₀ de cada sobrenadante ensayado.

8.2. Ensayo de patogenicidad basado en *Caenorhabditis elegans*

Con objeto de evaluar la patogenicidad de las cepas objeto de estudio, se recurrió a un modelo basado en *C. elegans*, por el cual, las bacterias patógenas producen retardo en la velocidad de crecimiento del nematodo, alteraciones en su descendencia y muerte de los individuos infectados por este tipo de microorganismos. Para este tipo de ensayos se empleó el método de Darby y colaboradores, con algunas modificaciones descritas en los trabajos de Navas y colaboradores y Ruiz-Diez y colaboradores (Darby *et al.*, 1999, Ruiz-Diez *et al.*, 2003, Navas *et al.*, 2007). Para este análisis, cada cepa objeto de estudio se sembró sobre placas de agar patata y dextrosa (PDA) y se incubó a temperatura óptima de crecimiento durante alrededor de 24 h o hasta lograr una fina capa traslúcida sobre el agar. A continuación, se depositaron 5 individuos preadultos hermafroditas sobre cada placa. Las placas se incubaron a 20°C, y los nematodos se examinaron en una lupa binocular Nikon SMZ800 a entre 2-6x aumentos y se contaron los huevos, juveniles, adultos así como los individuos muertos por placa cada 24 h durante los siguientes 7 días. En todos los ensayos se usó *E. coli* OP50 como control negativo para estimar el ratio de muerte natural, y a *P. aeruginosa* PA14 como control positivo de cepa patógena.

8.3. Ensayos de ecotoxicidad en crisopas (*Chrysoperla carnea*) y mariquitas (*Adalia bipunctata*)

Estos ensayos se realizaron de acuerdo con Medina y colaboradores (Medina *et al.*, 2004) y Álvarez-Alfageme y colaboradores (Alvarez-Alfageme *et al.*, 2011) con pequeñas modificaciones. Se depositó una única larva en estadio L1 por caja de ensayo para evitar canibalismo, y se alimentaron con huevos de *C. capitata* mezclados con las cepas bacterianas en estudio. La comida se preparó mezclando aproximadamente 1.000 huevos con 0,1 g de liófilo (en formulación seca estable en trehalosa al 10% (p/v) según (Manzanera *et al.*, 2004), con un mínimo de 10^8 - 10^9 UFC/ml). Se registró la longitud y el peso, así como la mortalidad bajo cada condición a los tiempos 0, 7 y 15 días. Como control negativo se incluyeron huevos con una cantidad equivalente de trehalosa estéril. Todos los experimentos se realizaron en una cámara de control climático a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y $60 \pm 5\%$ de humedad relativa, con un fotoperiodo de 16 h.

8.4. Ensayo de ecotoxicidad en lombrices de tierra (*Eisenia foetida*)

El ensayo de reproducción de lombrices se llevó a cabo de acuerdo con el Ensayo Guía OECD No. 222 (OECD, 2004) con pequeñas modificaciones (Neuhauser & Callahan, 1990). Para ello, se colocaron lombrices de la misma edad aproximadamente y con una longitud de entre 5,5 y 6 cm en contenedores con 0,5 L de una mezcla de sustrato vegetal y turba rubia o de esfagno (3:1, v/v) y mantenidos a pH 6,7-7,4, 70% de humedad relativa y 20 - 25°C durante 30-60 días en oscuridad. Las lombrices se alimentaron con 5 g de harina de garbanzo hidratada a la semana. Las bacterias se añadieron en estado deshidratado utilizando como xeroprotector trehalosa, con tal y como se ha descrito en el apartado anterior, (10^8 - 10^9 UFC/g) (0,5 gramos por semana). Como control positivo para el seguimiento del número de muertes, se añadió 2% de NaCl al sustrato mezcla. Se registraron la longitud, peso, número de neonatos y de ootecas, así como de individuos muertos a los tiempos de muestreo 15, 30 y 60 días.

8.5. DaphToxKit®. Bioensayo de toxicidad con *Daphnia magna*

Para analizar la toxicidad de extractos bacterianos contra *D. magna* (Cladocera) se empleó DaphToxKit F® (Microbiotests, Bélgica) de acuerdo con la norma ISO 6341 y el Ensayo Guía de la OECD No. 211 (ISO-6341, 2012, OECD, 2012) con ligeras modificaciones (Hernando *et al.*, 2003). Los ensayos se llevaron a cabo en oscuridad a 20°C durante 24-48 h, tras lo cual se registró la movilidad de los organismos. Se emplearon organismos recién nacidos (no más de 24 h desde la apertura de la epifia) que se depositaron en una placa multipocillo con 10 ml de sobrenadantes a ensayar por pocillo. Los sobrenadantes se obtienen a partir de cultivos en fase de crecimiento exponencial a los que se somete a un proceso de centrifugado (5.500 x g durante 15 min.) y una esterilización por filtrado (filtros de 0.23 µm). En cada pocillo se depositaron 5 individuos de *D. magna*, para el estudio de cada concentración de sobrenadante de cultivo por bacteria ensayada. Los contenidos de cada pocillo se disolvieron directamente en la disolución estándar de ‘agua dulce’ (por litro. NaHCO₃, 67,75 mg; CaCl₂ x 2H₂O, 294 mg; MgSO₄ x 7H₂O, 123,25 mg; KCl, 5,75 mg) preparada según las indicaciones del fabricante. Se consideró como inmóvil o muerto cualquier individuo que no mostrara natación alguna bajo estimulación (incluso si aún movía las antenas) durante un periodo máximo de 15 s de observación. Se usó dicromato potásico a 3,2 mg/l como compuesto de referencia tóxica.

8.6. Ensayo de patogenicidad con ratones (*Mus musculus* CD1)

Los ensayos de patogenicidad sobre ratones como modelo animal se llevaron a cabo según el protocolo descrito por Stelma y colaboradores (Stelma *et al.*, 1987) en las instalaciones de la Unidad de Experimentación Animal del Centro de Investigación Biomedica (CIBM)-UGR. Las cepas en estudio se cultivaron a 30°C durante 24 h en TSB. A continuación se concentraron los cultivos 10 veces mediante centrifugado (5.500 x g durante 15 min.) y posteriormente se resuspendieron en una solución de 0,1% de peptona hasta alcanzar una concentración de 10⁹ UFC/ml. Para este ensayo se emplearon cinco individuos CD1 hembra (23-24 g) por condición a ensayar a los que se les inyectaron intraperitonealmente (i.p) 0,1 ml de la suspensión. Aquellos organismos a ensayar con la misma cepa se mantuvieron juntos en las mismas jaulas de 0,4 L a 25°C, bajo ciclos luz-

oscuridad de 12 horas y ventilación controlada. Los ratones se alimentaron con pienso para ratones estándar (Cunipic Premium Ratones) y agua, ambos esterilizados previamente. Los ratones se observaron durante dos semanas y se registraron los valores de peso corporal, diferencias de peso y número de muertes a los 7 y 14 días. Las cepas en ensayo que mataron 3 o más ratones fueron consideradas como patógenas (asumiendo un ratio de muerte natural no mayor del 20%). Como control negativo se inyectaron 5 ratones con 0,1% de peptona estéril.

El trabajo con animales de laboratorio empleado se realizó bajo las normas establecidas por el comité de bioética para garantizar que la utilidad y cantidad de datos compensa el uso de animales. Los informes a presentar a este comité deben incluir metodología de reducción del dolor durante los tratamientos, así como el uso de mecanismos de eutanasia que permitan hacer término de la vida de los mismos de una forma humanitaria y lo más indolora posible. Para llevar a cabo el ensayo planteado, se incluyeron mecanismos de mejora del entorno que evitaran situaciones de estrés durante el proceso. Por otra parte, se incluyó un punto final de eutanasia para el ensayo con el uso de ketamina/xilacina a 20 mg/kg como analgésico previo a la extracción total de sangre para análisis de componentes sanguíneos de control.

8.7. Efectos bacterianos sobre plantas de pimiento (*Capsicum annuum*)

Se valoraron los efectos sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de pimiento por parte de las bacterias en estudio siguiendo las indicaciones del apartado 2.5.

9. **Formulación y monitorización de los efectos de protección y promoción del crecimiento en plantas**

9.1. Plásmido de entrega y plásmido auxiliador

Los plásmidos de entrega que se usaron son portadores de una resistencia a gentamicina, Gm. Además, los plásmidos contienen una región *mob*, que se puede utilizar para la movilización del plásmido a partir de una bacteria a otra por los genes de transferencia RP4 situados en el plásmido pRK600 en la cepa de *E. coli* HB101. Por su parte, el plásmido auxiliador porta los genes de la transposasa Tn7 (TnsA-E), que además codifica la resistencia a ampicilina, Ap, en la cepa *E. coli* pUX-BF13.

9.2. Introducción de plásmidos y marcado de una bacteria

El marcaje de la bacteria se llevó a cabo mediante el método de conjugación cuatriparental. Para ello se llevó a cabo un cultivo de las cepas involucradas (donadora *E. coli* GFP₂, auxiliadora *E. coli* pUX-BF13, portadora *E. coli* pRK600 y receptora *Microbacterium sp.* 3J1) en sus correspondientes medios con el antibiótico adecuado. Tras una noche crecimiento se lavaron los restos de antibiótico mediante centrifugado a 14.000 rpm 5 min., y se resuspendieron en medio mínimo M9. Se tomaron 50 µl de cada cultivo y se mezclaron en un tubo de 1,5 ml para, posteriormente, depositarlos sobre un filtro colocado sobre una placa de medio TSA no selectivo. La placa se dejó incubar durante 8 horas a 30°C, temperatura óptima para la cepa receptora.

De la biomasa en el filtro, se tomó una pequeña cantidad para realizar diluciones seriadas y siembra en placas selectivas que permitan únicamente el crecimiento de las cepas receptoras etiquetadas. Se dejó incubar una noche a 30°C.

9.3. Comprobación del etiquetado

La bacteria cultivada en medio selectivo con Gm se expuso a luz UV (350 nm) para comprobar si emitía fluorescencia como se describe más abajo. De igual modo, se realizó una preparación *in vivo*, empleando una única colonia desde el cultivo puro sobre una

gota de agua destilada para observar bajo un microscopio de fluorescencia. Por último, se llevó a cabo una reacción cuantitativa en cadena con ADN polimerasa termorresistente en tiempo real (qPCR) para amplificar *gfp* con los cebadores GFP-Fw1 y GFP-Rw2, tal y como se describe en el apartado 4.

La reacción de amplificación usando 5 µl de ADN molde y la mezcla maestra de SyberGreen (Roche), tuvo las mismas condiciones que para las descritas para la qPCR.

9.4. Visualización en microscopio de fluorescencia y de láser confocal de fluorescencia

Para el análisis de muestras en microscopio de fluorescencia y de láser confocal de fluorescencia se empleó un microscopio de epifluorescencia de filtro variable Axiophot (Zeiss, Oberkochen, Alemania) con un filtro de excitación a 485 nm y emisión a longitudes de onda > 520 nm; así como un microscopio de láser confocal invertido de Leica DMI6000 con láseres desde diodo azul 405 nm, Argón 458-514 nm, hasta He/Ne 543-633 nm (Centro de Instrumentación Científica – UGR). Tras identificar y detallar los campos visuales, se ajustaron con el software de Leica las opciones que permitieran tomar secuencias y tomas puntuales de calidad. Con las secuencias de capas de diferentes profundidades se pudieron montar imágenes de combinación confocal tridimensionales con aumentos de 40-100X con aceite de inmersión.

9.5. Visualización en microscopio electrónico de barrido de presión variable (VP-SEM)

Para el análisis microscópico de muestras por barrido electrónico se empleó un microscopio electrónico de barrido de presión variable, de alta resolución (VP-SEM) Zeiss SUPRA40VP con una fuente de electrones por emisión de campo tipo Schottky (cátodo caliente). Los detectores acoplados fueron el SE de electrones secundarios en alto vacío (topográfico lateral), el *In Lens* de electrones secundarios en alto vacío (topográfico cenital), el VP-SEM de electrones secundarios en bajo vacío, el *AsB* de electrones retrodispersados en alto y bajo vacío, y el STEM de electrones transmitidos DF y BF.

Tras identificar y detallar los campos visuales, se ajustaron los detectores apropiados para identificar estructuras celulares en superficie o a poca profundidad.

9.6. Formación y cuantificación de biopelículas

La formación de biopelículas se examinó usando tubos de vidrio de silicato de boro (superficie hidrófila) siguiendo método descrito por O'Toole y col. (O'Toole *et al.*, 1999). Un cultivo crecido de las cepas a estudiar se diluyó en TSB hasta una absorbancia de 0,05 a 600. Se tomaron alícuotas de 2 ml de cada cultivo tubos de ensayo por triplicado, y se incubaron a 30°C, 250 rpm durante 6 y 24 h. Se midió la absorbancia alcanzada en los tiempos de muestreo. Las células no unidas al vidrio se retiraron enjugando los tubos con agua destilada. Las células unidas fueron teñidas incubándolas con cristal violeta 0,1% (p/v) a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente, los tubos se lavaron dos veces con agua destilada para eliminar cualquier residuo no adherido. Las células unidas al vidrio se disolvieron añadiendo 5 ml de ácido acético glacial 10% (v/v) y se midió la absorbancia 600 nm. Se calculó la relación de absorbancia de células teñidas con cristal violeta (CVDO₆₀₀) respecto a la absorbancia del cultivo muestreado (DO₆₀₀).

9.7. Formulaciones de alginato

La formulación con alginato de sodio para inmovilizar las células con o sin semilla, se llevó a cabo con modificaciones de las técnicas descritas por Bashan (Bashan, 1986), y siguiendo las indicaciones y correcciones de método empleadas por Power y col. (Power *et al.*, 2011). Para preparar camas de alginato se mezclaron como sustrato 50 ml de alginato de sodio (4% p/v, concentración final 2%), 10 ml de leche desnatada en polvo (SMP) (100% p/v, concentración final 10%) y 40 ml de un cultivo de la cepa a formular, conteniendo aproximadamente (10^9 UFC/ml). La mezcla se depositó sobre una solución de CaCl₂ al 2% (p/v) en agitación (50 rpm) empleando una jeringa estéril de 5 ml. Las camas resultantes se almacenaron a 4°C hasta su uso.

10. Programas informáticos utilizados y procesamiento estadístico

Para llevar a cabo el análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizaron tratamientos de ANCOVA y de ANOVA con los programas estadísticos SPSS Statistics 23.0 (IBM, New York, NY (USA), 2012) y STATISTICA 10.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK (USA), 2010).

Para la aplicación de ANOVA se llevó a cabo el tratamiento según las condiciones de ANOVA para una vía. Según los criterios de ANOVA, esta fue aplicable y, por tanto, se continuó con el tratamiento *post hoc* cuando la probabilidad del factor F fue menor de 0,05 entendiéndose que los datos con dicho resultado no eran iguales y mostraban por lo tanto diferencias significativas. En caso de ser el valor de probabilidad de F mayor de 0,05 no aplicó ANOVA, dado que se entiende que los datos eran iguales y no existía diferencia significativa entre ellos.

En el análisis *post hoc* se llevó a cabo en análisis de homogeneidad de varianzas o estadístico de Levene. En este caso se valoró la probabilidad o significancia en torno al valor 0,05. Para los valores de significancia menores de 0,05, se consideró que existían diferencias significativas en las varianzas de los grupos comparados y se llevó a cabo el tratamiento de la T2 de Tamhane para comprobar si la diferencia entre grupos era estadísticamente significativa. En el caso de valores superiores a 0,05, se consideró que no existían diferencias significativas en las varianzas de los grupos comparados y se llevó a cabo la prueba de Tukey para conocer si entre los grupos estudiados la diferencia era estadísticamente significativa.

RESULTADOS

CAPÍTULO I

En este trabajo se comprobó el efecto de una colección de bacterias xerotolerantes sobre plantas como inoculantes ante condiciones de sequía, para determinar si existe una correlación entre su nivel de tolerancia a la falta de agua, con el nivel de protección de plantas frente a la misma. Las bacterias capaces promover el crecimiento en plantas se denominan BPCP (PGPR, *Plant Growth Promotion Rhizoacteria*, por sus siglas en inglés). Sin embargo, a aquellas bacterias que mejoran la tolerancia a la desecación en plantas se las denomina en esta tesis BTDP (RDTE, *Rhizobacterial drought tolerance enhancers*, por sus siglas en inglés). Para este estudio se utilizó una colección de microorganismos tolerantes a la desecación aislada en nuestro grupo (*Microbacterium sp.* 3J1, *Arthrobacter koreensis* 5J12A, *Rhodococcus sp.* 4J2A2, *Leucobacter sp.* 4J7B1 y *Arthrobacter siccitolerans* 4J27, cuyos niveles de supervivencia tras un periodo de desecación de 24 horas fueron de un 49%, 34%, 22%, 25% y 23%, respectivamente (Narváez-Reinaldo et al. 2010). Para que este análisis fuera completo, se estudió inicialmente la capacidad de promover el crecimiento de las plantas por la colección de microorganismos. Se caracterizó el potencial de las cepas como BPCB (PGPR) y, posteriormente, como BTDP (RDTE) sobre plantas de pimiento (*Capsicum annuum* var. *annuum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), maíz (*Zea mays*) y soja (*Glycine max*), para evaluar los efectos sobre distintas especies vegetales. Se identificaron las cepas taxonómicamente más cercanas a aquellas que mayor protección producían sobre las plantas y se estudió de nuevo si existía una correlación entre aquellas cepas más tolerantes a la sequía con aquellas que más protegían a las plantas contra la falta de agua. Finalmente se realizó un estudio bioquímico del perfil de moléculas implicadas en procesos de fitoprotección frente a la sequía por parte de microorganismos.

1. Promoción de crecimiento de plantas por acción bacteriana

Para estudiar la promoción del crecimiento de plantas por las 5 cepas seleccionadas se empleó el método descrito en la sección 5 de *Materiales y Métodos*. Como control se utilizaron plantas inoculadas con *Pseudomonas putida* KT2440 por su capacidad para promover el crecimiento de plantas y por su sensibilidad frente a la falta de agua. De manera adicional, se utilizaron plantas sin inóculo para lo cual se empleó un volumen equivalente de inóculo en forma de solución salina 1xM9 libre de células. Los ensayos

con plantas de pimiento y tomate se llevaron a cabo entre febrero y mayo de 2012, mientras que los de maíz y soja se realizaron entre febrero y junio de 2013.

Se registró el peso fresco (PF), peso seco (PS), peso totalmente túrgido (PTT) y contenido relativo de agua (CRA) descritos según se indica en el apartado 5.5 de la sección de *Materiales y Métodos*.

Las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, mostraron diferencias significativas en todos los parámetros analizados respecto a las plantas no inoculadas, respondiendo a su capacidad promotora del crecimiento en plantas. Respecto a las cepas en estudio, las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 y *A. koreensis* 5J12A fueron las que presentaron mayores diferencias, siendo estas significativas respecto a los controles de plantas no inoculadas e inoculadas con *P. putida* KT2440, como puede observarse en la figura 14. Por otra parte, las plantas inoculadas con la cepa *Rhodococcus sp.* 4J2A2 presentaron resultados significativamente superiores a las plantas no inoculadas, aunque estas diferencias no fueron significativas con respecto a las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. Por último, las plantas inoculadas con *Leucobacter sp.* 4J7B1 y *A. siccitolerans* 4J27 no mostraron diferencias significativas con las plantas no inoculadas.

La altura alcanzada por las plantas inoculadas con las cepas en estudio fue en todos los casos mayor o igual que la obtenida por las plantas sin inocular al día 33 del ensayo. Los mayores aumentos de altura se dieron entre los días 20 y 33 del ensayo en todas las plantas salvo en las de soja que se dio entre los días 14 y 20, llegando a ser generalmente cerca del doble respecto al anterior punto de muestreo para las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, con *Microbacterium sp.* 3J1, con *Rhodococcus sp.* 4J2A2 y con *P. putida* KT2440. Este aumento no fue estadísticamente distinto en el caso las plantas inoculadas con *Leucobacter sp.* 4J7B1, ni con las inoculas con *A. siccitolerans* 4J27 respecto a las plantas no inoculadas.

Al día 33 del ensayo, los valores obtenidos por las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 llegaron a ser entre un 40% (para el maíz y la soja) y un 70% (para el pimiento y el tomate) superiores a los obtenidos por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. Por otra parte, los valores fueron hasta 4 veces superiores a los obtenidos por plantas no inoculadas en el caso de plantas de pimiento y tomate, y de en torno al doble en plantas de maíz y soja.

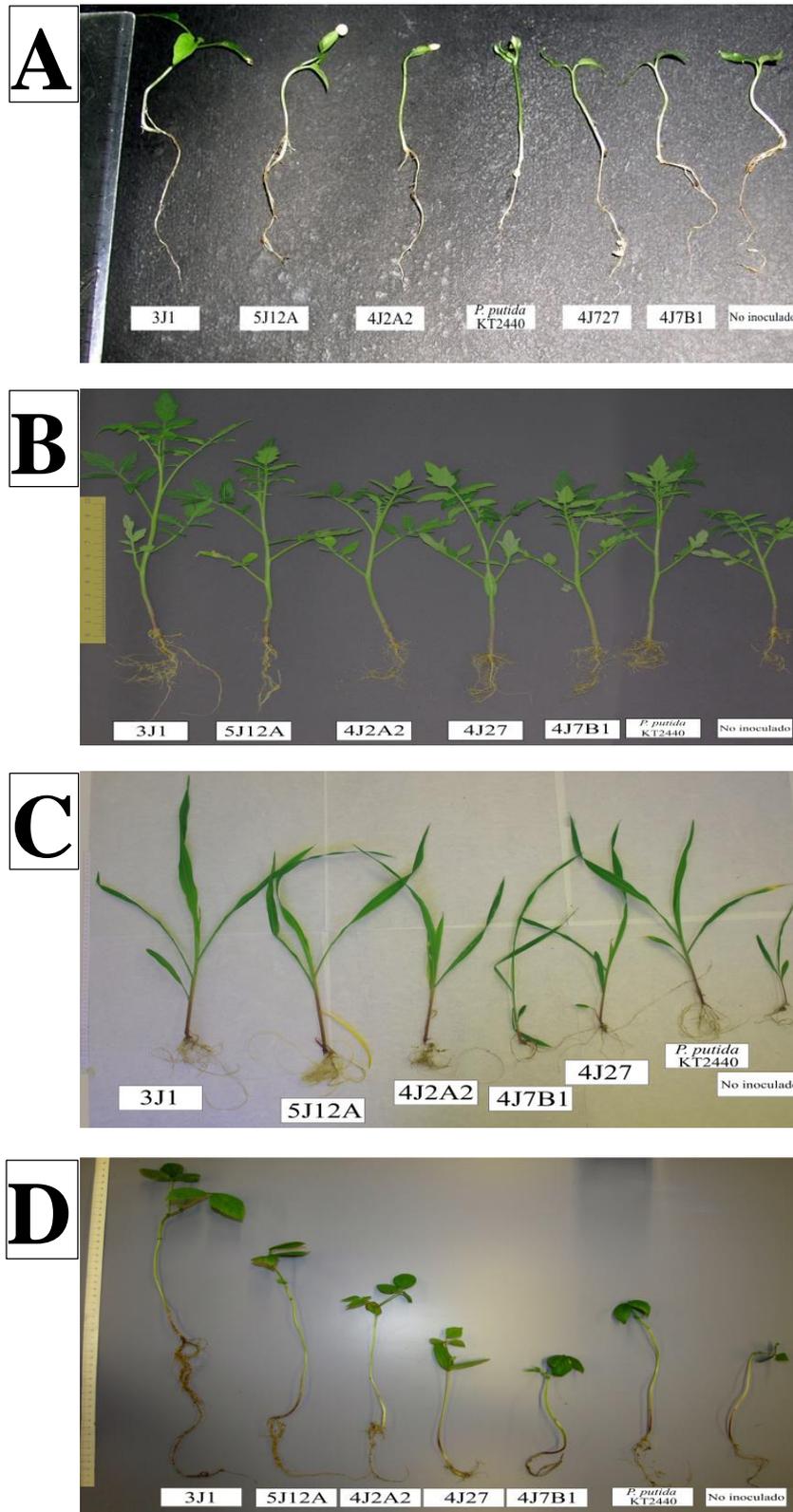


Figura 14. Estado a los 33 días de las plantas inoculadas e incubadas en condiciones de riego. Se muestran las plantas de pimiento (A), tomate (B), maíz (C) y soja (D) inoculadas con las cepas *Microbacterium* sp. 3J1, *A. koreensis* 5J12A, *P. putida* KT2440, *Rhodococcus* sp. 4J2A2, *A. siccitolerans* 4J27, *Leucobacter* sp. 4J7B1 y de las plantas sin inocular al día 33 en condiciones de riego.

Respecto a las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, estas no mostraron diferencias significativas con las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 en el caso del pimiento, mientras que fueron un entre un 20%-60% superiores en los otros casos (para el maíz y la soja, y para el tomate, respectivamente). Las plantas inoculadas con *Rhodococcus sp.* 4J2A2 no presentaron diferencias significativas con las inoculadas con *P. putida* KT2440, pero sí respecto a las plantas no inoculadas. En ninguno de los casos estudiados las plantas inoculadas con *Leucobacter sp.* 4J7B1 y con *A. siccitolerans* 4J27 mostraron diferencias significativas respecto a las plantas no inoculadas como puede observarse en la figura 15.

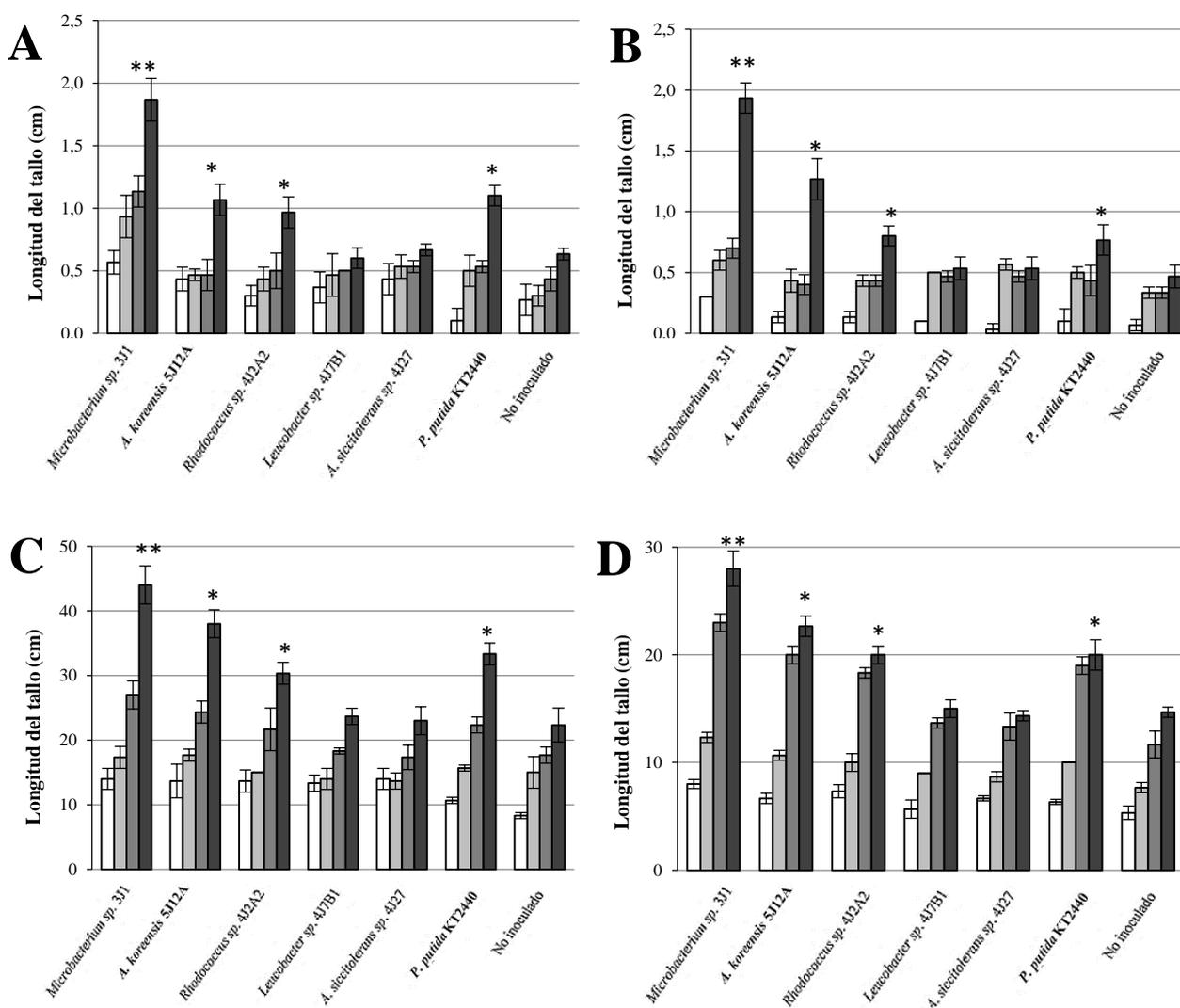


Figura 15. Altura tallo de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. Se muestran los datos obtenidos en plantas de pimiento (A), tomate (B), maíz (C) y soja (D). En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en cm. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7, el gris claro al día 14, el gris oscuro al 20 y el negro al día 33 de muestreo. Se indica diferencia significativa con el control sin inóculo (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

Respecto a los datos de longitud de las raíces, en el caso de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1, con *A. koreensis* 5J12A, *Rhodococcus sp.* 4J2A2 y con *P. putida* KT2440 mostraron una longitud mayor y con una diferencia significativa respecto a las de plantas sin inóculo en todos los casos estudiados. Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 mostraron raíces entre un 10% (para el pimiento y en el maíz) y un 20% (para el tomate y la soja) más largas que las inoculadas con *P. putida* KT2440. En las plantas sin inocular, esta diferencia llegó a ser en torno al 30-40% superior, salvo en plantas de soja en las que llegó a ser de casi el doble.

En el caso de las plantas inoculadas tanto con *A. koreensis* 5J12A, como con *Rhodococcus sp.* 4J2A2 mostraron una diferencia significativa de entre 10-25% respecto a las plantas no inoculadas, salvo en el caso de la soja, donde esta diferencia llegó a ser de un 40% superior. Ni las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, ni las inoculadas con *Rhodococcus sp.* 4J2A2 mostraron diferencias significativas con las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. En ninguno de los casos estudiados las plantas inoculadas con *Leucobacter sp.* 4J7B1 y con *A. siccitolerans* 4J27 mostraron diferencia significativa respecto a las plantas no inoculadas como puede observarse en la figura 16.

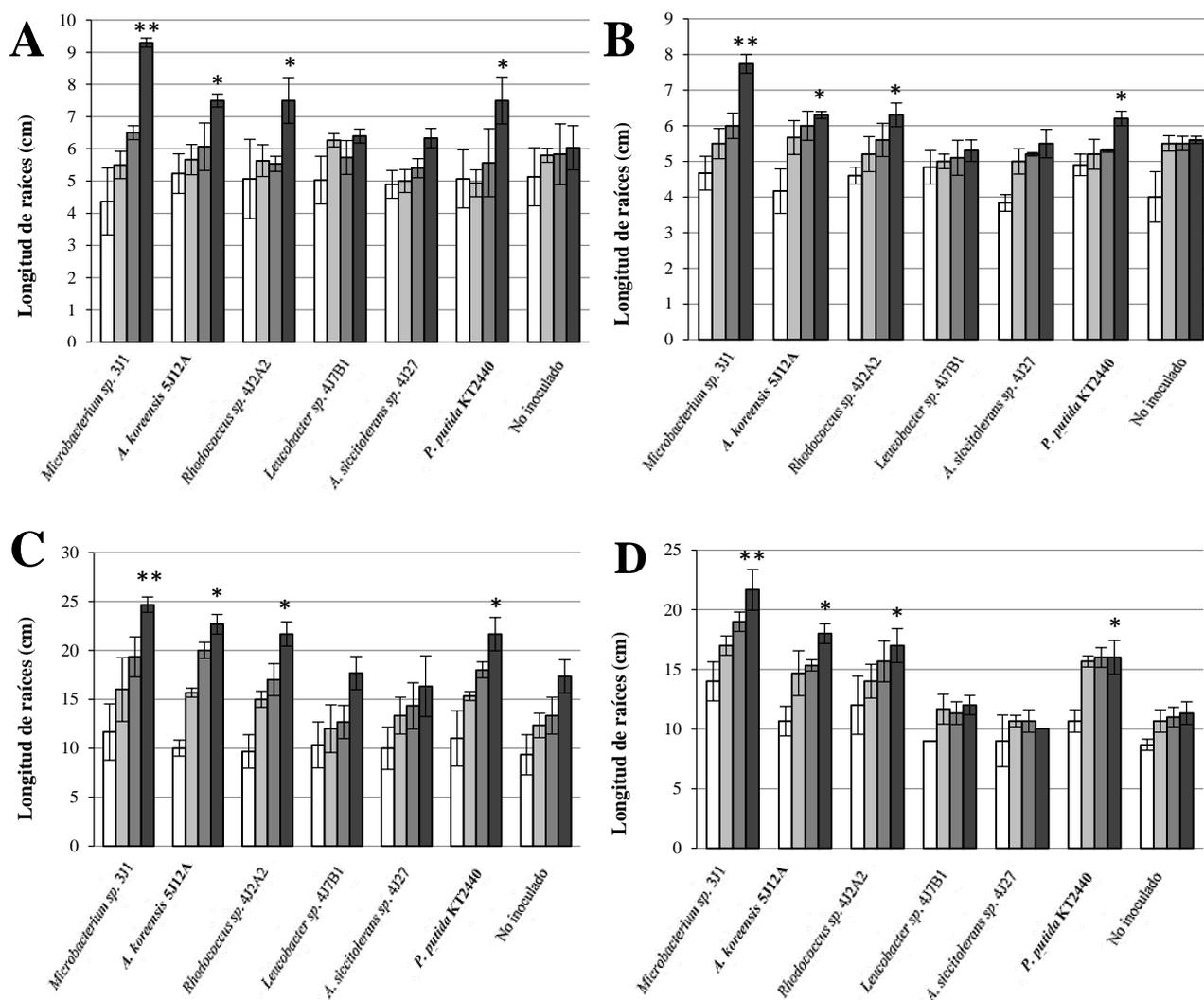


Figura 16. Longitud de la raíz de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. Se muestran los datos obtenidos en plantas de pimiento (A), tomate (B), maíz (C) y soja (D). En ordenadas se muestra la longitud de la raíz de la planta en cm. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro al día 14, el gris oscuro al 20 y el negro al día 33. Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

El peso fresco (PF) de las plantas inoculadas aumentó de manera más notable en la última mitad del ensayo. En las muestras tomadas el día 33, las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 mostraron valores de peso fresco mayores al resto de plantas, llegando a ser de en torno a un 30-40% superiores a los de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, salvo en el caso de las plantas de maíz que fue en torno a un 70%. Respecto a las plantas no inoculadas, esta diferencia llegó a ser cerca del doble. Para el caso de las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, sus valores de PF fueron en torno a un 15-20% superiores respecto a los valores finales de las plantas inoculadas con *P.*

putida KT2440, salvo en el caso del tomate, en el cual la diferencia fue de en torno al 5%. Las plantas inoculadas con *Rhodococcus* sp. 4J2A2 no presentaron diferencia significativa con las inoculadas con *P. putida* KT2440, pero sí respecto a las plantas no inoculadas. En ninguno de los casos estudiados las plantas inoculadas con *Leucobacter* sp. 4J7B1 y con *A. siccitolerans* 4J27 mostraron diferencia significativa respecto a las plantas no inoculadas como puede observarse en la figura 17.

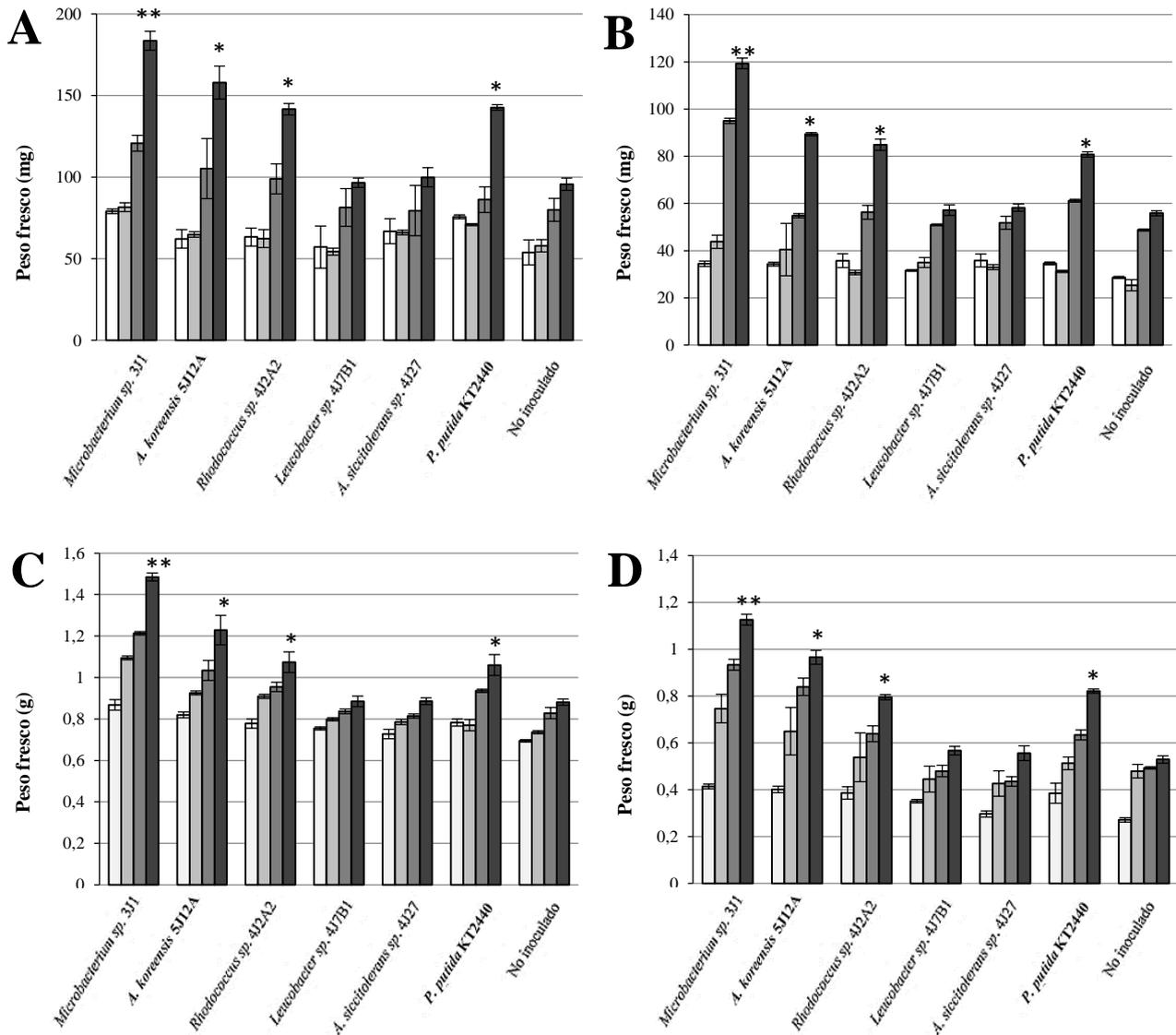


Figura 17. Peso fresco de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. Se muestran los datos obtenidos en plantas de pimiento (A), tomate (B), maíz (C) y soja (D). En ordenadas se muestra el peso en mg o g de la planta. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro al día 14, el gris oscuro al 20 y el negro al día 33. Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

Análogamente se midió el peso seco (PS) de las plantas, el cual aumentó en todas las condiciones durante los primeros puntos de muestreo, dándose los mayores aumentos hacia el último punto de muestreo. Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 mostraron valores de PS superiores al resto de plantas, llegando a ser en torno a un 40-80% superiores a los valores de PS de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. En cuanto a las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A la diferencia fue de un 16% (en el caso del maíz) y un 50% (en el caso del pimiento) superiores. Con respecto a las plantas no inoculadas, la diferencia detectada llegó a ser de más de un 80% en maíz, más del doble en pimiento y soja, y más del triple en tomate. La excepción más notoria en este caso se dio respecto a las plantas inoculadas con *Leucobacter sp.* 4J7B1 en tomate, cuya diferencia apenas llegó al 40% del valor obtenido por las inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1.

Para el caso de las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, sus valores de PS fueron en torno a un 20-30% superiores respecto a los valores finales de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. Las plantas inoculadas con *Rhodococcus sp.* 4J2A2 no mostraron diferencias significativas con las inoculadas con *P. putida* KT2440, salvo en el caso del tomate. Salvo en los casos mencionados, las plantas inoculadas con *Leucobacter sp.* 4J7B1 y con *A. siccitolerans* 4J27 no mostraron diferencia significativa respecto a las plantas no inoculadas como puede observarse en la figura 18.

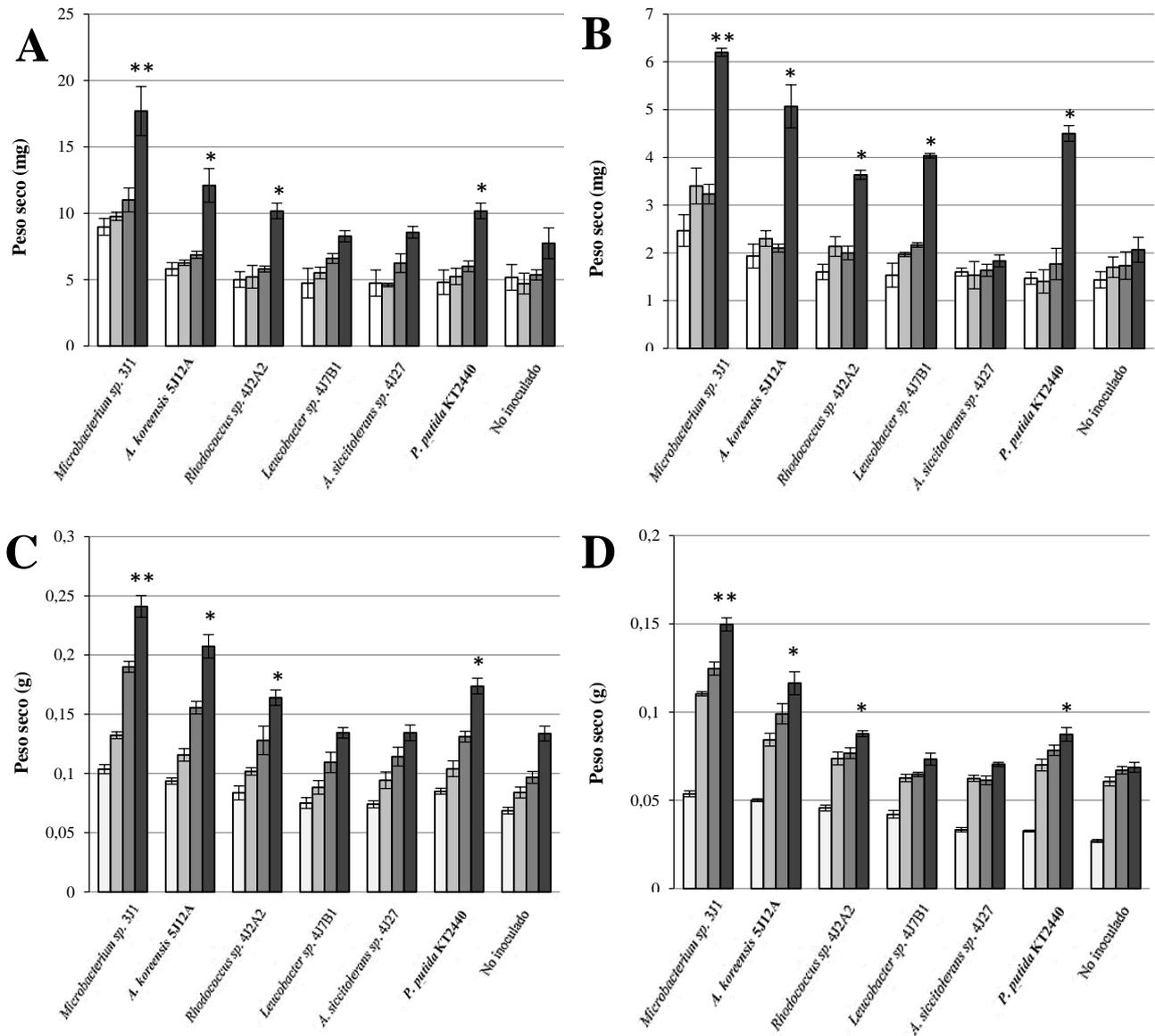


Figura 18. Peso seco de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. Se muestran los datos obtenidos en plantas de pimiento (A), tomate (B), maíz (C) y soja (D). En ordenadas se muestra el peso en mg o g de la planta. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro al día 14, el gris oscuro al 20 y el negro al día 33. Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

También se estudiaron los valores correspondientes al peso totalmente túrgido (PTT). En las muestras tomadas el día 33, las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 mostraron valores de PTT superiores al resto de plantas, llegando a ser en torno a un 20-40% superiores a los de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. Respecto a las plantas no inoculadas, esta diferencia llegó a ser de entre un 60% en caso del maíz, hasta un 90% respecto al caso de la soja. En cuanto a las plantas inoculadas con *A. koreensis*

5J12A, sus valores de PTT fueron en torno a un 5-20% superiores respecto a los valores finales de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. Las plantas inoculadas con *Rhodococcus* sp. 4J2A2 no mostraron diferencias significativas con las inoculadas con *P. putida* KT2440. En ninguno de los casos estudiados las plantas inoculadas con *Leucobacter* sp. 4J7B1 y con *A. siccitolerans* 4J27 mostraron diferencia significativa respecto a las plantas no inoculadas como puede observarse en la figura 19.

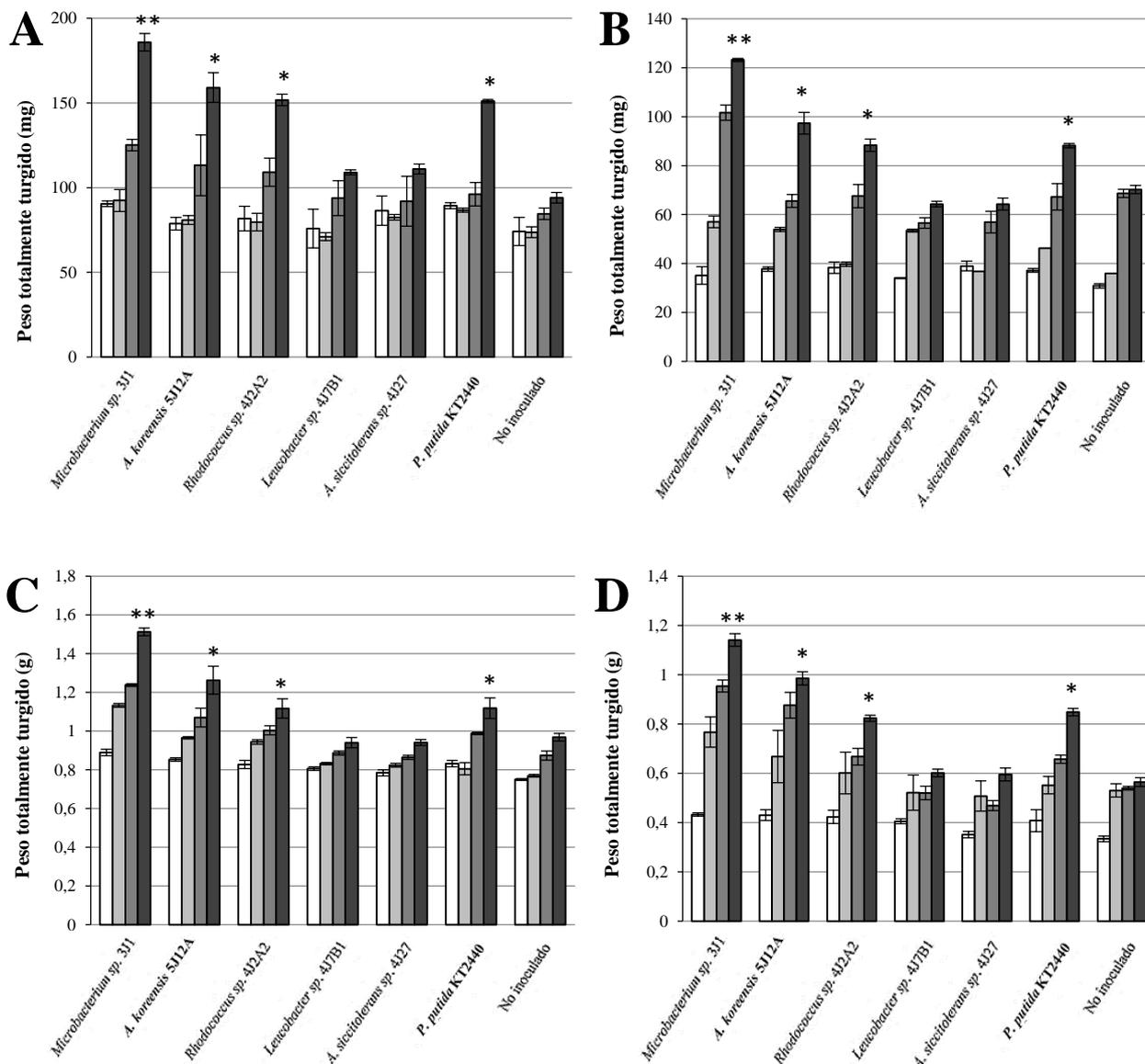


Figura 19. Peso totalmente túrgido de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. Se muestran los datos obtenidos en plantas de pimiento (A), tomate (B), maíz (C) y soja (D). En ordenadas se muestra el peso en mg o g de la planta. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro al día 14, el gris oscuro al 20 y el negro al día 33. Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

El análisis de los diferentes pesos nos permitió evaluar parámetros como el potencial de recuperación de agua (PRA), entendido como la diferencia entre PTT y PF, el cual indica lo distante que está la planta de su estado de equilibrio o de máximo turgor tras un periodo de sequía, de forma que valores bajos de PRA indican un estado cercano al equilibrio hídrico de la planta. En el caso del pimiento, tras 33 días de ensayo los valores de PRA de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J llegaron a ser de hasta 12 veces inferiores respecto a las plantas no inoculadas, y hasta 10 veces inferiores respecto a las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. En las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, esta diferencia fue de 6 y 5 veces respecto a las plantas no inoculadas e inoculadas con *P. putida* KT2440, respectivamente. El resto de condiciones mostraron valores de PRA similares o superiores a los obtenidos por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440.

En el caso del tomate, tanto las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 como con *A. koreensis* 5J12A mostraron valores un 75% inferiores a los mostrados por las plantas no inoculadas, no existiendo diferencia significativa sin embargo con respecto a las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. Para el caso del maíz, los valores de PRA para las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 fueron un 64% inferiores a los mostrados por plantas no inoculadas, mientras que las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A mostraron valores un 10% inferiores respecto a dichas plantas. El resto de condiciones mostraron valores de PRA entre un 10-30% superiores a los de las plantas no inoculadas. Por último, respecto al caso de la soja, los valores de PRA de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 llegaron a ser de hasta 2,5 veces menores que los mostrados por las plantas no inoculadas y casi 2 veces respecto a las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. Las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A mostraron valores casi un 85% inferiores respecto a los de las plantas no inoculadas, siendo de cerca del 30% inferiores a los mostrados por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. Las plantas inoculadas con *Rhodococcus sp.* 4J2A2 no mostraron diferencias respecto a las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. En el resto de casos, las plantas inoculadas con *Leucobacter sp.* 4J7B1 y con *A. siccitolerans* 4J27 mostraron resultados semejantes o superiores a los mostrados por las plantas no inoculadas, como puede observarse con más detalle en la figura 20.

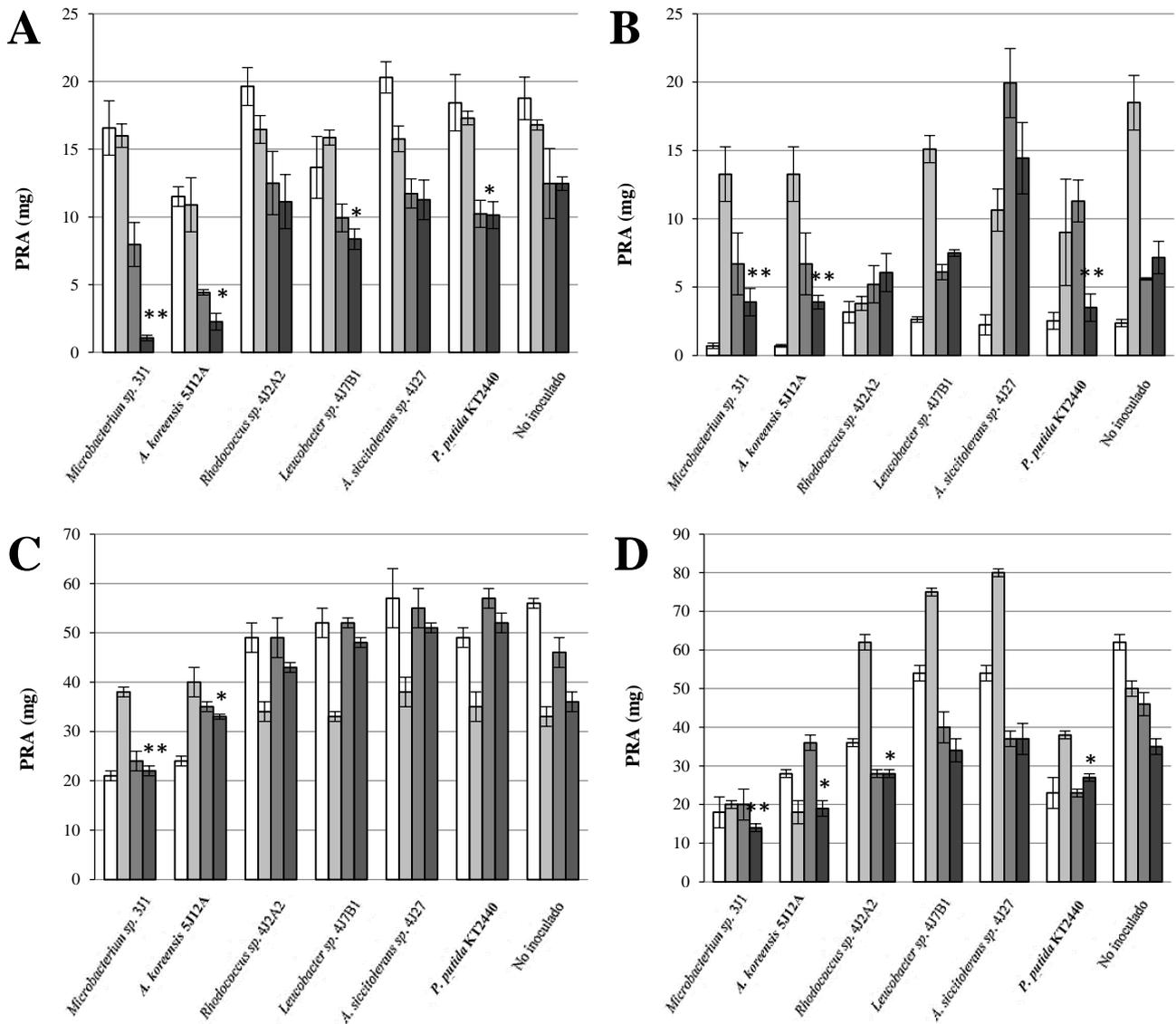


Figura 20. Potencial de recuperación de agua de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. Se muestran los datos obtenidos en plantas de pimiento (A), tomate (B), maíz (C) y soja (D). En ordenadas se muestra el peso en mg de la planta. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro al día 14, el gris oscuro al 20 y el negro al día 33. Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

Respecto a los valores de CRA, que indican el estado hídrico de la planta respecto al mejor estado posible o al estado hídrico ideal de la misma, en general se observa que estos valores de las plantas se mantuvieron estables o con un ligero aumento. Salvo en el caso del maíz, no existió diferencia significativa en los valores de CRA entre las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 y con *A. koreensis* 5J12A, llegando a mostrar valores de en torno al 4-5% superiores a las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 en todos los casos salvo para la soja, donde dicha diferencia fue del 2%.

Respecto a las plantas no inoculadas, estas diferencias fueron de entre el 5-10% superiores en todos los casos salvo en el tomate, donde la diferencia llegó a ser de cerca del 25% superior. Por otra parte, las plantas inoculadas con *Rhodococcus sp.* 4J2A2 no presentaron diferencia significativa con las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, salvo en el caso del maíz, donde dicha diferencia fue de en torno a un 2% superior. Todas las plantas inoculadas presentaron valores estadísticamente superiores a los obtenidos por las plantas no inoculadas, salvo en el caso del pimiento y la soja, en el que las plantas inoculadas con *A. siccitolerans* 4J27 y con *Leucobacter sp.* 4J7B1 donde no se observó dicha diferencia. Estos datos pueden observarse con más detalle en la figura 21.

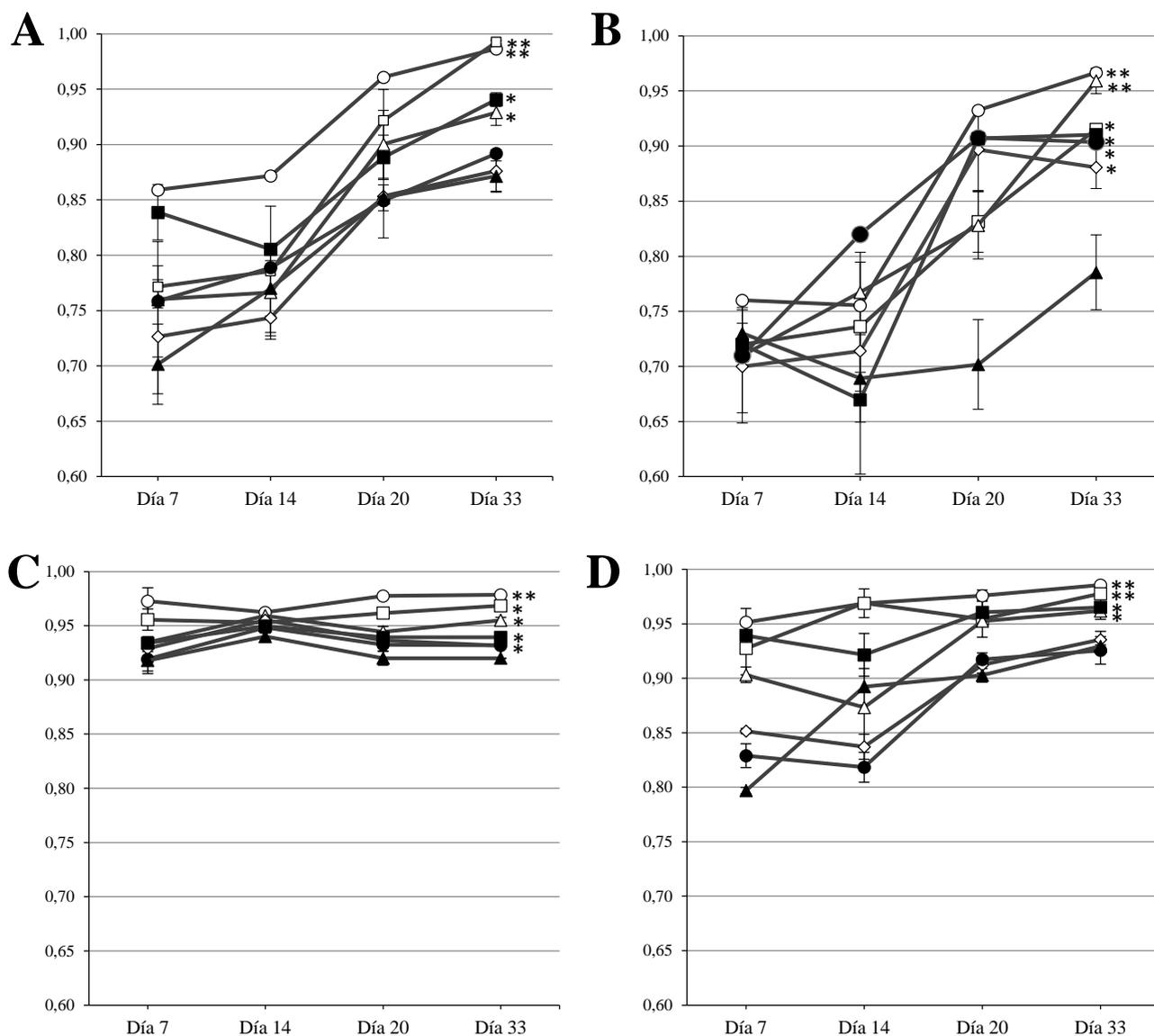


Figura 21. Contenido relativo de agua en plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. En ordenadas de muestran los valores adimensionales del CRA. En abscisas se indican los tiempos de muestreo. Los puntos con círculo blanco se corresponden con plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1; los cuadrados con plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A; con triángulos las plantas inoculadas con *Rhodococcus sp.* 4J2A2; con rombos las plantas *Leucobacter sp.* 4J7B1; los símbolos en forma de círculos oscuros con *A. siccitolerans* 4J27; los cuadrados con *P. putida* KT2440; y los triángulos oscuros con plantas no inoculadas. Se muestran los datos obtenidos en plantas de pimiento (A), tomate (B), maíz (C) y soja (D). Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

El último de los análisis obtenidos mediante los pesos registrados fue el índice de retención de agua (IRA), entendido como la diferencia entre PF y PS, el cual indica el agua que es capaz de recuperar una planta dependiendo de su estado fisiológico respecto al estado totalmente desecado o de marchitez. En el caso de las plantas de pimiento y tomate, para las muestras tomadas el día 33, las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 mostraron valores un 10% (pimiento) y un 5% (tomate) superiores respecto a las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, llegando al 15 y al 7,5% superiores respecto a las plantas no inoculadas, respectivamente. Las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A mostraron valores de IRA superiores al resto de plantas, llegando a ser de entre un 25% (pimiento) y un 50% (tomate) superior a los de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. Respecto a las plantas no inoculadas, esta diferencia llegó a ser de en torno a un 85% superior en el caso del pimiento y más del doble en el caso del tomate. Las plantas inoculadas con *Rhodococcus sp.* 4J2A2 no presentaron diferencia significativa en IRA respecto a las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. En el caso de las plantas de maíz y soja, las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 mostraron valores IRA significativamente superiores al resto de plantas, llegando a ser un 35% superiores a los de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. Estas plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 presentaron un IRA que llegó a ser más de doble respecto a las plantas no inoculadas, esta diferencia llegó a ser más del doble en el caso de la soja y de en torno a un 65% superior en el caso del pimiento. Las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A mostraron valores significativamente superiores a las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, llegando a ser de entre un 20% (en el caso del maíz) y un 15% (en el caso de la soja) superior. Respecto a las plantas no inoculadas, esta diferencia llegó a ser de en torno al 25% superior en ambos casos. Las plantas inoculadas con *Rhodococcus sp.* 4J2A2 no mostraron diferencia significativa en IRA respecto a las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. En ninguno de los casos estudiados las plantas inoculadas con *Leucobacter sp.* 4J7B1 y con *A. siccitolerans* 4J27 mostraron diferencia significativa en IRA respecto a las plantas no inoculadas como puede observarse en la figura 22.

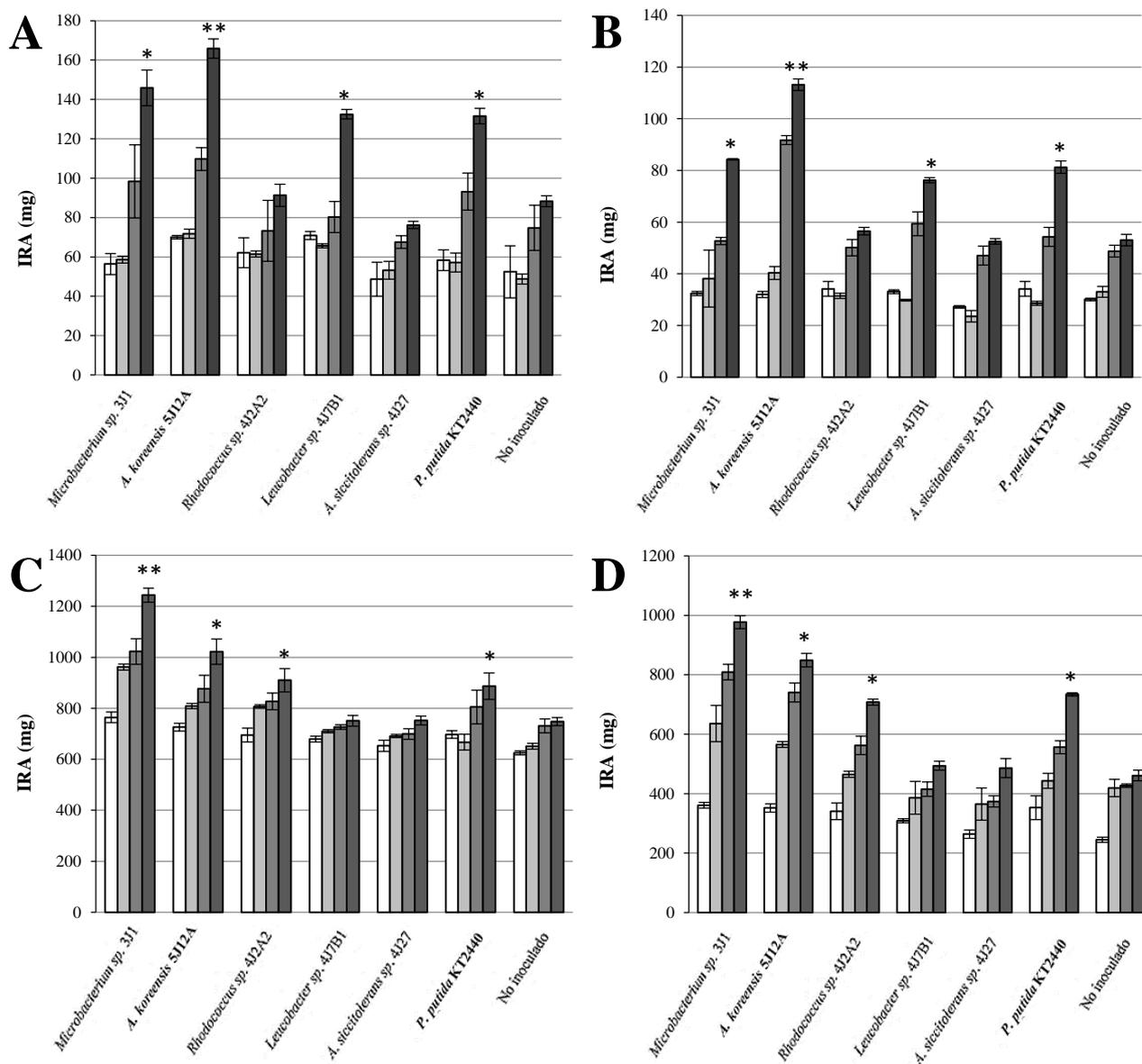


Figura 22. Índice de retención de agua de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes a los diferentes tiempos del ensayo en condiciones de riego. Se muestran los datos obtenidos en plantas de pimiento (A), tomate (B), maíz (C) y soja (D). En ordenadas se muestra el peso en mg de la planta. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro al día 14, el gris oscuro al 20 y el negro al día 33. Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

2. Xeroprotección de plantas de pimiento por acción bacteriana

Tras estudiar la promoción del crecimiento de las plantas por parte de los microorganismos se estudió la capacidad de proteger a estas plantas contra la sequía por parte de la colección de cepas tolerantes a la falta de agua.

Para este estudio partimos de plantas de 28 días de edad, transcurridos desde su germinación, tal y como se indica en el apartado 5 de la sección *Materiales y Métodos*. En este momento se inocularon las plantas y se cesó el riego de todas las macetas para comenzar a provocar condiciones de estrés por sequía en las plantas, considerando este momento como el tiempo 0. A partir de este tiempo se tomaron muestras a los 7, 14, 20 y 33 días, extrayendo tres plantas inoculadas con cada una de las cepas bacterianas *Microbacterium sp.* 3J1, *A. koreensis* 5J12A, *Rhodococcus sp.* 4J2A2, *Leucobacter sp.* 4J7B1 y *A. siccitolerans* 4J27. Adicionalmente se utilizaron plantas inoculadas con la cepa *P. putida* KT2440, por la capacidad de este microorganismo de promover el crecimiento de plantas y por ser sensible a la falta de agua. Por último, también se utilizaron plantas a las que se añadió el volumen equivalente de inóculo en forma de medio mínimo M9 y por tanto, consideradas como no inoculadas.

En cada muestreo se registró peso fresco (PF), peso seco (PS), peso totalmente túrgido (PTT) y contenido relativo de agua (CRA), descritos según se indica en el apartado 5.5 de la sección de *Materiales y Métodos*. Así, transcurridos 33 días en ausencia de riego, tanto las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 como las plantas no inoculadas presentaron una apariencia marchita al final del proceso. Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 y con *A. koreensis* 5J12A, toleraron la sequía mostrando una apariencia y tamaño normal. Por su parte, las plantas inoculadas con *Rhodococcus sp.* 4J2A2 mostraron un ligero nivel de resistencia a la sequía en algunos casos de estudio. Las plantas inoculadas con *Leucobacter sp.* 4J7B1 y con *A. siccitolerans* 4J27 también se marchitaron al final del ensayo en la mayoría de casos. Los ensayos con plantas de pimiento y tomate se llevaron a cabo entre febrero y mayo de 2012, mientras que los de maíz y soja se realizaron entre febrero y junio de 2013. El estado de las plantas al final del ensayo puede observarse en la figura 23.

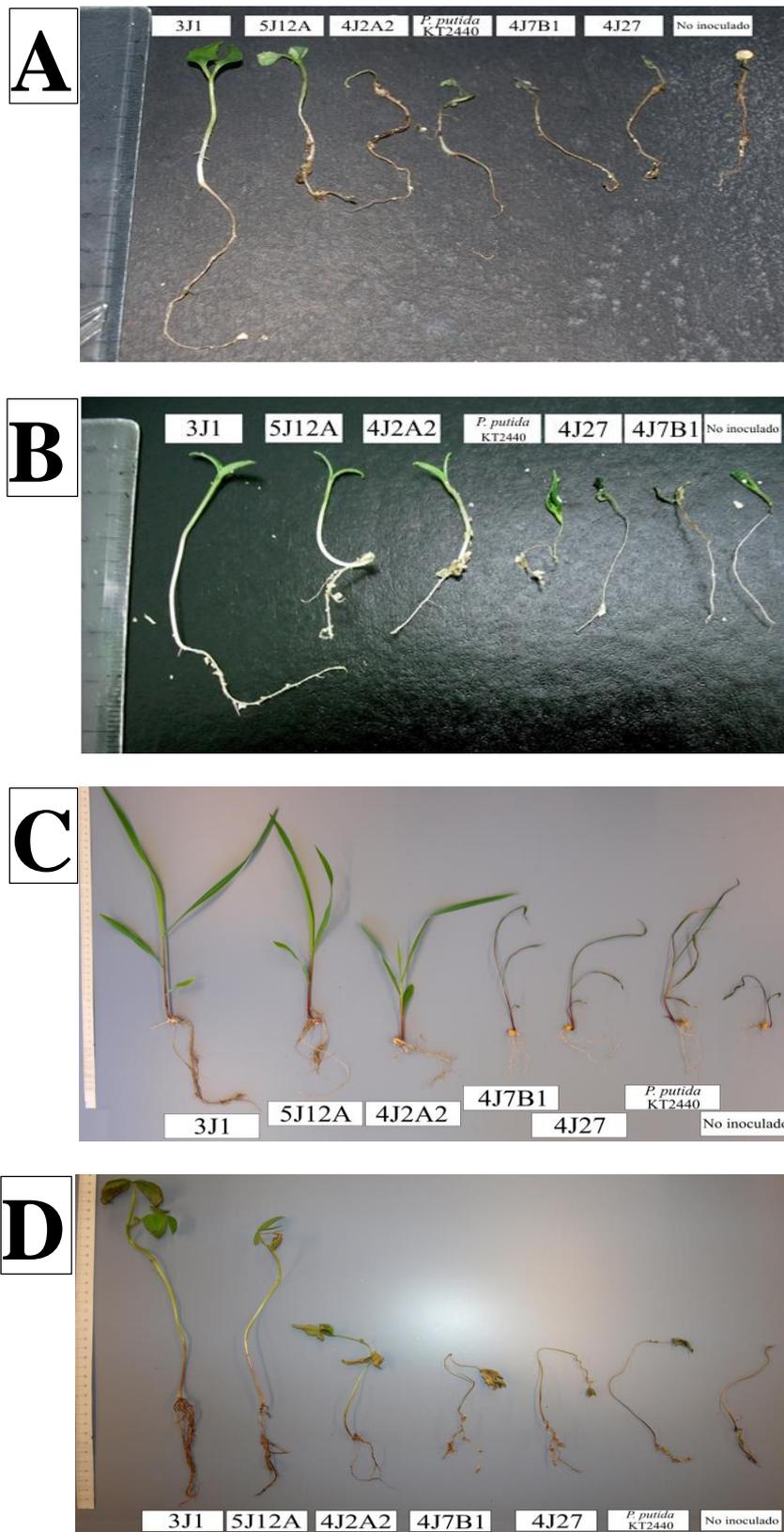


Figura 23. Aspecto de plantas inoculadas, a los 33 días sin riego. Se muestran las plantas de pimienta (A), tomate (B), maíz (C) y soja (D) inoculadas con las cepas *Microbacterium* sp. 3J1, *A. koreensis* 5J12A, *P. putida* KT2440, *Rhodococcus* sp. 4J2A2, *A. siccitolerans* 4J27, *Leucobacter* sp. 4J7B1 y de las plantas sin inocular al día 33 en condiciones de sequía.

El peso fresco (PF) de las plantas inoculadas con cada una de las cepas aumentó de manera más marcada hacia la última mitad del ensayo cuando estaban inoculadas con las cepas *Microbacterium sp.* 3J1, *A. koreensis* 5J12A y *Rhodococcus sp.* 4J2A2. En las muestras tomadas el día 33, las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 mostraron valores de peso fresco superiores a los de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 y a las plantas no inoculadas, llegando a mostrar una diferencia de más del doble.

Para el caso de las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, sus valores de PF fueron en torno a un 40-45% superiores a los de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 y a las plantas no inoculadas, salvo en el caso de la soja, donde esta diferencia llegó a ser de hasta casi el 80% superior. Las plantas inoculadas con *Rhodococcus sp.* 4J2A2 mostraron valores de en torno a un 15% superiores a los de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 y a las plantas no inoculadas en los casos del pimiento y el maíz, llegando hasta el 30% en el de la soja. Esta cepa no mostró diferencia significativa con los controles en el caso del tomate. En ninguno de los casos estudiados las plantas inoculadas con *Leucobacter sp.* 4J7B1 o con *A. siccitolerans* 4J27 mostraron diferencia significativa respecto a las plantas no inoculadas como puede observarse en la figura 24.

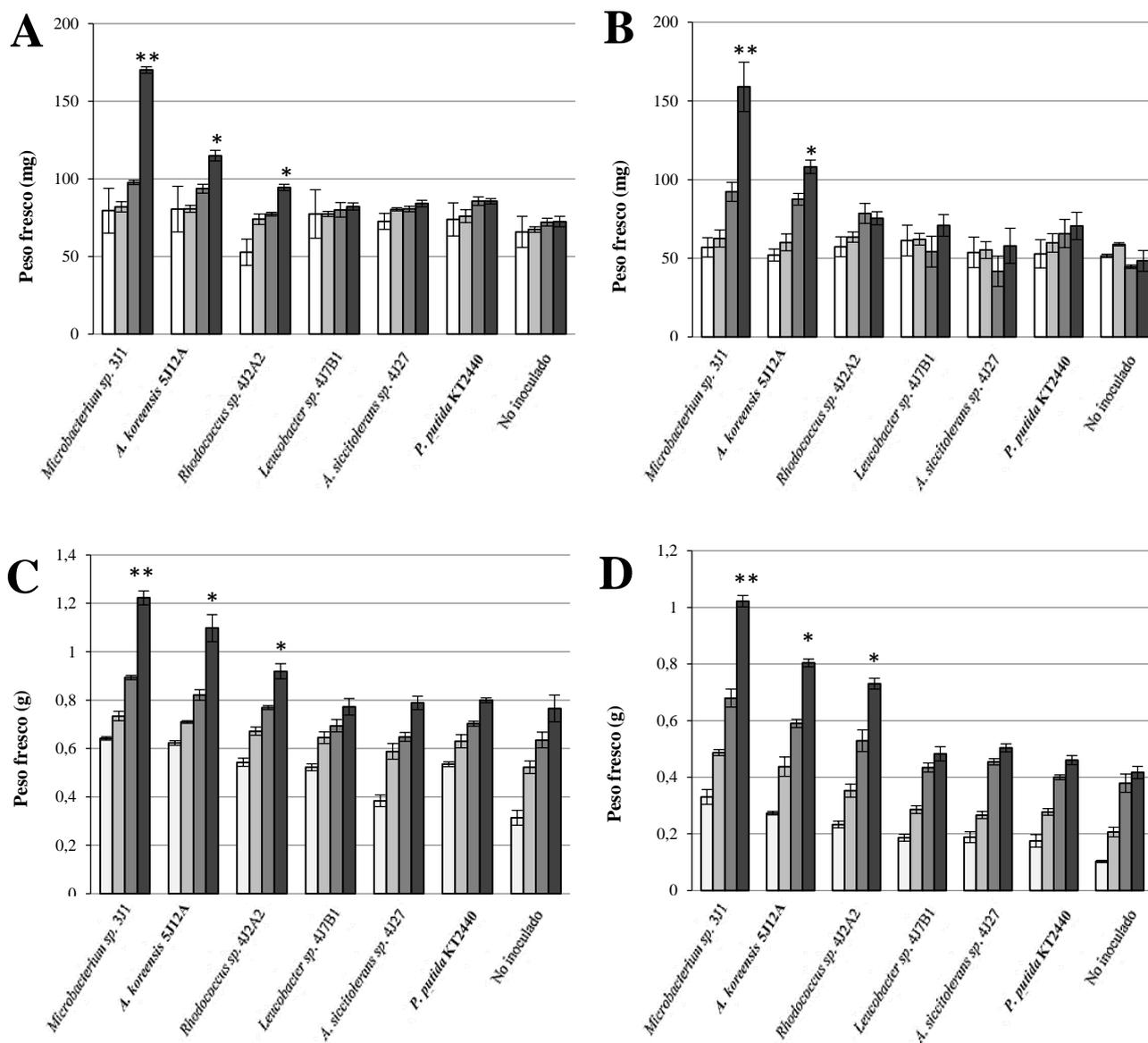


Figura 24. Peso fresco de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. Se muestran los datos obtenidos en plantas de pimienta (A), tomate (B), maíz (C) y soja (D). En ordenadas se muestra el peso en mg o g de la planta. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro al día 14, el gris oscuro al 20 y el negro al día 33. Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

El peso seco (PS) de las plantas inoculadas con cada una de las cepas aumentó de manera más marcada en la última mitad del ensayo. En ningún caso se observó diferencia significativa entre los valores de PS de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 y los de las plantas no inoculadas. En las muestras tomadas el día 33, las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 mostraron valores de PS superiores a los de las plantas no inoculadas, así como para las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, llegando a ser más del doble respecto a ambas condiciones. Únicamente en el caso del tomate la diferencia mostrada fue en torno a un 60% superior.

Respecto a las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, sus valores de PS fueron en torno a un 30-35% superiores respecto tanto a las plantas no inoculadas como a las inoculadas con *P. putida* KT2440, salvo en el caso de la soja, en la que los valores mostrados llegaron a ser de casi el doble superiores respecto a dichas condiciones. Por último, las plantas inoculadas con *Rhodococcus sp.* 4J2A2, mostraron valores en torno a un 15-20% superiores a los de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 o con las plantas no inoculadas. En ninguno de los casos estudiados las plantas inoculadas con *Leucobacter sp.* 4J7B1 o con *A. siccitolerans* 4J27 mostraron diferencias significativas respecto a las plantas no inoculadas como puede observarse en la figura 25.

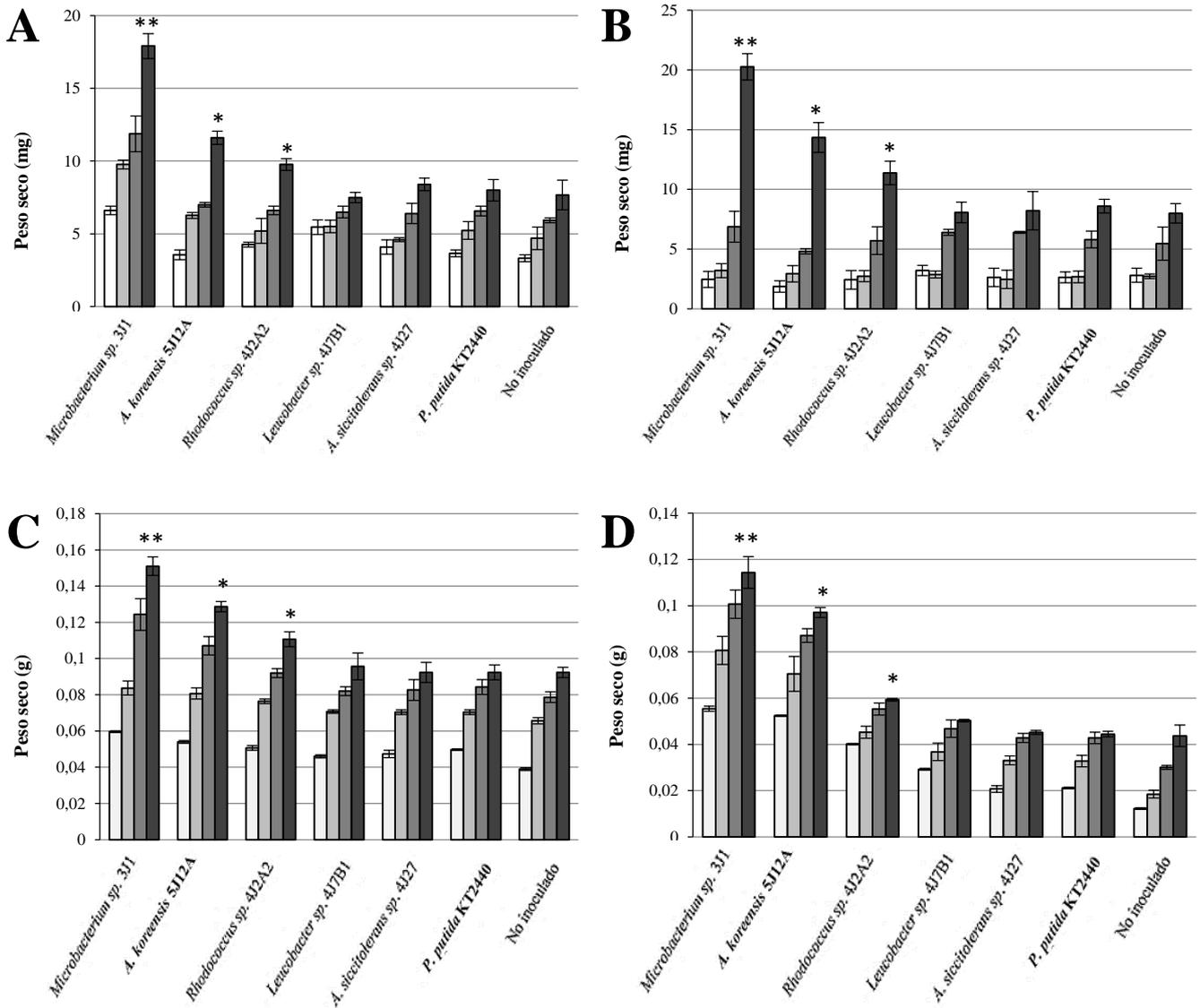


Figura 25. Peso seco de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes a los diferentes tiempos del ensayo en condiciones de sequía. Se muestran los datos obtenidos en plantas de pimienta (A), tomate (B), maíz (C) y soja (D). En ordenadas se muestra el peso en mg o g de la planta. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro al día 14, el gris oscuro al 20 y el negro al día 33. Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

El peso totalmente túrgido (PTT) de las plantas inoculadas con cada una de las cepas aumentó de manera más marcada en la última mitad del ensayo. En las muestras tomadas el día 33, las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 mostraron valores de PTT superiores a los de las plantas no inoculadas, así como para las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, llegando a ser de entre un 20% para el maíz y un 55% para el pimiento y la soja. En el caso del tomate la diferencia mostrada fue en torno al doble respecto a las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440.

En cuanto a las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, sus valores de PTT fueron en torno a un 15-30% superiores respecto tanto a las plantas no inoculadas como respecto a las inoculadas con *P. putida* KT2440, salvo en el caso de la soja, en la que los valores mostrados llegaron a ser de casi el doble respecto a dichas condiciones. Por último, las plantas inoculadas con *Rhodococcus sp.* 4J2A2, mostraron valores en torno a un 20% superiores a los de las plantas control en el caso del pimiento y la soja. En ninguno de los casos estudiados las plantas inoculadas con *Leucobacter sp.* 4J7B1 o con *A. siccitolerans* 4J27 mostraron diferencias significativas respecto a las plantas no inoculadas como puede observarse en la figura 26.

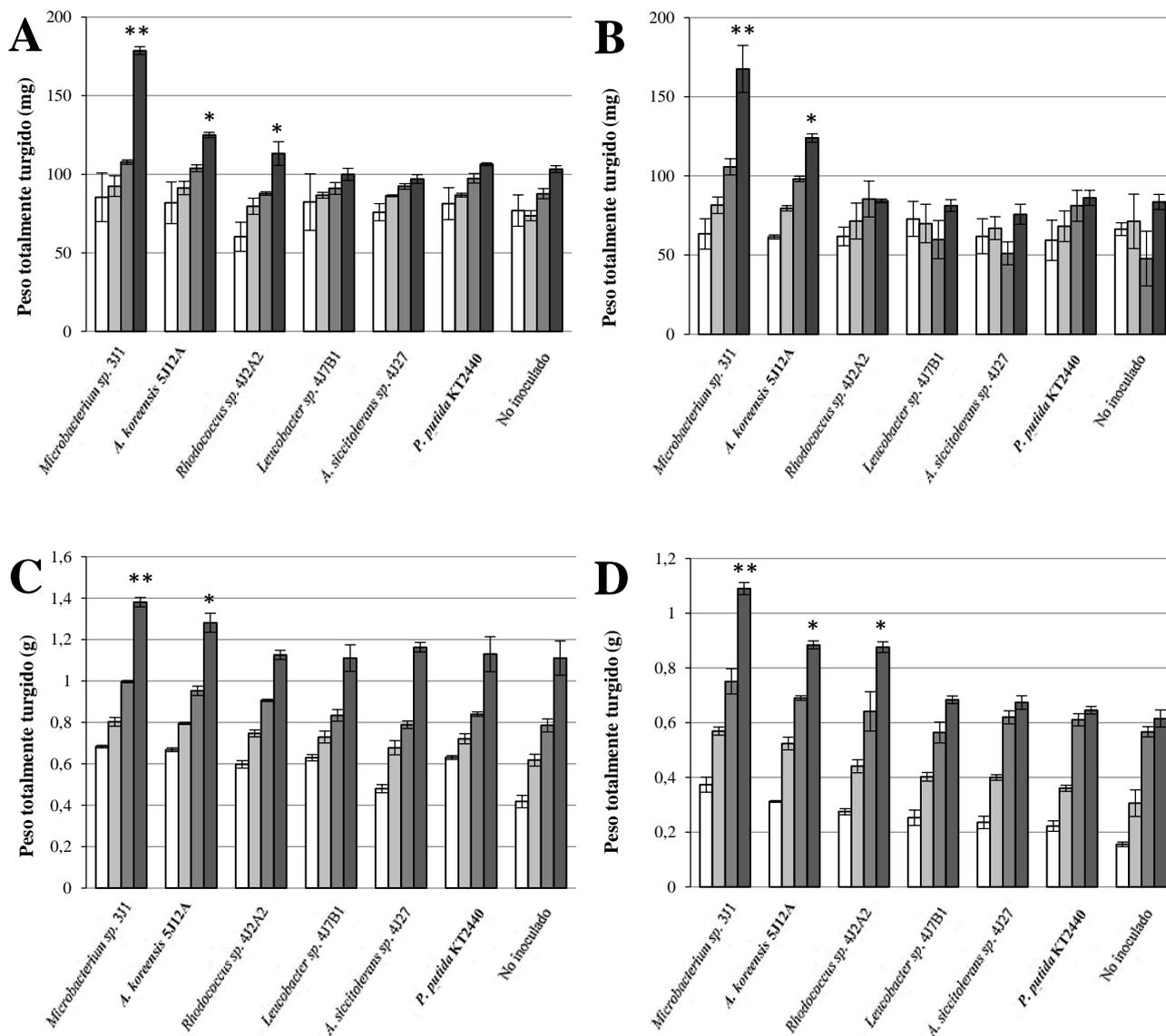


Figura 26. Peso totalmente túrgido de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. Se muestran los datos obtenidos en plantas de pimiento (A), tomate (B), maíz (C) y soja (D). En ordenadas se muestra el peso en mg o g de la planta. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro al día 14, el gris oscuro al 20 y el negro al día 33. Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

El potencial de recuperación de agua (PRA) de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 llegó a ser de hasta 2-4 veces inferior respecto tanto a las plantas no inoculadas como en las inoculadas con *P. putida* KT2440, salvo en el caso del maíz, donde la diferencia llegó a ser 8 veces inferior. En las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, la diferencia de PRA fue de entre 2-3 veces inferior respecto a las plantas no inoculadas e inoculadas con *P. putida* KT2440, salvo en el caso del maíz, donde esta diferencia llegó a ser de más de 5 veces inferior.

Las plantas inoculadas con *Rhodococcus sp.* 4J2A2 mostraron un PRA de en torno a un 20-30% inferior respecto a las plantas no inoculadas con *P. putida* KT2440, salvo en el caso del pimiento, donde no mostraron diferencia significativa con las inoculadas con *P. putida* KT2440. Para las plantas de maíz, la diferencia con los valores de PRA de las plantas control llegó a ser hasta 4 veces inferior. Las plantas inoculadas con *Leucobacter sp.* 4J7B1 y con *A. siccitolerans* 4J27 mostraron diferencias significativas respecto a las plantas no inoculadas en sus valores de PRA en los casos del maíz (en torno al 20% inferiores) y del pimiento (2 veces inferiores) respectivamente. En el resto de casos, estas plantas mostraron resultados semejantes o superiores a los mostrados por las plantas no inoculadas, como puede observarse con más detalle en la figura 27.

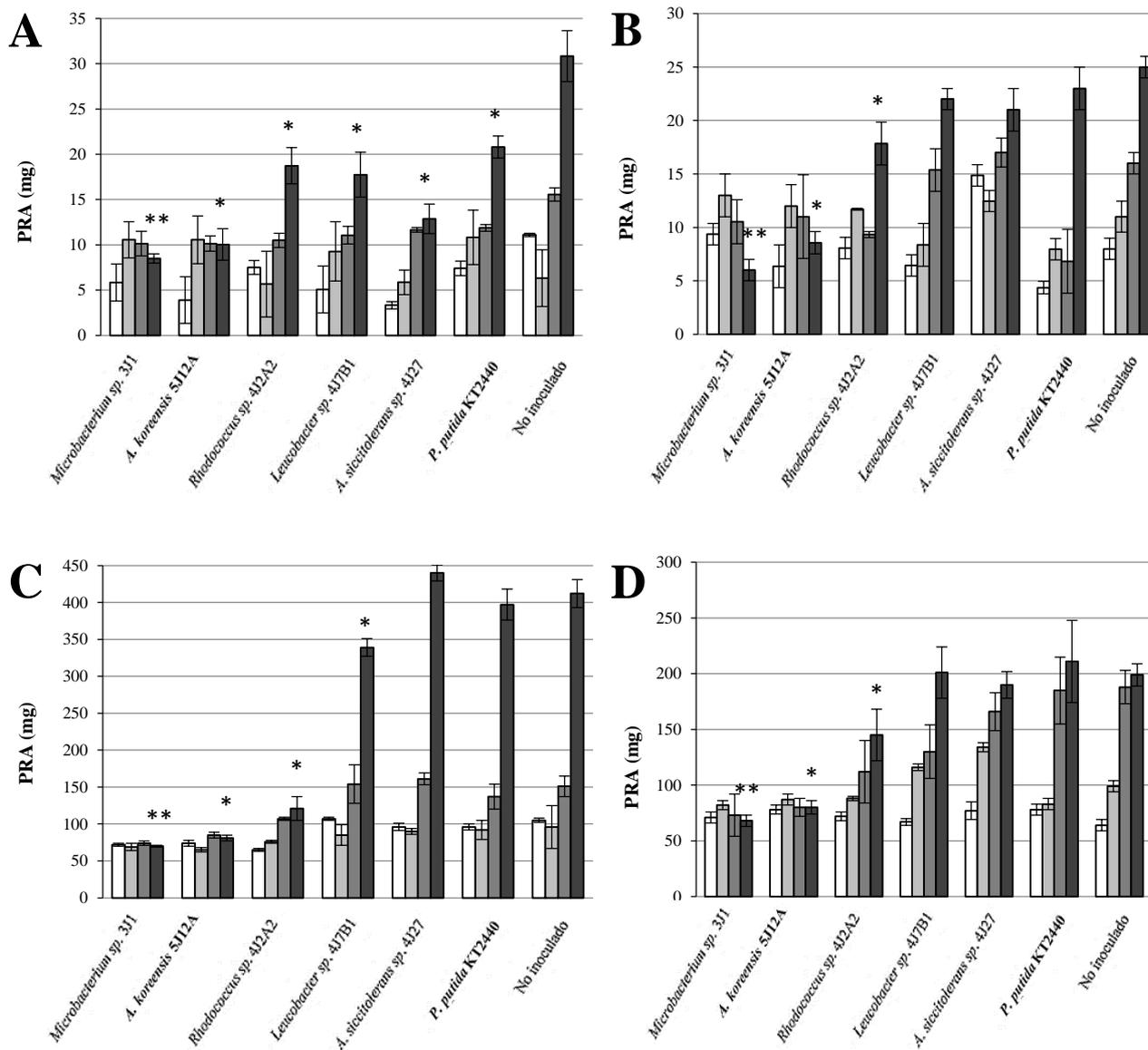


Figura 27. Potencial de recuperación de agua (PRA) de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. Se muestran los datos obtenidos en plantas de pimiento (A), tomate (B), maíz (C) y soja (D). En ordenadas se muestra el peso en mg de la planta. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro al día 14, el gris oscuro al 20 y el negro al día 33. Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

Respecto al CRA, en general se observa que los valores a partir del segundo y tercer punto de muestreo comenzaron a reducirse de manera más marcada. Sólo en los casos de las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A y con *Microbacterium sp.* 3J1, se superaron los valores de CRA de 0,85 al final de ensayo. Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 mostraron diferencias significativas con el CRA de las plantas no inoculadas llegando las diferencias a ser de entre un 40-50%. El valor de CRA fue en torno a un 15-17% mayor que en las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 en los casos del pimiento y el tomate, mientras que para el maíz y la soja llegó a ser en torno al 30-35% superior. Las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A mostraron valores de en torno a un 12-13% superiores a los de las plantas no inoculadas. En cuanto a las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, esta diferencia llegó a ser de en torno al 12-13% en los casos del pimiento y el tomate, mientras que para el maíz y la soja llegó a ser en torno al 25-35% superior.

Por su parte, las plantas inoculadas con *Rhodococcus sp.* 4J2A2 mostraron diferencias entre 15- 25% superiores con respecto a las plantas no inoculadas. Las diferencias en CRA de las plantas inoculadas con esta cepa respecto a las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 fueron un 20-25% superiores en los casos del maíz y la soja, mientras que en los casos del pimiento y el tomate no mostraron diferencias significativas. Por su parte, las plantas inoculadas con *A. siccitolerans* 4J27 y con *Leucobacter sp.* 4J7B1, mostraron un CRA de un 20% superior respecto a las plantas sin inocular en los casos del tomate y el pimiento, y de algo más del 10% superior en el caso plantas de soja inoculadas con *Leucobacter sp.* 4J7B1. Sin embargo, los resultados de CRA no llegaron a mostrar dicha diferencia significativa en el caso del maíz. Por otra parte, estas cepas no mostraron diferencia significativa con las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, salvo en el caso de las plantas de pimiento y de soja, donde dicha diferencia fue de en torno al 10%, respectivamente, tal y como se puede observar en la figura 28.

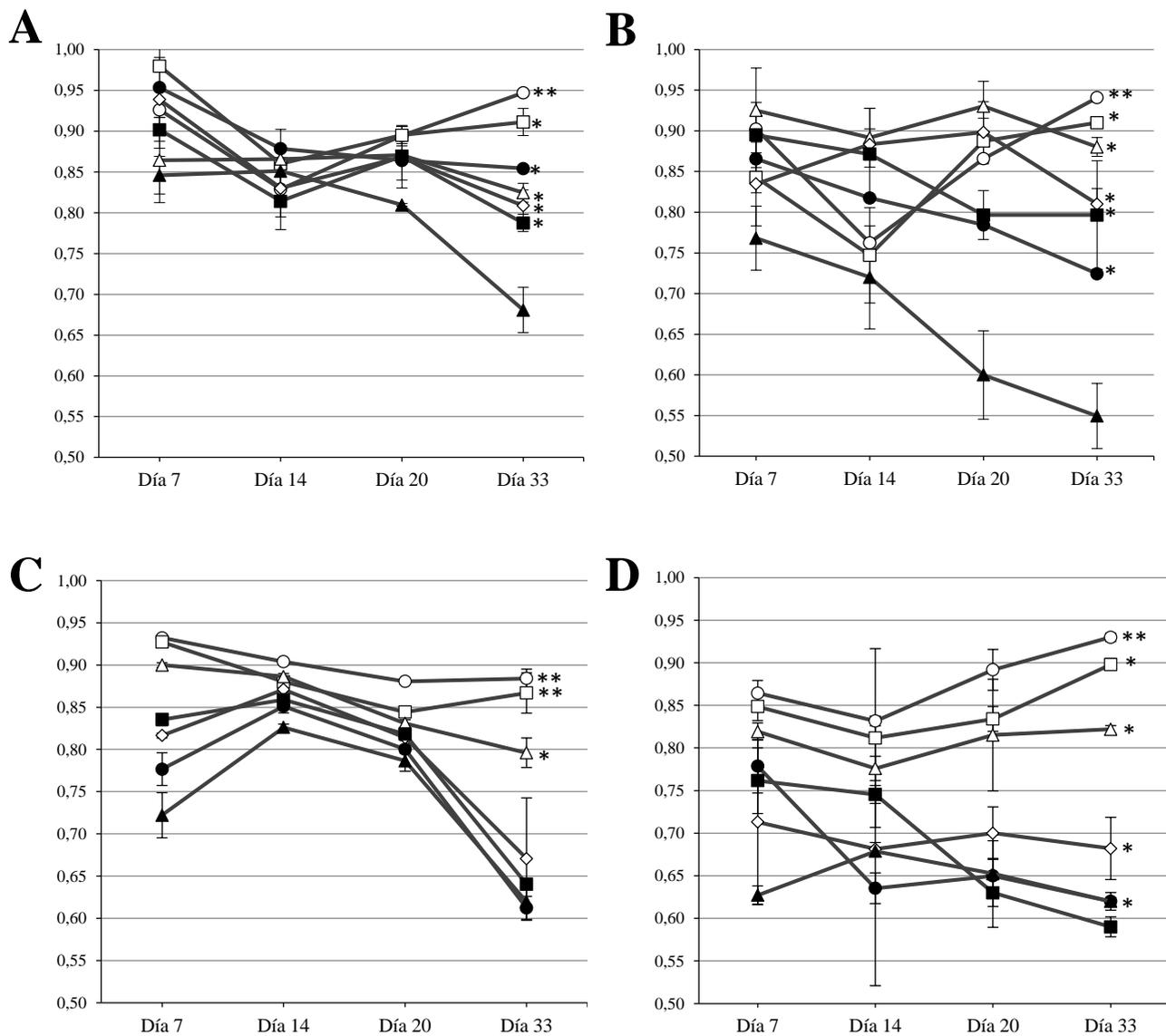


Figura 28. Contenido relativo de agua (CRA) en plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. En ordenadas se muestran los valores adimensionales del CRA. En abscisas se indican los tiempos de muestreo. Los puntos con círculo blanco se corresponden con plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1; los cuadrados blancos con plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A; con triángulos blancos las plantas inoculadas con *Rhodococcus sp.* 4J2A2; con rombos las plantas *Leucobacter sp.* 4J7B1; los símbolos en forma de círculos oscuros con *A. siccitolerans* 4J27; los cuadrados negros con *P. putida* KT2440; y los triángulos oscuros con plantas no inoculadas. Se muestran los datos obtenidos en plantas de pimiento (A), tomate (B), maíz (C) y soja (D). Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

El índice de retención de agua (IRA) observado en las muestras tomadas el día 33 por las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 fue un 40-55% superior tanto a las plantas no inoculadas como a las inoculadas con *P. putida* KT2440. Para el caso de las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, los valores de IRA fueron de un 30-40% superiores respecto tanto a las plantas no inoculadas como a las inoculadas con *P. putida* KT2440.

Respecto a las plantas inoculadas con *Rhodococcus sp.* 4J2A2, la diferencia respecto a los valores de las plantas no inoculadas y a los de las inoculadas con *P. putida* KT2440 fue de en torno a un 20-40% superiores, salvo en el caso del tomate, en la que no mostraron diferencias significativas respecto a las plantas con condiciones control. En ninguno de los casos estudiados las plantas inoculadas con *Leucobacter sp.* 4J7B1 o con *A. siccitolerans* 4J27 mostraron diferencia significativa respecto a las plantas no inoculadas, como puede observarse en la figura 29.

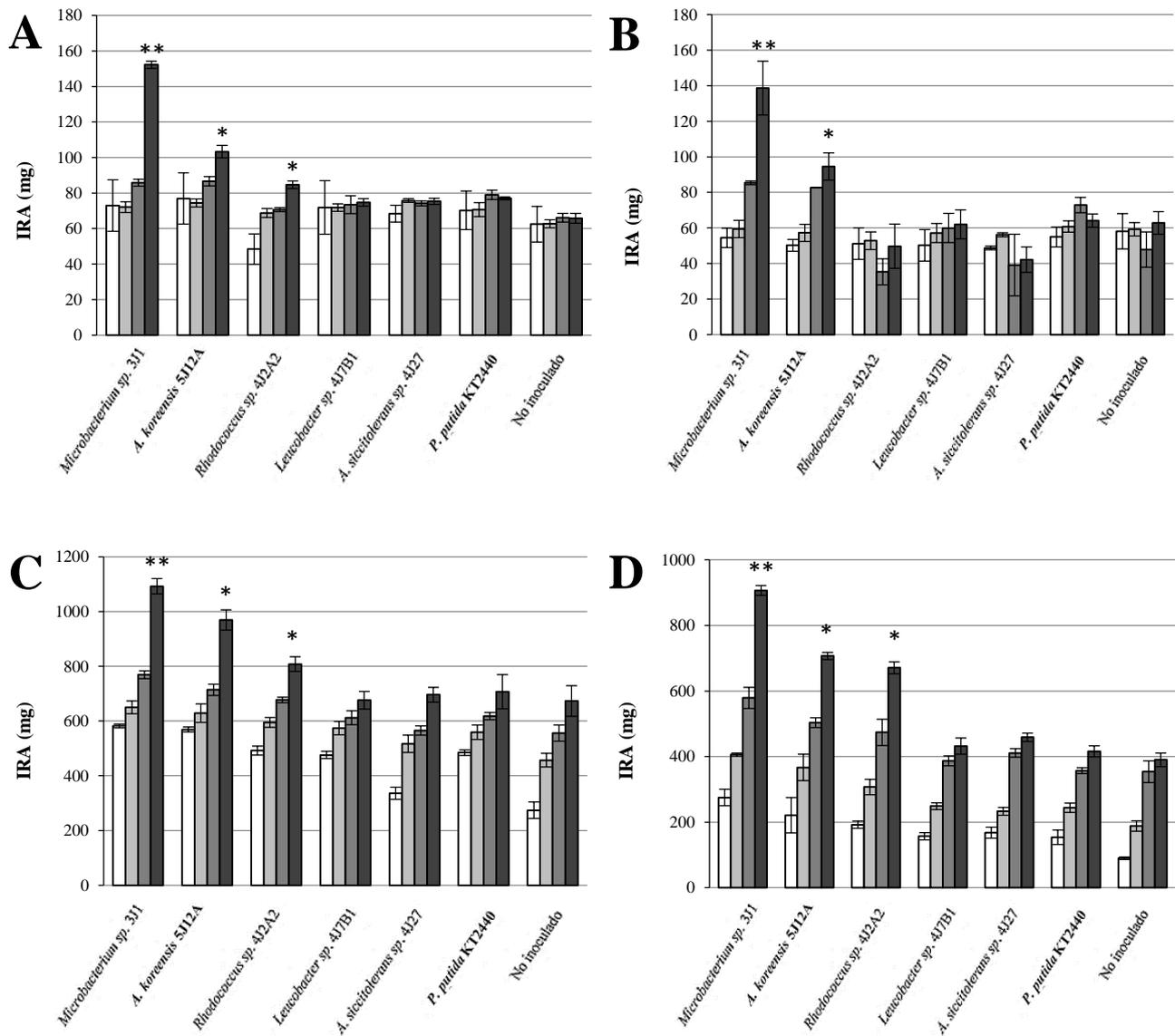


Figura 29. Índice de Recuperación de agua de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. Se muestran los datos obtenidos en plantas de pimiento (A), tomate (B), maíz (C) y soja (D). En ordenadas se muestra el peso en mg de la planta. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro al día 14, el gris oscuro al 20 y el negro al día 33. Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

Además del estudio del peso de las plantas, y su contenido hídrico, también estudiamos la longitud de las plantas tanto en su parte aérea como radicular. Este estudio se realizó con objeto de identificar si las cepas bacterianas que usábamos causaban algún tipo de efecto sobre el crecimiento sobre las plantas en condiciones de estrés hídrico.

De este modo, para los datos de altura, se tomó como medida la longitud en cm desde la base blanquecina de tallo o el punto donde se encontraran las primeras raíces, hasta el plano horizontal formado por el primer par de hojas (hojas seminales). Mientras que para las raíces se tomó como medida la longitud en cm desde la base blanquecina de tallo o el punto donde se encontraran las primeras raíces, hasta la punta del ápice radical más largo sin forzar el estiramiento del mismo.

Así, la longitud alcanzada en las muestras tomadas el día 33 por las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 mostraron valores 2-3 veces superiores tanto a las plantas no inoculadas, como a las inoculadas con *P. putida* KT2440. Para el caso de las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, sus valores de longitud fueron de algo menos del doble respecto tanto a las plantas no inoculadas, como a las inoculadas con *P. putida* KT2440, salvo en el caso de la soja y el maíz, donde dicha diferencia fue de un 40% superior. Respecto a las plantas inoculadas con *Rhodococcus sp.* 4J2A2, la diferencia en longitud de la parte aérea de las plantas no inoculadas y a los de las inoculadas con *P. putida* KT2440 fue de en torno a un 15-25% superiores, salvo en el caso del tomate, en la que no mostraron diferencias significativas respecto a las plantas control. En ninguno de los casos estudiados las plantas inoculadas con *Leucobacter sp.* 4J7B1 o con *A. siccitolerans* 4J27 mostraron diferencia significativa respecto a las plantas no inoculadas, como puede observarse en la figura 30.

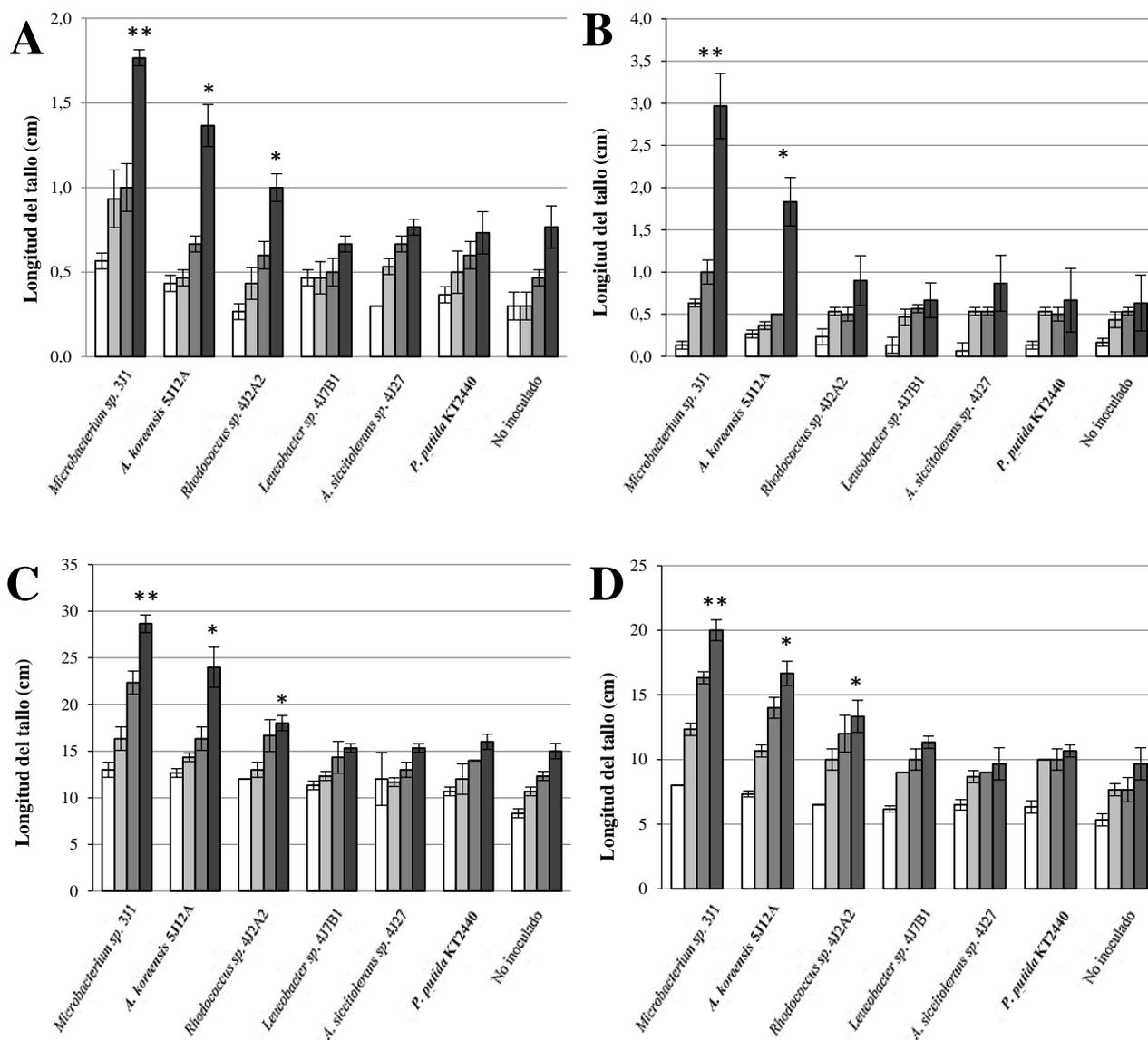


Figura 30. Altura del tallo de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de estrés hídrico. Datos correspondientes a plantas de pimiento (A), tomate (B), maíz (C) y soja (D). En ordenadas se muestra la longitud del tallo de la planta en cm. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro al día 14, el gris oscuro al 20 y el negro al día 33. Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

La longitud de las raíces en las muestras tomadas el día 33 para las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 mostraron valores superiores tanto a las plantas no inoculadas como a las inoculadas con *P. putida* KT2440, esta diferencia llegó a ser de un 50-75% superior, salvo en el caso de la soja, donde la diferencia llegó a ser de 2 veces superior. Para el caso de las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, su valor de longitud fue en torno a un 25% superiores tanto a las plantas no inoculadas como a las inoculadas con *P. putida* KT2440, salvo en el caso de la soja, donde esta diferencia llegó hasta el 40%.

Respecto a las plantas inoculadas con *Rhodococcus sp.* 4J2A2, estas mostraron valores de longitud de raíz de entre un 15-30% superiores a los de las plantas con condiciones control, salvo en el caso de las plantas de tomate, donde no mostraron diferencias significativas con las mismas. En ninguno de los casos estudiados las plantas inoculadas con *Leucobacter sp.* 4J7B1 o con *A. siccitolerans* 4J27 mostraron diferencia significativa respecto a las plantas no inoculadas como puede observarse en la figura 31.

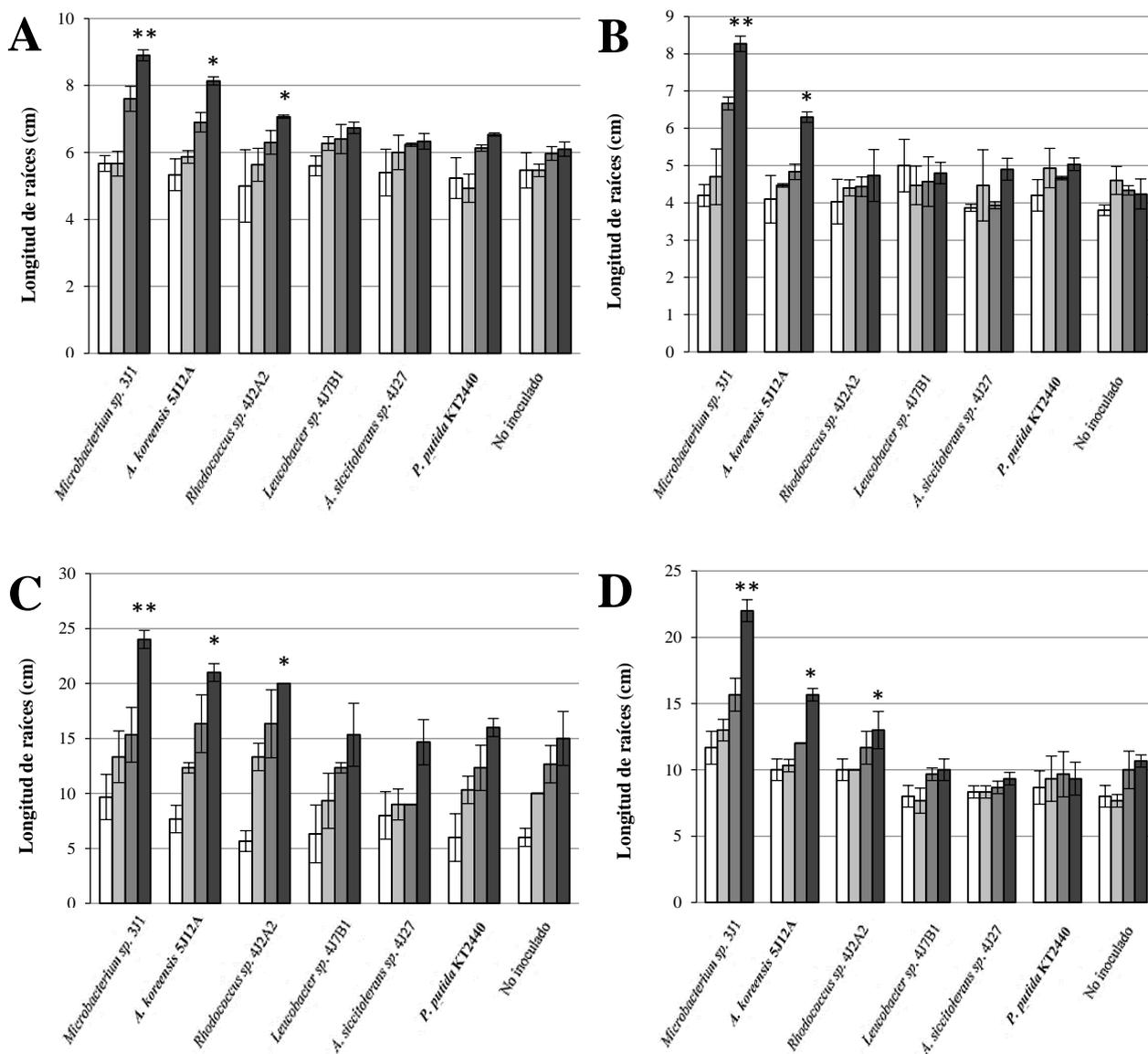


Figura 31. Longitud de la raíz de las plantas de pimiento inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. Se muestran los datos obtenidos en plantas de pimiento (A), tomate (B), maíz (C) y soja (D). En ordenadas se muestra la longitud de la raíz de la planta en cm. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro al día 14, el gris oscuro al 20 y el negro al día 33. Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

3. Protección de plantas por cepas taxonómicamente cercanas

Dado que los mayores niveles de protección de las plantas frente a la sequía se producían por parte de las cepas microbianas con mayor tolerancia a la falta de agua, decidimos estudiar la capacidad de protección de los cultivos en función del grado de tolerancia a la sequía de los microorganismos por parte de las especies más cercanas a los mismos. Para esto se realizó un estudio taxonómico que identificase los microorganismos taxonómicamente más cercanos a cada una de las bacterias estudiadas. Se calculó la tolerancia a la falta de agua por estas cepas y posteriormente se realizó un análisis de la protección frente a la sequía de las plantas cuando estaban inoculadas con estas cepas.

3.1. Análisis taxonómico de las cepas tolerantes a la sequía. Árbol filogenético

Para analizar cuáles eran las cepas taxonómicamente más cercanas a las dos cepas que más protección habían generado sobre las plantas (*Microbacterium sp.* 3J1 y *A. koreensis* 5J12A) se realizó un estudio en base al gen codificante para el ARNr 16S, empleando la herramienta BLAST de la base de datos proporcionada por la web del NCBI, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), así como el programa de ensamble y comparación de secuencias ClustalW del EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Con ello se obtuvieron árboles filogenéticos por agrupación y algoritmo del vecino más próximo. Así, se seleccionaron las cepas tipo más cercanas de la colección DMSZ (Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania). Las dos cepas más cercanas a *Microbacterium sp.* 3J1 y a *A. koreensis* 5J12A fueron *Microbacterium foliourum* P333/02 (DSM 12966) y *Microbacterium phyllosphaerae* P369/06 (DSM 13468), y *Arthrobacter koreensis* CA15-8 (DSM 16760) y *Arthrobacter luteolus* CF25 (DSM13067), tal y como se muestran en la figura 32.

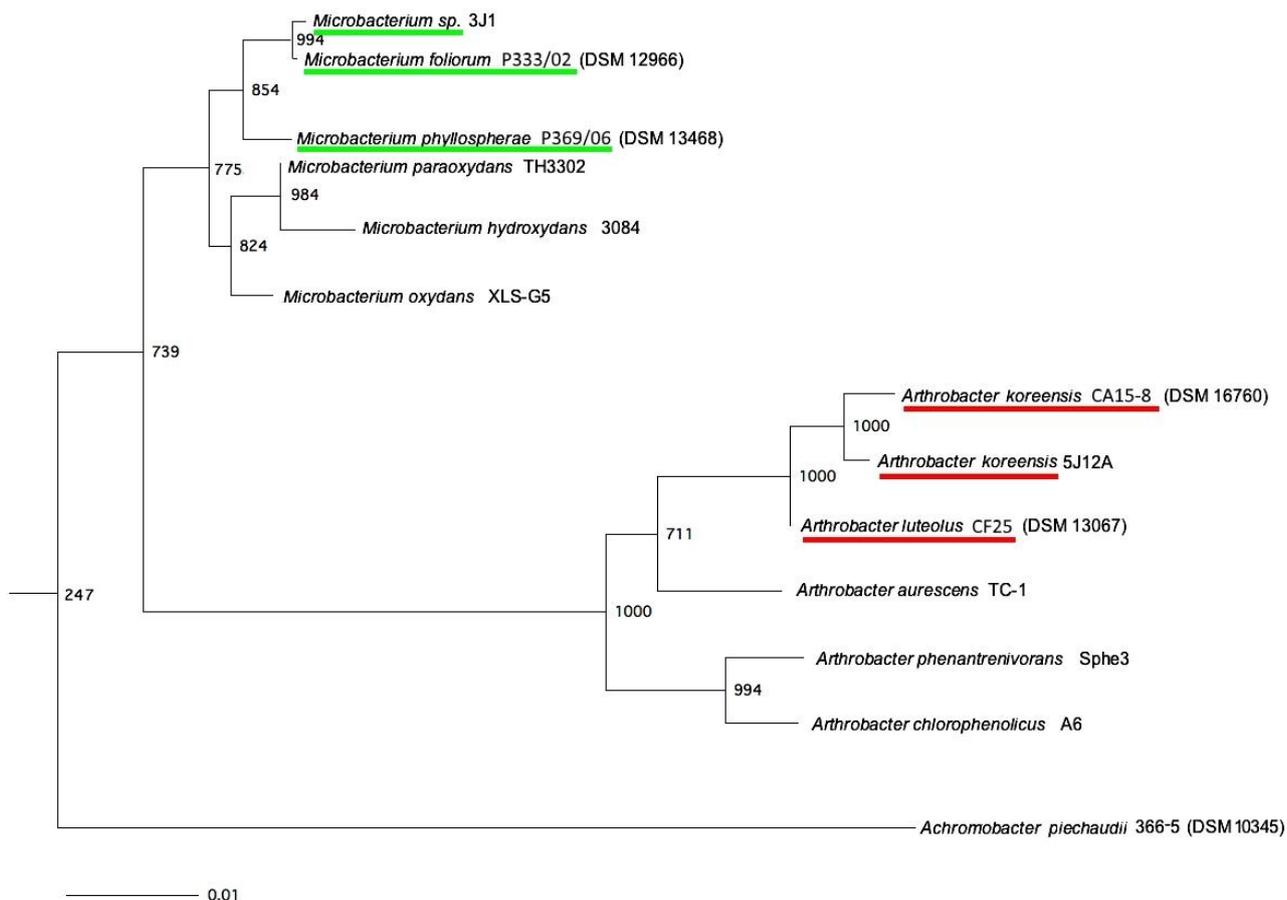


Figura 32. Árbol filogenético por método del vecino más próximo para las cepas con mejores efectos de protección frente a la sequía en plantas. En la figura se muestran los valores de cercanía filogenética para las cepas *Microbacterium sp.* 3J1 y *A. koreensis* 5J12A respecto a las cepas con mayor similitud alcanzada al comparar el gen codificante para ARNr 16S. Se destacan en verde las cepas más cercanas a *Microbacterium sp.* 3J1, y en rojo, las más cercanas a *A. koreensis* 5J12A. Se incluye *Achromobacter piechaudii* 366-5 (DSM 10345) como exogrupo.

3.2. Tolerancia a la desecación

Para identificar el grado de tolerancia a la falta de agua de las cepas taxonómicamente más cercanas a *Microbacterium sp.* 3J1 y a *A. koreensis* 5J12A se realizó un ensayo de desecación tal y como describe Narváez-Reinaldo et al. 2010, empleando la cepa *P. putida* KT2440 como cepa sensible a la falta de agua.

La tolerancia de dichas cepas fue, en todos los casos, menor a la mostrada por las cepas previamente estudiadas, como se muestra en la figura 33. La cepa *P. putida* KT2440 no presentó supervivencia alguna en este ensayo. Por su parte, la cepa *Microbacterium sp.*

3J1 mostró una supervivencia superior al 40%, mientras que los valores alcanzados tanto por la cepa *M. foliorum* P333/02 (DSM12966) (30%) como la cepa *M. phyllosphaerae* P369/06(DSM 13468) (18%) mostraron tolerancias significativamente inferiores a *Microbacterium sp.* 3J1. En cuanto a la cepa *Arthrobacter sp.* 5J12A, esta mostró una supervivencia cercana al 30%, siendo la de las cepas *A. koreensis* CA15-8 (DSM 16760) (23%) y *A. luteolus* CF25 (DSM13067) (2%) significativamente inferiores. Las cepas *M. foliorum* P333/02 (DSM12966) y *A. koreensis* CA15-8 (DSM 16760) respectivamente, son por tanto las cepas con una tolerancia más cercana a la de las cepas previamente estudiadas.

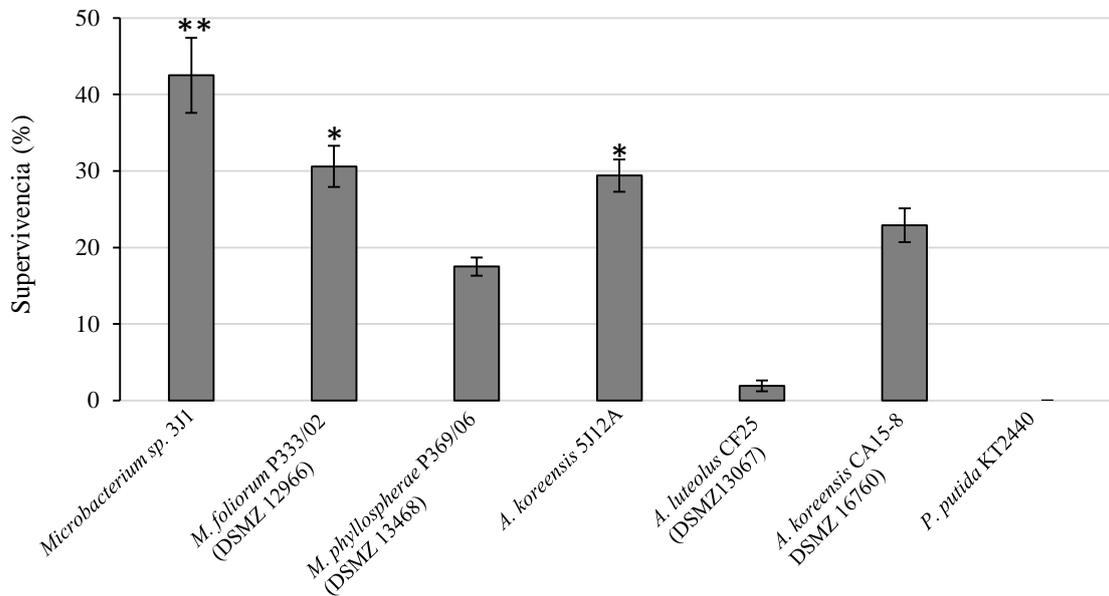


Figura 33. Tolerancia a la desecación de las cepas filogenéticamente más cercanas a las cepas en estudio. En la figura se observan los niveles de supervivencia (%) a desecación completa durante un periodo de 24 h para las cepas en estudio *Microbacterium sp.* 3J1 y *A. koreensis* 5J12A, así como para las cepas más cercanas filogenéticamente. Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

3.3. Ensayos comparativos de protección frente a la sequía contra cepas tipo más cercanas

Para evaluar si existe una correlación entre el nivel de tolerancia a la falta de agua del microorganismo y el nivel de protección suministrado a la planta se realizaron estudios de tolerancia a la sequía de dos tipos de plantas (pimiento y tomate) inoculadas con las cepas taxonómicamente más cercanas a *Microbacterim sp.* 3J1 y a *A. koreensis* 5J12A.

3.3.1. Ensayos con plantas de pimiento y tomate

Los ensayos se realizaron con plantas de pimiento y tomate de un mes de vida en lugar de 2 semanas como se realizaron en el apartado anterior (fase L4) en condiciones de sequía con las cepas *Microbacterim sp.* 3J, *M. foliorum* P333/02 (DSM 12966), *M. phyllosphaerae* P369/06 (DSM 13468), *A. koreensis* 5J12A, *A. koreensis* CA15-8 (DSM 16760) y *A. luteolus* CF25 (DSM 13067) para poder evaluar una posible correlación entre la tolerancia a la sequía y la protección suministrada a la planta. Se registraron el peso fresco, el peso seco y el contenido relativo de agua.

El peso fresco (PF), presentó un mayor aumento en la segunda mitad del ensayo. En ninguno de los casos estudiados las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 mostraron diferencia significativa respecto a las plantas no inoculadas. Las plantas inoculadas con *M. foliorum* P333/02 (DSM 12966) y con *M. phyllosphaerae* P369/06 (DSM 13468) mostraron valores de un 47% y de algo más de la mitad inferiores respecto a las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1. Los valores de PF de las plantas inoculadas con *M. foliorum* P333/02 (DSM 12966) respecto a los de las inoculadas con *M. phyllosphaerae* P369/06 (DSM 13468) fue de un 15-20% superior, no mostrando esta últimas tal diferencia ni con las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, ni con las no inoculadas. Por otra parte, las plantas inoculadas con *A. luteolus* CF25 (DSM 13067) y con *A. koreensis* CA15-8 (DSM 16760) mostraron un valor de un 60% inferior al de las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A. Ninguna de estas plantas mostró diferencia respecto a las plantas las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 y a las no inoculadas (figura 34).

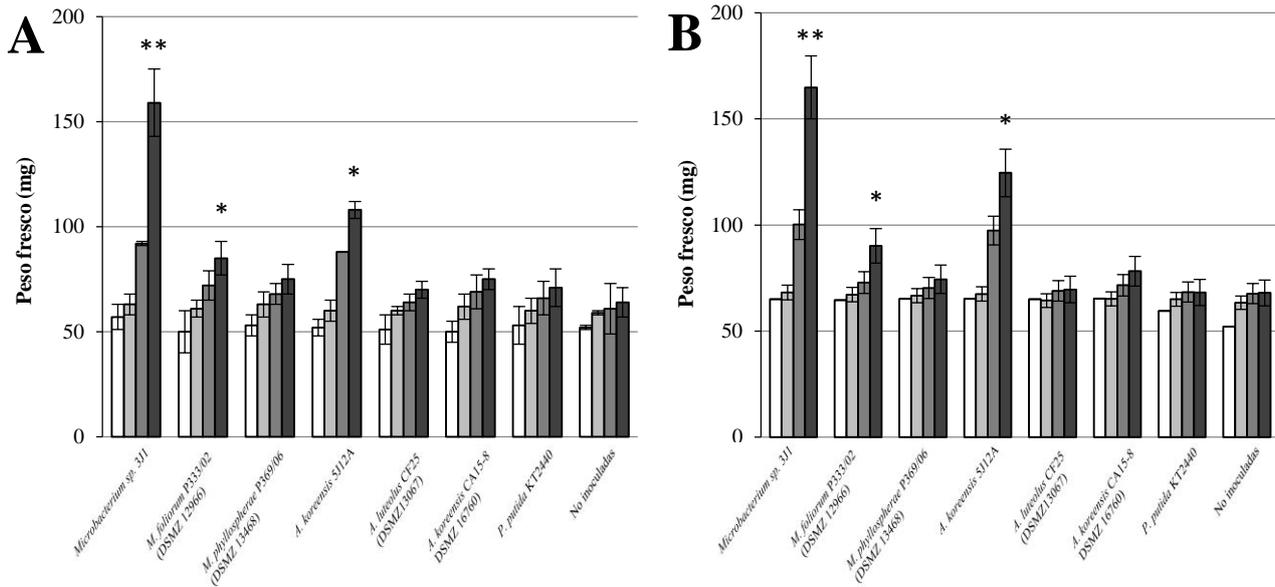


Figura 34. Peso fresco de plantas de pimiento inoculadas en condiciones de estrés hídrico. En ordenadas se muestra el peso en mg de las plantas. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro al día 14, el gris oscuro al 20 y el negro al día 33. Se muestran los datos obtenidos en plantas de pimiento (A) y tomate (B). Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

El peso seco (PS) de las plantas aumentó en la segunda mitad del ensayo. En ninguno de los casos estudiados las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 mostraron diferencia significativa respecto a las plantas no inoculadas. En el caso del pimiento, las plantas inoculadas con *M. foliorum* P333/02 (DSM 12966) y con *M. phyllosphaerae* P369/06 (DSMZ 13468) presentaron un valor de PS de la mitad del mostrado por las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp. 3J1. Ninguna de estas cepas mostraron diferencia significativa ni con las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 ni con las no inoculadas. En cuanto a las plantas de tomate, las plantas inoculadas con *M. foliorum* P333/02 (DSM 12966) y con *M. phyllosphaerae* P369/06 (DSMZ 13468) presentaron un valor de PS de un tercio inferior y de la mitad del mostrado por las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp. 3J1, respectivamente. Las plantas de tomate inoculadas con *M. foliorum* P333/02 (DSM 12966) mostraron una diferencia de en torno al 25% superior respecto a las plantas con *M. phyllosphaerae* P369/06 (DSMZ 13468). Las plantas inoculadas con esta última cepa no mostraron diferencia en PS respecto a las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 ni con las no inoculadas. Por su parte, las plantas

inoculadas con *A. luteolus* CF25 (DSMZ 13067) y con *A. koreensis* CA15-8 (DSMZ 16760) mostraron casi la mitad del valor de PS que las inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, no mostrando tal diferencia con las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 ni con las no inoculadas (figura 35).

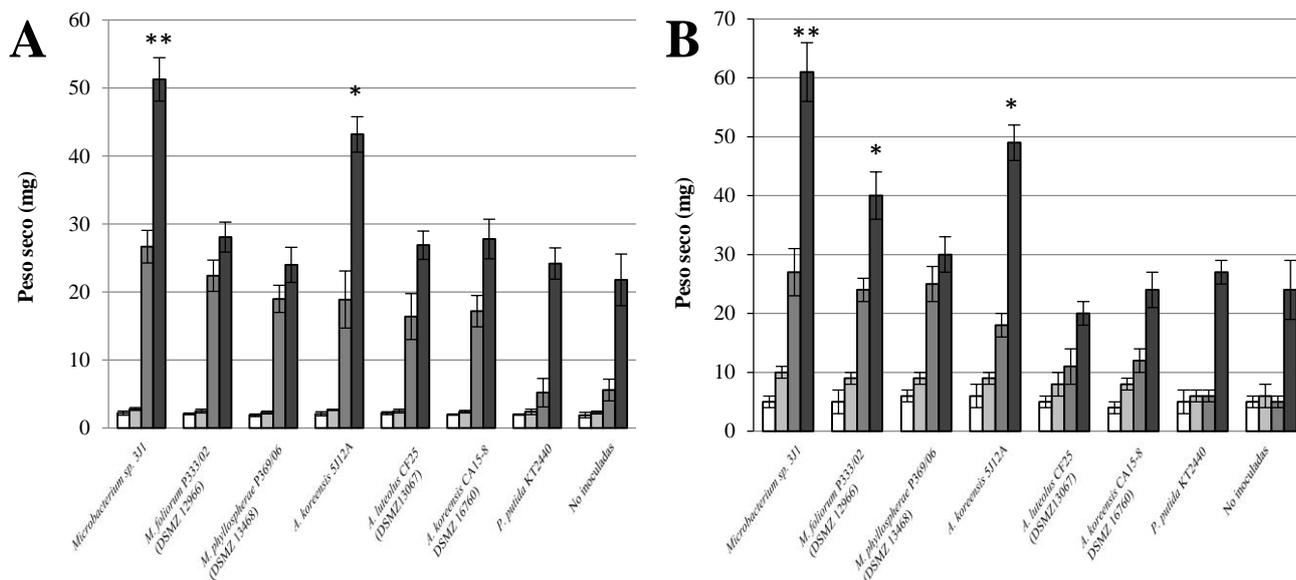


Figura 36. Peso seco de plantas inoculadas con cada cepa en condiciones de estrés hídrico. En ordenadas se muestra el peso en mg de las plantas. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro al día 14, el gris oscuro al 20 y el negro al día 33. Se muestran los datos obtenidos en plantas de pimiento (A) y tomate (B). Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

Los valores de CRA fueron análogos a los dos parámetros anteriores PF y PS. Así, las plantas inoculadas con las cepas *Microbacterium sp.* 3J1 y *A. koreensis* 5J12A mostraron valores altos de CRA situándose al final de ambos ensayos siempre por encima de 0,75, de modo análogo a como ocurría con plantas de dos semanas de edad. En general se observa que los valores a partir del segundo y tercer punto de muestreo comenzaron a decrecer. La diferencia en el valor de CRA en las plantas inoculadas con *M. foliorum* P333/02 (DSMZ 12966) y con *M. phyllosphaerae* P369/06 (DSMZ 13468) con respecto al CRA registrado en plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 fue de en torno al 10-20% inferior en el caso del pimiento, y en torno al 30-40% inferior en el caso del tomate, respectivamente. Por su parte, las plantas inoculadas con *M. foliorum* P333/02 (DSMZ

12966) mostraron una diferencia de en torno al 20-25% superior respecto a las plantas con condiciones control. Las plantas inoculadas con la cepa *M. phyllosphaerae* P369/06 (DSMZ 13468) alcanzaron una diferencia significativa de en torno al 12-17% superior respecto a las plantas con condiciones control. Por otra parte, las plantas inoculadas con *A. luteolus* CF25 (DSMZ 13067) y con *A. koreensis* CA15-8 (DSMZ 16760) mostraron valores de CRA de entre un 10-20% inferior en el caso del pimiento, y en torno al 25-35% inferior en el caso del tomate, respectivamente, respecto a los valores de CRA mostrados por las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A. Por su parte, las plantas inoculadas con *A. luteolus* CF25 (DSMZ 13067) mostraron una diferencia de en torno al 20-25% superior respecto a las plantas con condiciones control. Las plantas inoculadas con la cepa *A. koreensis* CA15-8 (DSMZ 16760) alcanzaron una diferencia significativa de en torno al 12-17% superior respecto a las plantas con condiciones control. Estos datos pueden observarse con más detalle en la figura 37.

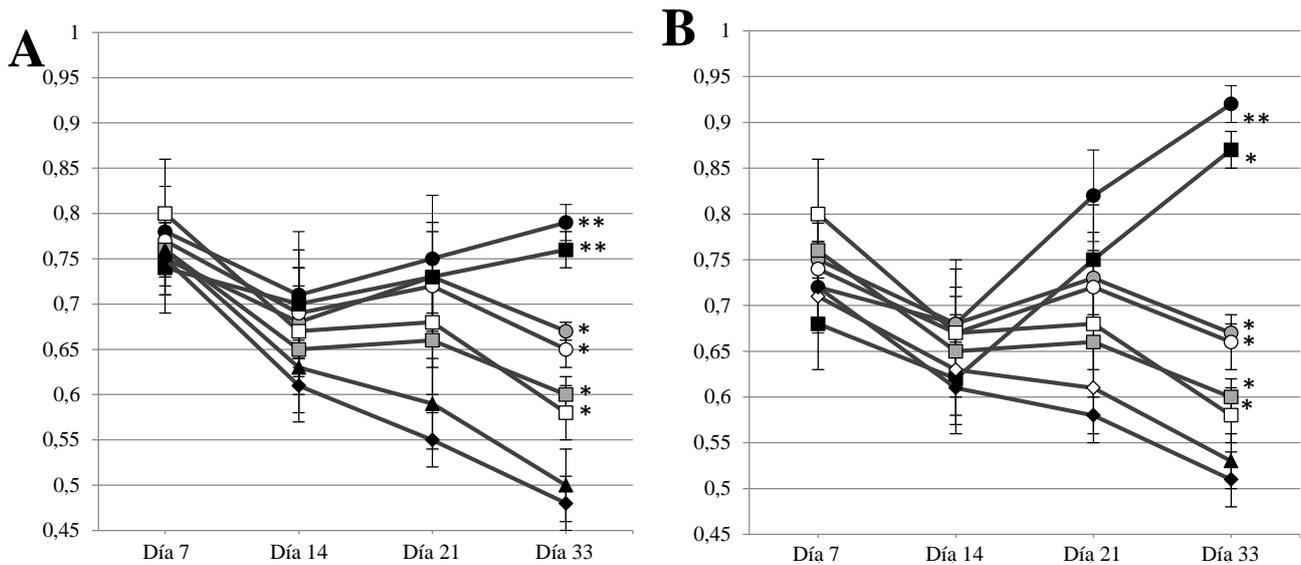


Figura 37. Contenido relativo de agua en plantas inoculadas con las las cepas en estudio y su cepas taxonómicamente más cercanas. En ordenadas de muestran los valores adimensionales del CRA. En abscisas se indican los tiempos de muestreo. Los puntos con círculo negro se corresponden con plantas inoculadas con *Microbacterium* sp. 3J1, los círculos grises con *M. foliorum* DS12966 y los círculos blancos con *M. phyllosphaerae* DSM13468; los cuadrados negros, con *A. koreensis* 5J12A, los cuadrados grises con *A. luteolus* DSM13067 y los cuadrados blancos con *A. koreensis* DSM16760; por último, los triángulos, con *P. putida* KT2440; los rombos negros, con las plantas no inoculadas. Se muestran los datos obtenidos en plantas de pimiento (A) y tomate (B). Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

4. Determinación de producción de compuestos protectores y fitohormonas por las cepas xerotolerantes.

Dado el efecto causado por algunos de los aislados en la protección de la planta ante la falta de agua, así como para la promoción del crecimiento de la planta en condiciones de riego, decidimos estudiar los factores involucrados en la promoción del crecimiento así como en la protección contra la desecación en plantas como compuestos xeroprotectores (trehalosa) y moléculas activas contra especies reactivas del oxígeno (enzimas antioxidantes), así como la producción de fitohormonas (auxinas, giberelinas, ácido abscísico, ácido salicílico, etileno) tanto en la colección de cepas xerotolerantes, como mecanismos más descritos en la literatura.

4.1. Compuestos xeroprotectores

Diversos estudios han descrito la producción de determinados compuestos por cepas bacterianas que actúan como protectores contra la sequía tanto para las propias cepas como para la planta. Entre las moléculas xeroprotectoras más descritas en la literatura y que parecen tener mayor influencia en la protección de biomoléculas esenciales contra la desecación, destaca la trehalosa (Iturriaga *et al.*, 2009, Ilhan *et al.*, 2015). Por otra parte, también se ha descrito el uso de enzimas como la superóxido dismutasa o la catalasa para el control de las especies reactivas del oxígeno (Yao *et al.*, 2006). En ambos casos, su función se ha descrito en la protección de las estructuras vitales, así como en la producción de fitohormonas, bajo condiciones de estrés por sequía.

4.1.1. Producción de trehalosa

La trehalosa es una de las moléculas más implicadas en la protección de plantas contra la sequía y en la regulación de otros mecanismos como la producción de agentes antioxidantes o de determinadas fitohormonas (Lunn *et al.*, 2014). La cuantificación de este compuesto se llevó a cabo utilizando cultivos crecidos en TSB como control, y en TSB adicionado con 5 y 50% PEG para simular dos tipos de condiciones de sequía, suave e intensa (Mohammad *et al.*, 1991). Tras alcanzar la fase estacionaria, se procedió a centrifugar los cultivos para obtener las células, las cuales se lavaron y lisaron. Tras

eliminar los restos celulares, las muestras se analizaron con un cromatógrafo iónico 940 Professional IC Vario 2 (Metrohm, Suiza) para cuantificar la cantidad de trehalosa por UFC detectada. Como estándar interno se empleó 1 mg/ml de sacarosa. De este modo se determinó la producción de trehalosa por las cepas *Microbacterium sp.* 3J1, *A. koreensis* 5J12A, *Rhodococcus sp.* 4J2A2, *A. siccitolerans* 4J27 y *Leucobacter sp.* 4J7B1. También se determinó la producción por la cepa *P. putida* KT2440 como control, ya que posee la ruta de trehalosa sintasa (*treS*) (Nelson *et al.*, 2002). Las concentraciones se determinaron haciendo uso de estándares internos de sacarosa y trehalosa, tal y como se indica en el apartado 6.1 de *Materiales y Métodos*.

Así, la cepa *P. putida* KT2440 produjo hasta 117 ppm ($\mu\text{g/ml}$) por $\text{CFU} \times 10^8 \cdot \text{ml}^{-1}$ en ausencia de PEG. Su producción se mantuvo sin diferencia significativa cuando se adicionó PEG al medio (tanto 5 como 50%). En ausencia de PEG, la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 produjo un 30% más de trehalosa respecto a la cepa *P. putida* KT2440. La cepa *A. koreensis* 5J12A por su parte produjo casi el triple que la cepa control (250 ppm por $\text{CFU} \times 10^8 \cdot \text{ml}^{-1}$). Las cepas *Rhodococcus sp.* 4J2A2, *Leucobacter sp.* 4J7B1 y *A. siccitolerans* 4J27 no mostraron diferencia significativa en la producción de trehalosa respecto a *P. putida* KT2440. En presencia de PEG 5%, la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 produjo 10 veces más trehalosa (409 ppm por $\text{CFU} \times 10^8 \cdot \text{ml}^{-1}$) que la cepa control (43 ppm por $\text{CFU} \times 10^8 \cdot \text{ml}^{-1}$). Por su parte, la cepa *A. koreensis* 5J12A produjo 9 veces más trehalosa que *P. putida* KT2440. En esta condición, la cepa *Rhodococcus sp.* 4J2A2 produjo hasta 4 veces más trehalosa que *P. putida* KT2440, mientras que las cepas *Leucobacter sp.* 4J7B1 y *A. siccitolerans* 4J27 produjeron entre 2,5-3 veces más, respectivamente. Por último, cuando el medio contuvo PEG 50%, la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 llegó a producir hasta 23 veces más trehalosa (990 ppm por $\text{CFU} \times 10^8 \cdot \text{ml}^{-1}$) que la cepa control *P. putida* KT2440. La cepa *A. koreensis* 5J12A, por su parte, produjo casi 15 veces más que la cepa control. Bajo esta condición, la cepa *Rhodococcus sp.* 4J2A2 produjo hasta 11 veces más trehalosa que *P. putida* KT2440, mientras que las cepas *Leucobacter sp.* 4J7B1 y *A. siccitolerans* 4J27 produjeron entre 5-6,5 veces más, respectivamente (figura 38).

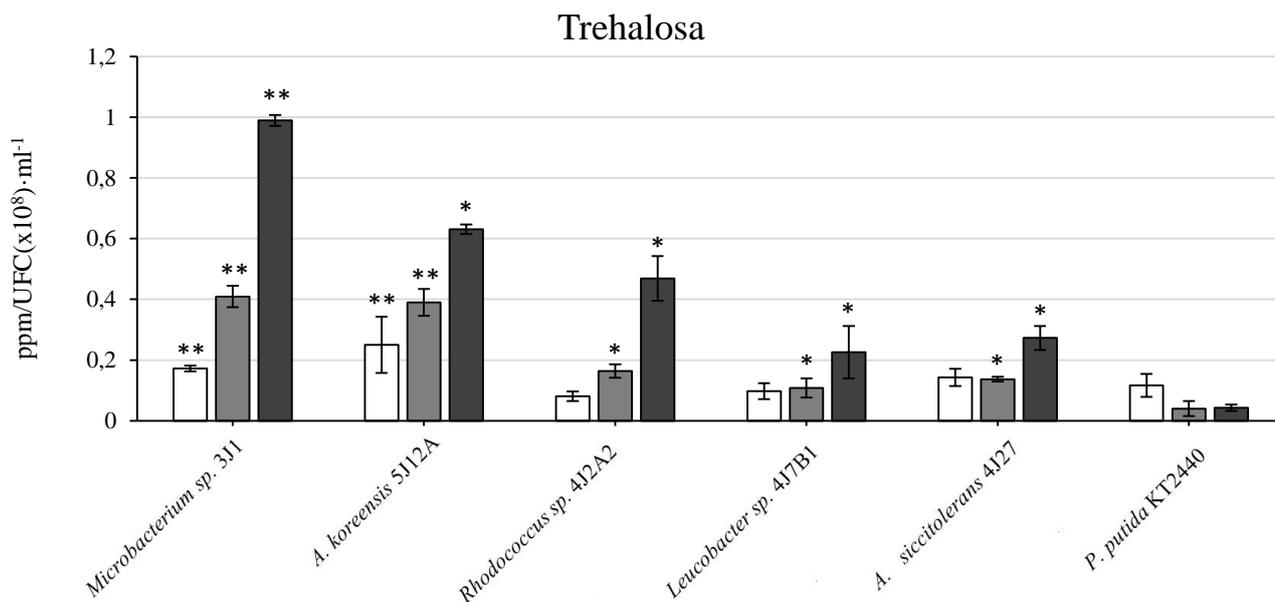


Figura 38. Producción de trehalosa por las cepas xerotolerantes. En ordenadas se muestran cantidad de trehalosa producida en ppm ($\mu\text{g/ml}$) respecto a las UFC ($\times 10^8$)/ml de cultivo de las cepas bacterianas. En abscisas se indican las cepas incluidas junto con el control negativo *P. putida* KT2440 en este ensayo. Las barras blancas corresponden a los cultivos sin PEG; las barras gris claro, a los cultivos con PEG 5%; y las barras gris oscura, a los cultivos con PEG 50%. Se indica para cada concidión ensayada la diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

4.1.2. Actividad superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT)

Las condiciones de sequía hacen que se incremente la concentración de radicales libres y especies reactivas del oxígeno. Dichos compuestos afectan a estructuras celulares, orgánulos e incluso al ADN con lo que resultan especialmente dañinos. Para evitar que estas especies se acumulen existen mecanismos como la producción de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) (Cruz de Carvalho, 2008). Para analizar si los microorganismos en estudio producían estas enzimas, se analizó la reducción de ferricitocromo añadido a un cultivo en TSB en fase exponencial como medida indirecta de la actividad de la SOD. Para estimar la reducción de citocromo C se recurrió al cambio de absorbancia inducida por el ferricianuro en el sobrenadante filtrado de dicho cultivo. Por su parte, la producción de CAT se determinó mediante la formación de H_2O_2 total que se calculó utilizando el colorante fluorescente Amplex® Rojo, el cual es un sustrato incoloro que reacciona con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con una estequiometría 1:1 para producir resorufina altamente fluorescente y fácilmente detectable (Beers & Sizer, 1952). Para ello se utilizaron los sobrenadantes de

cultivos de las distintas cepas en estudio cultivadas en medio mínimo M9 una vez alcanzaron la fase exponencial. Tanto los valores de absorbancia como los de fluorescencia, obtenidos en dichos ensayos, se extrapolaron en una curva patrón para calcular la concentración de la enzima. La curva patrón se realizó a partir de preparados de concentración conocidos tal y como se indica en el apartado 6.2 de *Materiales y Métodos*. Como controles se emplearon las cepas *P. putida* KT2440, *B. cepacia* CC-A174 y *Escherichia coli* MC4100 dado que presentan diferentes niveles de expresión para dichos enzimas.

Tanto la cepa *P. putida* KT2440 como la cepa *E. coli* MC4100 produjeron aproximadamente 1.300 U_{SOD}/ml de cultivo analizado, mientras que la cepa *B. cepacia* CC-A174 produjo en torno a 500 U_{SOD}/ml. Los valores máximos detectados de SOD para la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 fueron más de 3.300 U_{SOD}/ml, más de 2,5 veces superiores a los mostrados por las cepas *P. putida* KT2440 y *E. coli* MC4100, (más de 1.200 U_{SOD}/ml) y casi 7 veces superiores a los mostrados por la cepa *B. cepacia* CC-A174 (450 U_{SOD}/ml). Por su parte, la cepa *Arthrobacter sp.* 5J12A mostró valores superiores a 2.300 U_{SOD}/ml, un 43% superiores a los mostrados por las cepas *P. putida* KT2440 y *E. coli* MC4100, llegando a ser más de 4,5 veces superiores a los mostrados por *B. cepacia* CC-A174. Por último, las cepas *Rhodococcus sp.* 4J2A2, *Leucobacter sp.* 4J7B1 y *Arthrobacter sp.* 4J27 mostraron valores entre 300-600 U_{SOD}/ml, no observándose diferencia significativa por tanto en la actividad SOD respecto a la de la cepa *B. cepacia* CC-A174, tal y como se observa en la figura 39.

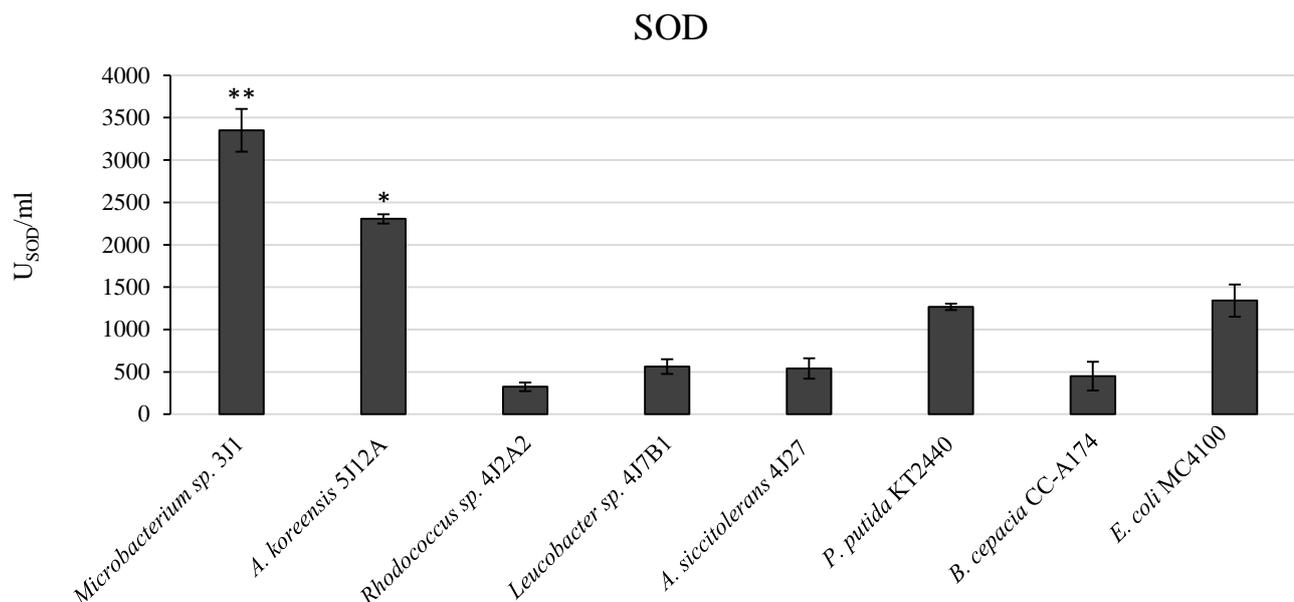


Figura 39. Actividad superóxido dismutasa por las cepas xerotolerantes. En ordenadas se muestran la actividad de SOD en U_{SOD}/ml de cada cepa bacteriana. En abscisas se indican las cepas incluidas junto con los controles *P. putida* KT2440, *B. cepacia* CC-A174 y *E. coli* MC4100 en este ensayo. Se indica diferencia significativa con las cepas control mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

En cuanto a la producción del enzima catalasa los controles mostraron distintos niveles de producción, siendo *B. cepacia* CC-A174 la cepa que mayor producción mostró (casi 2 U_{CAT}/ml). Tanto *P. putida* KT2440 como *E. coli* MC4100 produjeron menos de la mitad que *B. cepacia* CC-A174 (84 y 42 U_{CAT}/ml, respectivamente). Por su parte, la cepa *Arthrobacter* sp. 5J12A fue la que más CAT produjo (más de 4,5 U_{CAT}/ml), algo más del doble que la cepa *B. cepacia* CC-A174 y más de 5 veces que las cepas *P. putida* KT2440 y *E. coli* MC4100. *Microbacterium* sp. 3J1 produjo algo menos del doble de CAT (3,55 U_{CAT}/ml) que la cepa *B. cepacia* CC-A174 y más de 4 veces más que las cepas *P. putida* KT2440 y *E. coli* MC4100. Las cepas *Rhodococcus* sp. 4J2A2, *Leucobacter* sp. 4J7B1 y *Arthrobacter* sp. 4J27 (1,5-1,65 U_{CAT}/ml) no mostraron diferencia significativa con respecto a las cepas control *B. cepacia* CC-A174 y *P. putida* KT2440, siendo su producción de CAT de casi 3,5 veces superior a la mostrada por *E. coli* MC4100 como observarse con mayor detalle en la figura 40.

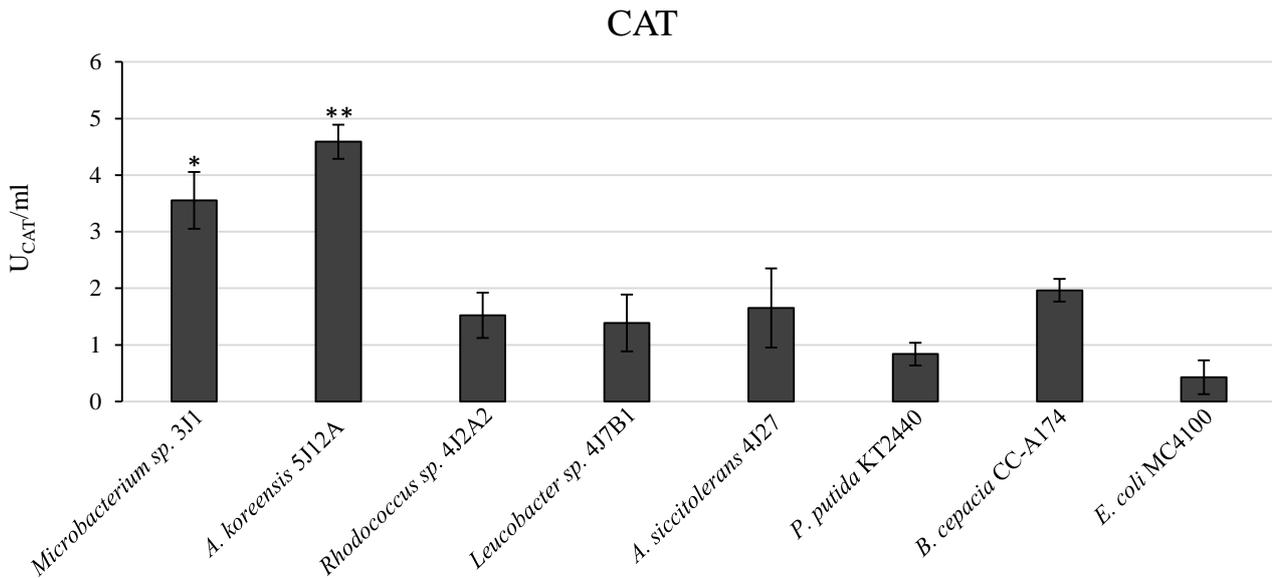


Figura 40. Actividad catalasa en las cepas xerotolerantes. En ordenadas se muestran la actividad CAT en U_{CAT}/ml de cada cepa bacteriana. En abscisas se indican las cepas incluidas junto con los controles *P. putida* KT2440, *B. cepacia* CC-A174 y *E. coli* MC4100 en este ensayo. Se indica diferencia significativa con las cepas control mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

4.2. Fitohormonas

Las fitohormonas son compuestos capaces de influir sobre el crecimiento, desarrollo y eficiencia en el uso del agua de las plantas. La concentración de una fitohormona y su proporción con respecto a otras, condiciona la respuesta específica por parte de la planta que le permitirá mejorar su respuesta fisiológica. Muchas cepas bacterianas son capaces de producir fitohormonas, actuando como reguladores externos de la concentración de fitohormonas (Yang *et al.*, 2009).

4.2.1. Auxinas/ácido indolacético (IAA)

Uno de los factores mejor estudiados en la promoción del crecimiento por las cepas microbianas es la producción de auxinas y moléculas tipo ácido indol-3-acético (IAA) por parte de la bacteria. Su efecto en muchas ocasiones ha sido descrito conjunto al consumo de ácido aminociclopropil carboxílico (ACC) como uno de los mecanismos más importantes en la protección de plantas frente a la sequía (Lecube *et al.*, 2014). Con objeto de conocer si las cepas xerotolerantes producían tal molécula, llevamos cabo un ensayo basado en la detección-cuantificación colorimétrica de IAA a 530 nm en sobrenadantes de cultivo de las cepas en estudio en medio específico. De este modo, se inocularon matraces de medio mínimo M9 (suplementado con 500 µg/ml de triptófano) con cultivos saturados de *P. putida* KT2440, *Microbacterium sp.* 3J1, *A. koreensis* 5J12A, *Rhodococcus sp.* 4J2A2, *A. siccitolerans* 4J27 y *Leucobacter sp.* 4J7B1. Pasadas 24 horas en agitación a 30°C, se centrifugaron los cultivos y se utilizaron para extraer el IAA. Se empleó una recta patrón entre valores de absorbancia y concentración de IAA para determinar la concentración (entre 5 y 200 µg/ml) de las muestras estudiadas, tal y como se describe en el apartado 6.3 de *Materiales y Métodos*.

La cepa control *P. putida* KT2440 produjo 18 µg/ml de IAA. Algunas de las cepas en estudio llegaron a concentraciones de IAA similares. En el caso de las cepas *Microbacterium sp.* 3J1 y *A. koreensis* 5J12A, ambas produjeron incluso más cantidad, llegando a observarse una concentración de 26,8 µg/ml y 33,5 µg/ml, suponiendo un incremento de hasta un tercio y casi el doble de la producción de *P. putida* KT2440 respectivamente. La cepa *Rhodococcus sp.* 4J2A2 produjo una concentración semejante a la observada en el caso de la cepa control. Por su parte, las cepas *Leucobacter sp.* 4J7B1 y *A. siccitolerans* 4J27 produjeron 12 µg/ml y 9,5 µg/ml respectivamente (figura 41).

Por otra parte, gracias al análisis del genoma de las distintas cepas xerotolerantes, se identificaron marcos de lectura abiertos (ORF) con homología para los genes codificante para las enzimas involucradas en la producción de IAA.

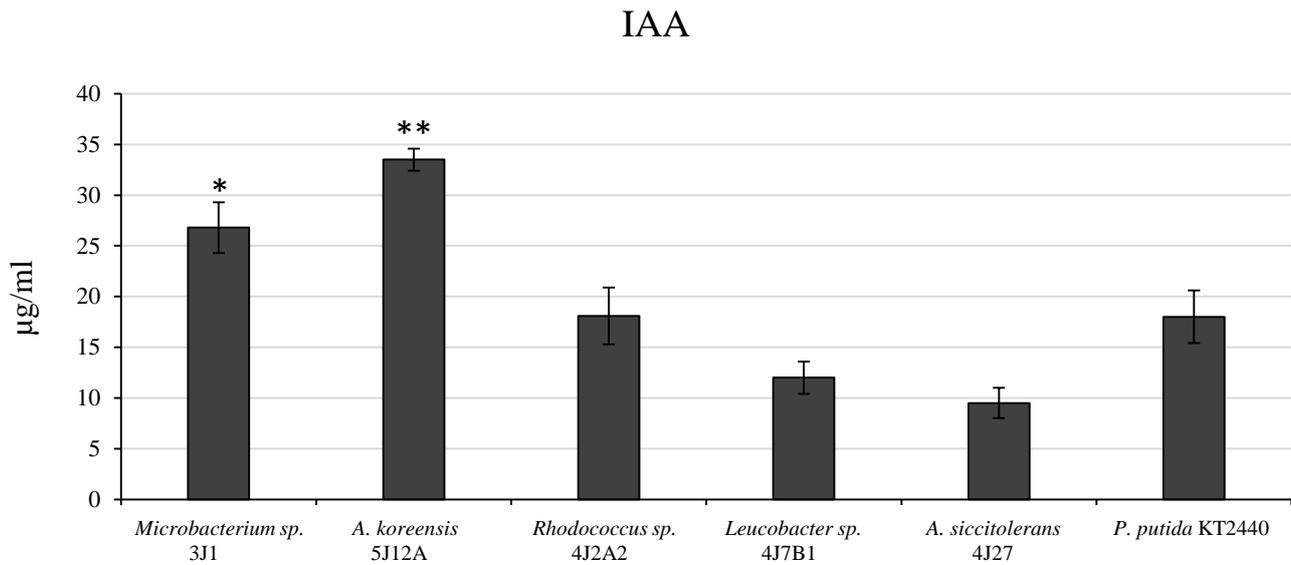


Figura 41. Producción de ácido indolacético-auxinas por las cepas xerotolerantes. En ordenadas se muestran cantidad de IAA producida en µg/ml por las cepas bacterianas. En abscisas se indican las cepas incluidas junto con el control positivo *P. putida* KT2440 en este ensayo. Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

4.2.2. Ácido giberélico (GA₃) y ácido abscísico (ABA)

Otras fitohormonas implicadas en la respuesta a estrés abiótico son el ácido giberélico (GA₃), implicado en la mejora de la arquitectura foliar y radicular de las plantas, y el ácido abscísico (ABA), que regula la apertura y cierre de los estomas, como describen Unyayar y col. y Karadeniz y col. (Unyayar *et al.*, 1996, Karadeniz *et al.*, 2006). Ambas fitohormonas se han descrito en la promoción del crecimiento y en la mejora del uso eficiente del agua por plantas en periodos de estrés hídrico. Con objeto de conocer si las cepas *Microbacterium sp.* 3J1, *A. koreensis* 5J12A, *Rhodococcus sp.* 4J2A2, *Leucobacter sp.* 4J7B1 y *A. siccitolerans* 4J27 producían dichas moléculas, se cultivaron dichas cepas en medio TSB durante 24 h a 30°C. Dichos cultivos se centrifugaron y filtraron, obteniendo un sobrenadante al que se realizó una extracción con solventes orgánicos (etilacetato). A cada muestra se realizó un análisis cromatográfico para cuantificar la concentración tanto de GA₃ como de ABA, empleando estándares internos de concentración conocida, tal y como se describe en el apartado 6.4 de *Materiales y Métodos*. Se empleó la cepa *P. putida* KT2440 como control positivo de producción de GA₃ y ABA, siguiendo las descripciones de Planchamp y col. en 2014 y Kang y col. en 2014 (Kang *et al.*, 2014, Planchamp *et al.*, 2014).

En cuanto a las moléculas de la familia de las giberelinas (GA_3), la cepa control *P. putida* KT2440 produjo 10,2 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 produjo incluso más cantidad (16,3 $\mu\text{g/ml}$), suponiendo un incremento de más del 70% sobre la producción de *P. putida* KT2440. Algunas de las cepas en estudio llegaron a producir niveles semejantes, como en el caso de *A. koreensis* 5J12A (9,5 $\mu\text{g/ml}$). Por su parte, las cepas *Rhodococcus sp.* 4J2A2, *Leucobacter sp.* 4J7B1 y *A. siccitolerans* 4J27 produjeron 7,4 $\mu\text{g/ml}$, 2,2 $\mu\text{g/ml}$ y 2,5 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, lo que supuso una producción de ABA entre un 30 y un 75% menor que las de *P. putida* KT2440, respectivamente (figura 42).

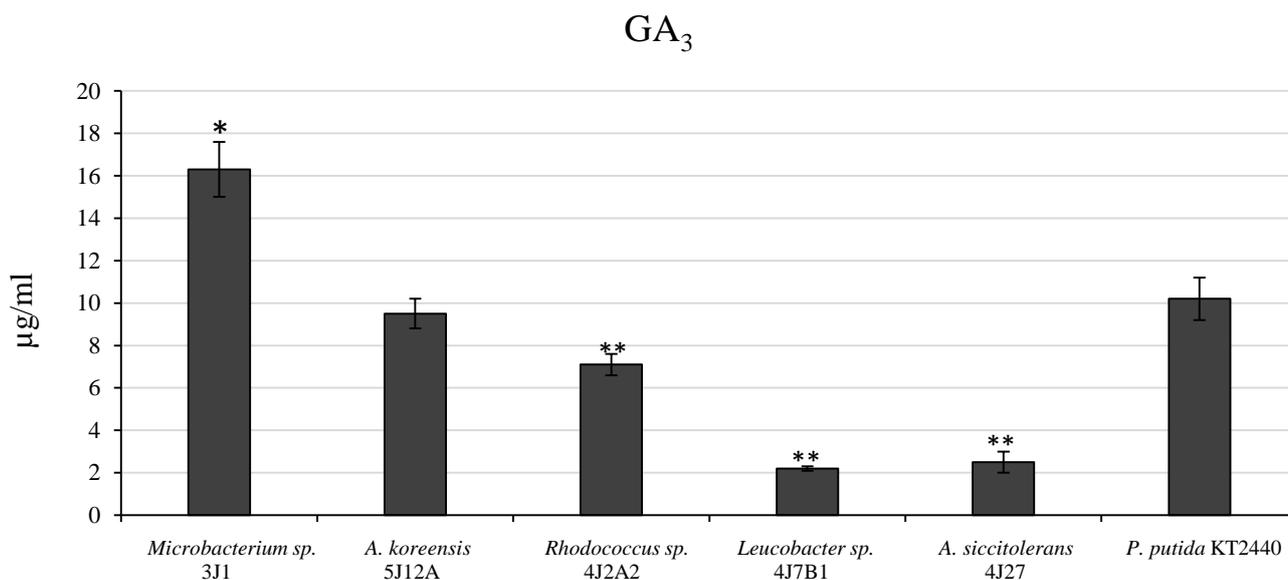


Figura 42. Producción de ácido giberélico-giberelinas de los cultivos bacterianos. En ordenadas se muestran cantidad de GA_3 producida en $\mu\text{g/ml}$ por las cepas bacterianas. En abscisas se indican las cepas incluidas junto con el control positivo *P. putida* KT2440 en este ensayo. Se indican las diferencias significativas con el control negativo mediante un asterisco (*) cuando se superaron sus resultados y con dos (**) cuando fueron inferiores.

Para el caso del ácido abscísico (ABA), la cepa control *P. putida* KT2440 produjo 1 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 produjo incluso mayor concentración, (1,64 $\mu\text{g/ml}$), suponiendo un incremento de más del 60% sobre la producción de *P. putida* KT2440. Por su parte, las cepas *A. koreensis* 5J12A y *Rhodococcus sp.* 4J2A2 produjeron 1,12 $\mu\text{g/ml}$ y 0,89 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, sin suponer diferencia significativa con la producción de GA_3 observada en el caso de *P. putida* KT2440. Por último, las cepas *Leucobacter sp.* 4J7B1 y *A. siccitolerans* 4J27, produjeron un total de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ y 0,52 $\mu\text{g/ml}$ de GA_3 , respectivamente, lo que supuso un 50 y un 75% menos que el producido por *P. putida* KT2440 (figura 43).

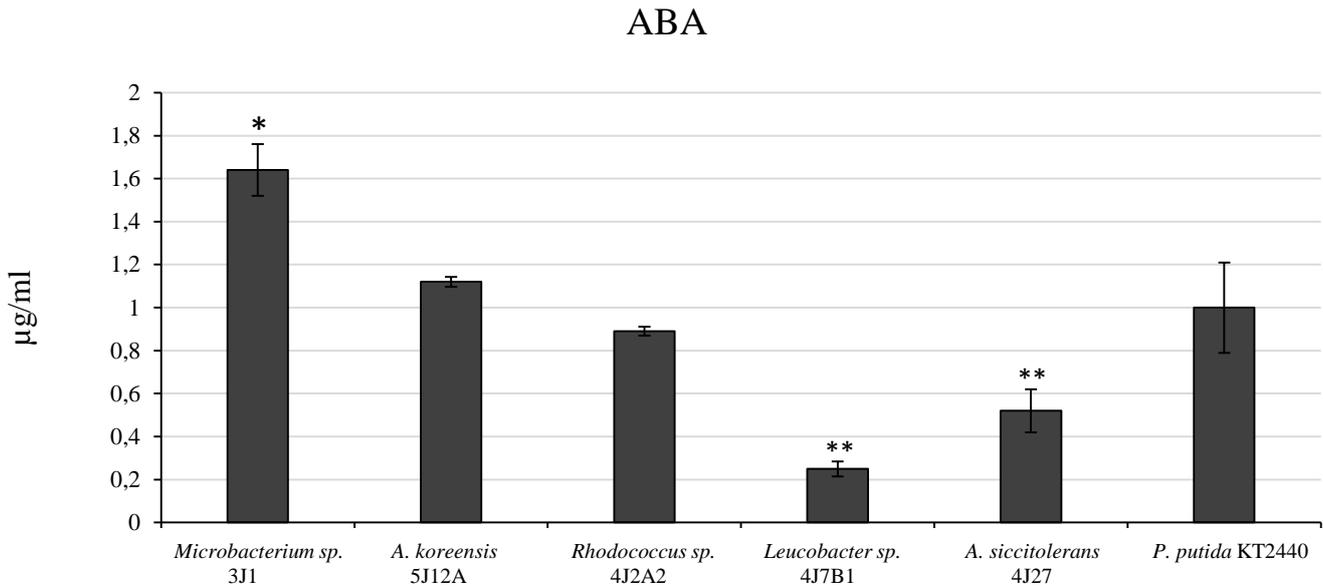


Figura 43. Producción de ácido abscísico por las cepas xerotolerantes. En ordenadas se muestran cantidad de ABA producida en µg/ml por las cepas bacterianas. En abscisas se indican los nombres de cepas en ensayo. Se indican las diferencias significativas con el control negativo mediante un asterisco (*) cuando se superaron sus resultados y con dos (**) cuando fueron inferiores.

4.2.3. Producción de ácido salicílico (SA)

El ácido salicílico (SA) es otra de las fitohormonas involucradas en la protección de plantas contra la sequía (Schmelz *et al.*, 2003). Para determinar la producción de SA por parte de los microorganismos en estudio, se emplearon cultivos en medio mínimo M9 con ácidos casamínicos en los cuales se cultivaron las cepas *Microbacterium sp.* 3J1, *A. koreensis* 5J12A, *Rhodococcus sp.* 4J2A2, *Leucobacter sp.* 4J7B1 y *A. siccitolerans* 4J27 durante 48 h a 30°C. El cultivo en fase exponencial se centrifugó, filtró y finalmente se realizó una extracción del SA del sobrenadante con etilacetato, tal y como se indica en el apartado 6.5 de *Materiales y Métodos*. A cada muestra se añadió 1M FeCl₃ que forma complejo con el SA y permite llevar a cabo una detección colorimétrica por espectrofotometría a 527 nm. Se empleó una recta patrón entre valores de absorbancia y concentración de SA (entre 5 y 200 µg/ml) para determinar la concentración de las muestras estudiadas tal y como se describe en el apartado 6.5 de *Materiales y Métodos*. Se empleó la cepa *P. putida* KT2440 como control positivo de producción de SA (Patten & Glick, 2002).

La producción de ácido salicílico (SA) por la cepa control *P. putida* KT2440 alcanzó los 58,9 µg/ml. En el caso de la cepa *Microbacterium sp.* 3J1, se observó incluso mayor concentración, llegando a 95,6 µg/ml, suponiendo un incremento de más del 60% sobre la producción de *P. putida* KT2440. Por su parte, las cepas *A. koreensis* 5J12A, *Rhodococcus sp.* 4J2A2, *Leucobacter sp.* 4J7B1 y *A. siccitolerans* 4J27 produjeron una concentración inferior, siendo de 25,4 µg/ml, 55,6 µg/ml, 28,9 µg/ml y 24,4 µg/ml respectivamente. Estos resultados fueron significativamente inferiores a los producidos por *P. putida* KT2440, tal y como se observa en la figura 44.

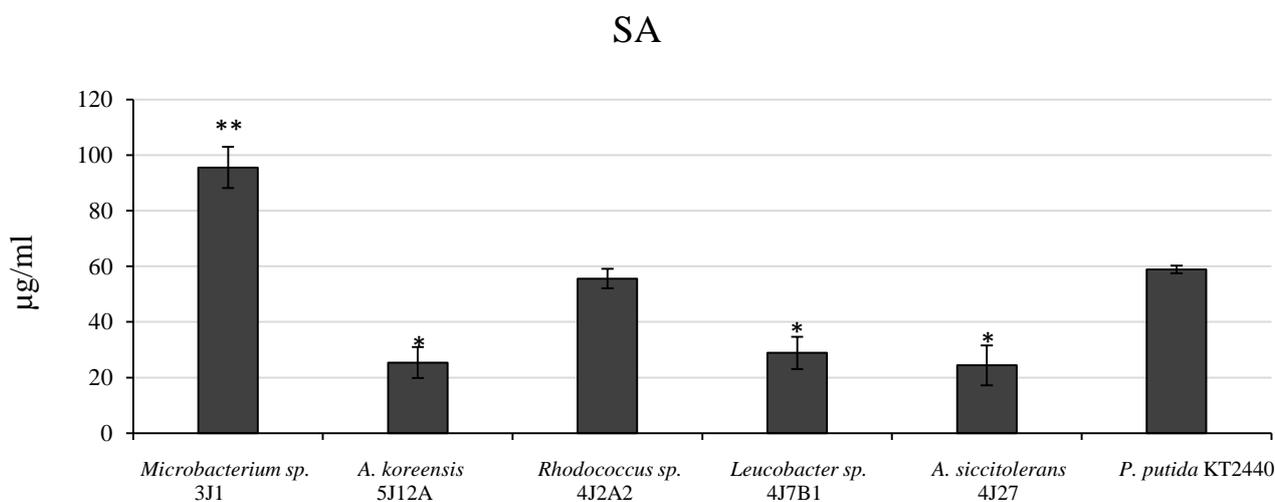


Figura 44. Producción de ácido salicílico por las cepas xerotolerantes. En ordenadas se muestran cantidad de SA producida en µg/ml por las cepas bacterianas. En abscisas se indican las cepas incluidas junto con el control positivo *P. putida* KT2440 en este ensayo. Se indican las diferencias significativas con el control negativo mediante dos asteriscos (**) cuando se superaron sus resultados y con uno (*) cuando fueron inferiores.

4.2.4. Producción de etileno y sus precursores

El etileno es una de las fitohormonas con un mayor efecto sobre metabolismo de la planta. Sin embargo, produce serias limitaciones en el crecimiento de la planta y puede llegar a ser perjudicial en casos de estrés abiótico como en el caso de la sequía (Wilkinson & Davies, 2010). Con objeto de estudiar si las cepas xerotolerantes alteraban la producción de etileno en las plantas, se midió la concentración de etileno, producido por plantas inoculadas y sometidas a estrés hídrico, mediante cromatografía de gases, empleando estándares de etileno de concentración conocida (apartado 6.6 de *Materiales y Métodos*).

4.2.4.1. Emisión de etileno por plantas inoculadas

Para realizar la determinación de etileno por plantas se llevaron a cabo cultivos de las cepas en estudio en medio TSB hasta una absorbancia aproximada de 1 (600 nm) para emplearlos como inoculantes. Posteriormente, se llevó a cabo la inoculación con cada cepa y sobre plantas de dos semanas de vida, se mantuvieron bajo condiciones de sequía durante tres semanas para evitar analizar las plantas en proceso de marchitez, tal y como se explica en el apartado 6.6 de *Materiales y Métodos*. Tras este periodo de incubación, se extrajeron las plantas del sustrato, se limpiaron de los restos del mismo y se colocaron en viales de vidrio 10 ml de volumen sellados para evitar pérdida de los gases que producían las plantas. Tras una incubación de una hora, se analizó la concentración del etileno en el vial por cromatografía empleando una curva patrón de concentraciones conocidas (1-5 ng/ml) para estimar la concentración. Como control positivo de producción de etileno se emplearon plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, ya que dicha cepa es sensible a la desecación y ya habíamos comprobado que no era capaz de proteger plantas contra la sequía.

La concentración de etileno generada por las plantas inoculadas con la cepa control *P. putida* KT2440 alcanzó 1,97 ng/ml al final de ensayo. Mientras que las plantas no inoculadas produjeron de 2,03 ng/ml, no siendo estos valores estadísticamente diferentes. Las plantas inoculadas con la cepa *Microbacterium sp.* 3J1, produjeron la menor cantidad etileno (1,36 ng/ml), lo que supone una reducción significativa de algo más de un 30% respecto a las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. Por su parte, las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A produjeron 1,66 ng/ml, suponiendo una reducción significativa de algo menos del 20% respecto a los controles del ensayo. Se observó un efecto similar en las plantas inoculadas con *Rhodococcus sp.* 4J2A2 que produjeron 1,58 ng/ml. Por último, las plantas inoculadas con las cepas *Leucobacter sp.* 4J7B1 y *A. siccitolerans* 4J27 produjeron 1,75 ng/ml y 1,8 ng/ml respectivamente, lo que supone una reducción significativa de en torno a un 10% respecto a los controles, tal y como se observa en la figura 45.

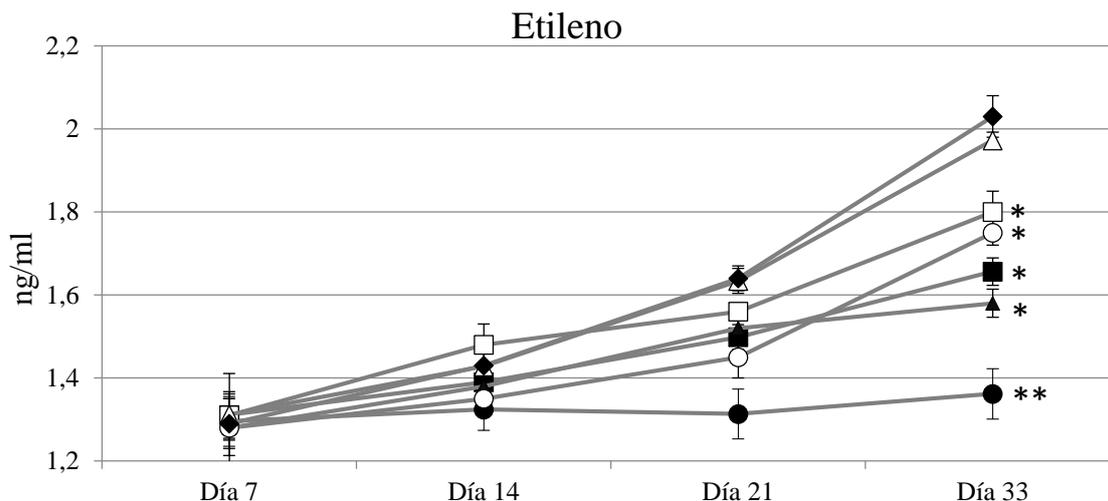


Figura 45. Producción de etileno por plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes y sometidas a sequía. En ordenadas se muestran los valores de etileno detectado por cromatografía en ng/ml. En abscisas se indican los tiempos de muestreo. Los puntos con círculo negro se corresponden con plantas inoculadas con *Microbacterium* sp. 3J1; los puntos con cuadrado negro, con *A. koreensis* 5J12A; los puntos, con inoculadas con *Rhodococcus* sp. 4J2A2; los puntos con círculo blanco, con *Leucobacter* sp. 4J7B1; los puntos con cuadrado blanco, con *A. siccitolerans* 4J27; los puntos con triángulo blanco, con *P. putida* KT2440; y, por último, los puntos con rombo negro, con plantas no inoculadas. Se indica diferencia significativa con el control negativo mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

4.2.4.2. Actividad ACC-desaminasa

Una de las moléculas precursoras más habituales en la producción de etileno es el ácido ciclopropano carboxílico (ACC). Dicha molécula puede ser degradada gracias a la actividad del enzima ACC-desaminasa, presente en muchas bacterias de la rizosfera, lo que se traduce en una reducción de etileno y por lo tanto en una mejora en la resistencia de la planta a la sequía (Saleem *et al.*, 2007). Para identificar y cuantificar la capacidad de producir ACC-desaminasa por parte de las cepas microbianas se decidió realizar un ensayo de actividad enzimática ACC-desaminasa (ACCd) mediante detección colorimétrica de α -cetobutirato, producto del catabolismo de la molécula de ACC, obtenido de cultivos centrifugados y filtrados de las cepas en estudio cultivadas durante 24h a 30°C. Se empleó una curva patrón con distintas concentraciones de α -cetobutirato (entre 0,01 y 20 $\mu\text{mol/ml}$) para determinar su concentración en las muestras estudiadas, tal y como se describe en el apartado 6.7 de *Materiales y Métodos*. Se empleó la cepa *P. putida* KT2440 como control positivo al determinar Duan *et al.* 2013 que esta especie era capaz de producir el enzima en estudio.

La cepa control *P. putida* KT2440 llegó a producir 0,082 $\mu\text{g/ml}$ de α -cetobutirato en este ensayo. *Microbacterium sp.* 3J1 fue la cepa con mayor capacidad de consumo de la molécula de ACC como fuente de nitrógeno, llegando a producir casi el doble de α -cetobutirato que la cepa control *P. putida* KT2440. En el caso de la cepa *A. koreensis* 5J12A, su producción superó en un 15% a las de la cepa control *P. putida* KT2440. La cepa *Rhodococcus sp.* 4J2A2 produjo un 25% menos que la cepa control *P. putida* KT2440, mientras que las cepas *Leucobacter sp.* 4J7B1 y *A. siccitolerans* 4J27, mostraron niveles aún menores, siendo de menos de una cuarta parte de la producción del control (figura 46).

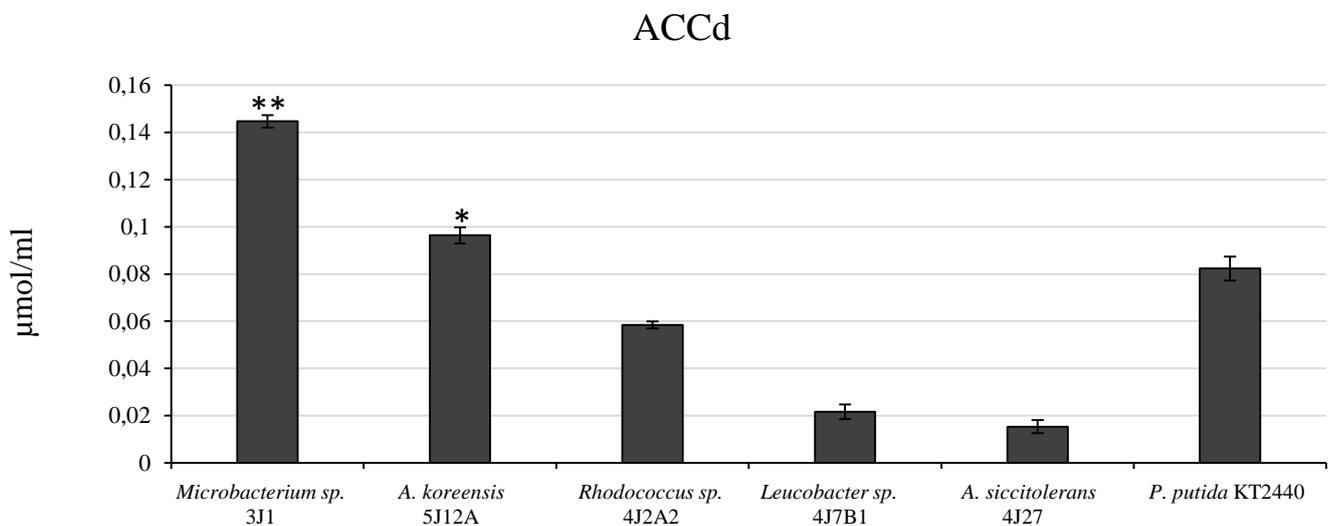


Figura 46. Producción de α -cetobutirato en cultivos con cepas xerotolerantes. En ordenadas se muestra la producción en $\mu\text{mol/ml}$ de α -cetobutirato como producto del metabolismo de ACC. En abscisas se indican las cepas empleadas en el ensayo. Se indican las diferencias significativas con el control negativo *P. putida* KT2440 mediante un asterisco (*), mientras que si además existe diferencia significativa sobre el resto de cepas se emplea un doble asterisco (**).

4.3. Análisis de correlación

Tras llevar a cabo estas determinaciones, se procedió a estudiar su significación estadística así como a analizar el grado de correlación entre las mismas. Así, los resultados tras aplicar el estadístico de análisis de la correlación ANCOVA, mostraron una correlación entre los parámetros de crecimiento de las plantas, (peso seco, peso fresco, peso totalmente túrgido, contenido relativo de agua, longitud de la raíz y longitud del tallo) y la concentración de trehalosa producida por las células microbianas.

Este análisis indicó que la producción de trehalosa se correlaciona fuertemente con los parámetros fisiológicos registrados en las plantas inoculadas en condiciones de sequía, obteniendo coeficientes de determinación (R^2) cercanos a 1. Así, la alta concentración de trehalosa producida por *Microbacterium* sp. 3J1 se tradujo en valores altos de longitud del tallo y raíz, de peso fresco, seco y totalmente túrgido, así como del contenido relativo de agua. Por otra parte, la baja producción de trehalosa por la cepa *P. putida* KT2440 (sensible a desecación) estuvo correlacionada con valores similares en los puntos más bajos de la recta de correlación, lo que indican que los valores de los parámetros fisiológicos citados dependen de la producción de trehalosa. Igualmente, se detectó correlación positiva entre la producción de trehalosa y la de otras fitohormonas y moléculas involucradas en la protección contra el estrés oxidativo, típicos en la defensa frente a la desecación (figura 47).

Análisis de Correlación

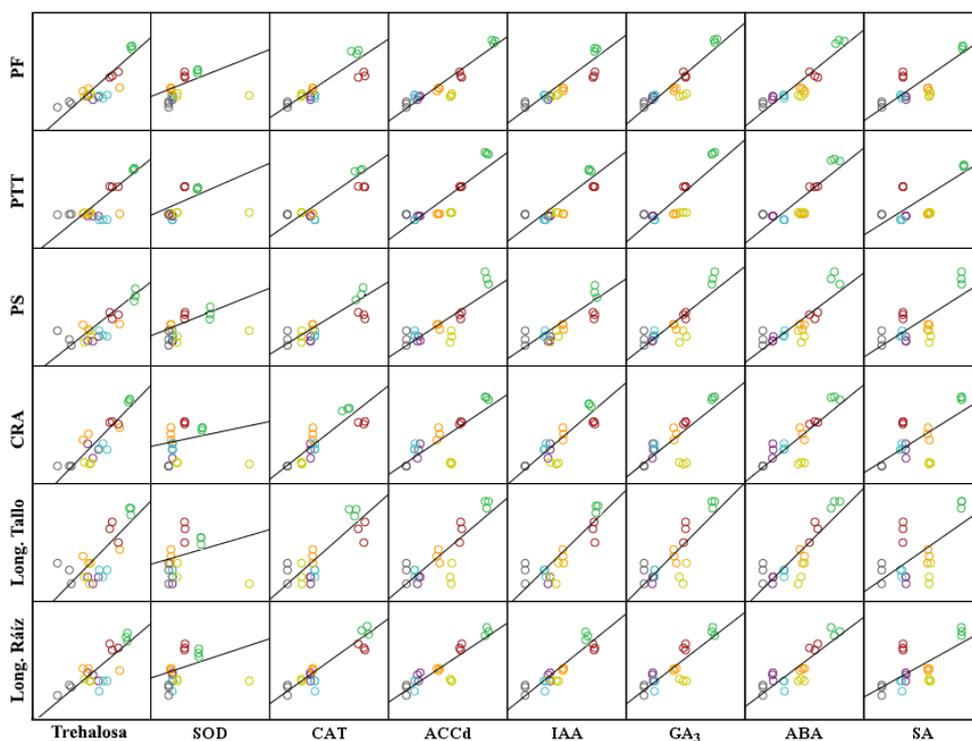


Figura 47. Análisis de correlación estadística. ANCOVA realizado para las correlaciones entre la producción de la trehalosa, la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), el CAC-deaminasa (ACCd), ácido indolacético (IAA), el ácido abscísico (ABA) y ácido giberélico (GA3) de cada cepa, y los valores para el peso seco de la planta (PS), peso fresco (PF), totalmente peso turgente (PTT), contenido relativo de agua (CRA), longitud de la raíz y del tallo. Los círculos verdes corresponden a *Microbacterium* sp. 3J1; los círculos rojos, a *A. koreensis* 5J12A; los círculos naranja, a *Rhodococcus* sp. 4J2A2; los círculos violeta, a *Leucobacter* sp. 4J7B1; los círculos azules, a *A. siccitolerans* 4J27; los círculos amarillos, a *P. putida* KT2440 y los círculos grises, a muestras no inoculadas.

CAPÍTULO II

El objetivo de este capítulo fue estudiar los mecanismos moleculares por los que se alcanza una elevada protección y promoción del crecimiento de plantas, una vez caracterizado el efecto de un mecanismo molecular como es la concentración de trehalosa producida por el microorganismo en el proceso de protección de la planta contra la sequía. Dado que la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 presentó los mayores niveles de protección de los cuatro tipos de plantas contra la falta de agua, por limitaciones experimentales, nos centramos en el análisis en detalle de la interacción molecular de esta cepa con las plantas de pimiento. De entre las cuatro especies vegetales estudiadas en el capítulo anterior, seleccionamos la planta de pimiento como modelo tanto por contar con amplia difusión en la literatura científica en proteómica y metabolómica, como por contar con su genoma completamente secuenciado y accesible.

Para caracterizar las rutas que se inducen o reprimen, ante sequía, se llevaron a cabo ensayos basados en geles bidimensionales (SDS-PAGE 2D) y en cromatografía de gases masas (GC-MS) para estudiar los cambios en el proteoma y en el metaboloma de plantas de pimiento, en condiciones de sequía cuando el microorganismo *Microbacterium sp.* 3J1 está presente. Dichas plantas se inocularon y se sometieron a sequía tal y como se describe en el capítulo anterior para comparar el perfil de proteínas y metabolitos que cambian en la planta ante condiciones de sequía en presencia del microorganismo. Para analizar si el cambio en la expresión de proteínas y metabolitos en la planta ante la sequía en presencia del microorganismo se debe a una exportación de moléculas por parte de la bacteria, se analizó también la expresión de proteínas y metabolitos ante condiciones de sequía en la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 a nivel proteómico y metabolómico. Para ello, se utilizaron cultivos adicionados de polietilén glicol (PEG) al 5% y al 50% para simular condiciones de escasez de agua propias de un suelo no encharcado y de una sequía intensa, respectivamente. Dado que, por su novedad, la base de datos de la cepa *Microbacterim sp.* 3J1 no se utiliza con frecuencia, se emplearon resultados de homologías con taxones superiores para identificar determinados compuestos.

1. Proteómica de la interacción planta-microorganismo

Para analizar las diferencias en el perfil de proteínas expresado durante procesos de sequía en plantas inoculadas como no inoculadas, se realizaron electroforesis en geles bidimensionales de la fracción soluble de homogenados de raíz tanto inoculada como no inoculada. Por otra parte, se estudió perfil de proteínas de la fracción soluble de homogenados de la bacteria *Microbacterium sp.* 3J1 en condiciones de sequía. Para simular los procesos de sequía utilizamos PEG 50% dada su capacidad de retirar agua del medio. Dado que el hábitat natural de este microorganismo y de la planta es el suelo, en el que el nivel de hidratación dista mucho de ser del 100%, se utilizó como referencia una concentración de PEG del 5% (p/v) para condiciones normales o de ausencia de sequía.

1.1. Proteómica en raíces de pimiento (*Capsicum annuum*)

Dado que la parte de la planta expuesta al microorganismo es la raíz, decidimos estudiar el efecto de la falta de agua en esta parte de la planta tanto en presencia como en ausencia de *Microbacterium sp.* 3J1. Los cambios en el perfil de proteínas resultante del cambio de condiciones hídricas y de la presencia del microorganismo pueden ser detectados mediante un estudio comparativo de las proteínas expresadas de forma diferencial en geles bidimensionales o 2D. Este análisis se llevó a cabo por triplicado de forma independiente para raíces de plantas de pimiento tanto inoculadas como no inoculadas sometidas a sequía durante un periodo de 14 días en ausencia total de riego. Las proteínas solubles se extrajeron y separaron usando geles en función de su punto isoeléctrico (primera dimensión), y posteriormente, en función de su masa (segunda dimensión), tal y como se indica en el apartado 6 de *Materiales y Métodos*. Tras la electroforesis en la segunda dimensión, los geles se tiñeron y se observó la disposición de las manchas aparecidas en cada gel como producto de la tinción, atendiendo a las diferencias en intensidades, con más de 700 manchas correspondientes a las proteínas de la fracción soluble que denominamos como *spots*. Estos geles presentaron un perfil de proteínas similar en las tres réplicas, coincidiendo la observación inicial de las réplicas con los análisis de selección automáticos llevados a cabo por el paquete informático.

Para analizar los resultados, se utilizó el asistente de detección automática '*Spot Detection Parameter Wizard*' del paquete informático PDQuest[®], ajustado a un modelo de detección gaussiano y definiendo previamente la intensidad mínima de *spot*, así como los rangos de tamaño de los mismos. Este modelo de detección permitió establecer un gel maestro formado a partir de los *spots* identificados tanto en los geles de raíces de plantas de pimiento inoculadas, como en los de las raíces no inoculadas. Posteriormente se descartaron artefactos e interferencias (por ejemplo, cristalizaciones o fallos del detector), y se establecieron los márgenes de intensidad de lectura mínima de *spots* y de intensidad máxima del ruido de fondo. De este modo, se identificaron un total de 769 *spots* diferenciales entre ambas condiciones como proteínas potenciales.

De estos 769 *spots*, se seleccionaron 66 por algoritmo booleano dentro del paquete informático PDQuest[®], atendiendo a un doble criterio. por una parte se seleccionaron los *spots* que se expresaban únicamente en una de las condiciones (a los que llamamos cualitativos), y por otra parte se seleccionaron los *spots* cuya intensidad en una de las dos condiciones fue dos o más veces más intensa en una condición con respecto a la otra condición (a los que llamamos cuantitativos). Tras esta primera selección, a los *spots* cuantitativos se les aplicó el estadístico t-student para valorar la significancia de las intensidades de cada *spot*. Para facilitar el estudio, se llevó a cabo una representación de consenso de los geles de las condiciones que estamos comparando de todos los *spots* seleccionados (cuantitativos y cualitativos) bajo la condición en la que estos se sobreexpresaban (raíces inoculadas frente a raíces no inoculadas). La disposición final de los *spots* seleccionados, así como la intensidad de los mismos pueden observarse en la figura 48A y 48B.

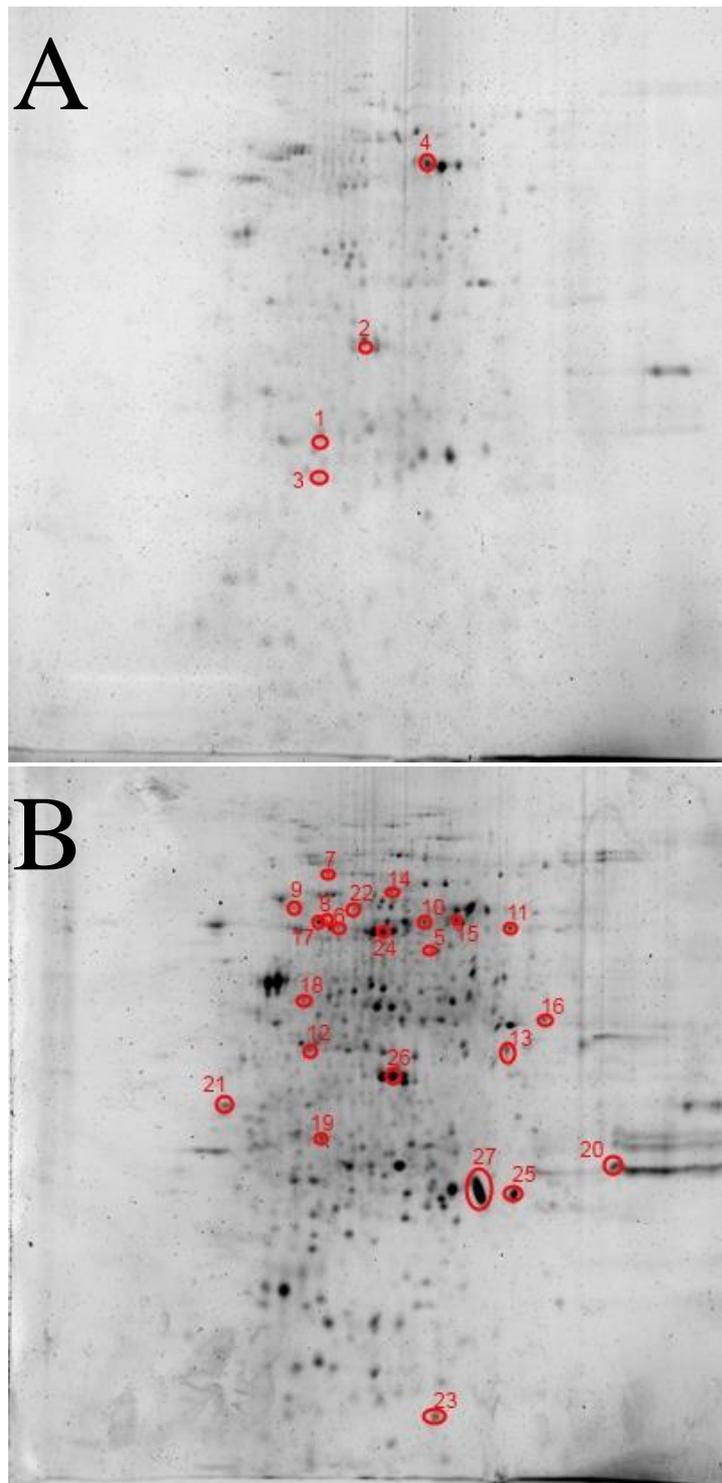


Figura 48. Proteomas promedio en geles 2D SDS-PAGE. Se muestra el promedio de tres geles obtenidos para las muestras de raíz de pimiento inoculada con *Microbacterium* sp. 3J1 (A) y de otros tres para las muestras de raíz no inoculada (B) bajo condiciones de sequía. En rojo se marcan los spots tanto cualitativos como cuantitativos correspondientes a las proteínas seleccionadas acompañadas del número identificativo asignado automáticamente en el análisis bioinformático.

Así, se seleccionaron finalmente 3 *spots* cualitativos y 5 cuantitativos procedentes de las muestras de raíces inoculadas. Por su parte, se seleccionaron 27 *spots* cualitativos y 31 cuantitativos para las raíces no inoculadas. Inicialmente se identificaron por número de péptidos emparejados por PMF o método de la huella peptídica, tal y como se indica en la sección 7.2.5 de *Materiales y Métodos*. La identificación final de los mismos se llevó a cabo mediante MALDI TOF/TOF, siendo sólo posible la identificación de un único *spot* cualitativo y 3 cuantitativos para las muestras de raíces inoculadas, y 10 *spots* cualitativos y 13 cuantitativos, para las muestras de raíces no inoculadas. En total se identificaron 27 *spots* con fiabilidad (superaron el valor de calificación (*score*) de las bases de datos consultadas y un valor $p < 0.05$) para el conjunto de condiciones ensayadas. La selección y tratamiento de estos *spots* se representa en la figura 49.

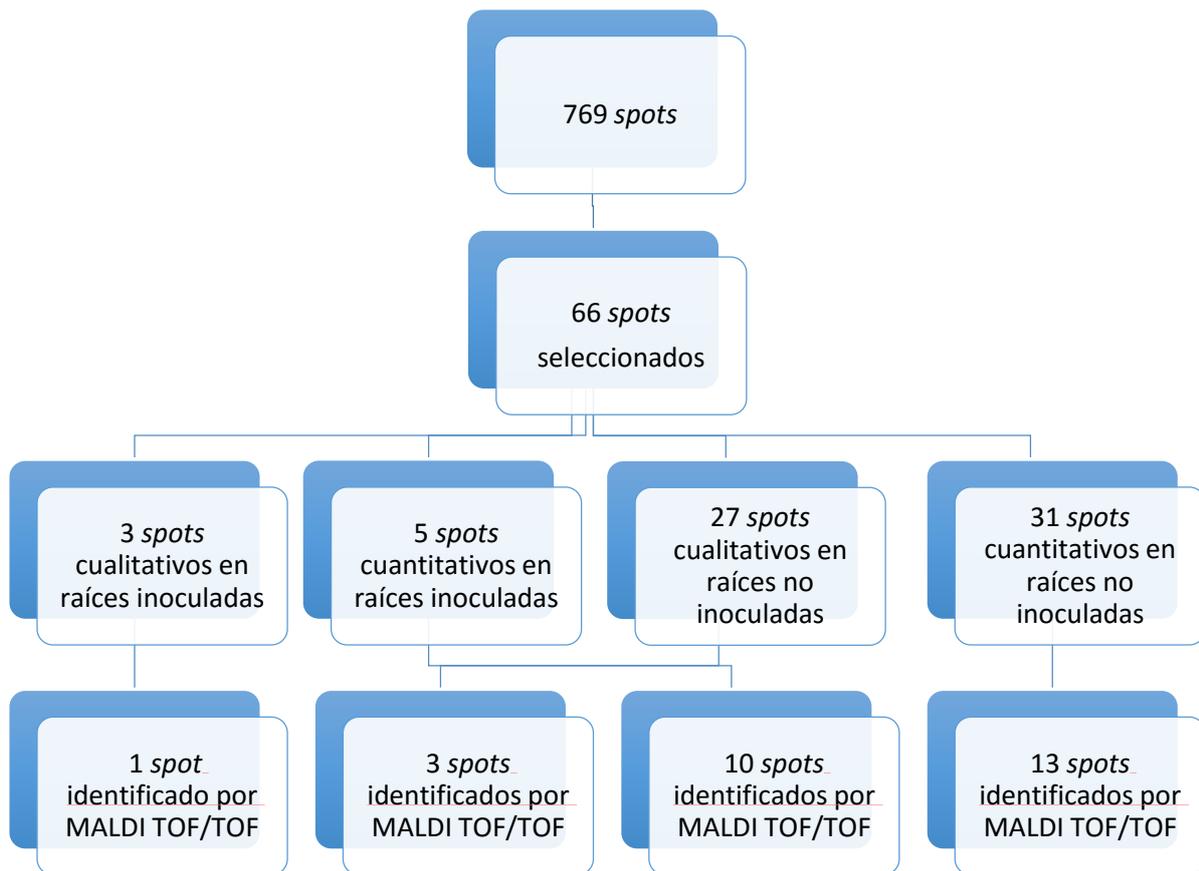


Figura 49. Selección e identificación de los *spots* sobre geles 2D. Se muestra el proceso de cribado y selección de *spots* hasta la clasificación booleana en cualitativos y cuantitativos para cada condición, así como el número final de los mismos que pudo ser identificado por MALDI TOF/TOF tanto en raíces inoculadas como no inoculadas sometidas a sequía.

Todos estos *spots* finalmente identificados mostraron un valor de calificación o *score* respecto a las bases de datos SwissProt y NCBI-Proteins por encima del mínimo establecido para garantizar una identificación comparativa positiva (indicados en la tabla 3). Por otra parte, se empleó el índice Decoy, que se basa en la búsqueda de patrones de péptidos aleatorios dentro de una base de datos de péptidos reversa o de secuencias enredadas (base de datos artificial generada invirtiendo el sentido de secuencias peptídicas de bases de datos reales), para evitar falsos positivos en el proceso de identificación. A menos que haya una secuencia palíndromo, esta base de datos inversa no debe devolver ningún péptido identificado, evitando así falsos positivos, lo que nos da el número de falsos accesos dividido por el número de accesos positivos (NFA o FDR, *False Discovery Rate*, por sus siglas en inglés), expresado en porcentaje. Su valor al comparar los *spots* identificados siempre fue 0. Las proteínas finalmente identificadas, junto con los resultados de los mecanismos de identificación descritos, se muestran en la tabla 3.

En respuesta a la sequía, en el proteoma de raíces de plantas no inoculadas, se identificó un grupo de proteínas que aparecían con mayor intensidad respecto al proteoma de las muestras de plantas con *Microbacterium sp.* 3J1. Dichas proteínas se ven relacionadas con rutas de respuesta rápida ante estrés abiótico, es decir, aquella respuesta obligada e inespecífica que la planta lleva a cabo para sobrevivir al evento estresante. De este modo, 8 *spots* (aproximadamente el 17%) se identificaron como proteínas relacionadas con una función de regulación osmótica como el caso de la succinil-CoA ligasa y de la fosfoglicerato mutasa. Por otra parte, también se identificaron 4 proteínas (10% del total identificado) involucradas en la biosíntesis de fitohormonas. el elemento de factor de unión sensible al etileno, la S-Adenosil homocisteína hidrolasa, la anexina (reducción de peróxido de hidrógeno), y la cafeoil-CoA 3-O-metiltransferasa (síntesis de flavonoides). Algunas de ellas como la S-Adenosil homocisteína hidrolasa, la anexina y el elemento de factor de unión sensible al etileno, se encuentran directamente relacionados con la respuesta a estrés abiótico al ser enzimas que forman parte de la ruta del etileno. También se identificó una mayor intensidad en proteínas relacionadas con la señalización de procesos de estrés abiótico, como la 7-Gamma aminobutírico transaminasa (cataliza la producción de GABA), llegando a suponer cerca del 10% del total identificado. Además se identificaron 20 proteínas sobreexpresadas con funciones antioxidantes o relacionadas con procesos de eliminación de agentes oxidantes llegando a suponer casi el 56% de las

identificadas en este ensayo. Sin embargo, se detectó sólo una proteína involucrada en rutas dedicadas a la protección de estructuras (orgánulos y estructuras citosólicas).

En el caso de proteínas sobreexpresadas en raíces de plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1, se identificaron 4 proteínas cuya concentración aumentó significativamente, y que estaban relacionadas únicamente con funciones de regulación osmótica (polifenol oxidasa, precursor cloroplástico de la polifenol oxidasa) y antioxidante (ATP-sintasa, V-ATPasa). En este caso, se identificó un menor número de proteínas que en el caso del proteoma de raíces no inoculadas (6 veces menos). De estas, dos enzimas pertenecían a la ruta de hidroxilación de monofenoles (polifenol oxidasa y su precursora), relacionada tanto con función osmótica como con función antioxidante. Se observó también la desaparición de *spots* correspondientes a enzimas tales como la 7-Gamma aminobutírico transaminasa, la disulfuro-isomerasa, la serina hidroximetil transferasa, la succinil-CoA ligasa, la fructosa bifosfato aldolasa, etc., muchas de ellas relacionadas con la señalización de estrés o con respuestas funcionales tempranas poco específicas. Por otra parte, disminuyó notablemente la intensidad de *spots* de gran intensidad que se identificaron en las muestras de raíces no inoculadas, como ocurrió con la deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, varios tipos de ATP sintasa, la S-Adenosil homocisteína hidrolasa, la glutation S-transferasas e incluso la anexina, descritas en otras plantas como participantes en rutas de respuesta a condiciones de estrés hídrico.

Tabla 3. Proteoma identificado de las raíces no inoculadas e inoculadas bajo condiciones de sequía. Se muestran las proteínas identificadas por condición junto con su condición de cualitativa o cuantitativa, función predicha, valores constitutivos teóricos y estimados, metodología de identificación y medidas de calidad de la misma.

POS ^A	Proteína	ID ^B	Función	T PM/PI ^C	E PM/PI ^D	TIPO	Análisis PDQuest		MALDI TOF-TOF			PMF			C ⁿ	
							p-valor ^e	Mapas ^f	Calif. ^g	% Cov. ^h	Nº Pep ⁱ	Calif. ^j	% Cov. ^k	Nº pep ^l		D ^m
1	ATP-sintasa	gi413947582	R	55,4/6,2	35/6,2	Ql	-	3/3	105/44	2,90	1/5			0	I	
2	Polifenol oxidasa	gi1146424	R, O	66,8/6,6	67/6,5	Qt	0,0022	3/3	46/44	2,50	1/5			0	I	
3	V-ATPasa	gi147791359	R	73/5,2	35/6,3	Ql	-	3/3	163/45	2,30	2/5			0	I	
4	Precursor de polifenol oxidasa (cloroplástico)	gi251851953	R, O	67,6/7,2	67/7,1	Qt	0,0239	3/3	123/45	4,20	2/5			0	I	
5	7-Gamma aminobutírico transaminasa 3 (cloroplástico)	gi470136321	X, R, O	55,6/6,9	55/7	Ql	-	3/3	80/44	2,80	2/5			0	NI	
6	ATP Sintasa, subunidad beta mitocondrial	gi114421	R	59,8/5,9	60/6	Ql	-	3/3	148/44	5,0	2/5	128/75	35	14/47	0	NI
7	ATPasa tipo IV protón-catalítica, subunidad alfa Bomba de protones vacuolar	gi147791359	R	73/5,2	73/5,9	Ql	-	3/3	228/43	6,7	3/5			0	NI	
8	ATP sintasa, subunidad beta mitocondrial	gi114421	R	59,9/5,9	60/5,9	Ql	-	3/3	182/45	9,8	4/5	134/75	31	16/44	0	NI
9	Disulfuro-isomerasa	gi565396585	X, R	55,6/4,9	55/5,9	Ql	-	3/3	57/44	2,6	1/5			0	NI	
10	ATPasa alfa Subunidad F1 mitocondrial	gi57013987	R	55,2/5,8	60/6,7	Ql	-	3/3	274/44	12,2	5/5	223/75	45	21/48	0	NI
11	Serina hidroximetil transferasa 4	gi11762130	R, O, X	51,8/7,1	58/7,6	Ql	-	3/3	85/45	3,4	1/5			0	NI	
12	Succinil-CoA ligasa, Subunidad beta	gi146215968	O, R	45,3/6,4	55/6,5	Ql	-	3/3	115/43	3,3	2/5			0	NI	
13	Fructosa bifosfato aldolasa 3 (cloroplástico)	gi460386382	R, O	43/8,9	45/7,7	Ql	-	3/3	45/43	6,8	2/5			0	NI	
14	Fosfoglicerato mutasa (2,3 Bifosfoglicerato independiente)	gi565402329	O	61,2/5,4	62/6,5	Qt	0,00017	3/3	71/45	2,1	1/5			0	NI	
15	Deshidrogenasa	gi10178084	R	61,7/6,3	59/7,2	Qt	0,0054	3/3	44/44	2,2	1/4			0	NI	
16	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	gi18072801	R	34,5/6,2	50/7,9	Qt	0,0017	3/3	22/11	4,7	1/4			0	NI	
17	ATP sintasa Subunidad beta (mitocondrial)	gi114421	R	59,8/5,9	59/5,9	Qt	0,026	3/3	293/45	10,4	5/5	171/75	40	24/71	0	NI
18	NAD-Malato deshidrogenasa	gi5123836	R, O	43,3/8,0	45/6,3	Qt	0,048	3/3	170/44	4,4	1/5			0	NI	
19	Cafeoil -CoA 3-O- metiltransferasa	gi193290676	P, R	27,8/7,5	38/6	Qt	0,001	3/3	46/11	4,0	1/4			0	NI	
20	Quitinasa	gi237662969	E, R	27,7/7,5	36/8,5	Qt	0,0003	3/3	74/43	5,1	1/5			0	NI	
21	Elemento de factor de unión sensible al Etileno	gi40353323	P	21,7/6,2	43/5,3	Qt	0,02	3/3	10/9	2,1	1/5			0	NI	
22	ATPasa alfa Subunidad F1	gi3273590	R	45,1/8,5	61/6,5	Qt	0,003	3/3	71/43	7,4	2/5			0	NI	
23	Nucleósido difosfato quinasa	gi12230332	R	16,3/6,4	16/6,9	Qt	0,05	3/3	28/10	10,8	1/5			0	NI	
24	S-Adenosil homocisteína hidrolasa	gi407930077	P	53,1/5,6	56/6,4	Qt	0,024	3/3	82/11	7,6	3/5	54/43	17	7/36	0	NI
25	Glutation S-transferasa	gi18150415	R	23,4/5,6	35/7,8	Qt	0,0158	3/3	46/45	3,8	1/2			0	NI	
26	Anexina	gi1071660	R, P	35,8/5,7	48/6,5	Qt	-	3/3	378/12	20	4/5	238/43	56	22/68	0	NI
27	Glutation S-transferasa GST1	gi61889381	R	23,8/6,4	35/7,3	Qt	-	3/3	88/44	14	3/5	97/75	44	10/40	0	NI

^a Posición del *spot* en el mapa representativo del gel 2D; ^b Número de acceso para la proteína en la base de datos SWISSPROT; ^c Peso molecular teórico (kDa) / *Spot* isoelectrónico teórico; ^d Peso molecular experimental estimado (kDa) / *Spot* isoelectrónico estimado en el mapa del gel 2D; ^e p valor del análisis de PDQuest de acuerdo con el moledlo estadístico ANOVA para los *spots* cuantitativos; los *spots* cualitativos se indican como 'Ql'; los *spots* cuantitativos se indican como 'Qt'; ^f número de mapas proteómicos (geles) en los que aparece el *spot* de un total de 3 geles; ^g calificación de proteínas identificadas por MALDI TOF/TOF sobre la calificación mínima significativa; ^h porcentaje de cobertura sobre la secuencia de amino ácidos para las proteínas identificadas; ⁱ número de péptidos emparejados por espectrometría de masas-masas; ^j calificación de proteínas identificadas por PMF sobre la calificación mínima significativa; ^k porcentaje de cobertura sobre la secuencia de amino ácidos para las proteínas identificadas; ^l número de péptidos emparejados por PMF; ^m índice de calidad Decoy (número de repeticiones en base de datos inversa-aleatoria); ⁿ Condición bajo la cual se obtuvo el *spot*. I (plantas inoculadas), NI (plantas no inoculadas); Código de función relacionado con la formación de estructuras, E; moléculas señal, X; molécula anti-Ros o antioxidante, R; Fitohormona/Control sobre el ciclo del etileno, P; u osmoprotector/osmorregulador/osmolito, O.

1.2. Proteómica de *Microbacterium sp.* 3J1 en sequía (PEG)

Tras identificar determinadas proteínas cuya expresión se vio alterada en las muestras de raíces por la presencia del inoculante bacteriano, se trató de identificar las proteínas de la cepa microbiana cuya expresión cambiaba en condiciones de sequía. Así, para identificar el perfil de proteínas expresado por el microorganismo (*Microbacterium sp.* 3J1) en condiciones de sequía, se procedió a realizar un análisis proteómico añadiendo a un cultivo puro en medio líquido polietilenglicol 6000 (PEG) al 50% (p/v), y comparándolo con una concentración de referencia de PEG al 5% (p/v). La adición de este compuesto secuestra moléculas de agua generando una condición de menor disponibilidad de la misma de manera proporcional a la concentración de PEG. Dicho efecto disminuye el potencial hídrico del medio simulando condiciones de sequía para el cultivo. Teniendo en cuenta que en los suelos naturales comúnmente no se alcanza una hidratación completa, las condiciones de cultivo del microorganismo fueron llevadas a cabo con adición de PEG 5% (p/v), para simular un suelo en condiciones normales, y de PEG 50% (p/v), para simular un estrés por sequía severo.

De forma análoga a la descrita en la sección anterior, se separaron las proteínas mediante geles 2D SDS-PAGE. Una vez separadas, se obtuvieron representaciones espaciales de geles promedio al comparar tres geles resultantes de la separación de muestras independientes incubadas en las mismas condiciones. Por último, se generó un gel como resultado de comparar ambas condiciones. En dicho gel se identificaron 237 *spots*, se seleccionaron 43 por algoritmo booleano dentro del paquete informático PDQuest®, atendiendo a un doble criterio. por una parte se seleccionaron los *spots* que se expresaban únicamente en una de las condiciones (a los que llamamos cualitativos), y por otra parte se seleccionaron los *spots* cuya intensidad en una de las dos condiciones fue dos o más veces más intensa en una condición con respecto a la otra condición (a los que llamamos cuantitativos). Tras esta primera selección, a los *spots* cuantitativos se les aplicó el estadístico t-student para valorar la significancia de las intensidades de cada *spot*. Para facilitar el estudio, se llevó a cabo una representación de consenso de los geles de las condiciones que estamos comparando de todos los *spots* seleccionados (cuantitativos y cualitativos) bajo la condición en la que estos se sobreexpresaban (raíces inoculadas frente a raíces no inoculadas). La disposición final de los *spots* seleccionados, así como la intensidad de los mismos pueden observarse en la figura 50A y 50B.

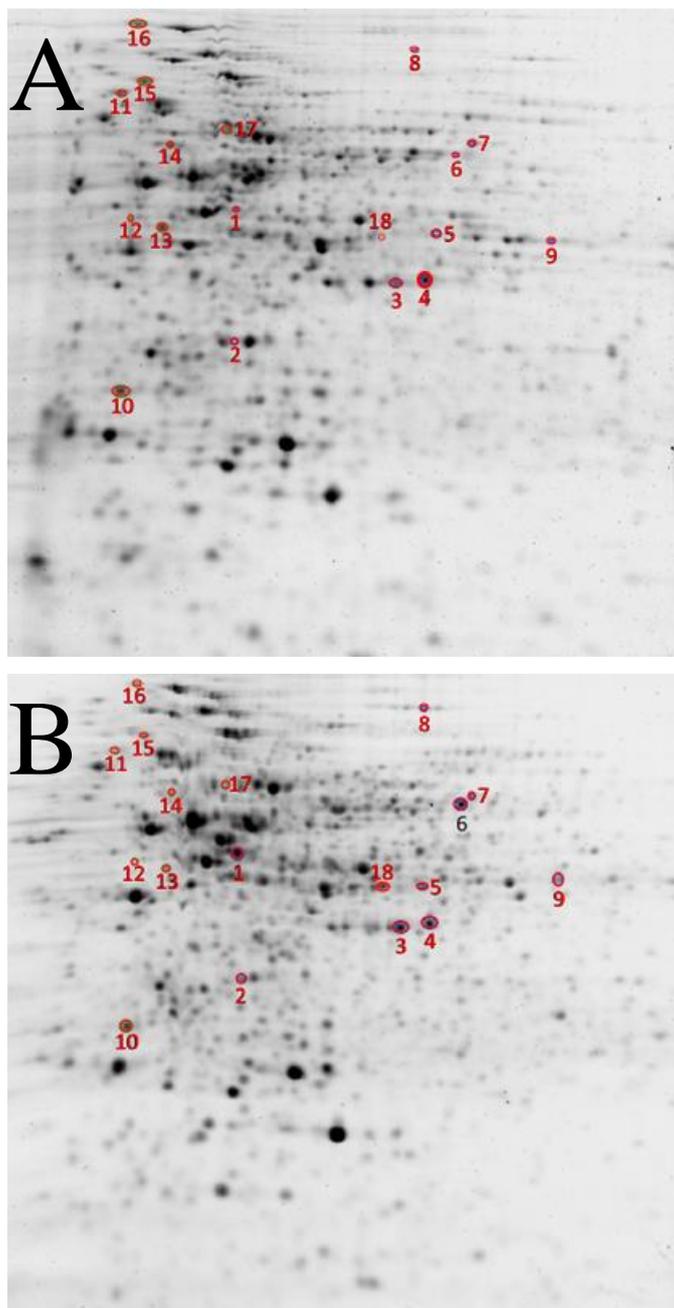


Figura 50. Proteomas promedio en geles 2D SDS-PAGE. Se muestra el promedio de tres geles obtenidos para las muestras de cultivo de *Microbacterium* sp, 3J1 con PEG 50% (A) y para las muestras de cultivo de *Microbacterium* sp, 3J1 con PEG 5% (B). En rojo se marcan los spots tanto cualitativos como cuantitativos correspondientes a las proteínas seleccionadas acompañadas del número identificativo asignado automáticamente en el análisis bioinformático.

Así, se seleccionaron finalmente 21 *spots* cuantitativos procedentes de los cultivos de *Microbacterium* sp. 3J1 con PEG 50%. Por su parte, se seleccionaron 3 *spots* cualitativos y 19 *spots* cuantitativos procedentes de los cultivos de *Microbacterium* sp. 3J1 con PEG 5%. Inicialmente se identificaron por número de péptidos emparejados por PMF o método

de la huella peptídica, tal y como se indica en la sección 7.2.5 de *Materiales y Métodos*. La identificación final de los mismos se llevó a cabo mediante MALDI TOF/TOF, obteniéndose buenos índices de identificación para 5 *spots* cuantitativos para las muestras procedentes de los cultivos de *Microbacterium sp.* 3J1 con PEG 50%, así como 1 *spots* cualitativos y 9 cuantitativos, para las muestras procedentes de los cultivos de *Microbacterium sp.* 3J1 con PEG 5%. En total se identificaron 15 *spots* con fiabilidad (superaron el valor de calificación (*score*) de las bases de datos consultadas y un valor $p < 0.05$) para el conjunto de condiciones ensayadas. La selección y tratamiento de estos *spots* se representa en la figura 51.

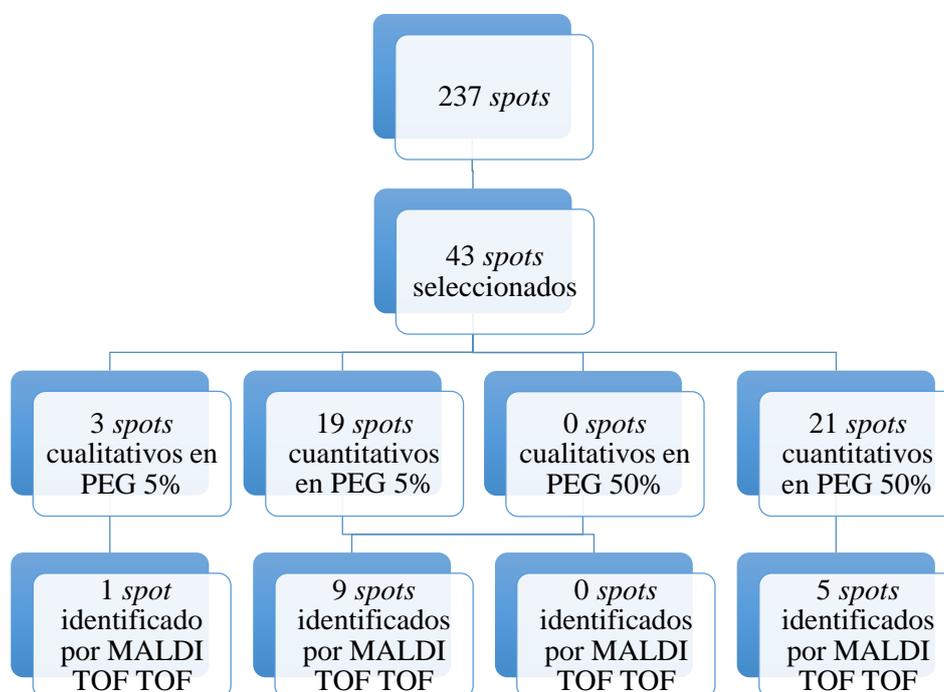


Figura 51. Selección e identificación de los *spots* sobre geles 2D. Se muestra el proceso de cribado y selección de *spots* hasta la clasificación booleana en cualitativos y cuantitativos para cada condición, así como el número final de los mismos que pudo ser identificado por MALDI TOF/TOF en cultivos de *Microbacterium sp.* 3J1 tanto con PEG 5% como con PEG 50%.

Comenzando con el caso de los cultivos de *Microbacterium sp.* 3J1 con PEG 5% se llegaron a identificar 9 proteínas teñidas con mayor intensidad. De ellas, 8 estaban asociadas a reguladores osmóticos y proteínas con funciones antioxidantes, como fue el caso de la glutamato sintasa (involucrada en la biosíntesis de glutamato) y de la isocitrato deshidrogenasa (que participa en la biosíntesis de oxoglutarato) o en el de la acil-CoA

deshidrogenasa (cuya función es la oxidación de ácidos grasos en mitocondrias) y la L-lactato deshidrogenasa (involucrada en la fermentación del ácido láctico en procesos oxidativos), respectivamente. Algunas de esas proteínas identificadas se asociaron también a proteínas involucradas en señalización de procesos de estrés abiótico (como el factor de elongación Tu, que forma parte del mecanismo que sintetiza nuevas proteínas por traducción en el ribosoma), de protección de estructuras (como la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP, implicada en el ciclo de Krebs para catalizar la formación de oxoglutarato, y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, implicada en las reacciones de la glucólisis) y a fitohormonas, como la cetoácido reductoisomerasa (involucrada en las rutas de síntesis de aminoácidos) o la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (participante en el control del metabolismo y sistemas de señalización de ABA). Al menos la mitad de las proteínas identificadas se caracterizaron por presentar varias funciones y por responder a más de un tipo de estrés (tabla 4).

En el cultivo de *Microbacterium sp.* 3J1 con PEG 50% se identificaron 5 *spots* (algo más de la mitad de las identificadas en el caso anterior), correspondientes a 5 proteínas con mayor intensidad. Dichas proteínas se tiñeron intensamente en condiciones severas de estrés mientras que los niveles de las mismas fueron nulos o muy bajos cuando las condiciones fueron menos severas (PEG 5%). De ellas, 2 se identificaron como asociadas a la regulación osmótica (aconitato hidratasa y alanil-ARNt sintasa) y 3 se asociaron a funciones antioxidantes (chaperona DnaK, triosafosfato isomerasa y 1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa). Además, algunas se asociaron con proteínas con funciones de protección estructural o de señalización ante estrés abiótico, como son la aconitato hidratasa (involucrada en el ciclo del ácido cítrico, a partir del cual se producen muchos osmorreguladores), y la 1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (cataliza la síntesis de L-glutamato, importante regulador osmótico) y la alanil-ARNt (implicada en las rutas de síntesis de aminoácidos, especialmente de los involucrados en la osmoprotección), respectivamente. En este caso no se detectó ninguna proteína de tipo regulador vegetal o fitohormona. Proteínas como la isocitrato deshidrogenasa, la glutamato sintasa, la acil-CoA deshidrogenasa o la L-lactato deshidrogenasa, que se detectaron con altos niveles de intensidad cuando el cultivo contuvo PEG 5% se redujeron de manera notoria o incluso desaparecieron cuando el cultivo de *Microbacterium sp.* 3J1 se vio expuesto a PEG 50%.

Tabla 4. Proteoma identificado de los cultivos puros de *Microbacterium sp.* 3J1 con PEG 5% y PEG 50% como condiciones artificiales de sequía. Se muestran las proteínas identificadas por condición junto con su condición de cualitativa o cuantitativa, función predicha, valores constitutivos teóricos y estimados, metodología de identificación y medidas de calidad de la misma.

POS ^A	Proteína	ID ^B	Función	T PM/PI ^C	E PM/PI ^D	TIPO	Análisis PDQuest		MALDI TOF-TOF			PMF			C ⁿ	
							p-valor ^e	Mapas ^f	Calif. ^g	% Cov. ^h	Nºpep ⁱ	Calif. ^j	% Cov. ^k	Nºpep ^l		D ^m
1	L-aspartato Oxidoreductasa	gi 551257345	R, O	34.5/5.06	39.3/5.06	Qt	0.005	3/3	35/30	4.3	1/5				5% PEG	
5	Glutamato sintasa [NADPH]	gi 652424279	O	54.8/7.52	55.3/7.92	Qt	0.00016	3/3	53/39	2	1/5				5% PEG	
8	Factor de elongación Tu	EFTU_BACAA	X	42.9/4.77	49.5/4.77	Qt	0.00667	3/3	271/39	13.9	3/5				5% PEG	
11	ATP sintasa subunidad beta	ATPB_BACAA	R	51.2/4.94	55.6/4.94	Qt	0.00017	3/3	173/40	11.1	2/5				5% PEG	
12	Acil-CoA deshidrogenasa	gi 497462210	R	40.3/4.93	45.2/4.93	Qt	0.00808	3/3	37/36	2.9	1/4				5% PEG	
13	Isocitrato deshidrogenasa [NADP]	IDH_BACSU	O, E	46.4/5.02	51/5.05	Qt	0.00324	3/3	97/38	4.5	3/5				5% PEG	
14	L-lactato deshidrogenasa	LDH_BACME	R, O	35/5.58	40/5.58	Qt	0.00017	3/3	166/39	10.7	4/5				5% PEG	
15	Cetoácido reductoisomerasa	ILVC_BACSK	R, P, O	37.2/5.32	42/5.32	Qt	0.00667	3/3	121/38	5.6	1/4				5% PEG	
16	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 1	G3P1_BACCE	O, E	35.8/5.27	45.2/5.27	QI	-	3/3	130/40	7.2	2/5				5% PEG	
17	Aconitato hidratasa	gi 657019280	O, E	101.7/4.75	101.5/4.75	Qt	0,0002732	3/3	99/30	3.2	3/5				50% PEG	
19	Alanil-ARNt sintasa	gi 493548752	X, O	97.2/5.36	88.4/5.36	Qt	0.0007186	3/3				73/70	9.7	8	0	50% PEG
22	Chaperona DnaK	DNAK_BACME	R	65.2/4.69	68.3/4.69	Qt	7,8017E-05	3/3				70/70	9.8	4/5	0	50% PEG
29	Triosafosfato isomerasa	TPIS_BACMD	R	26.9/4.63	40.5/4.63	Qt	0.025564	3/3	65/39	6	1/5				50% PEG	
30	1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa	ROCA_GEOTN	X, R	56.5/5.54	62.8/5.54	Qt	0,0037244	3/3	50/40	2.25	2/5				50% PEG	

^a Posición del *spot* en el mapa representativo del gel 2D; ^b Número de acceso para la proteína en la base de datos SWISSPROT; ^c Peso molecular teórico (kDa) / punto isoelectrico teórico del *spot*; ^d Peso molecular experimental estimado (kDa) / punto isoelectrico estimado del *spot* en el mapa del gel 2D; ^e p valor del análisis de PDQuest de acuerdo con el modelo estadístico ANOVA para los *spots* cuantitativos; los *spots* cualitativos se indican como 'QI'; los *spots* cuantitativos se indican como 'Qt'; ^f número de mapas proteómicos (geles) en los que aparece el *spot* de un total de 3; ^g calificación de proteínas identificadas por MALDI TOF/TOF sobre la calificación mínima significativa; ^h porcentaje de cobertura sobre la secuencia de amino ácidos para las proteínas identificadas; ⁱ número de péptidos emparejados por espectrometría de masas-masas; ^j calificación de proteínas identificadas por PMF sobre la calificación mínima significativa; ^k porcentaje de cobertura sobre la secuencia de amino ácidos para las proteínas identificadas; ^l número de péptidos emparejados por PMF; ^m índice de calidad Decoy (número de repeticiones en base de datos inversa-aleatoria); ⁿ Condición bajo la cual se obtuvo el *spot*. I (plantas inoculadas), NI (plantas no inoculadas); Código de función relacionado con la formación de estructuras, E; moléculas señal, X; molécula anti-Ros o antioxidante, R; Fitohormona/Control sobre el ciclo del etileno, P; o osmoprotector/osmorregulador/osmolito, O.

2. Metabolómica de la interacción planta-microorganismo

Con objeto de identificar los metabolitos producidos tanto durante la interacción planta-microorganismo en condiciones de sequía, como del propio microorganismo *Microbacterium sp.* 3J1 de manera aislada expuesto a sequía inducida por PEG, se llevó a cabo un estudio metabolómico basado en una técnica de cromatografía por gases masas (GC-MS). Los resultados fueron identificados y cuantificados para, posteriormente, llevar a cabo un análisis comparativo entre las condiciones y entre las funciones asociadas a ellos.

2.1. Metabolómica de raíces de pimiento (*Capsicum annuum*) inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 en sequía

Para la identificación de compuestos metabólicos producidos durante la interacción entre la raíz de plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) y el microorganismo *Microbacterium sp.* 3J1 en condiciones de sequía, se empleó cromatografía de gases. Estos ensayos se llevaron a cabo por triplicado partiendo de tres raíces por condición. Para los mismos, se empleó un cromatógrafo de gases Thermo TraceGC (o Trace GC Ultra) y un espectrómetro de gases con trampa de iones PolarisQ (o ITQ900), equipado con un automuestreador AS2000. Los metabolitos se identificaron por comparación con la base de datos NIST98 (NIST, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA). Para la detección y evaluación de los cromatogramas, así como para la cuantificación automática de picos de los metabolitos seleccionados, se usó el procesamiento configurado predeterminadamente por el paquete informático Xcalibur 2.0 (Thermo Finnigan, USA). También se llevaron a cabo fragmentaciones virtuales para corroborar los resultados con el software Mass Frontier 2.0 (Thermo Finnigan, USA).

Con ello se procedió a un análisis comparativo para determinar la concentración de determinados cambios metabolómicos que se produjeran en las plantas inoculadas respecto a las no inoculadas. Se analizaron aquellos metabolitos identificados en una concentración de al menos 1,5 veces superior respecto a la otra condición analizada. De esta forma, se identificaron los metabolitos cuya presencia se alteró como resultado de exponer a plantas en sequía a la cepa *Microbacterium sp.* 3J1.

Como podemos apreciar en la figura 52 al comparar los cromatogramas, se observó cómo se acumularon determinados compuestos bajo cada una de las condiciones. Se identificaron perfiles cromatográficos en las raíces no inoculadas y las diferencias que se dieron al inocular las mismas. Tras la identificación de los mismos, se cuantificaron los picos correspondientes a los compuestos que se acumulaban en una de las dos condiciones, utilizando como referencia la concentración añadida de 1 μ M ribitol.

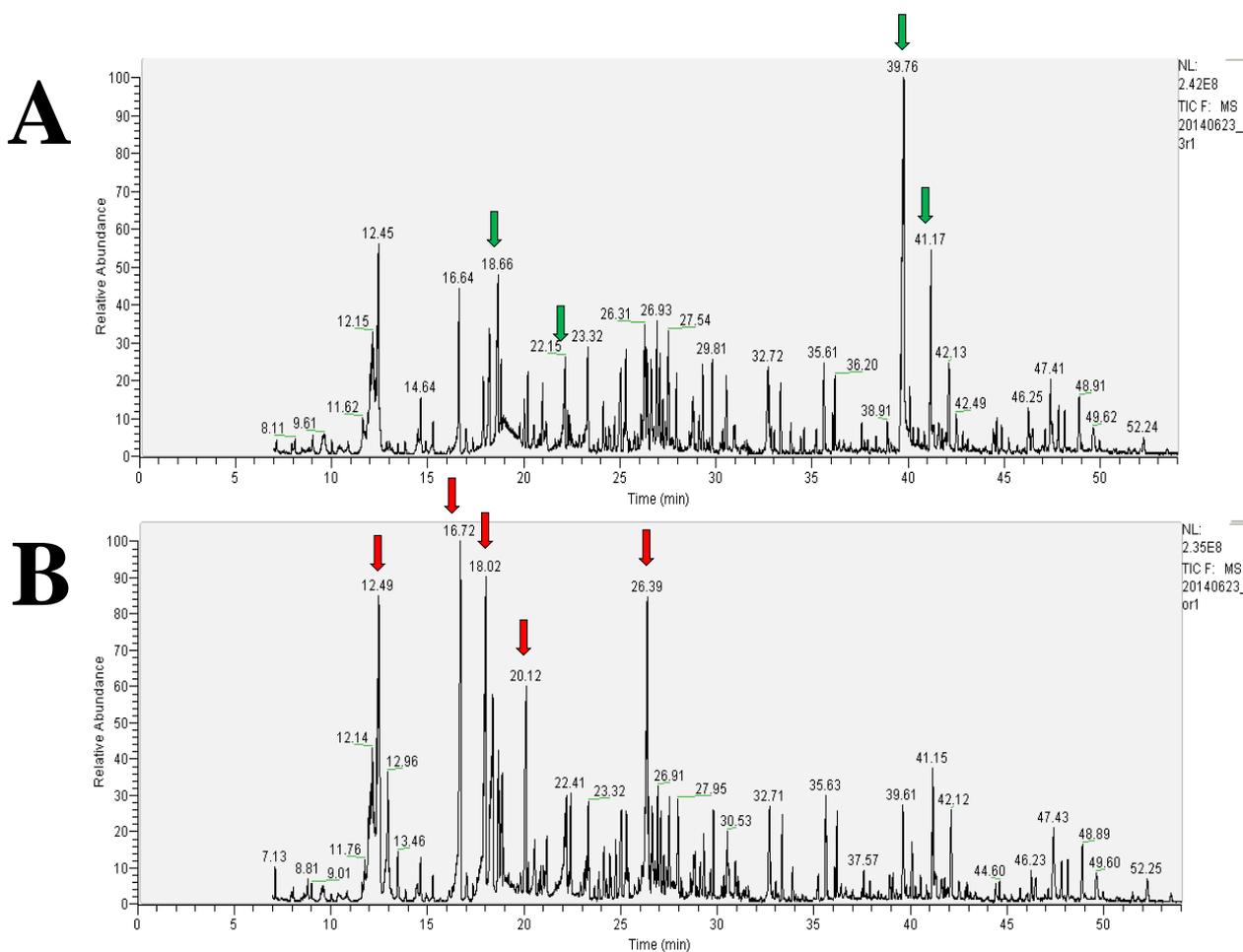


Figura 52. Cromatogramas de las raíces de pimiento. Se muestra la cromatografía de gases correspondiente a raíces inoculadas (A) y no inoculadas (B) bajo condiciones de sequía. Se señalan con flechas verdes algunos de los picos con diferencias más destacadas en raíces inoculadas y con flechas rojas en raíces no inoculadas.

Para conocer la proporción relativa de cada metabolito identificado dentro del total del metaboloma se llevó a cabo un diagrama metabolómico para cada condición (figuras 53A y 53B). La concentración relativa de algunos metabolitos fue similar en las raíces inoculadas y en las no inoculadas, como ocurrió con la celobiosa (5% en ambos casos), la tirosina (2 y 3% respectivamente) el mio-inositol (3 y 1% respectivamente), así como con otros compuestos aparecidos en baja concentración. Se trata, en general, de metabolitos primarios (constitutivos) que, sin embargo, influyen decisivamente en procesos estresantes como puede ocurrir con el mio-inositol.

Por otra parte, en las muestras de raíces inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 se observó una reducción en la presencia de metabolitos como la glucosa (que pasó de representar el 13% de los metabolitos al 2%), la galactosa (que pasó de representar el 7% de los metabolitos al 3%), la sacarosa (que pasó de representar el 8% de los metabolitos al 4%) y la melibiosa (que pasó de representar el 21% de los metabolitos al 13%), muchos de ellos dentro del grupo de los azúcares. Por otra parte, existe una serie de compuestos que aumentaron en términos de concentración relativa como ocurrió con la etanolamina (que pasó de representar el 2% al 27% de los metabolitos identificados) y la trehalosa (cuya representación era inferior al 0,1% en raíces no inoculadas y que pasó a representar el 6% de los metabolitos identificados cuando se encontraba presente el microorganismo).

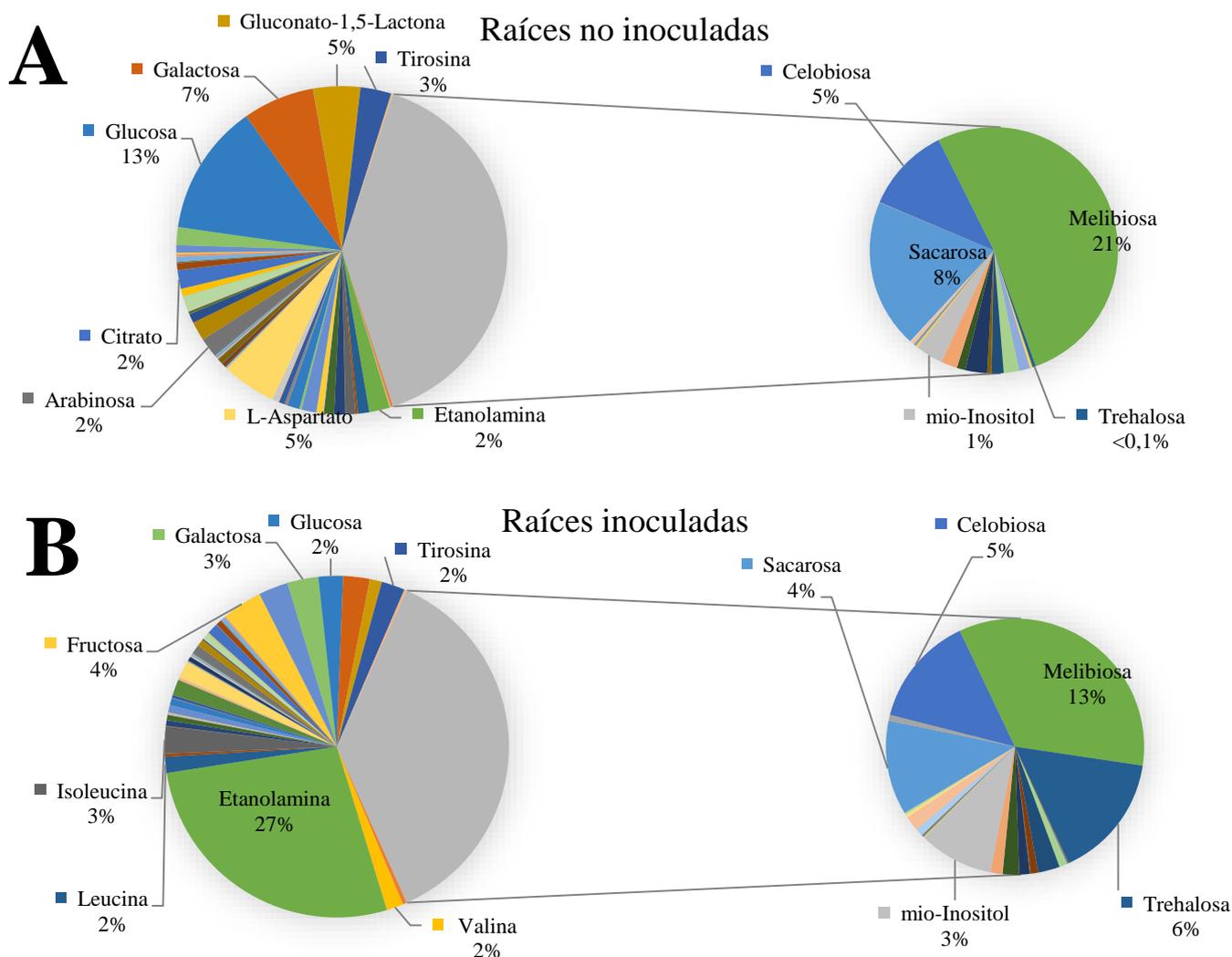


Figura 53. Metabolomas de concentraciones relativas de cada condición sometida a sequía. Se muestran los mapas metabolómicos en base a la proporción de cada compuesto sobre el total para las condiciones de raíces no inoculadas (A) y raíces inoculadas (B).

Tras establecer las concentraciones de los compuestos identificados, se llevó a cabo un análisis de aquellos metabolitos que mostraron diferencias en sus concentraciones finales entre las condiciones estudiadas, como se muestra la figura 54A. Así, se seleccionaron aquellos compuestos que presentaron una diferencia de concentración de al menos 1,5 veces mayor en una de las dos condiciones estudiadas con un nivel de significación $p < 0,05$ (mayor del 95%) tras aplicarles un estadístico t-student. Una vez seleccionados los componentes con diferencias en su concentración, estos se estudiaron por separado atendiendo a si se concentraban en las muestras de raíces inoculadas o en las de raíces no inoculadas, tal como se muestra en las figuras 54B y 54C.

Se observó un mayor número de metabolitos (casi el doble) en las raíces de plantas inoculadas con respecto a las raíces de plantas no inoculadas. Más de la mitad de los metabolitos que se encontraban en mayor concentración en raíces inoculadas lo estaban en más de 5 veces respecto a los de las raíces no inoculadas. Por su parte, aquellos metabolitos que se ven más concentrados en raíces no inoculadas, correspondieron en su mayoría con compuestos de rutas básicos o constitutivos para mantener la viabilidad de la planta más que a mecanismos especializados en la resistencia frente a la sequía. De ellos únicamente un tercio de los metabolitos identificados redujeron su concentración más de 5 veces por la presencia de *Microbacterium sp.* 3J1.

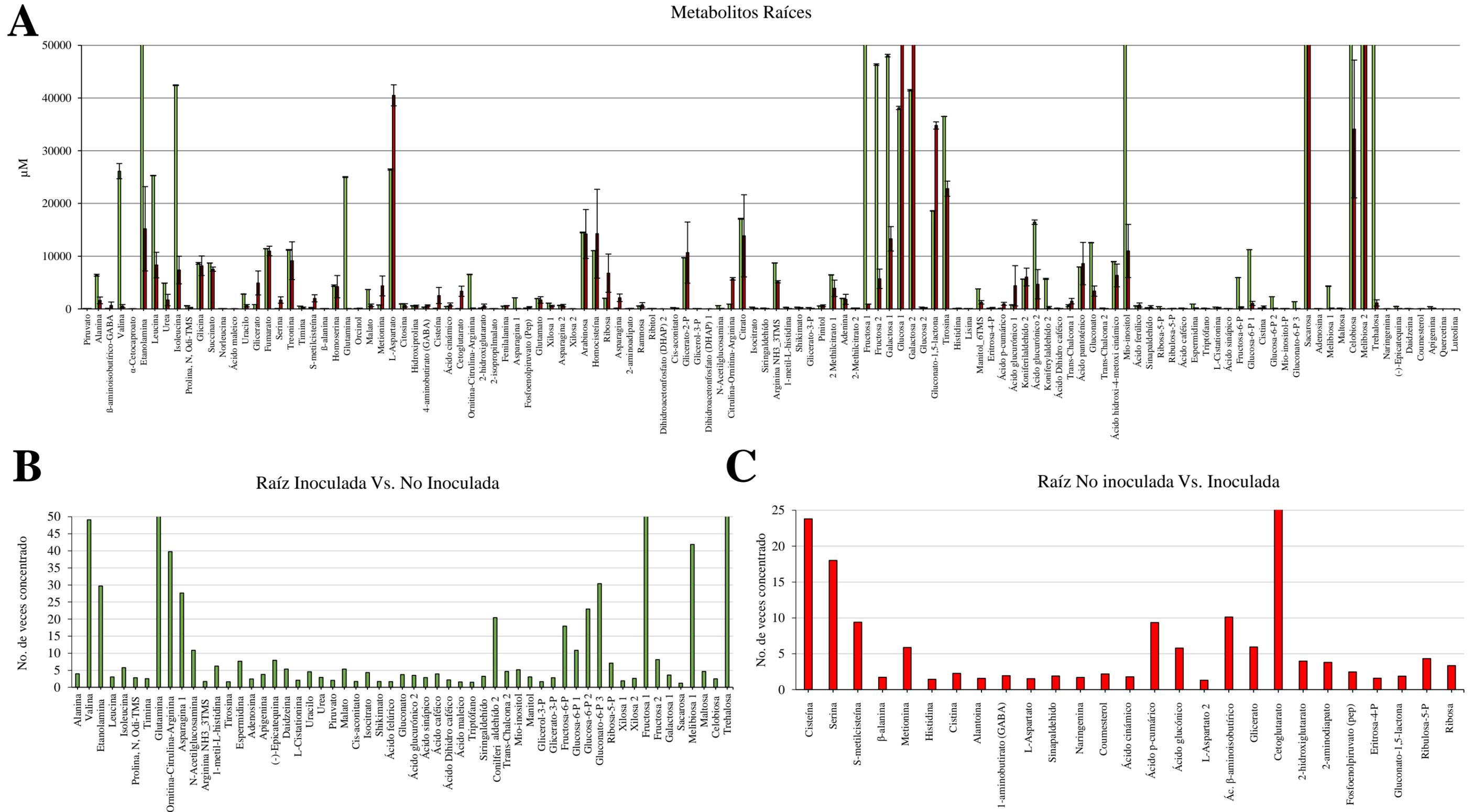


Figura 54. Identificación y cuantificación de metabolitos. Se muestra la concentración de los metabolitos encontrados para las raíces inoculadas (barras verdes) y no inoculadas (barras rojas) bajo condiciones de sequía (4A). Por otra parte, se muestran los metabolitos concentrados en las raíces inoculadas (4B) y no inoculadas (4C) expresados en número de veces más concentrado en una condición respecto a la otra.

Una vez clasificados los metabolitos y caracterizada su concentración relativa, se organizaron por grupos químicos y por funciones fisiológicas en respuesta al estrés por sequía, como se indica en las tablas 5 y 6.

En las raíces inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1, se encontraron hasta 56 compuestos cuya concentración fue al menos 1,5 veces superior respecto a las raíces no inoculadas. De ellos, 17 metabolitos (30% de los metabolitos sobreproducidos) se encontraron en una concentración al menos 5 veces superior a la que presentaron estos compuestos en las raíces no inoculadas. Los metabolitos con una mayor diferencia de concentración en las raíces de plantas inoculadas respecto a las raíces no inoculadas fueron glutamina (456,6 veces), trehalosa (84,79 veces), valina (49,08 veces), melibiosa (41,87 veces), gluconato-6-P (30,39 veces) y etanolamina (29,69 veces). Por otra parte, en 27 de los metabolitos identificados se observó una fuerte reducción en su concentración respecto a las plantas no inoculadas. Los metabolitos que mayor reducción de concentración mostraron por efecto de la inoculación con *Microbacterium sp.* 3J1 fueron cetoglutarato (70,98 veces menos), cisteína (23,81 veces), serina (18,02 veces), ácido β -aminoisobutírico (10,13), S-metilcisteína (9,39 veces) y ácido p-cumárico (9,36 veces).

Tabla 5. Metabolitos concentrados en raíces inoculadas respecto a no inoculadas por grupos químicos y función de respuesta ante sequía. Se muestra también el ratio entre las concentraciones detectadas en una y otra condición.

<i>Metabolito</i>	<i>Ratio</i>	<i>Tipo</i>	<i>Metabolito</i>	<i>Ratio</i>	<i>Tipo</i>
<i>Alanina</i> ^{a, c, d}	3,96	Aminoácido	<i>Ácido glucurónico</i> ^{a, b, c, e}	3,51	Ácido orgánico
<i>Valina</i> ^{a, d}	49,08	Aminoácido	<i>Ácido sinápico</i> ^{c, e}	2,85	Ácido orgánico
<i>Leucina</i> ^{a, d}	3,04	Aminoácido	<i>Ácido caféico</i> ^{b, c, d, e}	3,94	Ácido orgánico
<i>Isoleucina</i> ^{b, c}	5,76	Aminoácido	<i>Ácido dihidrocaféico</i> ^{b, d}	2,16	Ácido orgánico
<i>Prolina</i> ^{a, b, e}	2,80	Aminoácido	<i>Ácido quínico</i> ^b	1,49	Ácido orgánico
<i>Triptófano</i> ^{a, c}	1,48	Aminoácido	<i>Ácido maloico</i> ^{a, b}	2,31	Ácido orgánico
<i>Glutamina</i> ^{b, d}	456,60	Aminoácido	<i>Ácido ferúlico</i> ^{b, e}	1,89	Ácido orgánico
<i>Omitina-Citrulina-Arginina</i> ^a	39,79	Aminoácido	<i>Siringaldehído</i> ^e	3,24	Aldehído
<i>Asparagina</i> ^a	27,64	Aminoácido	<i>Coniferaldehído</i> ^{d, e}	20,43	Aldehído
<i>Arginina NH₃</i> ^a	1,70	Aminoácido	<i>trans-Chalcona</i> ^b	4,64	Cetona
<i>1-metil-L-histidina</i> ^{c, f}	6,20	Aminoácido	<i>Mio-inositol</i> ^a	5,15	Polialcohol
<i>Tirosina</i> ^{b, c}	1,60	Aminoácido	<i>Manitol</i> ^a	3,05	Polialcohol
<i>L-Cistationina</i> ^c	2,10	Aminoácido	<i>Glicerol-3-P</i> ^{c, d}	1,69	C. fosfatado
<i>Espermidina</i> ^{c, e}	7,65	Poliamina	<i>Glicerato-3-P</i> ^{c, d}	2,80	C. fosfatado
<i>N-Acetilglucosamina</i> ^{a, b}	10,84	Amino-Azúcar	<i>Fructosa-6-P</i> ^{c, d}	17,94	C. fosfatado
<i>Etanolamina</i> ^{a, c}	29,69	Amino-Alcohol	<i>Glucosa-6-P</i> ^{a, c}	10,87	C. fosfatado
<i>Adenosina</i> ^{c, d}	2,45	Nucleósido	<i>Gluconato-6-P</i> ^a	30,39	C. fosfatado
<i>Apigenina</i> ^b	3,79	Flavona	<i>Ribosa-5-P</i> ^{a, d}	7,07	C. fosfatado
<i>(-)-Epicatequina</i> ^b	7,92	Flavonoide	<i>Xilosa</i> ^{a, d, e}	1,92	Azúcar
<i>Daidzeina</i> ^{b, c, d}	5,37	Isoflavona	<i>Fructosa</i> ^{a, d}	8,12	Azúcar
<i>Uracilo</i> ^{a, d}	4,57	B. nitrogenada	<i>Galactosa</i> ^a	3,61	Azúcar
<i>Timina</i> ^{b, c}	2,56	B. nitrogenada	<i>Melibiosa</i> ^{a, d}	41,87	Azúcar
<i>Urea</i> ^{a, c}	2,91	C. nitrogenado	<i>Maltosa</i> ^{a, d}	4,65	Azúcar
<i>Piruvato</i> ^a	2,02	Ácido orgánico	<i>Celobiosa</i> ^{a, d}	2,49	Azúcar
<i>Malato</i> ^{a, c}	5,35	Ácido orgánico	<i>Trehalosa</i> ^{a, c, e}	84,79	Azúcar
<i>Cis-aconitato</i> ^{a, d}	1,72	Ácido orgánico	<i>Rafinosa</i> ^{a, b}	2,01	Azúcar
<i>Isocitrato</i> ^{a, b}	4,34	Ácido orgánico	<i>Melicitosa</i> ^a	2,34	Azúcar
<i>Shikimato</i> ^{a, d}	1,73	Ácido orgánico			
<i>2-Methylcitrato</i> ^a	1,65	Ácido orgánico			
<i>Gluconato</i> ^a	3,72	Ácido orgánico			

A, Equilibrio osmótico; B, Anti-ROS; C, Fitohormona/Ciclo Etileno; D, Señal; E, Estructural; F, Otros

Tabla 6. Metabolitos concentrados en raíces no inoculadas respecto a inoculadas por grupos químicos y función de respuesta ante sequía. Se muestra también el ratio entre las concentraciones detectadas en una y otra condición.

<i>Metabolito</i>	<i>Ratio</i>	<i>Tipo</i>
<i>Cisteína</i> ^b	23,81	Aminoácido
<i>Serina</i> ^d	18,02	Aminoácido
<i>S-metilcisteína</i> ^c	9,39	Aminoácido
<i>β-alanina</i> ^a	1,74	Aminoácido
<i>Metionina</i> ^c	5,88	Aminoácido
<i>Histidina</i> ^{a, c, f}	1,44	Aminoácido
<i>Cistina</i> ^b	2,29	Aminoácido
<i>4-aminobutirato (GABA)</i> ^{a, c, d}	1,95	Aminoácido
<i>L-Aspartato</i> ^{b, c}	1,53	Aminoácido
<i>Alantoina</i> ^c	1,57	C. nitrogenado
<i>Sinapaldehído</i> ^e	1,91	Aldehído
<i>Naringenina</i> ^{b, c, d}	1,71	Isoflavonoide
<i>Coumesterol</i> ^{b, c}	2,18	Isoflavona
<i>Ácido cinámico</i> ^{b, c}	1,80	Ácido orgánico
<i>Ácido p-cumárico</i> ^{c, f}	9,36	Ácido orgánico
<i>Ácido glucónico</i> ^{b, d, e}	5,78	Ácido orgánico
<i>Ác. β-aminoisobutírico</i> ^{a, d, e}	10,13	Ácido orgánico
<i>Glicerato</i> ^{a, b, d}	5,94	Ácido orgánico
<i>Cetoglutarato</i> ^{a, b}	70,98	Ácido orgánico
<i>2-hidroxiglutarato</i> ^b	3,98	Ácido orgánico
<i>2-aminoadipato</i> ^a	3,81	Ácido orgánico
<i>Fosfoenolpiruvato (Pep)</i> ^{b, d}	2,48	Ácido orgánico
<i>Gluconato-1,5-lactona</i> ^f	1,87	Ácido orgánico
<i>Eritrosa-4-P</i> ^a	1,59	C. fosfatado
<i>Ribulosa-5-P</i> ^{b, d}	4,33	C. fosfatado
<i>Ribosa</i> ^{c, d}	3,35	Azúcar

A, Equilibrio osmótico; B, Anti-ROS; C, Fitohormona/Ciclo Etileno; D, Señal; E, Estructural; F, Otros

Atendiendo a las características de los compuestos identificados, existen diferencias significativas destacables entre las condiciones ensayadas. En el caso de las raíces inoculadas, se observó una gran diversidad de grupos químicos en los metabolitos detectados (sólo se observaron 4 grupos con más de un 10% de metabolitos totales), respecto a los que se observan en las raíces no inoculadas (donde la suma de 2 grupos superó más del 70% de los metabolitos totales). Concretamente, más de la mitad de los metabolitos identificados en las raíces inoculados fueron aminoácidos (el 29% del total, respecto al 32% en raíces no inoculadas) y ácidos orgánicos (23% del total, respecto al 39% en raíces no inoculadas). Otro tercio de los metabolitos identificados en las raíces de plantas inoculadas fueron azúcares (16% del total, respecto al 4% en raíces no inoculadas), seguidos por compuestos fosfatados (11% del total, respecto al 8% en raíces no inoculadas) y polialcoholes (5%, mientras que no se identificó ninguno en raíces no inoculadas). Adicionalmente, se identificó un 16% de compuestos de diversos grupos cuya representatividad fue menor y entre los cuales encontramos bases nitrogenadas, aldehídos, cetonas, flavonas o nucleósidos, cuya proporción fue similar a la detectada en raíces no inoculadas (figuras 55A y 55B). Con esto, como podemos observar en la figura 55C, se dieron variaciones significativas tanto en la cantidad de metabolitos por cada función, como en los valores de abundancia relativa de dichas funciones. Aquí debe tenerse en cuenta que cada metabolito identificado podía ajustarse a más de un tipo de función contra la sequía.

En cuanto a las funciones asociadas a cada compuesto identificado cuya concentración varió significativamente, se agruparon en torno a cinco categorías. reguladores osmóticos (osmolitos, sustancias osmoprotectoras, sustancias osmocompatibles), antioxidantes (reguladores de grupos reactivos, neutralizadores), fitohormonas (relacionadas con el control de fitohormonas, fitohormonas funcionales contra la sequía, reguladores del crecimiento), moléculas señal (involucradas en activación o cambios de ruta, receptores o mensajeros específicos) y moléculas estructurantes (modificadores de estructuras como paredes y compartimentos vacuolares, y protectores como el sinapaldehído, la trehalosa, el ácido felúrico o el ácido glucurónico), dependiendo del mecanismo de resistencia o tolerancia a la sequía con el que estuvieran más relacionados. Se incluyó una categoría adicional que denominamos ‘otros’ para incluir aquellos compuestos que se asociaron también con otras funciones de resistencia a estreses bióticos o abióticos no relacionados con la sequía.

En cuanto a los compuestos acumulados en raíces de plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1, aproximadamente el 10% de los metabolitos sobreproducidos podían clasificarse dentro de 3 o más de los grupos funcionales (mientras que estos grupos supusieron un 20% en raíces no inoculadas), y algo más del 50% en dos grupos (30% en el caso de las raíces no inoculadas). El resto (aproximadamente el 40%) se consideraron compuestos monofuncionales (cerca del 50% en raíces no inoculadas). Así, al menos 20 metabolitos se pudieron agrupar dentro de las funciones de regulación osmótica, fitohormona y señalización de estrés, mientras que en el caso de las raíces de plantas no inoculadas, fueron grupos funcionales de antioxidantes, fitohormonas y señalización de estrés los que agruparon más de 10 de los compuestos.

Por otra parte, el análisis de abundancia relativa de dichas funciones nos permitió comparar su distribución en ambas condiciones. Así, las raíces inoculadas acumularon casi el doble de metabolitos con una función de regulación osmótica respecto a las raíces no inoculadas, mientras que acumularon un 40% menos de compuestos con función de reguladores de las moléculas reactivas del oxígeno (figura 55D). Los otros tres grupos mantuvieron una de abundancia relativa similar en ambas condiciones, con cerca del 20% de representatividad las funciones relacionadas con moléculas señal y fitohormonas, y con menos del 10%, las estructurantes.

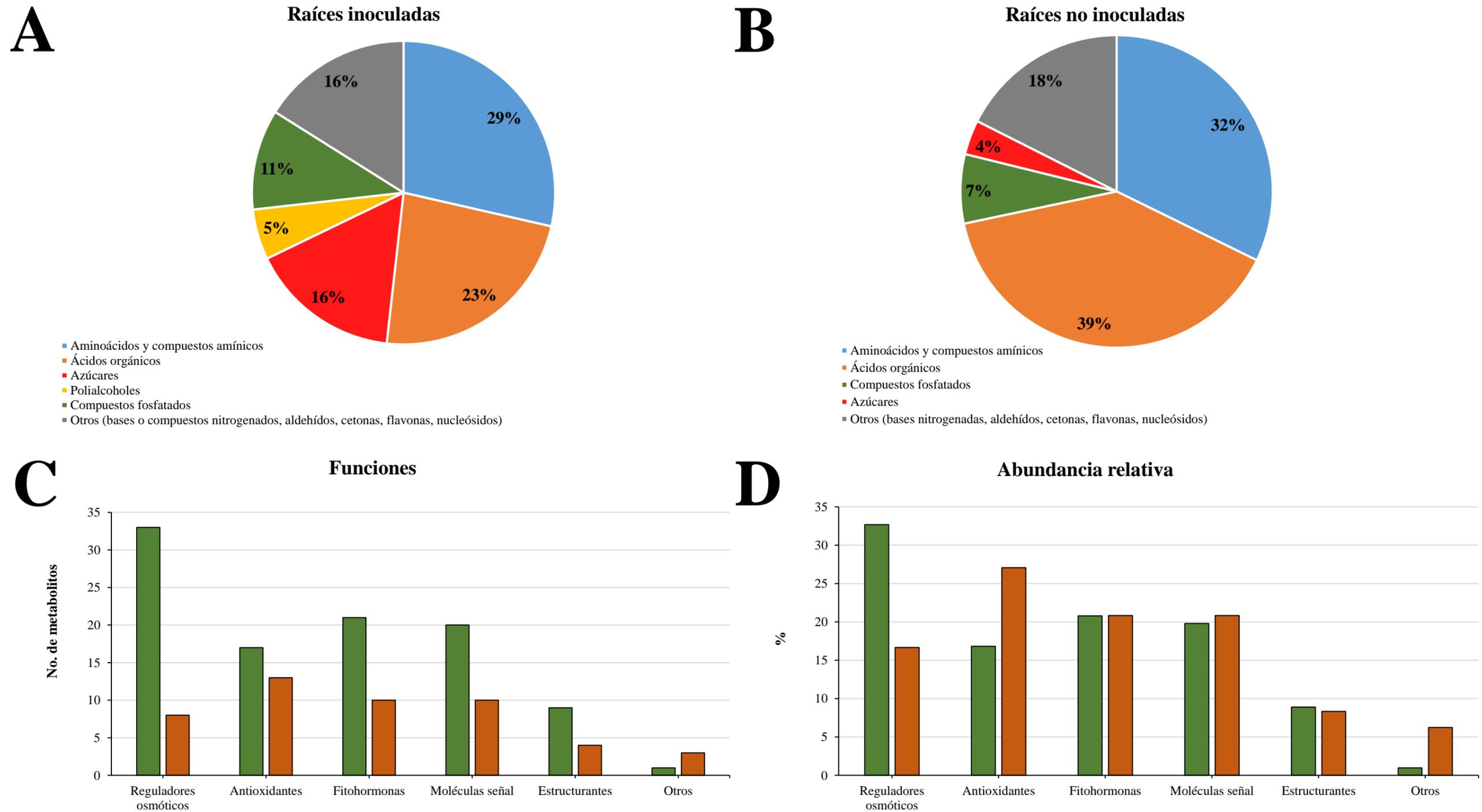


Figura 55. Análisis de componentes y funciones de los metabolitos detectados en la interacción planta-microorganismo. Se muestran la abundancia relativa de los metabolitos según su origen químico tanto en raíces inoculadas (A) como en raíces no inoculadas (B). Por otra parte se indican el número de metabolitos detectados relacionado con cada función de anti estrés (C), así como la abundancia relativa de metabolitos por función (D); las barras de color verde corresponden con las muestras analizadas de raíces inoculadas; las barras color naranja, a las muestras analizadas de raíces no inoculadas.

2.2. Metabolitos producidos por la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 en sequía

Para identificar los metabolitos que *Microbacterium sp.* 3J1 producía ante estrés hídrico, se comparó el perfil de metabolitos producidos en un cultivo en medio TSB suplementado con de PEG 6.000 al 50% (p/v), respecto a un cultivo en medio suplementado con PEG 6.000 al 5% (p/v). De esta forma se buscó poder comparar el estado hídrico en suelos en ausencia de sequía donde no se alcanza el 100% de hidratación con condiciones de sequía severas. Se siguieron los protocolos y análisis marcados en el apartado anterior en cuanto a técnicas y criterios para llegar a la identificación y comparación de los metabolitos detectados.

Con ello, se procedió a comparar en cuanto a 4 criterios distintos: diferencia entre la concentración relativa en sobrenadante, diferencia entre la concentración relativa de la fracción intracelular, y en cada una de estas condiciones, diferencia de concentración de metabolitos en presencia de 50 y 5% de PEG en el medio. De este modo se analizaron los metabolitos secretados (extracelular) y los acumulados (intracelular) ante las condiciones de sequía artificial impuestas. Aquellos metabolitos que mostraron una acumulación de al menos 1,5 veces superior a la condición opuesta fueron considerados para el análisis de funciones.

Tras identificar los compuestos y conocer sus concentraciones medias en las tres muestras estudiadas en cada condición, se evaluaron y seleccionaron aquellos con una diferencia de concentración de al menos 1,5 veces mayor con un nivel de significación $p < 0,05$ (mayor del 95%) tras aplicarles un estadístico t-student.

Así, los compuestos se dividieron según la presencia de 50 y 5% de PEG en el medio, tal como se muestra en las figuras 56A y 56B, para estudiar la relación con los sistemas de resistencia contra estrés abiótico, y más concretamente en los sistemas de resistencia contra sequía. Comenzando con el análisis de compuestos en el sobrenadante, se observó que el número de metabolitos acumulados fue menor y menos diverso en su composición y tipos químicos para el cultivo con PEG 50% que para el de PEG 5%, llegando a mostrar seis veces menos componentes identificados. De estos metabolitos, más de la mitad se encontraron acumulados más de 5 veces respecto al sobrenadante del cultivo con PEG 5% (en el cual poco más del 40% de los metabolitos se acumularon más de 5 veces). Los metabolitos más acumulados en cultivos con PEG 50% respecto a los encontrados en cultivos con PEG 5% fueron el ácido cinámico (siendo su concentración 7,74 veces más

alta en presencia de PEG 50% que en presencia de PEG al 5%), la urea (7,72 veces más concentrada) y la sacarosa (6,94 veces más concentrada). Por otra parte, los metabolitos que mayor reducción mostraron cuando el medio contenía PEG 50%, respecto al que contenía PEG 5%, fueron la serina (cuya concentración se redujo en 19,17 veces), el ácido cafeico (18,71 veces menos concentrado), la arginina (17 veces menos concentrada) y la melibiosa (16,30 veces menos concentrada) (tabla 7).

Por su parte, en la fracción intracelular los metabolitos acumulados en cada condición fueron prácticamente los mismos en número que en la fracción del sobrenadante. Se identificaron 43 metabolitos en la muestra con PEG 50%, y 45 para el cultivo con PEG 5%. En el cultivo con PEG 50%, el 70% de los compuestos que se acumularon superaban por más de 5 veces la concentración respecto a cuándo el cultivo contuvo PEG 5% (en este medio, sólo la mitad de los compuestos se acumularon más de 5 veces respecto al cultivo con PEG 50%). Las mayores diferencias de concentración entre los metabolitos acumulados en cultivos con PEG 50% respecto a los encontrados en cultivos con PEG 5% fueron el gluconato-1,5-lactona (siendo su concentración 20,03 veces más alta en presencia de PEG 50% que en presencia de PEG al 5%), la lisina (19,14 veces más concentrada), la fructosa (18,77 veces más concentrada) y la trans-chalcona (17,72 veces más concentrada). Por otra parte, los metabolitos que mayor reducción mostraron cuando el medio contenía PEG 50%, respecto al que contenía PEG 5%, fueron la timina (cuya concentración se redujo en 73,29 veces), la glicina (58,73 veces menos concentrada), la treonina (43,33 veces más concentrada) y el 4-aminobutirato (GABA) (22,94 veces más concentrado). Estos datos se muestran con mayor detalle en la tabla 6.

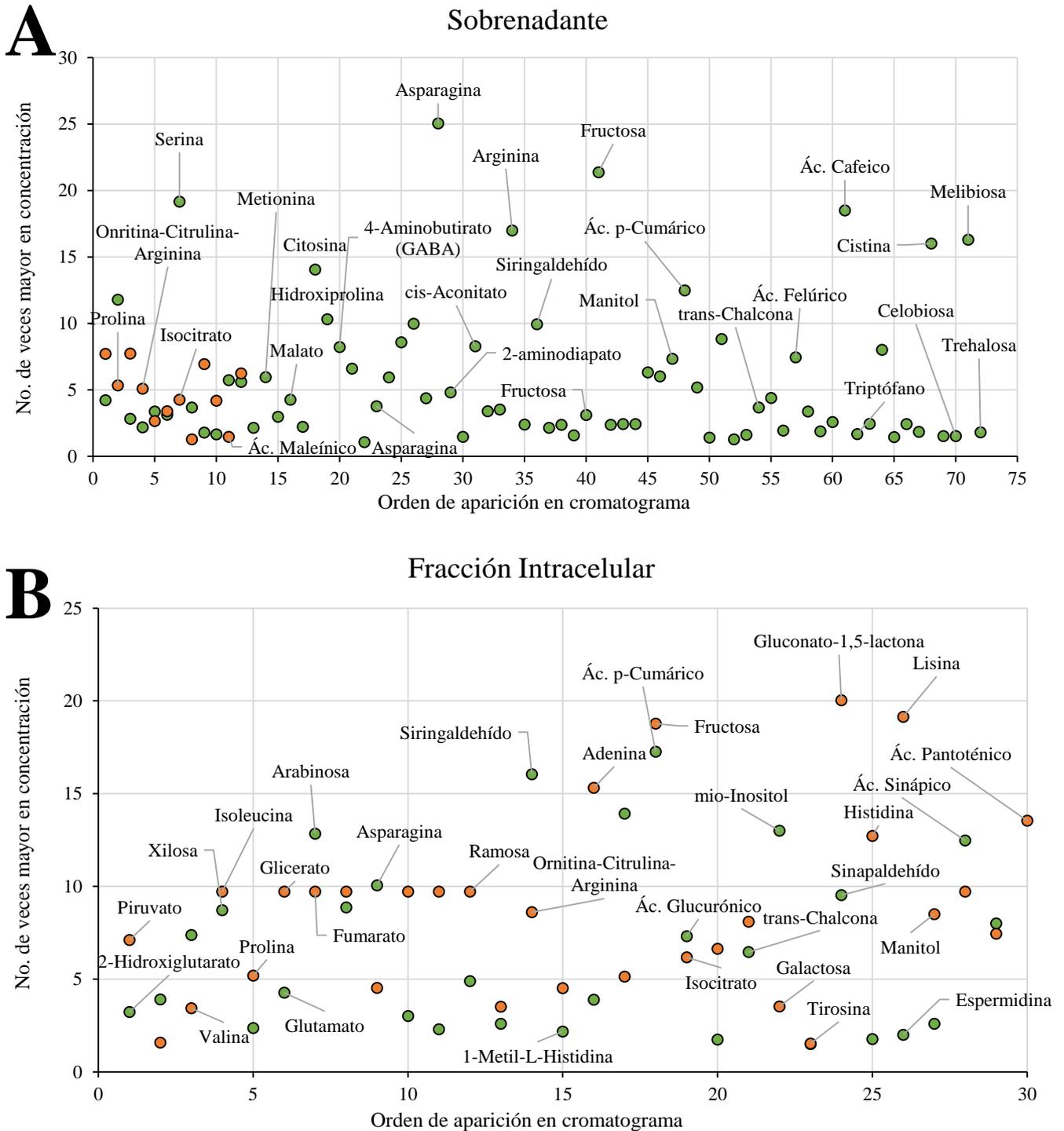


Figura 56. Cuantificación de metabolitos identificados. Se muestran aquellos metabolitos concentrados en los sobrenadantes de los cultivos puros expuestos a PEG (6A) y en la fracción intracelular de dichos cultivos (6B). Los puntos verdes corresponden con los compuestos concentrados en medio con PEG 5%; los puntos naranjas corresponden con los compuestos concentrados en medio con PEG 50%. Los metabolitos se ordenaron por aparición en el cromatograma.

Tabla 7. Metabolitos concentrados en los sobrenadantes de los cultivos expuestos a PEG 5% y PEG 50% por grupos químicos y función de respuesta ante la sequía. Se muestra también el ratio entre las concentraciones detectadas en una y otra condición.

Sobrenadante	5% Vs 50%		Sobrenadante	5% Vs 50%	
<i>Metabolito</i>	<i>Ratio</i>	<i>Tipo</i>	<i>Metabolito</i>	<i>Ratio</i>	<i>Tipo</i>
<i>Alanina</i> ^{a, c, d}	4,23	Aminoácido	<i>cis-Aconitato</i> ^{a, d}	8,29	Ác. orgánico
<i>Valina</i> ^{a, d}	2,83	Aminoácido	<i>Citrato</i> ^{a, b}	3,54	Ác. orgánico
<i>Leucina</i> ^{a, d}	3,39	Aminoácido	<i>α-Cetocaproato</i> ^b	2,19	Ác. orgánico
<i>Norleucina</i> ^a	3,14	Aminoácido	<i>Malato</i> ^{a, c}	4,27	Ác. orgánico
<i>Serina</i> ^d	19,17	Aminoácido	<i>Shikimato</i> ^{a, d}	2,38	Ác. orgánico
<i>Treonina</i> ^{a, d}	3,69	Aminoácido	<i>2-Metilcitrato</i> ^a	2,39	Ác. orgánico
<i>S-Metilcisteína</i> ^c	1,79	Aminoácido	<i>Gluconato</i> ^a	1,63	Ác. orgánico
<i>Homoserina</i> ^a	1,67	Aminoácido	<i>Gluconato-1,5-lactona</i> ^f	6,02	Ác. orgánico
<i>β-Alanina</i> ^a	5,75	Aminoácido	<i>Pinitol</i> ^a	2,39	Alcohol
<i>Glutamina</i> ^{b, d}	5,60	Aminoácido	<i>Orcinol</i> ^b	2,16	Alcohol
<i>Metionina</i> ^c	5,96	Aminoácido	<i>Manitol</i> ^a	7,34	Alcohol
<i>L-Cistationina</i> ^b	2,99	Aminoácido	<i>mio-Inositol</i> ^a	4,39	Alcohol
<i>Cisteína</i> ^b	2,22	Aminoácido	<i>trans-Chalcona</i> ^b	3,69	Cetona
<i>Triptófano</i> ^{a, c}	1,69	Aminoácido	<i>Siringaldehído</i> ^e	9,95	Aldehído
<i>Citosina</i> ^{a, b}	14,07	Aminoácido	<i>Sinapaldehído</i> ^e	3,38	Aldehído
<i>Cistina</i> ^b	16,01	Aminoácido	<i>Conilferaldehído</i> ^{d, e}	5,18	Aldehído
<i>Hidroxiprolina</i> ^a	10,32	Aminoácido	<i>Glicerato-3-P</i> ^{c, d}	1,60	C. fosfatado
<i>Arginina</i> ^a	17,00	Aminoácido	<i>Glicerato-2-P</i> ^{c, d}	1,47	C. fosfatado
<i>Asparagina</i> ^a	3,78	Aminoácido	<i>Glicerol-3-P</i> ^{c, d}	3,40	C. fosfatado
<i>Tirosina</i> ^{b, c}	6,33	Aminoácido	<i>Ribosa-5-P</i> ^{a, d}	1,89	C. fosfatado
<i>1-Metil-L-Histidina</i> ^{a, c, f}	2,15	Aminoácido	<i>Ribulosa-5-P</i> ^{b, d}	2,59	C. fosfatado
<i>L-Cistationina</i> ^c	8,02	Aminoácido	<i>Frutosa-6-P</i> ^{c, d}	2,44	C. fosfatado
<i>4-Aminobutirato (GABA)</i> ^{a, c, d}	8,22	Aminoácido	<i>Glucosa-6-P</i> ^{a, c}	1,85	C. fosfatado
<i>Espermidina</i> ^{c, e}	2,46	Poliamina	<i>mio-Inositol-P</i> ^a	1,54	C. fosfatado
<i>Ácido β-Aminoisobutírico</i> ^{a, d, e}	11,80	Ác. orgánico	<i>Xilosa</i> ^{a, d, e}	5,95	Azúcar
<i>Ác. sinápico</i> ^{c, e}	1,46	Ác. orgánico	<i>Arabinosa</i> ^{a, b}	8,59	Azúcar
<i>Ác. felúrico</i> ^{b, e}	7,45	Ác. orgánico	<i>Glucosa</i> ^{a, d}	2,45	Azúcar
<i>Ác. glucurónico</i> ^{b, d, e}	1,42	Ác. orgánico	<i>Galactosa</i> ^a	2,45	Azúcar
<i>Ác. dihidrocaféico</i> ^{b, d}	1,29	Ác. orgánico	<i>Ribosa</i> ^{c, d}	4,39	Azúcar
<i>Ác. cafeico</i> ^{b, c, d, e}	18,51	Ác. orgánico	<i>Fructosa</i> ^{a, d}	3,11	Azúcar
<i>α-cetoglutarato</i> ^{a, b}	6,60	Ác. orgánico	<i>Celobiosa</i> ^{a, d}	1,54	Azúcar
<i>2-Isopropilmalato</i> ^{a, c}	1,07	Ác. orgánico	<i>Melibiosa</i> ^{a, d}	16,30	Azúcar
<i>2-Aminodiapato</i> ^a	4,81	Ác. orgánico	<i>Trehalosa</i> ^{a, c, e}	1,83	Azúcar

Sobrenadante	50% Vs 5%	
<i>Metabolito</i>	<i>Ratio</i>	<i>Tipo</i>
<i>Onritina-Citruilina-Arginina</i> ^a	5,10	Aminoácido
<i>Prolina</i> ^{a, b, e}	5,34	Aminoácido
<i>Ác. cinámico</i> ^{b, c}	7,74	Ác. orgánico
<i>Ác. maleínico</i> ^{a, b}	1,48	Ác. orgánico
<i>2-Hidroxiglutarato</i> ^b	6,25	Ác. orgánico
<i>Isocitrato</i> ^{a, b}	4,27	Ác. orgánico
<i>Urea</i> ^{a, c}	7,72	C. nitrogenado
<i>Adenina</i> ^d	3,41	Base nitrogenada
<i>Sacarosa</i> ^a	6,94	Azúcar
<i>Rafinosa</i> ^{a, b}	4,20	Azúcar

A, Equilibrio osmótico; B, Anti-ROS; C, Fitohormona/Ciclo Etileno; D, Señal; E, Estructural; F, Otros

Tabla 8. Metabolitos concentrados la fracción intracelular de los cultivos expuestos a PEG 5% y PEG 50% por grupos químicos y función de respuesta ante la sequía. Se muestra también el ratio entre las concentraciones detectadas en una y otra condición.

Fracción intracelular	5% Vs 50%		Fracción intracelular	50% Vs 5%	
Metabolito	Ratio	Tipo	Metabolito	Ratio	Tipo
<i>Alanina</i> ^{a, c, d}	16,34	Aminoácido	<i>Valina</i> ^{a, d}	3,43	Aminoácido
<i>Leucina</i> ^{a, d}	16,46	Aminoácido	<i>Isoleucina</i> ^{b, c}	9,71	Aminoácido
<i>Glicina</i> ^a	58,73	Aminoácido	<i>Prolina</i> ^{a, b, e}	5,19	Aminoácido
<i>Norleucina</i> ^a	5,19	Aminoácido	<i>Homocisteína</i> ^b	4,52	Aminoácido
<i>Serina</i> ^d	2,58	Aminoácido	<i>Ornitina-Citrulina-Arginina</i> ^a	8,60	Aminoácido
<i>Treonina</i> ^{a, d}	43,33	Aminoácido	<i>Tirosina</i> ^{a, c}	1,52	Aminoácido
<i>S-Metilcisteína</i> ^c	2,00	Aminoácido	<i>Histidina</i> ^{a, c, f}	12,72	Aminoácido
<i>Timina</i> ^{b, c}	73,29	Aminoácido	<i>Lisina</i> ^d	19,14	Aminoácido
<i>Homosreina</i> ^a	3,83	Aminoácido	<i>Triptófano</i> ^{a, c}	10,65	Aminoácido
<i>Glutamina</i> ^{b, d}	5,77	Aminoácido	<i>Cistina</i> ^b	1,75	Aminoácido
<i>Metionina</i> ^c	6,75	Aminoácido	<i>N-Acetilglucosamina</i> ^{a, b}	4,51	Aminoácido
<i>Cisteína</i> ^b	1,95	Aminoácido	<i>Ácido β-Aminoisobutírico</i> ^{a, d, e}	1,57	Ác. orgánico
<i>Hidroxiprolina</i> ^a	6,94	Aminoácido	<i>Ác. pantoténico</i> ^a	13,54	Ác. orgánico
<i>Fenilalanina</i> ^{a, b, e}	3,90	Aminoácido	<i>Ác. glucurónico</i> ^{a, b, c, e}	6,32	Ác. orgánico
<i>Asparagina</i> ^a	7,37	Aminoácido	<i>Ác. felúrico</i> ^{b, e}	4,81	Ác. orgánico
<i>L-Cistationina</i> ^c	2,59	Aminoácido	<i>Ác. dihidrocaféico</i> ^{b, d}	14,53	Ác. orgánico
<i>1-Metil-L-Histidina</i> ^{a, c, f}	2,17	Aminoácido	<i>Piruvato</i> ^a	7,10	Ác. orgánico
<i>Espermidina</i> ^{c, e}	2,00	Poliamina	<i>Glicerato</i> ^{a, b, d}	9,71	Ác. orgánico
<i>Etanolamina</i> ^{a, c}	5,87	Amino-alcohol	<i>Fumarato</i> ^a	9,71	Ác. orgánico
<i>Ác. cinámico</i> ^{b, c}	7,78	Ác. orgánico	<i>Fosfoenolpiruvato (Pep)</i> ^{b, d}	9,71	Ác. orgánico
<i>Ác. p-cumárico</i> ^{c, f}	17,26	Ác. orgánico	<i>Dihidroactonfosfato (DHAP)</i> ^{a, d}	9,71	Ác. orgánico
<i>Ác. sinápico</i> ^{c, e}	12,48	Ác. orgánico	<i>Isocitrato</i> ^{a, b}	6,17	Ác. orgánico
<i>Gluconato</i> ^a	1,74	Ác. orgánico	<i>2-Metilcitrato</i> ^a	6,63	Ác. orgánico
<i>α-Cetocaproato</i> ^b	1,83	Ác. orgánico	<i>Gluconato-1,5-lactona</i> ^f	20,03	Ác. orgánico
<i>Succinato</i> ^{a, b}	7,09	Ác. orgánico	<i>Adenina</i> ^d	15,31	B. nitrogenada
<i>Malato</i> ^{a, c}	5,60	Ác. orgánico	<i>Adenosina</i> ^{c, d}	5,59	Nucleósido
<i>4-Aminobutirato (GABA)</i> ^{a, c, d}	22,94	Ác. orgánico	<i>Manitol</i> ^a	8,50	Alcohol
<i>α-Cetoglutarato</i> ^{a, b}	5,85	Ác. orgánico	<i>trans-Chalcona</i> ^b	17,72	Cetona
<i>Glutamato</i> ^{a, c, d}	4,26	Ác. orgánico	<i>Coniferaldehído</i> ^{d, e}	7,45	Aldehído
<i>cis-Aconitato</i> ^{a, d}	3,01	Ác. orgánico	<i>Glicerato-2-P</i> ^{c, d}	3,51	C. fosfatado
<i>Citrato</i> ^{a, b}	2,29	Ác. orgánico	<i>Glicerato-3-P</i> ^{c, d}	5,13	C. fosfatado
<i>2-Hidroxiglutarato</i> ^b	3,23	Ác. orgánico	<i>Eritrosa-4-P</i> ^a	9,71	C. fosfatado
<i>2-Metilcitrato</i> ^{a, b}	13,92	Ác. orgánico	<i>Glucosa-6-P</i> ^{a, c}	4,43	C. fosfatado
<i>Urea</i> ^{a, c}	3,65	C. nitrogenado	<i>Ribosa-5-P</i> ^{a, d}	4,59	C. fosfatado
<i>Citosina</i> ^{a, b}	7,00	B. nitrogenada	<i>mio-Inositol-P</i> ^a	4,30	C. fosfatado
<i>Uracilo</i> ^{a, d}	2,22	B. nitrogenada	<i>Rammosa</i> ^{a, e}	9,71	Azúcar
<i>mio-Inositol</i> ^a	13,00	Alcohol	<i>Fructosa</i> ^{a, d}	18,77	Azúcar
<i>Orcinol</i> ^b	6,06	Alcohol	<i>Glucosa</i> ^{a, d}	8,09	Azúcar
<i>Pinitol</i> ^a	2,59	Alcohol	<i>Galactosa</i> ^a	3,52	Azúcar
<i>Siringaldehído</i> ^e	16,04	Adehído	<i>Sacarosa</i> ^a	15,86	Azúcar
<i>Ribulosa-5-P</i> ^{b, d}	1,77	C. fosfatado	<i>Melibiosa</i> ^{a, d}	8,80	Azúcar
<i>Frutosa-6-P</i> ^{c, d}	8,00	C. fosfatado	<i>Maltosa</i> ^{a, d}	9,71	Azúcar
<i>Xilosa</i> ^{a, d, e}	2,37	Azúcar	<i>Trehalosa</i> ^{a, c, e}	6,27	Azúcar
<i>Arabimosa</i> ^{a, b}	12,84	Azúcar			
<i>Ribosa</i> ^{c, d}	8,86	Azúcar			

A, Equilibrio osmótico; B, Anti-ROS; C, Fitohormona/Ciclo Etileno; D, Señal; E, Estructural; F, Otros

Respecto a las características de los compuestos identificados, en los sobrenadantes de los cultivos con PEG 50%, la proporción de grupos químicos a los que pertenecen sus metabolitos concentrados fue menos diversa (solo tres grupos presentaron una representatividad superior al 10% de los metabolitos totales), respecto a los que se encontraban en los cultivos con PEG 5% donde se identificaron 4 grupos que mostraron una representatividad por encima del 10%. En cuanto a las células (fracción intracelular), en los cultivos con PEG 50%, se observó un mayor número de grupos (4) cuya representatividad superó el 10% respecto a los que se identificaron en los cultivos con PEG 5% donde sólo 2 grupos tuvieron una representatividad por encima del 10%.

En los sobrenadantes de los cultivos con PEG 50%, se acumularon proporcionalmente menos aminoácidos (20% del total, respecto a 36% en cultivos con PEG 5%), pero se acumularon más azúcares (20% del total, respecto a 14% en cultivos con PEG 5%) y más ácidos orgánicos (40% del total, respecto a 26% en cultivos con PEG 5%), suponiendo el resto de grupos minoritarios en torno a un 20%. Por otra parte, en los cultivos con PEG 50% no se acumularon ni compuestos fosfatados ni polialcoholes, los cuales llegaron a suponer un 12% y un 6% del total, respectivamente, en los cultivos con PEG 5%. Estos datos pueden observarse con más detalle en las figuras 57A.1 y 57B.1.

En las células (fracción intracelular), los compuestos de los cultivos con PEG 50%, se acumuló proporcionalmente menos aminoácidos (26% del total, respecto a 42% en cultivos con PEG 5%) y menos polialcoholes (2% del total, respecto a 9% en cultivos con PEG 5%), prácticamente la misma proporción de ácidos orgánicos (30% del total, respecto al 31% en cultivos con PEG 5%), pero se acumularon más azúcares (14% del total, respecto al 7% en cultivos con PEG 5%) y más compuestos fosfatados (14% del total, respecto al 4% en cultivos con PEG 5%), suponiendo el resto de grupos minoritarios en torno al 9%. Estos datos pueden observarse con más detalle en las figuras 57A.2 y 57B.2.

En cuanto a las funciones asociadas a cada compuesto concentrado, nuevamente las agrupamos en torno a cinco categorías. reguladores osmóticos (como osmolitos, sustancias osmoprotectoras y sustancias osmocompatibles), antioxidantes (reguladores de grupos reactivos y neutralizadores de especies reactivas del oxígeno), fitohormonas (como moléculas relacionadas con el control de fitohormonas, fitohormonas funcionales contra la sequía y reguladores del crecimiento), moléculas señal (involucradas en

activación o cambios de ruta, receptores o mensajeros específicos) y moléculas estructurantes (modificadores de estructuras como paredes y compartimentos vacuolares, y protectores como el conilferraldehído, la espermidina, el ácido sinápico, la prolina, la fenilalanina, el ácido β -aminoisobutírico, el siringaldehído, la trehalosa, el ácido felúrico o el ácido glucurónico), dependiendo del mecanismo de resistencia o tolerancia a la sequía con el que estuvieran más relacionados. Se incluyó la categoría ‘otros’ cuando el compuesto se relacionaba también con otras funciones de resistencia a estreses bióticos o abióticos no relacionados con la sequía.

Como resultado del análisis de metabolitos observamos variaciones significativas tanto en números netos de metabolitos identificados cuya concentración varió de forma significativa, como en la abundancia relativa en la representación de dichas funciones en ambos análisis de metabolitos concentrados. Aquí debe tenerse en cuenta que cada metabolito identificado puede ajustarse a más de un tipo de función contra la sequía (figura 57C).

En los sobrenadantes de los cultivos con PEG 50%, se observó que en torno al 10% de los metabolitos podían agruparse en tres de los grupos funcionales (no mostrando diferencia respecto a los cultivos con PEG 5%), mientras que algo más de la mitad podían agruparse en dos grupos funcionales (no mostrando diferencia respecto a los cultivos con PEG 5%). El resto (40%) se consideraron metabolitos monofuncionales (algo más del 40% en los cultivos con PEG 5%). En este caso, sólo los grupos funcionales de regulación osmótica y de antioxidantes lograron acumular 5 o más de los compuestos identificados, mientras que en los cultivos con PEG 5% las funciones capaces de agrupar a 20 metabolitos o más fueron la regulación osmótica, las fitohormonas y la señalización ante estrés.

En las células (fracción intracelular) de los cultivos con PEG 50%, casi el 15% de los metabolitos pudieron agruparse en tres grupos funcionales (respecto al 10% que se dio en los cultivos con PEG 5%), mientras que prácticamente la mitad de los mismos se agruparon en dos grupos funcionales, lo que supone resultados muy similares a los obtenidos con PEG 5%. El resto (37%) se consideraron metabolitos monofuncionales (no mostrando diferencia respecto a los cultivos con PEG 5%). De este modo, como ocurría en el sobrenadante bajo esta condición, los grupos funcionales de regulación osmótica, antioxidantes, fitohormonas y señales ante estrés lograron acumular 10 o más de los

compuestos identificados, mientras que en los cultivos con PEG 5% las funciones capaces de agrupar a 15 metabolitos o más fueron la regulación osmótica, las fitohormonas y la señalización ante estrés.

Por otra parte, el análisis de abundancia relativa de dichas funciones nos permite comparar más directamente entre ambas condiciones. Así, en los sobrenadantes de los cultivos con PEG 50% se acumularon casi un 20% más de metabolitos con función relacionada con la regulación osmótica que en los cultivos con PEG 5%, aunque en ambos casos esta función llegó a suponer más de un tercio en términos de abundancia relativa del total de las funciones. De igual modo, los cultivos con PEG 50% acumularon el doble de antioxidantes que los cultivos con PEG 5%. En cambio, en las funciones de fitohormona, señalización de estrés o estructurante, los cultivos con PEG 50% acumularon menor porcentaje relativo de compuestos que los cultivos con PEG 5%, siendo dichas diferencias de en torno al 30-50%.

Para finalizar, las células (fracción intracelular) de los cultivos con PEG 50% acumularon casi un 10% más de metabolitos con función de regulación osmótica, en torno a un 25% más de moléculas señal, y un 30% más de metabolitos con función estructurante, respecto a los cultivos con PEG 5%. En cambio, tanto en función antioxidante como en fitohormona, los cultivos con PEG 50% acumularon menor porcentaje de metabolitos que los cultivos con PEG 5%, siendo dichas diferencias de en torno al 20 y 40% superiores respectivamente. Estos datos pueden observarse en la figura 57D.

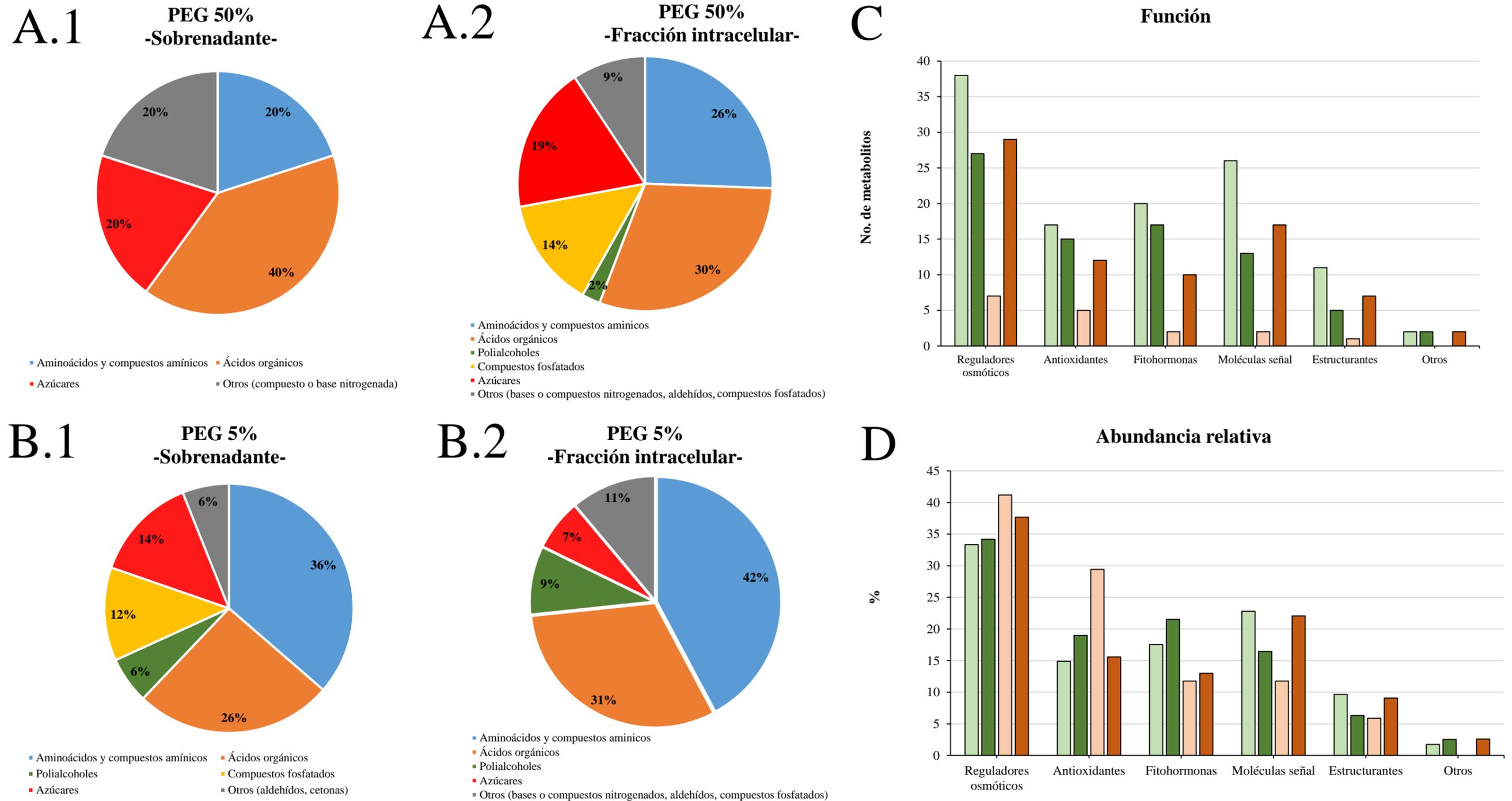


Figura 57. Análisis de componentes y funciones de los metabolitos detectados en cultivos puros de *Microbacterium sp. 3J1* expuestos a PEG. Se muestran la abundancia relativa de los metabolitos según su origen químico tanto en cultivos expuestos a PEG 5% (paneles A) como a PEG 50% (paneles B) para sobrenadante (paneles 1) y fracción intracelular (paneles 2). Por otra parte se indican el número de metabolitos detectados relacionado con cada función de anti estrés (C), así como la abundancia relativa de metabolitos por función (D); las barras de color verde claro corresponden con sobrenadante de cultivo expuesto a PEG 5%; las barras verde oscuras, con la fracción intracelular de cultivo expuesto a PEG 5%; las barras naranja claro, a sobrenadante de cultivo expuesto a PEG 50%; y las barras naranja oscuro, con la fracción intracelular expuesta a PEG 50%.

CAPÍTULO III

El objetivo de este capítulo consistió en conocer el grado de bioseguridad de las cepas xerotolerantes estudiadas. Cualquier producto microbiológico que se libere al medio ambiente debe ser inocuo y seguro tanto para el ser humano como para el medio ambiente. Para el caso concreto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (BPCP o PGPR), aún no existe un protocolo concreto que nos permita garantizar la inocuidad para usarse como agente inoculante sobre plantas. De este modo, se planteó combinar una serie de ensayos basados en modelos de organismos presentes en el medio ambiente que pueden verse potencialmente afectados, así como de modelos de infección para el ser humano. La combinación de ensayos de bioseguridad con organismos tales como *Caenorhabditis elegans*, *Eisenia foetida*, *Mus musculus* o *Daphnia magna*, sirven de modelo para reconocer posibles interferencias a cualquier nivel, incluido el humano, que pudiera causar el uso de las cepas en estudio en el caso de liberarse al medio ambiente. Como resultado final se obtuvo un valor numérico indicativo del nivel de seguridad de las cepas que se le denominó índice de seguridad humana y ambiental, ISHA (o *EHSI*, por sus siglas en inglés, *Environmental and Human Safety Index*). Como controles para los distintos ensayos descritas como bacterias promotoras del crecimiento en plantas se emplearon así mismo las cepas *Pseudomonas putida* KT2440, *Burkholderia cepacia* CC-A174, *Serratia marcescens* CTC 10211, *Serratia entomophila* CIP 102919, *Serratia proteamaculans* NCTN 394 y *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Además de estas cepas se incluyó una colección de cepas descritas como promotoras del crecimiento de plantas facilitadas por la empresa Investigaciones y Aplicaciones Biotecnológicas (IAB, Valencia, España) y que incluyeron a *Pseudomonas fluorescens* IABPF05, *Azotobacter vinelandii* IABAV02, *Rhizobium leguminosarum* IABRL05 y *Bacillus subtilis* IABBS05.

1. Ensayos con organismos vivos

1.1. Ensayos de sensibilidad microbiana con *Escherichia coli* MC4100

Los ensayos de sensibilidad con *Escherichia coli* MC4100 permiten simular el efecto de cambios producidos en el medio por la cepa en estudio sobre la comunidad microbiana del medio. Estos ensayos se realizaron en base al modelo propuesto por Smal y col. en 1994 (Small *et al.*, 1994), para observar las modificaciones debidas a cambios en el pH, producción de sustancias antimicrobianas o tóxicas que alteran el crecimiento normal en esta cepa. Para este ensayo se emplearon el sobrenadante filtrado de cultivos en

crecimiento exponencial de las cepas xerotolerantes, tal y como se indica en el apartado 8.1 de *Materiales y Métodos*.

Los valores de supervivencia de *E. coli* MC4100 tras la incubación con el sobrenadante del cultivo de la cepa control *P. putida* KT2440 y con el medio de cultivo 1xM9 libre de bacterias, fueron cercanos al 100%. Sin embargo, dicho valor se redujo a un 50% y un 35% cuando se emplearon los sobrenadantes de las cepas descritas como patógenas *B. cepacia* CC-A174 y *S. proteamaculans* PADG 3630, respectivamente. Ninguno de los sobrenadantes de cultivos de las cepas xerotolerantes estudiadas mostró diferencia significativa respecto a los valores de supervivencia de *E. coli* MC4100 obtenidos con los sobrenadantes de cultivos de *P. putida* KT2440 o respecto al medio 1xM9 libre de bacterias (figura 58), siendo la supervivencia superior al 95% en todos los casos.

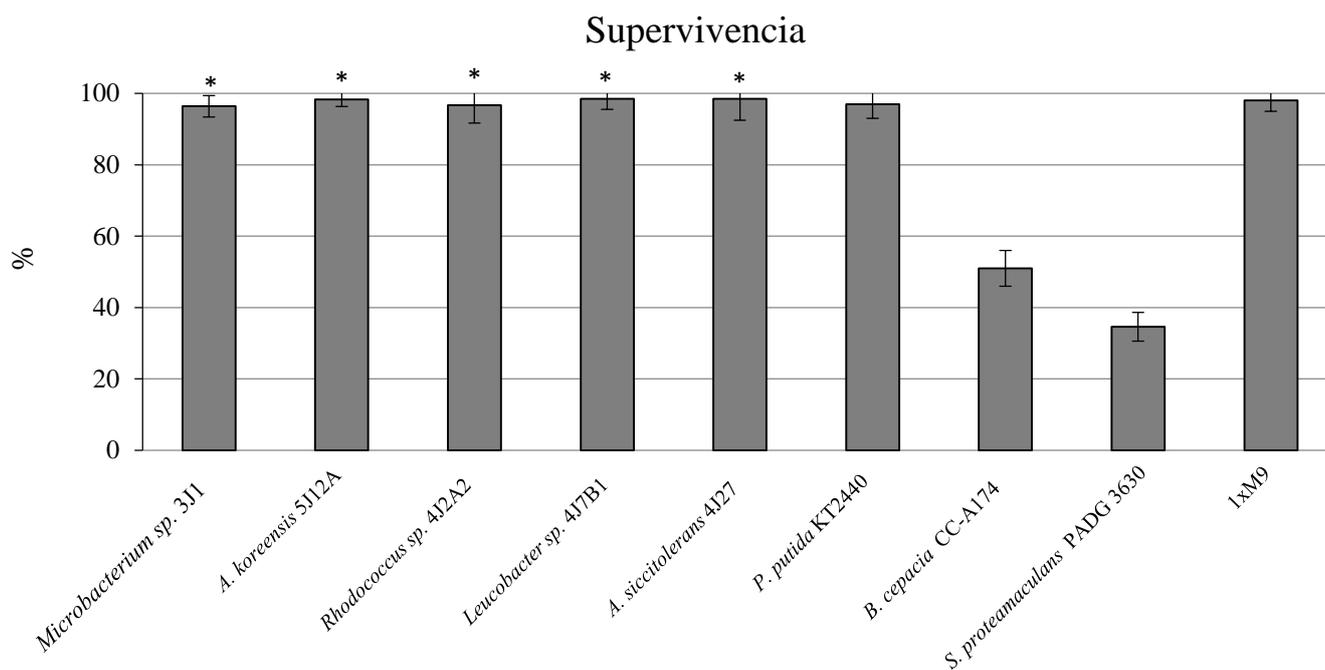


Figura 58. Supervivencia de *E. coli* MC4100 a la exposición de sobrenadantes de cultivos de aislados bacterianos durante 1,5h. Se muestra el porcentaje de supervivencia (%) tras el tiempo de contacto. Como control negativo de toxicidad sobre *E. coli*, se muestran el medio 1xM9 y el sobrenadante del cultivo *P. putida* KT2440, mientras los controles positivos de patogenicidad se empleó el sobrenadante de *B. cepacia* CC-A174 y *S. proteamaculans* PADG 3630. Los asteriscos (*) indican las cepas xerotolerantes ensayadas que muestran diferencias significativas respecto a las cepas control *B. cepacia* CC-A174 y *S. proteamaculans* PADG 3630.

1.2. Ensayo de patogenicidad con *Caenorhabditis elegans*

El ensayo de patogenicidad basado en *C. elegans* es uno de los más empleados como modelo de patogenicidad a nivel humano, pero también puede usarse como modelo para estudiar el nivel de seguridad sobre el medio ambiente. Su utilización es muy amplia y está bien estudiada, lo que permite realizar predicciones con un buen grado de fiabilidad en ambos contextos (Darby *et al.*, 1999, Schulenburg & Ewbank, 2004, Zachow *et al.*, 2009). Para estudiar el posible efecto patógeno de los microorganismos en estudio sobre *C. elegans*, se cultivaron estos microorganismos en medio PDA. Una vez alcanzado un crecimiento visible pero no excesivo, se añadieron 5 individuos juveniles de *C. elegans* a cada placa, y se incubaron las placas durante 7 días a 20°C. Durante este periodo de incubación, se registró el número de huevos, de neonatos o juveniles, de adultos y de individuos muertos, tal y como se indica en el apartado 8.2 de *Materiales y Métodos*. Como cepas no patógenas para este ensayo se usaron la cepa de alimentación habitual, *Escherichia coli* OP50, y la BPCP *P. putida* KT2440 (Navas *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2014) como controles negativos de patogenicidad. Por otra parte, se emplearon las cepas *B. cepacia* CC-A174 y *S. proteamaculans* PADG 3630, también BPCP como controles positivos de patogenicidad (Baldwin *et al.*, 2004, Schulenburg & Ewbank, 2004). Como control adicional de patogenicidad del ensayo, se usó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PA14, conocida patógena para estos organismos, dado que algunas cepas de esta especie también son BPCPs (Islam *et al.*, 2014).

El número de huevos depositados por *C. elegans* cuando estos se incubaron con las cepas consideradas como control negativo *E. coli* OP50 ni *P. putida* KT2440 fue de 326 y 309 huevos al final del ensayo, respectivamente, no mostrando diferencias significativas. Sin embargo, cuando los individuos de *C. elegans* se incubaron en presencia de las cepas, *B. cepacia* CC-A174, *S. proteamaculans* NCTC394 y *P. aeruginosa* PA14, se observó una ausencia casi total de los huevos depositados al final del ensayo. Por otra parte, cuando los nematodos se incubaron en placas con las cepas *Microbacterium sp.* 3J1 y *Rhodococcus sp.* 4J2A2, el número de huevos depositado por *C. elegans* fue de 584 y 635, respectivamente, observándose una diferencia significativa del doble respecto al número de huevos detectado con los nematodos incubados en placas con *E. coli* OP50 al final del ensayo. Cuando los nematodos se incubaron en placas con *A. koreensis* 5J12A, también se observó un incremento del número de huevos con respecto a la placa incubada en presencia de *E. coli* OP50, llegando a contarse cerca de 375 y 326 huevos, lo que

supone un 15% más en el primer caso. En los casos de nematodos cultivados con las cepas *Leucobacter sp.* 4J7B1 y *A. siccitolerans* 4J27 se observó un número de huevos superior los 300 por placa en el último punto de muestreo, suponiendo una pequeña diferencia (inferior al 8% respecto a las placas cultivadas en presencia de *E. coli* OP50) (figura 59).

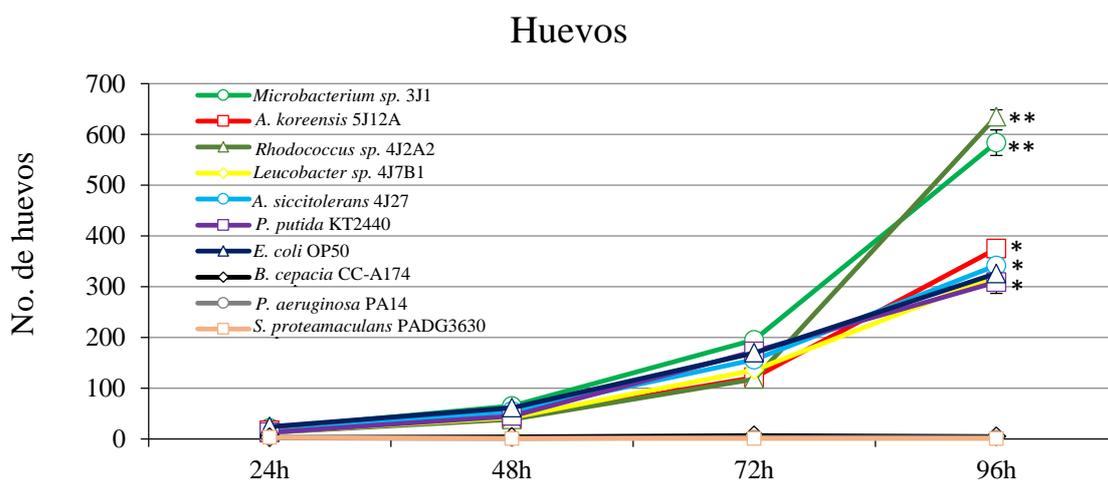


Figura 59. Número de huevos de *C. elegans* en presencia de distintas cepas microbianas. En ordenadas se muestra el número medio de huevos por placa contabilizado durante cada punto de muestreo indicado en abscisas. Se indica con un asterisco (*) las cepas xerotolerantes ensayadas que muestran diferencia significativa sobre los controles positivos, y con dos asteriscos (**), aquellas cepas xerotolerantes ensayadas que, además, mostraron diferencia significativa con los controles negativos.

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en el número de individuos juveniles cuando los nematodos se cultivaron con las cepas control negativo *E. coli* OP50 y *P. putida* KT2440, siendo estos de en torno a 1.200 juveniles al final del ensayo. Por otra parte, cuando los nematodos se incubaron con las cepas control positivo en patogenicidad *S. proteamaculans* NCTC394 y *P. aeruginosa* PA14 se observó un número muy reducido de juveniles al final del ensayo cercano a 15 juveniles, mientras que cuando se cultivaron con *B. cepacia* CC-A174, se observaron unos 25 juveniles al final del ensayo, lo que representa un 40% más que cuando se incubaron con *S. proteamaculans* PADG 3630 o *P. aeruginosa* PA14. En el caso de los nematodos incubados con a la cepa *Microbacterium sp.* 3J1, se observaron 1.325 juveniles, lo que representa un 5% más que cuando se incubaron con *E. coli* OP50 y *P. putida* KT2440 al final del ensayo. En el caso de nematodos expuestos a *A. koreensis* 5J12A y a *Rhodococcus sp.* 4J2A2 no se observó

diferencia significativa respecto al número de juveniles contabilizados cuando la cepa empleada fue *E. coli* OP50 o *P. putida* KT2440. Por último, en el caso de nematodos incubados con *Leucobacter sp.* 4J7B1 y con *A. siccitolerans* 4J27 se observaron 1.165 juveniles, lo que representa en torno a un 10% menos juveniles que los observados cuando las placas de cultivo contenían *E. coli* OP50 o *P. putida* KT2440 (figura 60).

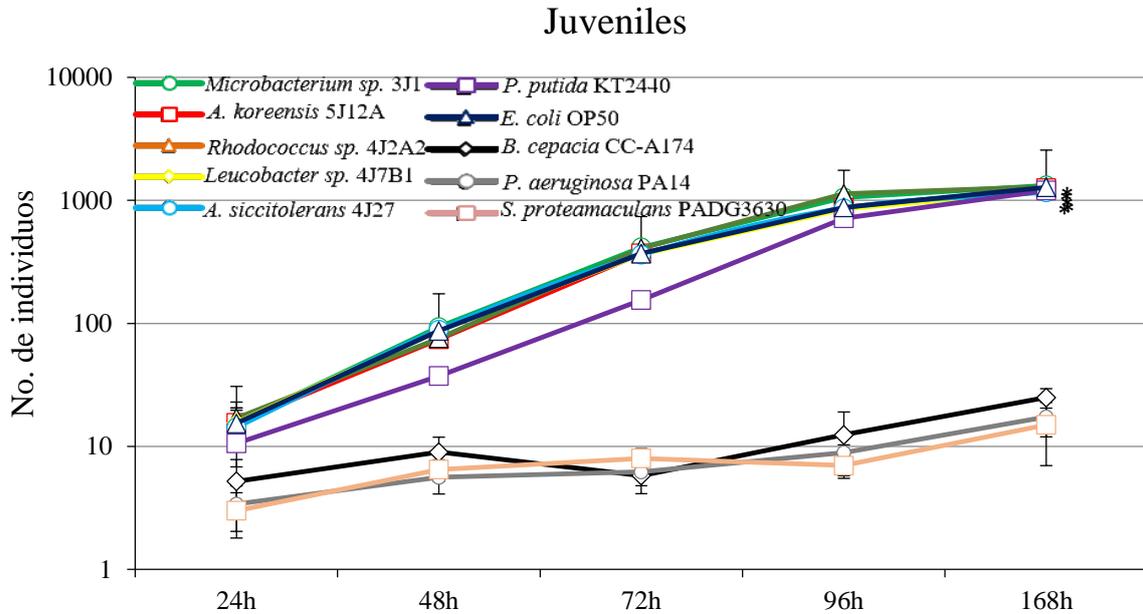


Figura 60. Número de juveniles de *C. elegans* en presencia de distintas cepas microbianas. En ordenadas se muestra el número medio de juveniles por placa contabilizado durante cada punto de muestreo indicado en abscisas. Se indica con un asterisco (*) las cepas xerotolerantes ensayadas que muestran diferencia significativa sobre los controles positivos, y con dos asteriscos (**), aquellas cepas xerotolerantes ensayadas que, además, mostraron diferencia significativa con los controles negativos.

Cuando los nematodos se incubaron con las cepas *E. coli* OP50 y *P. putida* KT2440 se observaron 1.103 y 1.045 individuos adultos al final del ensayo, respectivamente, lo que supuso una diferencia significativa del 5%. Por otra parte, cuando se incubaron con las cepas control positivo en patogenicidad *B. cepacia* CC-A174, *S. proteomaculans* NCTC394 y *P. aeruginosa* PA14 se observaron 41, 33 y 25 individuos adultos al final del ensayo. Por otra parte, cuando se incubaron con la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 se observaron 1.059 adultos, lo que supuso casi un 5% menos que los observados en presencia de *E. coli* OP50. En el caso de los nematodos incubados con la cepa *A. siccitolerans* 4J27 también se observaron valores por debajo de los estimados cuando se utilizó *E. coli* OP50 como fuente alimenticia.

Al final del ensayo se observaron unos 1.000 adultos cuando los nematodos estaban en presencia de *A. siccitolerans* 4J27, lo que supone casi un 10% menos de los encontrados cuando la cepa empleada fue *E. coli* OP50. Cuando las cepas empleadas fueron *A. koreensis* 5J12A y *Rhodococcus sp.* 4J2A2 se observó una reducción significativa respecto al número de adultos contabilizados respecto a cuando se empleó *E. coli* OP50, siendo este número de 960 adultos, lo que representa un 13% de reducción respecto al número de adultos encontrados con *E. coli* OP50. Por último, cuando los nematodos se incubaron con *Leucobacter sp.* 4J7B1 se observó una cantidad de adultos en torno a un 30% inferior respecto a cuando se incubaron con *E. coli* OP50 (figura 61).

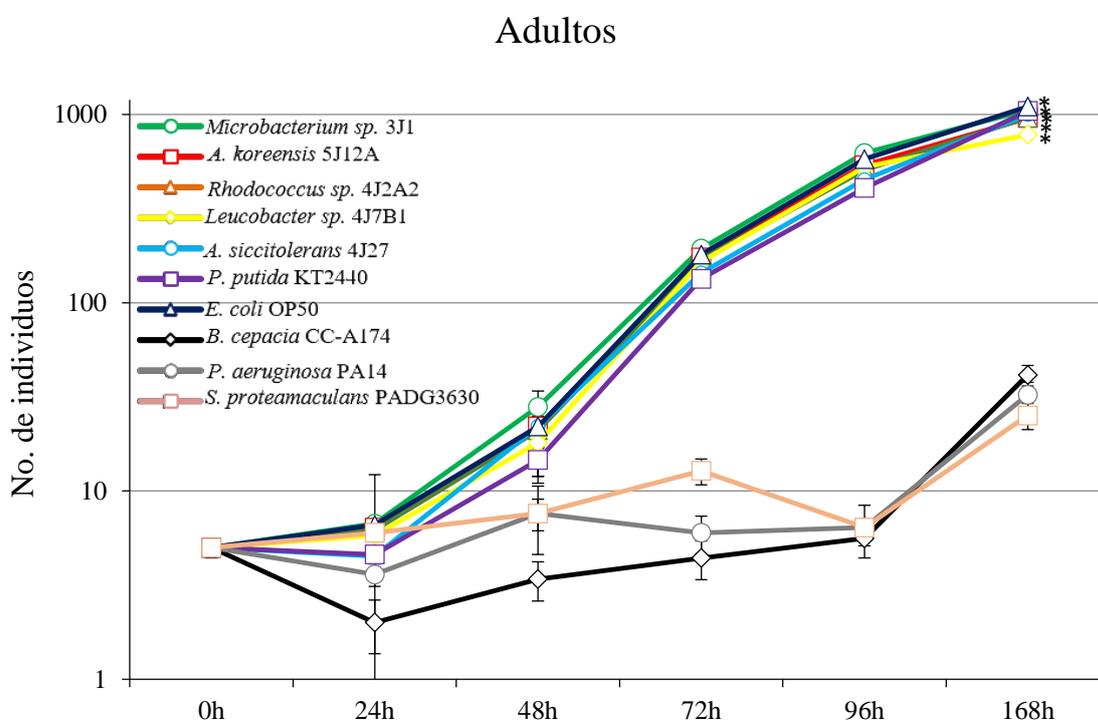


Figura 61. Número de adultos de *C. elegans* en presencia de distintas cepas microbianas. En ordenadas se muestra el número medio de adultos por placa contabilizado durante cada punto de muestreo indicado en abscisas. Se indica con un asterisco (*) las cepas xerotolerantes ensayadas que muestran diferencia significativa sobre los controles positivos, y con dos asteriscos (**), aquellas cepas xerotolerantes ensayadas que, además, mostraron diferencia significativa con los controles negativos.

El número de individuos muertos o cadáveres encontrados cuando los nematodos se incubaron con *E. coli* OP50 y *P. putida* KT2440 fue inferior a 1 al final del ensayo en ambos casos. Sin embargo, cuando los nematodos se incubaron con *B. cepacia* CC-A174, *S. proteomaculans* NCTC394 y *P. aeruginosa* PA14 se observaron entre 4 y 6 individuos muertos al final del ensayo. Los individuos muertos encontrados cuando los nematodos se incubaron con las cepas xerotolerantes nunca llegó a superar a un cadáver por placa al final del ensayo, lo que supone una ausencia de diferencia significativa con respecto a cuando se incubaron con las cepas control negativo *E. coli* OP50 y *P. putida* KT2440. Sin embargo, sí se observó una diferencia significativa cuando los nematodos se incubaron con *B. cepacia* CC-A174, *S. proteomaculans* NCTC394 y *P. aeruginosa* PA14, llegando a observarse entre 4 y 6 individuos muertos contabilizados lo que suponen valores de 5 a 10 veces mayores a los observados cuando se incubaron con *E. coli* OP50 o con *P. putida* KT2440 (figura 62).

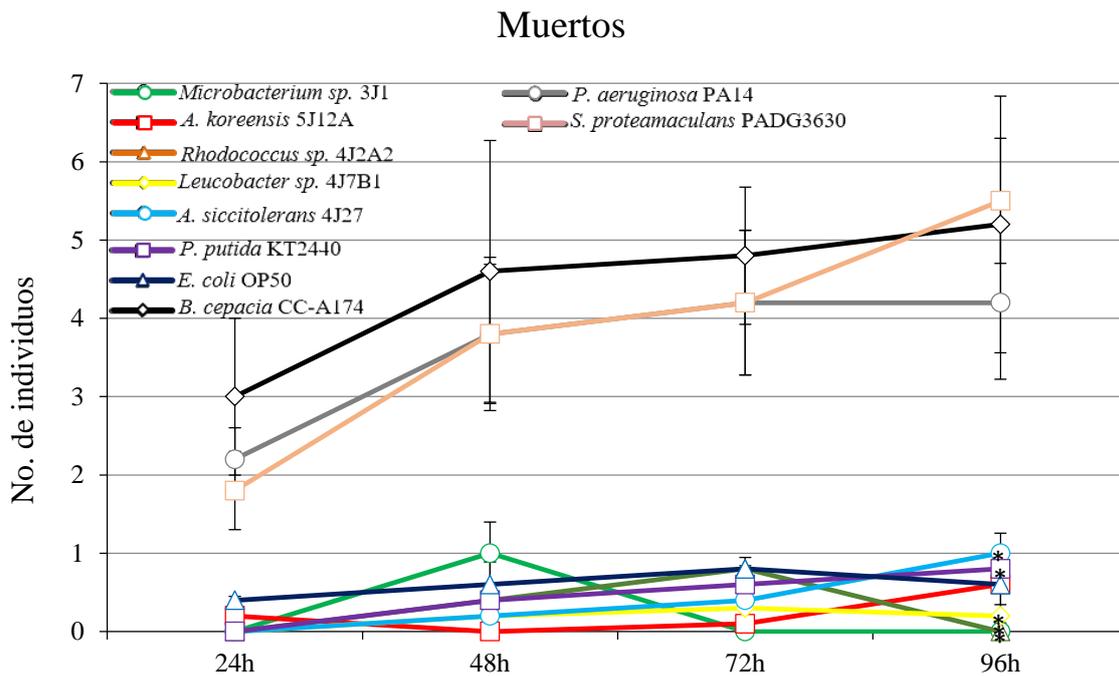


Figura 62. Número de individuos muertos de *C. elegans* en presencia de distintas cepas microbianas. En ordenadas se muestra el número medio de individuos muertos por placa contabilizado durante cada punto de muestreo indicado en abscisas. Se indica con un asterisco (*) las cepas xerotolerantes ensayadas que muestran diferencia significativa sobre los controles positivos, y con dos asteriscos (**), aquellas cepas xerotolerantes ensayadas que, además, mostraron diferencia significativa con los controles negativos.

1.3. Ensayos de ecotoxicidad con crisopas (*Chrysoperla carnea*) y mariquitas (*Adalia bipunctata*)

A nivel ecológico, es importante evaluar el impacto de la adición de un microorganismo a nivel infraedáfico, así como a nivel supraedáfico, esto es, el efecto que causa la adición de estos microorganismos sobre de especies animales que habitan en el entorno de la planta inoculada. En este caso, se analizó el efecto potencial sobre dos tipos de insectos beneficiosos para las plantas: crisopas y mariquitas. En ambos casos, se ensayaron las cepas en formato liofilizado en trehalosa, mezcladas con la alimentación hasta alcanzar una cantidad de 10^7 - 10^8 UFC/g, de manera periódica. A lo largo de dos semanas de ensayo se registró el peso, la longitud y la mortalidad de las ninfas (fases larvarias) de los insectos mencionados tal y como se describe en el apartado 8.3 de *Materiales y Métodos*. En estos estudios se utilizó a *P. putida* KT2440 y a *B. cepacia* CC-A174 como controles negativos, así como un control más en el que se utilizó la alimentación habitual suplementada con trehalosa estéril. Por otra parte, las cepas *S. entomophila* CIP102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630 se usaron como controles positivos tóxicos para dichas especies al afectarlas en su desarrollo así como por haberse descrito como BPCP (Nongkhilaw & Joshi, 2014), lo que permite una mejor comparación y análisis de resultados. En todos los casos se determinó que el nivel de supervivencia de las cepas estudiadas fue superior a 90% tras el proceso de liofilización en trehalosa.

1.3.1. Bioensayos con crisopas

El peso de las crisopas alimentadas con dieta suplementada con liófilos de las cepas *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174 en trehalosa, así como con trehalosa libre de células fue de en torno a 4 mg al final del ensayo, no mostrando diferencia significativa entre estas condiciones. Los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *S. entomophila* CIP102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630 alcanzaron valores de 2,6 mg al final del ensayo, no mostrando diferencia significativa entre ellas. Los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas xerotolerantes no mostraron en ningún caso diferencia significativa respecto a los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *P. putida* KT2440 o *B. cepacia* CC-A174 (figura 63).

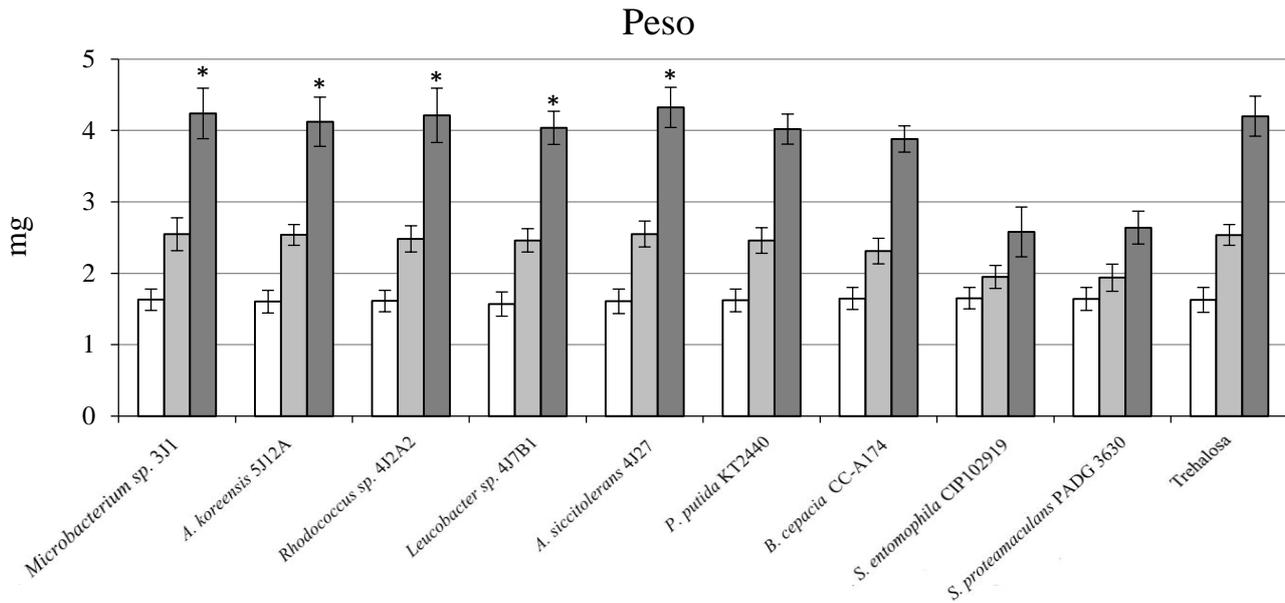


Figura 63. Peso de crisopas alimentadas con dieta suplementada con las cepas en ensayo. Se muestra el peso en mg a lo largo del periodo de ensayo. Las barras blancas indican los registros de peso a los 0 días; las barras grises claras, el peso a los 7 días; y las barras grises oscuras, los pesos a los 14 días de iniciar el ensayo. Se indica con un asterisco (*) la diferencia significativa en peso alcanzado por las crisopas alimentadas con dieta suplementada con las cepas xerotolerantes sobre el peso de las crisopas alimentadas con los controles positivos.

La longitud de los individuos alimentados con dieta suplementada con liófilos de las cepas *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174 en trehalosa, así como con trehalosa libre de células, alcanzaron valores en torno a 7,65 mm al final del ensayo, no mostrando diferencia significativa entre estas condiciones. Los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *S. entomophila* CIP102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630 alcanzaron valores de 6 mm al final del ensayo, no mostrando diferencia significativa entre ellas. Los individuos expuestos a las cepas xerotolerantes presentaron una longitud de en torno a 8 mm, no mostrando en ningún caso diferencia significativa respecto a los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *P. putida* KT2440 o *B. cepacia* CC-A174 (figura 64).

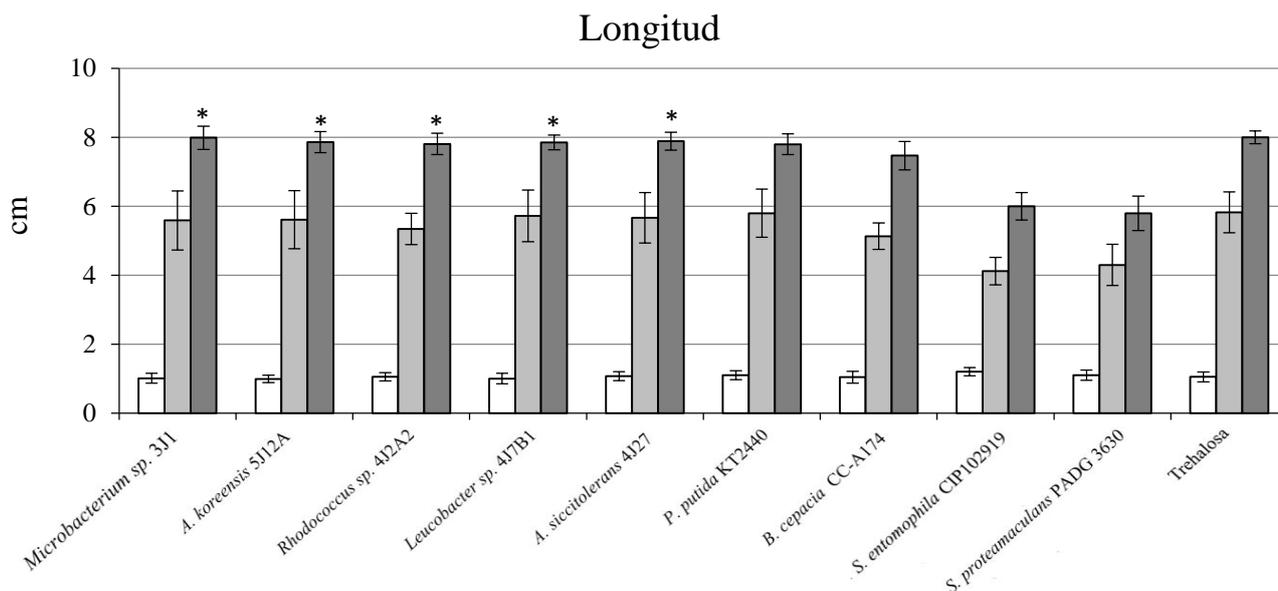


Figura 64. Longitud de crisopas alimentadas con dieta suplementada con las cepas en ensayo. Se muestra la longitud en mm a lo largo del periodo de ensayo. Las barras blancas indican los registros de peso a los 0 días; las barras grises claras, el peso a los 7 días; y las barras grises oscuras, los pesos a los 14 días de iniciar el ensayo. Se indica con un asterisco (*) la diferencia significativa en longitud alcanzada por las crisopas alimentadas con dieta suplementada con las cepas xerotolerantes sobre la longitud de las crisopas alimentadas con los controles positivos.

Por último se estudió la mortalidad en los individuos alimentados con dieta suplementada con liófilos de las cepas *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174 en trehalosa, los cuales alcanzaron valores en torno a 10% al final del ensayo, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. En el caso de los individuos alimentados con dieta suplementada con trehalosa libre de células, estos mostraron una mortalidad del 20%, el doble respecto a los individuos alimentados con dieta suplementada con liófilos de las cepas *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174 aunque hemos de tener en cuenta que hasta un 20% de mortalidad puede considerarse mortalidad natural en bioensayos (Urbano *et al.*, 2013). Los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *S. entomophila* CIP102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630 alcanzaron valores de mortalidad del 100 y del 90%, respectivamente. Por otra parte, los individuos alimentados con dieta suplementada con la cepa *Rhodococcus* sp. 4J2A2 fueron los únicos en los que se observó una ausencia total de mortalidad. Los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *Microbacterium* sp. 3J1, *A. koreensis* 5J12A y *A. siccitolerans* 4J27 alcanzaron valores de mortalidad de en torno al 10%, no mostrando diferencias significativas con los valores alcanzados por los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas control negativo *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-

A174, mientras que fueron 9-10 veces inferiores a los alcanzados por los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas control positivo *S. entomophila* CIP102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630. Por otra parte, los individuos alimentados con dieta suplementada con *Leucobacter sp.* 4J7B1, alcanzaron valores de mortalidad de en torno al 20%, mostrando valores semejantes a los obtenidos por los individuos alimentados con dieta suplementada con trehalosa, siendo hasta 5 veces inferiores a los mostrados por los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas control positivo *S. entomophila* CIP102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630 (figura 65).

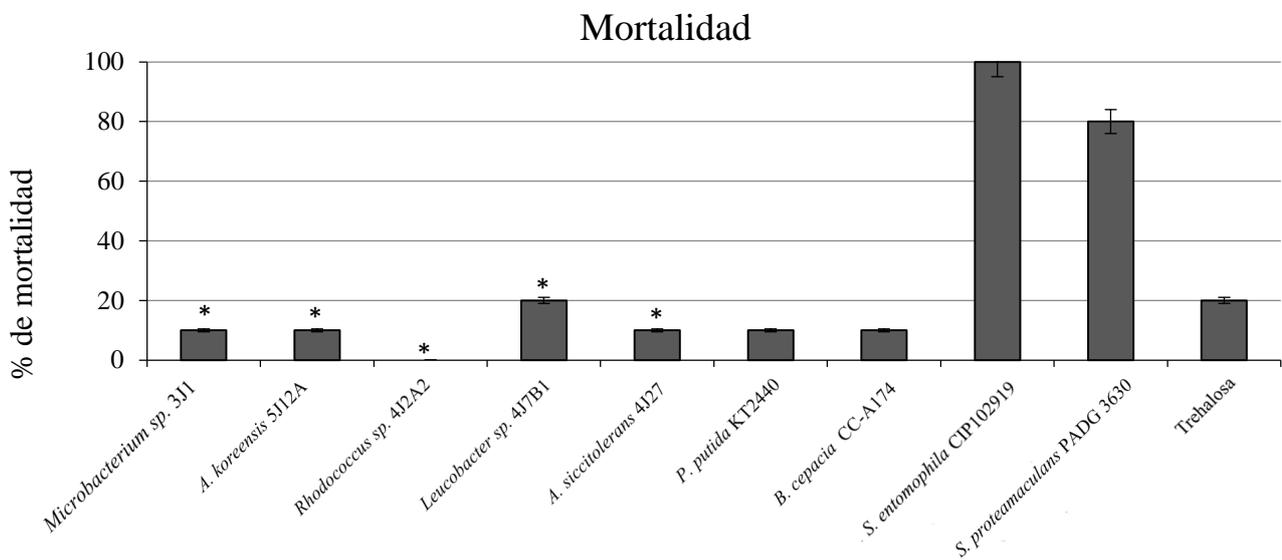


Figura 65. Mortalidad en crisopas alimentadas con dieta suplementada con las cepas en ensayo. Se muestra el porcentaje de organismos muertos tras la exposición durante 14 días a las cepas en estudio junto con la desviación típica obtenida en las repeticiones de dicho ensayo. Se indica con un asterisco (*) las cepas xerotolerantes ensayadas que muestran diferencia significativa sobre los controles positivos.

1.3.2. Bioensayos con mariquitas

El peso de las mariquitas alimentadas con dieta suplementada con liófilos de las cepas *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174 en trehalosa, así como con trehalosa libre de células fue de en torno a 9 mg al final del ensayo, no mostrando diferencia significativa entre estas tres condiciones. Los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *S. entomophila* CIP102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630 alcanzaron valores de 3 mg al final del ensayo, no mostrando diferencia significativa entre ellas. Los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas xerotolerantes no mostraron en ningún

caso diferencia significativa respecto a los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *P. putida* KT2440 o *B. cepacia* CC-A174, aunque esta diferencia sí que fue significativa con respecto a los alimentados con *S. entomophila* CIP 102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630 (figura 66).

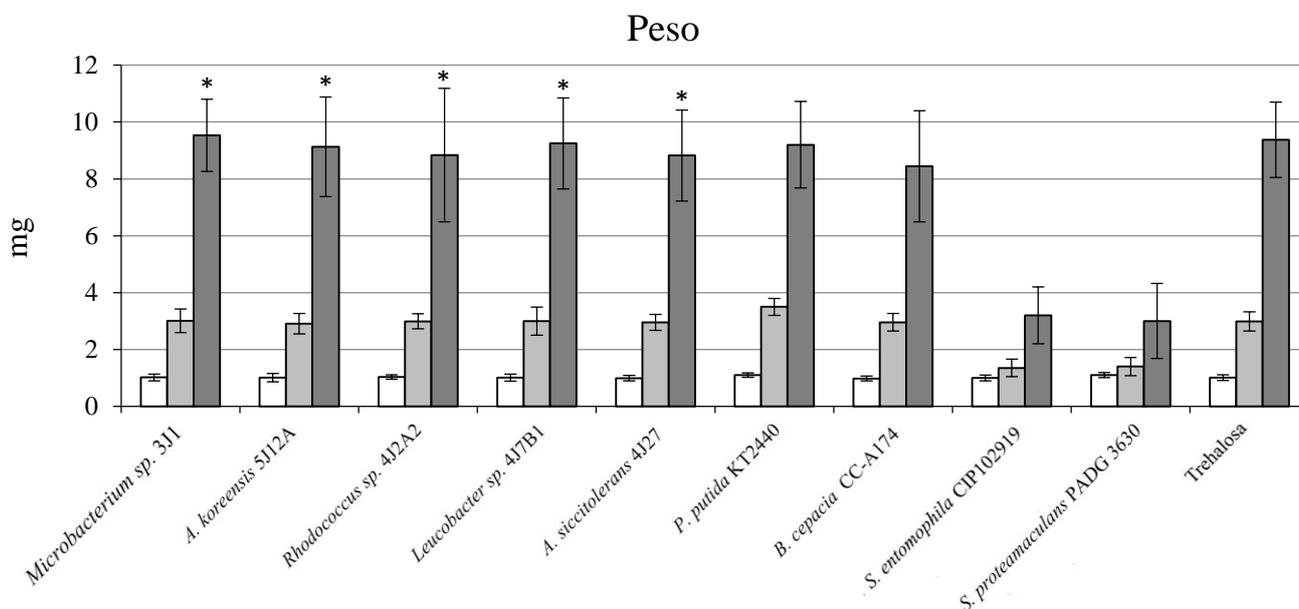


Figura 66. Peso de mariquitas alimentadas con dieta suplementada con las cepas en ensayo. Se muestra el peso en mg a lo largo del periodo de ensayo. Las barras blancas indican los registros de peso a los 0 días; las barras grises claras, el peso a los 7 días; y las barras grises oscuras, los pesos a los 14 días de iniciar el ensayo. Se indica con un asterisco (*) la diferencia significativa en peso alcanzado por las mariquitas alimentadas con dieta suplementada con las cepas xerotolerantes sobre el peso de las mariquitas alimentadas con los controles positivos.

La longitud de los individuos alimentados con dieta suplementada con liófilos de las cepas *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174 en trehalosa, así como con trehalosa libre de células, no fue estadísticamente diferente entre estas condiciones, alcanzando valores en torno a 4,3 mm al final del ensayo. Los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *S. entomophila* CIP102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630 alcanzaron valores de 3,2-3,5 mm al final del ensayo, no mostrando diferencia significativa entre ellas. Los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas xerotolerantes no mostraron una longitud estadísticamente diferente respecto a la longitud de los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *P. putida* KT2440 o *B. cepacia* CC-A174 (figura 67).

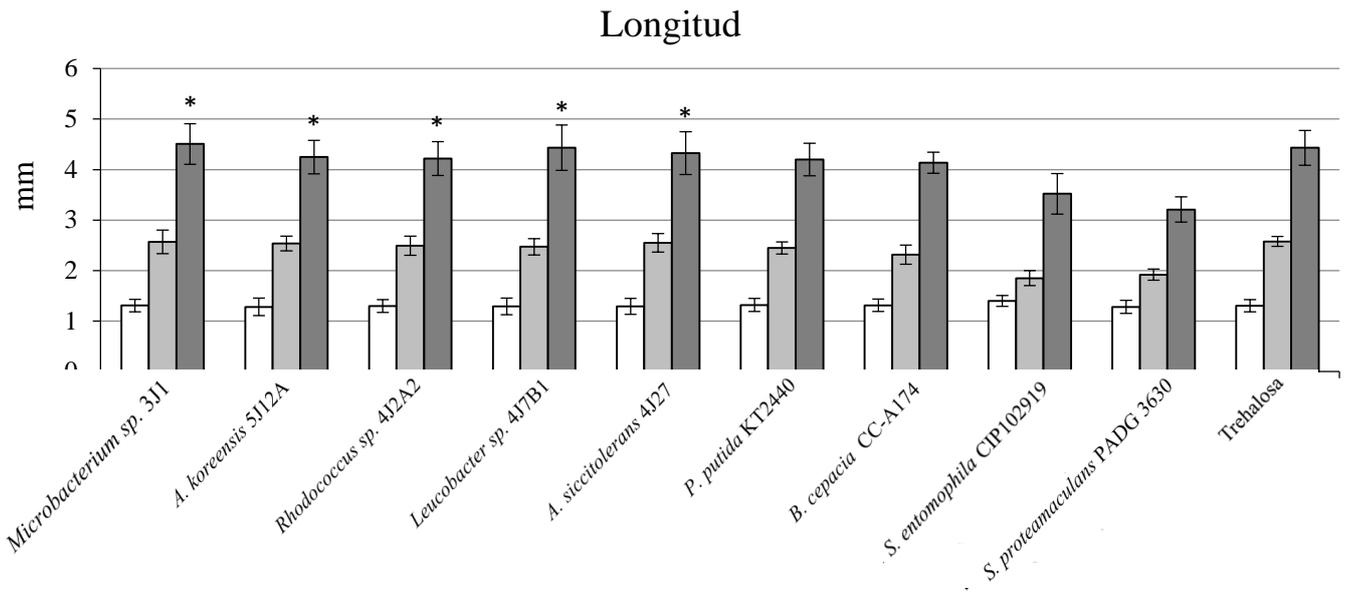


Figura 67. Longitud de mariquitas alimentadas con dieta suplementada con las cepas en ensayo. Se muestra la longitud en mm a lo largo del periodo de ensayo. Las barras blancas indican los registros de peso a los 0 días; las barras grises claras, el peso a los 7 días; y las barras grises oscuras, los pesos a los 14 días de iniciar el ensayo. Se indica con un asterisco (*) la diferencia significativa en longitud alcanzada por las mariquitas alimentadas con dieta suplementada con las cepas xerotolerantes sobre la longitud de las mariquitas alimentadas con los controles positivos.

Por último se estudió la mortalidad en los individuos alimentados con dieta suplementada con liófilos de las cepas *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174 en trehalosa, la cual alcanzó valores en torno a 30% al final del ensayo, no mostrando diferencia significativa entre estas condiciones. En el caso de los individuos alimentados con dieta suplementada con trehalosa libre de células, estas mariquitas mostraron una mortalidad del 20%, siendo esta diferencia de en torno a un 30% inferior con los individuos alimentados con dieta suplementada con liófilos de las cepas *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174. Los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *S. entomophila* CIP102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630 presentaron una mortalidad del 100%. Por otra parte, los individuos alimentados con dieta suplementada con la cepa *A. koreensis* 5J12A fueron los únicos que mostraron 0% de mortalidad. Los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *Microbacterium* sp. 3J1 y *A. siccitolerans* 4J27 alcanzaron valores de mortalidad de en torno al 10%, no mostrando diferencias significativas con los valores alcanzados por los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas control negativo *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174, mientras que fueron 10 veces inferiores a los alcanzados por los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas control positivo *S. entomophila* CIP102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630. Por

otra parte, los individuos alimentados con dieta suplementada con *Rhodococcus sp.* 4J2A2 y *Leucobacter sp.* 4J7B1, presentaron una mortalidad de en torno al 20%, mostraron valores semejantes a los obtenidos por los individuos alimentados con dieta suplementada con la condición control negativo de trehalosa, siendo hasta 5 veces inferiores a los mostrados por los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas control positivo *S. entomophila* CIP102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630 (figura 68).

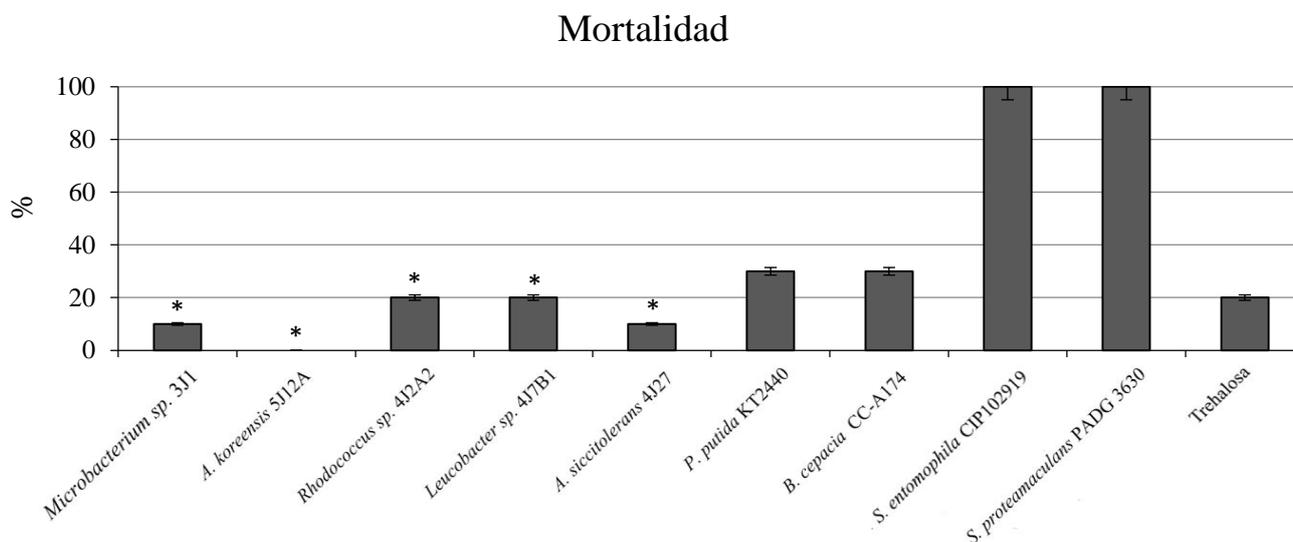


Figura 68. Mortalidad en mariquitas alimentadas con dieta suplementada con las cepas en ensayo. Se muestra el porcentaje de organismos muertos tras la exposición prolongada durante 14 días a las cepas en estudio junto con la desviación típica obtenida en las repeticiones de dicho ensayo. Se indica con un asterisco (*) las cepas xerotolerantes ensayadas que muestran diferencia significativa sobre los controles positivos.

1.4. Ensayo de ecotoxicidad con lombrices de tierra (*Eisenia foetida*)

Las lombrices de tierra (*Eisenia foetida*) son organismos altamente resistentes a agentes patógenos y hay escasas descripciones de cepas capaces de ocasionarles enfermedad por infección. Esto se debe en parte a un sistema inmune muy desarrollado (Schulenburg *et al.*, 2007). Pese a ello, estos organismos edáficos altamente beneficiosos para la estructuración y enriquecimiento orgánico del suelo, son muy sensibles a los cambios en su hábitat (Neuhauser & Callahan, 1990). La adición al medio de sustancias tóxicas vermícidas o vermífugas pueden causar gran estrés, afectando a su presencia en el suelo, así como en su desarrollo y capacidad reproductiva. Para analizar si las cepas estudiadas

tenían un efecto negativo sobre el ciclo de vida de lombrices de tierra, se suministraron 10^7 - 10^8 UFC/g de las cepas, en formato liofilizado, mezcladas con la alimentación cada 48-72 horas. A lo largo de dos semanas de ensayo se registró el peso, la longitud y la mortalidad de los individuos, así como la cantidad de ootecas y neonatos, tal y como se describe en el apartado 8.4 de *Materiales y Métodos*. Mediante la adición de las cepas como parte de la dieta pretendemos estudiar si la inoculación de las mismas en el suelo puede causar efectos adversos sobre la comunidad de lombrices. En estos estudios se utilizó a *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174 como controles negativos por su inocuidad sobre *E. foetida*, así como un control adicional análogo a los comentados anteriormente. En el caso de los ensayos de reproducción, la cepa *B. cepacia* CC-A174 actúa como un control negativo, pero con valores inferiores a los mostrados por los otros dos descritos anteriormente. Por otra parte, se empleó la cepa *S. entomophila* CIP102919 como control positivo al afectar a otros organismos del suelo en su fase larvaria (biocontrol) (Nuñez-Valdez *et al.*, 2008). También se usó NaCl al 2% como control positivo al haberse descrito su efecto letal para lombrices.

El peso de los individuos alimentados con dieta suplementada con liófilos de las cepas *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174 en trehalosa, así como con trehalosa libre de células fue de en torno a 0,9 g al final del ensayo, no mostrando diferencia significativa entre estas tres condiciones. Los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *S. proteamaculans* PADG 3630, así como con NaCl 2%, alcanzaron valores de 0,6 g al final del ensayo, no mostrando diferencia significativa entre ellas. Los individuos alimentados con dieta suplementada con la cepa *Leucobacter sp.* 4J7B1 mostraron valores en torno a un 10% superiores a los de los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *P. putida* KT2440 o *B. cepacia* CC-A174, y cerca de un 40% superiores a los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *S. proteamaculans* PADG 3630, así como con NaCl 2%. Los individuos alimentados con dieta suplementada con el resto de las cepas xerotolerantes no mostraron diferencia significativa respecto a los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *P. putida* KT2440 o *B. cepacia* CC-A174 (figura 69).

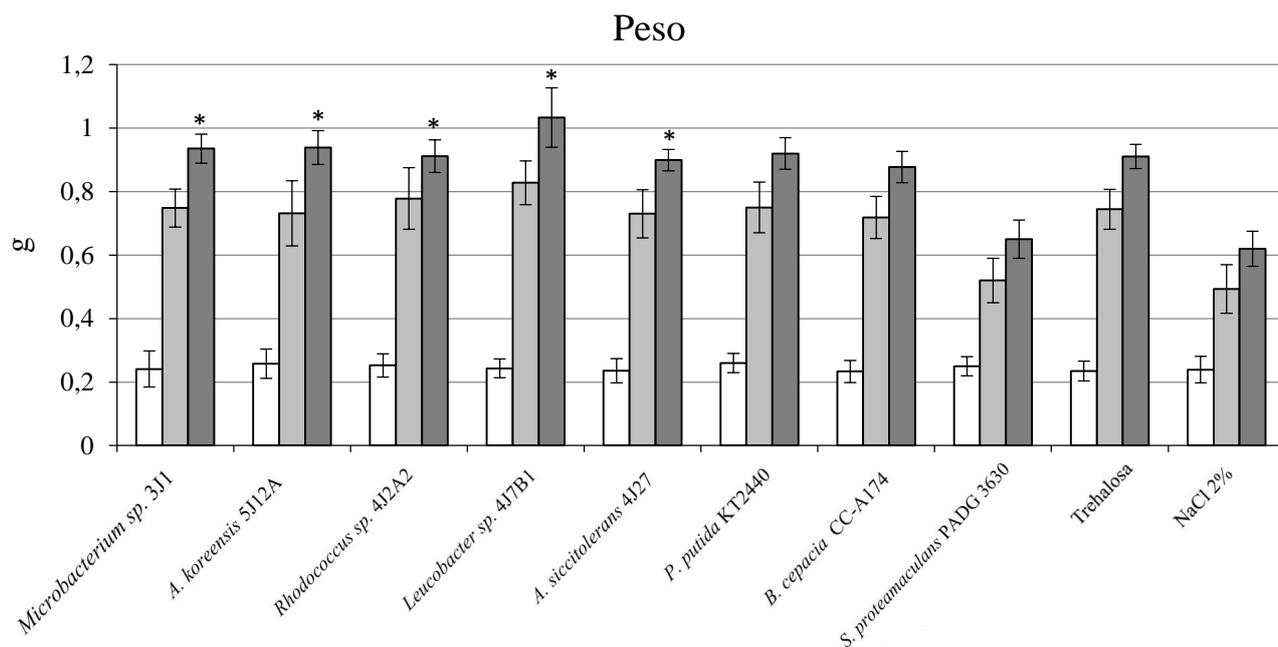


Figura 69. Peso de *Eisenia foetida* expuesta a las diferentes condiciones de ensayo. En el gráfico se muestra el peso (g) de las lombrices al inicio (columnas en blanco), a los 7 días (columnas en gris claro) y a final del ensayo, a los 15 días (columnas gris oscuro), alimentadas con dieta adicionada con las cepas indicadas. Se indica con un asterisco (*) aquellas lombrices alimentadas con dieta adicionada con las cepas indicadas que muestran diferencia significativa sobre los controles positivos.

La longitud de los individuos alimentados con dieta suplementada con liófilos de las cepas *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174 en trehalosa, así como con trehalosa libre de células, alcanzaron valores en torno a 10,5-11 cm al final del ensayo, no mostrando diferencia significativa entre condiciones. Los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *S. proteamaculans* PADG 3630, así como con NaCl 2%, alcanzaron valores de 8 cm al final del ensayo, no mostrando diferencia significativa entre ellas. Los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas xerotolerantes presentaron una longitud de 11-13 cm, no mostrando en ningún caso diferencia significativa respecto a los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *P. putida* KT2440 o *B. cepacia* CC-A174. Por otra parte, los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *Microbacterium* sp. 3J1, *A. koreensis* 5J12A y *Rhodococcus* sp. 4J2A2 mostraron una longitud un 30% superior a la de los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *S. proteamaculans* PADG 3630, así como con NaCl 2%. Los individuos alimentados con dieta suplementada con la cepa *Leucobacter* sp. 4J7B1 mostraron valores de longitud de más de un 35% superiores a la de los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *S. proteamaculans*

PADG 3630, así como con NaCl 2%. Por último, los individuos alimentados con dieta suplementada con la cepa *A. siccitolerans* 4J27 mostraron una longitud un 25% superior a la de los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas *S. proteamaculans* PADG 3630, así como con NaCl 2% (figura 70).

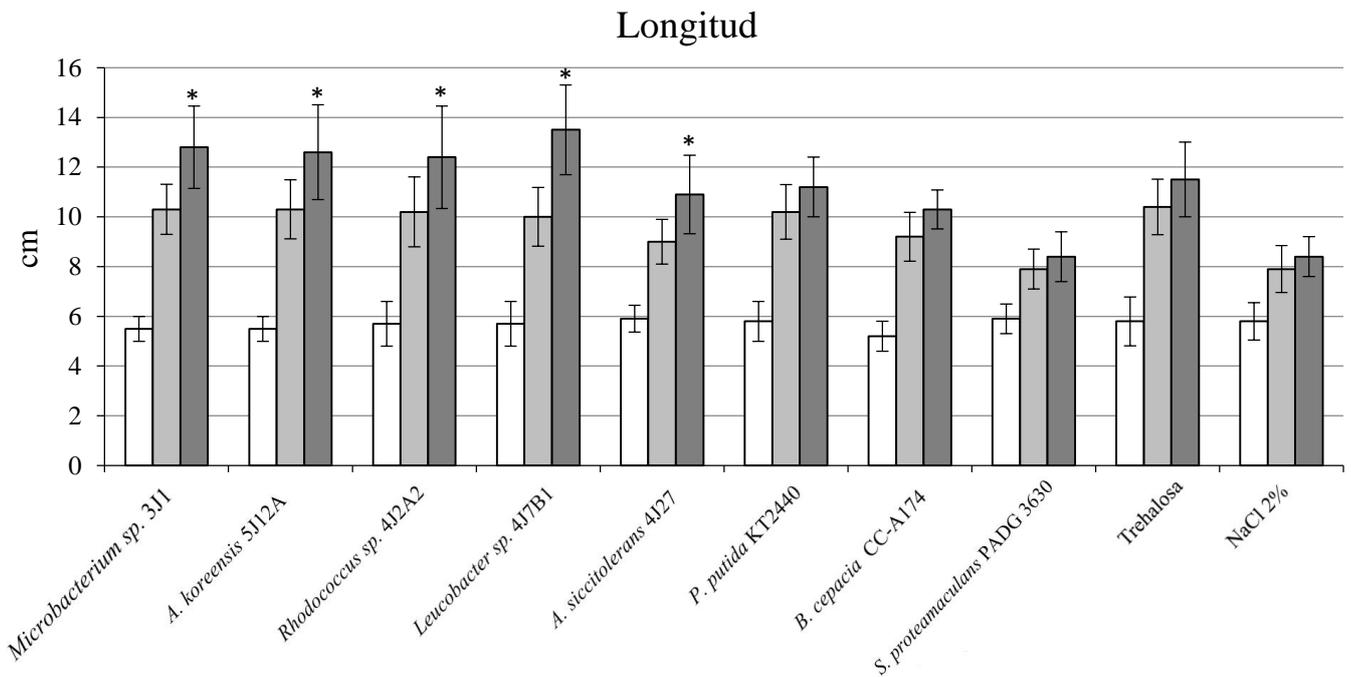


Figura 70. Longitud de *Eisenia foetida* incubada en presencia de distintas cepas bacteriana. Se muestra la longitud (cm) alcanzada por los organismos en ensayo al inicio (columnas en blanco), a los 7 días (columnas en gris claro) y a final del ensayo, a los 15 días (columnas gris oscuro), bajo las distintas condiciones ensayadas. Se indica con un asterisco (*) las cepas xerotolerantes ensayadas que muestran diferencia significativa sobre los controles positivos.

El número de neonatos registrado en los individuos alimentados con dieta suplementada con *P. putida* KT2440 liofilizada en trehalosa, así como con trehalosa libre de células, fue de 65 neonatos al final del ensayo, no mostrando diferencia significativa entre sí. Por otra parte, en muestras de individuos alimentados con dieta suplementada con la cepa *B. cepacia* CC-A174 se encontraron 50 neonatos al final del ensayo. El número de neonatos registrado en los individuos alimentados con dieta suplementada con la cepa control positivo *S. proteamaculans* PADG 3630, así como con NaCl 2%, fue de 42 y 10, respectivamente. El número de neonatos registrado en las muestras de individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas xerotolerantes fue de entre 58 y 63, y no mostró en ningún caso diferencia significativa respecto al de los individuos

alimentados con dieta suplementada con la cepa *P. putida* KT2440, así como con trehalosa. Sin embargo, sí llegaron a mostrar una diferencia de un 15% superior respecto a los individuos alimentados con dieta suplementada con la cepa *B. cepacia* CC-A174. En el caso de los individuos con dieta suplementada con *Leucobacter sp.* 4J7B1 el número de neonatos registrado (72 neonatos) llegó a ser de un 30% superior respecto a los individuos con dieta suplementada con la cepa *B. cepacia* CC-A174. Los individuos con dieta suplementada con las cepas xerotolerantes mostraron una diferencia significativa en el número de neonatos de un 30 y un 80% superior respecto a los individuos alimentados con dieta suplementada con la cepa control positivo *S. proteamaculans* PADG 3630, así como con NaCl 2%, respectivamente. Para el caso de los individuos alimentados con dieta suplementada con *Leucobacter sp.* 4J7B1, dicha diferencia llegó a ser de un 40 y 85% superior, respectivamente (figura 71).

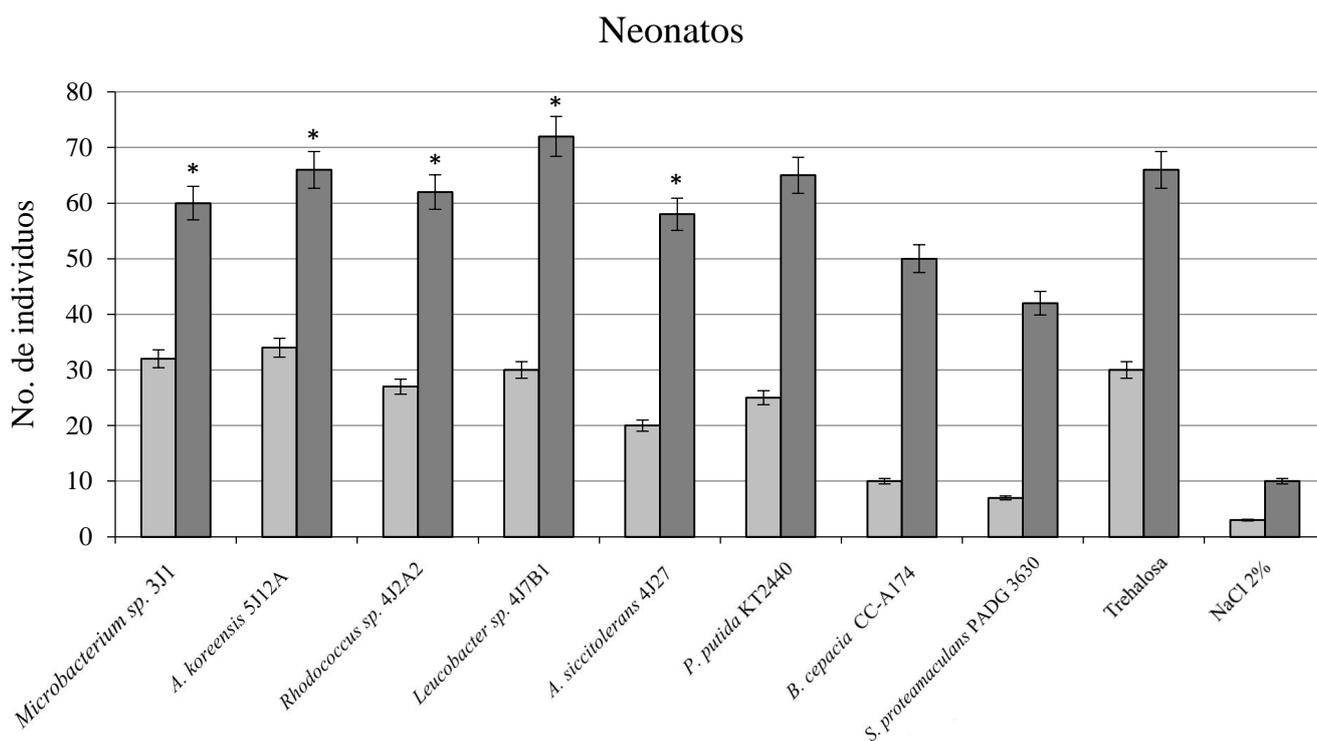


Figura 71. Número de neonatos de *Eisenia foetida* incubada en presencia de distintas cepas bacteriana. Se muestra el número de neonatos registrados a los 7 días (columnas en gris claro) y a final del ensayo, a los 15 días (columnas gris oscuro), bajo las distintas condiciones ensayadas. Se indica con un asterisco (*) las cepas xerotolerantes ensayadas que muestran diferencia significativa sobre los controles positivos.

El número de ootecas registradas en los individuos alimentados con dieta suplementada con *P. putida* KT2440 liofilizada en trehalosa, así como con trehalosa libre de células, fue de 69 neonatos al final del ensayo, no mostrando diferencia significativa entre sí. Por otra parte, se encontraron 45 ootecas en las muestras de individuos alimentados con dieta suplementada con la cepa *B. cepacia* CC-A174 al final del ensayo. El número de ootecas registradas en los individuos alimentados con dieta suplementada con la cepa control positivo *S. proteamaculans* PADG 3630, así como con NaCl 2%, fue de 35 y 12, respectivamente. El número de ootecas registradas en los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas xerotolerantes fue de entre 58 y 63, no siendo en ningún caso esta diferencia significativa respecto a la de los individuos alimentados con dieta suplementada con la cepa *P. putida* KT2440, así como con trehalosa. Únicamente en el número de ootecas registrado para los individuos alimentados con dieta suplementada con *Leucobacter sp.* 4J7B1, se observó una diferencia significativa un 10% superior a dichos controles. Por otra parte, se encontraron entre 61 y 68 ootecas en las muestras de individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas xerotolerantes, lo que supuso un aumento de un 15% respecto a las muestras con dieta suplementada con la cepa *B. cepacia* CC-A174. En el caso de los individuos alimentados con dieta suplementada con *Leucobacter sp.* 4J7B1 el número de ootecas registrado (78 ootecas) llegó a ser de un 30-40% superior respecto a los individuos alimentados con dieta suplementada con la cepa *B. cepacia* CC-A174. Los individuos alimentados con dieta suplementada con las cepas xerotolerantes mostraron una diferencia significativa en el número de ootecas registradas de un 45 y un 80% superior que en las muestras suplementadas con la cepa control positivo *S. proteamaculans* PADG 3630, así como con NaCl 2%, respectivamente. Para el caso de los individuos alimentados con dieta suplementada con *Leucobacter sp.* 4J7B1, dicha diferencia llegó a ser de un 55 y 85% superior, respectivamente (figura 72).

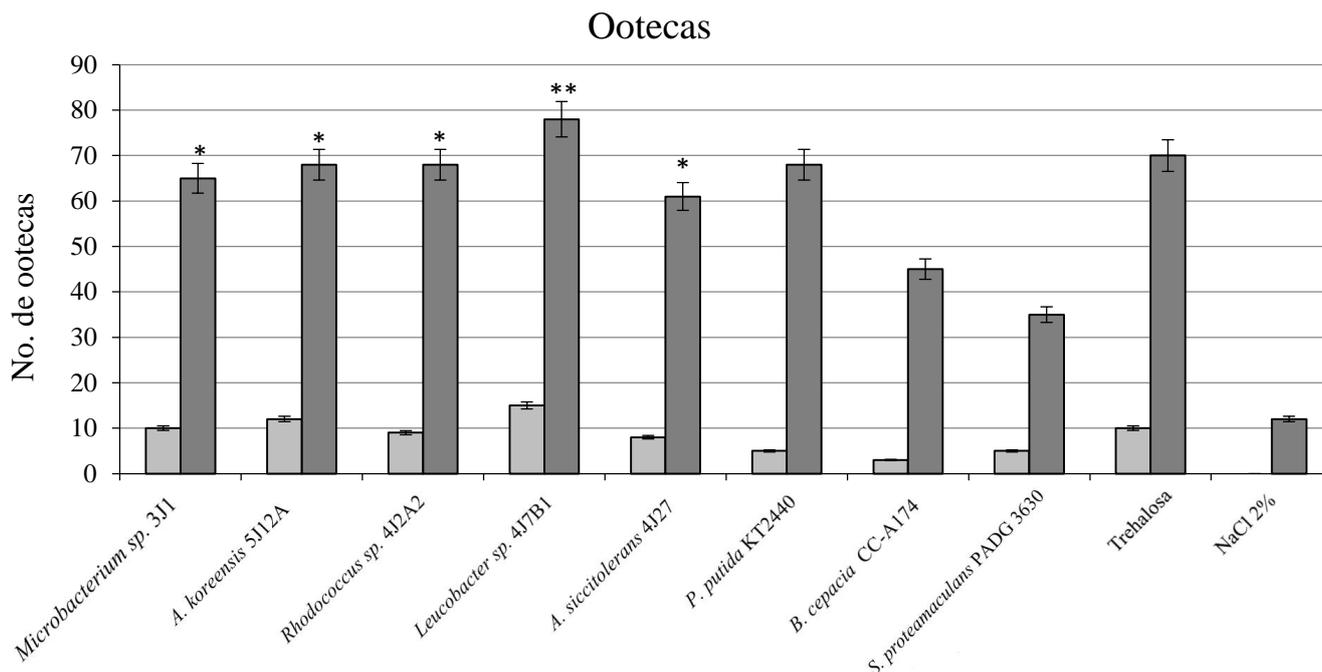


Figura 72. Número de ootecas contabilizadas de *Eisenia foetida* incubada en presencia de distintas cepas bacteriana. Se muestra el número de ootecas registradas a los 7 días (columnas en gris claro) y a final del ensayo, a los 15 días (columnas gris oscuro), bajo las distintas condiciones ensayadas. Se indica con un asterisco (*) las cepas xerotolerantes ensayadas que muestran diferencia significativa sobre los controles positivos, y con dos asteriscos (**), aquellas cepas xerotolerantes ensayadas que, además, muestran diferencia significativa con los controles negativos.

1.5. Ensayo de análisis de la toxicidad por Microtox®. *Vibrio fischeri*

El análisis de toxicidad mediante el kit comercial Microtox®, se basa en la reducción de la bioluminiscencia emitida por *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 cuando este se encuentra en presencia de sustancias tóxicas. Este método permite detectar concentraciones bajas de sustancias que afectan el metabolismo de esta bacteria (Onorati & Mecozzi, 2004).

Para este ensayo se usaron sobrenadantes filtrados (0,23 µm) de cultivos bacterianos en fase exponencial tal y como se indica en el apartado 8.1 de *Materiales y Métodos*. Como control negativo se empleó tanto el sobrenadante del cultivo de *P. putida* KT2440, como el propio medio de cultivo TSB estéril. Por otra parte, se emplearon los sobrenadantes de las cepas *B. cepacia* CC-A174 y *S. proteamaculans* PADG 3630 como cepas productoras de toxinas y BPCP (Nacamulli *et al.*, 1997, Coenye & Vandamme, 2003, Coats & Rumpho, 2014). De igual modo, se incluyó la cepa *P. aeruginosa* PA14 como cepa con capacidad de afectar a varios niveles del ecosistema, así como por su influencia sobre el metabolismo de *V. fischeri* NRRL B-11177 (Santa Anna *et al.*, 2002).

De este modo, la bioluminiscencia emitida por *V. fischeri* NRRL B-11177 expuesta a los sobrenadantes filtrados de *P. putida* KT2440, así como a TSB estéril, como controles negativos, alcanzaron valores de EC₅₀ de $104.93 \pm 5.28\%$ y $107.77 \pm 3.90\%$, respectivamente, no mostrando diferencia significativa entre si al final del ensayo. Por su parte, la bioluminiscencia emitida por *V. fischeri* NRRL B-11177 expuesta a los sobrenadantes filtrados de *B. cepacia* CC-A174, *S. proteamaculans* PADG 3630 y *P. aeruginosa* PA14, mostró valores de $23,7 \pm 1,32\%$, $19,8 \pm 2,02\%$ y $16,4 \pm 1,81\%$, respectivamente. En el caso de la bioluminiscencia emitida por *V. fischeri* NRRL B-11177 expuesta a los sobrenadantes filtrados de *Rhodococcus sp.* 4J2A2, mostró un valor de EC₅₀ de $95.18 \pm 0.5\%$, siendo un 5% inferior al presentado por los cultivos expuesto a extractos de las condiciones control negativo, y un 80% superior en el caso de la bioluminiscencia emitida por *V. fischeri* NRRL B-11177 expuesta a los sobrenadantes filtrados de las cepas *B. cepacia* CC-A174, *S. proteamaculans* PADG 3630 y *P. aeruginosa* PA14, como controles positivos. Por otra parte, la bioluminiscencia emitida por *V. fischeri* NRRL B-11177 expuesta a los sobrenadantes filtrados de *Leucobacter sp.* 4J7B1 mostraron un valor de EC₅₀ de $83.74 \pm 1.46\%$, lo que supuso una ligera reducción del 5% respecto al presentado por la bioluminiscencia emitida por *V. fischeri* NRRL B-11177 expuesta a los sobrenadantes filtrados de la cepa *P. putida* KT2440, como del propio medio de cultivo TSB estéril, como controles negativos, y un 75% superior en el caso de los sobrenadantes filtrados de las cepas *B. cepacia* CC-A174, *S. proteamaculans* PADG 3630 y *P. aeruginosa* PA14, como controles positivos. La bioluminiscencia emitida por *V. fischeri* NRRL B-11177 expuesta a los sobrenadantes filtrados de *A. koreensis* 5J12A mostró un valor de EC₅₀ de $52.51 \pm 2.11\%$, lo que supuso casi la mitad del presentado por los cultivos expuestos a extractos de las condiciones control negativo, y un 43% superior en el caso de los extractos de las cepas control positivo. Por otra parte, la bioluminiscencia emitida por *V. fischeri* NRRL B-11177 expuesta a los sobrenadantes filtrados de *Microbacterium sp.* 3J1 mostró un valor de EC₅₀ de $35.40 \pm 0.85\%$, lo que supuso una reducción del 65% del valor al presentado por la bioluminiscencia emitida por *V. fischeri* NRRL B-11177 expuesta a los sobrenadantes filtrados de la cepa *P. putida* KT2440, como del propio medio de cultivo TSB estéril, como controles negativos, y un 43% superior en el caso de los sobrenadantes de las cepas *B. cepacia* CC-A174, *S. proteamaculans* PADG 3630 y *P. aeruginosa* PA14, como controles positivos. Por último, la bioluminiscencia emitida por *V. fischeri* NRRL B-11177 expuesta a los sobrenadantes filtrados de *A. siccitolerans* 4J27 mostró un valor de EC₅₀ de $25.05 \pm$

0.60%, lo que supuso una reducción del EC₅₀ de un 75% respecto al presentado por la bioluminiscencia emitida por *V. fischeri* NRRL B-11177 expuesta a los sobrenadantes filtrados de la cepa *P. putida* KT2440, como del propio medio de cultivo TSB estéril, como controles negativos, no presentando diferencia significativa respecto al valor de EC₅₀ mostrado por las cepas *B. cepacia* CC-A174, *S. proteamaculans* PADG 3630 y *P. aeruginosa* PA14, como controles positivos (figura 73).

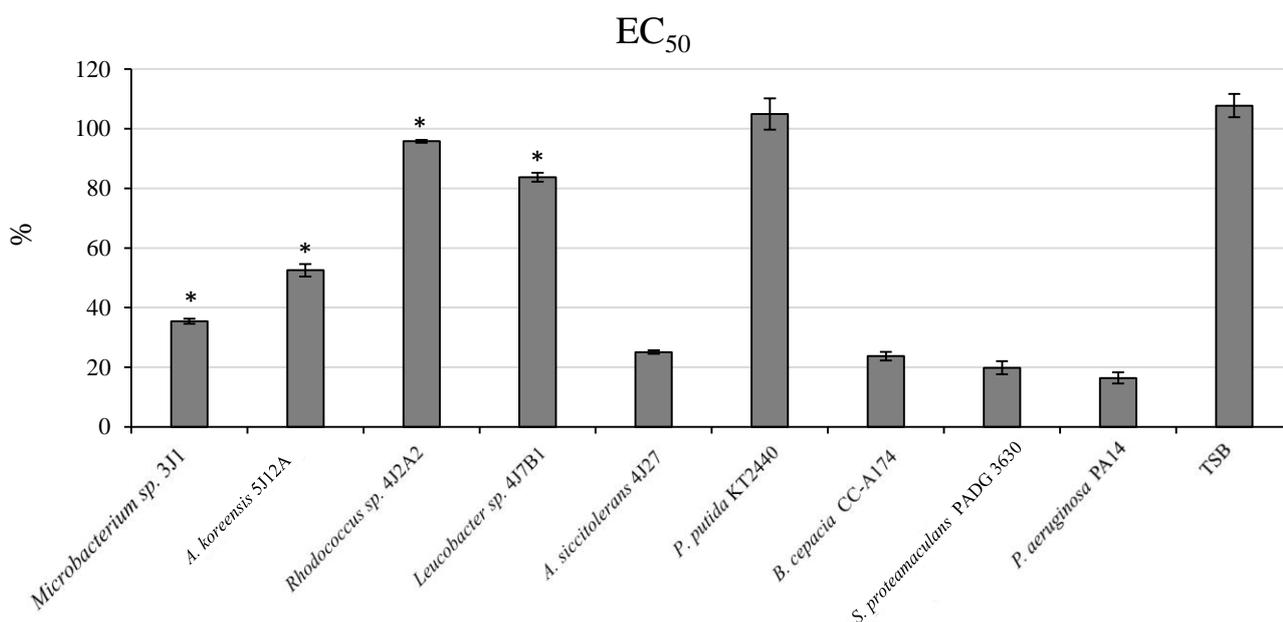


Figura 73. EC₅₀ sobre *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 obtenido en ensayo de Microtox® para los diferentes sobrenadantes empleados en el ensayo. En el gráfico se muestra el porcentaje requerido de cada extracto en TSB para alcanzar un efecto de reducción de bioluminiscencia emitida por *V. fischeri* NRRL B-11177 del 50%. Los valores que cercanos al 100% se consideran inocuos. Se indica con un asterisco (*) las bioluminiscencias de *V. fischeri* expuestas a los sobrenadantes de las cepas xerotolerantes ensayadas que muestran diferencia significativa sobre la obtenida cuando *V. fischeri* fue expuesta a los sobrenadantes de las cepas control positivo.

1.6. Ensayo de toxicidad por DaphToxKit®. *Daphnia magna*

El ensayo de DaphToxKit® es un ensayo estandarizado para conocer efectos sobre pequeños organismos indicativos de la calidad y sensibilidad de ecosistemas acuáticos basado en la viabilidad de *D. magna* cuando se expone ante metabolitos producidos por distintos microorganismos. Para este ensayo se usó sobrenadante filtrado de cultivos una

vez las cepas en estudio alcanzaban la de fase exponencial de crecimiento, tal y como se indica en el apartado 8.5 de *Materiales y Métodos*. Como control negativo se utilizó el propio medio de cultivo TSB estéril y el preparado de ‘Agua Fresca Estándar’ con el que se llevan a cabo las diluciones de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos ensayados (como indica el fabricante). Como controles negativos se usaron sobrenadantes filtrados de las cepas *P. putida* KT2440, *B. cepacia* CC-A174 y *S. proteomaculans* PADG 3630, todas ellas BCPB. De igual modo, se incluyó como control positivo el sobrenadante del cultivo de *P. aeruginosa* PA14, por sus conocidos efectos sobre poblaciones de distintos ambientes (Santa Anna *et al.*, 2002).

El valor de EC₅₀ al incubar a *D. magna* con medio de cultivo TSB estéril y el preparado de ‘Agua Fresca Estándar’ fue de $100 \pm 3,08$. Por otra parte, cuando se incubó a *D. magna* con el sobrenadante filtrado de cultivos de las cepas *P. putida* KT2440, *B. cepacia* CC-A174, *S. proteomaculans* PADG 3630 y *P. aeruginosa* PA14, el EC₅₀ fue de $14,12 \pm 1.62\%$, $12,5 \pm 1.54\%$, $12,2 \pm 1.5\%$ y $7,8 \pm 1.48\%$, respectivamente. Así, los individuos incubados con el sobrenadante filtrado de cultivos de *Leucobacter sp.* 4J7B1 mostraron valores de EC₅₀ de $57,12 \pm 2.35\%$, lo que supuso una reducción del 43% del valor observado cuando se incubó con medio de cultivo TSB estéril y el preparado de ‘Agua Fresca Estándar’, y en torno a un 80% superior al mostrado ante el sobrenadante filtrado de cultivos de las cepas *P. putida* KT2440, *B. cepacia* CC-A174, *S. proteomaculans* PADG 3630 y *P. aeruginosa* PA14. Por otra parte, los individuos incubados con el sobrenadante filtrado de cultivos de las cepas *Rhodococcus sp.* 4J2A2 ($24.95 \pm 1.39\%$) y *A. siccitolerans* 4J27 ($25.7 \pm 1.68\%$), mostraron valores un 75% inferiores al presentado por los individuos expuestos al sobrenadante de los cultivos de las cepas control negativo, y en torno al doble mostrado por los individuos incubados con el sobrenadante filtrado de cultivos de las cepas control positivo. Por último, los individuos incubados con el sobrenadante filtrado de cultivos de las cepas *Microbacterium sp.* 3J1 ($14.01 \pm 1.34\%$) y *A. koreensis* 5J12A ($12.5 \pm 1.57\%$) mostraron valores un 85% inferiores al presentado por los individuos expuestos a los sobrenadantes de los cultivos de las condiciones control negativo, mientras que no mostraron diferencia significativa respecto a los valores presentados por los individuos de *D. magna* expuestos a los sobrenadantes de los cultivos de las cepas control positivo (figura 74).

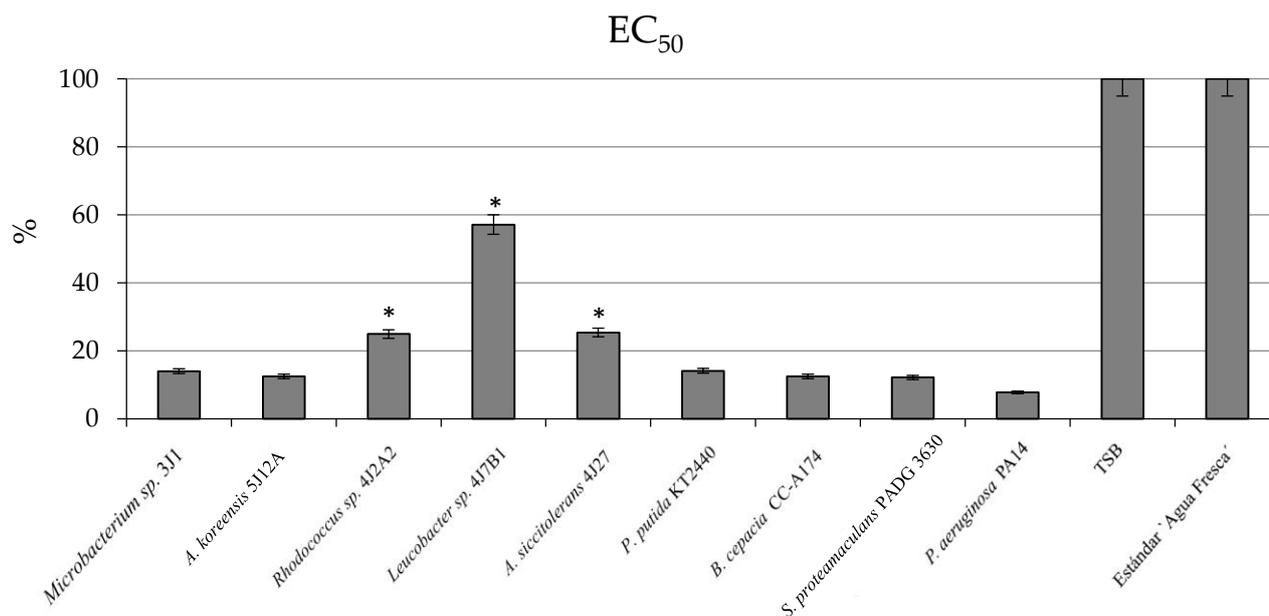


Figura 74. EC₅₀ sobre *Daphnia magna* obtenido en ensayo de DaphToxKit® para los diferentes sobrenadantes empleados en el ensayo. En el gráfico se muestra el porcentaje requerido de cada sobrenadante filtrado de los cultivos bacterianos para alcanzar un efecto de reducción de movilidad del 50% en *Daphnia magna*. Los que superan el 100% o se encuentran cercanos se consideran inocuos. Se indica con un asterisco (*) el valor de EC₅₀ de los sobrenadantes filtrados de cultivos de las cepas xerotolerantes ensayadas que mostraron diferencia significativa sobre los valores obtenidos por los sobrenadantes filtrados de cultivos de las cepas control positivo.

1.7. Ensayo de patogenicidad con ratones de laboratorio (*Mus musculus* CD1)

El modelo animal más estudiado y empleado para el estudio de enfermedades del ser humano es el ratón de laboratorio, *Mus musculus* (Bedell *et al.*, 1997, Peters *et al.*, 2007). La similitud anatómica y funcional de estos organismos ha permitido un gran avance en medicina y farmacología aplicada a seres humanos. Además, también sirve como modelo para el estudio de organismos vertebrados, uno de los últimos eslabones del ecosistema que se puede ver influenciado por la introducción de inoculantes en el mismo. Dadas las políticas actuales de reducción de ensayos con vertebrados, decidimos validar los ensayos previos con un estudio con ratones para justificar el uso de los primeros en sustitución de este último tipo. Este ensayo se enfocó como una prueba para valorar en conjunto el resto de los ensayos descritos y establecer un patrón para los mismos tanto a nivel de seguridad ambiental como de salud humana. Para este ensayo se utilizaron las células de cultivos en fase exponencial de las cepas xerotolerantes. Una vez centrifugadas y lavadas, se resuspendieron en una solución de agua de peptona 0,1% a una concentración de 10⁸-10⁹

UFC/ml para su inoculación intraperitoneal, tal y como se describe en el apartado .6 de *Materiales y Métodos*. Como control negativo se tomaron inóculos de *P. putida* KT2440 como BPCP reconocida como cepa GRAS (generalmente reconocida como segura o *Generally Recognised As Safe*, por sus siglas en inglés) sobre ratones (Loiseau-Marolleau & Malarre, 1977, Wang *et al.*, 2014), así como agua de peptona 0.1% libre de bacterias. Por otra parte, como controles positivos de patogenicidad sobre estos organismos se inocularon células de *B. cepacia* CC-A174 y *S. proteamaculans* PADG 3630 que también son BPCP, así como de la cepa *P. aeruginosa* PA14, ampliamente usada en este tipo de ensayos.

El peso alcanzado por los ratones inoculados con la cepa *P. putida* KT2440, así como con peptona 0,1%, fue de 26,2-26,5 g al final del ensayo, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. Por otra parte, el peso de los ratones expuestos a las cepas *B. cepacia* CC-A174, *S. proteamaculans* PADG 3630 y *P. aeruginosa* PA14, fue aproximadamente de 24 g al final del ensayo, no mostrando diferencia significativa entre condiciones. El peso de los ratones inoculados con la cepa *Rhodococcus sp.* 4J2A2 fue de casi 29 g, siendo un 8% superiores a los observados en los ratones expuestos las condiciones control negativo, y más de un 15 % superiores a los mostrados por los ratones expuestos a las cepas control positivo *B. cepacia* CC-A174, *S. proteamaculans* PADG 3630 y *P. aeruginosa* PA14. El peso de los ratones inoculados con las cepas *Microbacterium sp.* 3J1, *A. koreensis* 5J12A, *Leucobacter sp.* 4J7B1 y *A. siccitolerans* 4J27 fue de 25,6-26,5 g, no mostraron diferencia significativa respecto a los ratones inoculados con las condiciones control negativo. Sin embargo, sus valores fueron entre un 10 y un 15% superiores a los mostrados por los ratones expuestos a las cepas control positivo (75).

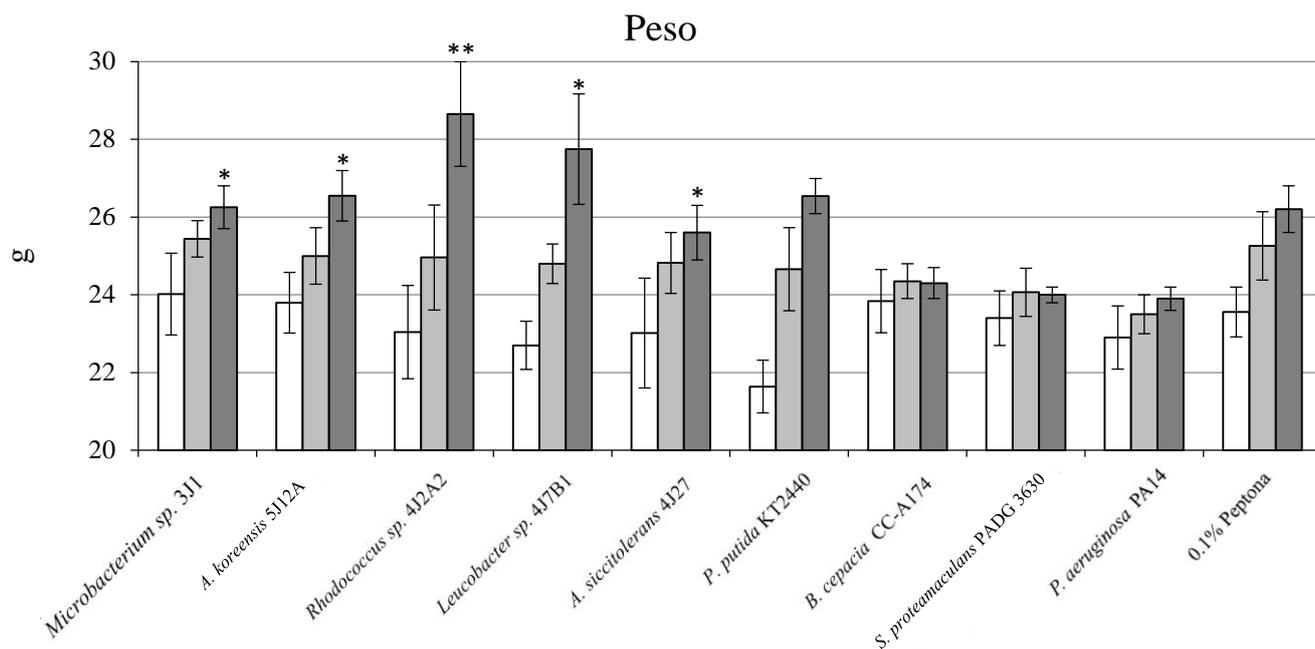


Figura 75. Peso de ratones (*Mus musculus* CD1) inoculados. En el gráfico se muestra el peso (g) alcanzado por los ratones en ensayo inicialmente (columnas en blanco), a los 7 días (columnas en gris claro) y a final del ensayo, a los 15 días (columnas gris oscuro) para cada condición ensayada. Se indica con un asterisco (*) las cepas xerotolerantes ensayadas que muestran diferencia significativa sobre los controles positivos y con dos asteriscos (**), aquellas cepas xerotolerantes ensayadas que, además, muestran diferencia significativa con los controles negativos.

Dada la variedad en el peso inicial de los ratones, decidimos representar el incremento de peso desde el inicio del ensayo. El incremento de peso de los ratones inoculados con la cepa *P. putida* KT2440, así como con peptona 0,1%, alcanzó unos valores en torno a 2,9 y 2 g, respectivamente, al final del ensayo, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. Por su parte, el incremento de peso de los ratones inoculados con las cepas *B. cepacia* CC-A174, *S. proteamaculans* PADG 3630 y *P. aeruginosa* PA14, mostró valores de en torno a 0,5-1 g al final del ensayo, no mostrando diferencia significativa entre condiciones. El incremento de peso de los ratones inoculados con las cepas *Rhodococcus* sp. 4J2A2 y *Leucobacter* sp. 4J7B1 fue el mayor registrado al final del ensayo (4,35 y 5,05 g, respectivamente), siendo en torno a 2 veces superior respecto a los ratones inoculados la cepa *P. putida* KT2440, así como con peptona 0,1%, y de más de 6 veces superiores respecto a los ratones inoculados con las cepas control positivo. Por otra parte, el incremento de peso de los ratones inoculados con la cepa *A. siccitolerans* 4J27 (2,55 g) no mostró diferencia significativa respecto a los inoculados con la cepa *P. putida* KT2440, llegando a ser dicha diferencia del 20% superior respecto a los valores

alcanzados por los ratones inoculados con peptona 0,1% y de casi 4 veces superior respecto a incremento de peso alcanzado por los ratones inoculados con las cepas control positivo. Por último, el incremento de peso de los ratones inoculados con las cepas *Microbacterium sp.* 3J1 y *A. koreensis sp.* 5J12A fue de en torno a 2 g, no mostrando diferencia significativa respecto al observado en los ratones inoculados con peptona 0,1%. Sin embargo, fue un 30% inferior respecto a los valores mostrados por ratones inoculados con *P. putida* KT2440. Además, sus valores fueron casi 3 veces superiores respecto a los alcanzados por los ratones inoculados con las cepas control positivo (figura 76).

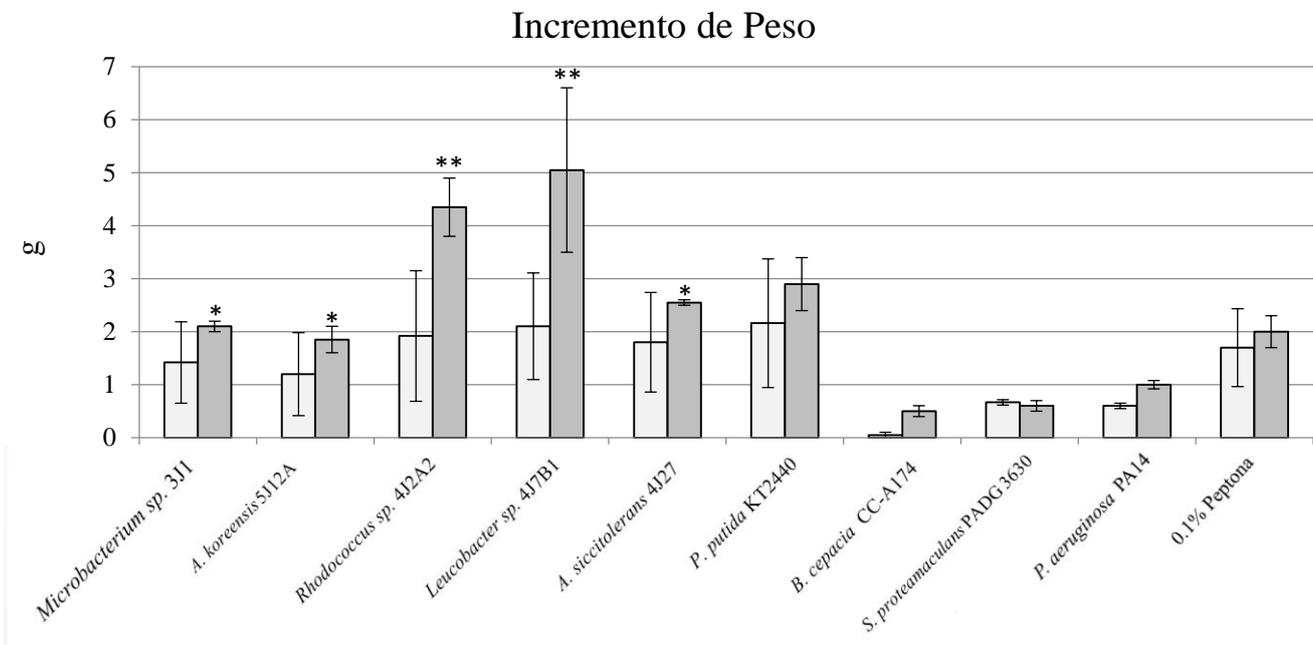


Figura 76. Incremento de peso en ratones (*Mus musculus* CD1) inoculados con las cepas xerotolerantes. En el gráfico se muestra el peso (g) que incrementan los ratones en ensayo desde el inicio del mismo hasta los 7 días (columnas en gris claro) y hasta el final del ensayo, a los 15 días (columnas gris oscuro) para cada condición ensayada. Se indica con un asterisco (*) las cepas xerotolerantes ensayadas que muestran diferencia significativa sobre los controles positivos y con dos asteriscos (**), aquellas cepas xerotolerantes ensayadas que, además, presentaron diferencia significativa con los controles negativos.

Por último, estudiamos el número de ratones que murieron a lo largo del estudio. Todos los ratones inoculados con la cepa *P. putida* KT2440, así como con peptona 0,1%, sobrevivieron al final del ensayo. El número de muertes registrado en los ratones inoculados con *B. cepacia* CC-A174, *S. proteamaculans* PADG 3630 y *P. aeruginosa*

PA14, fue de 3, 4 y 5 respectivamente, lo que supone una mortalidad del 60, 80 y 100% al final del ensayo, respectivamente. Ninguno de los ratones inoculado con las cepas xerotolerantes murió a lo largo del ensayo (figura 77).

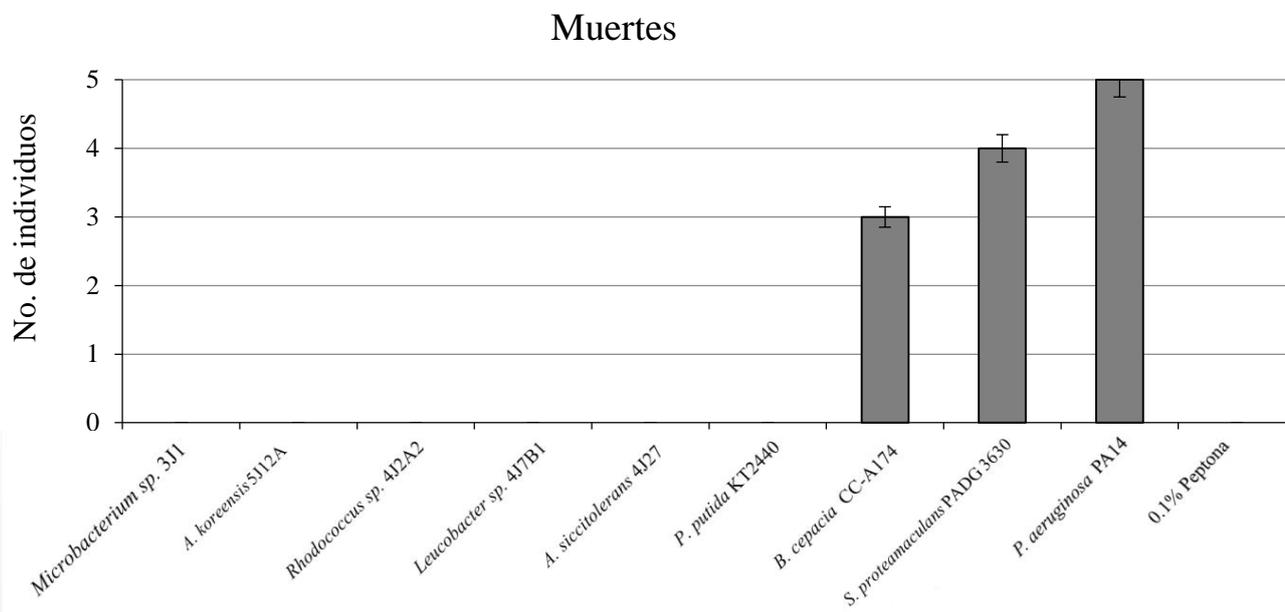


Figura 77. Muertes en ratones (*Mus musculus* CD1) inoculados con las cepas xerotolerantes. En el gráfico se muestra el número de ratones muertos a final del ensayo para cada condición ensayada.

1.8. Ensayo de efectos bacterianos sobre plantas de pimiento (*Capsicum annuum*)

La adición de un microorganismo al medio ambiente debe representar un claro beneficio para la producción de plantas según indica la Regulación No 1107/2009. Además hemos de descartar posibles efectos negativos sobre otras plantas y para proteger el ecosistema. Como modelo de planta se utilizó el pimiento, *Capsicum annuum*, en el cual se evaluó el efecto de la inoculación de las cepas xerotolerantes a una concentración de 10^8 UFC/ml, tal y como se indica en los apartados 2.5 y 9.7 de *Materiales y Métodos*. Como control se utilizaron plantas sin inocular, mientras que como controles de promoción del crecimiento se usaron las cepas promotoras del crecimiento de plantas *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174. Por otra parte, se usaron las cepas *S. marcescens* BS 303, *S. entomophila* CIP 102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630, descritas como BPCP, pero con efectos perjudiciales descritos en ensayos anteriores. Para este ensayo se registró el PS, CRA y longitud del tallo de las plantas inoculadas tal y como se describe en el apartado 5.5 de *Materiales y Métodos*.

El peso seco (PS) de las plantas inoculadas con las cepas control positivo *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174 fue de 11-13 mg al final del ensayo. Por su parte, el peso seco de las plantas inoculadas con *S. marcescens* BS 303, *S. entomophila* CIP 102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630, así como las plantas no inoculadas, fue de 6,5-7 mg al final del ensayo. En el caso de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 el PS fue de 20 mg, lo que supuso un aumento del 40% del peso de las plantas inoculadas con las cepas *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174. Respecto a las plantas inoculadas con *S. marcescens* BS 303, *S. entomophila* CIP 102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630, así como las plantas no inoculadas, esta diferencia de PS llegó a ser de casi 6 veces superior. El PS de las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A y con *Rhodococcus sp.* 4J2A2 fue de 13-14 mg, con lo que no mostraron diferencia significativa respecto al valor alcanzado por las plantas inoculadas con las cepas control positivo *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174. Sin embargo, estos valores llegaron a ser algo más del doble de los valores alcanzados por las plantas inoculadas con *S. marcescens* BS 303, *S. entomophila* CIP 102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630, así como las plantas no inoculadas. Por último, el PS de las plantas inoculadas con *Leucobacter sp.* 4J7B1 y con *A. siccitolerans* 4J27 fue de 6,5-7 mg, no mostrando diferencia significativa respecto al PS de las plantas inoculadas con las cepas control *S. marcescens* BS 303, *S. entomophila* CIP 102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630, así como por las plantas no inoculadas (figura 78).

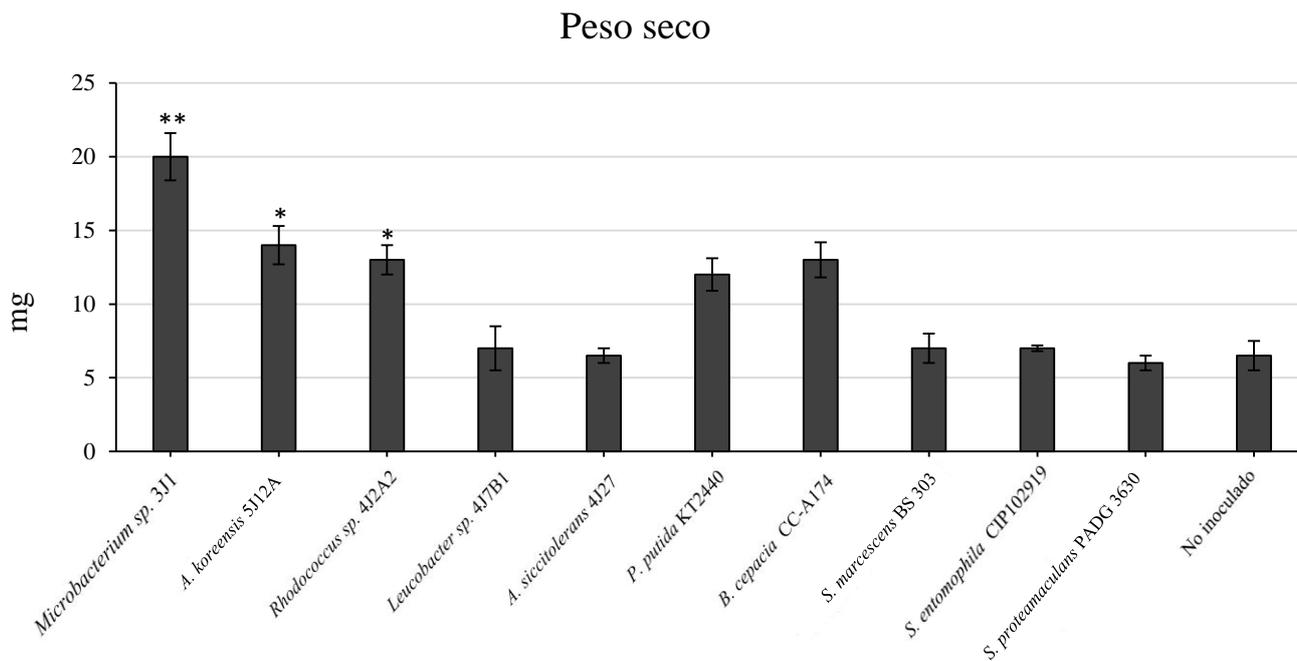


Figura 78. Peso seco (PS) de plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) inoculadas con cultivos bacterianos. En el gráfico se muestra el peso (mg) alcanzado por las plantas inoculadas con distintas cepas bacterianas en ensayo a los 33 días del inicio del mismo. Se indica con un asterisco (*) las cepas xerotolerantes ensayadas que muestran diferencia significativa con las condiciones de inoculación con *S. marcescens* BS 303, *S. entomophila* CIP 102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630, así como son las plantas no inoculadas; y con dos asteriscos (**), aquellas cepas xerotolerantes ensayadas que, además, muestran diferencia significativa con los controles positivos.

La longitud del tallo de las plantas inoculadas con las cepas control positivo *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174 fue de 1,5-1,6 cm al final del ensayo. La longitud del tallo de las plantas inoculadas con *S. marcescens* BS 303, *S. entomophila* CIP 102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630, así como las plantas no inoculadas, fue de 0,6-0,8 cm al final del ensayo. Las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp. 3J1 mostraron una longitud de tallo de 2,1 cm, lo que supuso un aumento del 25% respecto a la longitud del tallo de las plantas inoculadas con las cepas *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174. Respecto a las plantas inoculadas con *S. marcescens* BS 303, *S. entomophila* CIP 102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630, así como las plantas no inoculadas, su tallo fue 3 veces más largo. La longitud del tallo de las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A y con *Rhodococcus* sp. 4J2A2 fue de 1,5-1,6 cm, con lo que no mostraron diferencia significativa respecto al valor alcanzado por las plantas inoculadas con las cepas *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174. Sin embargo, estos valores llegaron a ser algo más del doble de los de las plantas inoculadas con *S. marcescens* BS 303, *S. entomophila* CIP 102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630, así como las plantas no inoculadas. Por último,

las plantas inoculadas con *Leucobacter sp.* 4J7B1 y con *A. siccitolerans* 4J27 presentaron una longitud de tallo de 0,5-0,6 cm, no mostrando diferencia significativa respecto a los valores alcanzados por las plantas inoculadas con *S. marcescens* BS 303, *S. entomophila* CIP 102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630, así como por las plantas no inoculadas (figura 79).

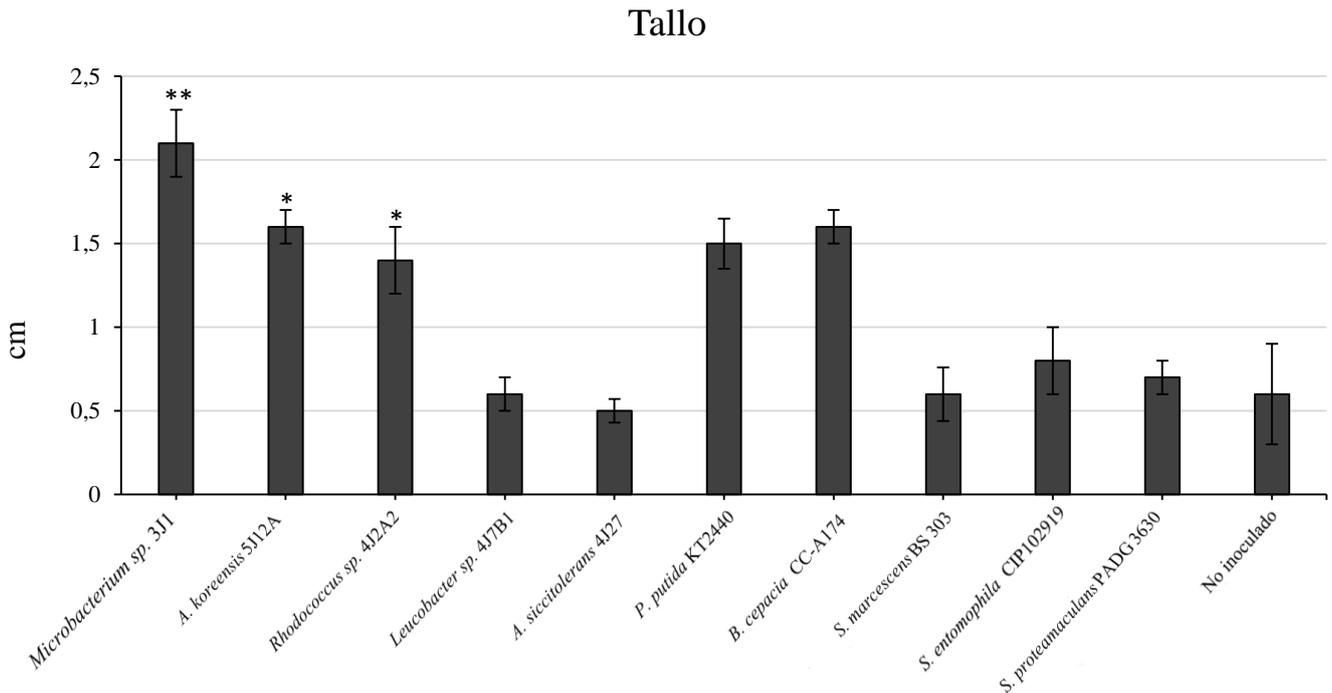


Figura 79. Altura de tallo al final el ensayo de plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) inoculadas con cultivos bacterianos. En el gráfico se muestra la altura del tallo (cm) alcanzada por las plantas inoculadas con distintas cepas bacterianas en ensayo a los 33 días del mismo. Se indica con un asterisco (*) las cepas xerotolerantes ensayadas que muestran diferencia significativa con las condiciones de inoculación con *S. marcescens* BS 303, *S. entomophila* CIP 102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630, así como son las plantas no inoculadas.

El último aspecto que se evaluó fue el contenido relativo de agua en la planta (CRA). El CRA de las plantas inoculadas con las cepas control positivo *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174 fue de 0,94-0,95 al final del ensayo. El CRA de las plantas inoculadas con *S. marcescens* BS 303, *S. entomophila* CIP 102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630, así como las plantas no inoculadas fue 0,81-0,84 al final del ensayo. El CRA de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1, con *A. koreensis* 5J12A y con *Rhodococcus sp.* 4J2A2, fue de 1; 0,98 y 0,96, respectivamente, no mostrando diferencia significativa

respecto al valor alcanzado por las plantas inoculadas con las cepas control positivo *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174. Por otra parte, mostraron una diferencia significativa de un 15% superior respecto a los valores de CRA de las plantas inoculadas con *S. marcescens* BS 303, *S. entomophila* CIP 102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630, así como las plantas no inoculadas, esta diferencia llegó a ser de 3 veces superior. El CRA de las plantas inoculadas con *Leucobacter* sp. 4J7B1 y con *A. siccitolerans* 4J27 fue de 0,85-0,86 cm, no mostrando diferencia significativa respecto a los valores alcanzados por las plantas inoculadas con las cepas control *S. marcescens* BS 303, *S. entomophila* CIP 102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630, así como por las plantas no inoculadas (figura 80).

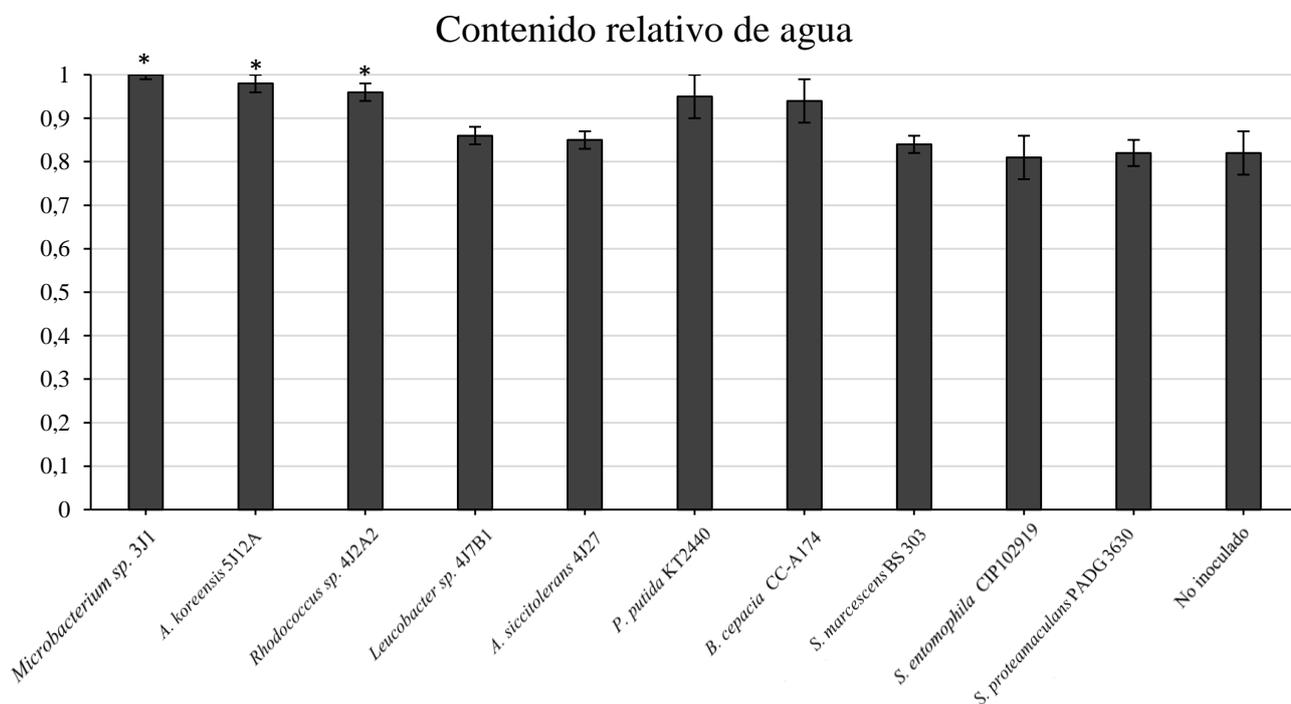


Figura 80. Contenido relativo de agua (CRA) alcanzado a punto final el ensayo por plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) inoculadas con cultivos bacterianos. En el gráfico se muestra CRA alcanzada por las plantas inoculadas con distintas cepas bacterianas en ensayo a los 33 días del mismo. Se indica con un asterisco (*) las cepas xerotolerantes ensayadas que muestran diferencia significativa con las condiciones de inoculación con *S. marcescens* BS 303, *S. entomophila* CIP 102919 y *S. proteamaculans* PADG 3630, así como son las plantas no inoculadas.

2. Índice de seguridad ambiental y humana (ISAH)

Para integrar los resultados de la batería de pruebas propuestas en un solo valor se utilizó el método Delphi. El objetivo final fue desarrollar una serie de valores que indicasen si una cepa candidata a BPCP es segura para la salud humana y el medio ambiente. Esta escala de valoración la denominamos como índice de seguridad ambiental y humana (ISAH), y tiene una escala de 0 a 100 (tabla 9). Los valores más altos indican una mayor probabilidad de que la cepa bacteriana de interés sea segura para su liberación al medio ambiente (figura 81). El ISAH se basa en tres tipos de parámetros obtenidos de cada ensayo: mortalidad (M), reproducción (R) y desarrollo (D) de los organismos modelo. La mortalidad es el factor principal que se utiliza para determinar la patogenicidad de una cepa bacteriana. Sin embargo, alteraciones en el nivel de reproducción también pueden afectar a las futuras poblaciones del organismo en cuestión. Por otra parte, los parámetros de desarrollo del organismo proporcionan información sobre su capacidad para cumplir con su función en el medio ambiente. En base a investigaciones anteriores asignamos un peso específico a cada factor según la fórmula $ISAH = 0.5 \times M + 0.3 \times R + 0.2 \times D$. Como se muestra en la tabla 9, la suma máxima posible de los valores de mortalidad (M), la reproducción (R) y el desarrollo (D) se realizó para que alcanzase 100; por lo tanto, la mayor puntuación posible ISAH sería 100. Los valores por debajo de un cierto punto de corte ($50 \pm 0,5$) indican la necesidad de pruebas adicionales de seguridad antes de que el candidato pueda ser considerado seguro para su uso como un BPCP.

Las puntuaciones máximas para los diferentes ensayos fueron ponderadas en función de la importancia de cada prueba y su relevancia para con la seguridad humana y ambiental. Por ejemplo, la puntuación más alta posible se asignó para el ensayo con *C. elegans*, siendo el parámetro de este ensayo con más carga el de la mortalidad. Esta puntuación reflejó la importancia ecológica de estos nematodos como los organismos del suelo y, a su vez, como modelo para la patogénesis en los seres humanos. Del mismo modo, la importancia de los microorganismos en la formación del suelo y su papel como parte del microbioma humano llevó a asignarle una puntuación máxima de 20 cuando la cepa candidata a BPCP no tuviese ningún efecto sobre la viabilidad de *E. coli* MC4100. El efecto sobre los artrópodos beneficiosos se valoró con un máximo de 15 en ausencia de mortalidad en ensayos con *C. carnea* y *A. bipunctata* después de la adición de las bacterias. Por su parte, la puntuación máxima por el efecto de la BPCP en fauna acuática fue de 15, si no se observa efecto sobre la EC_{50} de *D. magna*. En general, aunque las

bacterias pueden alterar el peso, el tamaño y la fertilidad de *E. foetida*, no suele afectar a la mortalidad a causa de las fuertes defensas celulares y humorales del anélido, a pesar de que este organismo se alimenta de bacterias y que ocupan su fluido celómico. En consecuencia, la patogenicidad de la cepa bacteriana no siempre refleja la mortalidad causada; por lo tanto, la contribución de este ensayo para la puntuación ISAH fue más baja. Para establecer el peso relativo y los valores máximos de los parámetros de mortalidad, reproducción y desarrollo de otros organismos se utilizó un razonamiento análogo.

La puntuación para el parámetro de desarrollo (D) se basó en los datos obtenidos de longitud y peso para los ensayos con *C. carnea*, *A. bipunctata* y *E. foetida*, el valor de EC_{50} obtenido en la prueba de Microtox[®], y en los valores de peso seco y contenido relativo de agua (CRA) en los ensayos con planta modelo (*C. annuum*). Nuestra propuesta consistió en dar una puntuación máxima de 20 para este parámetro. 5 para un incremento o ausencia de cambios sobre la longitud de la planta, 10 para un aumento de peso de la planta, y 5 para un aumento o ausencia de cambios en cuanto al CRA tras la exposición de la misma a la cepa candidata a BPCP. Para calcular el valor del parámetro de reproducción (R), se utilizó el número de huevos, juveniles y adultos contabilizado en el ensayo con *C. elegans* y el número de ootecas y neonatos detectados en el ensayo con *E. foetida*. Si la diferencia en comparación con las puntuaciones de control negativo (es decir, la puntuación máxima) fuese muy pequeña, y se encontrase dentro del primer cuartil de efecto, Q_1 (0% a 24%), la puntuación final se modificaría multiplicando por 1,0. Por ejemplo, si la mortalidad de *C. elegans* es la misma comparando la cepa candidata a BPCP y el control negativo (la cepa no patógena *E. coli* OP50), o si la diferencia no es mayor que 24%, entonces la puntuación asignada de 25 se multiplica por 1,0, manteniendo el total de la puntuación potencial para dicho parámetro. Si la diferencia en comparación con el control negativo fuese más baja y se encontrase dentro del segundo cuartil, Q_2 (25% a 49%), entonces la puntuación se multiplicaría por 0,75. Si la diferencia fuese moderada y se encontrase dentro del tercer cuartil de efecto, Q_3 (50% a 74%), la puntuación se multiplicaría por 0,5. Si en cambio la diferencia fuese mayor y estuviese comprendida en el cuarto cuartil, Q_4 (75% a 95%), la puntuación se multiplicaría por 0,25. Por último, si el efecto es significativamente inferior (entre el 0% y 4%) de la cepa candidata a BPCP frente al 100% con el control negativo, el resultado se multiplicaría por 0,0.

ISAH			Puntuación
Bioensayo	Parámetro	Categoría	
Sensibilidad con <i>E. coli</i> MC4100	UFCs/ml	Mortalidad	10
Ensayo con Microtox® (<i>V. fischeri</i>)	EC ₅₀	Desarrollo	5
Ensayo de patogenicidad con <i>C. elegans</i>	No. Adultos	Reproducción	6
	No. Juveniles	Reproducción	10,5
	No. Huevos	Reproducción	6
	No. Muertos	Mortalidad	25
Bioensayo con <i>C. carnea</i>	Longitud	Desarrollo	1
	Peso	Desarrollo	2
	No. Muertos	Mortalidad	3.75
Bioensayo con <i>A. bipunctata</i>	Longitud	Desarrollo	1
	Peso	Desarrollo	2
	No. Muertos	Mortalidad	3.75
Ensayo de ecotoxicidad con <i>E. foetida</i>	Longitud	Desarrollo	2
	Peso	Desarrollo	3
	No. Juveniles	Reproducción	4.5
	No. Ootecas	Reproducción	3
Ensayo con DaphtoxKit® (<i>D. magna</i>)	EC ₅₀	Mortalidad	7.5
Ensayo de efectos bacterianos en planta (<i>C. annuum</i>)	Peso seco	Desarrollo	1
	Tallo	Desarrollo	2
	CRA	Desarrollo	1
Puntuación Máxima			100

Tabla 9. Puntuación máxima y organización de categorías y parámetros integrados en el cálculo de ISAH. Se muestran los distintos ensayos junto a los parámetros analizados en las mismas para constituir el ISAH. Cada parámetro se organiza por categorías y se indica la puntuación máxima que podría alcanzar.

Para validar este sistema de puntuación se calculó el ISAH de las cepas *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174 como cepas patrón anteriormente estudiadas a todos los niveles del índice. De igual modo se compararon los valores obtenidos con los resultados de ensayos en ratones de laboratorio CD1 (*M. musculus*). Para evaluar el potencial del ISAH como mecanismo para reducir el número de animales vertebrados necesarios para pruebas

de seguridad, se compararon estos datos en términos de supervivencia, aumento de peso y el crecimiento en ratones de laboratorio CD1. La puntuación obtenida por estos patrones en ISAH fue de 93.375 (inocua) para *P. putida* KT2440 y de 49 (límite de seguridad) para *B. cepacia* CC-A174 (tabla 10A); a su vez, se observó una alta correlación con los resultados obtenidos en las pruebas con ratones (100 y 48.75 respectivamente) (tabla 10B). Estudios llevados a cabo con otras ocho cepas BPCP (*Serratia marcescens* CTC 10211, *Serratia entomophila* CIP 102919, *Serratia proteamaculans* PADG 3630, *Pseudomonas aeruginosa* PA14, *Pseudomonas fluorescens* IABPF05, *Azotobacter vinelandii* IABAV02, *Rhizobium leguminosarum* IABRL05 y *Bacillus subtilis* IABBS05) dieron un grado similar de correlación entre las puntuaciones ISAH y los resultados de los ensayos con animales (datos no mostrados). En base al cálculo de ISAH para, *P. putida* KT2440 la consideraríamos como BPCP segura. Por otra parte, la cepa *B. cepacia* CC-A174 requería de pruebas adicionales y se consideró fuera del límite de seguridad.

En cuanto a las cepas *Microbacterium* sp. 3J1, *A. koreensis* 5J12A, *Rhodococcus* sp. 4J2A2, *Leucobacter* sp. 4J7B1 y *A. siccitolerans* 4J27 mostraron valores de 90,875, 92,125, 93,375, 97,125 y 90,625 para el índice de seguridad ambiental y humana propuesto. De este modo, como podemos ver en la tabla 10, todas las cepas estudiadas presentaron un ISAH por encima de 90, es decir, superior al ISAH de *P. putida* KT2440. Esto indica que todas presentaron un efecto bajo tanto para el medio ambiente como para la salud humana. Concretamente, las cepas *Rhodococcus* sp. 4J2A2 (93.375) y *Leucobacter* sp. 4J7B1 (97.125) presentaron valores igual y superior respectivamente a los obtenidos por la cepa de referencia *P. putida* KT2440. Las cepas *A. siccitolerans* 4J27 (90.625), *Microbacterium* sp. 3J1 (90.875) y *A. koreensis* 5J12A (92.125) mostraron valores ligeramente inferiores, con algo menos de 3 puntos de ISAH por debajo. Para analizar si podíamos aplicar el cálculo de ISAH a otros microorganismos candidatos a PGPB, la empresa IAB dedicada a la comercialización de microorganismos promotores del crecimiento de plantas nos facilitó las cepas *Pseudomonas fluorescens* IABPF05, *Azotobacter vinelandii* IABAV02, *Rhizobium leguminosarum* IABRL05 y *Bacillus subtilis* IABBS05 para su estudio. El resultado de dicho análisis nos indicó que *P. fluorescens* IABPF05 presentó un valor ISAH de 57,43, *A. vinelandii* IABAV02 presentó un valor ISAH de 58,5, *R. leguminosarum* IABRL05 presentó un valor ISAH de 72,875, y *Bacillus subtilis* IABBS05 presentó un valor ISAH de 59,25, donde el valor alcanzado en cada bioensayo se muestra en la tabla 10A.

A Índice de seguridad ambiental y humana (ISAH)															
Bioensayo	3J1	5J12A	4J2A2	4J7B1	4J27	<i>P. putida</i> KT2440	<i>B. cepacia</i> CC-A174	<i>S. marcescens</i> BS 303	<i>S. entomophila</i> CIP 102919	<i>S. proteamaculans</i> PADG 3630	<i>P. aeruginosa</i> PA14	<i>P. fluorescens</i> IABPF05	<i>A. vinelandii</i> IABAV02	<i>R. leguminosarum</i> IABRL05	<i>B. subtilis</i> IABBS05
Sensibilidad con <i>E. coli</i> MC4100	10	10	10	10	10	10	5	5	5	5	2,5	10	10	10	10
Ensayo con Microtox® (<i>V. fischeri</i>)	2,5	3,75	5	5	1,25	5	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	2,5	2,5	2,5
Ensayo de patogenicidad con <i>C. elegans</i>	47,5	47,5	47,5	47,5	47,5	47,5	11,875	5,625	5,625	5,625	5,625	17,5	17,5	27,625	17,5
Bioensayo con <i>C. carnea</i>	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	2,25	2,5	2	2	8,8125	5,0625	6,75	5,8125
Bioensayo con <i>A. bipunctata</i>	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	0,75	0,75	0,75	0,75	3,625	4,3125	6,5	5,0625
Ensayo de ecotoxicidad con <i>E. foetida</i>	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	10,625	10,625	9,5	9,5	10,25	10,625	11,75	10,625
Ensayo con DaphtoxKit® (<i>D. magna</i>)	1,875	1,875	1,875	5,625	1,875	1,875	1,875	1,875	1,875	1,875	1,875	3,75	3,75	3,75	3,75
Ensayo de efectos bacterianos en planta (<i>C. annuum</i>)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Resultado Final	90,875	92,125	93,375	97,125	90,625	93,375	49	30,625	30,625	29	26,25	57,4375	58,5	72,875	59,25

B								
Índice Patogenicidad en Ratones								
Bioensayo	Parámetro	3J1	5J12A	4J2A2	4J7B1	4J27	<i>P. putida</i> KT2440	<i>B. cepacia</i> CC-A174
Bioensayo con ratones CD1 <i>(Mus musculus)</i>	Peso final	15	15	15	15	15	15	15
	Peso ganado	35	35	35	35	35	35	8,75
	No. Muertos	50	50	50	50	50	50	25
Resultado Final		100	100	100	100	100	100	48,75

Tabla 10. Índice de Seguridad Ambiental y Humana (ISAH). En la tabla A se muestra el resultado obtenido por cada cepa en los correspondientes ensayos realizados para determinar la seguridad de la misma (con la ponderación de cada ensayo ya aplicada), así como el valor final de ISAH correspondiente. Se incluyen también los resultados de las cepas de referencia *P. putida* KT2440, *B. cepacia* CC-A174, *S. marcescens* CTC 10211, *S. entomophila* CIP 102919, *S. proteamaculans* NCTN 394, *P. aeruginosa* PA14, *P. fluorescens* IABRL05, *Azotobacter vinelandii* IABAV02, *Rhizobium leguminosarum* IABRL05 y *Bacillus subtilis* IABBS05. También se muestran los resultados obtenidos por las cepas xerotolerantes junto con *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174 para el bioensayo de patogenicidad sobre ratones de laboratorio (B).

En conclusión y al compararlas con otras cepas empleadas como BPCP, podemos indicar que todas las cepas xerotolerantes se encuentran dentro del rango ‘ISAH Seguro’, muy cercanos a la cepa de referencia *P. putida* KT2440 (figura 81).

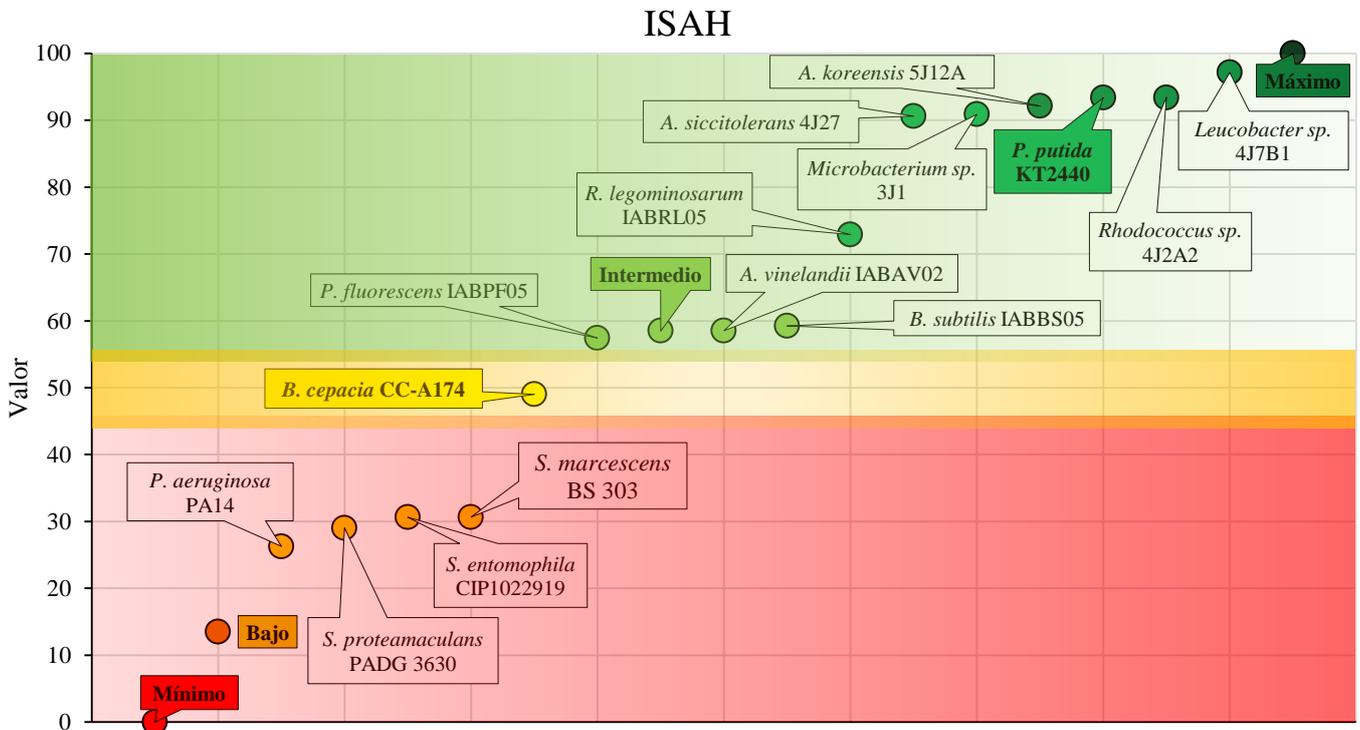


Figura 81. Índice de Seguridad Ambiental y Humana (ISAH) para cepas usadas como BPCP. Se muestran los distintos rangos propuestos según la puntuación obtenida. Los cambios de coloración redefinen en función del valor obtenido por las cepas ‘referencia’ *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174, marcándose en rojo la zona de peligro, en amarillo el límite o zona de transición, y en verde la zona de valores seguros para el medio ambiente y la salud humana.

CAPÍTULO IV

Tras comprobar que las cepas estudiadas mostraron unos niveles de bioseguridad altos, se decidió llevar a cabo ensayos de invernadero y campo. Como planta modelo, se empleó el maíz (*Zea mays*) al tratarse de una de las especies ensayada con buenos resultados, tal y como se refleja en el *Capítulo 1* de este mismo trabajo, y por tratarse tanto de una planta con interés agrícola como bioenergético. Se decidieron emplear las cepas xerotolerantes con mejores resultados en laboratorio para comprobar la efectividad como inoculante en las etapas de ensayo mencionadas. El formato de inoculación empleado fue el de cápsula plástica sobre semillas tanto para los ensayos de invernadero como para la siembra en campo.

1. Ensayos en invernadero

Inicialmente se llevaron a cabo ensayos de inoculación en formato de cápsula sobre plantas de maíz. Estos estudios se llevaron a cabo entre los meses de marzo y junio del año 2012. Se emplearon tiestos de 5 L rellenos con mezcla de sustrato vegetal y sustrato natural arcilloso 1:2 (v/v), sobre los que se incorporó un sistema de riego por goteo programado para controlar las condiciones hídricas de cada ensayo. Tanto en los ensayos con riego como en los de sequía, se mantuvo la humedad del suelo por encima del 70% hasta una semana después de que germinaran las semillas (periodo de adaptación posterior a la germinación). A partir de este momento, cada ensayo siguió un programa de riego específico para las condiciones a ensayar. Las semillas fueron recubiertas empleando cápsulas de poliestireno disueltas con cloroformo y en las que se mezclaron las células de las cepas como producto de liofilizado con trehalosa 10% (p/v) hasta alcanzar una proporción de 10^8 - 10^9 UCF/ml, siguiendo las indicaciones de la técnica descrita por Manzanera y colaboradores en 2004 (Manzanera *et al.*, 2004).

1.1. Promoción de crecimiento de plantas por acción bacteriana

Para estudiar la promoción del crecimiento de plantas de maíz en invernadero se seleccionaron las cepas *Microbacterium sp.* 3J1 y *A. koreensis* 5J12A y se empleó el método descrito en la sección 5 de *Materiales y Métodos*. Como control se utilizaron plantas inoculadas con *Pseudomonas putida* KT2440 por su capacidad para promover el crecimiento de plantas y por su sensibilidad frente a la falta de agua. De manera adicional, se utilizaron plantas sin inóculo, empleando semillas encapsuladas libres de células.

Se analizaron al menos 20 plantas para registrar el peso fresco (PF), peso seco (PS), peso totalmente túrgido (PTT) y contenido relativo de agua (CRA) descritos según se indica en el apartado 5.5 de la sección de *Materiales y Métodos* a los 15, 30, 45 y 60 días tras el periodo de adaptación posterior a la germinación.

Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 y *A. koreensis* 5J12A mostraron un tamaño ligeramente mayor al de las plantas no inoculadas y al de las inoculadas con *P. putida* KT2440, sin llegar a mostrar grandes diferencias con dichas condiciones en los parámetros estudiados. El aspecto físico de las plantas estudiadas puede observarse en la figura 82.



Figura 82. Estado a los 60 días de las plantas inoculadas e incubadas en condiciones de riego. Se muestran las plantas de maíz inoculadas con las cepas *Microbacterium sp.* 3J1, *A. koreensis* 5J12A y *P. putida* KT2440, así como las plantas sin inocular al día 60 en condiciones de riego.

El valor de la humedad de los maceteros se mantuvo constante a lo largo del proceso, con un margen de variación máximo del 5% entre las condiciones ensayadas. La humedad mínima registrada fue de en torno al 70% en el día 28 y en los días 56 y 60 de muestreo (figura 83).

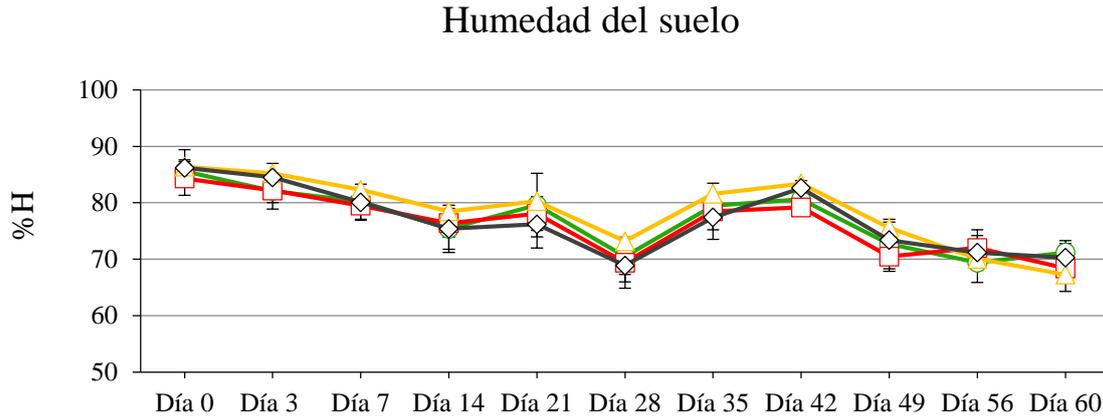


Figura 83. Humedad registrada en los maceteros bajo riego periódico. En ordenadas se muestran el porcentaje de humedad (%H). En abscisas se indican los tiempos de muestreo. Los círculos verdes se corresponden con plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1; los cuadrados rojos, con plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A; los triángulos naranjas, con las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440; y los rombos grises con plantas no inoculadas.

Se estudió la longitud de las plantas tanto en su parte aérea como radicular, para evaluar los efectos beneficiosos sobre el desarrollo de la planta bajo condiciones de riego periódico en invernadero. De este modo, para los datos de altura, se tomó como medida la longitud en m desde el punto donde se encontraran las primeras raíces, hasta el plano horizontal formado por el último par de hojas desarrollado. Mientras que para las raíces se tomó como medida la longitud en m desde el punto donde se encontraran las primeras raíces, hasta la punta del ápice radical más largo sin forzar el estiramiento del mismo.

La altura alcanzada al final del ensayo por las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 2,5-2,7 m, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. La altura de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 llegó a ser de algo más de 3 m, suponiendo un valor en torno a un 15% superior al mostrado por las plantas no inoculadas, no mostrando diferencia significativa con las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. Las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, con una altura de 2,86 m, no mostraron diferencia significativa en su valor de altura respecto al presentado por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 84).

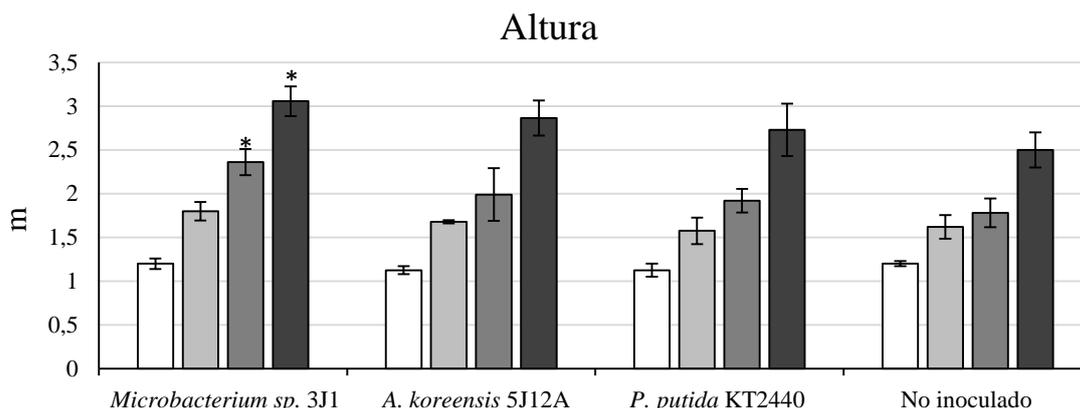


Figura 84. Altura del tallo de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en m. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 15, el gris claro al día 30, el gris oscuro al 45 y el negro al día 60 de muestreo. Las muestras con asterisco (*) indican diferencia significativa con el control sin inóculo.

Por otra parte, la longitud de la raíz al final del ensayo por las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 45-49 cm, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. La longitud de las raíces de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 llegó a ser de 54,2 cm, suponiendo un valor en torno a un 15% superior al mostrado por las plantas no inoculadas, no mostrando diferencia significativa con las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. Las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, con una longitud de raíz de 50,5 cm, no mostraron diferencia significativa en la longitud de su raíces respecto al presentado por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 85).

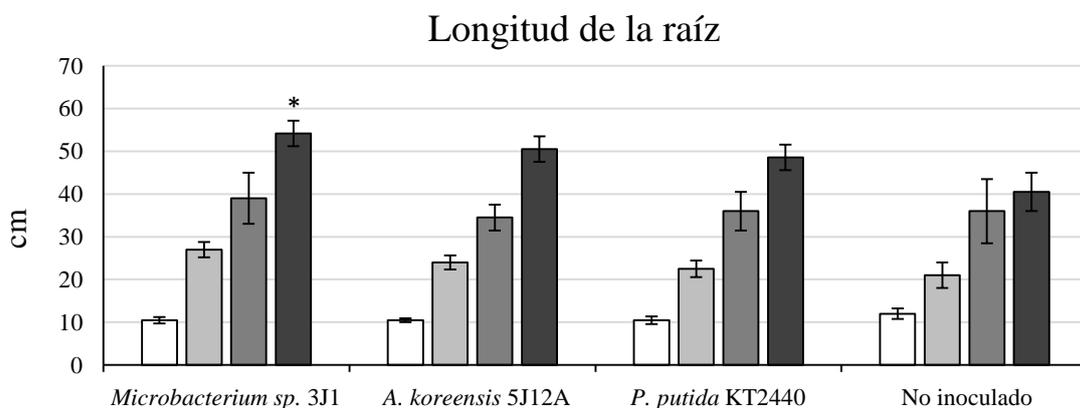


Figura 85. Longitud de la raíz de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en cm. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 15, el gris claro al día 30, el gris oscuro al 45 y el negro al día 60 de muestreo. Las muestras con asterisco (*) indican diferencia significativa con el control sin inóculo.

El peso fresco (PF) de las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 128-135 g, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. El PF de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 llegó a ser de casi 146 g, suponiendo un valor poco más de un 10% superior al mostrado por las plantas no inoculadas, no mostrando diferencia significativa con las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. Las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, con un PF de 137 g, no mostraron diferencia significativa en su valor de PF respecto al presentado por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 86).

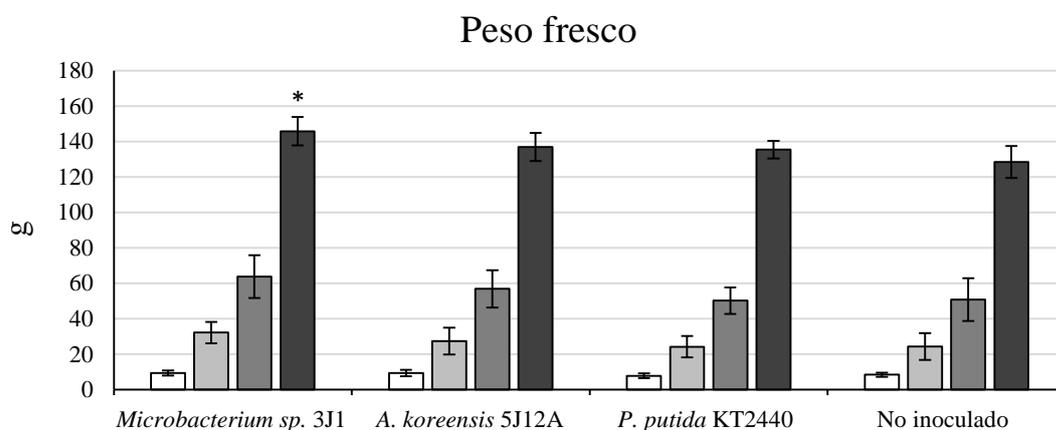


Figura 86. Peso fresco de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en cm. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 15, el gris claro al día 30, el gris oscuro al 45 y el negro al día 60 de muestreo. Las muestras con asterisco (*) indican diferencia significativa con el control sin inóculo.

El peso seco (PS) de las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 15-18 g, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. El PS de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 llegó a ser de casi 24 g, suponiendo un valor de en torno al 20% superior al mostrado por las plantas no inoculadas, no mostrando diferencia significativa con las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. Las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, con un PS de 20 g, no mostraron diferencia significativa en su valor de PS respecto al presentado por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 87).

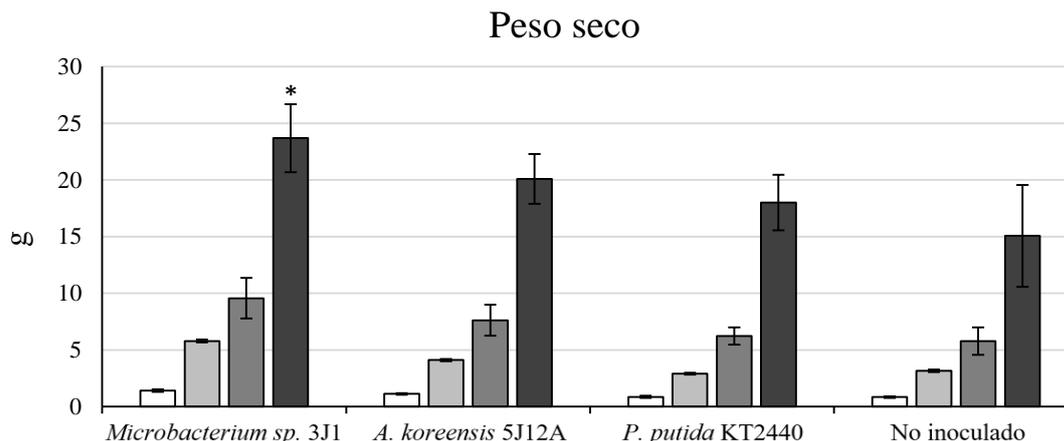


Figura 87. Peso seco de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en g. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 15, el gris claro al día 30, el gris oscuro al 45 y el negro al día 60 de muestreo. Las muestras con asterisco (*) indican diferencia significativa con el control sin inóculo.

El peso totalmente túrgido (PTT) de las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 143-153 g, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. El PTT de las plantas inoculadas tanto con *Microbacterium sp. 3J1* (155 g) como con *A. koreensis* 5J12A (152 g), no mostró diferencia significativa con respecto al presentado por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 88).

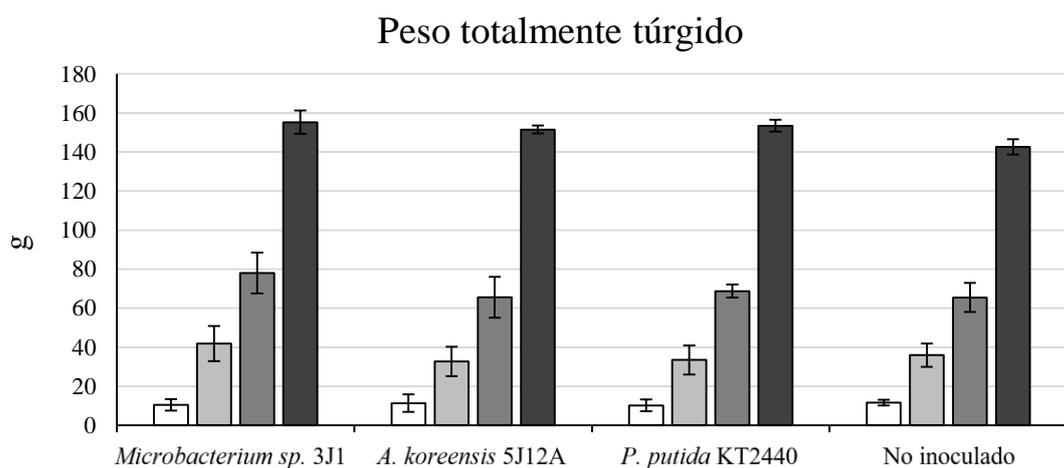


Figura 88. Peso totalmente túrgido de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en g. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 15, el gris claro al día 30, el gris oscuro al 45 y el negro al día 60 de muestreo.

Respecto a los valores de CRA, que indican el estado hídrico de la planta respecto al mejor estado posible o al estado hídrico ideal de la misma, en general se observa que estos valores de las plantas se mantuvieron estables o con un ligero aumento al final del ensayo. El CRA de las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 0,86-0,89, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. El CRA de las plantas inoculadas tanto con *Microbacterium sp.* 3J1 (0,93) como con *A. koreensis* 5J12A (0,89), no mostró diferencia significativa con respecto al presentado por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 89).

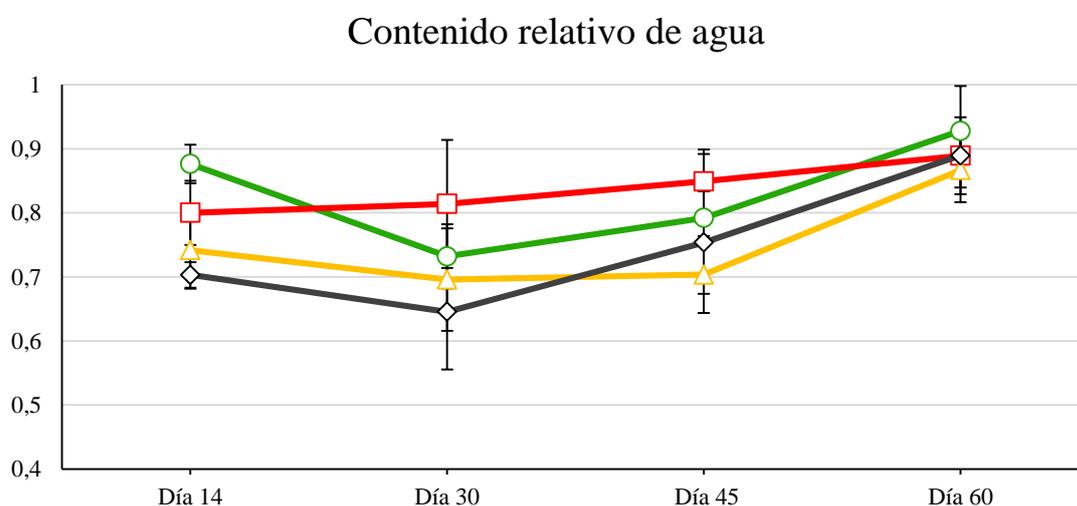


Figura 89. Contenido relativo de agua en plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. En ordenadas se muestran los valores adimensionales del CRA. En abscisas se indican los tiempos de muestreo. Los círculos verdes se corresponden con plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1; los cuadrados rojos, con plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A; los triángulos naranjas, con las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440; y los rombos grises con plantas no inoculadas.

1.2. Xeroprotección de plantas de pimiento por acción bacteriana

Tras estudiar la promoción del crecimiento de las plantas por parte de los microorganismos en invernadero, se estudió la efectividad de las cepas para proteger a las plantas de maíz contra la sequía en condiciones de invernadero. Se seleccionaron las cepas *Microbacterium sp.* 3J1 y *A. koreensis* 5J12A, y se empleó el método descrito en la sección 5 de *Materiales y Métodos*. Como control se utilizaron plantas inoculadas con

P. putida KT2440 por su capacidad para promover el crecimiento de plantas y por su sensibilidad frente a la falta de agua. De manera adicional, se utilizaron plantas sin inóculo, empleando semillas encapsuladas libres de células.

Se analizaron al menos 20 plantas para registrar el peso fresco (PF), peso seco (PS), peso totalmente túrgido (PTT) y contenido relativo de agua (CRA) descritos según se indica en el apartado 5.5 de la sección de *Materiales y Métodos* en los días 15, 30, 45 y 60 días tras el periodo de adaptación posterior a la germinación. Las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp. 3J1 y *A. koreensis* 5J12A mostraron mucha variabilidad entre muestras, sin llegar a mostrar grandes diferencias en los parámetros estudiados con las plantas no inoculadas y con las inoculadas con *P. putida* KT2440. El aspecto físico de las plantas estudiadas puede observarse en la figura 90.



Figura 90. Estado a los 60 días de las plantas inoculadas e incubadas en condiciones de sequía. Se muestran las plantas de maíz inoculadas con las cepas *Microbacterium* sp. 3J1, *A. koreensis* 5J12A y *P. putida* KT2440, así como las plantas sin inocular al día 60 en condiciones de sequía.

El valor de la humedad de los maceteros fue decreciendo paulatinamente a un ritmo de un 3-5% por semana, salvo en la primera y última semana, donde llegó al 7%. El valor mínimo registrado fue de en torno al 30% el último día de muestreo. descenso total fue de entre el 50-60%. No hubo diferencia significativa en la pérdida de humedad entre las condiciones ensayadas (figura 91).

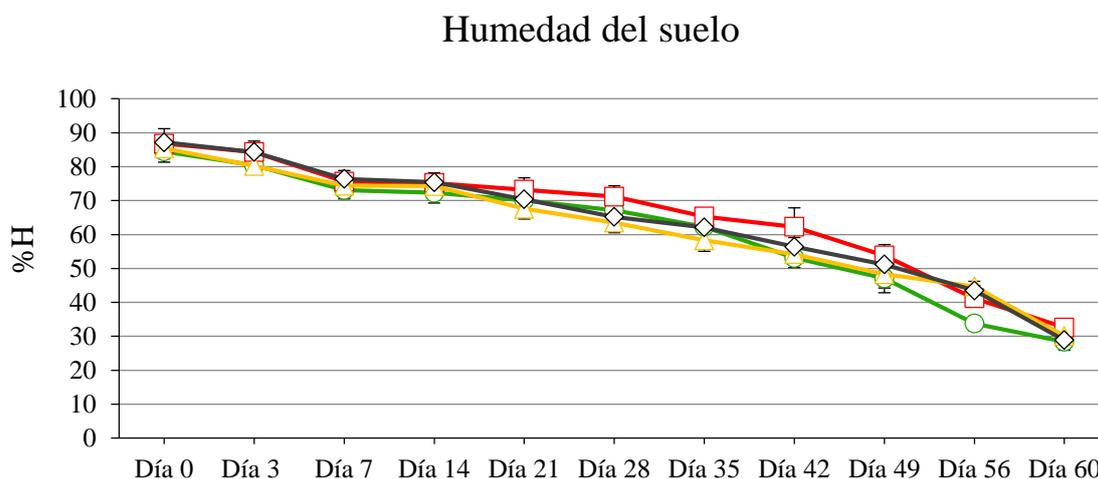


Figura 91. Humedad registrada en los maceteros en condiciones de sequía. En ordenadas de muestran el porcentaje de humedad (%H). En abscisas se indican los tiempos de muestreo. Los círculos verdes se corresponden con plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1; los cuadrados rojos, con plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A; los triángulos naranjas, con las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440; y los rombos grises con plantas no inoculadas.

El peso fresco (PF) de las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 55 g, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. El PF de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 llegó a ser de casi 70 g, suponiendo un incremento de un 20% respecto a las plantas no inoculadas, así como a las inoculadas con las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. Las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, con un PF de 60 g, no mostraron diferencia significativa en su valor de PF respecto al presentado por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 92).

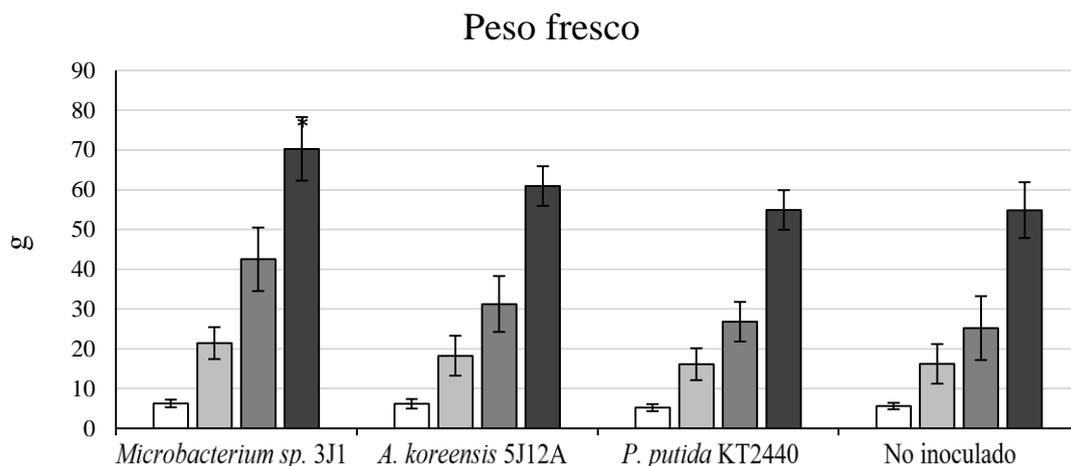


Figura 92. Peso fresco de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en g. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 15, el gris claro al día 30, el gris oscuro al 45 y el negro al día 60 de muestreo. Las muestras con asterisco (*) indican diferencia significativa con el control sin inóculo.

El peso seco (PS) de las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 9-10 g, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. El PS de las plantas inoculadas tanto con *Microbacterium sp. 3J1* como con *A. koreensis* 5J12A llegó a ser de 12-13 g, suponiendo un aumento significativo del 25% respecto al mostrado por las plantas no inoculadas y por las inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 93).

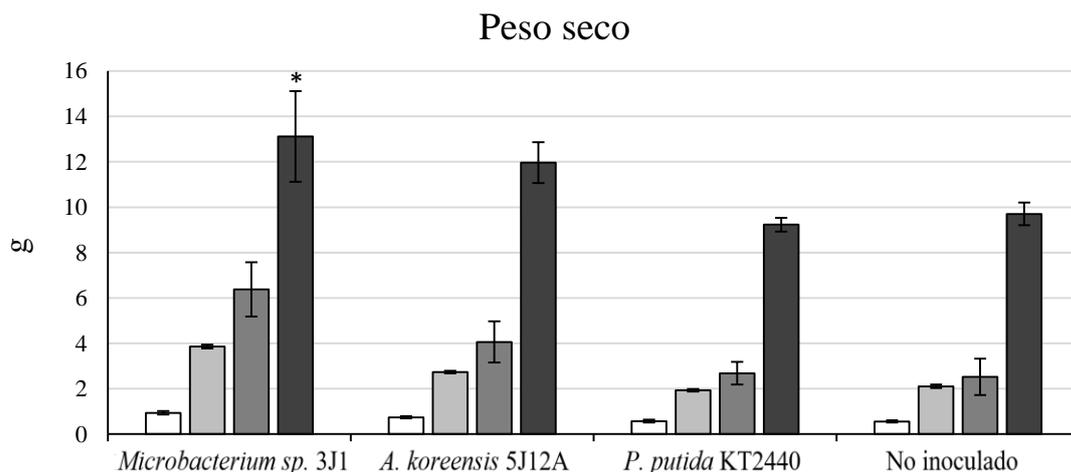


Figura 93. Peso seco de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en g. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 15, el gris claro al día 30, el gris oscuro al 45 y el negro al día 60 de muestreo. Las muestras con asterisco (*) indican diferencia significativa con el control sin inóculo.

El peso totalmente túrgido (PTT) de las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 87-92 g, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. El PTT de las plantas inoculadas tanto con *Microbacterium sp.* 3J1 (94 g) como con *A. koreensis* 5J12A (93 g), no mostró diferencia significativa con respecto al presentado por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 94).

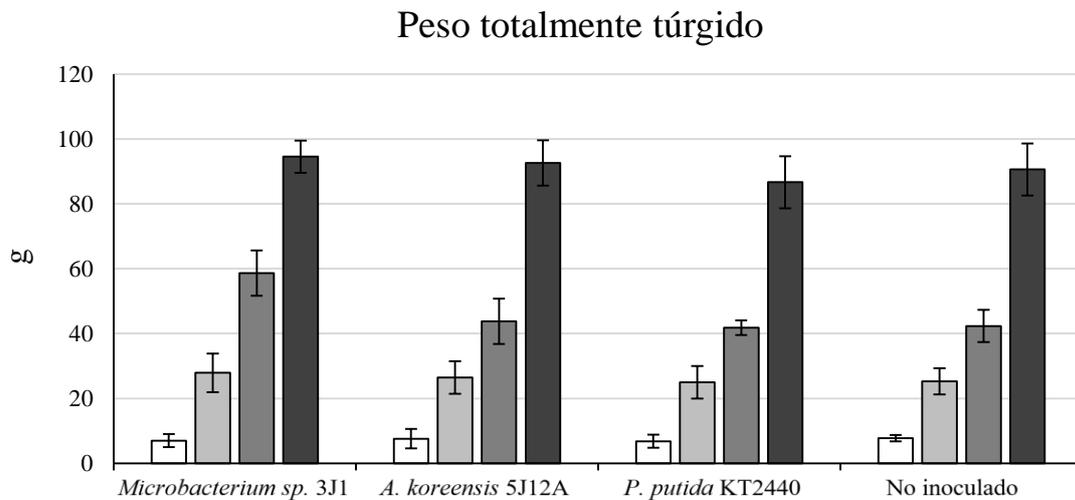


Figura 94. Peso totalmente túrgido de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en g. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 15, el gris claro al día 30, el gris oscuro al 45 y el negro al día 60 de muestreo.

Respecto los valores de CRA, en general se observa que las mayores reducciones se dan entre los muestreos de 14 y 30 días, así como entre los muestreos de 45 y 60 días. El CRA de las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 0,55-0,57, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. El CRA de las plantas inoculadas tanto con *Microbacterium sp.* 3J1 (0,63) como con *A. koreensis* 5J12A (0,61), no mostró diferencia significativa con respecto al presentado por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 95).

Contenido relativo de agua

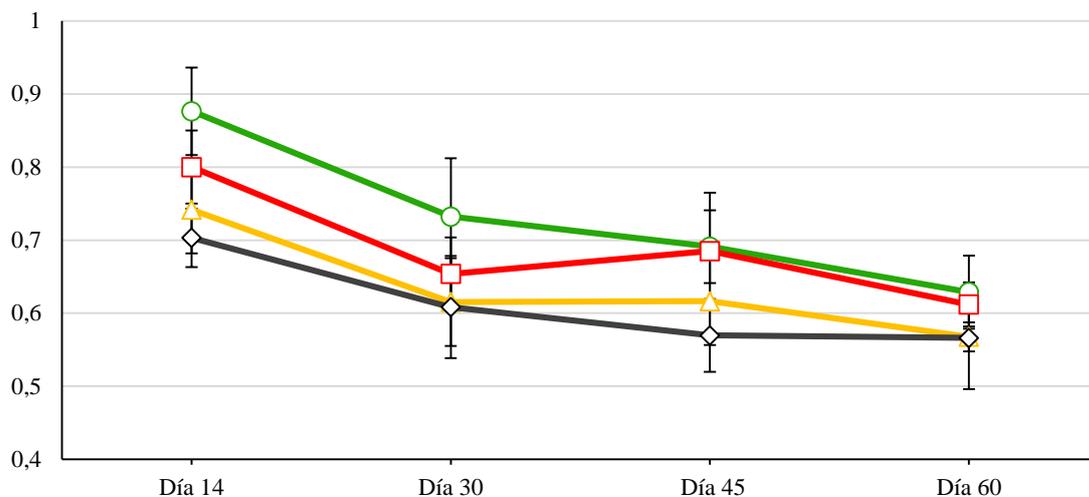


Figura 95. Contenido relativo de agua en plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. En ordenadas se muestran los valores adimensionales del CRA. En abscisas se indican los tiempos de muestreo. Los círculos verdes se corresponden con plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1; los cuadrados rojos, con plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A; los triángulos naranjas, con las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440; y los rombos grises con plantas no inoculadas.

Además del estudio del peso de las plantas, y su contenido hídrico, también estudiamos la longitud de las plantas tanto en su parte aérea como radicular, para evaluar posibles efectos beneficiosos sobre la planta bajo condiciones de estrés hídrico en invernadero. De este modo, para los datos de altura, se tomó como medida la longitud en m desde el punto donde se encontraran las primeras raíces, hasta el plano horizontal formado por el último par de hojas desarrollado. Mientras que para las raíces se tomó como medida la longitud en cm desde el punto donde se encontraran las primeras raíces, hasta la punta del ápice radical más largo sin forzar el estiramiento del mismo.

Así, el valor de la altura alcanzada al final del ensayo por las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 1,6-1,65 m, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. La altura de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 llegó a ser de algo más de 2,10 m, suponiendo un valor en torno a un 20% superior al mostrado por las plantas no inoculadas, así como a las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. Las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, con una altura de 1,90 m, lo que supuso un valor casi un 15% superior al presentado por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 96).

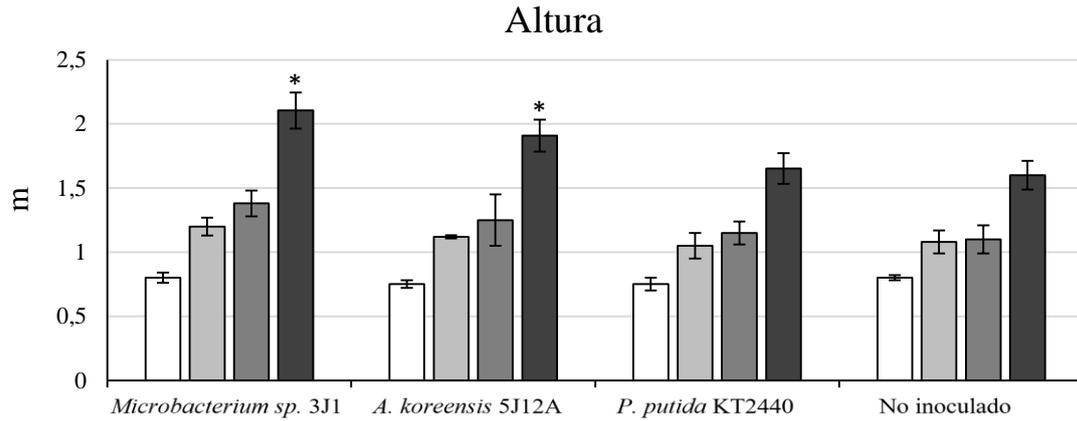


Figura 96. Altura del tallo de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en m. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 15, el gris claro al día 30, el gris oscuro al 45 y el negro al día 60 de muestreo. Las muestras con asterisco (*) indican diferencia significativa con el control sin inóculo.

Por otra parte, la longitud de la raíz al final del ensayo por las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 27-28 cm, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. La longitud de las raíces de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp. 3J1* llegó a ser de algo más de 39 cm, suponiendo un aumento del 30% respecto al mostrado por las plantas no inoculadas, así como a las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. Las plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A, con una longitud de raíz de 33 cm, mostraron diferencia significativa de un 15% en la longitud de su raíces respecto al presentado por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 97).

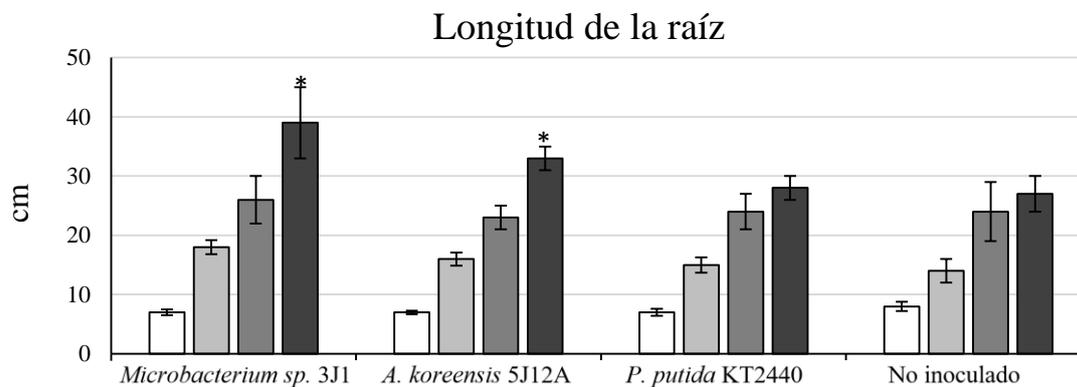


Figura 97. Longitud de la raíz de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en cm. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 15, el gris claro al día 30, el gris oscuro al 45 y el negro al día 60 de muestreo. Las muestras con asterisco (*) indican diferencia significativa con el control sin inóculo.

2. Ensayos de campo

Tras los primeros ensayos de invernadero, se decidió llevar la experiencia de este ensayo a escala de campo para comprobar el nivel de efecto que se mantenía en dichas condiciones. Estos estudios se llevaron a cabo en entre los meses de marzo y junio de los años 2011, 2012 y 2013 en emplazamientos de la Vega de Granada (Granada) y la Vega del río Guadalhorce-Arroyo de los Castellones (Antequera, Málaga), con suelos arcilloso-limosos (figura 98).



Figura 98. Vista aérea de las zonas de siembra en campo. Se muestran las zonas de siembra en la Vega de Granada (A) y la Vega del río Guadalhorce (B) donde se llevaron a cabo los ensayos de campo.

La distribución de la siembra se llevó a cabo en cuadrado latinos tal y como se muestra en la figura 99. El control de los riegos se llevó a cabo mediante canalización abierta y por sistema de riego por ‘pivots’. Tanto en los ensayos con riego como en los de sequía, se emplearon riegos cada 24-48 horas para mantener por la humedad del suelo por encima del 70% hasta una semana después de germinar las semillas. A partir de este momento,

cada ensayo siguió las pautas de riego requeridas para las condiciones a ensayar. Las semillas fueron recubiertas empleando cápsulas de poliestireno disueltas con cloroformo y en las que se mezclaron las células de las cepas como producto de liofilizado con trehalosa 10% (p/v) hasta alcanzar una proporción de 10^8 - 10^9 UCF/ml, siguiendo las indicaciones de la técnica descrita por Manzanera y colaboradores en 2004 (Manzanera y col. 2004).

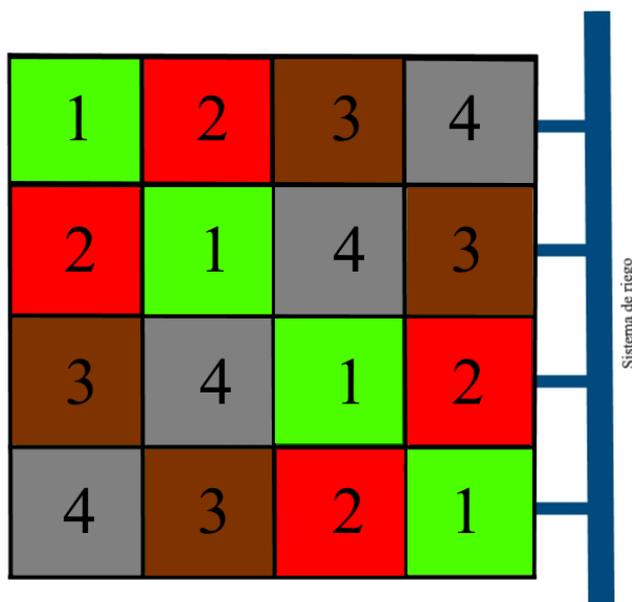


Figura 99. Distribución de la siembra en campo. Se muestra la distribución en cuadrados latinos empleada para la siembra en campo. Los cuadrados verdes corresponden a las semillas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1; los rojos, con las inoculadas con *A. koreensis* 5J12A; los marrones, con las inoculadas con *P. putida* KT2440; y los grises, con las semillas no inoculadas

2.1. Promoción de crecimiento de plantas por acción bacteriana

Para estudiar la promoción del crecimiento de plantas de maíz en campo se seleccionaron las cepas *Microbacterium sp.* 3J1 y *A. koreensis* 5J12A y se empleó el método descrito en la sección 5 de *Materiales y Métodos*. Como control se utilizaron plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 por su capacidad para promover el crecimiento de plantas y por su sensibilidad frente a la falta de agua. De manera adicional, se utilizaron plantas sin inóculo, empleando semillas encapsuladas libres de células. Se muestrearon al menos 20 plantas para registrar el peso fresco (PF), peso seco (PS), peso totalmente túrgido (PTT) y contenido relativo de agua (CRA) descritos según se indica en el apartado 5.5 de la sección de *Materiales y Métodos* en los días 15, 30, 45 y 60 días tras el periodo de adaptación posterior a la germinación.

Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 y *A. koreensis* 5J12A mostraron un aspecto general muy semejante de las plantas no inoculadas y que las inoculadas con *P. putida* KT2440, sin llegar a mostrar diferencias entre las condiciones en los parámetros estudiados. En todos los casos estudiados se dieron contrastes notables entre muestras registradas.

El valor de la humedad en campo se mantuvo lo más constante posible a lo largo del proceso, con un margen de variación máximo del 10% entre las condiciones ensayadas. La humedad mínima registrada fue de en torno al 75% en el día 28 de muestreo (figura 100).

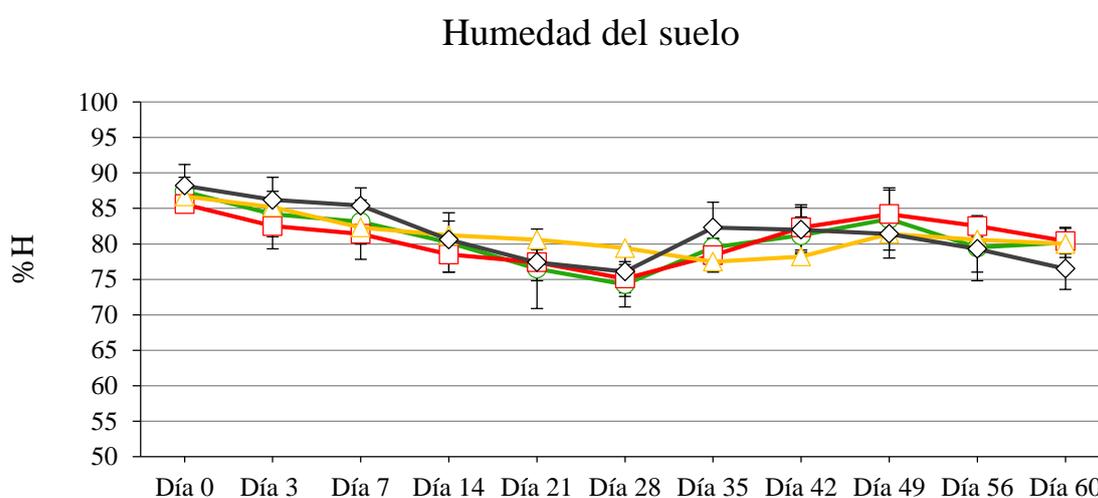


Figura 100. Humedad registrada en suelo bajo riego periódico. En ordenadas de muestran el porcentaje de humedad (%H). En abscisas se indican los tiempos de muestreo. Los círculos verdes se corresponden con plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1; los cuadrados rojos, con plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A; los triángulos naranjas, con las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440; y los rombos grises con plantas no inoculadas.

Se estudió la longitud de las plantas tanto en su parte aérea como radicular, para evaluar los efectos beneficiosos sobre el desarrollo de la planta bajo condiciones de riego periódico en campo. De este modo, para los datos de altura, se tomó como medida la longitud en m desde el punto donde se encontraran las primeras raíces, hasta el plano horizontal formado por el último par de hojas desarrollado. Mientras que para las raíces se tomó como medida la longitud en cm desde el punto donde se encontraran las primeras raíces, hasta la punta del ápice radical más largo sin forzar el estiramiento del mismo.

El valor de la altura alcanzada al final del ensayo por las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 1,72-1,8 m, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. La altura de las plantas inoculadas tanto con *Microbacterium sp.* 3J1 (1,84 m) como con *A. koreensis* 5J12A (1,65 m), no mostró diferencia significativa respecto a la presentada por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 101).

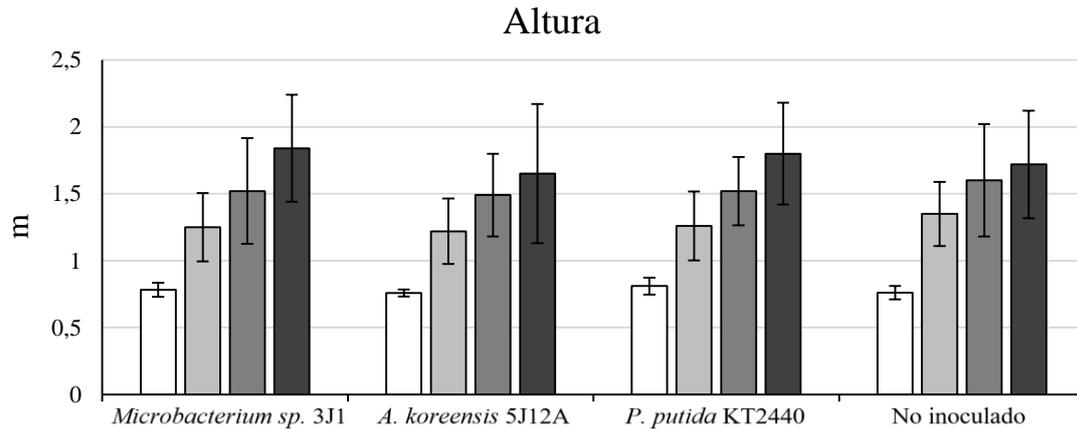


Figura 101. Altura del tallo de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en m. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 15, el gris claro al día 30, el gris oscuro al 45 y el negro al día 60 de muestreo.

Por otra parte, la longitud de la raíz al final del ensayo por las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 30-37 cm, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. La longitud de la raíz de las plantas inoculadas tanto con *Microbacterium sp.* 3J1 (42 cm) como con *A. koreensis* 5J12A (38 cm), no mostró diferencia significativa respecto a la presentada por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 102).

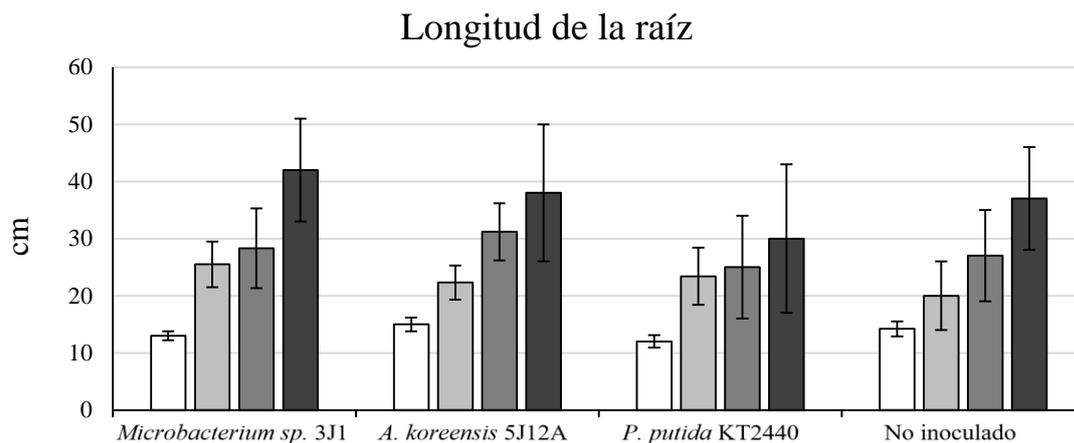


Figura 102. Longitud de la raíz de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en cm. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 15, el gris claro al día 30, el gris oscuro al 45 y el negro al día 60 de muestreo.

El peso fresco (PF) de las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 107-127 g, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. El PF de las plantas inoculadas tanto con *Microbacterium sp. 3J1* (138 g) como con *A. koreensis 5J12A* (116 g), no mostró diferencia significativa respecto al presentado por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 103).

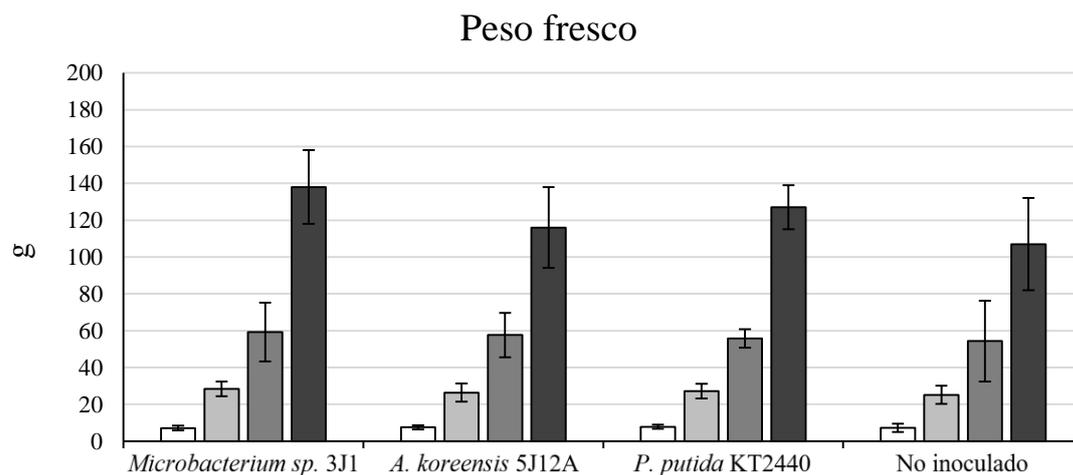


Figura 103. Peso fresco de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en cm. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 15, el gris claro al día 30, el gris oscuro al 45 y el negro al día 60 de muestreo.

El peso seco (PS) de las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 15-18 g, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. El PS de las plantas inoculadas tanto con *Microbacterium sp.* 3J1 (21 g) como con *A. koreensis* 5J12A (19 g), no mostró diferencia significativa respecto al presentado por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 104).

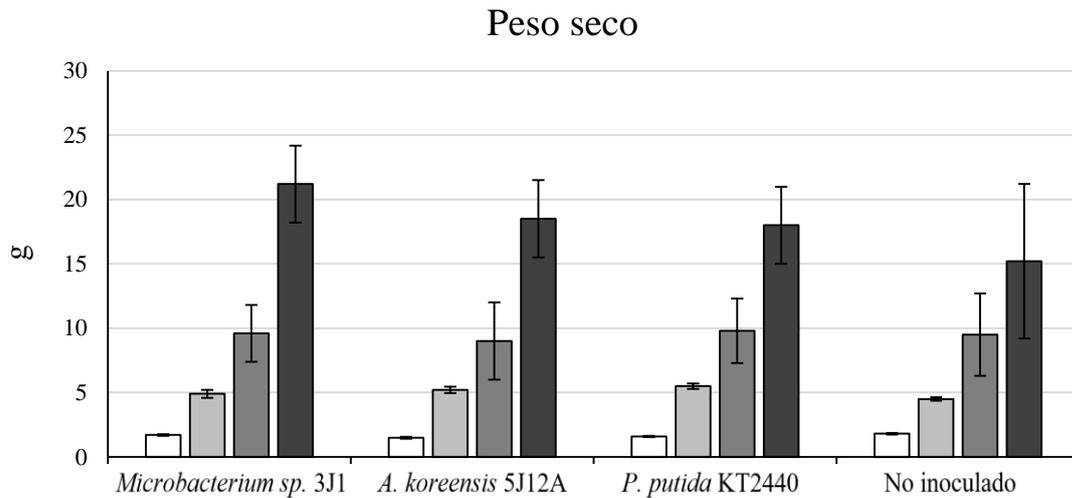


Figura 104. Peso seco de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en cm. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 15, el gris claro al día 30, el gris oscuro al 45 y el negro al día 60 de muestreo.

El peso totalmente túrgido (PTT) de las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 141-155 g, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. El PTT de las plantas inoculadas tanto con *Microbacterium sp.* 3J1 (168 g) como con *A. koreensis* 5J12A (137 g), no mostró diferencia significativa respecto al presentado por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 105).

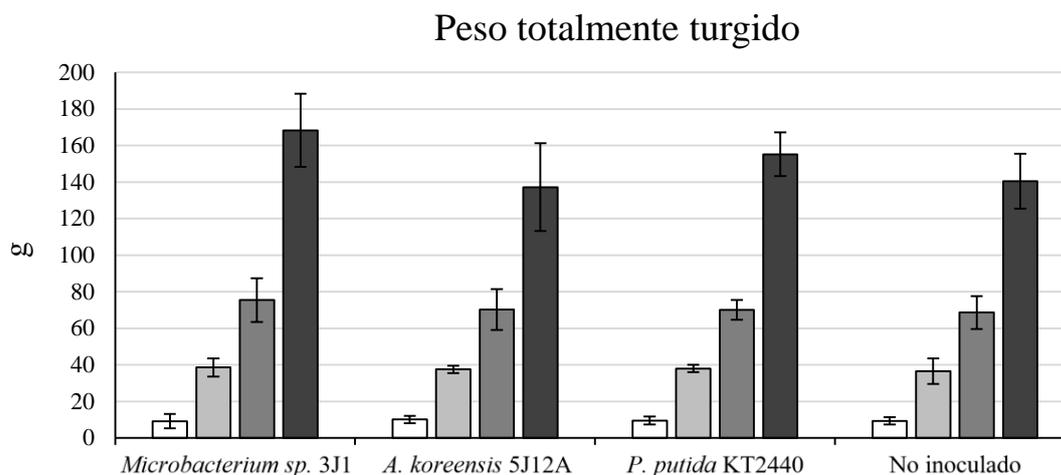


Figura 105. Peso totalmente túrgido de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en cm. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 15, el gris claro al día 30, el gris oscuro al 45 y el negro al día 60 de muestreo.

Respecto a los valores de CRA, que indican el estado hídrico de la planta respecto al mejor estado posible o al estado hídrico ideal de la misma, en general se observa que estos valores de las plantas descendieron ligeramente hacia el día 30 de muestreo, pero volvieron a aumentar hacia el día 45 y se mantuvieron en general estables o con un ligero aumento hacia el final del ensayo. El CRA de las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 0,73-0,79, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. El CRA de las plantas inoculadas tanto con *Microbacterium sp. 3J1* (0,79) como con *A. koreensis 5J12A* (0,82), no mostró diferencia significativa con respecto al presentado por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 106).

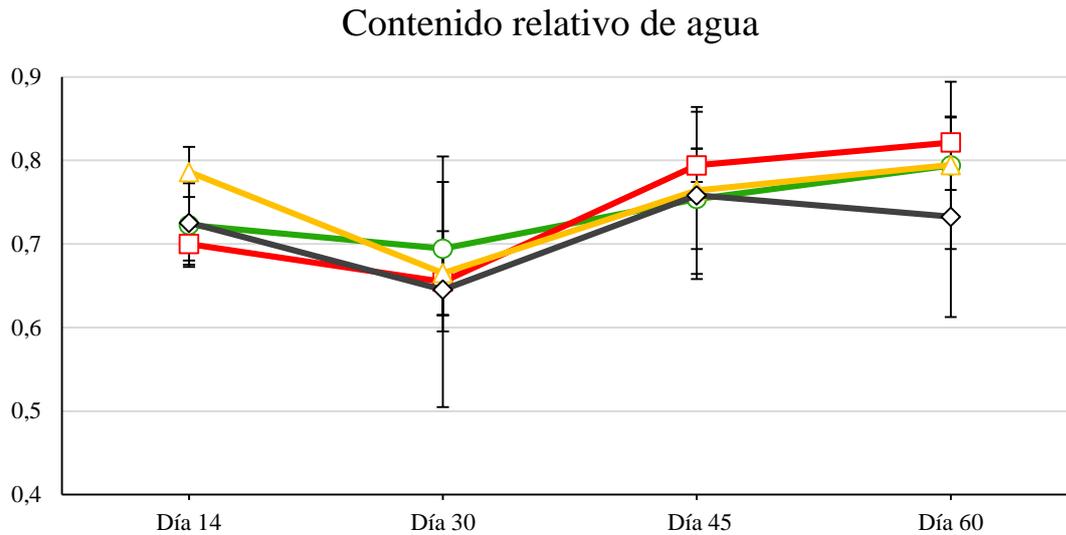


Figura 106. Contenido relativo de agua en plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de riego. En ordenadas se muestran los valores adimensionales del CRA. En abscisas se indican los tiempos de muestreo. Los círculos verdes se corresponden con plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1; los cuadrados rojos, con plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A; los triángulos naranjas, con las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440; y los rombos grises con plantas no inoculadas.

2.2. Xeroprotección de plantas de pimiento por acción bacteriana

Tras estudiar la promoción del crecimiento de las plantas por parte de los microorganismos en campo, se procedió a estudiar el grado de efectividad que mantenían las cepas para proteger a las plantas de maíz contra la sequía en condiciones de campo. Se emplearon nuevamente las cepas *Microbacterium sp.* 3J1 y *A. koreensis* 5J12A, usando el método descrito en la sección 5 de *Materiales y Métodos* para llevar a cabo dicho estudio. Como control se utilizaron plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 por su capacidad para promover el crecimiento de plantas y por su sensibilidad frente a la falta de agua. De manera adicional, se utilizaron plantas sin inóculo, empleando semillas encapsuladas libres de células. Se muestrearon al menos 20 plantas para registrar el peso fresco (PF), peso seco (PS), peso totalmente túrgido (PTT) y contenido relativo de agua (CRA) descritos según se indica en el apartado 5.5 de la sección de *Materiales y Métodos* en los días 15, 30, 45 y 60 días tras el periodo de adaptación posterior a la germinación.

Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 y *A. koreensis* 5J12A mostraron mucha variabilidad entre muestras, sin llegar a mostrar grandes diferencias en los parámetros estudiados con las plantas no inoculadas y con las inoculadas con *P. putida* KT2440. La humedad del suelo del campo fue disminuyendo progresivamente a un ritmo de un 2-5% por semana. El valor mínimo registrado fue de en torno al 20% el último día de muestreo. El descenso total fue de entre el 55-60%. No hubo diferencia significativa en la pérdida de humedad entre las condiciones ensayadas (figura 107).

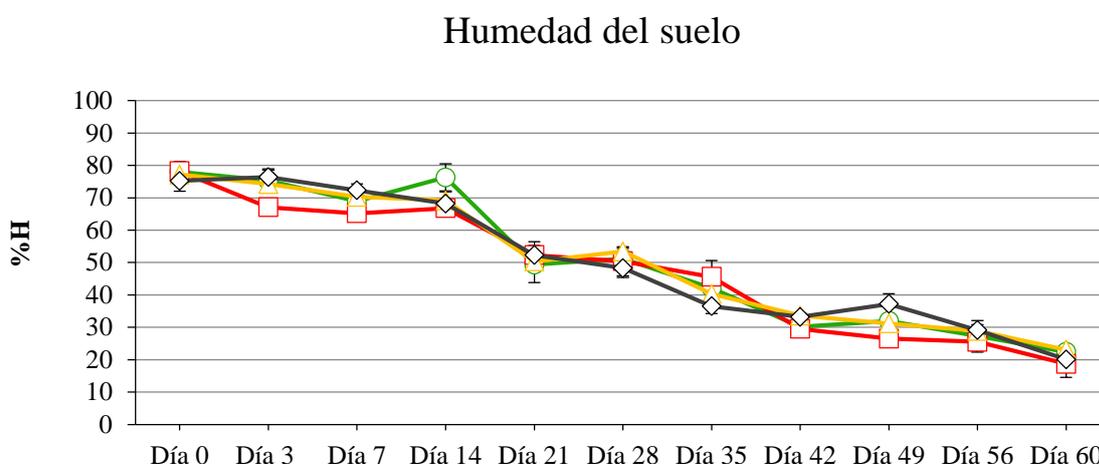


Figura 107. Humedad registrada en suelo bajo condiciones de sequía. En ordenadas se muestran el porcentaje de humedad (%H). En abscisas se indican los tiempos de muestreo. Los círculos verdes se corresponden con plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1; los cuadrados rojos, con plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A; los triángulos naranjas, con las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440; y los rombos grises con plantas no inoculadas.

El peso fresco (PF) de las plantas no inoculadas, así como el de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 33-39 g, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. El PF de las plantas inoculadas tanto con *Microbacterium sp.* 3J1 (41 g) como con *A. koreensis* 5J12A (32 g), no mostró diferencia significativa respecto al presentado por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 108).

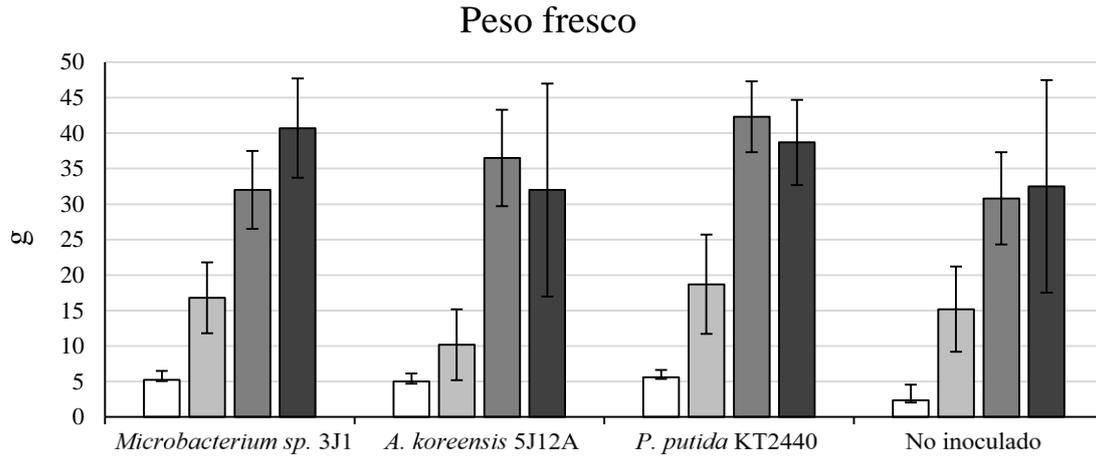


Figura 108. Peso fresco de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en g. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 15, el gris claro al día 30, el gris oscuro al 45 y el negro al día 60 de muestreo.

El peso seco (PS) de las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 11-15 g, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. El PS de las plantas inoculadas tanto con *Microbacterium sp. 3J1* (11 g) como con *A. koreensis* 5J12A (13 g), no mostró diferencia significativa respecto al presentado por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 109).

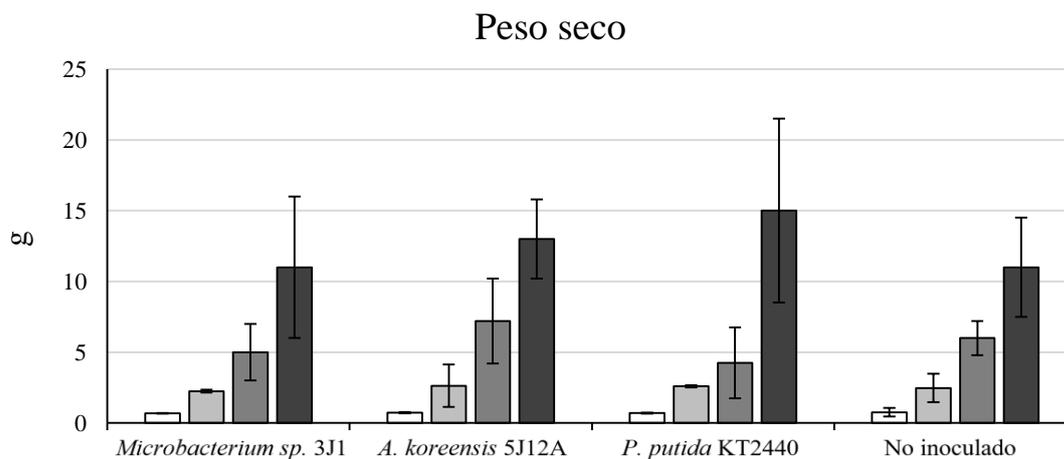


Figura 109. Peso seco de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en g. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 15, el gris claro al día 30, el gris oscuro al 45 y el negro al día 60 de muestreo.

El peso totalmente túrgido (PTT) de las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 11-15 g, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. El PTT de las plantas inoculadas tanto con *Microbacterium sp.* 3J1 (11 g), así como el de las inoculadas con *A. koreensis* 5J12A (13 g), no mostró diferencia significativa respecto al presentado por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 110).

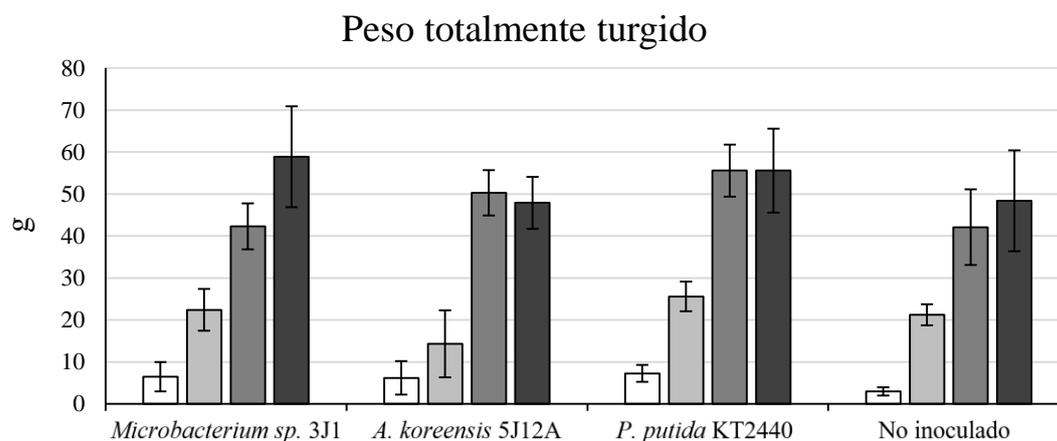


Figura 110. Peso totalmente túrgido de plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en g. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7, el gris claro al día 14, el gris oscuro al 20 y el negro al día 33 de muestreo.

Respecto al CRA, en general se observa que los valores se redujeron de manera más marcada para las muestras tomadas los días 14-30 y 45-60. Los valores de CRA de las plantas no inoculadas, así como de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fueron de 0,57-0,58, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. El CRA de las plantas inoculadas tanto con *Microbacterium sp.* 3J1 (0,62) como con *A. koreensis* 5J12A (0,54), no mostró diferencia significativa con respecto al presentado por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 111).

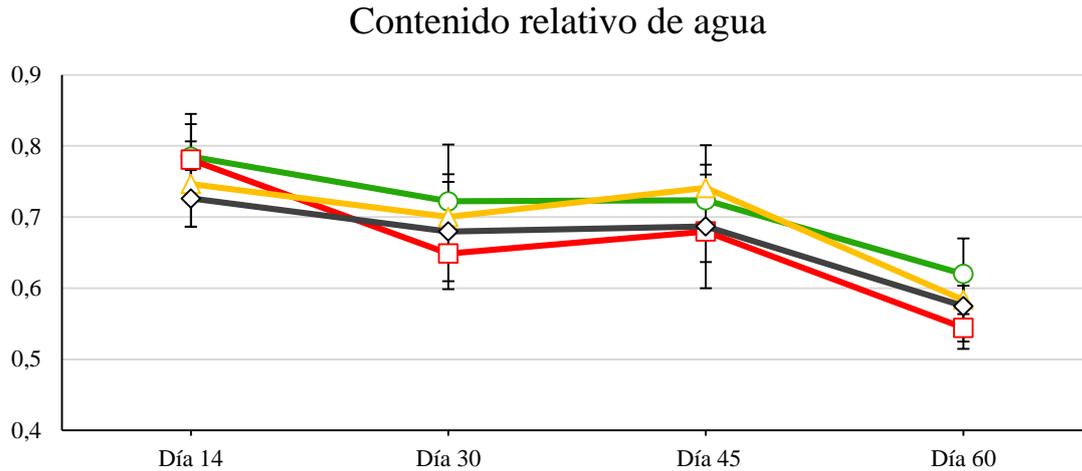


Figura 111. Contenido relativo de agua en plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. En ordenadas se muestran los valores adimensionales del CRA. En abscisas se indican los tiempos de muestreo. Los círculos verdes se corresponden con plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1; los cuadrados rojos, con plantas inoculadas con *A. koreensis* 5J12A; los triángulos naranjas, con las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440; y los rombos grises con plantas no inoculadas.

Además del estudio del peso de las plantas, y su contenido hídrico, también estudiamos la longitud de las plantas tanto en su parte aérea como radicular, para evaluar posibles efectos beneficiosos sobre la planta bajo condiciones de estrés hídrico en condiciones de campo. De este modo, para los datos de altura, se tomó como medida la longitud en m desde el punto donde se encontraran las primeras raíces, hasta el plano horizontal formado por el último par de hojas desarrollado. Mientras que para las raíces se tomó como medida la longitud en cm desde el punto donde se encontraran las primeras raíces, hasta la punta del ápice radical más largo sin forzar el estiramiento del mismo.

El valor de la altura alcanzada al final del ensayo por las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 1,52-1,78 m, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. La altura de las plantas inoculadas tanto con *Microbacterium sp.* 3J1 (1,89 m) como con *A. koreensis* 5J12A (1,47 m), no mostró diferencia significativa respecto a la presentada por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 112).

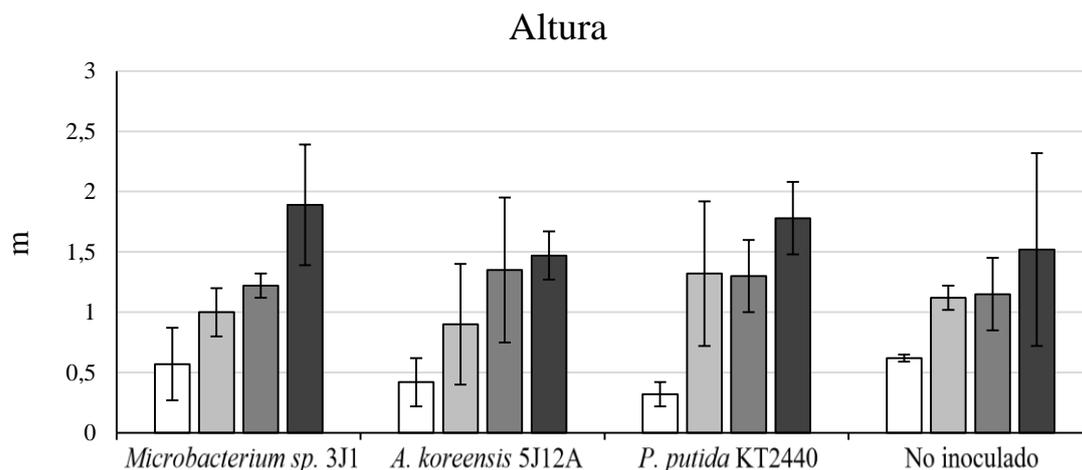


Figura 112. Altura del tallo de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en m. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 15, el gris claro al día 30, el gris oscuro al 45 y el negro al día 60 de muestreo.

Por otra parte, la longitud de la raíz al final del ensayo por las plantas no inoculadas, así como por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, fue de 17-25 cm, no mostrando diferencia significativa entre ambas condiciones. La longitud de la raíz de las plantas inoculadas tanto con *Microbacterium sp. 3J1* (28 cm) como con *A. koreensis* 5J12A (20 cm), no mostró diferencia significativa respecto a la presentada por las plantas no inoculadas o por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 113).

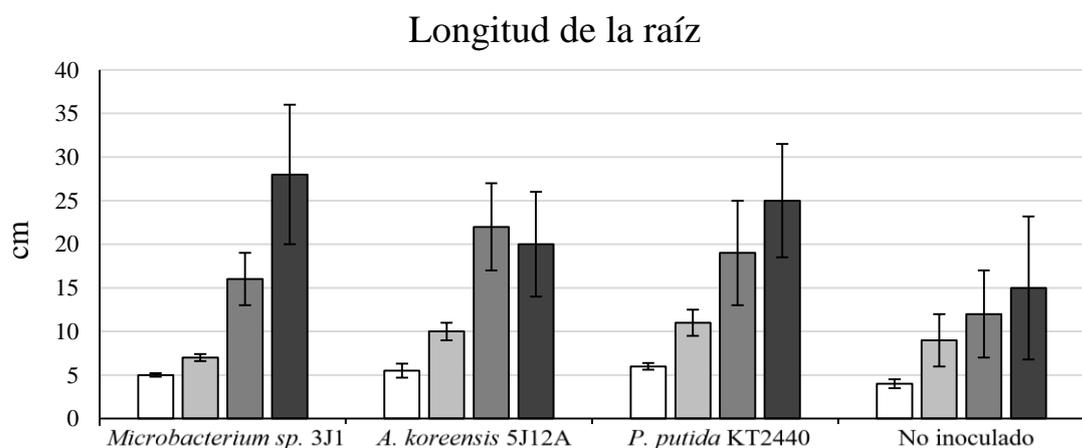


Figura 113. Longitud de la raíz de las plantas inoculadas con las cepas xerotolerantes en condiciones de sequía. En ordenadas se muestra longitud del tallo de la planta en cm. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 15, el gris claro al día 30, el gris oscuro al 45 y el negro al día 60 de muestreo.

CAPÍTULO V

Los resultados de promoción del crecimiento y protección frente a la sequía en plantas por las cepas xerotolerantes *Microbacterium sp.* 3J1 y *Arthrobacter koreensis* 5J12A obtenidos a escala de invernadero y campo mostraron diferencias siendo mucho menores en el primero de los casos y nulas en el segundo, respecto con las plantas no inoculadas, o con las plantas inoculadas con *Pseudomonas putida* KT2440. Entre las posibles explicaciones puede estar la diferencia de formulación utilizada en el laboratorio y en las condiciones de invernadero y campo, en las que el inóculo está más concentrado entorno a la raíz de la planta que en el primero de los casos. Las formulaciones en cápsulas sólidas, pese a permitir un mayor contacto inicial con el plantón germinado, no garantizan un suministro constante de la cepa en el suelo (Smith, 1995, Fernandes Junior *et al.*, 2009, Malusá *et al.*, 2012). Por lo tanto, el microorganismo pierde gran parte de su efectividad rápidamente, imposibilitando un tiempo de contacto adecuado entre planta y microorganismo inoculante. Este insuficiente tiempo de contacto, impide que el microorganismo se establezca en el suelo para mantener la interacción en fases más avanzadas del desarrollo de la planta (Stephens & Rask, 2000, Nelson, 2004, Xavier *et al.*, 2004, Fernandes Junior *et al.*, 2009). Se ha comprobado que la formulación en alginato favorece la supervivencia de la cepa inoculante en el suelo (Bashan, 1986, Power *et al.*, 2011). El objetivo de este capítulo fue emplear una nueva formulación basada en alginato para favorecer el crecimiento de la planta y la protección frente a la sequía por parte de *Microbacterium sp.* 3J1. Para estudiar si la formulación en base de alginato se adecuaba a las necesidades, se estudió si el microorganismo formaba biopelículas, filamentos, o modificaciones de las células radiculares, ya que la formación de estas estructuras permite a la cepa inoculante sobrevivir por un periodo de tiempo más largo en el ambiente. Para identificar si la formulación en alginato permitía una supervivencia más prolongada del microorganismo en el suelo se analizó la presencia del microorganismo y se compararon estos resultados con los observados con el inoculante en base líquida. Finalmente se buscó conocer qué características de la nueva formulación permiten una mayor viabilidad del inoculante, respecto a las empleadas anteriormente.

1. Mecanismos de interacción planta-microorganismo.

Para identificar cómo se establece el contacto entre planta y microorganismo, se seleccionó la cepa xerotolerante *Microbacterium sp.* 3J1 como inoculante ya que proporcionó a las plantas la mayor longitud del tallo y de la raíz, el mayor peso fresco, seco y totalmente túrgido, así como el mayor contenido relativo de agua, tanto en condiciones de riego como de sequía. Como planta modelo se seleccionó al pimiento, dados los numerosos estudios realizados con esta planta. Estos estudios incluyen ensayos de transcriptómica llevados a cabo en nuestro grupo, por la Lcda. Cristina García Fontana, con esta cepa y planta modelo en condiciones de sequía (García-Fontana et al., *En preparación*). Estos análisis de transcriptómica mostraron la inducción de genes involucrados en la morfogénesis y diferenciación del tricoma y células pilosas, en la adhesión y reconocimiento celular, y modificaciones fisiológicas o morfológicas en simbiosis cuando la planta y el microorganismo se encontraban en condiciones de sequía. Por otra parte, en cultivos con PEG 50% de la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 se indujeron genes relacionados con la biosíntesis de exopolisacáridos y con la unión extracelular de solutos, ambos involucrados en la formación de biopelículas. Basándonos en estos resultados decidimos comprobar la formación de biopelículas como método de contacto entre planta y microorganismo y el tipo de colonización de la planta por parte del microorganismo, mediante microscopía electrónica de barrido de presión variable, VP-SEM, y mediante microscopía confocal de láser fluorescente, CLMS.

1.1. Interacción planta-microorganismo por microscopía electrónica de barrido de presión variable (VP-SEM)

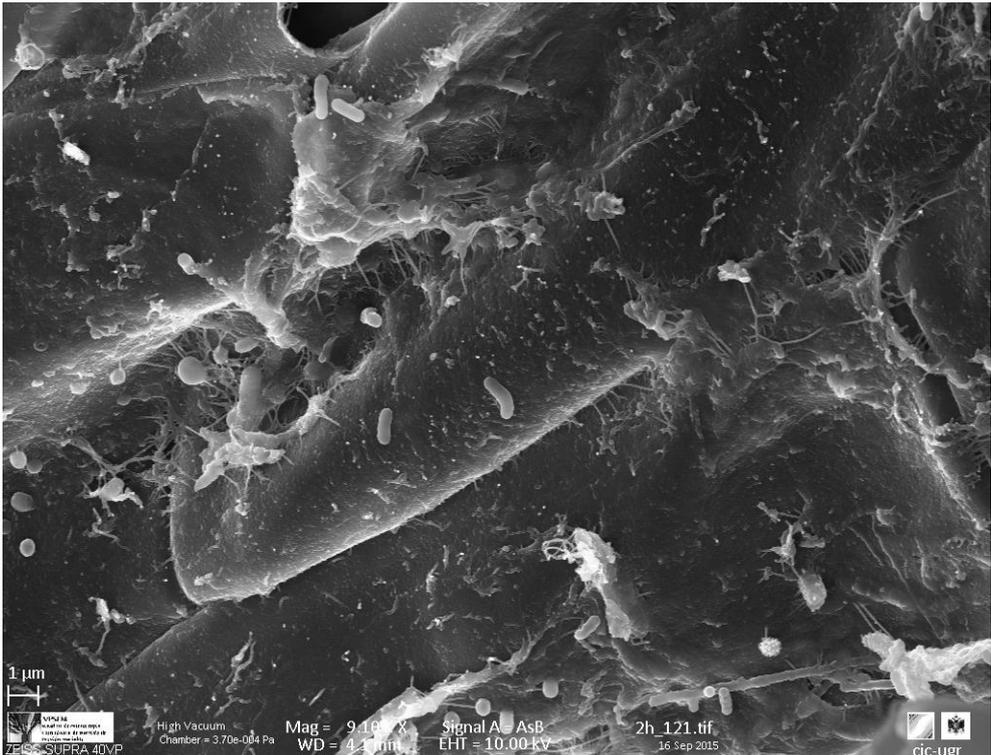
La formulación de inoculantes en alginato mantiene la viabilidad de la población bacteriana y permite una liberación progresiva de los mismos. Esta viabilidad y tipo de liberación va a condicionar la colonización de la planta por el microorganismo. Es necesario ajustar la concentración de alginato y de otros compuestos en la formulación, en función del tiempo requerido para la interacción del microorganismo con la planta y en función del tipo de colonización que establezca este microorganismo con la planta (Bashan, 1998, Abd El-Fattah *et al.*, 2013). Por lo tanto la concentración del alginato empleada determinará el tipo de liberación del microorganismo. Así, una concentración baja de alginato (1-2%, p/v) permite una liberación de células alta y rápida, óptima para

una colonización individual inespecífica, o sin agregaciones celulares específicas, tal y como ocurre con bacterias rizosféricas que actúan como biocontroladores o en el caso de bacterias epifíticas (Joe *et al.*, 2012). Una concentración media (3%, p/v) produce una liberación más paulatina y prolongada en el tiempo la cual sería más adecuada para contactos que requieren de la formación de filamentos radiculares, engrosamientos o nodulaciones, tales como las bacterias nodulantes o endofíticas. Sin embargo, una concentración mayor (4-6%, p/v) tiende a favorecer la retención de agua, la elasticidad y viscosidad de la matriz, así como una mayor concentración de células estables. Esta alta concentración de alginato es adecuada para permitir contactos entre la planta y el microorganismo que requieren de un tiempo más prolongado, tal y como ocurre con aquellas cepas cuyo principal mecanismo de colonización es la formación de biopelículas en localizaciones específicas de la raíz de la planta (DeLucca *et al.*, 1990, Smidsrod & Skjak-Braek, 1990, Kostov *et al.*, 2010, Fadel *et al.*, 2013). Por lo tanto, es necesario conocer con precisión el modo de contacto para ajustar la concentración de alginato en la formulación y permitir de este modo una colonización adecuada.

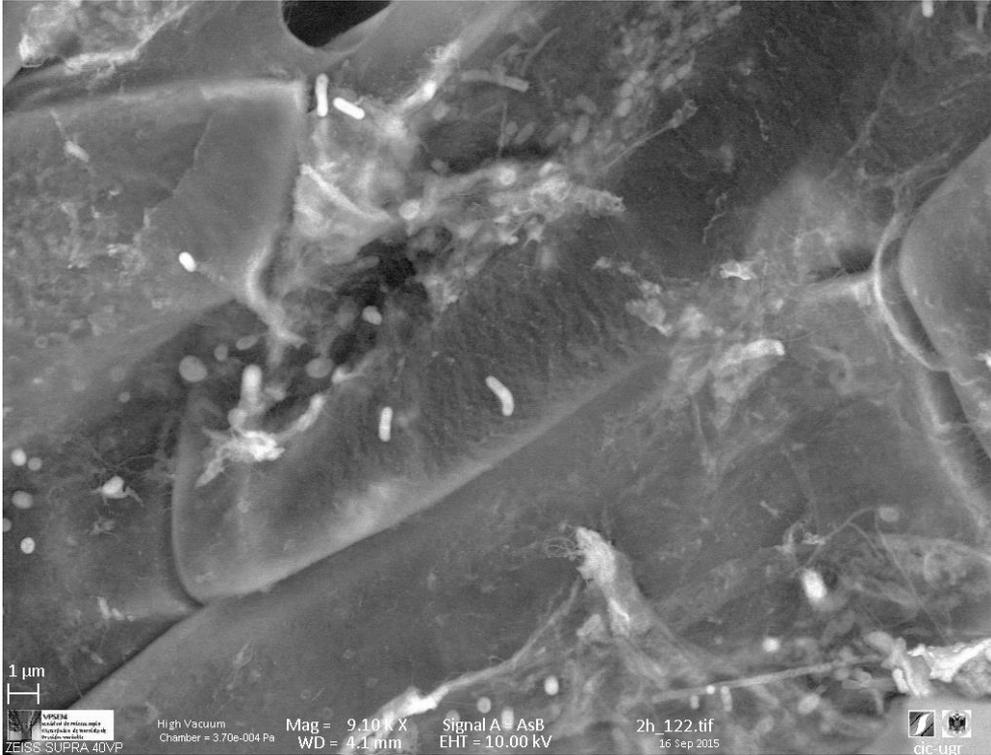
La caracterización de la interacción de *Microbacterium sp.* 3J1 con la planta en la formulación líquida, empleada a nivel de laboratorio, se realizó mediante VP-SEM. Este estudio permite identificar el tipo de colonización que emplea esta cepa. El objetivo último de este análisis fue ajustar la concentración de alginato de sodio, así como de otros compuestos de la formulación, para incrementar la estabilidad de la cepa y facilitar la reconstitución del inoculante, de manera que se facilite la colonización óptima de la planta por parte del microorganismo. Para llevar a cabo dicho estudio, se inocularon raíces de pimiento esterilizadas en superficie con cultivos puros de *Microbacterium sp.* 3J1 y se siguió el proceso de interacción a distintos tiempos (2, 5 y 24 h). Se empleó la cepa *Pseudomonas putida* KT2440 como control de cepa BPCP, así como por formar biopelículas como modo de contacto (Nelson *et al.* 2002). En el análisis por VP-SEM se obtuvieron imágenes de barrido electrónico de superficie (*In Lens*), así como imágenes de barrido de baja profundidad por retrodispersión (*AsB*, *backscattering*), tal y como se indica en el apartado 11.5 de *Materiales y Métodos*. Se buscó la identificación de zonas en el exterior de la planta donde se acumularan las células microbianas, así como estructuras de unión y entrada de la cepa microbiana en la raíz de la planta.

Así, en etapas tempranas de contacto (1-2 horas) se observó la formación de matrices iniciales de biopelículas en las raíces inoculadas con *P. putida* KT2440 establecidas sin patrones claros (figura 114). En el caso de *Microbacterium sp.* 3J1, se observaron adhesiones de células aisladas o de grupos pequeños localizados inespecíficamente (figura 115). Estas uniones se caracterizaron por la formación de conexiones pilosas (filamentos) y anclajes matriciales de las células en la superficie de la epidermis radicular (figura 116). Se detectaron algunas células bacterianas completamente inmersas en determinados puntos de adhesión reconocibles como las zonas entre paredes celulares de la raíz o en las vellosidades radiculares (zonas de contacto preferencial), siendo en cualquier caso una estructura menos definida que las detectadas en raíces inoculadas con *P. putida* KT2440. Tras un mayor tiempo de contacto (3-5 horas) las raíces inoculadas con *P. putida* KT2440 ya mostraban biopelículas muy desarrolladas e incluso estructuras muy consolidadas en torno a ellas (figura 117). Las células ya se encontraban establecidas subsuperficialmente de manera amplia a lo largo de los distintos campos visuales analizados. En cuanto a las raíces inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1, se observaron agrupaciones bacterianas similares a biopelículas en zonas específicas de la raíz, en contraste con el establecimiento de biopelículas detectadas en las raíces inoculadas con *P. putida* KT2440 (figura 118). También se observó la formación de tricomas, torceduras y adaptaciones en las radículas y células pilosas más finas de las raíces de pimiento que no se detectaron tan claramente y en un número tan elevado en las raíces inoculadas con *P. putida* KT2440. Por último, en las muestras preparadas tras 24 horas de contacto de raíces inoculadas con *P. putida* KT2440 se observó una colonización muy expandida sin responder a patrones concretos, con una amplia difusión en todas las zonas radiculares y bajo las primeras capas epidermiales (colonización generalista). En las raíces inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1, se observó menor número de células bacterianas en la superficie, salvo en las biopelículas de las zonas de contacto preferenciales. Se detectaron así mismo zonas densamente pobladas por la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 bajo la superficie radicular en dichas zonas (figura 119). Así, mostraban mayor especificidad de contacto que en las raíces inoculadas con *P. putida* KT2440. La señal de los electrones de retrodispersión permitió identificar que, en ambos casos, las cepas estudiadas se encontraban dispuestas en planos laminares paralelos bajo la superficie y, en el caso de las raíces inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1, en agrupaciones en torno a engrosamientos de los espacios intersticiales de las paredes celulares.

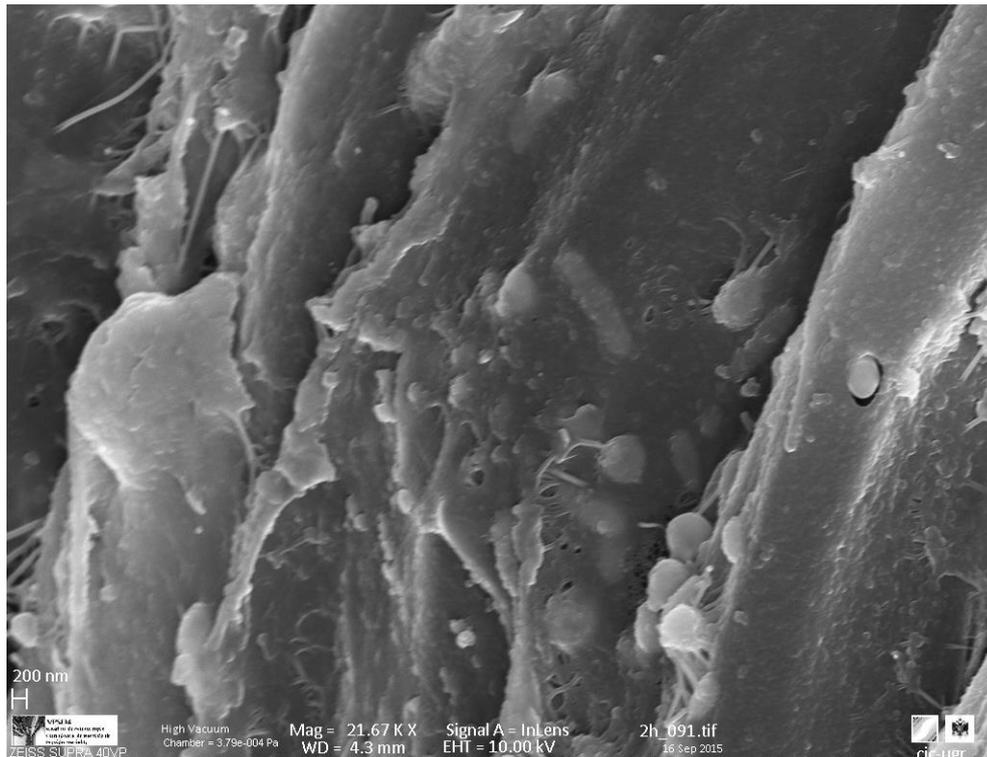
A



B



C



D

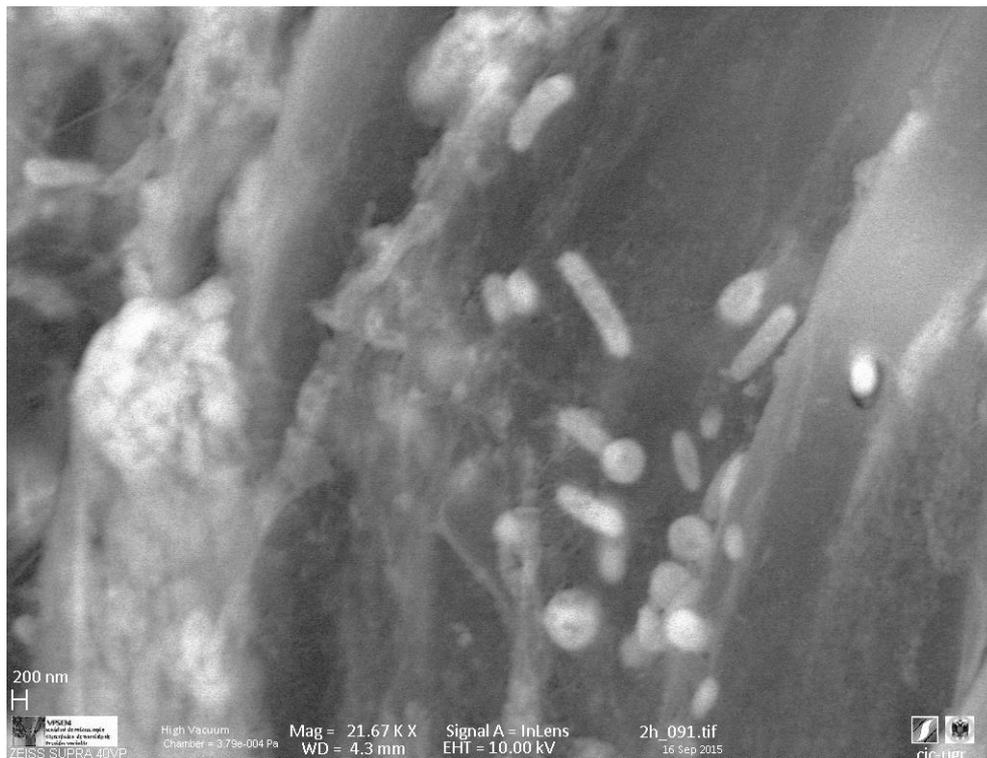
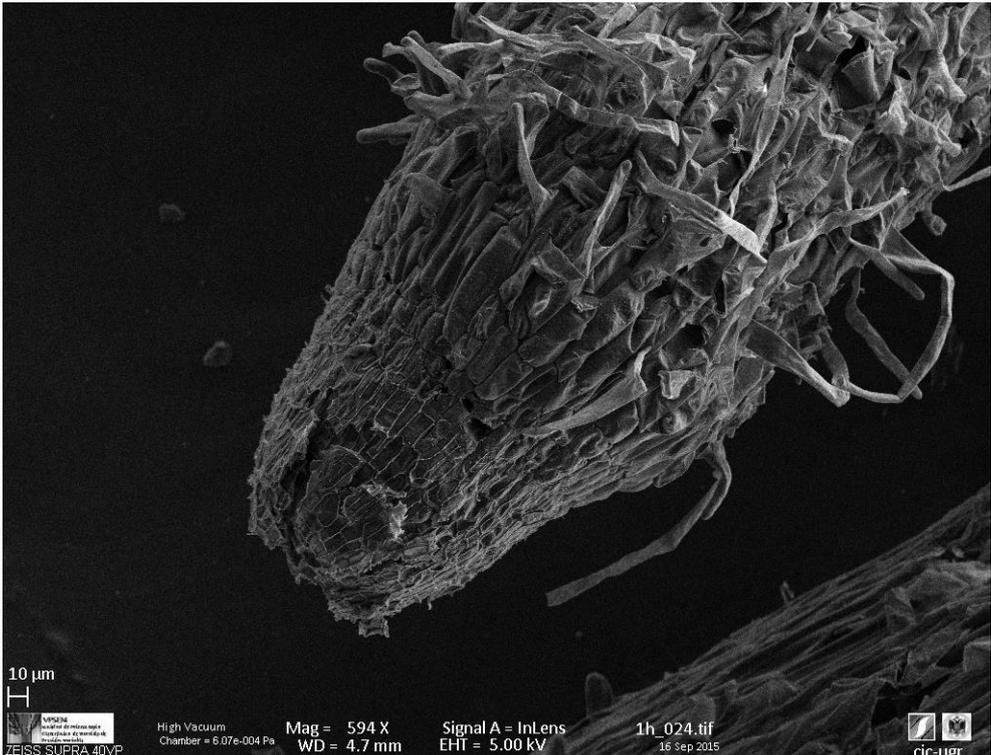
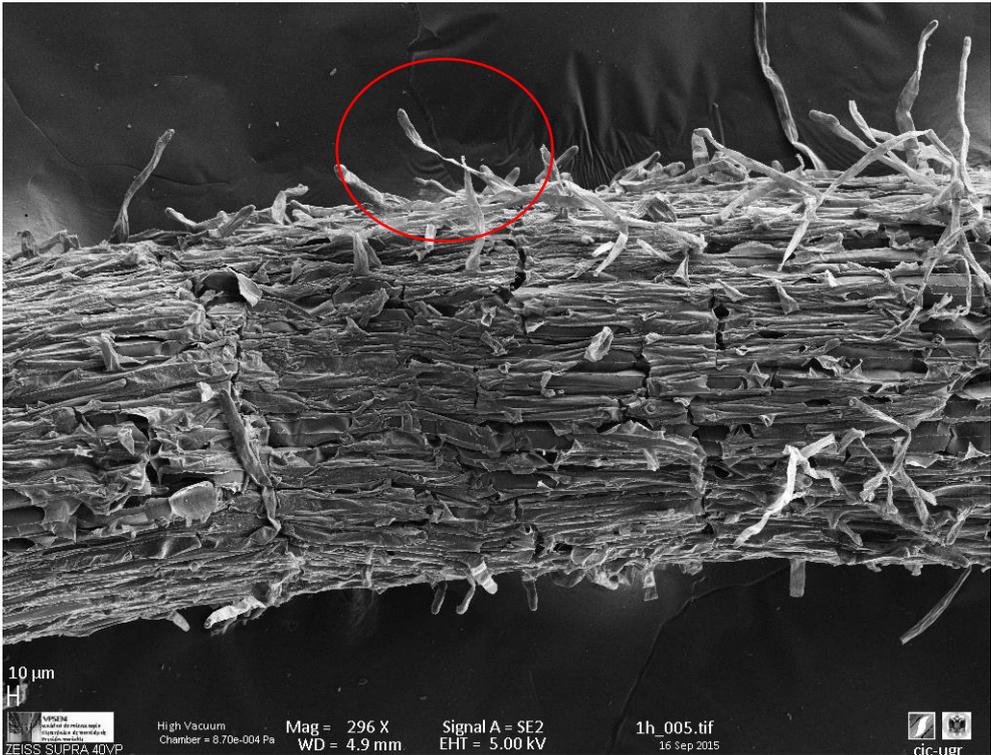


Figura 114. Micrografías electrónicas de barrido de raíces de pimiento inoculadas con *P. putida* KT2440 a las 1-2 h. Se muestran micrografías de VP-SEM de las fases iniciales del contacto donde se puede apreciar, tanto por escaneo electrónico directo, como por retrodispersión de electrones (profundidad), como las células de la cepa inoculante se establecen sin organización específica bajo la epidermis de la raíz inoculada (A y B), así como las formaciones de biopelículas en detalle (C y D).

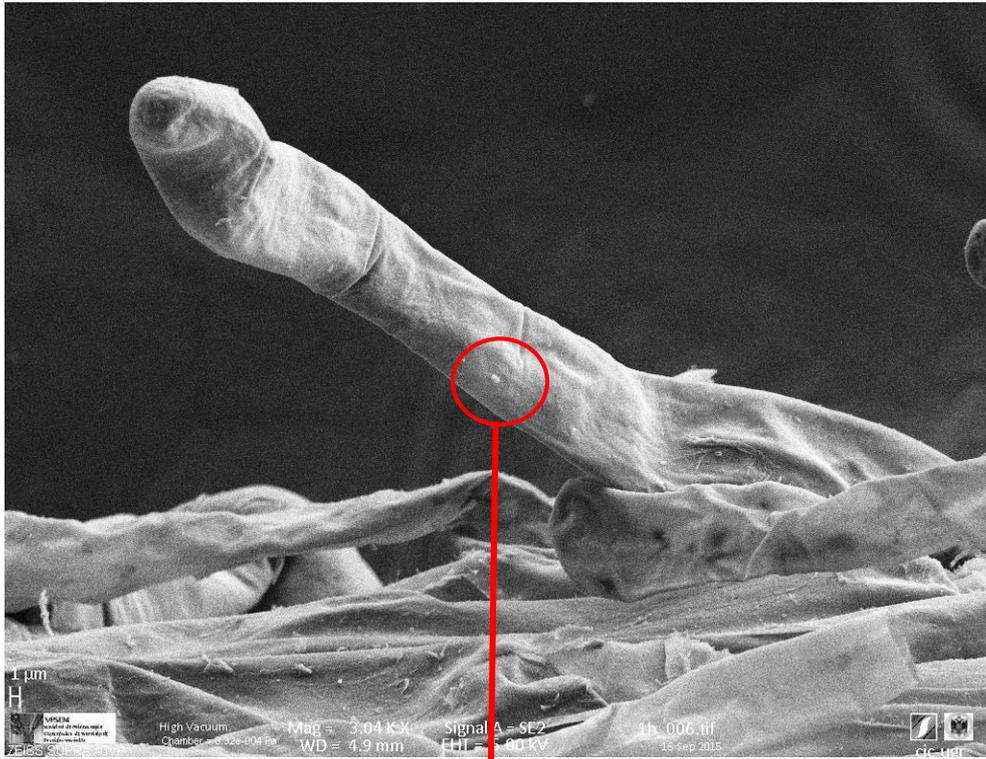
A



B



C

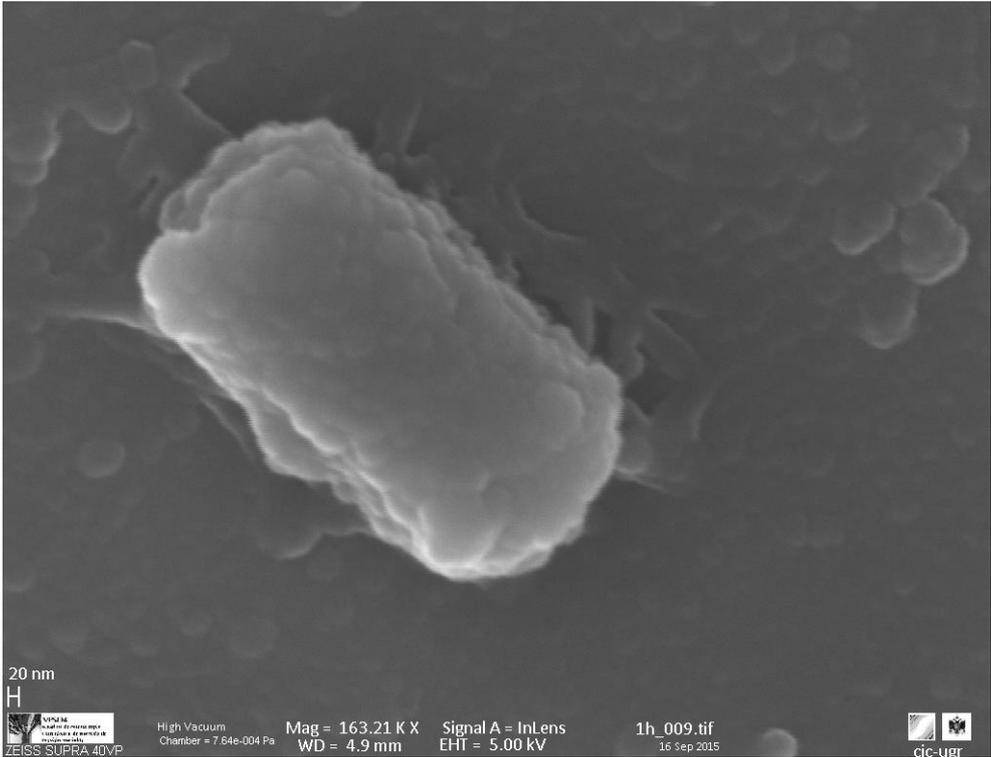


D

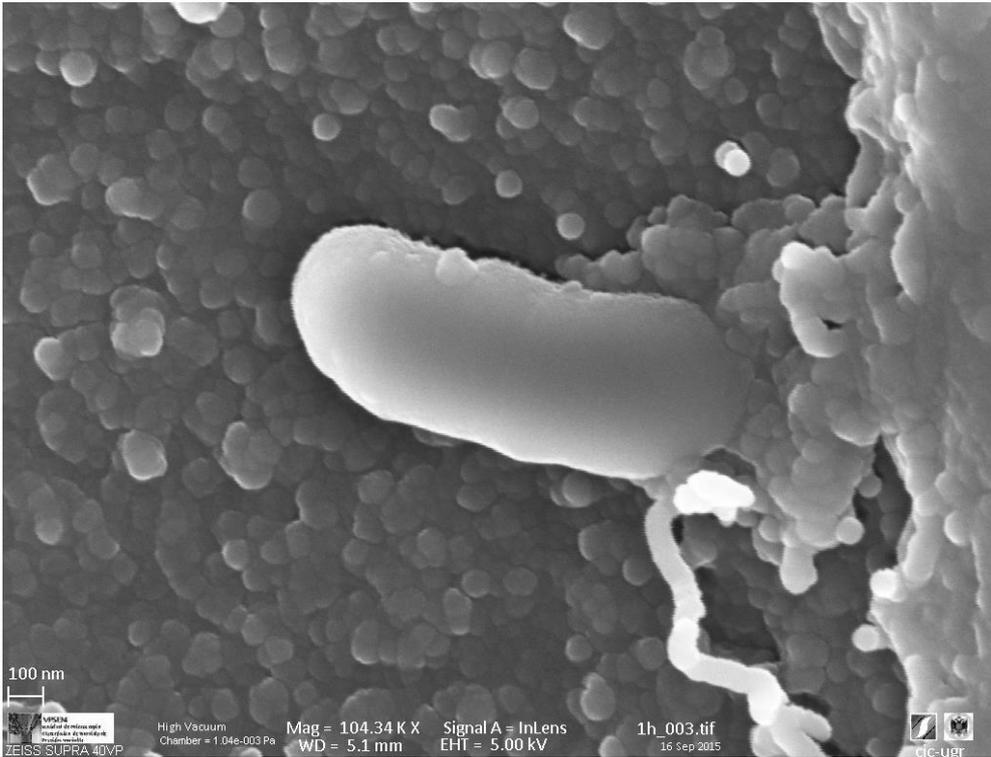


Figura 115. Micrografías electrónicas de barrido de raíces de pimiento inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 a las 1-2h. Se muestran micrografías de VP-SEM de las fases iniciales del contacto, con el aspecto inicial de los ápices radiculares (A) y detalles de las primeras etapas de la colonización en las microvellosidades (B, C y D). Las marcas en rojo indican zonas ampliadas y correspondencia en la siguiente micrografía. La escala de referencia de cada micrografía se ha ajustado para facilitar la identificación de la cepa inoculante.

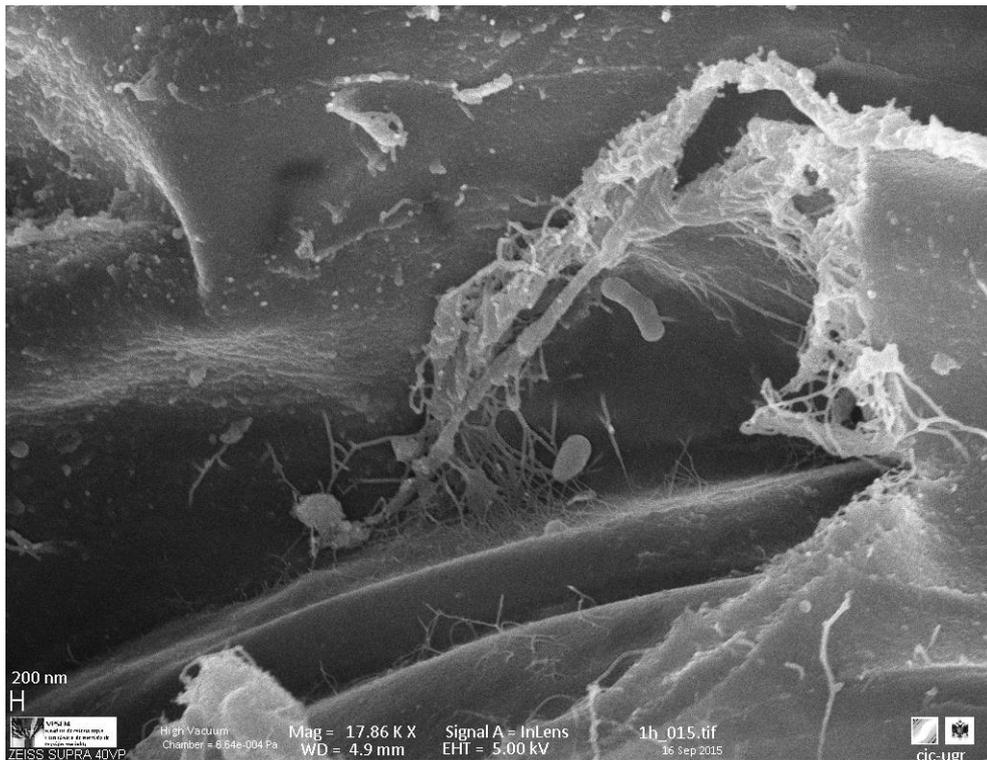
A



B



C



D

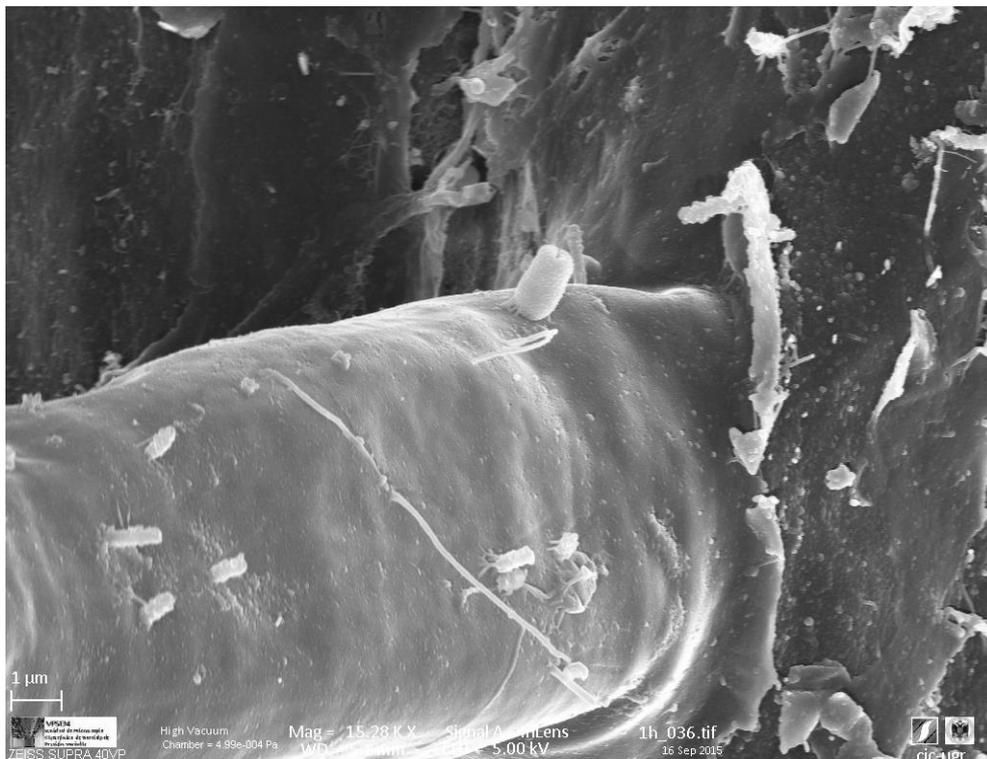
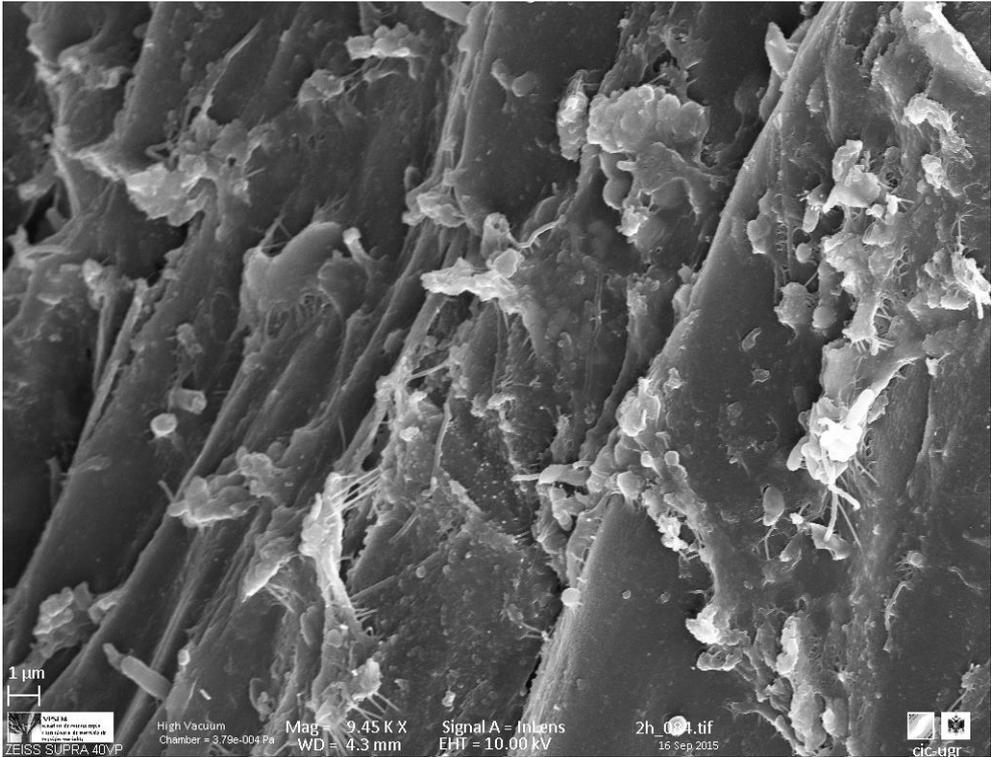
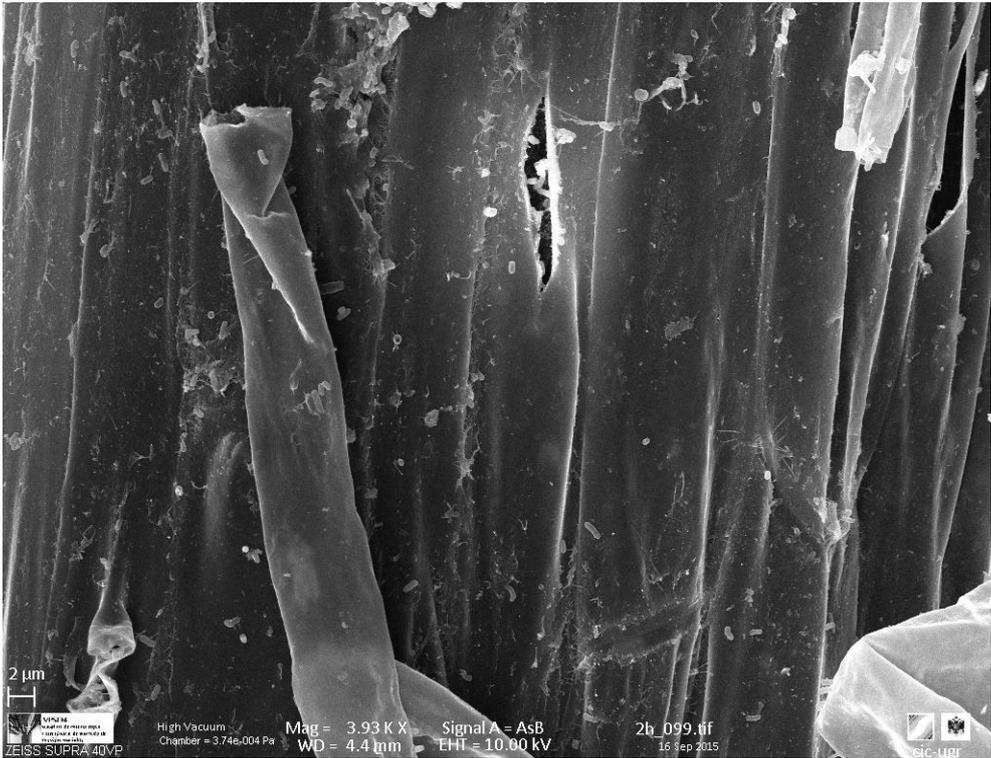


Figura 116. Micrografías electrónicas de barrido de raíces de pimiento inoculadas con *Microbacterium sp. 3J1* a las 1-2 h. Se muestran micrografías de VP-SEM de las fases iniciales del contacto, con el aspecto de las primeras etapas de colonización mediante adhesión individual en plano longitudinal (A) o axial (B). También se muestra las primeras agregaciones y filamentos de unión de células en los huecos intercelulares de la epidermis radicular (C) y en las raicillas laterales (D). La escala de referencia de cada micrografía se ha ajustado para facilitar la identificación de la cepa inoculante.

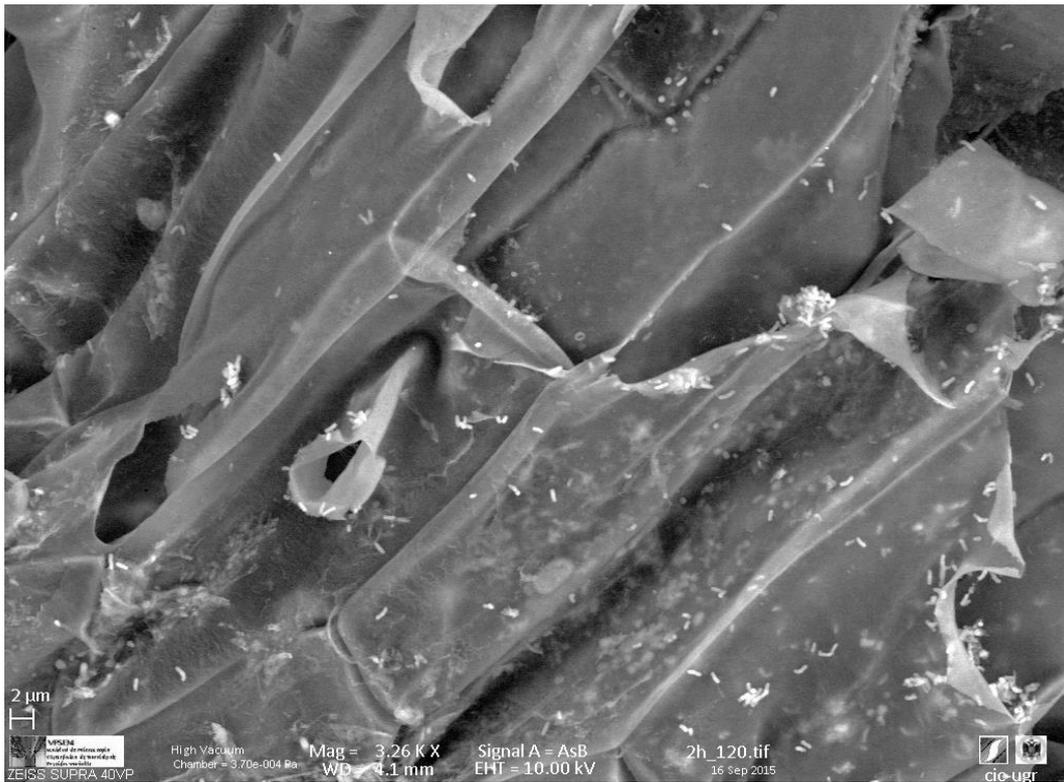
A



B



C



D

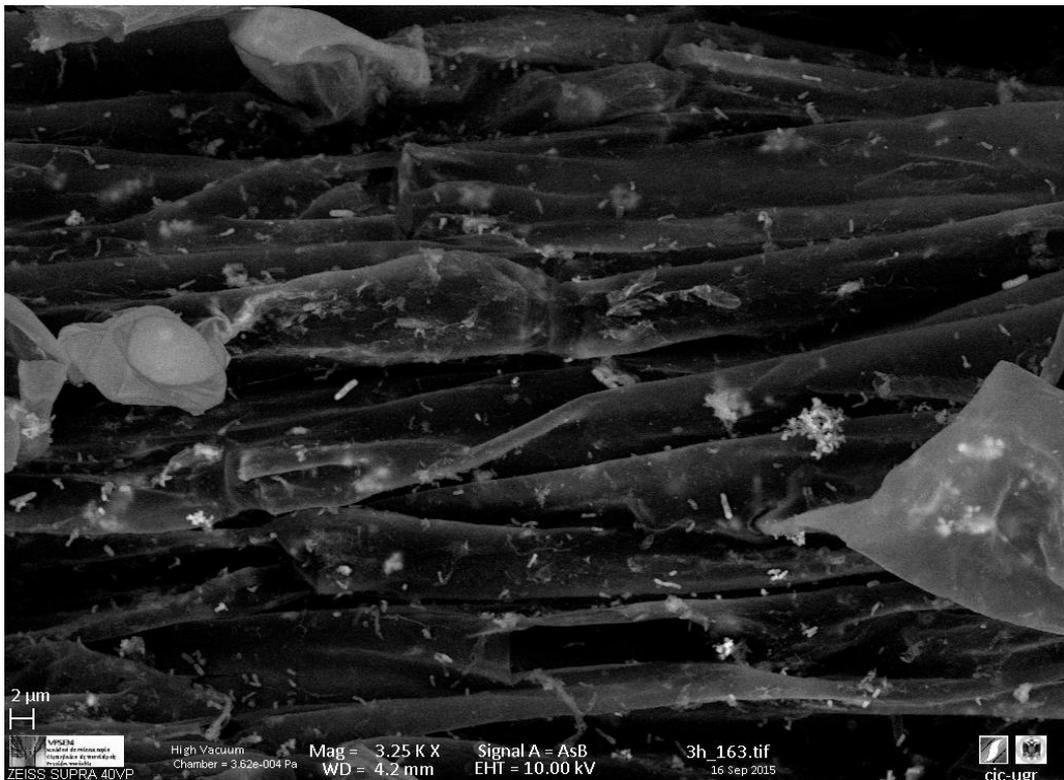
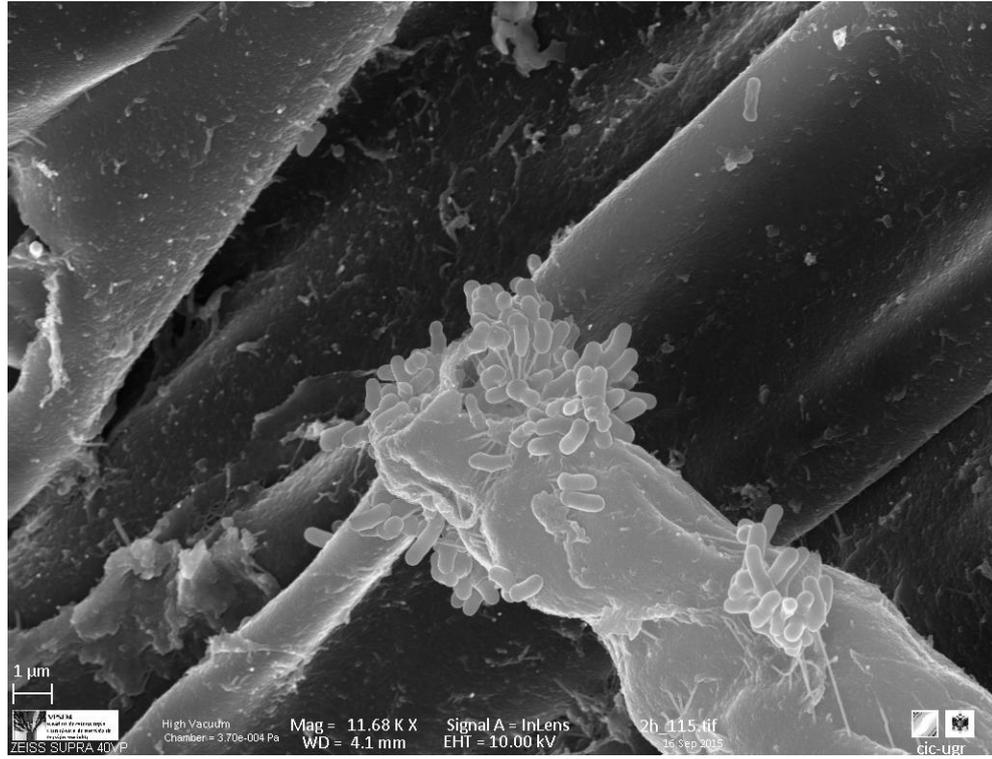


Figura 117. Micrografías electrónicas de barrido de raíces de pimiento inoculadas con *P. putida* KT2440 a las 3-5 h (A y B) y a las 24 h (C y D). Se muestran micrografías de VP-SEM de las fases intermedia (A y B) y avanzada (C y D) del contacto, donde se aprecia el contacto en biopelícula y la colonización superficial homogénea y extensa de esta cepa en la zona apical (A).

A



B



C



D

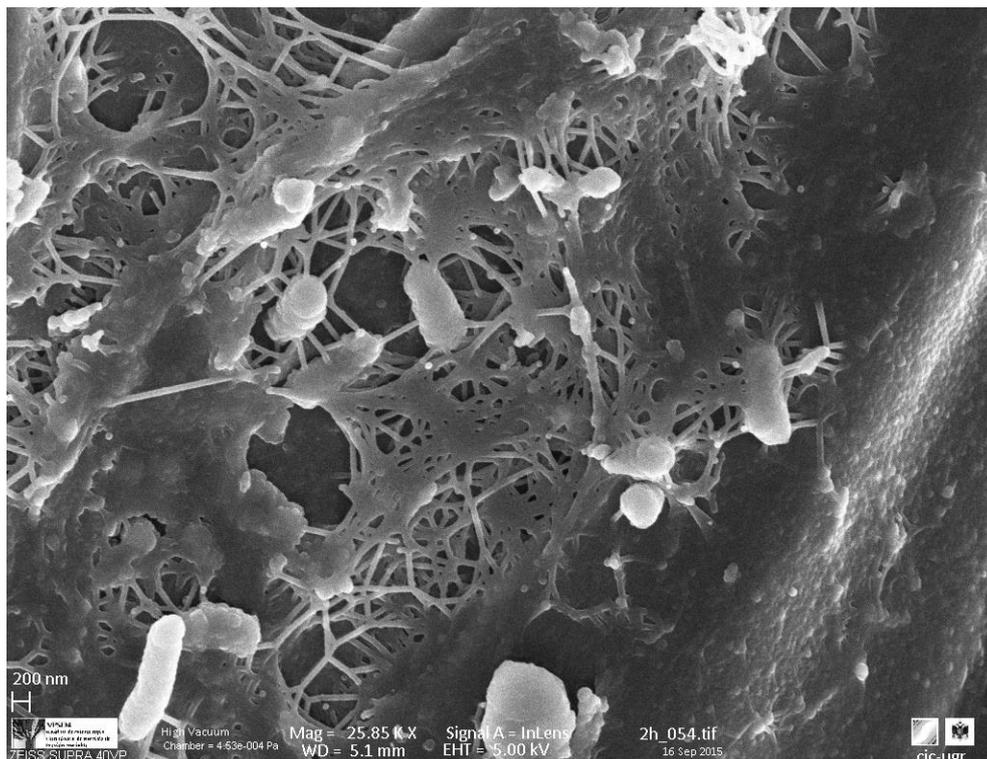
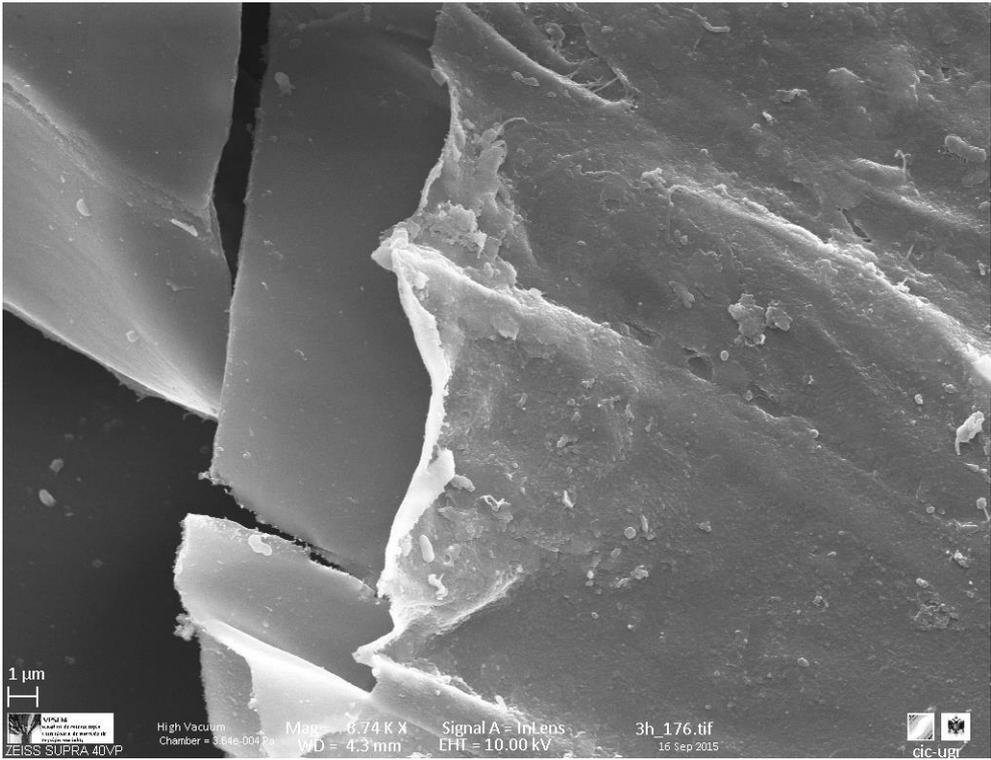
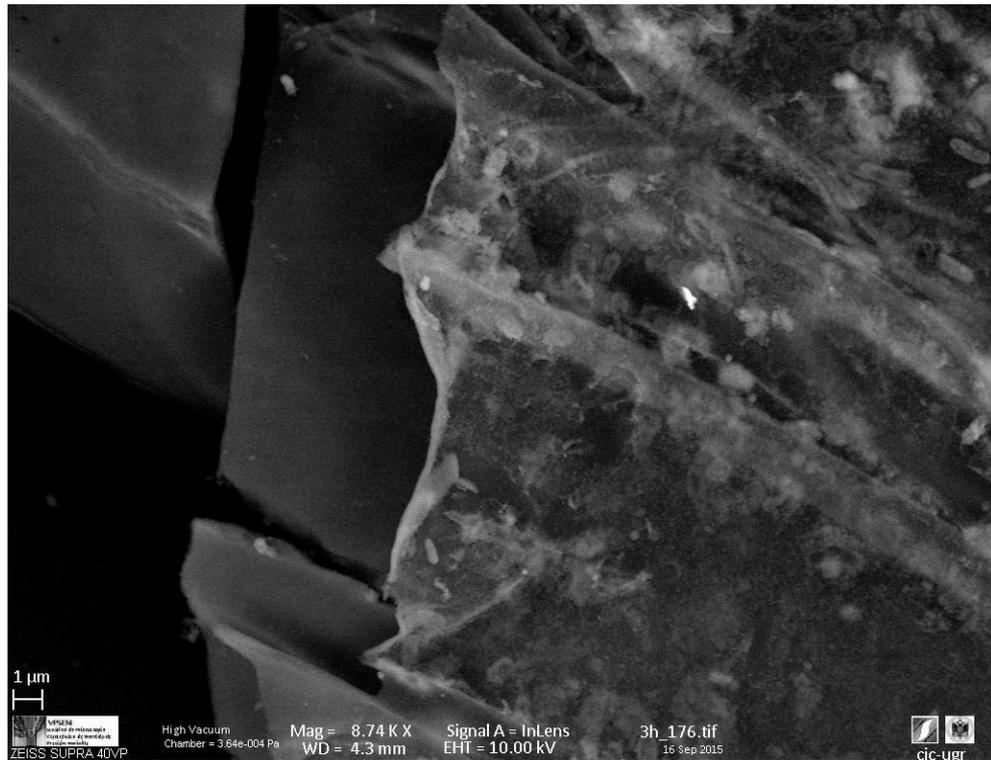


Figura 118. Micrografías electrónicas de barrido de raíces de pimiento inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 a las 3-5 h. Se muestran micrografías de VP-SEM de las fases intermedias del contacto, donde surgen agregaciones espacialmente definidas (A) y agregaciones múltiples en zonas de contacto prioritario (B). Se distinguen también formaciones complejas en biopelícula (C) y accesos al interior de la epidermis de la raíz inoculada (D). La escala de referencia de cada micrografía se ha ajustado para facilitar la identificación de la cepa inoculante.

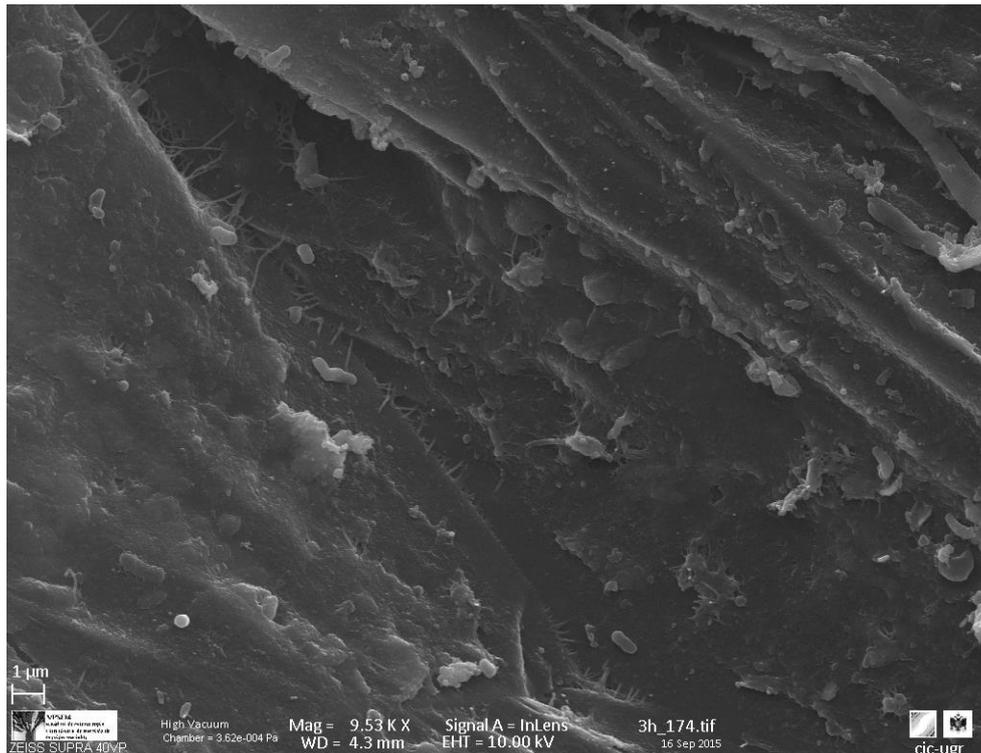
A



B



C



D

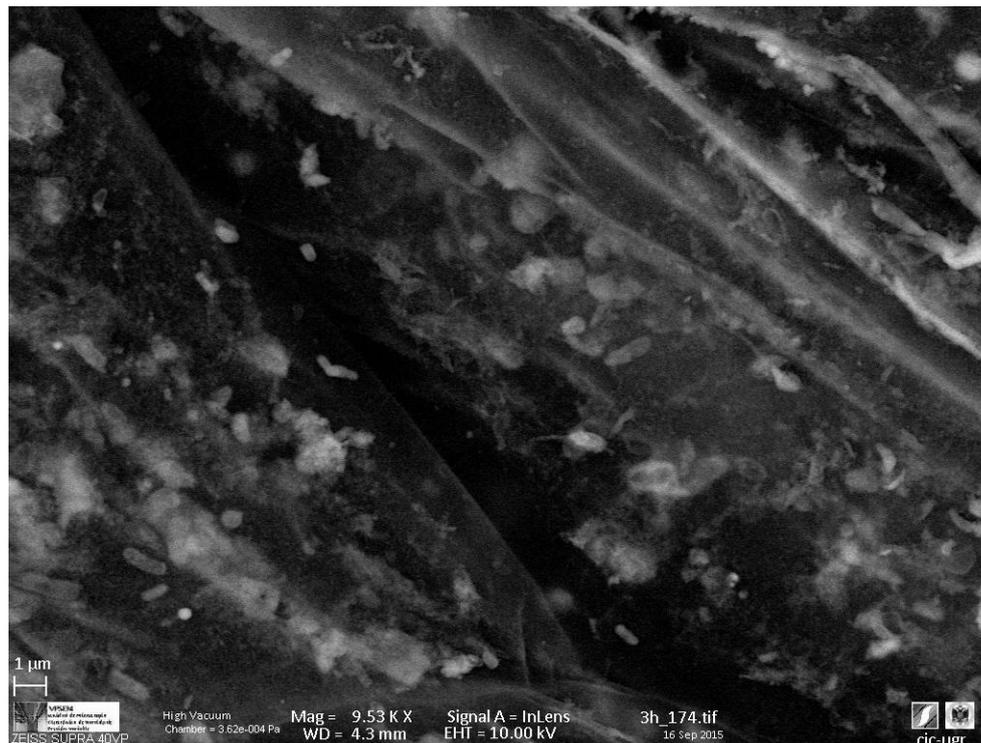


Figura 119. Micrografías electrónicas de barrido de raíces de pimiento inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 a las 24 h. Se muestran micrografías de VP-SEM en detalle de las fases avanzadas del contacto donde se puede apreciar, tanto por escaneo electrónico directo, como por retrodispersión de electrones (profundidad), cómo la mayor cantidad de células de la cepa inoculante se organizan bajo la epidermis de la raíz inoculada (A y B), así como los restos de biopelículas que aún mantienen células en el exterior en zonas estratégicas para la interacción, como grietas de la raíz (C y D). La escala de referencia de cada micrografía se ha ajustado a 1 µm para facilitar la identificación de la cepa inoculante.

1.2. Formación de biopelículas por la cepa *Microbacterium sp.* 3J1

Tras visualizar la interacción planta-microorganismo e identificar las estructuras de interacción en matriz, se trató de comprobar la capacidad de formar biopelículas por parte de *Microbacterium sp.* 3J1. Este ensayo permite establecer la concentración óptima de alginato y del resto de constituyentes en la formulación que favorezca el proceso de colonización. El tipo de contacto por biopelícula requiere de un número alto de células que por otra parte, establezcan procesos de *quorum sensing* y que los mismos ocurran durante un periodo de tiempo mínimo para llevarse a cabo de manera efectiva (Timmusk *et al.*, 2005, Rudrappa *et al.*, 2008, Seneviratne *et al.*, 2011). Por tanto, la mejora en estos factores mediante un tipo de formulación adecuada puede beneficiar considerablemente la eficacia de la interacción. Para determinar la capacidad de producción de biopelícula por parte de *Microbacterium sp.* 3J1, se llevaron a cabo cultivos en medio TSB en tubos de ensayo de borosilicato. Las muestras se analizaron mediante espectrofotometría a una absorbancia de 0,05 (a 600 nm) a las 6 y a las 24h desde la inoculación. Se registró la absorbancia en unidades por nm de en cada tiempo de muestreo para identificar si estaba correlacionada con la densidad de la biopelícula producida. Se comparó el aspecto de la matriz adherida a las paredes de los tubos de ensayo (resultados cualitativos), así como la absorbancia de las biopelículas formadas (resultados cuantitativos), por la cepa *P. putida* KT2440, cepa BPCP y descrita por su capacidad de formar biopelículas (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000, Stepanović *et al.*, 2000), tal como se indica en el apartado 11.7 de *Materiales y Métodos*.

Se observó formación de biopelícula en los cultivos de *P. putida* KT2440 tanto a las 6 como a las 24 h (figura 120). En los cultivos de *Microbacterium sp.* 3J1 se observó formación de biopelículas a las 6 horas, mostrando sin embargo menor cantidad de estructuras adheridas y siendo éstas más dispersas que las generadas por los cultivos de *P. putida* KT2440 (figura 120). Esto se reflejó en la absorbancia de las biopelículas formadas teñidas por cristal violeta (CVDO₆₀₀) en relación con la absorbancia del cultivo (DO₆₀₀), donde los cultivos de *Microbacterium sp.* 3J1 presentaron un 25% menos de biopelícula (0,41 CVDO₆₀₀/DO₆₀₀) que en el caso de los cultivos de *P. putida* KT2440 (0,56 CVDO₆₀₀/DO₆₀₀) (figura 121).

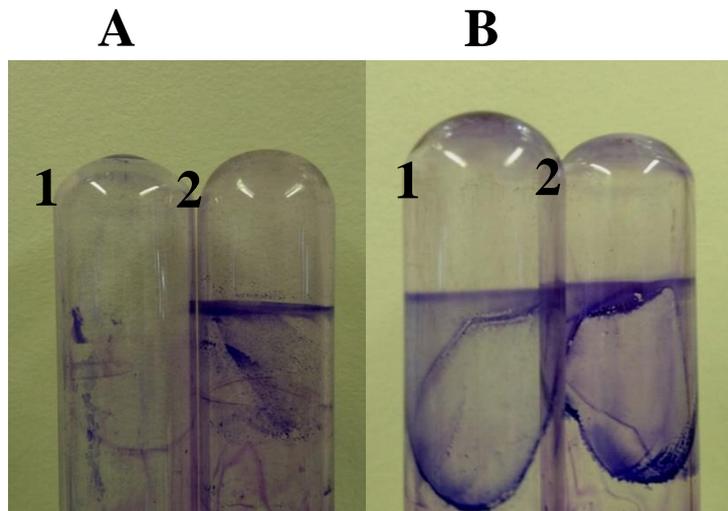


Figura 120. Biopelículas de las cepas estudiadas adheridas en tubos de ensayo. Se muestran las estructuras de biopelícula teñidas con cristal violeta 0,3% en los puntos de muestreo a las 6 h (A) y a las 24 h (B), para las cepas *Microbacterium sp.* 3J1 (tubos No. 1) y *P. putida* KT2440 (tubos No. 2).

Sin embargo, a las 24 h de cultivo, la formación de la biopelícula mostró un aspecto más estructurado y de mayor crecimiento en los cultivos de *Microbacterium sp.* 3J1, lo que indica que la biopelícula estaba completamente formada. En este caso no se observó diferencia significativa en la absorbancia de las biopelículas formadas en relación con la absorbancia del cultivo de ambas cepas (0,64 y 0,62 CVDO₆₀₀/ DO₆₀₀, respectivamente) (figura 121).

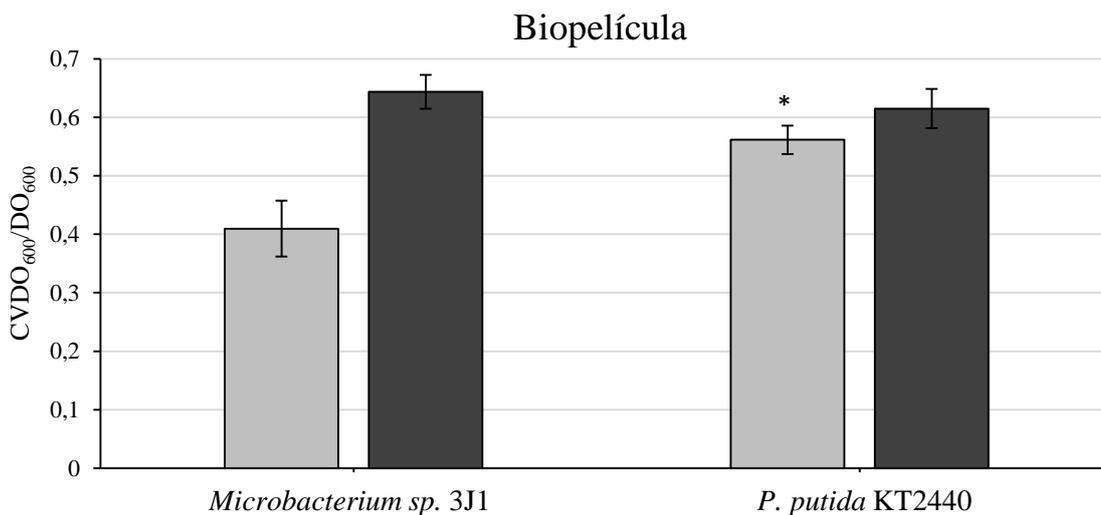


Figura 121. Absorbancia de las biopelículas formadas en relación con la absorbancia del cultivo. Se muestra la absorbancia alcanzada por las biopelículas formadas por cada cepa, en relación a la absorbancia de los cultivos en CVDO₆₀₀/DO₆₀₀ de cada una a los tiempos de muestreo de 6 h (barras gris claro) y de 24 h (barras gris oscuro). El asterisco (*) indica diferencia significativa.

1.3. Seguimiento de la colonización

Una vez que la cepa microbiana ha establecido un contacto adecuado con la raíz hospedadora, y comienza la fase de interacción con la planta, es muy importante estudiar el modo en que la cepa inoculante coloniza la raíz de la planta, ya que no persiste en la misma de igual modo cuando se establece fuera de la raíz (epifítica) que cuando lo hace dentro de la misma (endofítica). Dentro de este último tipo, la persistencia varía si la cepa se establece intracelularmente (dentro de las células de la planta) o si lo hace intercelularmente (entre paredes celulares de distintas células vegetales) (Gray & Smith, 2005). Las interacciones intracelulares permiten una mayor colonización, acceso a recursos e incluso la multiplicación de la cepa inoculante. Sin embargo, una interacción a nivel intercelular requiere una presencia relativamente prolongada en el suelo, al no llegar a establecerse y no reproducirse normalmente de manera estable dentro de la planta, haciendo necesario así una reposición del inoculante para mantener la interacción. Esto suele hacer necesario un programa de reinoculación o que la formulación en base de alginato permita a la cepa una presencia prolongada y una liberación gradual en el suelo que garantice dicha presencia (Gray & Smith, 2005, Reddy, 2012, Sessitsch *et al.*, 2013, Chibeba *et al.*, 2015).

Para facilitar el seguimiento del microorganismo dentro de la raíz se realizaron variantes fluorescentes de la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 mediante la inserción del gen *gfp* que codifica la expresión de proteínas verdes fluorescentes o GFP (*Green Fluorescent Protein*, por sus siglas en inglés). Se eligió la expresión de proteínas fluorescentes verdes, por su fácil visualización mediante microscopía de fluorescencia confocal, y por la posibilidad de distinguir su fluorescencia de la autofluorescencia de la planta mediante la tinción de esta última con cristal violeta. De igual modo se siguió y cuantificó la presencia del gen que la codifica (*gfp*) mediante qPCR en tiempo real. Para comparar los resultados de la visualización y poder determinar el tipo de interacción que lleva a cabo la cepa *Microbacterium sp.* 3J1, se emplearon como control, los datos de microscopía de la cepa *Pseudomonas fluorescens* WCS417r-YFP como cepa epifítica (Pieterse *et al.*, 2014), los de la cepa *Pseudomonas putida* VM1450-GFP como endófito intercelular (Ryan *et al.*, 2008) y los de la cepa *Burkholderia phytofirmans* PsJN-GFP como endófito intracelular (Compant *et al.*, 2008). Como planta modelo, se empleó el pimiento por su fácil cultivo y su estudio previo.

1.3.1. Conjugación y visualización de cultivos puros

La inserción del gen *gfp* en la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 se realizó por conjugación cuatriparental tal como se indica en el apartado 11.2 de *Materiales y Métodos*.

Tras la conjugación se identificaron las colonias que emitían mayor fluorescencia en la placa con medio selectivo y se sembraron en una nueva placa de medio selectivo. A partir de dichas colonias se obtuvieron cultivos puros a los que se les analizó la fluorescencia emitida tanto en cultivos en placa, como en medio líquido, bajo luz ultravioleta, seleccionando para futuros trabajos el clon *Microbacterium sp.* 3J1-GFP como aquella que emitía mayor fluorescencia (figura 122A y 122B). Para detectar al microorganismo en el suelo una vez liberado y evitar la presencia de falsos positivos, se decidió utilizar la técnica de PCR del gen *gfp* desde muestras del suelo, dado que este gen proviene originalmente de la medusa *Aequorea victoria*, lo que hace muy improbable encontrarlo en el suelo.

Para determinar si podíamos utilizar este método de selección para identificar la variante fluorescente de la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 se realizó una PCR del gen *gfp* tal y como se indica en el apartado 4.3 de *Materiales y Métodos*. Como control positivo de dicha amplificación se incluyó DNA total aislado de la cepa de *E. coli* donadora del gen *gfp* (*E. coli* GFP₂) utilizada en la conjugación cuatriparental arriba indicada. Como control negativo de amplificación se incluyó a la cepa silvestre de *Microbacterium sp.* 3J1.

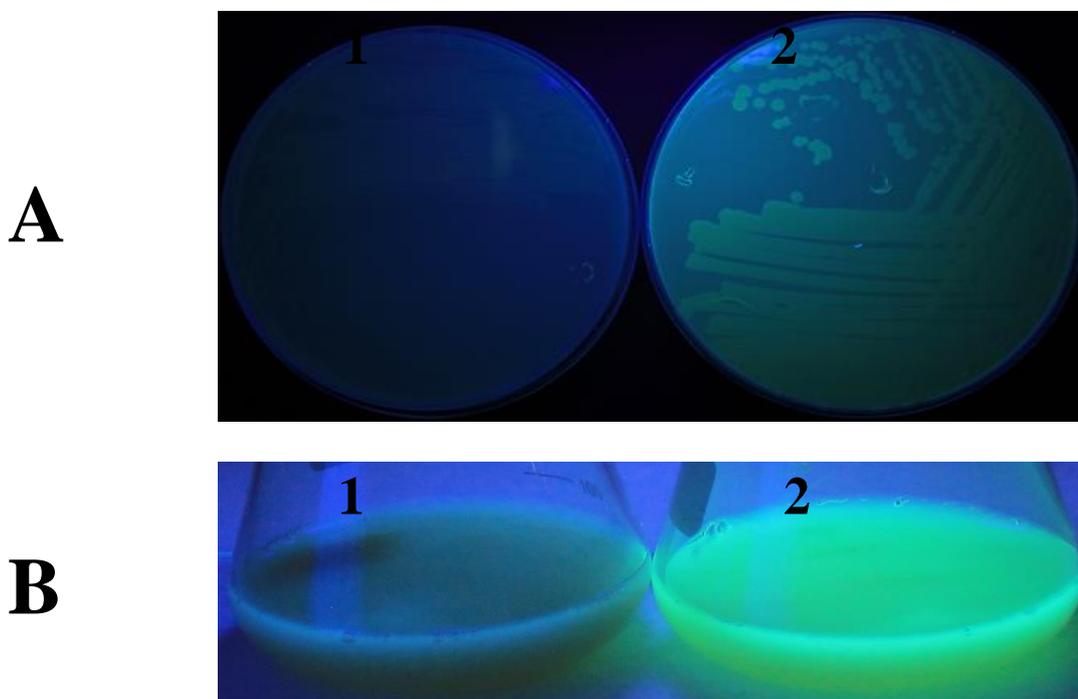


Figura 122. Fluorescencia de la cepa transformada. Se muestra la fluorescencia emitida, tras excitarse bajo luz ultravioleta, de un cultivo en medio semisólido TSA (A) y de otro en medio líquido TSB (B) de las cepas *Microbacterium sp.* 3J1 (paneles 1) y *Microbacterium sp.* 3J1-GFP (paneles 2).

Como resultado de la amplificación por PCR del gen *gfp* se observó una banda en geles de agarosa de en torno a 750 pb, coincidiendo con el tamaño esperado para este gen, tal y como puede observarse en la figura 123.

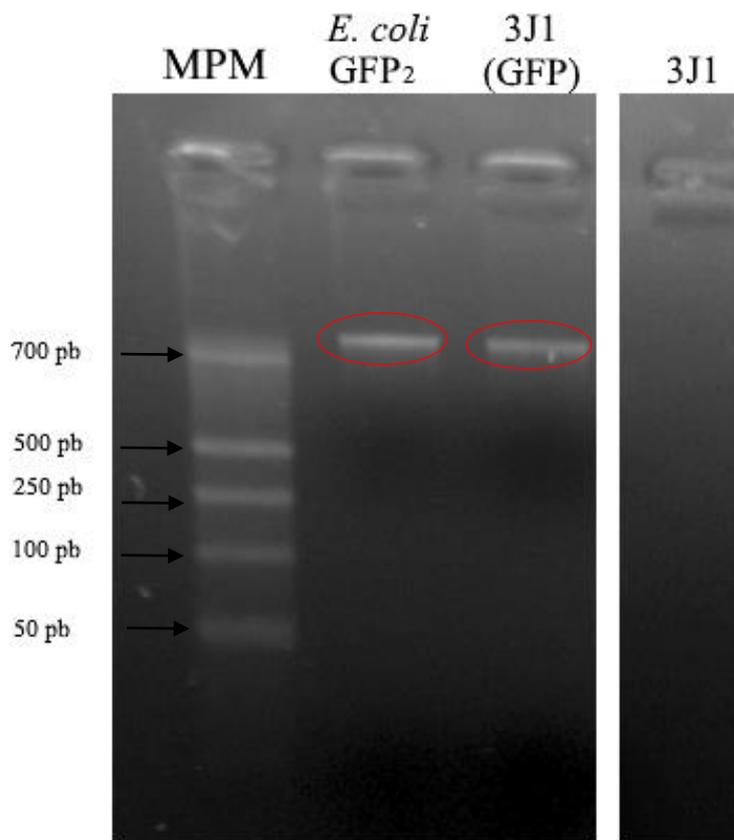


Figura 123. PCR del gen *gfp*. Se muestra el producto de PCR del gen *gfp* (~750pb) de ADN total extraído de la cepa donadora *E. coli* GFP₂, de ADN de la cepa transformada *Microbacterium sp.* 3J1-GFP, así como de ADN de la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 sin transformar, como control. El amplicón se comparó con un marcador de peso molecular de bajo rango (MPM de 50-700 pb).

Para caracterizar la estabilidad del gen *gfp* en la cepa *Microbacterium sp.* 3J1-GFP se realizaron hasta 4 subcultivos en TSA de la misma en medio carente del antibiótico empleado como marcador de selección (Gentamicina-30). Tras dichos cultivos, se comprobó tanto la presencia del marcador de selección mediante siembra en placas con medio selectivo TSA Gm₃₀, como mediante observación de la fluorescencia emitida por las células.

1.3.2. Interacción del microorganismo en la planta por análisis de microscopía de fluorescencia

Tal y como hemos indicado anteriormente, para determinar la concentración de alginato en la nueva formulación, se necesitaba identificar si la relación de la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 con la planta era epifítica o endofítica. Para ello se analizó la interacción del microorganismo con la planta mediante análisis de microscopía de fluorescencia. Para este estudio, se utilizaron plantas con cuatro semanas de edad y al menos 5 cm de altura, tanto de pimiento como de trébol, en tiestos de 0,4 L con sustrato estéril. Las raíces de las plantas se sumergieron en 40 ml de una suspensión bacteriana en solución salina 1xM9 de la cepa *Microbacterium sp.* 3J1-GFP con entre 10^8 - 10^9 UFC/ml. Tras una incubación de 24 horas con el cultivo en medio líquido, se extrajeron las raíces y se tiñeron con cristal violeta al 5% (p/v) por inmersión durante 5 minutos para eliminar la autofluorescencia de la planta. Tras lavar con etanol 97% (V/V) el exceso de tinte, se prepararon cortes transversales y longitudinales de en torno a 100 μ m de espesor, de zonas basales, apicales y medias de la raíz usando un escalpelo de hoja curva y se observaron al microscopio de fluorescencia, tal y como se indica en el apartado 11.4 de *Materiales y Métodos*.

Dado que a la longitud de onda de excitación de las GFP (395 nm) la fluorescencia de las raíces tintadas se emite en rojo, la visualización de las células y estructuras de las mismas evita autofluorescencia verde y la mayor parte del ruido de fondo en dicho color, facilitando la localización e identificación de la cepa fluorescente. La fluorescencia emitida por la proteína GFP permitió identificar colonias y células individuales. Para evitar la identificación de artefactos (corpúsculos cristalinos, zonas de endurecimiento celular no porosas o estructuras vegetales no teñidas con cristal violeta), se examinó la morfología celular junto a los rangos de emisión habituales para la cepa transformada.

Como resultado de esta observación se identificó la presencia de colonias fluorescentes preferentemente entre las paredes celulares de las células de la planta formando colonias, así como de células individuales en los espacio entre las paredes celulares, y en los intracelulares (figura 124).

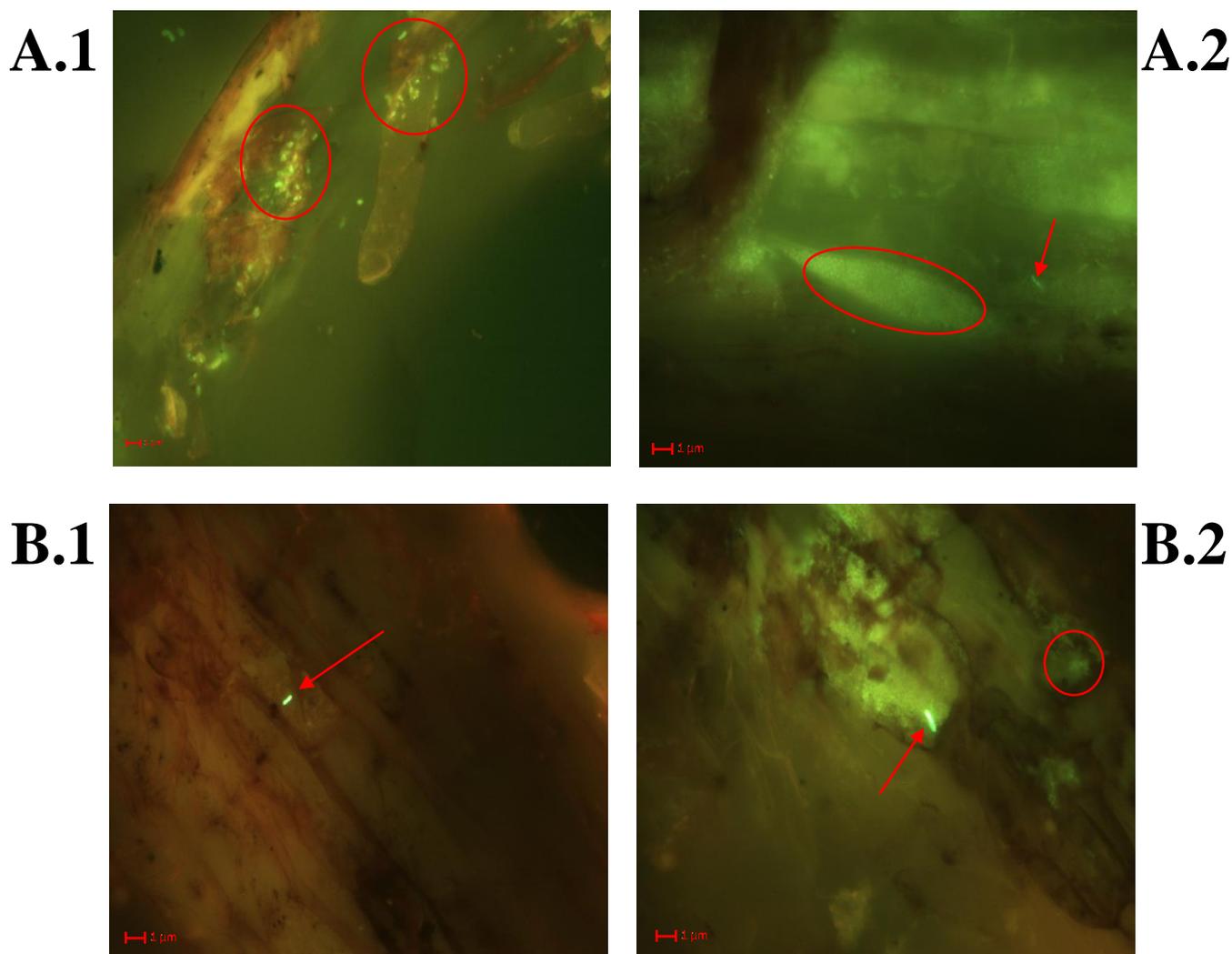


Figura 124. Identificación de *Microbacterium sp.* 3J1-GFP por microscopía de fluorescencia. Se muestran las células fluorescentes identificadas dentro de raíces de pimiento (A.1 y A.2) y de trébol (B.1 y B.2) a corte longitudinal hemisférico. Las líneas y círculos rojos indican la presencia de las células fluorescentes.

1.3.3. Detección de *Microbacterium sp.* 3J1 en la planta por microscopía confocal de láser de barrido (CLSM)

Con objeto de poder ajustar adecuadamente el porcentaje de alginato, así como los mejores elementos reconstituyentes en la nueva formulación con alginato, se necesitaba identificar el tipo de relación endofítica (estable o temporal dependiendo de la zona en que se posiciona la cepa dentro de la raíz) de la cepa *Microbacterium sp.* 3J1. Para identificar con precisión la profundidad de la raíz de la planta en la que se encuentra la bacteria, se recurrió a microscopía confocal de láser de barrido (CLSM).

Para ello, se prepararon muestras de raíz de pimiento inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1-GFP de aproximadamente 100 μm de espesor, tal y como se especifica en el apartado anterior, y se visualizaron por CLSM, sin necesidad de alterar las estructuras celulares en la preparación, tal y como se indica en el apartado 11.4 de *Materiales y Métodos*.

Gracias a esta técnica se pudo caracterizar la disposición espacial de la cepa inoculante. La identificación de las células de la cepa bacteriana se llevó a cabo tanto por sus características morfológicas, como en base a las diferencias con la autofluorescencia, dado que la intensidad de la fluorescencia de las mismas fue de un 25% mayor a la de las estructuras vegetales no teñidas. La fluorescencia emitida por los artefactos como estructuras cristalinas fue entre un 25 y un 50% mayor que la emitida por las células de la cepa inoculante y además fueron detectables a mayores longitudes de onda, lo que permitió evitar errores de lectura.

Como resultado del análisis de 30 muestras de 6 plantas diferentes se detectó una mayor intensidad de fluorescencia debida a las células de *Microbacterium sp.* 3J1-GFP en las zonas de crecimiento apical y lateral y en especial en los meristemas de la raíz. De igual modo, pudimos observar zonas de agregación en torno a las células del floema, así como entre las paredes celulares formando microcolonias en la endodermis de la planta (figura 125).

Por otra parte, también se identificaron acúmulos celulares fluorescentes en zonas de la raíz alejadas del meristemo. Para estos casos se aplicó una nueva capa de lectura confocal ajustando al color rojo de fluorescencia emitido por las células vegetales tintadas y así evitar ruido de fondo por autofluorescencia. En dichas ocasiones también se encontraban en torno a los tejidos conductivos, tanto del xilema como del floema, así como entre las paredes celulares de la endodermis. Los lugares donde se identificaron las bacterias son específicos y definidos (no aleatorios) en las zonas del meristemo y más concretamente en torno a la última capa del periciclo o zona de conexión entre los vasos y la endodermis.

En estos casos se pudo identificar con facilidad las colonias del inoculante en, al menos, la mitad de los tejidos radiculares observados (figura 126). No se encontraron diferencias en torno la presencia de la cepa en la raíz con tiempos de contacto mayores por encima de las 6 horas de contacto, pero sí una aceleración en la formación de las estructuras descritas.

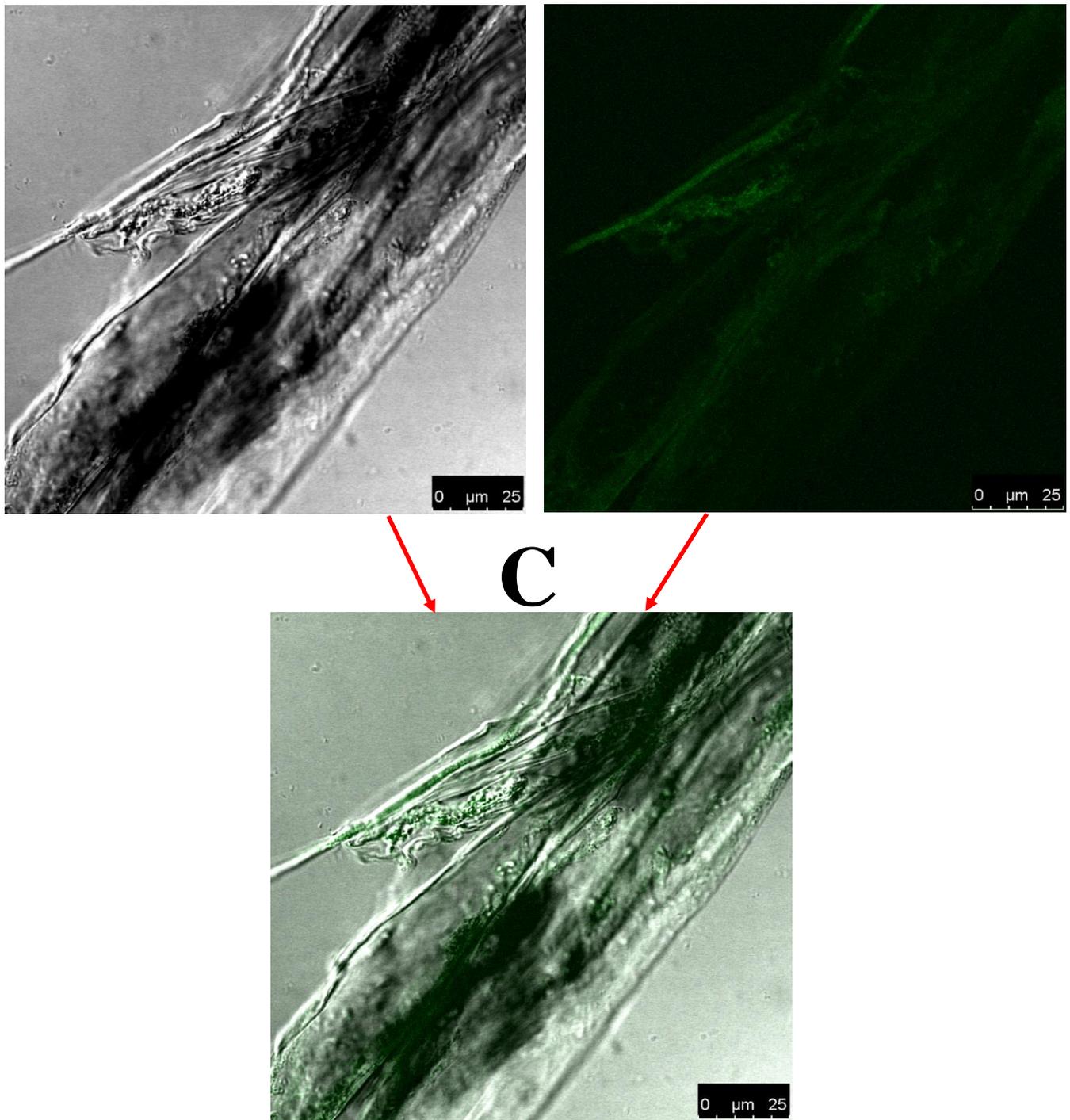
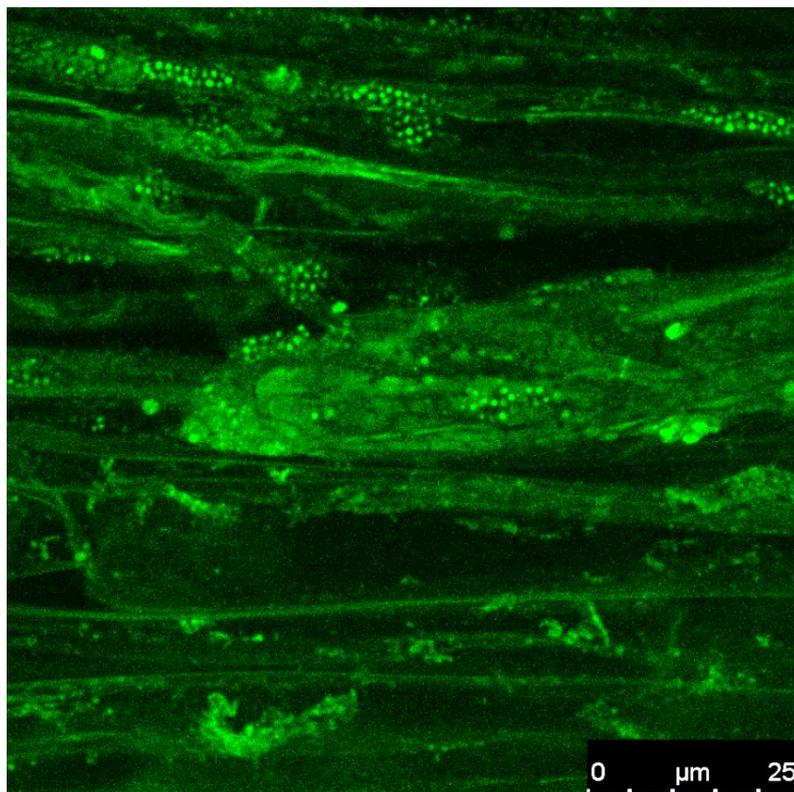
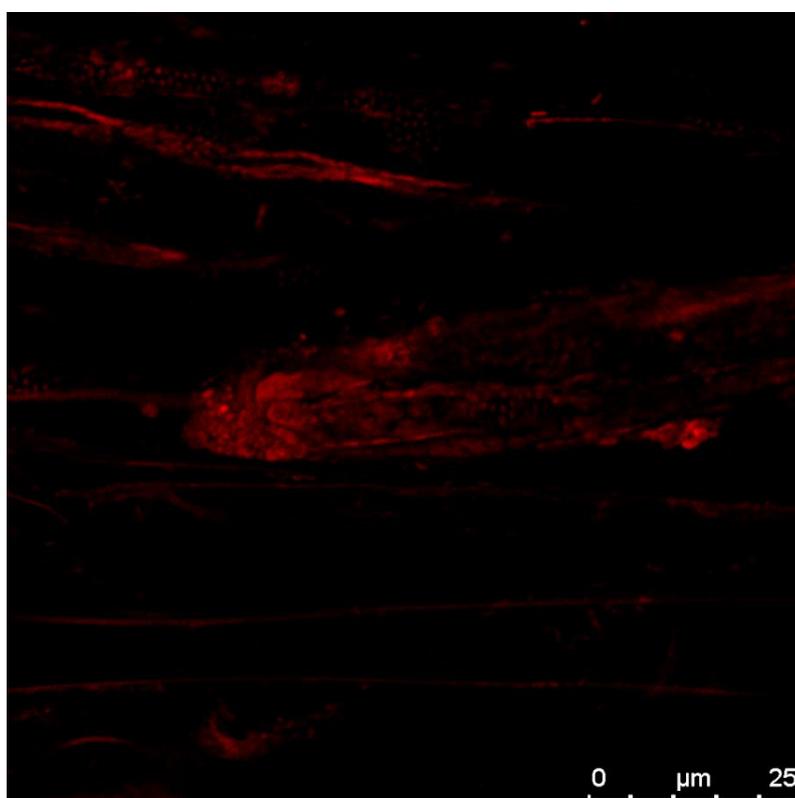


Figura 125. Micrografía por CLSM de una raíz de pimiento inoculada con *Microbacterium* sp. 3J1-GFP. Se muestra la imagen de microscopía óptica (A) del área analizada por microscopía de láser confocal (B), así como la superposición de ambas (C). En estas imágenes únicamente se aplica el filtro verde de excitación a 395 nm.

A



B



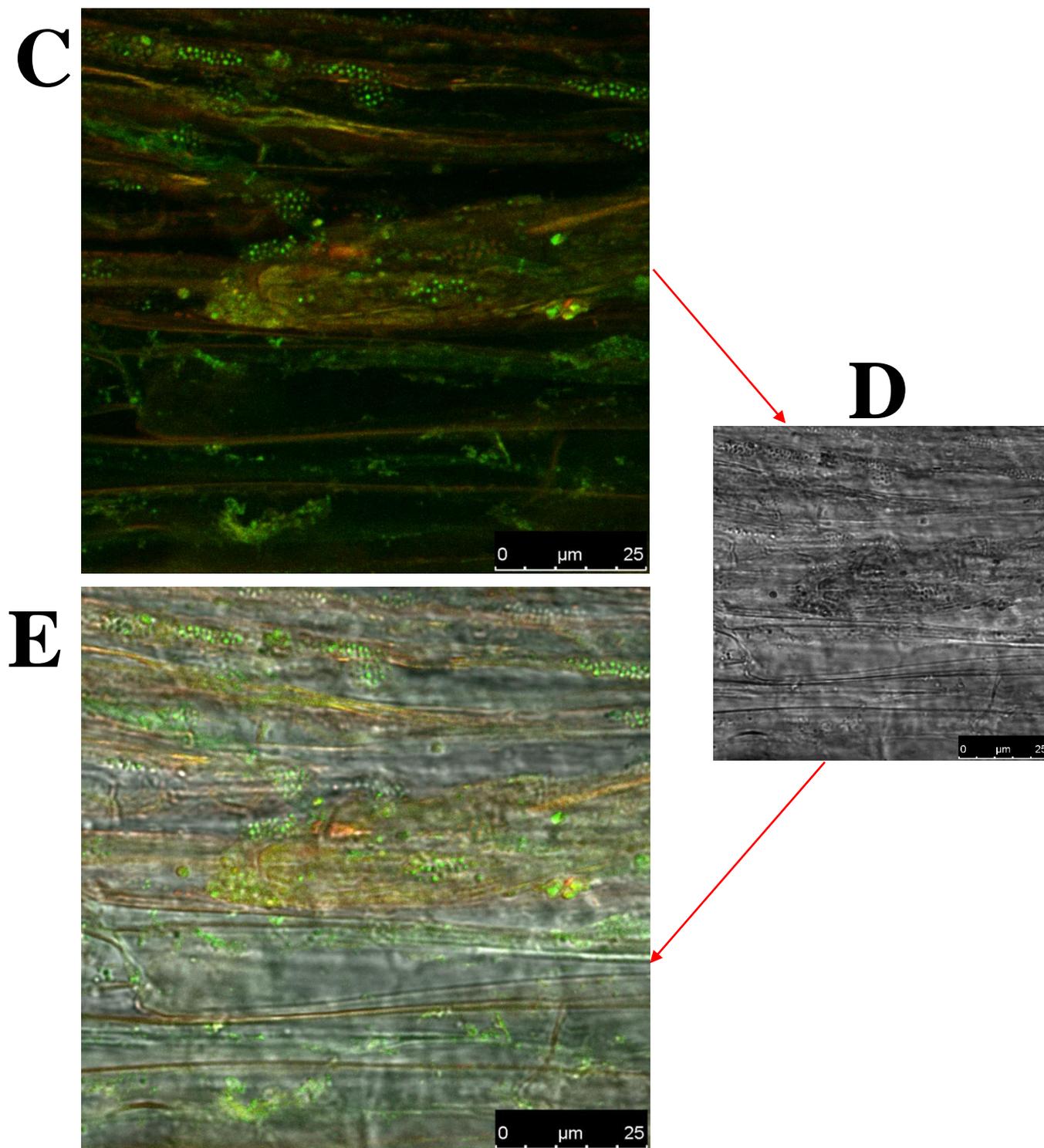


Figura 126. Micrografías confocal y óptica de raíces de pimiento inoculadas con *Microbacterium sp. 3J1*. Se muestran las capas por color de emisión registrado para el análisis de microscopía confocal, fijándose en verde para la detección de GFP (A) y en rojo para la autofluorescencia de la planta teñida (B), así como el resultado del solapamiento de ambas (C). Del mismo modo, se muestran la micrografía óptica de la zona analizada (D) y la superposición de ésta con el solapamiento del análisis de microscopía confocal (E), para evaluar la correspondencia espacial de dicho análisis.

2. Comparativa de las formulaciones inoculantes

Dado que *Microbacterium* sp. 3J1 en presencia de la planta establece un tipo de interacción endofítica no persistente y de colonización por filamentos y biopelículas, la opción más adecuada para su formulación se basó en alginato con una concentración alta (4%, p/v o superior), de forma que las células de las bacterias permaneciesen durante más tiempo en el medio. Se pretende de este modo obtener una formulación que permita una liberación más progresiva y prolongada en el tiempo en suelos naturales y bajo condiciones de sequía (Nelson, 2004, Kalaiarasi & Dinakar, 2015). Así mismo, la formulación debe asegurar la presencia de la cepa en el suelo en una mayor concentración y que ésta se pueda seguir fácilmente en suelo y en la planta.

Siguiendo indicaciones de la literatura (Fernandes Junior *et al.*, 2009, Power *et al.*, 2011) se formuló un nuevo formato de inoculante empleando como aglutinante alginato de sodio al 4% para lograr una estructura esférica semisólida, manteniendo una matriz gelatinosa en su interior que permita estabilizar las células de la cepa inoculante (mantiene intactas las estructuras celulares y, por tanto, viables a las células). Para preparar las células bacterianas, se emplearon al menos 10^9 UFC/ml de *Microbacterium* sp. 3J1-GFP suspendidas en una mezcla de solución salina 1xM9 y leche desnatada estéril en proporción 4:1 (v/v). La suspensión de células conjuntamente con el alginato (4%), se dispuso en forma de esferas mediante la adición de la mezcla en forma de gotas en un baño de CaCl_2 2% (p/v). Las esferas obtenidas se lavaron 3 veces con un volumen de agua destilada estéril. La presencia de leche desnatada sirve como fuente de nutrientes para las bacterias una vez añadidas al medio ambiente. Igualmente, se añadió trehalosa 0,1% (p/v). La presencia de trehalosa en la preparación, permite una mayor supervivencia de las células a los estreses abióticos del ambiente. Cada esfera pesó alrededor de 0,08-0,1 g y se emplearon en torno a 1,5-2 g de esferas por macetero. El aspecto externo de las esferas a lo largo del tiempo se muestra en la figura 127. Para conservarlas se mantuvieron en un recipiente plástico en un volumen inferior a la mitad de la capacidad del recipiente y manteniendo la humedad interior en torno al 30-40% (gracias al agua destilada de lavado) y a una temperatura ambiente (20-25°C), tal y como se indica en el apartado 11.8 de *Materiales y Métodos*.

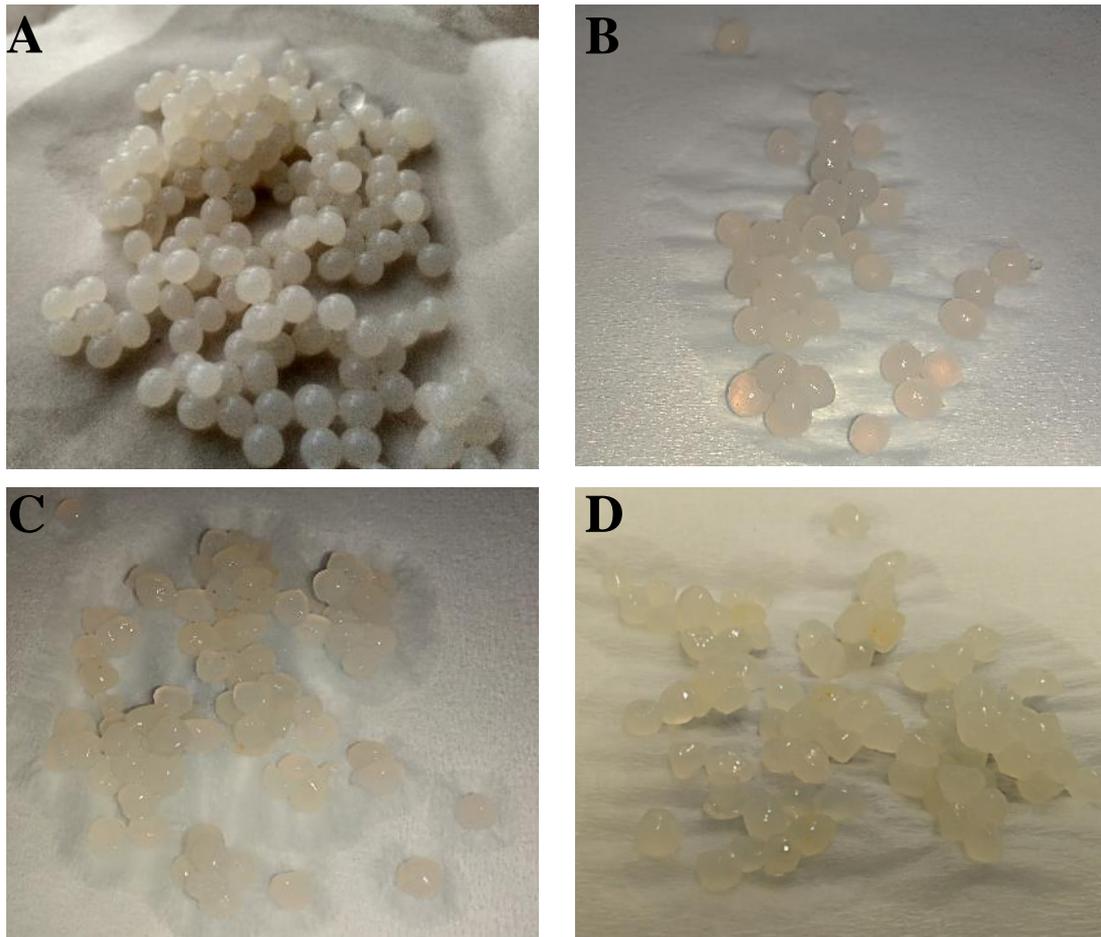


Figura 127. Aspecto externo de las esferas de alginato. Se muestra el aspecto de las esferas de alginato a los 7 (A), 14 (B), 21 (C) y a los 30 días (D) en las condiciones de conservación descritas.

Empleando esta formulación, se comparó la eficiencia del inóculo con base de alginato respecto a los datos de la formulación líquida en cuanto a la protección frente a la sequía. Para realizar dicha comparativa, se llevó a cabo un ensayo inoculando plantas de pimiento con riego periódico y bajo condiciones de sequía, tal y como se indica en el apartado 5 de *Materiales y Métodos*. En dichos ensayos se ajustó la cantidad de UFC/ml atendiendo al volumen medio de las esferas de alginato y a las UFC/g calculadas en ensayos anteriores. Las plantas, de 2 semanas y entre 3-5 cm de alto, fueron inoculadas con la cepa *Microbacterium sp.* 3J1. El sustrato empleado fue un suelo natural arcilloso no estéril, para simular mejor las condiciones naturales de aplicación. Se registró el peso fresco (PF), contenido relativo de agua (CRA) y longitud del tallo de plantas inoculadas con la cepa *P. putida* KT2440 y *Microbacterium sp.* 3J1 tanto en formato líquido como con base de alginato. Adicionalmente se incluyeron plantas inoculadas con medio libres de células como plantas control.

En condiciones de sequía, el peso fresco (PF) de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 y de las plantas sin inocular fue de 0,45 mg al final del ensayo (día 33 desde la inoculación), tanto para la condición de inoculante líquido como de alginato. Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 en formato líquido mostraron valores de PF de 0,8 mg. Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 en formato de alginato mostraron un PF de 1,27 mg, lo que supone un incremento de peso de casi 3 veces respecto a las condiciones control, y casi un 40% más del valor mostrado por las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 en formato líquido. En condiciones de riego periódico, las plantas no inoculadas pero adicionadas de los inoculantes libres de células, mostraron un PF de 0,48 mg en ambos casos. Las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 en formato líquido y de alginato mostraron valores de PF de 0,82 y 0,98 mg respectivamente. Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 en formato líquido mostraron un PF de 1,5 mg. Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 en formato de alginato mostraron un PF de 2,5 mg, lo que supone incremento de peso de 5 veces respecto a las plantas no inoculadas pero adicionadas de los inoculantes libres de células, y casi 3 veces más peso que el mostrado por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 con ambos formatos. Así mismo, el PF de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 fue un 40% superior al de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 en formato líquido (figura 128 1A y 1B).

El contenido relativo de agua (CRA) en condiciones de sequía de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 y de las plantas sin inocular no superó el valor de 0,61 al final del ensayo, tanto para la condición de inoculante líquido como de alginato. Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 en formato líquido mostraron valores de CRA de 0,76. Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 en formato de alginato mostraron un CRA de 0,86, lo que supone casi un 30% más del valor mostrado por las condiciones control, y más de un 10% del valor mostrado por las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 en formato líquido. En condiciones de riego periódico, las plantas no inoculadas pero adicionadas de los inoculantes libres de células, mostraron un CRA de 0,8 en ambos casos. Las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 en formato líquido y de alginato mostraron valores de CRA de 0,85-0,87, respectivamente. Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 en formato líquido mostraron un CRA de 0,91. Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 en formato de alginato mostraron un CRA de 0,95, lo que supone incremento en torno a un 15% respecto a las plantas no

inoculadas pero adicionadas de los inoculantes libres de células, y de un 10% respecto al mostrado por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 con ambos formatos. Así mismo, el CRA de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 fue un 5% superior al de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 en formato líquido (figura 128 2A y 2B).

La longitud del tallo en condiciones de sequía de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 y de las plantas sin inocular fue de 0,7 al final del ensayo, tanto para la condición de inoculante líquido como de alginato. Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 en formato líquido mostraron valores de longitud del tallo de 10,2 cm. Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 en formato de alginato mostraron una longitud del tallo de 15,5 cm, lo que supone el doble del valor mostrado por las condiciones control, y más de un 30% del valor mostrado por las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 en formato líquido. En condiciones de riego periódico, las plantas no inoculadas pero adicionadas de los inoculantes libres de células, mostraron un valor de longitud del tallo de 9,2-9,5 cm en ambos casos. Las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 en formato líquido y de alginato mostraron valores de longitud del tallo de 11,3-14,2 cm, respectivamente. Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 en formato líquido mostraron un valor de longitud del tallo de 14,7 cm. Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 en formato de alginato mostraron un valor de longitud del tallo de 19,4 cm, lo que supone casi el doble del valor mostrado por las plantas no inoculadas pero adicionadas de los inoculantes libres de células, y un incremento de un 30-40% respecto al mostrado por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 con ambos formatos. Así mismo, el valor de la longitud del tallo mostrado por las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 fue un 25% superior al de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 en formato líquido (figura 128 3A y 3B).

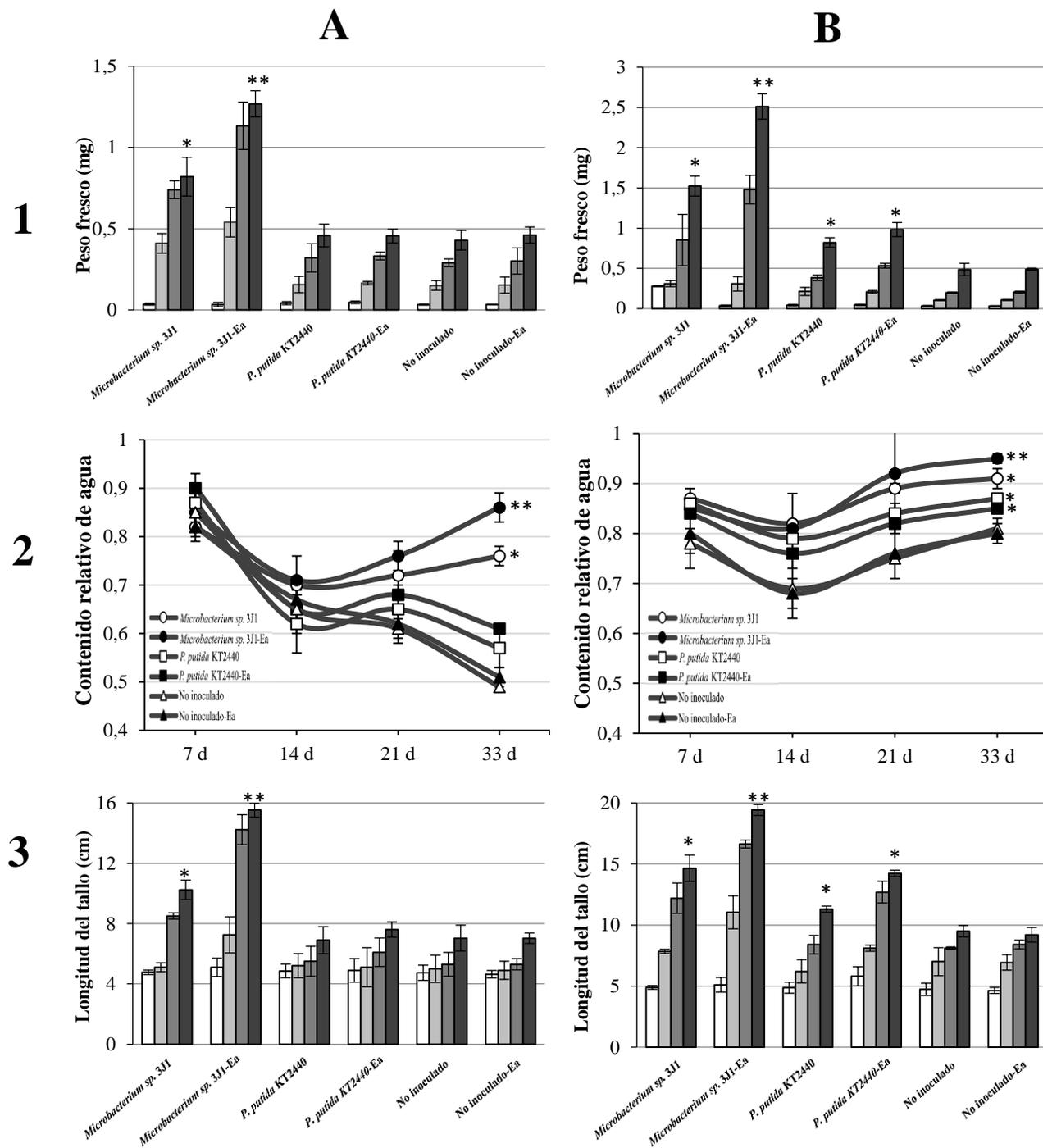


Figura 128. Peso fresco (1), contenido relativo de agua (2) y longitud del tallo (3) de plantas de pimiento inoculadas con diferentes formatos. Se muestran los valores alcanzados por las plantas de pimiento tanto con la formulación en líquido y como con esferas de alginato (Ea) y tanto en condiciones de sequía (A) como con riego periódico (B).

3. Seguimiento de la cepa *Microbacterium sp.* 3J1

Tras comprobar que la nueva formulación era capaz de mejorar la eficiencia de la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 de promocionar el crecimiento y de proteger frente a la sequía en plantas de pimiento en un suelo natural, se estudió la proporción de células que persistían a lo largo del tiempo, para identificar si éste es suficiente para que planta y microorganismo puedan establecer sus interacciones de forma eficaz.

3.1. Seguimiento de la bacteria en suelo por amplificación cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) del gen *gfp*.

Para poder identificar la presencia del microorganismo a lo largo del tiempo, se optó por la amplificación del gen *gfp* mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), con las condiciones indicadas en el apartado 4.5 de *Materiales y Métodos*. Además de la presencia del gen *gfp*, se realizó un conteo de UFC en medio selectivo.

3.1.1. Cultivos puros

Inicialmente se prepararon cultivos puros de la cepa *Microbacterium sp.* 3J1-GFP para poner a punto las condiciones de amplificación y establecer una curva patrón de ADN-*gfp* respecto a los valores de C_p (punto de cruce, o *crossing point* en inglés, definido como el ciclo en el cual la fluorescencia de la amplificación supera la fluorescencia de fondo. Bajos valores de C_p indican una mayor expresión de la diana) detectados en la RT-qPCR (ciclo al que se logra una fluorescencia superior al de una amplificación inespecífica), así como una relación respecto al número de UFCs/ml.

De este modo se prepararon curvas estándar con las que poder comparar tanto los valores de C_p como de UFC/ml de las muestras de suelo y planta inoculadas a distintos tiempos con los datos obtenidos para ambos parámetros respecto al patrón de ADN-*gfp* (cuantificado espectrofotométricamente). Se emplearon muestras de ADN de la cepa no transformada, así como muestras blanco (sin ADN) para determinar los valores de C_p de amplificación de fondo (tabla 11; figura 129).

A

ADN (ng/μl)	<i>Microbacterium sp. 3J1-GFP</i>							<i>Microbacterium sp. 3J1</i>	Blanco
	0,12	0,259	0,547	1,079	1,811	2,524	5,12	5,03	0,00071
Cp	28,268	27,595	26,739	25,257	23,086	20,876	12,972	29,128	31,156
DE	0,202	0,119	0,0656	0,104	0,271	0,117	0,202	0,153	0,519

B

ADN (ng/μl)	0,12	0,259	0,547	1,079	1,811	2,524	5,12
UFC/ml (x 10 ⁷)	2,4	4,9	9,8	18,2	35,6	44,2	94,5
DE	0,5	0,6	0,8	1,2	2,6	2,2	3,1

Tabla 11. Patrones para qPCR. Se muestra la correspondencia entre concentración de ADN amplificado (ng/μl) y el valor de Cp de dichos amplicones del gen *gfp* por qPCR (A), y con respecto a las UFC/ml (x 10⁷) de los cultivos puros correspondientes (B). Los datos se acompañan de la relación de ADN-Cp obtenida para la extracción de ADN un cultivo de la cepa no transformada, así como para el blanco empleado en la qPCR descrita. A cada medida acompaña la desviación estándar de tres muestras (DE).

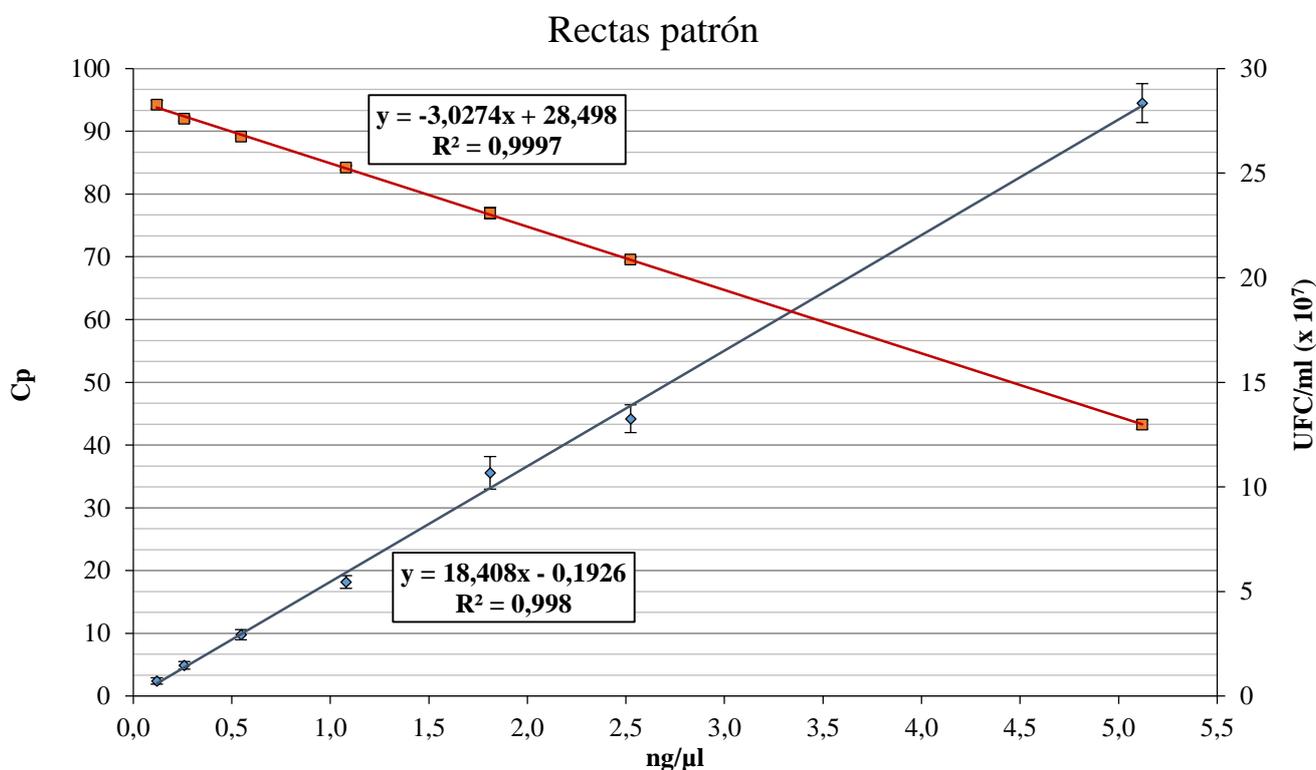


Figura 129. Rectas patrón de ADN. Se muestran las rectas patrón, así como el valor de la ecuación de cada recta para ADN-Cp de qPCR (rojo) y para ADN-UFC/ml (x 10⁷) (azul).

3.1.2. Suelo

Adicionalmente, se estudió el tiempo de contacto óptimo para lograr una formulación más efectiva. Para ello, se definió el periodo tiempo en el que se podía detectar a la cepa en estudio en suelo natural no estéril tras una única inoculación en formulación líquida y en base de alginato (utilizando en torno a 10^8 UFC/ml). Tras inocular el suelo y se incubó 24 horas, y se extrajo el ADN de muestras de 1 g de este suelo. Se realizó una amplificación cuantitativa del gen *gfp* de estas muestras. Este proceso se llevó a cabo cada 24 horas a lo largo de 14 días. Con objeto de poder calcular el número de UFC/g de suelo de las muestras que podían recuperarse respecto a las inoculadas inicialmente por gramo de suelo, se pusieron en relación con los valores de Cp obtenidos. Para poder establecer una relación entre las UFCs detectadas en suelo y UFC/ml de la curva estándar, se empleó la relación con el valor de Cp obtenido en cada punto de muestreo.

En el suelo inoculado con formulación líquida, la máxima amplificación se observó a las 2 h, alcanzando 2,92 ng/ μ l de ADN amplificado. La amplificación en los sucesivos días de muestreo se redujo del orden de un 10% cada día, hasta que al día 4 de muestro la concentración amplificada supuso un 40% menos que la máxima alcanzada (1,75 ng/ μ l). Sin embargo, en el caso de la inoculación con formato en base de alginato, el máximo de amplificación se alcanzó en el día 1 de muestreo (2,82 ng/ μ l) y el ADN amplificado se redujo un 20% hasta el día 3 de muestreo. Entre los días 4 y 7 de muestreo no hubo diferencias significativas en la concentración amplificada (2 ng/ μ l), suponiendo de 2 a 3 veces mayor concentración de ADN amplificado que en el suelo inoculado con formato líquido. Hasta el día 9 del ensayo la amplificación fue cercana al 50% respecto máximo amplificado. La diferencia en la concentración de ADN amplificado en los últimos días del ensayo llegó a ser de entre 4 y 8 veces superior en el suelo inoculado con formato en base de alginato respecto al inoculado con formulación líquida. En el día 14 del ensayo, en el suelo inoculado con formulación en base de alginato se amplificaron 0,35 ng/ μ l, mientras que en el suelo inoculado con formulación líquida se amplificaron menos de 0,01 ng/ μ l (figura 130).

Amplificación de ADN en el suelo

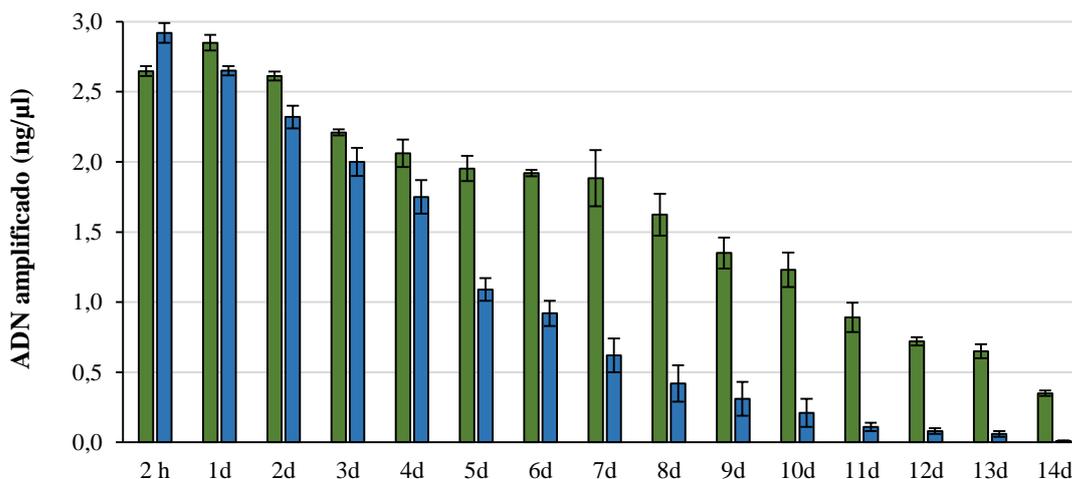


Figura 130. Concentración de ADN amplificado por punto de muestreo en suelo.
 La figura muestra la concentración de ADN-*gfp* amplificado en ng/μl a lo largo de los 14 días de muestreo para la formulación en líquido (azul) y en alginato (verde).

En el caso del suelo inoculado con inoculante en formato líquido, el número de células estimado en UFC/ml fue en torno a un 20-25% inferior al número de UFC/g detectado a lo largo del ensayo. En el caso del suelo inoculado con inoculante en formato con base de alginato, esta diferencia se mantuvo en torno al 10% a lo largo del ensayo. En el suelo inoculado con formulación líquida, la detección de UFC/g máxima se observó a las 2 h, alcanzando 54×10^7 UFC/g. La detección en los sucesivos días de muestreo se redujo del orden de un 10% cada día, hasta que al día 4 de muestro las UFC/g detectadas supusieron un 40% menos que el máximo alcanzado (32×10^7 UFC/g). Se observó una reducción paulatina hasta el final del ensayo. En el caso de la inoculación con formato en base de alginato, el máximo de UFC/g detectadas fue de 54×10^7 UFC/g y hasta el día 3 de muestreo dicha cantidad únicamente se redujo un 25%. Entre los días 4 y 7 de muestreo no hubo diferencias significativas en la concentración amplificada (40×10^7 UFC/g), suponiendo de 2 a 4 veces mayor cantidad UFC/g que en el suelo inoculado con formato líquido. A partir del día 11 del ensayo las UFC/g detectadas en suelo inoculado con formato en base de alginato llegó a ser 6 veces superior a la detectada en suelo inoculado con formato líquido. En el día 14 del ensayo, en el suelo inoculado con formulación en base de alginato se detectaron 5×10^7 UFC/g, mientras que en el suelo inoculado con formulación líquida se detectaron menos de 1×10^7 UFC/g (figura 131).

Concentración de inoculante en suelo

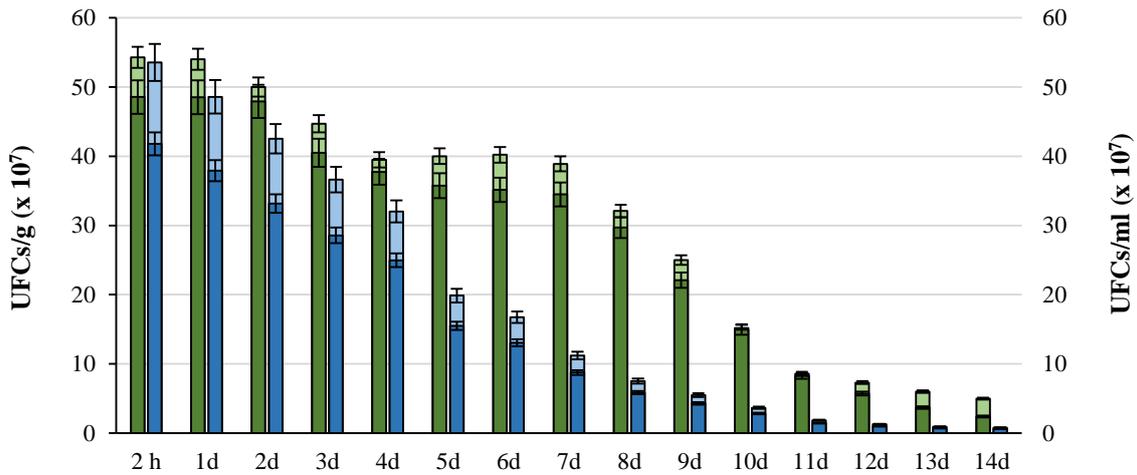


Figura 131. UFC de *Microbacterium sp.* 3J1-GFP por gramo de suelo. La gráfica muestra las UFC/ml ($\times 10^7$) equivalentes estimadas respecto a la relación con la curva Cp de amplificación del gen *gfp* (color oscuro), así como las UFC/g ($\times 10^7$) (color claro) contabilizadas a lo largo de los 14 días de muestreo para la formulación en líquido (azul) y en alginato (verde).

3.1.3. Planta

Tras estudiar la detección de la cepa en suelo durante un periodo de dos semanas, se procedió a llevar a cabo un ensayo análogo empleando plantas de pimiento inoculadas tanto con formulación líquida como en base de alginato. El ensayo se llevó a cabo empleando maceteros con suelo natural para evaluar la persistencia y el efecto sobre la inoculación. Con estos ensayos se pretendió estudiar la persistencia de la cepa en la planta.

La concentración mínima de ADN amplificado en las raíces de plantas de pimiento inoculadas con formulación líquida se detectó a las 4h de inocular (0,88 ng/ μ l), y la máxima en el día 1 de muestreo (1,45 ng/ μ l). Entre los días 2 y 4 no se observó diferencia significativa en la concentración de ADN amplificada, pero a partir del día 5, la amplificación se redujo en un 35% y hasta menos de la mitad hacia el día 9 de muestreo (0,64 ng/ μ l). A partir del día 9 hasta el final del ensayo no se observó diferencia significativa en la concentración de ADN amplificada. En cuanto al ADN amplificado en las raíces de las plantas de pimiento inoculadas con formulación en base de alginato, se observó un mínimo a las 4h de inocular (0,42 ng/ μ l), lo que supuso la mitad de concentración amplificada respecto a las raíces inoculadas en formulación líquida. En el muestreo del día 1, la concentración de ADN amplificada fue un 30% inferior en las raíces

inoculadas con formato líquido. A partir del día 2 de muestreo no se observaron diferencias significativas respecto al resto de días de muestreo en cuanto al ADN amplificado, observándose el máximo el día 10 de muestreo con 1,72 ng/μl. La concentración de ADN amplificada de las raíces inoculadas con formato en base de alginato no presentó diferencia significativa con la amplificada de raíces inoculadas con formato líquido entre los días 2 y 5 de muestreo, mientras que los días 6-7 de muestreo la concentración amplificada fue de un 25-35% mayor respecto a la amplificada en raíces inoculadas con formulación líquida. Desde el día 8 de muestreo, hasta el final del ensayo, la concentración de ADN amplificada en las raíces inoculadas con formato en base de alginato fue de 2 a 3 veces superior a la amplificada de raíces inoculadas con formato líquido (figura 132).

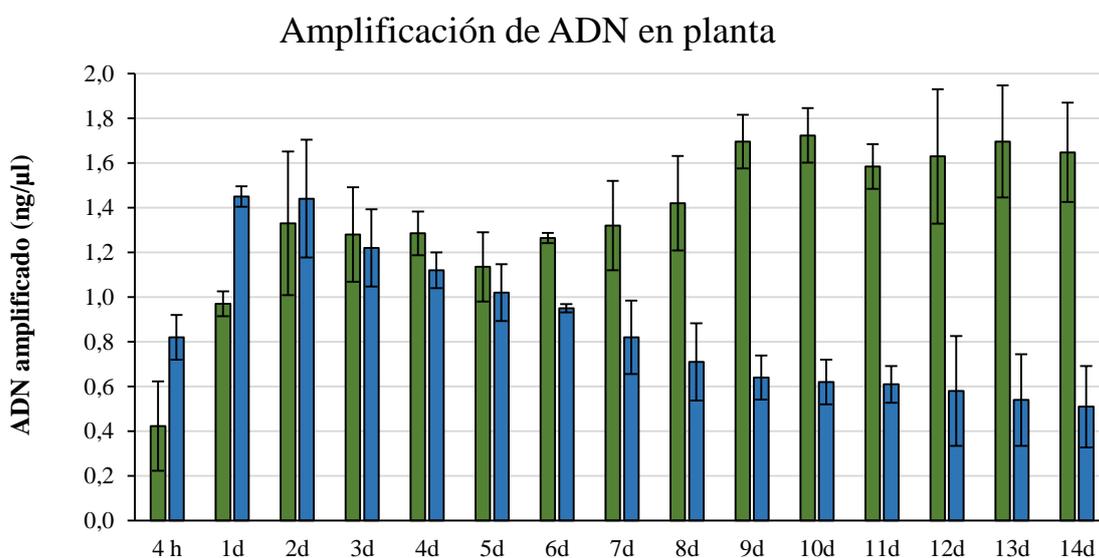


Figura 132. Seguimiento de *Microbacterium sp.* 3J1-GFP en plantas en macetero con inoculante por RT-qPCR. Se muestra la concentración de ADN amplificado (ng/μl) a lo largo de los 14 días de muestreo para la formulación en líquido (azul) y en alginato (verde).

DISCUSIÓN

Las interacciones positivas entre planta y microorganismo pueden resultar en una promoción del crecimiento de la planta cuando ésta crece en condiciones normales, así como en una protección frente al estrés cuando la planta crece en presencia del estrés en cuestión. En esta tesis se analizaron inicialmente tanto los efectos en la promoción del crecimiento, como la protección frente a la desecación en distintos cultivos de plantas por una colección de cinco microorganismos especialmente tolerantes a la desecación aislados previamente en nuestro grupo de investigación (*Microbacterium sp.* 3J1, *Arthrobacter koreensis* 5J12A, *Arthrobacter siccitolerans* 4J27, *Rhodococcus sp.* 4J2A2 y *Leucobacter sp.* 4J7B1) (Narváez-Reinaldo *et al.*, 2010). En este estudio se incluyó igualmente la cepa *Pseudomonas putida* KT2440, porque se ha descrito previamente como una BPCP sensible a desecación (Manzanera *et al.*, 2002, Nelson *et al.*, 2002, Planchamp *et al.*, 2014) así como la cepa *Achrombacter piechaudii* 366-5 por su capacidad de proteger plantas contra la sequía (Mayak *et al.*, 2004). Así, en este trabajo hemos establecido una correlación entre la tolerancia a la sequía de la cepa inoculante y la protección que ésta realiza sobre las plantas, ya que las cepas que muestran la mayor tolerancia a la desecación, también fueron las que mayor grado de protección contra la sequía mostraron sobre las plantas estudiadas. Por otra parte el hecho de que ciertos cultivos, como el maíz o el pimiento, queden protegidos contra la sequía en presencia de ciertas cepas xerotolerantes como *Rhodococcus sp.* 4J2A2, mientras que en el caso de otros cultivos como el tomate no queden protegidos contra la sequía por esta cepa, indica que, en las condiciones ensayadas, podemos encontrar distintos tipos de interacciones dependiendo de la planta utilizada. Esto sugiere que ciertas plantas se consideren más preparadas para la interacción con determinadas cepas xerotolerantes. De igual modo, se comparó la capacidad de proteger cultivos contra la sequía por cepas taxonómicamente cercanas a las cepas *Microbacterium sp.* 3J1, y *A. koreensis* 5J12A para identificar si el efecto protector era una característica particular de la cepa aislada o si compartían dicha capacidad con cepas estrechamente relacionadas a nivel taxonómico. Se seleccionaron estas dos cepas al ser las que presentaron mejores resultados tanto en la promoción del crecimiento, como en la protección frente a la sequía en plantas. Las cepas taxonómicamente más cercanas a ambas se seleccionaron en base a la secuencia del gen 16S rRNA. Como resultado de este análisis se observó que tanto la promoción del crecimiento de la planta, como la protección contra la sequía de la misma, no están definidas por la clasificación taxonómica del microorganismo, sino más bien por el nivel de tolerancia de la bacteria frente a la sequía. Para una mayor seguridad en este respecto,

sugerimos la realización de este estudio con un mayor número de microorganismos BPCP con capacidad de proteger a plantas contra la sequía.

Se han descrito diversos mecanismos por los cuales las bacterias pueden proteger a las plantas contra la sequía. Para identificar a qué nivel se estaba produciendo este efecto de protección de la planta contra la sequía analizamos las moléculas más comúnmente descritas en estos procesos de protección de las plantas contra la sequía por microorganismos. Algunos de estos mecanismos son la producción de ciertas fitohormonas (IAA, GA₃, ABA, y SA), el consumo de ACC, la producción de moléculas antioxidantes que participan en la prevención y reparación del daño causado por especies reactivas del oxígeno (ROS) (por ejemplo a través de actividad superóxido dismutasa y catalasa), así como la producción de moléculas xeroprotectoras, como la trehalosa, implicadas en la protección de biomoléculas esenciales (Marulanda *et al.*, 2009, Rodríguez-Salazar *et al.*, 2009, Sandhya *et al.*, 2010, Julca *et al.*, 2012, Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013, de Ollas *et al.*, 2013, Akter *et al.*, 2014, Fayez & Bazaid, 2014). Para identificar a qué nivel estaba actuando la bacteria sobre la planta en su protección contra la sequía, se analizó la producción de estas moléculas y se realizó un análisis de la correlación de la covarianza (ANCOVA) de dichas producciones respecto al estado fisiológico de la planta a través de su peso (PS, PF y PTT), de su tamaño (longitud del tallo y de la raíz), así como del contenido hídrico (CRA, PAR e IRA). Con dicho estudio se pudo identificar que la concentración de trehalosa producida por las células microbianas es el parámetro bioquímico que mayor efecto produce sobre el estado fisiológico de la planta. Así, este análisis indica que la mayor producción de trehalosa producida por la cepa *Microbacterium sp.* 3J1, se asocia al mayor valor en los parámetros fisiológicos vegetales citados anteriormente. Esto es, la concentración de trehalosa y los valores fisiológicos indicados presentaban coeficientes de determinación (R^2) muy cercanos a 1. Por otra parte, también se observó una gran correlación entre la producción de trehalosa por *P. putida* KT2440 (cepa sensible a la desecación), y los valores fisiológicos que alcanzó la planta con dicho inoculante en condiciones de sequía, lo que refuerza la correlación positiva entre ambos. Esta correlación entre la producción de trehalosa por parte del microorganismo y el peso, tamaño y contenido hídrico de las plantas en condiciones de sequía se mantuvo para todas las cepas estudiadas al contrario de lo ocurrido con la producción de fitohormonas, moléculas antioxidantes o consumo de ACC, donde alguno de los microorganismos no presentó la correlación mencionada.

Todos los aislados utilizados en este trabajo pertenecen al grupo de las Actinobacterias. Esto puede deberse a la mayor abundancia en los suelos de este grupo en especial en condiciones de estrés por sequía, ya que las bacterias de este grupo presentan una mayor tolerancia a estreses abióticos tales como la falta de agua, las temperaturas extremas y la falta de nutrientes, entre otras cosas gracias a su elevada producción de trehalosa (Deutch & Perera, 1992, Zevenhuizen, 1992). Especulamos que la alta tolerancia a la desecación del microorganismo, permite la selección del mismo en la rizosfera de la planta respecto a sus competidores en condiciones de sequía y esta supervivencia le permite a la bacteria establecer interacciones con la planta para más tarde desarrollar la protección de la misma frente a la falta de agua. A la luz de los análisis anteriores, esta relación entre la tasa de supervivencia de la cepa y la protección de la planta contra la sequía que muestra, estaría correlacionada con la capacidad de la célula microbiana para producir trehalosa. Así parece lógico proponer el uso de BPCP altamente tolerantes a la desecación para la protección de las plantas contra la sequía. Sugerimos por lo tanto que es la capacidad de producción de trehalosa del microorganismo la que determina el nivel de protección de éste sobre la planta. La trehalosa es una molécula conocida por su capacidad de estabilizar biomoléculas esenciales de las células, y se ha relacionado con la modulación del metabolismo de las plantas a través de la inducción de genes de respuesta al estrés, factores de transcripción y la mayoría de las proteínas quinasas reguladoras involucradas en la respuesta de la planta (Schluepmann *et al.*, 2004). Bae y colaboradores encontraron que la adición exógena de 30 mM de trehalosa podía relacionarse con la regulación de la producción de etileno y de las vías de señalización del jasmonato en la planta (Bae *et al.*, 2005). La presencia de trehalosa parece estar también relacionada con la comunicación cruzada en la señalización de ABA en diferentes procesos fisiológicos, incluyendo la regulación de la apertura-cierre de los estomas (Gómez *et al.*, 2010). Se comprobó así mismo que la inoculación de *Medicago truncatula* con la cepa *Sinorhizobium meliloti*, sobreproductora de IAA, se tradujo en una acumulación de trehalosa en la célula bacteriana y esto produjo una re-modulación del perfil de fitohormonas en la planta (Bianco & Defez, 2009). Estos trabajos muestran que existe un sistema de interacción entre la trehalosa, como factor externo estimulante, y el perfil de fitohormonas que se produce en la planta. Además, la adición de trehalosa exógena se ha asociado con la protección contra el daño oxidativo mediante la reducción de ROS, el incremento de moléculas antioxidantes no enzimáticas, y la co-activación del sistema antioxidante y del

sistema de glioxalasa (implicado en la desintoxicación de ROS para reconstituir el glutatión reducido) (Mostofa *et al.*, 2014).

Gracias a la secuenciación del genoma de las cepas empleadas (Manzanera *et al.*, 2014, Manzanera *et al.*, 2015a, Manzanera *et al.*, 2015b, Manzanera *et al.*, 2015c, Manzanera *et al.*, 2015d), hemos podido identificar con homología a los genes involucrados en la ruta de biosíntesis de trehalosa desde la glucosa-6-fosfato/trehalosa-6-fosfato (*otsA-otsB*). Además, también hemos detectado que, pese a estar presente en todos los aislados, la concentración de trehalosa observada en cada aislado era distinta. Esta ruta es la misma que emplean muchas de las plantas para la producción interna de trehalosa (Avonce *et al.*, 2006). En el caso de la cepa *Microbacterium sp.* 3J1, ésta, es además capaz de producir trehalosa desde cualquier α -glucosa ya que dispone de la ruta *treY-treZ* en su genoma. Bien por mayor facilidad de acceso a sustratos, bien por su coste energético más eficiente, esta vía puede ser en parte la causante de una mayor producción de trehalosa por esta cepa, lo que se traduce en mejores resultados a nivel de protección de plantas frente a la sequía. En la actualidad estamos estudiando la diferente expresión de ambas rutas por parte del microorganismo cuando la cepa interactúa con la planta en condiciones de sequía en nuestro grupo de investigación. De igual modo, un mejor control sobre la regulación fitohormonas como el ABA en condiciones de sequía o de la producción de enzimas antioxidantes, hacen que esta cepa no sea sólo capaz de mostrarse eficiente en la protección frente a la sequía, sino que sea también capaz de estimular un mayor crecimiento vegetal. Se ha estudiado que, bajo condiciones de sequía, las plantas reguladas con ABA exógeno muestran una apertura y cierre de estomas más controlada y efectiva (uso más eficiente del agua) (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013). Teniendo en cuenta que, además, en los casos en los que no ha habido regulación positiva de la trehalosa aportada por microorganismos este control ejercido por ABA se perdía, todo parece indicar la necesidad de la trehalosa como regulador de esta fitohormona bajo dichas condiciones (Van Houtte *et al.*, 2013). Los resultados de baja producción de trehalosa por algunas de las cepas podrían explicar una baja producción de ABA y que esto se haya traducido en un peor control sobre la apertura y cierre de los estomas.

Para identificar qué otros mecanismos moleculares se activaban en la planta en presencia del microorganismo se estudió la variación en el perfil proteico, así como de los distintos metabolitos producidos, mediante técnicas de proteómica y metabolómica (Kiely *et al.*, 2006, Lim & Kim, 2013). Gracias a la identificación de estas proteínas y metabolitos

podemos proponer cuales son las rutas metabólicas que están involucradas a nivel de producción de fitohormonas, de moléculas xeroprotectoras y antioxidantes, así como las involucradas en señalización, rutas enzimáticas y respuestas moleculares durante la interacción planta-microorganismo en condiciones de sequía (Lim & Kim, 2013). Para realizar estos estudios se seleccionó a *Microbacterium sp* 3J1 como microorganismo modelo de protección de plantas frente a la sequía al mostrar los resultados más notables. Como planta modelo se empleó la planta del pimiento al ser la que presentó los resultados más reproducibles a lo largo de las repeticiones realizadas.

La falta de bases de datos suficientemente completas impidió una caracterización completa del proteoma. Sin embargo la caracterización realizada alcanzó un porcentaje de identificación notable para lo considerado habitual con la técnica empleada, ya que logramos identificar 41 de 109 *spots* seleccionados en ensayos con plantas y con la cepa *Microbacterium sp*. 3J1 (35-40%, respecto al 20-30% habitual descrito en la literatura) (Kandasamy *et al.*, 2009). En cuanto al metaboloma, se identificaron más de 150 compuestos de manera fiable debido a la extensión de la base de datos con variantes de isoformas y derivados de compuestos recogida por el NIST98 (NIST, Gaithersburg, Md.) (Graber *et al.*, 2010).

La respuesta de las plantas ante estrés por sequía a niveles tanto proteómico como metabolómico es muy compleja (Kosova *et al.*, 2011, Benešová *et al.*, 2012). Las plantas responden al estrés mediante un ajuste progresivo de su metabolismo, con alteraciones metabólicas sostenidas, transitorias y de respuesta tanto temprana, como tardía (Liu & Bennett, 2011, Krasensky & Jonak, 2012, Muscolo *et al.*, 2015). Por ejemplo, la planta produce una alta concentración de rafinosa y de prolina en sequía durante varios días en respuesta al aumento de la presión osmótica. Por otra parte el metabolismo central de carbohidratos cambia rápidamente de una manera compleja en función del tiempo que dura el periodo de sequía (Liu & Bennett, 2011, Krasensky & Jonak, 2012). Algunos de los cambios metabólicos de la planta en respuesta a la sequía ocurren también cuando ésta se incuba en presencia de alta concentración de sales, o a altas temperaturas, mientras que otros cambios son específicos de la sequía y no ocurren en otras condiciones (Obata & Fernie, 2012). Por ejemplo, la concentración de aminoácidos, azúcares y alcoholes normalmente aumentan en respuesta a diferentes condiciones de estrés (Krasensky & Jonak, 2012, Muscolo *et al.*, 2015, Sun *et al.*, 2015). Sin embargo observamos que las plantas inoculadas muestran un perfil metabólico y un perfil de proteínas específico para

resistir eventos de sequía. Por otro lado, la resistencia básica de la planta (independiente de la bacteria), aquella que cualquier planta es capaz de ofrecer con mecanismos no específicos, no fue suficiente para permitir su supervivencia durante el periodo estudiado, con lo que estas acabaron marchitándose (Liu & Bennett, 2011). Así, la inoculación con cepas tolerantes a la sequía indica que las BPCP son capaces de modificar la respuesta de la planta para mantener su homeostasis y evitar así los efectos de la sequía. (Kohler *et al.*, 2008, Bresson *et al.*, 2013).

De este modo, comparando el metaboloma de especies tolerantes al estrés por sequía, con el de especies sensibles al estrés, se observa que, en general, las plantas tolerantes al estrés tienen mayores concentraciones de metabolitos relacionados con dicho estrés en condiciones normales de crecimiento y que, en condiciones desfavorables acumulan grandes cantidades de metabolitos de protección, tales como prolina y azúcares no reductores solubles. Esto indica que su metabolismo basal se encuentra mucho mejor preparado para posibles condiciones de crecimiento adversas, probablemente debido a un largo periodo de adaptación de la especie al medio en que vive (Silvente *et al.*, 2012, Yobi *et al.*, 2012, Arbona *et al.*, 2013, Muscolo *et al.*, 2015). En el caso de plantas de pimiento, una especie no tolerante a la sequía (Alvino *et al.*, 1994, Delfine *et al.*, 2001), en ausencia de inóculo únicamente sintetizaban algunos osmolitos y metabolitos antioxidantes no específicos para tratar de mantener la estabilidad estructural y celular. Sin embargo, en las plantas de pimiento inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 se observaron mecanismos de tolerancia específicos como la producción de prolina, valina y de otros aminoácidos cuya concentración aumentó notablemente en comparación con la observada en las plantas no inoculadas. A nivel proteómico, se observó que la alta proporción de proteínas sobreexpresadas implicadas en la detoxificación de moléculas oxidantes tipo ROS en plantas no inoculadas, se redujo cuando estas fueron inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1.

Ambos análisis, proteómico y metabolómico, muestran que las plantas inoculadas presentan una mejor señalización para activar rutas metabólicas con objeto de mejorar su tolerancia, pero las plantas sin inocular solo expresan señales de alerta con poca mejora de la respuesta frente a la sequía. El ejemplo más claro lo encontramos en la señalización de GABA, la cual es casi inexistente en las plantas inoculadas, pero está muy activa en las plantas no inoculadas tanto a nivel proteómico como metabolómico.

En la mayoría de las ocasiones los metabolitos identificados corresponden al final de una ruta o son el resultado de la acumulación en un punto muy concreto de la misma. Las herramientas bioinformáticas de predicción de rutas metabólicas utilizadas (MeltDB o CARMEN del CeBiTec, Universidad de Bielefeld, Alemania) no resolvieron las rutas potenciales al faltar pasos en las mismas o identificar metabolitos implicados en múltiples rutas.

De este modo, el análisis de rutas se llevó a cabo mediante análisis comparativo de aquellos compuestos identificados junto con el apoyo del genoma secuenciado tanto de la planta modelo (CapCyc (Pepper) de SolCyc – SGN, SOL Genomics Network (<http://solcyc.solgenomics.net/>, Thompson Institute for Plant Research, NY - USA) como del microorganismo inoculante empleados (depositado en la base de datos TBL/EMBL/GenBank con el número de acceso PRJEB8445 (ID: 285632)). Partiendo de la predicción de rutas para el modelo vegetal, se compararon éstas, con las posibles rutas por las que el microorganismo podría mejorar la resistencia de la planta frente a la sequía.

De este modo, se han analizado las rutas de resistencia frente al estrés por sequía. Entre los mismos destacan el estudio del ciclo del etileno, la producción de azúcares y osmorreguladores como la trehalosa, la producción de fitohormonas con efectos ante la sequía, las rutas de señalización rápida tanto específicas, así como las rutas del metabolismo básico (Gibson, 2004, Krasensky & Jonak, 2012, Obata & Fernie, 2012).

En el caso del control sobre el ciclo de etileno, en plantas inoculadas con *Microbacterium* sp. 3J1, se acumulan moléculas reguladoras, de las que destacan algunas como la espermidina, la cual supone un desvío de la ruta a nivel de la S-adenosilmetionina (SAM), penúltimo paso del ciclo antes de producir etileno (Li *et al.*, 2013). Pese a que SAM también puede verse acumulado por una sobreexpresión del ciclo de poliaminas (ciclo de la ornitina-citrulina-arginina) (Gill & Tuteja, 2010), resulta significativo que la acumulación de estos compuestos supere en casi 8 veces a los obtenidos en plantas no inoculadas. Además, otras moléculas del ciclo de Yang-etileno como la metionina, se reducen significativamente en plantas inoculadas respecto a las no inoculadas. Por otra parte, la acumulación de mio-inositol, junto con la SAM, da lugar a S-adenosilhomocisteína (SAH), la cual se metaboliza para acumular adenosina en lugar de seguir el ciclo de Yang (Bohnert *et al.*, 1995, Sengupta *et al.*, 2008). Siguiendo esta ruta alternativa, se observó la acumulación de mio-inositol (precursor de compuestos

antioxidantes) en plantas inoculadas respecto a las no inoculadas. Además, las plantas de pimiento suelen emplear como sustrato la SAM para la síntesis de ácido sinápico, molécula importante en la comunicación planta-microorganismo en el suelo (Achnine *et al.*, 2004). En relación a esta ruta, se observó una alta concentración de metabolitos intermediarios como el conilferaldehído, el sinapaldehído o el ácido felúrico, e incluso del propio el ácido sinápico en plantas inoculadas, así como de conilferaldehído y ácido felúrico en la cepa cultivada en presencia de PEG 50% (que simula un estrés severo por sequía), lo que indica la activación de la ruta de biosíntesis de estos compuestos.

Por otra parte, en el genoma de la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 existen genes que codifican para metiltransferasa dependiente de SAM, así como de enzimas metilasas y metiltransferasas, involucradas en el paso de SAM a SAH, intermediario en la ruta de producción de homocisteínas y adenosina (Weretilnyk *et al.*, 2001) (figura 133). Esta ruta se detectó así mismo en el genoma del pimiento, sin embargo no fueron capaces de activarla bajo sequía. Se observa además que la adenina se concentraba también en la cepa bacteriana cuando se cultivaba con PEG 50%. Para esta misma condición, también se detectó una acumulación notable de homocisteína a nivel de cepa (no observado en planta), lo que puede indicar que el microorganismo acabe acumulando la homocisteína que debe estar produciendo la planta inoculada para corresponder a la concentración de adenosina detectados en la misma, evitando de este modo que se volviera a producir metionina a partir de dicho compuesto. Todo ello hace pensar que, mientras en las plantas sin inóculo se concentran los precursores del ciclo del etileno, en las plantas inoculadas se activan rutas alternativas que permiten controlar la concentración del mismo.

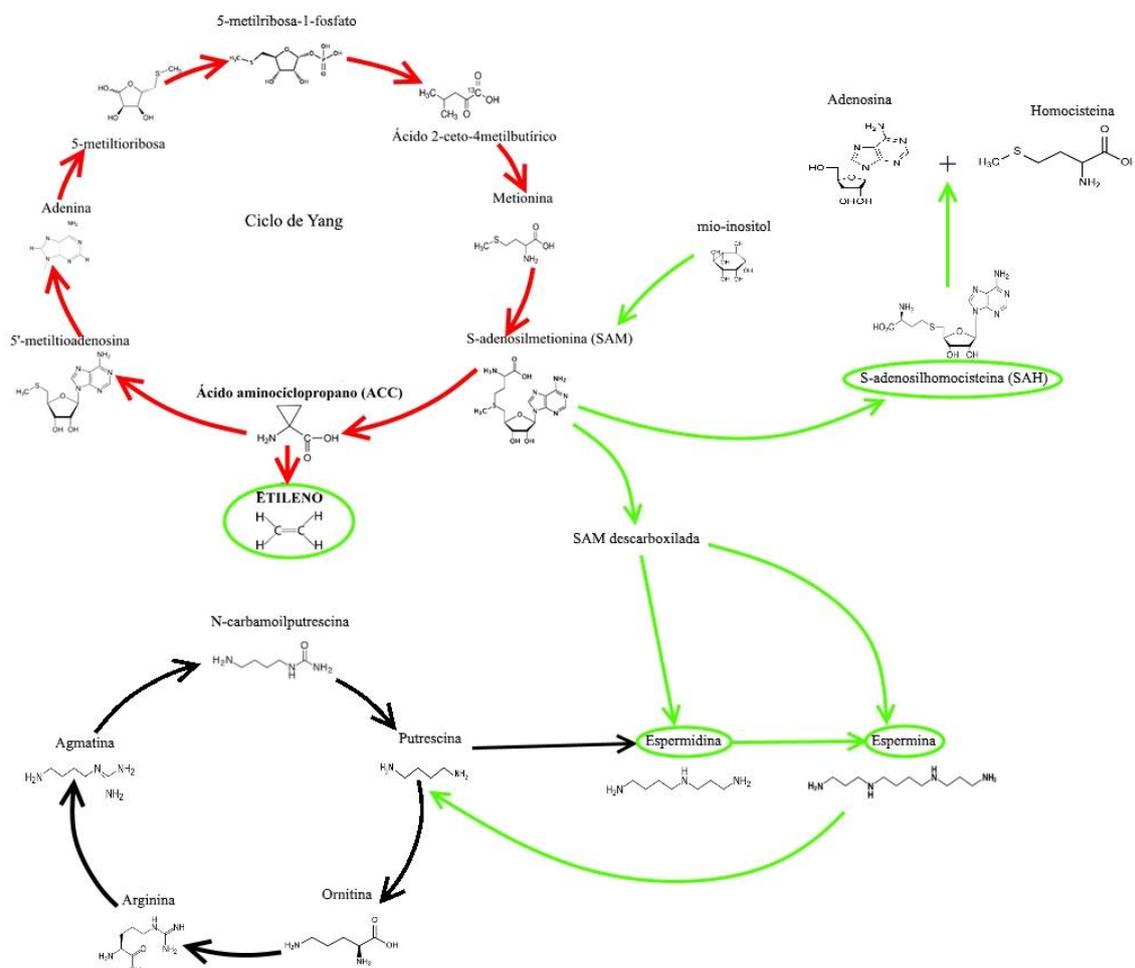


Figura 133. Posibles alternativas al ciclo de Yang mediadas por *Microbacterium sp. 3J1*. Se muestran las posibles salidas del ciclo de Yang cuando la planta fue inoculada con *Microbacterium sp. 3J1*. Las líneas rojas indican la ruta habitual en plantas en la producción de etileno; las líneas verdes indican las posibles rutas alternativas mediadas por el inoculante.

La producción de xeroprotectores (solutos compatibles implicados en la protección de biomoléculas esenciales contra la sequía), coincide en múltiples ocasiones con la producción de osmoprotectores y osmoreguladores (solutos compatibles implicados en la protección contra la alta concentración de sales). Sin embargo, no todos estos osmolitos tienen la misma efectividad, y las plantas tolerantes a la sequía han desarrollado rutas que les permiten producir varias moléculas con el fin de responder más eficientemente a la situación estresante (Boyer & Meyer, 1980, Obata & Fernie, 2012, Fraire-Velázquez & Balderas-Hernández, 2013, Muscolo *et al.*, 2015). Algunas de dichas combinaciones son específicas para cada especie vegetal, pero la mayoría de estos metabolitos tienen otras funciones en el desarrollo de la planta en ausencia de estrés (Morgan, 1983, Obata & Fernie, 2012). Además, estos compuestos pueden a su vez estar involucrados en el

mantenimiento y recuperación de estructuras celulares (paredes, membranas u orgánulos) o en la eliminación de especies reactivas del oxígeno (Manivannan *et al.*, 2008). Por otra parte, estas combinaciones pueden verse modificadas por agentes externos como microorganismos rizosféricos (Lim & Kim, 2013). Dichas modificaciones vienen dadas por el aporte de enzimas por parte del microorganismo, que modifican las rutas metabólicas en la planta hospedadora, por el consumo de compuestos producidos por la planta o incluso por el aporte directo de sustratos o metabolitos intermediarios que permiten emplear los recursos de las plantas de manera más eficiente (Kohler *et al.*, 2008, Iturriaga *et al.*, 2009, Ashraf, 2010).

Así, el análisis de los metabolitos producidos en las raíces de las plantas de pimiento no inoculadas muestra que se produjeron metabolitos y enzimas poco específicos pudiendo estar involucrados en la tolerancia frente a la sequía. Las enzimas sobreproducidas fueron la fructosa-bifosfato aldolasa (implicada en la síntesis de gliceraldehído-3-fosfato) o la NAD malato deshidrogenasa (catálisis de malato a oxalacetato, osmolito del metabolismo central). Por otra parte, los metabolitos identificados fueron en su mayoría intermediarios del metabolismo central que se acumulan en situaciones estresantes como la eritrosa-4-fosfato, la histidina, el glicerato o el cetoglutarato (Boyer & Meyer, 1980, Chaves *et al.*, 2009, Arbona *et al.*, 2013).

Sin embargo, cuando las plantas de pimiento estaban inoculadas con *Microbacterium sp.*, 3J1, la composición de reguladores osmóticos fue muy compleja, mostrando gran cantidad de metabolitos específicos como la citrulina-arginina-ornitina (todos implicados en rutas importantes de respuesta a estreses abióticos) (Muscolo *et al.*, 2015), la trehalosa, la rafinosa, el manitol, el piruvato o el malato. Algunos de estos metabolitos son moléculas antioxidantes o reguladores de las estructuras celulares, pero a diferencia con las plantas no inoculadas existe una especificidad de acción de las mismas o una especificidad en su síntesis, que no corresponde con la del metabolismo primario, sino con mecanismos especializados para tolerar el estrés por sequía (Boyer & Meyer, 1980, Manivannan *et al.*, 2008). Las diferencias encontradas cuando las plantas están inoculadas vienen dadas por la distinta concentración de dichas moléculas producidas en presencia del microorganismo. Destacamos que muchos de estos compuestos tienen más de una función involucrada en la resistencia a la sequía, potenciando su eficacia al actuar a varios niveles (Morgan, 1983, Manivannan *et al.*, 2008).

El malato es otra molécula importante como agente osmoprotector y regulador de moléculas reactivas del oxígeno. La ruta metabólica de producción de malato no es una ruta del metabolismo primario (Guicherd *et al.*, 1997). En la planta inoculadas con *Microbacterium* sp. 3J1, se observa una mayor concentración de esta molécula tanto por análisis de proteómica como de metabolómica. Por otra parte, destacamos especialmente la producción de trehalosa como agente regulador osmótico (Iturriaga *et al.*, 2009). Las moléculas de trehalosa se encuentran en una concentración 80 veces mayor en plantas inoculadas que en las no inoculadas. Esta mayor concentración, puede deberse al aporte directo por parte del microorganismo, que activan dicha ruta en condiciones de estrés, y al aporte por parte de la planta de los sustratos de la ruta como glucosa o fructosa (Liu *et al.*, 2013, Vacheron *et al.*, 2013). Como se ha comentado la planta *C. annuum* presenta los genes *otsA* y *otsB* codificantes para la trehalosa-6-fosfato sintasa y trehalosa-6-fosfato fosfatasa, involucrados en la producción de trehalosa (figura 134). En este caso la trehalosa se sintetiza a partir de UDP-glucosa y la glucosa-6-fosfato a través de trehalosa-6-fosfato, por la acción de las dos enzimas citadas.

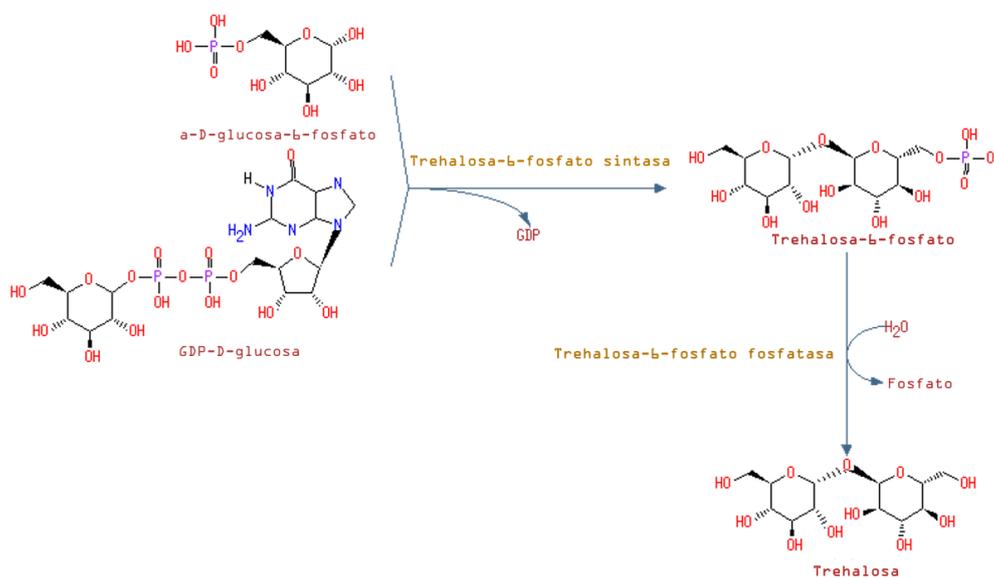


Figura 134. Ruta de producción de trehalosa en pimienta. Se muestra la ruta *otsA-otsB* que emplean las plantas de pimienta para producir trehalosa.

La cepa *Microbacterium sp.* 3J1 además de la ruta *ots* presenta los genes *treY* y *treZ* como ruta alternativa, para la producción de trehalosa a partir de malto-oligosacáridos o α -1,4-glucanos. De este modo, ante situaciones de estrés osmótico, como el provocado por la sequía, la cepa sería capaz de producir altas concentración de este compuesto desde una gran variedad de sustratos. Por estudios transcriptómicos llevados a cabo posteriormente en nuestro grupo, se ha detectado que las plantas no inoculadas produjeron mayor cantidad de trehalosa que las inoculadas, lo que sugiere que la producción de trehalosa en situaciones de estrés hídrico se debe principalmente a la cepa inoculante *Microbacterium sp.* 3J1, y más específicamente mediante la inducción del promotor de *treS* (figura 135) (García-Fontana, C., comunicación personal).

De hecho, el análisis de metabolitos para el cultivo de la cepa con PEG, mostró que a bajas concentraciones de este compuesto (PEG 5%, que simula un estrés hídrico leve) se produce una liberación de trehalosa en el exterior celular (medio de cultivo), mientras que en concentraciones más altas (PEG 50%, que simulan un estrés hídrico intenso), la trehalosa se encuentra principalmente en el interior celular donde se encuentra en una concentración de hasta 6 veces mayor. Esto parece indicar que existe un sistema de protección temprano por el cual puede exportar trehalosa al exterior, mientras que ante situaciones de mayor estrés hídrico, el microorganismo trata de proteger su propia integridad celular reprimiendo la exportación de trehalosa.

También se ha detectado una alta concentración de maltosa en plantas inoculadas, un precursor de una ruta alternativa en la producción de trehalosa que podemos encontrar en *C. annuum* llamada *treS* (De Smet *et al.*, 2000). La maltosa acumula en el interior celular del microorganismo inoculante cuando éste se cultivó en presencia de PEG 50% (9,71 mayor concentración que con PEG 5%). De este modo, la presencia de *Microbacterium sp.* 3J1 podría producir un aumento en la concentración de este en la planta, disponiendo de esta forma de una ruta más corta y eficiente para producir trehalosa, y regular las fitohormonas, como en el caso del ABA (De Smet *et al.*, 2000, Bae *et al.*, 2005, Iturriaga *et al.*, 2009, Gómez *et al.*, 2010). Sin embargo, para demostrar que esta ruta está funcionando en las células de la planta, sería necesario comprobar su actividad, mediante ensayos de RT-PCR del gen *treS* en condiciones de sequía tanto en presencia como en ausencia del microorganismo.

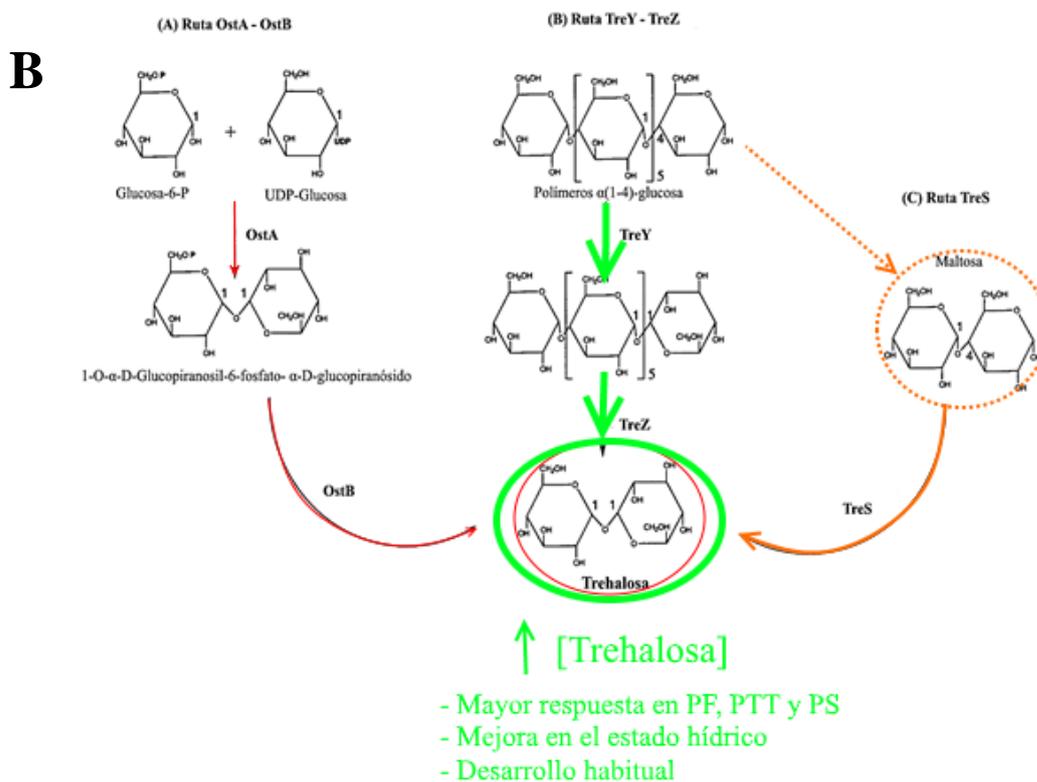
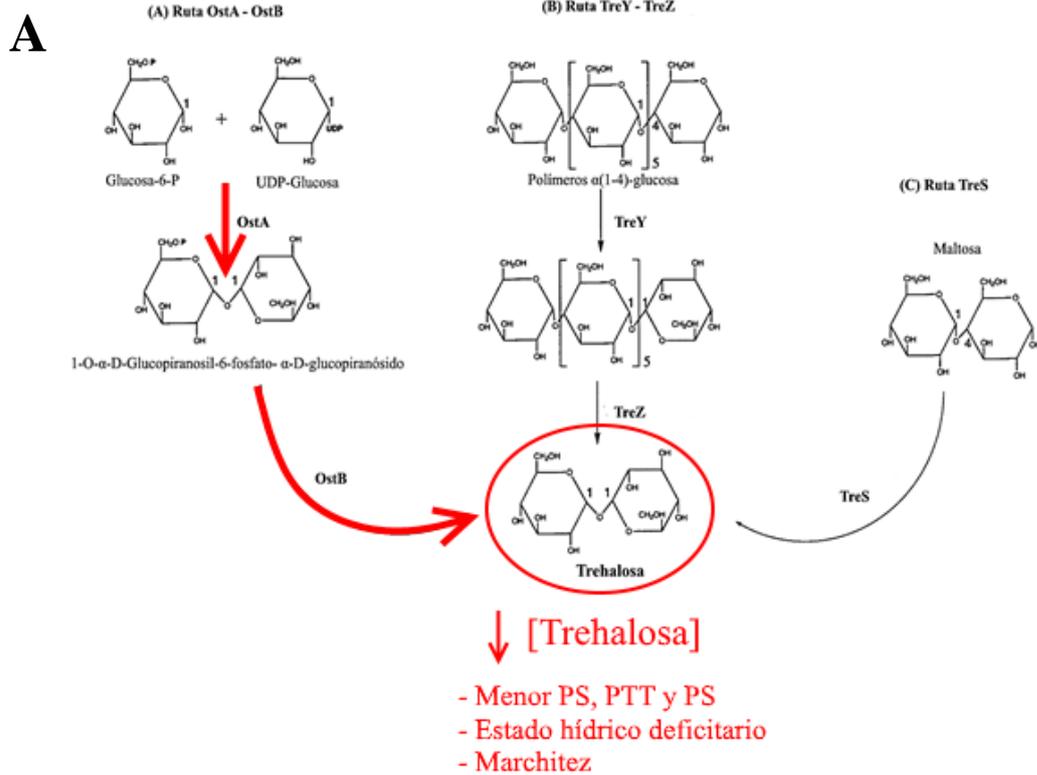


Figura 135. Producción de trehalosa en sequía. Propuesta de diferencias de producción de trehalosa en plantas no inoculadas (A) e inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 (B) bajo condiciones de sequía. Las líneas rojas hacen referencia a las rutas seguidas por la planta; las verdes, a las rutas que sigue el microorganismo inoculante; y las naranjas, a las posibles rutas mediadas por la interacción. El grosor de las líneas hace referencia a la aportación que cada ruta en base a estudios de transcriptómica llevados a cabo en nuestro grupo (figura modificada de Koen et al. 2000).

Otra molécula xeroprotectora detectada es la rafinosa (Sziderics *et al.*, 2010). Las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp. 3J1 presentaron 2 veces más concentración de rafinosa. Igualmente se detectó una concentración de rafinosa 4 veces mayor en el sobrenadante de los cultivos de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 cuando esta se cultivó con PEG 50% respecto a los cultivos con PEG 5%. También se observó mayor concentración de otros compuestos osmorreguladores como el mio-inositol (Boyer & Meyer, 1980, Morgan, 1983). En base a los metabolitos identificados sugerimos que la ruta más probable para la producción de mio-inositol en plantas de pimiento requiere de metabolitos intermediarios como la glucosa-6-fosfato y el mio-inositol fosfato (figura 136). La concentración de ambas moléculas y del propio mio-inositol aumentó tanto en el sobrenadante de cultivos de *Microbacterium* sp. 3J1 con PEG 5%, como en el interior celular de la cepa en cultivos con PEG 50%. Dado que uno de los componentes más costosos de obtener desde el punto de vista energético es la glucosa-6-fosfato y las plantas inoculadas producen 10 veces más dicha molécula respecto a las no inoculadas, parece que la planta pudiera estar acumulando intermediarios para facilitar la producción a la cepa bacteriana y que ésta le permita a su vez acumular a la planta el mio-inositol, suponiéndole un ahorro energético significativo.

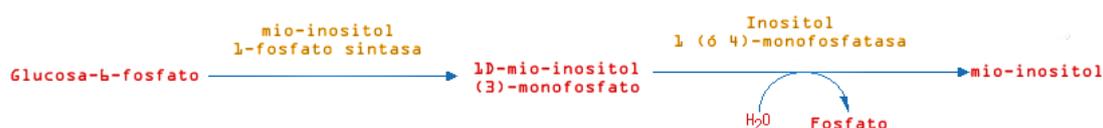


Figura 136. Ruta de producción de mio-inositol en pimiento. Se muestra la ruta para producir mio-inositol en plantas de pimiento desde G-6P y con mio-inositol-P como intermediario único.

También se observó un aumento en la concentración de prolina de hasta 5 veces superior tanto en sobrenadante como en el interior celular de *Microbacterium* sp. 3J1 cuando éste se cultivaba en presencia de PEG 50% respecto a los cultivos con PEG 5%. Además identificamos en el genoma de *Microbacterium* sp. 3J1 la presencia de genes con homología al gen codificante para el enzima prolina deshidrogenasa, involucrado en la biosíntesis de prolina (Manzanera *et al.*, 2015d). Otros compuestos involucrados en la ruta de producción de prolina en plantas de pimiento, como los del complejo citrulina-arginina-ornitina, que hemos mencionado anteriormente (figura 137), se encontraron en una concentración 5 veces superior en el sobrenadante de cultivos del inoculante

cultivado con PEG 50%. Por otra parte el compuesto glutamato, subproducto de esta ruta, se encontró en una concentración 4,26 veces superior en cultivos de la cepa con PEG 5%. La presencia de estos compuestos parece indicar que la planta está produciendo prolina con la ayuda de intermediarios generados por el microorganismo.

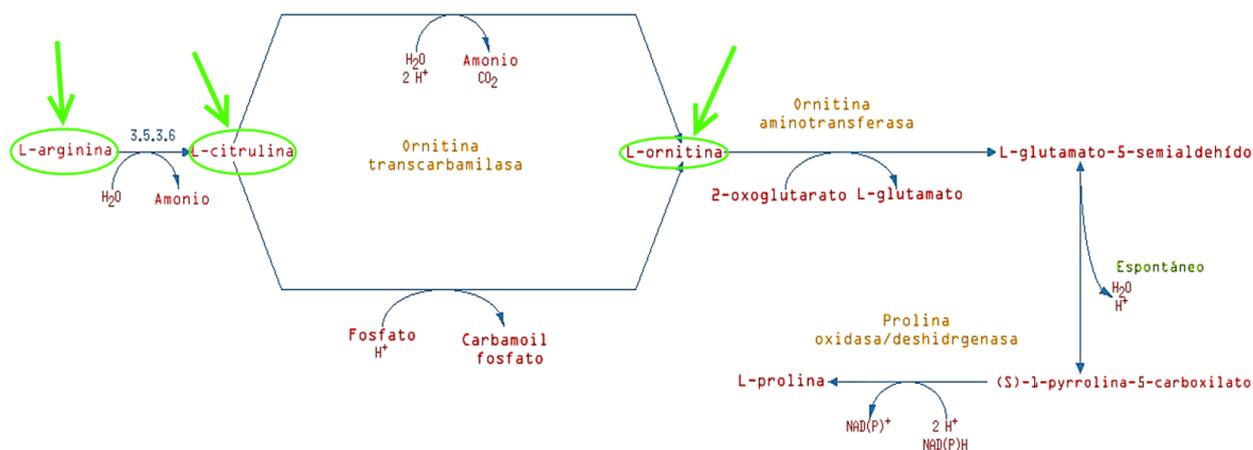


Figura 137. Ruta de producción de prolina en pimiento. Se muestra la ruta principal de producción de prolina a partir de arginina y los pasos de citrulina y ornitina en plantas de pimiento. Las líneas azules indican la ruta habitual en plantas de pimiento; las verdes indican los compuestos que se ven incrementados cuando las plantas fueron inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1.

Las fitohormonas están relacionadas con el control de procesos de crecimiento, desarrollo y floración en situaciones no estresantes (Kang *et al.*, 2002, Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013). Además, ante procesos de estrés abiótico muchas de ellas juegan papeles importantes, tanto para evitar las pérdidas de agua como para reducir el crecimiento de las plantas (evitan la aparición de raíces secundarias, de hojas y crecimiento del tallo), pudiendo sin embargo llegar a poner en riesgo en algunos casos la viabilidad de la planta a medio-largo plazo (Yang & Hoffman, 1984, Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013). Algunas de estas fitohormonas regulan la respuesta de la planta a la sequía mediante procesos de resistencia a sequía, como en el caso de las auxinas, cuya regulación radicular permite acceder a fuentes de agua poco accesibles (Gibson, 2004, Tanimoto, 2005, de Ollas *et al.*, 2013). Normalmente las fitohormonas que limitan el crecimiento son más frecuentes en las plantas que no están bien adaptadas a la sequía. Este mecanismo suele ser insuficiente para sobrevivir a sequías prolongadas; las fitohormonas que regulan la resistencia de las plantas, principalmente influyen sobre la gestión del agua y permiten un uso eficiente de la misma (Vandeleur *et al.*, 2009, Bano & Yasmeeen, 2010). Algunos microorganismos del suelo modifican las rutas de varias de estas fitohormonas para mejorar la resistencia de la planta a la falta de agua (Dimkpa *et al.*, 2009).

Como ya hemos visto en el *Capítulo 1*, *Microbacterium sp.* 3J1 es capaz de producir multitud de fitohormonas para la promoción del crecimiento de la planta, así como para la protección de estas plantas contra la sequía. A través de estudios metabolómicos hemos observado que la producción fitohormonas más relevantes en procesos de estrés abiótico se ve alterada por la presencia del inoculante bacteriano en condiciones de sequía. De entre éstas destacamos a las auxinas, cuyo precursor principal, el triptófano (figura 2), se encontró en una concentración 1,5 superior en plantas inoculadas. Además, el triptófano se identificó en una concentración 11 veces superior cuando se cultivó la cepa con PEG 50%. También se observó una alta concentración de shikimato en plantas inoculadas (casi el doble que en plantas no inoculadas), el cual es el principal precursor del ácido salicílico, potente antioxidante bajo condiciones de estrés abiótico (Fayez & Bazaid, 2014, Miura & Tada, 2014). Dicha concentración de shikimato también se detectó en el sobrenadante de cultivos de la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 con PEG 5%.

En la mayoría de estos casos, la planta acumula metabolitos que el microorganismo puede utilizar como sustratos de rutas biosintéticas de moléculas reguladoras implicadas en respuesta a estrés (Liu *et al.*, 2013, Vacheron *et al.*, 2013). En este sentido, las plantas inoculadas mostraron una alta concentración de moléculas que podrían exudar para beneficiar a los microorganismos inoculantes. Destacamos la producción de las moléculas implicadas en la producción de energía (manitol, glicerol-3-P, glicerato-3-P, fructosa-6-P, glucosa-6-P, gluconato-6-P, ribosa-5-P, xilosa, fructosa, galactosa, melibiosa, maltosa, y celobiosa entre otros) o las implicadas en la producción de metabolitos primarios del microorganismo (alanina, valina, arginina, tirosina, adenosina, o uracilo entre otros). Estas moléculas actúan como atrayentes del microorganismo y facilitan las funciones al inoculante, mejorando la velocidad de intercambio y señalización de la interacción permitiendo una retroalimentación positiva en el proceso de colonización por *Microbacterium sp.* 3J1 (Rudrappa *et al.*, 2008, Yuan *et al.*, 2015).

La producción de fitohormonas está finamente regulada por el estado fisiológico de la planta. La eficacia del sistema de señalización de la planta ante el estrés por sequía es clave cuando la sequía es prolongada (Zhu, 2002). De hecho, las plantas más tolerantes son también aquellas con sistemas de señalización a la sequía más eficaces y más rápidos (Kuromori *et al.*, 2014). En las raíces inoculadas identificamos mayor concentración de moléculas como la valina, la leucina y la adenosina, las cuales se encuentran en alta concentración en plantas tolerantes a la sequía (Manivannan *et al.*, 2008). También se

identificó una alta concentración de cis-asconitato, el cual es la isoforma de la molécula de asconitato en situaciones de estrés y que actúa como molécula de señal de las mismas; además influyen en el ciclo del citrato (Zhu, 2002). Por otra parte, la glucosa-6-fosfato se identificó en alta concentración un efecto que se ha descrito que ocurre cuando se dan aportes externos de ABA. Además hay otras moléculas, como hemos visto en el caso de los azúcares, que podrían considerarse como moléculas de señal externas para atraer y promover el crecimiento de microorganismos beneficiosos del suelo (Vacheron *et al.*, 2013). Destacamos la alta concentración detectada de ácido sinápico. El ácido sinápico se ha descrito como molécula señal para atraer microorganismos simbioses beneficiosos por parte de la planta (Mandal *et al.*, 2010).

En las raíces no inoculadas, se identificaron otras moléculas señal, la mayoría de las cuales forman parte de los sistemas de control de la homeostasis. De entre estas moléculas se identificó una concentración especialmente alta de serina y de histidina las cuales participan en la señalización del cierre de los estomas mediante regulación de CK/ABA (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013). También se identificó una alta concentración de naringenina, represor del desarrollo de raíces laterales (Lee, 2008). Además se detectó una alta concentración de ribosa, la cual regula la ruta del ABA (Puce *et al.*, 2004). Destacamos la reducción en la concentración de GABA en presencia de *Microbacterium* sp. 3J1, ya que esta molécula señal se produce inicialmente como osmolito mientras se encuentra en una concentración relativamente baja. Sin embargo en alta concentración el GABA, activa la producción de etileno, lo que ocurre cuando la sequía se prolonga en el tiempo. Un aumento en la concentración de etileno condicionado por la alta concentración de GABA desequilibra la homeostasis de la planta (Kathiresan *et al.*, 1997, Roberts, 2007, Akcay *et al.*, 2012). Destacamos en este sentido, que a través del análisis del proteoma de las plantas no inoculadas, también hemos identificado una mayor producción de la enzima gamma-aminobutírico transaminasa 3 cloroplastídica, implicada en la tolerancia básica y en la señalización de estrés abiótico (Kathiresan *et al.*, 1997, Roberts, 2007, Akcay *et al.*, 2012).

A partir del genoma de *Microbacterium* sp. 3J1, se han identificado los genes con homología con los codificantes para enzimas que participan en la biosíntesis de fitohormonas que regulan el crecimiento de la planta y la protección de la misma frente a la sequía (Manzanera *et al.*, 2015d). Hemos demostrado el correcto funcionamiento de algunas de estas rutas mediante ensayos bioquímicos, como por ejemplo para la

producción de auxinas, giberelinas, ácido salicílico, ácido abscísico o etileno. Aunque no se estudiara la producción de otras fitohormonas, también hemos encontrado en el genoma de *Microbacterium sp.* 3J1 secuencias con homología a genes que participan en la producción de estrigolactonas, citoquininas, ácido jasmónico y brasinoesteroides, las cuales también participan en la respuesta a la sequía por parte de la planta (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013, de Ollas *et al.*, 2013). Para proponer la existencia de una ruta utilizamos la información presente en la base de datos KEGG, de manera que la ruta propuesta puede presentar variaciones con respecto a la ruta real presente en el microorganismo. Pese a todo, existen en la mayoría de los casos suficientes genes identificados codificantes para enzimas involucradas en la biosíntesis de fitohormonas lo que sugiere la existencia de estas rutas. Las diferencias detectadas respecto a los genomas de las cepas *A. koreensis* 5J12A, *Rhodococcus sp.* 4J2A2, *A. siccitolerans* 4J27 y *Leucobacter sp.* 4J7B1 en dichas rutas son mínimas, hecho que concuerda con la detección de las distintas fitohormonas analizadas en el *Capítulo 1*. La producción de fitohormonas como IAA, ABA, GA₃ o SA, involucradas en la tolerancia frente a la sequía, parecía ser la responsable de los distintos niveles de protección de plantas frente a la sequía mostrada por las cepas estudiadas. Sin embargo, la cepa *P. putida* KT2440, que también las producía e incluso en mayor concentración, era muy sensible a la desecación y no protegía a las plantas modelo empleadas frente a la sequía. Esto nos llevó a pensar que, además de la producción por el microorganismo se ha de establecer una comunicación con la planta que haga efectiva esta protección. Esta comunicación, como se ha indicado anteriormente, parece estar condicionada por la producción de trehalosa, lo que condiciona tanto la supervivencia de la bacteria como la respuesta eficaz por parte de la planta (figura 138)

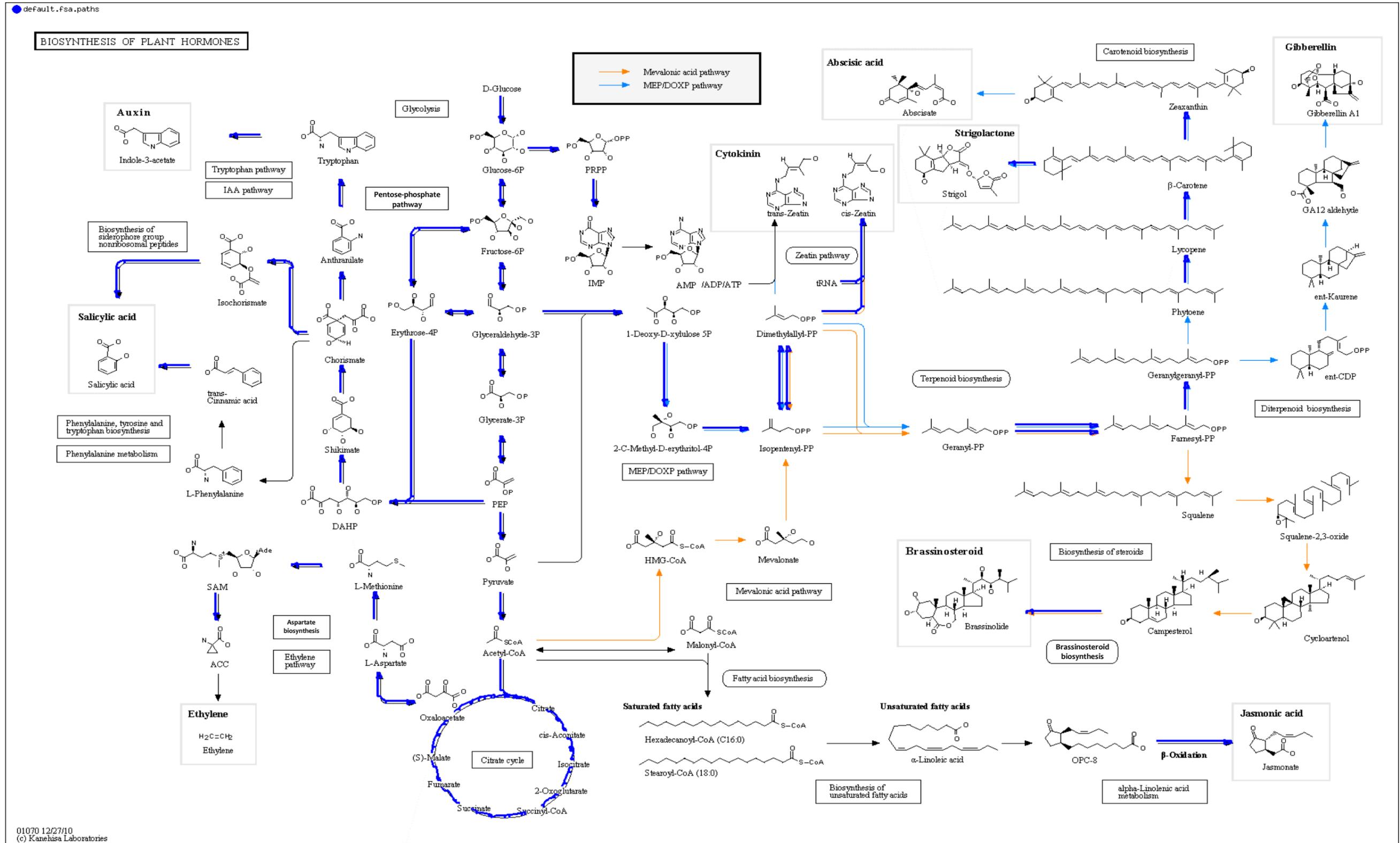


Figura 138. Rutas predichas para fitohormonas desde el genoma de *Microbacterium sp. 3J1*. Se muestra las rutas propuestas empleando la base de datos de KEGG y resaltando en azul aquellas que podrían seguirse en la biosíntesis de fitohormonas respecto a la base genética de la cepa analizada. Las líneas azul claro indican la ruta del metileritritol fosfato y las naranjas, la ruta del ácido mevalónico (rutas de conexión en la biosíntesis de fitohormonas).

La sequía también produce daños por estrés oxidativo sobre las plantas. Los agentes oxidantes provocan daños en la cadena respiratoria, alteran las rutas metabólicas, y afectan a la estabilidad del genoma, de las membranas y de los orgánulos de la planta (Mittler, 2002, Cruz de Carvalho, 2008). A través de los estudios de proteómica y metabolómica hemos encontrado en plantas no inoculadas una alta concentración de enzimas involucradas en aliviar los efectos oxidantes como la glutatión S-transferasa, varios tipos de ATPasas (tanto en cloroplastos, como en mitocondrias), o la nucleósido difosfato quinasa (Gray *et al.*, 2004, Cruz de Carvalho, 2008). La concentración de estas enzimas se reduce drásticamente en plantas inoculadas con *Microbacterium* sp. 3J1. La mayoría de estos mecanismos consiste en acumular enzimas involucrados en procesos respiratorios básicos para limitar los procesos de catálisis y de formación de radicales de oxígeno (Mittler, 2002). Por otra parte, se detectó también una alta concentración de metabolitos involucrados en la neutralización de radicales libres. Algunos de los metabolitos con mayor concentración en las plantas no inoculadas son el ácido cinámico, ácido glucurónico o el cetoglutarato, los cuales son osmoreguladores y reguladores de estructuras celulares, formando parte del metabolismo primario de la célula (Gray *et al.*, 2004).

La presencia de *Microbacterium* sp. 3J1 en plantas de pimiento, se traduce en una reducción de la concentración de moléculas antioxidantes, como las tras-chalconas, la diadzeína, la epicatequina, la apigenina, o la tirosina. Estas moléculas le permiten a la planta neutralizar las especies reactivas de oxígeno de forma más rápida (Bettaieb *et al.*, 2011). La alta concentración de la trans-chalcona, de glicerato, de ácido felúrico o de fosfoenolpiruvato en *Microbacterium* sp. 3J1 en condiciones de estrés hídrico (cultivado en presencia de PEG 50%) previene y neutraliza la actividad de reactivos oxidantes (Yildiz-Aktas *et al.*, 2009, Bettaieb *et al.*, 2011). También se identificaron dos enzimas precursoras de moléculas antioxidantes fenólicas como fueron la polifenol oxidasa y el precursor de la polifenol oxidasa cuando la planta se inoculó con *Microbacterium* sp. 3J1 en condiciones de sequía (Bettaieb *et al.*, 2011).

En las plantas no inoculadas se identificó una alta concentración quitinasas, las cuales reducen el tamaño de las estructuras celulares, así como disminuyen la tasa de división de las estructuras celulares (Cruz de Carvalho, 2008). También se identificó un aumento en la concentración de metabolitos como el ácido β -aminoisobutírico, el sinapaldehído y el ácido *p*-cumárico, todos ellos compuestos relacionados con el adelgazamiento y la

rigidez en las estructuras celulares vegetales. Este adelgazamiento o exceso de rigidez en las estructuras de sujeción, dificulta el tránsito de nutrientes y de agua y compartimentan significativamente la planta (cuanto más estanco y menor difusión, más lenta es la respuesta fisiológica de la planta), impidiendo una respuesta integrada (Bacelar *et al.*, 2006). Por el contrario, las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp. 3J1 se encuentran muchos más agentes reguladores de estructuras celulares específicos capaces de mantener la integridad de las membranas y paredes celulares incluso en condiciones de estrés hídrico. Algunos de los compuestos detectados fueron la trehalosa, el conilferil-aldehído, el ácido felúrico, el siringaldehído o el ácido glucurónico que incrementan la flexibilidad de los tallos, la permeabilidad de las paredes y membranas celulares y el crecimiento general de las plantas, facilitando intercambios de manera integral de nutrientes y agua en toda la planta (Alvarez *et al.*, 2008, Whitmore & Whalley, 2009).

Muchos de estos compuestos se identificaron también en los sobrenadantes de cultivos de *Microbacterium* sp. 3J1 con PEG 5%, tales como el ácido felúrico, el sinapaldehído, el conilferaldehído o el ácido glucurónico, lo cual supondría que a niveles bajos de estrés por sequía, ya comienzan a producirse dichos compuestos para mejorar la tolerancia. En interior de las células de *Microbacterium* sp. 3J1 cultivado con PEG 50% también se encontraron mayores concentraciones de ácido glucurónico y de conilferaldehído, con lo que dichos compuestos parecen acumularse bajo condiciones más severas de sequía para proteger estructuras y mejorar la permeabilidad celular. Así, parece que la acción del inoculante es capaz de acumular reguladores de las estructuras celulares frecuentes en la resistencia en situaciones de sequía, algo que la planta por sí sola no es capaz de producir en cantidad suficiente debido probablemente a las condiciones impuestas por dicho estrés (Gururani *et al.*, 2013, Islam *et al.*, 2014) (figura 139).

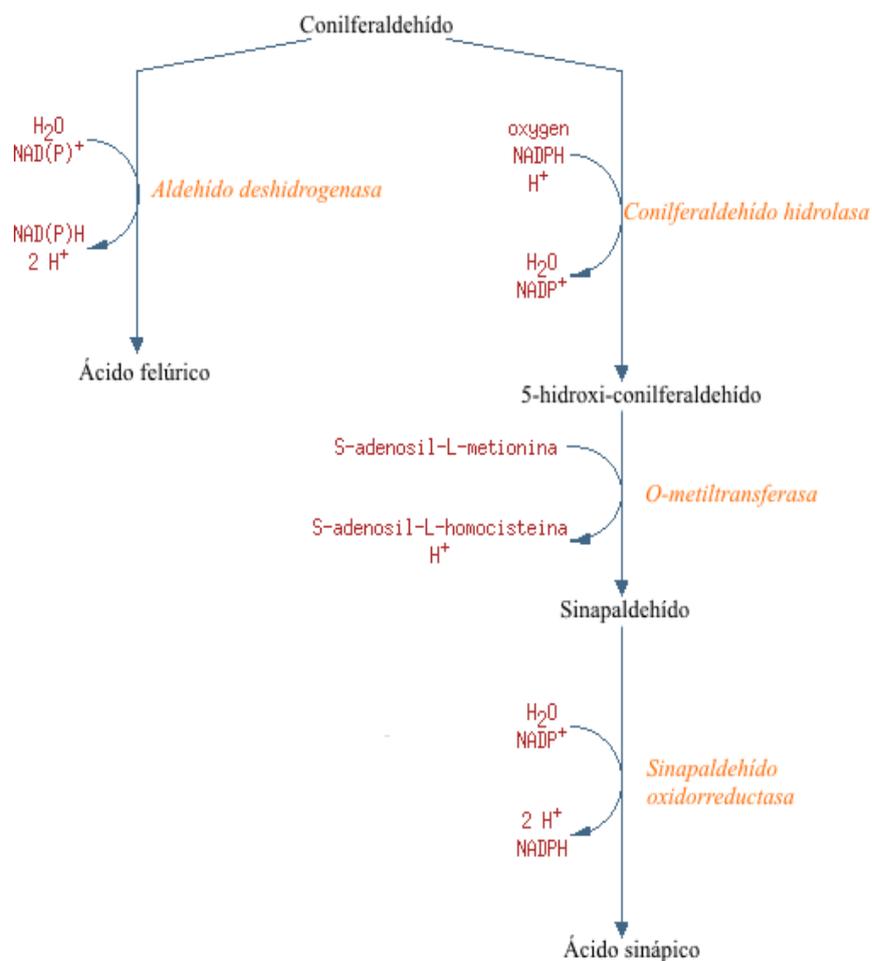


Figura 139. Ruta de los ácidos felúrico y sinápico. Se muestra la ruta propuesta de producción de ácidos que regulan estructuras celulares partiendo desde el conilferilaldehído en interacción planta-microorganismo.

Una vez caracterizada la maquinaria molecular por la que las bacterias tolerantes a la desecación protegen a las plantas contra la sequía, el paso siguiente consistió en ensayar su efecto en campo. Previo a su liberación hemos de garantizar que no causen efectos perjudiciales a los seres humanos, ni al medio ambiente, en ninguno de los distintos niveles tróficos del suelo. En la actualidad, no existe una regulación sobre las pruebas necesarias para evaluar la seguridad los microorganismos que se van a liberar de manera intencionada al medio ambiente. Así, proponemos un panel de pruebas y un sistema de evaluación para determinar el nivel de seguridad de las cepas que se van a emplear como inoculante. Este panel de pruebas se ha integrado bajo el denominativo Índice de Seguridad Ambiental y Humana (ISAH y EHSI en inglés de *Environmental and Human Safety Index*) para lograr un valor numérico de referencia sobre el posible impacto en la salud humana y en el medio ambiente causado por microorganismos que se pretenden emplear como BPCP o biofertilizante. Para validar la fuerza de este índice se compararon

los valores de ISAH con el resultado de los ensayos de patogenicidad en ratones de laboratorio. De esta forma pretendemos reducir la necesidad de utilizar modelos vertebrados para caracterizar la seguridad de los BPCP, cumpliendo con el principal objetivo de los comités bioéticos que marcan las políticas actuales y que se basan en las 3Rs (Reducir, Reemplazar y Refinar los ensayos con vertebrados) que regulan el uso de animales de investigación (Festing 2008, Smith 2001). Estas pruebas podrían así mismo ayudar a los responsables políticos a desarrollar nuevas regulaciones comunes a nivel internacional.

La naturaleza del ISAH es modular, lo que hace que sea fácil de intercambiar los ensayos que lo integran y valorar el efecto sobre organismos a ensayar en función del medio ambiente en el que se pretende liberar de forma intencionada el microorganismo en cuestión. Por ejemplo, si el ambiente muestra una especial sensibilidad de la población local de abejas, y no encontramos hábitats acuáticos en las cercanías de la zona donde se liberará el microorganismo, se puede intercambiar el ensayo en *Daphnia* por ensayos con abejas. Por lo tanto, consideramos el ISAH como una herramienta que puede adaptarse a las prioridades y las políticas locales. Además, este índice se puede utilizar para evaluar los riesgos potenciales asociados con microorganismos que podrían requerirse en el uso para otras aplicaciones biotecnológicas. Por ejemplo, dos de las cepas bacterianas empleadas como control en los ensayos, *Pseudomonas putida* KT2440 y *Burkholderia cepacia* CC-A174, han sido propuestas para procesos de biorremediación de suelos contaminados, por lo que el índice ISAH podría emplearse para valorar el impacto de la liberación intencionada de microorganismos con otras funciones distintas a las BPCP. Para validar la fuerza del ISAH se empleó una colección de cepas BPCP suministrada por la empresa Investigaciones y Aplicaciones Biotecnológicas S.L. (IAB) sita en Montcada, Valencia, así como con otros microorganismos reconocidos como patógenos. Este análisis con una mayor variedad de microorganismos, nos permite identificar la capacidad del ISAH para dar valores intermedios resultando en un sistema gradual, con el cual podemos establecer el nivel de seguridad a través de la experiencia con determinados microorganismos ya caracterizados. A través del análisis con un mayor número de cepas tanto BPCP como no BPCP mediante esta metodología, podremos refinar el modelo para las futuras aplicaciones del ISAH y evaluar la calidad de esta herramienta.

Los modelos animales, tales como *Caenorhabditis elegans*, han sido fundamentales en los estudios de interacción entre los patógenos bacterianos y organismos superiores (Ruiz-Diez *et al.*, 2003, Zachow *et al.*, 2009). Así, por ejemplo, se ha usado la función Probit para cuantificar la virulencia de bacterias patógenas tales como *Pseudomonas aeruginosa* PA14 en *C. elegans*, siendo la mortalidad, el peso y el tiempo de desarrollo de *C. elegans* variables útiles para estudiar la patogénesis en los seres humanos (Darby *et al.*, 1999, Ruiz-Diez *et al.*, 2003). De igual modo se han estudiado modelos como *E. foetida* para evaluar la ecotoxicidad de sustancias que pudieran afectar al medio (Neuhauser & Callahan, 1990). En ambos modelos, las cepas xerotolerantes mostraron siempre un efecto mínimo, indicando que no se dan efectos tóxicos ni patógenos. En este índice se contempla el efecto sobre modelos de microbiota (tanto con *Escherichia coli*, como con *Vibrio fisheri*) tanto por el contacto directo en el ensayo con *E. coli* MC4100, como por moléculas secretadas al medio en el caso del ensayo con *V. fisheri* NRRL B-11177. En ensayos como el llevado a cabo con *C. elegans*, las diferencias mínimas observadas en las cepas xerotolerante respecto a los valores típicos mostrados por la cepa control *E. coli* OP50, parece deberse a diferencias de palatabilidad o nutricionales más que a un efecto nocivo (OECD, 2004). Estos datos indican el efecto que las BPCP pueden provocar en la demografía de los organismos del suelo. El panel de pruebas contempladas en el cálculo del ISAH incluye pruebas propuestas por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) para evitar el riesgo de pérdida de biodiversidad en los suelos debido al uso de biocidas, agentes tóxicos u otros agentes nocivos (OECD, 2004). También incluye ensayos con *Adalia bipunctata* y *Chrysoperla carnea*, para analizar el efecto que causan estos microorganismos sobre depredadores primarios, que se consideran como parte del control biológico de plagas natural del medioambiente. El estudio de las cepas xerotolerantes con estos insectos indicó que no provocaban perjuicios ni a nivel de desarrollo de los insectos, ni a nivel de mortalidad de los mismos.

Por otra parte, la influencia de las secreciones de sustancias al medio por parte de las cepas xerotolerantes mostró efectos diversos. En el caso de la sensibilidad de *E. coli* MC4100, el efecto observado fue mínimo, mostrando baja carga en metabolitos tóxicos o perjudiciales secretados por las cepas xerotolerantes. Sin embargo, algunas de las cepas bacterianas tales como *Microbacterium sp.* 3J1, *Arthrobacter koreensis* 5J12A y *Arthrobacter siccitolerans* 4J27 afectaron el metabolismo de *D. magna* y *V. fisheri*. El

hecho de que su efecto sea leve en estos ensayos y de que no afecten a otros organismos en el resto de ensayos nos indica que el nivel de seguridad llegaría a ser suficiente para ser liberados de forma intencionada. Otra de las ventajas de este índice consiste en que en casos como estos microorganismos que han mostrado cierto efecto negativo en algunos de los ensayos, permiten redefinir los ensayos para calcular la concentración del microorganismo, así como de los posibles ambientes afectados, y establecer planes de seguimiento una vez liberados (Berg *et al.*, 2005, Berg, 2009). Hemos de tener en cuenta que la concentración de microorganismos utilizados en los bioensayos está muy por encima de las concentraciones a las que estos microorganismos se liberan al medio ambiente. Además tal y como hemos estudiado en el último capítulo de esta tesis, una vez liberados los microorganismos, existe un descenso de la concentración de los mismos debido a la pérdida de viabilidad de los mismos (Berg *et al.*, 2005, Berg *et al.*, 2005, Bergsma-Vlami *et al.*, 2005, Berg, 2009).

Dado que hemos establecido un valor de ISAH a partir del cual las cepas se consideren seguras, proponemos establecer el valor definido para la cepa *B. cepacia* CC-A174 que se estableció en aproximadamente la mitad del máximo valor posible de ISAH (49 para ser más precisos). Las cepas que presentan valores superiores a 49, o incluso con el valor máximo de 100 pueden producir cambios en el medio ambiente o en la salud humana, sin embargo, proponemos este índice como modelo, dado que hasta la fecha no existe ningún otro modelo que analice simultáneamente el efecto sobre todos los niveles de la cadena trófica del suelo (Bergsma-Vlami *et al.*, 2005). En la actualidad hay abierto un profundo debate de las empresas del sector con las autoridades europeas para definir las pruebas necesarias que establezcan desde el punto de vista regulatorio si una cepa se puede emplear como BCPC. Las grandes empresas multinacionales del sector apuestan por establecer una serie de pruebas con un coste económico que otras empresas medianas y pequeñas del sector no podrían asumir, lo que monopolizaría el comercio de las bacterias promotoras del crecimiento de plantas en manos de las grandes empresas. Con esta propuesta evitamos el gran coste económico de las pruebas y evitamos los ensayos sobre vertebrados tal y como se recoge en la actualidad por el marco legal de la Unión Europea. En el caso de las cepas xerotolerantes analizadas (*Microbacterium* sp. 3J1, *A. koreensis* 5J12A, *Rhodococcus* sp. 4J2A2, *A. siccitolerans* 4J27 y *Leucobacter* sp. 4J7B1) y en base a los criterios de ISAH establecidos se pueden considerar como seguras para su uso como inoculantes. Las cepas suministradas por IAB sirvieron para definir valores ISAH

intermedios para las BPCP empleadas a nivel comercial (Kriebel *et al.*, 2001, Berg, 2009, Li *et al.*, 2013).

La clasificación de cepas microbianas en función de su ISAH, evita el uso de referencias por similitud taxonómica en base al 16S. Indicamos en este sentido que la proximidad taxonómica no siempre refleja la seguridad que una cepa presente, dado que distintas cepas de una misma especie pueden ser patógenas e incluso letales, mientras que otras son completamente seguras (baste poner como ejemplo la especie bacteriana más estudiada: *E. coli*).

Pese a haber demostrado que las cepas xerotolerantes son seguras en base a los ensayos por ISAH, los resultados tanto de promoción del crecimiento como de protección contra la sequía en invernadero y en campo, fueron muy distintos de los observados en laboratorio. De este modo, la protección contra la sequía de *Microbacterium* sp. 3J1 y *A. koreensis* 5J12A, sobre el maíz empleando sustrato no estéril, fueron casi a la mitad respecto a los obtenidos en laboratorio, mientras que en ensayos de campo no se observaron diferencias estadísticamente significativas con las plantas no inoculadas.

Los ensayos realizados en invernadero y en campo se realizaron encapsulando a las cepas microbianas en formato seco en trehalosa recubierto por una envoltura de PVC (Manzanera *et al.*, 2004). Pese a que las semillas encapsuladas garantizan un mayor contacto con las plantas a inocular, un mayor tiempo en el suelo y a que reducen la dispersión del inoculante (Kloepper & Schroth, 1981, Manzanera *et al.*, 2004, Meldau *et al.*, 2012), los resultados en los cultivos inoculados tanto con *Microbacterium* sp. 3J1 como con *A. koreensis* 5J12A no mostraron los efectos deseados ni en condiciones de riego, ni bajo condiciones de sequía. Los cultivos inoculados con la cepa control de promoción del crecimiento vegetal, *P. putida* KT2440, tampoco mostraron los citados efectos. Proponemos que los diferentes resultados obtenidos en laboratorio y en campo resultan de las distintas condiciones de liberación, de la competencia y de la dispersión en sustratos naturales tal y como proponen otros autores (Liddell & Parke, 1989, Martínez-Viveros *et al.*, 2010).

En condiciones de invernadero, la temperatura, el grado de iluminación y la humedad están relativamente bien controladas. Sin embargo, los factores bióticos involucrados tanto a nivel del entorno en general, como del sustrato en particular, son escasamente controlables (Lambert & Joos, 1989, Lugtenberg *et al.*, 2001, Beneduzi *et al.*, 2012).

Tanto en condiciones de invernadero como de campo, se han descrito dificultades a la hora de aplicar cepas bacterianas como inoculantes con efectividad (Olmedo & Thuar, 2000, Jarak *et al.*, 2012). El efecto de los agentes biológicos del ambiente es uno de los factores más descritos en la pérdida de la eficiencia de un inoculante (Bashan, 1998, Benizri *et al.*, 2001, Albareda *et al.*, 2006). Los eventos de competencia, depredación y desplazamiento son comunes cuando los organismos del suelo no permiten el establecimiento y la distribución de la cepa inoculada en el conjunto de la población (Lambert & Joos, 1989, Lugtenberg *et al.*, 2001). De este modo, protozoos, amebas y nematodos, entre otros, depredan poblaciones de bacterias (Ingham *et al.*, 1985, Vargas & Hattori, 1986, Casida, 1989, Yeates *et al.*, 1993). Las cepas bacterianas productoras de antimicrobianos controlan cambios poblacionales entre los microorganismos (Bergsma-Vlami *et al.*, 2005) y el conjunto de población fúngica, bacteriana y en general la microfauna nativa, compite por los recursos nutricionales y espaciales de forma más efectiva al estar más adaptados a las condiciones del medio (Bergsma-Vlami *et al.*, 2005, Vacheron *et al.*, 2013). La dispersión por lixiviación provocada por la irrigación del terreno es capaz de diluir demasiado los inóculos, impidiendo un número mínimo que garantice un buen contacto y colonización en la planta (Liddell & Parke, 1989). Esto supone un factor de impacto sobre la interacción muy importante, especialmente cuando se emplean cepas endofíticas o formadoras de biopelículas persistentes (Benizri *et al.*, 2001, Bianciotto *et al.*, 2001, Albareda *et al.*, 2006).

Por último, la existencia en el medio de biocidas (fungicidas, bacteriocidas, fitocidas, antihelmínticos, etc.) y de otros productos fitosanitarios usados en agricultura, también afectan directamente a las cepas inoculantes (Schippers *et al.*, 1987, Ahemad & Khan, 2011). En el caso de los biocidas, se ha comprobado que muchos de ellos son tóxicos para cepas inoculantes, reduciendo su presencia en el medio o incluso el nivel de nodulación en plantas en su caso (Aggarwal *et al.*, 1986).

Para aumentar la eficacia del inoculante proponemos adaptar la formulación del mismo para aumentar su eficacia, permitiendo una liberación progresiva (Hale *et al.*, 1979, Smith, 1995, Fernandes Junior *et al.*, 2009). De igual modo, proponemos un aumento de la persistencia del inoculante en el suelo para evitar su dilución y dispersión por lixiviación (Liddell & Parke, 1989, Stephens & Rask, 2000, Xavier *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2010, Power *et al.*, 2011). Por último, el agente portador (*carrier* en inglés) debe de poder aplicarse de manera sencilla y económicamente viable (Nelson, 2004, Xavier *et al.*,

2004). Así, se eligió una formulación semisólida en base de alginato de sodio debido a los buenos resultados y por sus características mecánicas y estructurales. A esta formulación se le añadió leche desnatada en polvo como reconstituyente y trehalosa para mejorar la resistencia de las cepas. Esta formulación es biodegradable y no contiene sustancias tóxicas para el medio ambiente (Stephens & Rask, 2000, Nelson, 2004). Para definir la concentración de alginato de sodio adecuada y del resto de compuestos de la formulación, hubo que evaluar el tipo de contacto establecido, el tiempo mínimo de colonización, el tipo de interacción que se lleva a cabo (externa o interna), la formación de estructuras especializadas, el tiempo de persistencia en el medio, el tiempo de persistencia en la planta y la capacidad de multiplicación de la cepa (Burdman *et al.*, 2000, Benizri *et al.*, 2001, Bianciotto *et al.*, 2001, Albareda *et al.*, 2006, Martínez-Viveros *et al.*, 2010).

La cepa inoculante *Microbacterium sp.* 3J1 establece una primera fase de contacto con la planta que parece ser inespecífica, por lo que parece requerir de una alta concentración de células en torno a la raíz al inicio de la inoculación. Tras aglutinarse las células en torno a los lugares específicos de contacto forma biopelículas, lo que le permite formar núcleos de células numerosos en torno a la raíz, mecanismo común tanto entre las cepas epifíticas como endófitas (Burdman *et al.*, 2000, Bianciotto *et al.*, 2001, Rudrappa *et al.*, 2008, Seneviratne *et al.*, 2011, Yuan *et al.*, 2015). Tras esta fase, la cepa comienza a establecerse bajo la epidermis radicular en gran número y, posteriormente, en torno al floema de la misma. Esta zona es especialmente importante para los intercambios de compuestos derivados de este tipo de interacciones, sobre todo en condiciones de estrés abiótico, ya que proporciona un contacto más rápido y fluido, así como una respuesta más eficaz de la interacción (Jiang *et al.*, 2012, Vacheron *et al.*, 2013). Este tipo de contacto e interacción requiere del mantenimiento de una concentración alta de células alrededor de las raíces, con lo que propusimos una concentración de alginato de sodio del 4% que permite una liberación amplia de células durante un mayor tiempo (Kostov *et al.*, 2010, Seneviratne *et al.*, 2011, Yuan *et al.*, 2015). Esta nueva formulación se ensayó comparándose con la formulación en formato líquido en suelo natural, mostrando que era capaz de mantener los parámetros fisiológicos de la planta (peso fresco, peso seco, peso totalmente túrgido, contenido relativo de agua) obtenidos en condiciones controladas de laboratorio.

Para identificar la causa de la mejora de la formulación mediante esferas de alginato se siguió la supervivencia de la cepa en el tiempo mediante qPCR para comparar la formulación en líquido con la formulación en alginato ya que esta supervivencia determina la eficacia del inoculante (Lugtenberg & Kamilova, 2009, Martínez-Viveros *et al.*, 2010). También se determinó la supervivencia en suelo y en combinación con la planta para estimar los ciclos de reinoculación que fuesen necesarios (Sessitsch *et al.*, 2013). La presencia de la cepa *Microbacterium sp.* 3J1, cuando se empleó formulación líquida tanto en suelo, como en las plantas, fue indetectable a partir de las dos semanas tras la inoculación, en coincidencia con la duración del efecto del inóculo sobre las plantas. Cuando *Microbacterium sp.* 3J1 se inoculó con el formato de alginato, se detectó al microorganismo hasta 4 semanas tanto en suelo, como en la planta. En cultivos como la soja, el arroz y el maíz tratados con BCPC con alginato se incluyen ciclos adicionales de reinoculación durante los periodos críticos del crecimiento de la planta, como son el desarrollo primario, la floración o la maduración de los frutos, mejorando la productividad del cultivo (Reddy, 2012, Sessitsch *et al.*, 2013, Chibeba *et al.*, 2015).

La formulación óptima del inoculante mejora la viabilidad económica del producto (Stephens & Rask, 2000, Fernandes Junior *et al.*, 2009, Kalaiarasi & Dinakar, 2015). La nueva formulación en base a alginato permite cubrir las células y mantenerlas viables más tiempo lo que favorece el establecimiento de la cepa (Nelson, 2004, Xavier *et al.*, 2004).

Por lo tanto, la mejora en la formulación de este inoculante dependerá del uso concreto que se le quiera dar a la cepa.

CONCLUSIONS

According to the studies carried out and data analyzed throughout this thesis, as well as the literature review performed, the following conclusions were obtained:

1. Desiccation tolerant Plant Growth-Promoting Rhizobacteria *Microbacterium* sp. 3J1, *Arthrobacter koreensis* 5J12A and *Rhodococcus* sp. 4J2A2 protect model plants from drought. The level of protection of the plant is correlated with the survival rate of the microorganisms against desiccation. And both the degree of desiccation tolerance of the microorganism and the drought protection generated over the plant are correlated with the ability of the microorganism to produce trehalose.
2. The molecular mechanisms developed by *Microbacterium* sp. 3J1 to protect pepper plants from drought consists in the production of a specific response, and the silencing of the non-specific response of the plant to desiccation. The specific response includes the production of non-reducing sugars, phyto-hormones, specific Reactive Oxygen Species scavengers, and of specific enzymes. The repression of the non-specific response includes the repression of enzymes involved in ethylene biosynthesis, non-specific stress signaling molecules and the repression of non-specific oxidants scavenger.
3. The xeroprotection of pepper plants by *Microbacterium* sp. 3J1 occurs in a symbiotic manner where the plant produces intermediates, that the bacteria transforms in active compounds for the plant, such as the production of mannitol by the plant, that is converted in trehalose by the microorganism.
4. *Microbacterium* sp. 3J1 responds differently to mild or severe drought, with a quick response that includes the release of xeroprotectors to the environment under mild drought, and a slow response that includes production of more specialized molecules and the accumulation of the xeroprotectors under severe drought.

5. A modular evaluation system based on the performance of a panel of assays on model organisms corresponding to all trophic levels of the soil food chain can allow the assessment of the environmental impact of Plant-Growth Promoting Rhizobacteria as well as their impact on human health. The evaluation system named Environmental and Human Safety Index (EHSI) reproduces the results on murine models.
6. The xeroprotection of crops under greenhouse conditions and field trials with *Microbacterium sp.* 3J1 or *Arthrobacter koreensis* 5J12A does not reflect the results under laboratory conditions when the inoculating format is used as liquid or plastic coating.
7. The strain *Microbacterium sp.* 3J1 is an endophytic bacterium capable of colonizing the plant through specific contact areas of the root by the production of biofilms. Upon establishing contact with the plant, this strain has been detected both in interface areas between the walls of plant epithelial cells, and in phloem surrounding areas.
8. The formulation of inoculant *Microbacterium sp.* 3J1 based on alginate (4% w/v) was equally effective in natural soil that the liquid formulation in sterilized substrates.

BIBLIOGRAFÍA

Referencias bibliográficas

- Abril MA, Michan C, Timmis KN & Ramos JL (1989) Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *Journal of bacteriology* **171**: 6782-6790.
- Abd El-Fattah DA, Eweda WE, Zayed MS & Hassanein MK (2013) Effect of carrier materials, sterilization method, and storage temperature on survival and biological activities of *Azotobacter chroococcum* inoculant. *Annals of Agricultural Sciences* **58**: 111-118.
- Achnine L, Blancaflor EB, Rasmussen S & Dixon RA (2004) Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **16**: 3098-3109.
- Acosta-Martínez V, Dowd S, Sun Y & Allen V (2008) Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 2762-2770.
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods in enzymology* **105**: 121-126.
- Aggarwal TC, Narula N & Gupta KG (1986) Effect of some carbamate pesticides on nodulation, plant yield and nitrogen fixation by *Pisum sativum* and *Vigna sinensis* in the presence of their respective rhizobia. *Plant and Soil* **94**: 125-132.
- Ahemad M & Khan MS (2011) Effects of insecticides on plant-growth-promoting activities of phosphate solubilizing rhizobacterium *Klebsiella sp.* strain PS19. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **100**: 51-56.
- Ahemad M & Kibret M (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science* **26**: 1-20.
- Akçay N, Bor M, Karabudak T, Özdemir F & Turkan I (2012) Contribution of Gamma amino butyric acid (GABA) to salt stress responses of *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant and wild type plants. *J Plant Physiol* **169**: 452-458.
- Akter N, Rafiqul Islam M, Abdul Karim M & Hossain T (2014) Alleviation of drought stress in maize by exogenous application of gibberellic acid and cytokinin. *J Crop Sci Biotechnol* **17**: 41-48.
- Albareda M, Dardanelli MS, Sousa C, Megias M, Temprano F & Rodríguez-Navarro DN (2006) Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. *FEMS Microbiol Lett* **259**: 67-73.

- Alvarez S, Marsh EL, Schroeder SG & Schachtman DP (2008) Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. *Plant, cell & environment* **31**: 325-340.
- Alvarez-Alfageme F, Bigler F & Romeis J (2011) Laboratory toxicity studies demonstrate no adverse effects of Cry1Ab and Cry3Bb1 to larvae of *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae): the importance of study design. *Transgenic research* **20**: 467-479.
- Alvino A, Centritto M & Lorenzi F (1994) Photosynthesis response of sunlit and shade pepper (*Capsicum annuum*) leaves at different positions in the canopy under two water regimes. *Functional Plant Biology* **21**: 377-391.
- Anastassiadis S & Morgunov IG (2007) Gluconic acid production. *Recent patents on biotechnology* **1**: 167-180.
- Andow DA & Zwahlen C (2006) Assessing environmental risks of transgenic plants. *Ecology Letters* **9**: 196-214.
- Arbona V, Manzi M, de Ollas C & Gómez-Cadenas A (2013) Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 4885-4911.
- Antoun H & Kloepper JW (2001) Plant growth promoting rhizobacteria. (Brenner SaM, J.H., ed.). 1477-1480. Academic, New York.
- Ashraf M (2010) Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. *Biotechnology Advances* **28**: 169-183.
- Avonce N, Mendoza-Vargas A, Morett E & Iturriaga G (2006) Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evol Biol* **6**: 109.
- Babalola O (2010) Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett* **32**: 1559-1570.
- Bacelar EA, Santos DL, Moutinho-Pereira JM, Gonçalves BC, Ferreira HF & Correia CM (2006) Immediate responses and adaptative strategies of three olive cultivars under contrasting water availability regimes: Changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage. *Plant Science* **170**: 596-605.
- Bae H, Herman E, Bailey B, Bae H-J & Sicher R (2005) Exogenous trehalose alters *Arabidopsis* transcripts involved in cell wall modification, abiotic stress, nitrogen metabolism, and plant defense. *Physiologia plantarum* **125**: 114-126.
- Bakker PAHM, Berendsen RL, Doornbos RF, Wintermans PCA & Pieterse CMJ (2013) The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Frontiers in Plant Science* **4**: 165.

- Bano N & Musarrat J (2003) Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. *Current microbiology* **46**: 324-328.
- Bano A & Yasmeen S (2010) Role of phytohormones under induced drought stress in wheat. *Pakistan Journal of Botany* **42**: 2579-2587.
- Baldwin A, Sokol PA, Parkhill J & Mahenthalingam E (2004) The *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker is part of a novel genomic island encoding both virulence and metabolism-associated genes in *Burkholderia cenocepacia*. *Infection and immunity* **72**: 1537-1547.
- Barsch A, Patschkowski T & Niehaus K (2004) Comprehensive metabolite profiling of *Sinorhizobium meliloti* using gas chromatography-mass spectrometry. *Functional & integrative genomics* **4**: 219-230.
- Bashan Y (1986) Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Applied and Environmental Microbiology* **51**: 1089-1098.
- Bashan Y (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances* **16**: 729-770.
- Bashan Y & de-Bashan LE (2005) Fresh-weight measurements of roots provide inaccurate estimates of the effects of plant growth-promoting bacteria on root growth: a critical examination. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 1795-1804.
- Bashan Y & de-Bashan LE (2010) How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - A critical assesment. *Advances in Agronomy, Vol 108*, Vol. 108 (Sparks DL, ed.) 77-136.
- Bashan Y, de-Bashan L, Prabhu SR & Hernandez J-P (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil* **378**: 1-33.
- Beauchamp C & Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry* **44**: 276-287.
- Beers RF, Jr. & Sizer IW (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* **195**: 133-140.
- Bedell MA, Jenkins NA & Copeland NG (1997) Mouse models of human disease. Part I: techniques and resources for genetic analysis in mice. *Genes & development* **11**: 1-10.

- Beier C, Emmett B, Gundersen P, *et al.* (2004) Novel approaches to study climate change effects on terrestrial ecosystems in the field: Drought and passive nighttime warming. *Ecosystems* **7**: 583-597.
- Belimov A, Dodd I, Safronova V, Hontzeas N & Davies W (2007) *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1485-1495.
- Beneduzi A, Ambrosini A & Passaglia LMP (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology* **35**: 1044-1051.
- Benešová M, Holá D, Fischer L, *et al.* (2012) The physiology and proteomics of drought tolerance in maize: early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration? *PLoS ONE* **7**: e38017.
- Benizri E, Baudoin E & Guckert A (2001) Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology* **11**: 557-574.
- Berg G (2009) Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* **84**: 11-18.
- Berg G, Eberl L & Hartmann A (2005) The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology* **7**: 1673-1685.
- Berg G, Zachow C, Lottmann J, Götz M, Costa R & Smalla K (2005) Impact of plant species and site on rhizosphere-associated fungi antagonistic to *Verticillium dahliae* Kleb. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 4203-4213.
- Bergey DH & Holt JG (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Bergsma-Vlami M, Prins ME, Raaijmakers JM. 2005. Influence of plant species on population dynamics, genotypic diversity and antibiotic production in the rhizosphere by indigenous *Pseudomonas spp.* *FEMS Microbiol Ecol* **52**:59-69.
- Berkelman T (2008) Quantitation of protein in samples prepared for 2-D electrophoresis. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **424**: 43-49.
- Bettaieb I, Hamrouni-Sellami I, Bourgou S, Limam F & Marzouk B (2011) Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. *Acta Physiol Plant* **33**: 1103-1111.

- Bianciotto V, Andreotti S, Balestrini R, Bonfante P & Perotto S (2001) Extracellular polysaccharides are involved in the attachment of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* to arbuscular mycorrhizal structures. *European journal of histochemistry: EJH* **45**: 39-49.
- Bianco C & Defez R (2009) *Medicago truncatula* improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing *Sinorhizobium meliloti* strain. *Journal of Experimental Botany* **60**: 3097-3107.
- Bohlool BB & Schmidt EL (1973) Persistence and competition aspects of *Rhizobium japonicum* observed in soil by immunofluorescence microscopy. *Soil Science Society of America Journal* **37**: 561-564.
- Bohnert HJ, Nelson DE & Jensen RG (1995) Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* **7**: 1099-1111.
- Bonfante P & Anca I-A (2009) Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: A network of interactions. *Annual Review of Microbiology* **63**: 363-383.
- Boyer JS & Meyer RF (1980) Osmoregulation in plants during drought. *Genetic Engineering of Osmoregulation*, Vol. 14 (Rains DW, Valentine RC & Hollaender A, eds.), 199-202. Springer US.
- Braker G, Schwarz J & Conrad R (2010) Influence of temperature on the composition and activity of denitrifying soil communities. *FEMS Microbiol Ecol* **73**: 134-148.
- Bresson J, Varoquaux F, Bontpart T, Touraine B & Vile D (2013) The PGPR strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 induces a reproductive delay and physiological changes that result in improved drought tolerance in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **200**: 558-569.
- Buchholz TS, Volk TA & Luzadis VA (2007) A participatory systems approach to modeling social, economic, and ecological components of bioenergy. *Energy Policy* **35**: 6084-6094.
- Burdman S, Okon Y & Jurkevitch E (2000) Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Crit Rev Microbiol* **26**: 91-110.
- Buysens S, Heungens K, Poppe J & Hofte M (1996) Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of pythium-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 865-871.

- Çakmakçı R, Dönmez F, Aydın A & Şahin F (2006) Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 1482-1487.
- Casida LE (1989) Protozoan response to the addition of bacterial predators and other bacteria to soil. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 1857-1859.
- Cassán F, Maiale S, Masciarelli O, Vidal A, Luna V & Ruiz O (2009) Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *European Journal of Soil Biology* **45**: 12-19.
- Chakraborty U, Chakraborty BN, Basnet M & Chakraborty AP (2009) Evaluation of *Ochrobactrum anthropi* TRS-2 and its talc based formulation for enhancement of growth of tea plants and management of brown root rot disease. *Journal of applied microbiology* **107**: 625-634.
- Chaves MM, Flexas J & Pinheiro C (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* **103**: 551-560.
- Chen M & Alexander M (1973) Survival of soil bacteria during prolonged desiccation. *Soil Biology and Biochemistry* **5**: 213-221.
- Chennappa G, Adkar-Purushothama CR, Naik MK, Suraj U & Sreenivasa MY (2014) Impact of pesticides on PGPR activity of *Azotobacter sp.* isolated from pesticide flooded paddy soils *Greener Journal of Agricultural Sciences* **4**: 117-129.
- Chibeba AM, Guimaraes MF, Rodríguez-Brito O, Nogueira MA, Silva-Araujo R & Hungría M (2015) Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. *American Journal of Plant Sciences* **6**: 1641-1649.
- Ciais P, Reichstein M, Viovy N, *et al.* (2005) Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature* **437**: 529-533.
- Coats VC & Rumpho ME (2014) The rhizosphere microbiota of plant invaders: an overview of recent advances in the microbiomics of invasive plants. *Frontiers in Microbiology* **5**: 368.
- Coenye T & Vandamme P (2003) Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol* **5**: 719-729.
- Compant S, Kaplan H, Sessitsch A, Nowak J, Ait Barka E & Clement C (2008) Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS Microbiol Ecol* **63**: 84-93.

- Couillerot O, Bouffaud M-L, Baudoin E, Muller D, Caballero-Mellado J & Moënné-Cruz de Carvalho MH (2008) Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior* **3**: 156-165.
- Couillerot O, Bouffaud M-L, Baudoin E, Muller D, Caballero-Mellado J & Moënné-Loccoz Y (2010) Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings. *Soil Biology and Biochemistry* **42**: 2298-2305.
- Cruz de Carvalho MH (2008) Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior* **3**: 156-165.
- Dao TTH, Linthorst HJM & Verpoorte R (2011) Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry Reviews* **10**: 397-412.
- Darby C, Cosma CL, Thomas JH & Manoil C (1999) Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 15202-15207.
- Daszkowska-Golec A & Szarejko I (2013) Open or close the gate – Stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Frontiers in Plant Science* **4**: 138.
- De Leij F, Sutton EJ, Whipps JM, Fenlon JS & Lynch JM (1995) impact of field release of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* on indigenous microbial populations of wheat. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 3443-3453.
- DeLucca IAJ, Connick Jr WJ, Fravel DR, Lewis JA & Bland JM (1990) The use of bacterial alginates to prepare biocontrol formulations. *Journal of Industrial Microbiology* **6**: 129-134.
- De Meyer G & Hofte M (1997) Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology* **87**: 588-593.
- De Ollas C, Hernando B, Arbona V & Gomez-Cadenas A (2013) Jasmonic acid transient accumulation is needed for abscisic acid increase in citrus roots under drought stress conditions. *Physiologia plantarum* **147**: 296-306.
- De Smet KA, Weston A, Brown IN, Young DB & Robertson BD (2000) Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria. *Microbiology* **146** (Pt 1): 199-208.
- Delfine S, Loreto F & Alvino A (2001) Drought-stress effects on physiology, growth and biomass production of rainfed and irrigated bell pepper plants in the mediterranean region. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **126**: 297-304.

- Deutch CE & Perera GS (1992) Myceloid cell formation in *Arthrobacter globiformis* during osmotic stress. *The Journal of applied bacteriology* **72**: 493-499.
- Dimkpa C, Weinand T & Asch F (2009) Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, cell & environment* **32**: 1682-1694.
- Dyke GV & Shelley CF (1976) Serial designs balanced for effects of neighbors on both sides. *Journal of Agricultural Science* **87**: 303-305.
- Egamberdieva D, Kamilova F, Validov S, Gafurova L, Kucharova Z & Lugtenberg B (2008) High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environmental microbiology* **10**: 1-9.
- Ellis WR, Ham GE & Schmidt EL (1984) Persistence and recovery of *Rhizobium japonicum* inoculum in a field soil. *Agronomy Journal* **76**: 573-576.
- Espinosa-Urgel M, Salido A & Ramos J-L (2000) Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *Journal of bacteriology* **182**: 2363-2369.
- Fadel N, Shamel M & Zain M (2013) Mechanical stability of Ca-alginate beads as support for yeast cell. *EURECA* **1**: 101-102.
- Fahad S, Hussain S, Bano A, *et al.* (2015) Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. *Environmental science and pollution research international* **22**: 4907-4921.
- Fayez KA & Bazaid SA (2014) Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* **13**: 45-55.
- Fernandes Junior PI, Rohr TG, de Oliveira PJ, Xavier GR & Rumjanek NG (2009) Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **44**: 1184-1190.
- Fernando WGD, Nakkeeran S & Zhang Y (2006) Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, (Siddiqui Z, ed.) 67-109. Springer Netherlands.
- Fiehn O, Kopka J, Dormann P, Altmann T, Trethewey RN & Willmitzer L (2000) Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature biotechnology* **18**: 1157-1161.
- Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R & Jackson RB (2005) Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 4117-4120.

- Fraire-Velázquez S & Balderas-Hernández VE (2013) *Abiotic Stress in Plants and Metabolic Responses* in *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture*, book edited by Kouros Vahdati and Charles Leslie.
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K & Shinozaki K (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 436-442.
- Garcia AH (2011) Anhydrobiosis in bacteria: from physiology to applications. *Journal of biosciences* **36**: 939-950.
- Gaudin ACM, Henry A, Sparks AH & Slamet-Loedin IH (2013) Taking transgenic rice drought screening to the field. *Journal of Experimental Botany* **64**: 109-117.
- Gibson SI (2004) Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *Journal of Experimental Botany* **55**: 253-264.
- Gill SS & Tuteja N (2010) Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signaling & Behavior* **5**: 26-33.
- Gleick PH (1993) Water and conflict: Fresh water resources and international security. *International Security* **18**: 79-112.
- Glick BR (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **41**: 109-117.
- Glick BR, Karaturovic DM & Newell PC (1995) a novel procedure for rapid isolation of plant-growth promoting Pseudomonads. *Canadian Journal of Microbiology* **41**: 533-536.
- Gómez LD, Gilday A, Feil R, Lunn JE & Graham IA (2010) AtTPS1-mediated trehalose 6-phosphate synthesis is essential for embryogenic and vegetative growth and responsiveness to ABA in germinating seeds and stomatal guard cells. *The Plant Journal* **64**: 1-13.
- Graber E, Meller Harel Y, Kolton M, Cytryn E, Silber A, Rav David D, Tsechansky L, Borenshtein M & Elad Y (2010) Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media. *Plant and Soil* **337**: 481-496.
- Gray GR, Maxwell DP, Villarimo AR & McIntosh L (2004) Mitochondria/nuclear signaling of alternative oxidase gene expression occurs through distinct pathways involving organic acids and reactive oxygen species. *Plant Cell Rep* **23**: 497-503.
- Gray E & Smith D (2004) Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology & Biochemistry* **37**: 395.

Gray WM (2004) Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biology* **2**: e311.

Grayson M (2013) Agriculture and drought. *Nature* **501**: S1-S1.

Grichko VP & Glick BR (2001) Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**: 11-17.

Groom MJ, Gray EM & Townsend PA (2008) Biofuels and biodiversity: Principles for creating better policies for biofuel production. *Conservation Biology* **22**: 602-609.

Guicherd P, Peltier JP, Gout E, Bligny R & Marigo G (1997) Osmotic adjustment in *Fraxinus excelsior* L.: malate and mannitol accumulation in leaves under drought conditions. *Trees* **11**: 155-161.

Gururani M, Upadhyaya C, Baskar V, Venkatesh J, Nookaraju A & Park S (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in solanum tuberosum through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *J Plant Growth Regul* **32**: 245-258.

Hale CN, Lowther WL & Lloyd JM (1979) Effect of inoculant formulation on survival of *Rhizobium trifolii* and the establishment of oversown white clover (*Trifolium repens*). *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* **7**: 311-314.

Hall MA & Cook VM (2007) For producing a corn plant produced by crossing a corn plant of variety I294213 with itself or with another corn plant, greater yield, better stalks, better roots, resistance to insecticides, herbicides, pests, and disease, tolerance to heat and drought, reduced time to crop maturity. *Google Patents*.

Hasan HAH (2002) Gibberellin and auxin production by plant root-fungus and their biosynthesis: Enzymes, genes and their regulation. *Plant Physiology* **119**: 101-106.

Henry S, Baudoin E, Lopez-Gutierrez JC, Martin-Laurent F, Brauman A & Philippot L (2004) Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *Journal of microbiological methods* **59**: 327-335.

Hernando MD, Ejerhoon M, Fernandez-Alba AR & Chisti Y (2003) Combined toxicity effects of MTBE and pesticides measured with *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* bioassays. *Water research* **37**: 4091-4098.

Hider RC & Kong X (2009) Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports* **27**: 637-657.

- Hilton HW (1966) The effects of plant-growth substances on carbohydrate systems. *Adv Carbohydr Chem Biochem* **21**: 377-430.
- Hoddinott J & Kinsey B (2001) Child growth in the time of drought. *Oxford Bulletin of Economics and Statistics* **63**: 409-436.
- Hultgren RP, Hudson RJ & Sims GK (2002) Effects of soil pH and soil water content on prosulfuron dissipation. *J Agric Food Chem* **50**: 3236-3243.
- Hussain S, Siddique T, Saleem M, Arshad M & Khalid A (2009) Chapter 5. Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions. *Advances in Agronomy*, Vol. Volume 102, 159-200. Academic Press.
- Ibekwe AM, Kennedy AC, Frohne PS, Papiernik SK, Yang CH & Crowley DE (2002) Microbial diversity along a transect of agronomic zones. *FEMS Microbiol Ecol* **39**: 183-191.
- Ilhan S, Ozdemir F & Bor M (2015) Contribution of trehalose biosynthetic pathway to drought stress tolerance of *Capparis ovata* Desf. *Plant Biology* **17**: 402-407.
- Ingham RE, Trofymow JA, Ingham ER & Coleman DC (1985) interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers: Effects on nutrient cycling and plant growth. *Ecological Monographs* **55**: 119-140.
- Islam F, Yasmeen T, Ali Q, Ali S, Arif MS, Hussain S & Rizvi H (2014) Influence of *Pseudomonas aeruginosa* as PGPR on oxidative stress tolerance in wheat under Zn stress. *Ecotoxicology and environmental safety* **104**: 285-293.
- ISO-6341 (2012) Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test. International Organization for Standardization, London, UK.
- Iturriaga G, Suárez R & Nova-Franco B (2009) Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *International Journal of Molecular Sciences* **10**: 3793-3810.
- Jarak M, Mrkovački N, Bjelić D, Jošić D, Hajnal-Jafari T & Stamenov D (2012) Effects of plant growth promoting rhizobacteria on maize in greenhouse and field trial. *African Journal of Microbiology Research* **6**: 5683-5690.
- Jiang F, Chen L, Belimov AA, Shaposhnikov AI, Gong F, Meng X, Hartung W, Jeschke DW, Davies WJ & Dodd IC (2012) Multiple impacts of the plant growth-promoting rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2 on nutrient and ABA relations of *Pisum sativum*. *J Exp Bot* **63**: 6421-6430.
- Jing M, Ma H, Li H, Guo B, Zhang X, Ye W, Wang H, Wang Q & Wang Y (2015) Differential regulation of defense-related proteins in soybean during compatible and

incompatible interactions between *Phytophthora sojae* and soybean by comparative proteomic analysis. *Plant Cell Rep.* **34**: 1263-1280.

Joe MM, Karthikeyan B, Chauhan PS, Shagol C, Islam MR, Deiveekasundaram M & Sa T (2012) Survival of *Azospirillum brasilense* flocculated cells in alginate and its inoculation effect on growth and yield of maize under water deficit conditions. *European Journal of Soil Biology* **50**: 198-206.

Jogaiah S, Govind SR & Tran LS (2013) Systems biology-based approaches toward understanding drought tolerance in food crops. *Critical reviews in biotechnology* **33**: 23-39.

Jones M, Woodward R & Stoller J (2015) Increasing precision in agronomic field trials using latin square designs. *Agronomy Journal* **107**: 20-24.

Julca I, Alaminos M, Gonzalez-Lopez J & Manzanera M (2012) Xeroprotectants for the stabilization of biomaterials. *Biotechnol Adv* **30**: 1641-1654.

Kalaiarasi R & Dinakar S (2015) Bioflocs: A novel bioformulation of PGPR cells with higher degree of stress tolerance. *International Journal of Applied Research* **1**: 489-493.

Kandasamy S, Loganathan K, Muthuraj R, Duraisamy S, Seetharaman S, Thiruvengadam R, Ponnusamy B & Ramasamy S (2009) Understanding the molecular basis of plant growth promotional effect of *Pseudomonas fluorescens* on rice through protein profiling. *Proteome Science* **7**: 47-47.

Kang J-y, Choi H-i, Im M-y & Kim SY (2002) Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *The Plant Cell* **14**: 343-357.

Kang S, Post W, Wang D, Nichols J, Bandaru V & West T (2013) Hierarchical marginal land assessment for land use planning. *Land Use Policy* **30**: 106-113.

Kang S-M, Radhakrishnan R, Khan AL, Kim M-J, Park J-M, Kim B-R, Shin D-H & Lee I-J (2014) Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* **84**: 115-124.

Karadeniz A, Topcuoğlu ŞF & İnan S (2006) Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* **22**: 1061-1064.

Kardol P, Cornips NJ, van Kempen MML, Bakx-Schotman JMT & van der Putten WH (2007) Microbe-mediated plant–soil feedback causes historical contingency effects in plant community assembly. *Ecological Monographs* **77**: 147-162.

Karp A & Shield I (2008) Bioenergy from plants and the sustainable yield challenge. *New Phytologist* **179**: 15-32.

- Kathiresan A, Tung P, Chinnappa CC & Reid DM (1997) Gamma-aminobutyric acid stimulates ethylene biosynthesis in sunflower. *Plant Physiol* **115**: 129-135.
- Kaur H, Shaker K, Heinzl N, Ralph J, Galis I & Baldwin IT (2012) Environmental stresses of field growth allow cinnamyl alcohol dehydrogenase-deficient *Nicotiana attenuata* plants to compensate for their structural deficiencies. *Plant Physiol* **159**: 1545-1570.
- Kende H (1989) Enzymes of ethylene biosynthesis. *Plant Physiology* **91**: 1-4.
- Kende H (1993) Ethylene biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol* **44**: 283-307.
- Kende H & Zeevaart J (1997) The five "classical" plant hormones. *The plant cell* **9**: 197.
- Kennedy AC (1999) Chapter 17: The rhizosphere and spermosphere. (Sylvi DM, ed.) 389-404. Prentice Hall, New Jersey.
- Kennedy IR (2011) Importance of biofilm formation in plant growth promoting rhizobacterial action. *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, Vol. 18 (Maheshwari DK, ed.), 81-95. Springer Berlin Heidelberg.
- Khan MS, Zaidi A & Aamil M (2002) Biocontrol of fungal pathogens by the use of plant growth promoting rhizobacteria and nitrogen fixing microorganisms. *Ind J Bot Soc* **81**: 255-263.
- Khan MS, Zaidi A & Musarrat J (2009) *Microbial Strategies for Crop Improvement*. pp-105-132. Springer Ed., Berlin Heidelberg.
- Kiely PD, Haynes JM, Higgins CH, Franks A, Mark GL, Morrissey JP & O'Gara F (2006) Exploiting new systems-based strategies to elucidate plant-bacterial interactions in the rhizosphere. *Microbial ecology* **51**: 257-266.
- Klee HJ, Hayford MB, Kretzmer KA, Barry GF & Kishore GM (1991) Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant Cell* **3**: 1187-1193.
- Kloepper JW & Schroth MN (1978) Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. (Gilbert-Clarey T, ed.) 879-882. Angers, France.
- Kloepper JW, Schroth, M.N. (1978) Plant growth promoting rhizobacteria on radishes, fourth international conference on plant pathogen bacteria. Vol. 2, 879-882. Angers, France.
- Kloepper JW & Schroth MN (1981) Relationship of in vitro antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology* **71**: 1020-1024.

- Kloepper JW, Hume DJ, Scher FM, *et al.* (1988) plant growth-promoting rhizobacteria on canola (rapeseed). *Plant Disease* **72**: 42-46.
- Koch B, Jensen LE & Nybroe O (2001) A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *Journal of microbiological methods* **45**: 187-195.
- Kohler J, Hernández JA, Caravaca F & Roldán A (2008) Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. *Functional Plant Biology* **35**: 141-151.
- Kokalis-Burelle N, Kloepper JW & Reddy MS (2006) Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology* **31**: 91-100.
- Kokalis-Burelle N, Vavrina CS, Rosskopf EN & Shelby RA (2002) Field evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. *Plant and Soil* **238**: 257-266.
- Koltai H (2010) Mycorrhiza in floriculture: difficulties and opportunities. *Symbiosis* **52**: 55-63.
- Koning R. (1994). Fruit Ripening. *Plant Physiology Information Website*. http://plantphys.info/plants_human/fruitgrowripe.shtml
- Kosova K, Vitamvas P, Prasil IT & Renaut J (2011) Plant proteome changes under abiotic stress--contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of proteomics* **74**: 1301-1322.
- Kostov G, Angelov M, Mihaylov I & Poncelet D (2010) Mechanical properties of Calcium alginate beads for ethanol fermentation with immobilized yeast *Revue de génie industriel* **5**: 25-35.
- Krasensky J & Jonak C (2012) Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany* **63**: 1593-1608.
- Kriebel D, Tickner J, Epstein P, Lemons J, Levins R, Loechler EL, Quinn M, Rudel R, Schettler T & Stoto M (2001) The precautionary principle in environmental science. *Environmental Health Perspectives* **109**: 871-876.
- Kristin A & Miranda H (2013) The root microbiota—a fingerprint in the soil? *Plant and Soil* **370**: 671-686.
- Kuromori T, Mizoi J, Umezawa T, Yamaguchi-Shinozaki K & Shinozaki K (2014) Stress signaling networks: Drought stress. *Molecular Biology*, (Howell SH, ed.) 1-23. Springer New York.

- Lambert B & Joos H (1989) Fundamental aspects of rhizobacterial plant growth promotion research. *Trends in Biotechnology* **7**: 215-219.
- Lambers H, Mougél C, Jaillard B & Hinsinger P (2009) Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant and Soil* **321**: 83-115.
- Lambert B & Joos H (1989) Fundamental aspects of rhizobacterial plant growth promotion research. *Trends in Biotechnology* **7**: 215-219.
- Leadem CL (1987) The role of plant-growth regulators in the germination of forest tree seeds. *Plant Growth Regulation* **6**: 61-93.
- Lecube ML, Noriega GO, Santa Cruz DM, Tomaro ML, Batlle A & Balestrasse KB (2014) Indole acetic acid is responsible for protection against oxidative stress caused by drought in soybean plants: the role of heme oxygenase induction. *Redox report : communications in free radical research* **19**: 242-250.
- Lee K-D (2008) Effect of *R. leguminisarum* pre-incubated with inducers, naringenin and methyl-jasmonate, on nitrogen fixation and the growth of pea at different salinity levels. *The Korean Society of Environmental Agriculture* **27**: 362-367.
- Li B, Sang T, He L, Sun J, Li J & Guo S (2013) Exogenous spermidine inhibits ethylene production in leaves of cucumber seedlings under NaCl stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **138**: 108-113.
- Li FL, Bao WK & Wu N (2009) Effects of water stress on growth, dry matter allocation and water-use efficiency of a leguminous species, *Sophora davidii*. *Agrofor Syst* **77**: 193-201.
- Li G-X, Wu X-Q & Ye J-R (2013) Biosafety and colonization of *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 and its growth-promoting effects on poplars. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**: 10489-10498.
- Liddell CM & Parke JL (1989) Enhanced colonization of pea taproots by a fluorescent Pseudomonad biocontrol agent by water infiltration into soil. *Phytopathology* **79**: 1327-1332.
- Lim J-H & Kim S-D (2013) Induction of drought stress resistance by multi-functional PGPR *Bacillus licheniformis* K11 in pepper. *The Plant Pathology Journal* **29**: 201-208.
- Liu F, Xing S, Ma H, Du Z & Ma B (2013) Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 9155-9164.

- Liu J-X & Bennett J (2011) Reversible and irreversible drought-induced changes in the anther proteome of rice (*Oryza sativa* L.) Genotypes IR64 and Moroberekan. *Molecular Plant* **4**: 59-69.
- Liu X, Germaine KJ, Ryan D & Dowling DN (2010) Genetically modified *Pseudomonas* biosensing biodegraders to detect PCB and chlorobenzoate bioavailability and biodegradation in contaminated soils. *Bioengineered Bugs* **1**: 198-206.
- Loccoz Y (2010) Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings. *Soil Biology and Biochemistry* **42**: 2298-2305.
- Loiseau-Marolleau ML & Malarre N (1977) *Pseudomonas putida*: identification, antibiotic sensitivity and pathogenicity (author's transl). *Pathologie-biologie* **25**: 637-645.
- Lugtenberg B & Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* **63**: 541-556.
- Lovett J (1987) Pathogenicity test for *Listeria monocytogenes* using immunocompromised mice. *Journal of Clinical Microbiology* **25**: 2085-2089.
- Lugtenberg BJJ, Dekkers L & Bloemberg GV (2001) Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology*, Vol. 39 (Webster RK, Shaner G & Van Alfen NK, eds.), 461-490.
- Lunn JE, Delorge I, Figueroa CM, Van Dijck P & Stitt M (2014) Trehalose metabolism in plants. *The Plant Journal* **79**: 544-567.
- Malusá E & Vassilev N (2014) A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**: 6599-6607.
- Malusá E, Sas-Paszt L & Ciesielska J (2012) technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The Scientific World Journal* **2012**: 491206.
- Manavella PA, Arce AL, Dezar CA, Bitton F, Renou JP, Crespi M & Chan RL (2006) Cross-talk between ethylene and drought signalling pathways is mediated by the sunflower Hahb-4 transcription factor. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **48**: 125-137.
- Mandal SM, Chakraborty D & Dey S (2010) Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling & Behavior* **5**: 359-368.
- Manivannan P, Jaleel CA, Somasundaram R & Panneerselvam R (2008) Osmoregulation and antioxidant metabolism in drought-stressed *Helianthus annuus* under triadimefon drenching. *Comptes Rendus Biologies* **331**: 418-425.

- Manzanera M, Vilchez S & Tunnacliffe A (2004) Plastic encapsulation of stabilized *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3143-3145.
- Manzanera M, García de Castro A, Tøndervik A, Rayner-Brandes M, Strøm AR & Tunnacliffe A (2002) Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 4328-4333.
- Manzanera M, García-Fontana C, Vílchez JI & González-López J (2015a) Genome sequence of *Rhodococcus* sp. 4J2A2, a desiccation-tolerant bacterium involved in biodegradation of aromatic hydrocarbons. *Genome Announcements* **3**: e00592-1.
- Manzanera M, Vílchez JI, García-Fontana C, Calvo C & González-López J (2015b) Genome sequence of *Leucobacter* sp. 4J7B1, a plant-osmoprotectant soil microorganism. *Genome Announcements* **3**: e00398-15.
- Manzanera M, Narváez-Reinaldo JJ, García-Fontana C, Vílchez JI & González-López J (2015c) Genome sequence of *Arthrobacter koreensis* 5J12A, a plant growth-promoting and desiccation-tolerant strain. *Genome Announcements* **3**: e00648-15.
- Manzanera M, García-Fontana C, Vílchez JI, Narváez-Reinaldo JJ & González-López J (2015d) Genome sequence of *Microbacterium* sp. strain 3J1, a highly desiccation-tolerant bacterium that promotes plant growth. *Genome Announcements* **3**: e00713-15.
- Manzanera M, Santa-Cruz-Calvo L, Vílchez JI, García-Fontana C, Silva-Castro GA, Calvo C & González-López J (2014) Genome sequence of *Arthrobacter siccitolerans* 4J27, a xeroprotectant-producing desiccation-tolerant microorganism. *Genome Announcements* **2**: e00526-14.
- Markestandmarkets (2013) Global biofertilizers market by types, applications and geography—trends and forecasts to 2017. (Marketsandmarkets, ed.) Sallas, TX, USA.
- Martínez-Viveros O, Jorquera MA, Crowley DE, Gajardo G & Mora ML (2010) Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of soil science and plant nutrition* **10**: 293-319.
- Marulanda A, Barea J-M & Azcón R (2009) Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM fungi and bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. *J Plant Growth Regul* **28**: 115-124.
- Mathew S & Abraham TE (2004) Ferulic acid: An antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Critical reviews in biotechnology* **24**: 59-83.

- Mayak S, Tirosh T & Glick BR (2004) Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science* **166**: 525-530.
- McKenney MS & Rosenberg NJ (1993) Sensitivity of some potential evapotranspiration estimation methods to climate change. *Agricultural and Forest Meteorology* **64**: 81-110.
- Meca A, Sepulveda B, Ogoni JC, Grados N, Moret A, Morgan M & Tume P (2009) In vitro pathogenicity of northern Peru native bacteria on *Phyllocnistis citrella* Stainton (Gracillariidae: Phyllocnistinae), on predator insects (*Hippodamia convergens* and *Chrisoperla externa*), on *Citrus aurantifolia* Swingle and white rats. *Spanish Journal of Agricultural Research* **7**: 137-145.
- Medina P, Budia F, del Estal P & Vinuela E (2004) Influence of azadirachtin, a botanical insecticide, on *Chrysoperla carnea* (Stephens) reproduction: toxicity and ultrastructural approach. *Journal of economic entomology* **97**: 43-50.
- Meldau DG, Long HH & Baldwin IT (2012) A native plant growth promoting bacterium, *Bacillus sp.* B55, rescues growth performance of an ethylene-insensitive plant genotype in nature. *Frontiers in Plant Science* **3**: 112.
- Miethling R, Wieland G, Backhaus H & Tebbe CC (2000) variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microbial ecology* **40**: 43-56.
- Milborrow BV. 2001. The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *J Exp Bot* **52**:1145-1164.
- Mishra AK & Singh VP (2010) A review of drought concepts. *Journal of Hydrology* **391**: 202-216.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**: 405-410.
- Miura K & Tada Y (2014) Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers in Plant Science* **5**: 4.
- Mohammad RM, Akhavan-Kharazian M, Campbell WF & Rumbaugh MD (1991) Identification of salt- and drought-tolerant *Rhizobium meliloti* L. strains. *Plant and Soil* **134**: 271-276.
- Moore JA (1991) Surface transport of microorganisms by water. *Biotechnology* **15**: 41-55.
- Morgan J (1983) Osmoregulation as a selection criterion for drought tolerance in wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* **34**: 607-614.

- Mostofa MG, Yoshida N & Fujita M (2014) Spermidine pretreatment enhances heat tolerance in rice seedlings through modulating antioxidative and glyoxalase systems. *Plant Growth Regulation* **73**: 31-44.
- Munne-Bosch S, Lopez-Carbonell M, Alegre L & Van Onckelen HA (2002) Effect of drought and high solar radiation on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and abscisic acid concentrations in *Rosmarinus officinalis* plants. *Physiologia plantarum* **114**: 380-386.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* **15**: 473-497.
- Muscolo A, Junker A, Klukas C, Weigelt-Fischer K, Riewe D & Altmann T (2015) Phenotypic and metabolic responses to drought and salinity of four contrasting lentil accessions. *Journal of Experimental Botany*. **18**: 5467-5480.
- Nacamulli C, Bevivino A, Dalmastrì C, Tabacchioni S & Chiarini L (1997) Perturbation of maize rhizosphere microflora following seed bacterization with *Burkholderia cepacia* MCI 7. *FEMS Microbiology Ecology* **23**: 183-193.
- Narváez-Reinaldo JJ, Barba I, González-López J, Tunnacliffe A & Manzanera M (2010) Rapid Method for Isolation of Desiccation-Tolerant Strains and Xeroprotectants. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 5254-5262.
- Navas A, Cobas G, Talavera M, Ayala JA, Lopez JA & Martinez JL (2007) Experimental validation of Haldane's hypothesis on the role of infection as an evolutionary force for Metazoans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 13728-13731.
- Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT, *et al.* (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* **4**: 799-808.
- Nelson LM (2004) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. *Crop Management* **3**: 301-305.
- Neuhauser EF & Callahan CA (1990) Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to sublethal concentrations of organic chemicals. *Soil Biology and Biochemistry* **22**: 175-179.
- Nobbe F & Hiltner L (1896) Inoculation of the soil for cultivating leguminous plants. (Office UP, ed.) 570 813. U.S.
- Nongkhlaw FM & Joshi SR (2014) Epiphytic and endophytic bacteria that promote growth of ethnomedicinal plants in the subtropical forests of Meghalaya, India. *Revista de biologia tropical* **62**: 1295-1308.

- Nounjan N, Nghia PT & Theerakulpisut P (2012) Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes. *J Plant Physiol* **169**: 596-604.
- Nouri E, Breuillin-Sessoms F, Feller U & Reinhardt D (2014) phosphorus and nitrogen regulate arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Petunia hybrida*. *PLoS ONE* **9**: e90841.
- Nuñez-Valdez ME, Calderón MA, Aranda E, Hernández L, Ramírez-Gama RM, Lina L, Rodríguez-Segura Z, Gutiérrez MdC & Villalobos FJ (2008) Identification of a putative mexican strain of *Serratia entomophila* pathogenic against root-damaging larvae of Scarabaeidae (Coleoptera). *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 802-810.
- O'Toole GA, Pratt LA, Watnick PI, Newman DK, Weaver VB & Kolter R (1999) Genetic approaches to study of biofilms. *Methods in enzymology* **310**: 91-109.
- Obata T & Fernie AR (2012) The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **69**: 3225-3243.
- OECD (2004) *Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)*. OECD Publishing.
- OECD (2012) *Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test*. OECD Publishing.
- OECD (2015) *Biosafety and the environmental uses of micro-organisms*. OECD Publishing, Paris.
- Oki T & Kanae S (2006) Global hydrological cycles and world water resources. *science* **313**: 1068-1072.
- Olmedo CA & Thuar AM (2000) Greenhouse evaluation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity*, Vol. 38 (Pedrosa F, Hungria M, Yates G & Newton W, eds.), 600. Springer Netherlands.
- Onofre-Lemus J, Hernandez-Lucas I, Girard L & Caballero-Mellado J (2009) ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth-promoting effect on tomato plants. *Appl Environ Microbiol* **75**: 6581-6590.
- Onorati F & Mecozzi M (2004) Effects of two diluents in the Microtox toxicity bioassay with marine sediments. *Chemosphere* **54**: 679-687.
- Osono T (2008) Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of *Camellia japonica*: seasonal and leaf age-dependent variations. *Mycologia* **100**: 387-391.
- País SM, Téllez-Iñón MT & Capiati DA (2009) Serine/threonine protein phosphatases type 2A and their roles in stress signaling. *Plant Signaling & Behavior* **4**: 1013-1015.

- Pallas JR & Kays SJ (1982) Inhibition of photosynthesis by ethylene - A stomatal effect. *Plant Physiology* **70**: 598-601.
- Patten CL & Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3795-3801.
- Paul D & Lade H (2014) Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. *Agron Sustain Dev* **34**: 737-752.
- Penrose DM & Glick BR (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia plantarum* **118**: 10-15.
- Penrose DM, Moffatt BA & Glick BR (2001) Determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) to assess the effects of ACC deaminase-containing bacteria on roots of canola seedlings. *Can J Microbiol* **47**: 77-80.
- Peters JE, Thate TE & Craig NL (2003) Definition of the *Escherichia coli* MC4100 Genome by Use of a DNA Array. *Journal of bacteriology* **185**: 2017-2021.
- Perry C (2007) Efficient irrigation; inefficient communication; flawed recommendations. *Irrigation and Drainage* **56**: 367-378.
- Peters LL, Robledo RF, Bult CJ, Churchill GA, Paigen BJ & Svenson KL (2007) The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nat Rev Genet* **8**: 58-69.
- Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P & van der Putten WH (2013) Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Micro* **11**: 789-799.
- Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM & Bakker PAHM (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology* **52**: 347-375.
- Planchamp C, Glauser G & Mauch-Mani B (2014) Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants. *Front Plant Sci* **5**: 719.
- Plett JM, McDonnell L & Regan S (2009) Plant encoded 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity implicated in different aspects of plant development. *Plant Signaling & Behavior* **4**: 1186-1189.
- Pliego C, Kamilova F & Lugtenberg B (2011) Plant growth-promoting bacteria: fundamentals and exploitation. *Bacteria in Agrobiolology: Crop Ecosystems*, (Maheshwari DK, ed.) 295-343. Springer, Berlin Heidelberg.

Power B, Liu X, Germaine KJ, Ryan D, Brazil D & Dowling DN (2011) Alginate beads as a storage, delivery and containment system for genetically modified PCB degrader and PCB biosensor derivatives of *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of applied microbiology* **110**: 1351-1358.

Praveen Kumar G, Mir Hassan Ahmed SK, Desai S, Leo Daniel Amalraj E & Rasul A (2014) *In vitro* screening for abiotic stress tolerance in potent biocontrol and plant growth promoting strains of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. *International Journal of Bacteriology* **2014**: 6.

Prell J, White JP, Bourdes A, Bunnewell S, Bongaerts RJ & Poole PS (2009) Legumes regulate *Rhizobium* bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 12477-12482.

Puce S, Basile G, Bavestrello G, Bruzzone S, Cerrano C, Giovine M, Arillo A & Zocchi E (2004) Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in hydroid regeneration. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 39783-39788.

Purvers W, Sadova D, Orians G & C. H (2002) The science of the Life. (Panamericana EM, ed.) 1133. New York.

Puschenreiter M (2013) The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biology & Biochemistry* **60**: 182-194.

Quecine MC, Araújo WL, Rossetto PB, Ferreira A, Tsui S, Lacava PT, Mondin M, Azevedo JL & Pizzirani-Kleiner AA (2012) Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 7511-7518.

Reddy PP (2012) *Recent advances in crop protection*. Springer Science & Business Media, 2012.

Reguera M, Peleg Z, Abdel-Tawab YM, Tumimbang EB, Delatorre CA & Blumwald E (2013) Stress-induced cytokinin synthesis increases drought tolerance through the coordinated regulation of carbon and nitrogen assimilation in rice. *Plant Physiol* **163**: 1609-1622.

Reinhold-Hurek B & Hurek T (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 435-443.

Roberts MR (2007) Does GABA Act as a signal in plants?: hints from molecular studies. *Plant Signaling & Behavior* **2**: 408-409.

- Rodriguez-Salazar J, Suarez R, Caballero-Mellado J, Iturriaga G. 2009. Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. *FEMS Microbiol Lett* **296**:52-59.
- Rodríguez H, Fraga R, González T & Bashan Y (2006) Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil* **287**.
- Rosenheim JA (1998) Higher-order predators and the regulation of insect herbivore populations. *Annual review of entomology* **43**: 421-447.
- Roessner U, Wagner C, Kopka J, Trethewey RN & Willmitzer L (2000) Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **23**: 131-142.
- Rolli E, Marasco R, Vigani G, *et al.* (2015) Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. *Environmental Microbiology* **17**: 316-331.
- Rosenblueth M & Martinez-Romero E (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **19**: 827-837.
- Ross GS, Elder PA, McWha JA, Pearce D & Pharis RP (1987) The development of an indirect enzyme linked immunoassay for abscisic acid. *Plant Physiology* **85**: 46-50.
- Rothballer M, Schmid M & Hartmann A (2003) In situ localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. *Symbiosis* **34**: 261-279.
- Rounsevell MDA, Reginster I, Araújo MB, *et al.* (2006) A coherent set of future land use change scenarios for Europe. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **114**: 57-68.
- Rudrappa T, Biedrzycki ML & Bais HP (2008) Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* **64**: 153-166.
- Rudrappa T, Czymmek KJ, Paré PW & Bais HP (2008) Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiology* **148**: 1547-1556.
- Ruiz-Diez B, Sanchez P, Baquero F, Martinez JL & Navas A (2003) Differential interactions within the *Caenorhabditis elegans*-*Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis model. *J Theor Biol* **225**: 469-476.
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ & Dowling DN (2008) Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters* **278**: 1-9.
- Salisbury FB (1994) *The role of plant hormones*. Wilkinson R.E., ed. Plant-environment interaction. New York, USA: Dekker, 39-81.

- Sandhya V, Ali SZ, Grover M, Reddy G & Venkateswarlu B (2010) Effect of plant growth promoting *Pseudomonas spp.* on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant Growth Regulation* **62**: 21-30.
- Santa Anna LM, Sebastian GV, Menezes EP, Alves TLM, Santos AS, Pereira Jr. N & Freire DMG (2002) Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA 1 isolated in oil environments. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **19**: 159-166.
- Santamaria J & Bayman P (2005) Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial ecology* **50**: 1-8.
- Saleem M, Arshad M, Hussain S & Bhatti AS (2007) Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**: 635-648.
- Schippers B, Bakker AW & Bakker PAHM (1987) Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology* **25**: 339-358.
- Schmelz EA, Engelberth J, Alborn HT, O'Donnell P, Sammons M, Toshima H & Schulenburg H & Ewbank J (2004) Diversity and specificity in the interaction between *Caenorhabditis elegans* and the pathogen *Serratia marcescens*. *BMC Evolutionary Biology* **4**: 49.
- Schulenburg H, Boehnisch C & Michiels NK (2007) How do invertebrates generate a highly specific innate immune response? *Molecular immunology* **44**: 3338-3344.
- Schluempmann H, van Dijken A, Aghdasi M, Wobbes B, Paul M & Smeekens S (2004) Trehalose mediated growth inhibition of arabidopsis seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiology* **135**: 879-890.
- Schweitzer JA, Bailey JK, Fischer DG, LeRoy CJ, Lonsdorf EV, Whitham TG & Hart SC (2008) Plant–soil–microorganism interactions: heritable relationship between plant genotype and associated soil microorganisms. *Ecology* **89**: 773-781.
- Selvakumar G, Panneerselvam P & Ganeshamurthy AN (2014) Biosafety of novel bioinoculants. *Journal of Biofertilizers & Biopesticides* **5**: 145.
- Seneviratne G, Weerasekara MLMAW, Seneviratne KACN, Zavahir JS, Kecskés ML & Sengupta S, Patra B, Ray S & Majumder AL (2008) Inositol methyl transferase from a halophytic wild rice, *Porteresia coarctata* Roxb. (Tateoka): regulation of pinitol synthesis under abiotic stress. *Plant, cell & environment* **31**: 1442-1459.
- Sessitsch A, Kuffner M, Kidd P, Vangronsveld J, Wenzel WW, Fallmann K & Puschenreiter M (2013) The role of plant-associated bacteria in the mobilization and

- phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biology & Biochemistry* **60**: 182-194.
- Silvente S, Sobolev AP & Lara M (2012) Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. *PLoS ONE* **7**: e38554.
- Skirycz A & Inzé D (2010) More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology* **21**: 197-203.
- Smidsrod O & Skjak-Braek G (1990) Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol* **8**: 71-78.
- Smith RS (1995) Inoculant formulations and applications to meet changing needs. *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*, Vol. 27 (Tikhonovich I, Provorov N, Romanov V & Newton W, eds.), 653-657. Springer Netherlands.
- Small P, Blankenhorn D, Welty D, Zinser E & Slonczewski JL (1994) Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. *Journal of bacteriology* **176**: 1729-1737.
- Sokolova MG, Akimova GP & Vaishlya OB (2011) Effect of phytohormones synthesized by rhizosphere bacteria on plants. *Appl Biochem Microbiol* **47**: 274-278.
- Somers E, Vanderleyden J & Srivivasan M (2004) Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit Rev Microbiol* **30**: 205-240.
- Stelma GN, Reyes AL, Peeler JT, Francis DW, Hunt JM, Spaulding PL, Johnson CH & Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B & Švabić-Vlahović M (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods* **40**: 175-179.
- Stelting S, Burns RG, Sunna A, Visnovsky G & Bunt CR (2012) Immobilization of *Pseudomonas sp.* strain ADP: A stable inoculant for the bioremediation of atrazine. *Applied Clay Science* **64**: 90-93.
- Stephens JHG & Rask HM (2000) Inoculant production and formulation. *Field Crops Research* **65**: 249-258.
- Sun CX, Li MQ, Gao XX, Liu LN, Wu XF & Zhou JH (2015) Metabolic response of maize plants to multi-factorial abiotic stresses. *Plant Biology* **208**: 371-381.
- Sziderics AH, Rasche F, Trognitz F, Sessitsch A & Wilhelm E (2007) Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Canadian Journal of Microbiology* **53**: 1195-1202.
- Tanimoto E (2005) Regulation of root growth by plant hormones-roles for auxin and gibberellin. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**: 249-265.

- Tattini M, Galardi C, Pinelli P, Massai R, Remorini D & Agati G (2004) Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist* **163**: 547-561.
- Thomashow LS (1996) Biological control of plant root pathogens. *Curr Opin Biotechnol* **7**: 343-347.
- Thulasiraman V, Waker J & Berkelman T (2010) Evaluation of oriole fluorescent gel stain and comparison to SYPRO Ruby. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT* **21**: S53-S53.
- Timmusk S, Grantcharova N & Wagner EGH (2005) *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7292-7300.
- Timmusk S, Abd El-Daim IA, Copolovici L, Tanilas T, Kännaste A, Behers L, Nevo E, Seisenbaeva G, Stenström E & Niinemets Ü (2014) Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: Enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. *PLoS ONE* **9**: e96086.
- Tran L-SP, Urao T, Qin F, Maruyama K, Kakimoto T, Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 20623-20628.
- Trivedi P, Pandey A & Palni L (2005) Carrier-based Preparations of plant growth-promoting bacterial inoculants suitable for use in cooler regions. *World J Microbiol Biotechnol* **21**: 941-945.
- Trivedi P, Pandey A & Palni L (2012) Bacterial inoculants for field applications under mountain ecosystem: Present initiatives and future prospects. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics*, (Maheshwari DK, ed.) 15-44. Springer Berlin Heidelberg.
- Tumlinson JH (2003) Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 10552-10557.
- Unyayar S, Topcuoglu SF & Unyayar A (1996) A modified method for extraction and identification of indole-3-acetic acid (IAA), gibberellic acid (GA3) abscisic acid (ABA) and zeatin produced *Phanerochaete chrysosporium* ME446. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* **22**: 105-110.

- Urbano MR, Hinde J & Demetrio CGB (2013) Dose response models with natural mortality and random effects. *Journal of Agricultural Biological and Environmental Statistics* **18**: 594-610.
- Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud M-L, Touraine B, Moëgne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F & Prigent-Combaret C (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science* **4**: 356.
- Van Elsas JD & Heijnen CE (1990) Methods for the introduction of bacteria into soil: A review. *Biol Fertil Soils* **10**: 127-133.
- Van Rhijin P & Vanderleyden J (1995) The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiology* **59**: 124-142.
- Van Houtte H, Vandesteene L, Lopez-Galvis L, *et al.* (2013) Overexpression of the trehalase gene AtTRE1 leads to increased drought stress tolerance in *Arabidopsis* and is involved in abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol* **161**: 1158-1171.
- Vandeleur RK, Mayo G, Sheldon MC, Gilliam M, Kaiser BN & Tyerman SD (2009) The role of plasma membrane intrinsic protein aquaporins in water transport through roots: Diurnal and drought stress responses reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine. *Plant Physiology* **149**: 445-460.
- Vargas R & Hattori T (1986) Protozoan predation of bacterial cells in soil aggregates. *FEMS Microbiology Ecology* **2**: 233-242.
- Verstegen JA, Karssenberg D, van der Hilst F & Faaij A (2012) Spatio-temporal uncertainty in spatial decision support systems: A case study of changing land availability for bioenergy crops in Mozambique. *Computers, Environment and Urban Systems* **36**: 30-42.
- Vilchez S & Manzanera M (2011) Biotechnological uses of desiccation-tolerant microorganisms for the rhizoremediation of soils subjected to seasonal drought. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**: 1297-1304.
- Vilchez S, Tunnacliffe A & Manzanera M (2008) Tolerance of plastic-encapsulated *Pseudomonas putida* KT2440 to chemical stress. *Extremophiles* **12**: 297-299.
- Vlot AC, Dempsey DMA & Klessig DF (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 177-206.
- Vogel JP, Woeste KE, Theologis A & Kieber JJ (1998) Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene *ACS5* of *Arabidopsis* confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively. *Plant Biol* **95**: 4766-4771.

- Wang Y, Lv M, Zhang Y, Xiao X, Jiang T, Zhang W, Hu C, Gao C, Ma C & Xu P (2014) Reconstruction of lactate utilization system in *Pseudomonas putida* KT2440: a novel biocatalyst for l-2-hydroxy-carboxylate production. *Scientific Reports* **4**: 6939.
- Weretilnyk EA, Alexander KJ, Drebenstedt M, Snider JD, Summers PS & Moffatt BA (2001) Maintaining methylation activities during salt stress. The involvement of adenosine kinase. *Plant Physiology* **125**: 856-865.
- Whitmore AP & Whalley WR (2009) Physical effects of soil drying on roots and crop growth. *J Exp Bot* **60**: 2845-2857.
- Wickremesinhe ERM & Arteca RN (1996) Effects of plant growth regulators applied to the roots of hydroponically grown *Taxus x media* plants on the production of taxol and related. *Plant Science* **121**: 29-38.
- Wilkinson S & Davies WJ (2010) Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, cell & environment* **33**: 510-525.
- Wingler A, Walker RP, Chen Z-H & Leegood RC (1999) Phosphoenolpyruvate carboxykinase is involved in the decarboxylation of aspartate in the bundle sheath of maize. *Plant Physiology* **120**: 539-546.
- Xavier IJ, Holloway G & Leggett M (2004) Development of rhizobial inoculant formulations. *Crop Management* **3**: 301-306.
- Yamaguchi M, Valliyodan B, Zhang J, Lenoble ME, Yu O, Rogers EE, Nguyen HT & Sharp RE (2010) Regulation of growth response to water stress in the soybean primary root. I. Proteomic analysis reveals region-specific regulation of phenylpropanoid metabolism and control of free iron in the elongation zone. *Plant, cell & environment* **33**: 223-243.
- Yang J, Kloepper JW & Ryu C-M (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science* **14**: 1-4.
- Yang S & Hoffman N (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* **35**: 155-189.
- Yang S, Zhang Q, Guo J, Charkowski AO, Glick BR, Ibekwe AM, Cooksey DA & Yang C-H (2007) Global Effect of indole-3-acetic acid biosynthesis on multiple virulence factors of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 1079-1088.
- Yao XH, Min H & Lv ZM (2006) Response of superoxide dismutase, catalase, and ATPase activity in bacteria exposed to acetamiprid. *Biomedical and environmental sciences: BES* **19**: 309-314.

- Yeang HY, Hillman JR & Math VB (1980) Detection of endogenous ethylene and ethane from *Phaseolus vulgaris* L. by combined gas chromatography — mass spectrometry. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **99**: 379-382.
- Yeates GW, Bongers T, De Goede RGM, Freckman DW & Georgieva SS (1993) Feeding habits in soil nematode families and genera—An outline for soil ecologists. *Journal of Nematology* **25**: 315-331.
- Yildiz-Aktas L, Dagnon S, Gurel A, Gesheva E & Edreva A (2009) Drought tolerance in cotton: involvement of non-enzymatic ROS-scavenging compounds. *Journal of Agronomy and Crop Science* **195**: 247-253.
- Yobi A, Wone BW, Xu W, Alexander DC, Guo L, Ryals JA, Oliver MJ & Cushman JC (2012) Comparative metabolic profiling between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant species of *Selaginella* reveals insights into the resurrection trait. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **72**: 983-999.
- Yoshihara Y, Kiyosue T, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K & Shinozaki K (1997) Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant and Cell Physiology* **38**: 1095-1102.
- Yuan G-F, Jia C-G, Li Z, Sun B, Zhang L-P, Liu N & Wang Q-M (2010) Effect of brassinosteroids on drought resistance and abscisic acid concentration in tomato under water stress. *Scientia Horticulturae* **126**: 103-108.
- Yuan J, Zhang N, Huang Q, Raza W, Li R, Vivanco JM & Shen Q (2015) Organic acids from root exudates of banana help root colonization of PGPR strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6. *Sci Rep* **5**: 13438.
- Zachow C, Pirker H, Westendorf C, Tilcher R & Berg G (2009) The *Caenorhabditis elegans* assay: a tool to evaluate the pathogenic potential of bacterial biocontrol agents. *Eur J Plant Pathol* **125**: 367-376.
- Zaidi A, Khan MS & Aamil M (2004) Bioassociative effect of rhizospheric microorganisms on growth, yield and nutrient uptake of greengram. *J Plant Nutr* **27**: 599-610.
- Zehnder G, Murphy J, Sikora E & Kloepper J (2001) Application of rhizobacteria for induced resistance. *Eur J Plant Pathol* **107**: 39-50.
- Zevenhuizen LP (1992) Levels of trehalose and glycogen in *Arthrobacter globiformis* under conditions of nutrient starvation and osmotic stress. *Antonie van Leeuwenhoek* **61**: 61-68.

Zhang B, Zhang P & Chen X (2000) Factors affecting colonization of introduced microorganisms on plant roots. *Ying yong sheng tai xue bao = The journal of applied ecology / Zhongguo sheng tai xue xue hui, Zhongguo ke xue yuan Shenyang ying yong sheng tai yan jiu suo zhu ban* **11**: 951-953.

Zhu J-K (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology* **53**: 247-273.

FINANCIACIÓN

Esta tesis doctoral ha sido financiada gracias al Ministerio de Educación, Ciencia y Deporte del Gobierno de España mediante la beca predoctoral de formación de profesor universitario (FPU).

Igualmente, la actividad investigadora se ha llevado a cabo en el marco de financiación de los siguientes proyectos:

Organismo financiador: Junta de Andalucía (Consejería de Economía, Innovación y Ciencia)

- **Proyecto:** Rizorremediación de hidrocarburos policíclicos aromáticos por especies tolerantes a sequía P07.RNM.02588. 2008-2012.

- **Proyecto:** Mejora en la tolerancia a la sequía de plantas con interés en producción de biocombustibles en zonas de secano. P11.RNM.7844. 2013-2016.

Organismo financiador: Programa “Compromiso con la Investigación y el Desarrollo” de Campus de Excelencia Internacional BioTic Granada

- **Proyecto:** Desarrollo de herramientas biotecnológicas para la producción de barreras contra la desertificación. 2012.

Organismo financiador: Programa de Ayudas a la Transferencia de Investigación de la Universidad de Granada

- **Proyecto:** Mejora en la Productividad de plantas con interés en producción de biocombustibles en ambientes áridos y semiáridos. Estudio de BioSeguridad. 2011-2012.

Organismo financiador: Empresa Investigaciones y Aplicaciones Biotecnológicas, S.L.

- **Proyecto:** Ensayos de cuatro variables de bioseguridad de las cepas microbianas *Pseudomonas fluorescens* IABPF05, *Rhizobium leguminosarum* IABRL05 y *Azotobacter vinelandii* IABAV02. 2013-2015.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Durante el periodo de investigación ligado a la presente tesis doctoral se han publicado las siguientes aportaciones científicas:

- Artículos y publicaciones

1. Vílchez, J.I., Navas, A., González-López, J., Cobacho-Arcos, S. and Manzanera, M. (2016) Biosafety test for plant growth-promoting bacteria: Proposed Environmental and Human Safety Index (EHSI) protocol. *Frontiers in Microbiology* **6**.

Impact Factor: 4

Cuartil: Q1

2. Manzanera M, García-Fontana C, Vílchez JI, González-López J. Genome Sequence of *Rhodococcus* sp. 4J2A2, a Desiccation-Tolerant Bacterium Involved in Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons. *Genome Announcements*. 2015;3 (3):e00592-15. doi:10.1128/genomeA.00592-15.

3. Manzanera M, García-Fontana C, Vílchez JI, Narváez-Reinaldo JJ, González-López J. Genome Sequence of *Microbacterium* sp. Strain 3J1, a Highly Desiccation-Tolerant Bacterium That Promotes Plant Growth. *Genome Announcements*. 2015;3 (4):e00713-15. doi:10.1128/genomeA.00713-15.

4. Manzanera M, Narváez-Reinaldo JJ, García-Fontana C, Vílchez JI, González-López J. Genome Sequence of *Arthrobacter koreensis* 5J12A, a Plant Growth-Promoting and Desiccation-Tolerant Strain. *Genome Announcements*. 2015;3 (3):e00648-15. doi:10.1128/genomeA.00648-15.

5. Manzanera M, Vílchez JI, García-Fontana C, Calvo C, González-López J. Genome Sequence of *Leucobacter* sp. 4J7B1, a Plant-Osmoprotectant Soil Microorganism. *Genome Announcements*. 2015;3 (3):e00398-15. doi:10.1128/genomeA.00398-15.

6. Manzanera M, Santa-Cruz-Calvo L, Vílchez JI, et al. Genome Sequence of *Arthrobacter siccitolerans* 4J27, a Xeroprotectant-Producing Desiccation-Tolerant Microorganism. *Genome Announcements*. 2014;2 (3):e00526-14. doi:10.1128/genomeA.00526-14.

7. Uad-, I, González-López, J, Silva-Castro, GA, Vílchez-Morillas, JI.; González-Martínez, A, Martín-Ramos, D, Rivadeneyra-Torres, A, Rivadeneira-Ruiz, MA. Precipitation of carbonate crystals by bacteria isolated from a submerged fixed-film bioreactor used for the treatment of urban wastewater. *International Journal of Environmental Research*. 2013:8 (2), 435-446.

Autores: Índice de impacto: 1.462

Cuartil: Q3

8. Silva-Castro, GA, Uad-, I; Rivadeneyra-Torres, A, Vílchez-Morillas, JI., Martín-Ramos, D, Gonzalez-López, J; Rivadeneira-Ruiz, MA. Carbonate precipitation of bacterial strains isolated from sediments and seawater: Formation mechanisms. *Geomicrobiology journal*. 2013:30 (9), 840-850.

Índice de impacto: 1.440

Cuartil: Q3

9. Vílchez-Morillas, JI. Santa Cruz-Calvo, L, Picazo-Espinosa, R, Manzanera-Ruiz, M, González-López, J. Biotechnological uses of desiccation tolerant microorganisms for the rhizoremediation of soils subjected to seasonal drought. *Journal of biotechnology*. 2010:150, 220.

Índice de impacto: 2.970

Cuartil: Q2

10. Vílchez-Morillas, JI, Santa Cruz-Calvo, L, Picazo-Espinosa, R, González-López, J, Manzanera-Ruiz, M. Use of desiccation tolerant actinobacteria isolates for stabilization of biological material of biotechnological interest. *Journal of biotechnology*. 2010: 150, 335.

Índice de impacto: 2.970

Cuartil: Q2

11. En preparación: Desiccation-tolerant microorganisms as rhizobacterial drought tolerance enhancers. Vílchez, J.I., González-López, J., Manzanera, M.

- Capítulos de libro

1. Vílchez-Morillas, Juan Ignacio; Manzanera-Ruiz, Maximino; Santa Cruz-Calvo, Lucía; González-López, Jesús; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Picazo-Espinosa, Rafael. Contribución de los microorganismos en el mantenimiento de la biodiversidad en suelos áridos y semiáridos. III CONGRESO NACIONAL DE BIODIVERSIDAD - Editorial: CSIC, UGR. 2011.

2. Manzanera-Ruiz, Maximino; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vílchez-Morillas, Juan Ignacio; González-López, Jesús; Calvo-Sainz, Concepción. New isolation method of desiccation-tolerant microorganisms for the bioremediation of arid and semiarid soils. ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY III. Southampton, UK. – WITPRESS. 2010. ISBN: 978-1-84564-438-3.

3. Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Vílchez-Morillas, Juan Ignacio; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Picazo-Espinosa, Rafael; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino. Plant growth promoting rhizobacteria for protection against drought. BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION AND PLANT-ASSOCIATED MICROORGANISMS - GRÁFICAS ALÓS, S.A. 2010.

- Aportaciones a congresos

1. How safe is your plant growth promoting bacteria? XV NATIONAL MEETING OF THE SPANISH SOCIETY OF NITROGEN FIXATION. IV PORTUGUESE-SPANISH CONGRESS ON NITROGEN FIXATION (2015, León, España).

Comunicación oral

Manzanera, Maximino; Vílchez, Juan Ignacio, García Fontana, Cristina; Aranda, Elisabet; González López, Jesús

2. Differential analysis of root proteome obtained in microbe-plant interaction as a tool for identification of proteins involved in resistance to drought events in pepper plants. XXXVII CONGRESO SOCIEDAD ESPAÑOLA BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR (2014, Granada, España).

Poster en Congreso

Autores: Vílchez-Morillas, Juan Ignacio; Garcia-Fontana, Cristina; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

3. Differential analysis of root proteome obtained in microbe-plant interaction as a tool for identification of proteins involved in resistance to drought events in pepper plants. XXXVII CONGRESO SOCIEDAD ESPAÑOLA BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR (2014, Granada, España).

Ponencia en Congreso

Autores: Vílchez-Morillas, Juan Ignacio; García-Fontana, Cristina; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

4. *Microbacterium sp.* 3J1 reduces the expression of enzymes involved in ethylene pathway in roots of pepper plants under drought conditions. XXXVII CONGRESO SOCIEDAD ESPAÑOLA BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR (2014, Granada, España).

Poster en Congreso

García-Fontana, Cristina; Vílchez-Morillas, Juan Ignacio; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

5. Servicio de Texto Orientado iBiotecSTO: multiplataforma interactiva para la docencia de Biotecnología. XXXVII CONGRESO SOCIEDAD ESPAÑOLA BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR (2014, Granada, España).

Poster en Congreso

Manzanera-Ruiz, Maximino; Vargas-Morales, Alberto Manuel; Suarez-García, Antonio; Aguilera, Margarita; Vílchez-Morillas, Juan Ignacio; García-Fontana, Cristina

6. Dessication-tolerant microorganisms as drought plant protecting rhizobacteria: Transferring stress tolerance from different kingdoms. NEW FRONTIERS IN ANHYDROBIOSIS (2014, Pornichet, Francia).

Comunicación en congreso

Manzanera-Ruiz, Maximino; Vílchez-Morillas, Juan Ignacio; Santa Cruz-Calvo, Lucía; González-López, Jesús

7. Biosafety analysis of the *Bacillus pumilus* 15.1 strain through a *Caenorhabditis elegans* pathogenicity assay. BIOLOGICAL CONTROL - ITS UNIQUE ROLE IN ORGANIC AND INTEGRATED PRODUCTION (2013, Zagreb, Croacia).

Poster en Congreso

Caña-Roca, Juan Francisco; Garcia-Ramon, Diana Carolina; Vílchez-Morillas, Juan Ignacio; Manzanera-Ruiz, Maximino; Domínguez-Flores, Tania; Osuna-Carrillo De Albornoz, Antonio; Vílchez-Tornero, Susana

8. Biosafety of bacterial strains with application in green biotechnology. WORLD BIOTECHNOLOGY CONGRESS 2013; Eureka Conference (2013; Boston, USA).

Comunicación en congreso

Autores: Manzanera-Ruiz, Maximino; Vílchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Santa Cruz, Lucia; Picazo-Espinosa, Rafael; Julca-Chavez, Irene Consuelo; Calvo-Sainz, Concepción; González-López, Jesús

9. Precipitation of calcium carbonates by bacteria strains from a fixed-biofilm bioreactor. 2ND WATER RESEARCH CONFERENCE (2013, Singapur).

Poster en Congreso

Autores: Rivadeneira-Ruiz, Maria Angustias; Silva-Castro, Gloria Andrea; Vílchez-Morillas, Juan Ignacio; Martín-Ramos, Daniel; Rivadeneyra-Torres, Almudena; González-López, Jesús

10. Improvement in the rhizoremediation efficiency by the use of xeroprotective microorganisms. International Symposium on Biosorption and Bioremediation (2012; Praga, República Checa).

Comunicación en congreso

Autores: Manzanera-Ruiz, Maximino; Vílchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Santa-cruz, Lucia; Julca-Chavez, Irene Consuelo; González-López, Jesús

11. Isolation of desiccation tolerant micro-organisms for the rhyzoremediation of soils subjected to seasonal drought. 15TH INTERNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION SYMPOSIUM (2011, Viena, Austria).

Comunicación en congreso

Autores: Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Picazo-Espinosa, Rafael; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

12. New method for the isolation of drought plant protecting rhizobacteria. BIOTECNOLOGÍA HABANA 2011 (2011, La Habana, Cuba).

Poster en Exposición

Autores: Manzanera-Ruiz, Maximino; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Picazo-Espinosa, Rafael; Julca-Chavez, Irene Consuelo; Calvo-Sainz, Concepción; González-López, Jesús

13. Influencia de los iones manganeso en la precipitación de carbonatos por *Halomonas maura*. XXIII CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA (2011, Salamanca, España).

Poster en Congreso

Autores: Rivadeneira-Ruiz, Maria Angustias; Rivadeneira-Torres, Almudena; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Uad-, Imane; Silva-Castro, Gloria Andrea; Martín-Ramos, Daniel

14. Precipitación de carbonatos por bacterias aisladas de un biorreactor de filtro sumergido de una planta de depuración de aguas residuales. XXIII CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA (2011, Salamanca, España).

Poster en Congreso

Autores: Uad-, Imane; Silva-Castro, Gloria Andrea; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Martín-Ramos, Daniel; González-López, Jesús; Rivadeneira-Ruiz, Maria Angustias

15. Rizorremediación de suelos sometidos a sequía con especies tolerantes a la falta de agua. XXIII CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA (2011, Salamanca, España).

Poster en Congreso

Autores: Picazo-Espinosa, Rafael; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Calvo-Sainz, Concepción; González-López, Jesús

16. Utilización de la aplicación multiplataforma i-tunes como herramienta de apoyo para la docencia universitaria (i-LabBook). XXIII CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA (2011, Salamanca, España).

Poster en Congreso

Autores: Picazo-Espinosa, Rafael; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino; Vilchez-Tornero, Susana

17. Utilización de grasas de aguas residuales para la producción de micro-combustibles. XXIII CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA (2011, Salamanca, España).

Comunicación en congreso

Autores: Picazo-Espinosa, Rafael; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

18. Contribución de los microorganismos en el mantenimiento de la biodiversidad en suelos áridos y semiáridos. III CONGRESO NACIONAL DE BIODIVERSIDAD (2011, Granada, España).

Conferencia Congreso no publicada

Autores: Manzanera-Ruiz, Maximino; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Oliver-Jacobo, Amparo; Picazo-Espinosa, Rafael; González-López, Jesús

19. Biotechnological uses of desiccation tolerant microorganisms for the rhizoremediation of soils subjected to seasonal drought. 14TH INTERNATIONAL BYOTECHNOLOGY SYMPOSIUM AND EXHIBITION (2010, Rimini, Italia).

Poster en Congreso

Autores: Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Picazo-Espinosa, Rafael; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

20. Use of desiccation tolerant actinobacteria isolates for stabilization of biological material of biotechnological interest. 14TH INTERNATIONAL BYOTECHNOLOGY SYMPOSIUM AND EXHIBITION (2010, Rimini, Italia).

Poster en Congreso

Autores: Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Picazo-Espinosa, Rafael; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

21. Plant growth promoting rhizobacteria for protection against drought. NATIONAL MEETING OF THE SPANISH SOCIETY OF NITROGEN FIXATION (SEFIN) (13TH. ZARAGOZA. 2010) PORTUGUESE-SPANISH CONGRESS ON NITROGEN FIXATION (2010, Zaragoza, España).

Comunicación en congreso

Autores: Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Picazo-Espinosa, Rafael; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

- Patentes

1. Nombre: Cepa bacteriana CECT7624, uso de dicha cepa para aumentar la tolerancia al estrés hídrico de una planta y compuesto xeroprotector producido por la misma.

Tipo: Patente de invención, Propiedad industrial

Número de patente: WO2011067440 A2 Fecha de concesión: 03/12/09

Institución: UGR Tipo de protección: Otros

Autores: González-López, Jesús; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Manzanera-Ruiz, Maximino

2. Nombre: Cepa bacteriana CECT7624, uso de dicha cepa para aumentar la tolerancia al estrés hídrico de una planta y compuesto xeroprotector producido por la misma.

Tipo: Patente de invención, Propiedad industrial

Número de patente: WO2011067440 A3 Fecha de concesión: 04/12/09

Institución: UGR Tipo de protección: Otros

Autores: González-López, Jesús; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Manzanera-Ruiz, Maximino; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús

3. Nombre: Cepa bacteriana CECT7626, uso de dicha cepa para aumentar la tolerancia al estrés hídrico de una planta y compuesto xeroprotector producido por la misma.

Tipo: Patente de invención, Propiedad industrial

Número de patente: WO2011067442 A2 Fecha de concesión: 04/12/09

Institución: UGR Tipo de protección: Otros

Autores: González-López, Jesús; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Manzanera-Ruiz, Maximino; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús

4. Nombre: Cepa bacteriana CECT7626, uso de dicha cepa para aumentar la tolerancia al estrés hídrico de una planta y compuesto xeroprotector producido por la misma

Tipo: Patente de invención, Propiedad industrial

Número de patente: WO2011067442 A3 Fecha de concesión: 03/12/09

Institución: UGR Tipo de protección: Otros

Autores: González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio

Tesis Doctoral – Programa de Biología Fundamental y de Sistemas

Juan Ignacio Vílchez Morillas

Instituto Universitario de Investigación del Agua

Universidad de Granada

Granada – 2016

