



Facultad de Ciencias - UdelaR

Licenciatura en Bioquímica



**Análisis de *Cupriavidus* aislados de mimosas
nativas de Uruguay**

Laura Sandes Bufano

**Tutora: Elena Fabiano
Cotutor: Raúl Platero**

Noviembre 2015

Índice

1. Resumen	7
2. Introducción	8
2.1. Fijación Biológica de Nitrógeno	8
2.1.1. Nitrogenasa	9
2.2. Rizobios	10
2.2.1. “Beta-rizobios”	11
2.3. Leguminosas	11
2.3.1. Mimosa	12
2.4. Interacción rizobio-leguminosa	13
2.5. Evolución de la interacción planta-microorganismo	15
2.6. Leguminosas nativas en Uruguay	16
2.7. Antecedentes	17
3. Objetivos	18
3.1. Objetivo general.....	18
3.2. Objetivos específicos	18
4. Materiales y métodos	19
4.1. Aislamiento de microsimbiontes	19
4.2. Caracterización genotípica.....	19
4.2.1. Criterio para la denominación de los aislamientos de la colección	19
4.2.2. Amplificación por PCR de una región del gen del ADNr 16S.....	19
4.2.3. Amplificación por PCR del gen <i>nifH</i>	20
4.2.4. Visualización y secuenciación de los productos de PCR.....	21
4.2.5. Análisis filogenético	21
4.3. Caracterización fisiológica	21
4.3.1. Tolerancia y crecimiento de las cepas a distintos pH.....	21
4.3.2. Solubilización de fosfatos inorgánicos	22
4.3.3. Actividad guaiacol oxidasa.....	22

4.3.4.	Producción de sideróforos	22
4.3.5.	Crecimiento con distintas fuentes de carbono	22
4.3.6.	Resistencia a metales pesados	23
4.3.7.	Resistencia a antibióticos	23
4.4.	Promoción del crecimiento vegetal	23
4.4.1.	Desinfección y germinación de semillas.....	23
4.4.2.	Ensayo con plantas en condiciones gnotobióticas	24
4.4.3.	Efectividad de nodulación	24
4.5.	Análisis de la interacción planta-microorganismo.....	24
5.	Resultados.....	25
5.1.	Aislamiento de microsimbiontes	25
5.2.	Caracterización genotípica.....	26
5.2.1.	Identificación de los aislamientos	26
5.2.2.	Presencia del gen <i>nifH</i> en los microsimbiontes.....	26
5.2.3.	Análisis filogenético.....	26
5.3.	Caracterización fisiológica	30
5.3.1.	Crecimiento de cepas a distintos pHs	30
5.3.2.	Solubilización de fosfato.....	31
5.3.3.	Actividad guaiacol oxidasa.....	32
5.3.4.	Producción de sideróforos	32
5.3.5.	Crecimiento de derivados fenólicos	33
5.3.6.	Tolerancia a metales pesados	34
5.3.7.	Resistencia a antibióticos	37
5.4.	Caracterización de la simbiosis	39
5.4.1.	Especificidad de hospedero.....	39
5.4.2.	Capacidad de promover el crecimiento vegetal.....	41
5.5.	Cepas de mayor potencial	43
6.	Discusión.....	44
7.	Conclusiones y perspectivas.....	49
8.	Anexo.....	51

8.1. Anexo 1: Medios de cultivo y soluciones.....	51
8.1.1. Medios de cultivo	51
8.1.2. Soluciones.....	54
8.2. Anexo 2: Resultados complementarios	55
9. Referencias bibliográficas	56

Índice de Figuras

Figura 1. Estequiometría de la reacción catalizada por el complejo de la nitrogenasa.	9
Figura 2. Estructura del complejo enzimático nitrogenasa.	10
Figura 3. Estructura general de los flavonoides y de los Factores Nod... ..	13
Figura 4. Establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa.	14
Figura 5. Establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa	14
Figura 6. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias del gen del ADN _r 16S. ..	28
Figura 7. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias del gen <i>nifH</i>	29
Figura 8. Crecimiento en medio líquido de las cepas <i>Cupriavidus sp.</i> UYMSc13B, <i>Cupriavidus sp.</i> UYMU48A y <i>Cupriavidus sp.</i> UYPR2.512 a diferentes pHs.....	31
Figura 9. Solubilización de fosfato por parte de la cepa <i>Burkholderia sp.</i> UYMP09A.	32
Figura 10. Oxidación de guaiacol por parte de las cepas <i>Cupriavidus sp.</i> UYPR2.512, <i>Cupriavidus sp.</i> UYMU48A, <i>Cupriavidus sp.</i> UYMM02A y <i>Cupriavidus sp.</i> UYMRe04A.....	32
Figura 11. Producción de sideróforos en <i>Burkholderia sp.</i> UYMP09A, <i>Cupriavidus sp.</i> UYMSp04A, <i>Cupriavidus sp.</i> UYMR05A, <i>Cupriavidus sp.</i> UYMSc13B y <i>Cupriavidus sp.</i> UYMC03.	33
Figura 12. Cepas con buen crecimiento en presencia de K ₂ TeO ₃ 50 µM, CoCl ₂ 1 mM y CuSO ₄ 1 mM.....	36
Figura 13. Cepas con buen crecimiento en presencia de MnCl ₂ 500 µM.	37
Figura 14. <i>Burkholderia sp.</i> UYMP09A crecida en medio YMAG suplementado con FeCl ₃ 1 mM.....	37
Figura 15. A) Plantines de <i>Mimosa pudica</i> ya cosechados inoculados con las cepas <i>Cupriavidus sp.</i> UYMRe04A, <i>Cupriavidus sp.</i> UYPR2.512 y <i>Cupriavidus sp.</i> UYMA12B. B) Nódulos en las raíces de uno de los plantines inoculados con <i>Cupriavidus sp.</i> UYMRe04A. C) Nódulos en las raíces de uno de los plantines inoculados con <i>Cupriavidus sp.</i> UYPR2.512. D) Nódulos en las raíces de uno de los plantines inoculados con <i>Cupriavidus sp.</i> UYMA12B.	40
Figura 16. A) Plantines de <i>Mimosa uragüensis</i> ya cosechados inoculados con la cepa <i>Cupriavidus sp.</i> UYMSc13B. B) Nódulos en las raíces de uno de los plantines de A.	40
Figura 17. A) Plantines de <i>Mimosa polycarpa</i> ya cosechados inoculados con la cepa <i>Cupriavidus sp.</i> UYMA12B. B) Nódulos en las raíces de uno de los plantines de A.	41
Figura 18. A) Plantines de <i>Leucaena leucocephala</i> ya cosechados inoculados con la cepa <i>Cupriavidus sp.</i> UYPR2.512. B) Nódulos en las raíces de uno de los plantines de A.....	41
Figura 19. Análisis de la varianza del peso seco de la parte aérea de plantas de <i>M. pudica</i> inoculadas con los distintos aislamientos.	42
Figura 20. Análisis de la varianza del peso seco de la parte aérea de plantas de <i>M. uragüensis</i> inoculadas con los distintos aislamientos.....	42

Índice de Tablas

Tabla 1. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en la amplificación de los genes que codifican para los genes ADNr 16S y <i>nifH</i> y sus temperaturas de fusión.	20
Tabla 2. Cepas aisladas en este trabajo.	25
Tabla 3. Tolerancia en medio sólido a distintos pHs.....	30
Tabla 4. Evaluación de la capacidad de crecer en distintas fuentes de carbono.....	34
Tabla 5. Ensayo de tolerancia a distintos metales variando su concentración en medio YMAG sólido.	35
Tabla 6. Ensayo de tolerancia a distintos metales variando su concentración en medio YMAG sólido.	35
Tabla 7. Ensayo de tolerancia a distintos metales variando su concentración en medio YMAG sólido.	36
Tabla 8. Evaluación de la capacidad de las cepas de resistir frente a distintos antibióticos en YMAG sólido.	37
Tabla 9. Evaluación final de la capacidad de las cepas de resistir frente a distintos antibióticos.	38
Tabla 10. Leguminosas pertenecientes a la familia <i>Mimosoideae</i> y cepas bacterianas pertenecientes a las β -Proteobacterias, con las que se llevó a cabo el ensayo de nodulación y promiscuidad.	39
Tabla 11. Cepas de mayor potencial para los diferentes ensayos.....	43

1. Resumen

Los rizobios son bacterias del suelo que se encuentran en asociación simbiótica con las leguminosas. Éstos juegan un rol importante a nivel ambiental ya que se encargan de un proceso de gran impacto como es la fijación biológica de nitrógeno (FBN), mecanismo mediante el cual las plantas, gracias a la ayuda de las bacterias, adquieren el N₂ atmosférico. Su empleo en prácticas agrícolas, permite una disminución del uso de fertilizantes químicos nitrogenados con la consiguiente disminución de gases de efecto invernadero y eutrofización de cursos de agua.

Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar un grupo de rizobios simbiotes de Mimosas nativas. Se eligió este género vegetal debido al poco conocimiento que existe acerca de los rizobios asociados a estas plantas y que Uruguay es un sitio biogeográfico de sumo interés para su estudio ya que se piensa que es límite de distribución de muchas especies pertenecientes a este género.

Se identificó el género de once bacterias seleccionadas para este estudio mediante la amplificación, secuenciación y análisis de una región del gen que codifica para la subunidad menor del ribosoma (ADNr 16S). Se analizó también la filogenia del gen que codifica para la subunidad estructural de la enzima nitrogenasa (*nifH*) y se comparó con la del ADNr 16S. Se determinó que todos los aislamientos pertenecen al grupo de los beta-rizobios y diez de los once pertenecen al género *Cupriavidus*, lo cual afirma observaciones previas de nuestro laboratorio que indicarían que las Mimosas en nuestro país son preferentemente noduladas por *Cupriavidus*. Se observó que los once aislamientos presentan una buena adaptación a crecer en diferentes pHs y que algunos presentaron características de interés biotecnológico como la tolerancia a metales y la producción de guaiacol oxidasas; de interés para la biorremediación de suelos (resistencia a metales, crecimiento en derivados fenólicos, solubilización de fosfatos). Los ensayos realizados en plantas mostraron que todos los microsimbiontes nodularon *Mimosa pudica*, *M. uraguensis* y *M. polycarpa* pero sólo algunas cepas fueron capaces de promover el crecimiento significativamente. El fenotipo simbiótico no fue el mismo con los diferentes hospederos, indicando especificidad en la interacción.

Las leguminosas tienen un gran valor a nivel nacional ya que pueden utilizarse como alimento, forrajeras o para la repoblación de árboles en montes nativos, por lo que es interesante investigar los microorganismos asociados a sus raíces, en busca de inoculantes capaces de promover el crecimiento vegetal de esta familia.

2. Introducción

2.1. Fijación Biológica de Nitrógeno

Los microorganismos del suelo juegan un papel esencial en la sustentabilidad del ecosistema ya que son responsables de actividades tales como la descomposición de la materia orgánica, degradación de xenobióticos, agregado de partículas, ciclado de nutrientes como N, S, P donde participan en procesos de gran impacto como el de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) [1].

A pesar que el N_2 constituye más del 70% de la atmósfera, las plantas no pueden hacer uso de este recurso y están obligadas a utilizar las formas combinadas que se encuentran en el suelo o a asociarse a microorganismos que sí puedan convertir el N_2 gaseoso a otras formas químicas. La capacidad de reducir el N_2 se limita a organismos procariontas, bacterias y arqueas, y no se ha encontrado hasta la fecha ningún organismo eucariota que posea esta habilidad. Los procariontes fijadores de nitrógeno se denominan diazótrofos y se encuentran ampliamente distribuidos en grupos con diferentes estilos de vida y metabolismos que incluyen organismos aerobios, anaerobios, autótrofos, heterótrofos, metanótrofos, como células individuales o en filamentos, que se encuentran en vida libre o en simbiosis con otros organismos. Esto sugiere que la habilidad de fijar nitrógeno, surgió más de una vez desde el punto de vista evolutivo [2, 3].

En bacterias la FBN se da en seis de los phyla descritos hasta el momento y son: bacterias verdes del azufre, cianobacterias, Gram positivas de bajo y alto contenido de G+C, Spirochaetes, Firmicutes y Proteobacteria, siendo esta última la división que contiene más diazótrofos [4].

Los microorganismos que fijan nitrógeno en asociación con otro organismo son menos abundantes que los que lo hacen en vida libre. Este tipo de asociación se observa en: 1) los heterocistos de las cianobacterias que ocupan tejidos de plantas hepáticas, helechos, cícadras y dicotiledóneas; 2) algunos actinomicetos representados por el género *Frankia*, capaces de formar nódulos con muchas plantas no leguminosas de varias familias que incluyen a los géneros *Alnus* y *Prusia*; 3) Las proteobacterias denominadas genéricamente como rizobios (ver más adelante) que forman nódulos en muchas leguminosas, y excepcionalmente con una no leguminosa, *Parasponia*, miembro de la familia *Ulmaceae* [4–6].

Además de la importancia económica de la FBN, este proceso posee gran relevancia ambiental ya que permite disminuir el uso de fertilizantes químicos nitrogenados con la consiguiente disminución de los efectos nocivos asociados como por ejemplo la formación de gases de efecto invernadero y la eutrofización de cursos de agua [1].

2.1.1. Nitrogenasa

La FBN es llevada a cabo mediante un sistema enzimático particular denominado complejo enzimático de la nitrogenasa. Éste consta de dos componentes metaloproteicos, una ferroproteína (componente II) y una ferro-molibdenoproteína (componente I) responsables de catalizar la reducción de una molécula de dinitrógeno y convertirlo en dos de amonio. Este proceso es dependiente de Mg-ATP y genera un gran gasto energético debido a la estabilidad que posee el nitrógeno gaseoso gracias a su triple enlace (Figura 1) [7]. La transferencia de cada electrón consume 2 ATP, y se requieren 6 electrones para la reducción del N_2 a $2 NH_3$ y 2 electrones para la reducción de $2 H^+$ a H_2 , por lo tanto el costo energético mínimo es de 16 moles de ATP para la reducción de un mol de N_2 . Este valor se da en condiciones óptimas y el costo energético real es mayor, y varía según las condiciones y estado del sistema fijador. Entre los factores que afectan el costo energético de la reducción de N_2 por la nitrogenasa se encuentra la producción de H_2 , que ocurre inevitablemente durante la reacción. De esta forma, como la reducción de H^+ a H_2 tiene los mismos requerimientos de ATP y poder reductor que la reducción de N_2 a NH_3 , la producción de H_2 es una fuente de ineficiencia para la fijación de N_2 [8].

Además de N_2 y protones, la nitrogenasa puede reducir a sustratos no fisiológicos como el acetileno a etileno, el cianuro a metano y amoníaco, el óxido nitroso a N_2 y agua, entre otros. La reducción del acetileno a etileno por la nitrogenasa ha permitido desarrollar un método rápido y sencillo usado en la determinación de la actividad de la enzima mediante cromatografía de gases. Otra metodología que se utiliza es la basada en la cuantificación de la concentración de ^{15}N en el nitrógeno fijado a partir de concentraciones conocidas de ^{15}N en el suelo o en la atmósfera. Esta técnica es precisa, pero dificultosa porque requiere el empleo de un espectrómetro de masas y, generalmente, de $^{15}N_2$ o fertilizantes enriquecidos con ^{15}N [8].

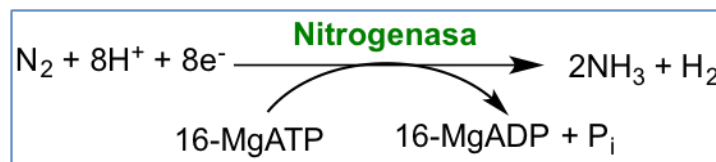


Figura 1. Estequiometría de la reacción catalizada por el complejo de la nitrogenasa.

La ferro-proteína es un homodímero codificado por el gen *nifH*, y contiene 4 átomos de Fe organizados en un grupo Fe_4S_4 , mientras que la ferro-molibdeno proteína es un heterodímero codificado por los genes *nifD* (que codifica para la subunidad α) y *nifK* (que codifica para la subunidad β) y contiene 30 átomos de Fe y 2 átomos de Mo organizados en 2 pares de grupos metálicos, llamados grupos P (Fe_8S_{7-8}) y cofactore FeMo (Fe_7S_9 Mo-homocitrato) (**Figura 2**) [7].

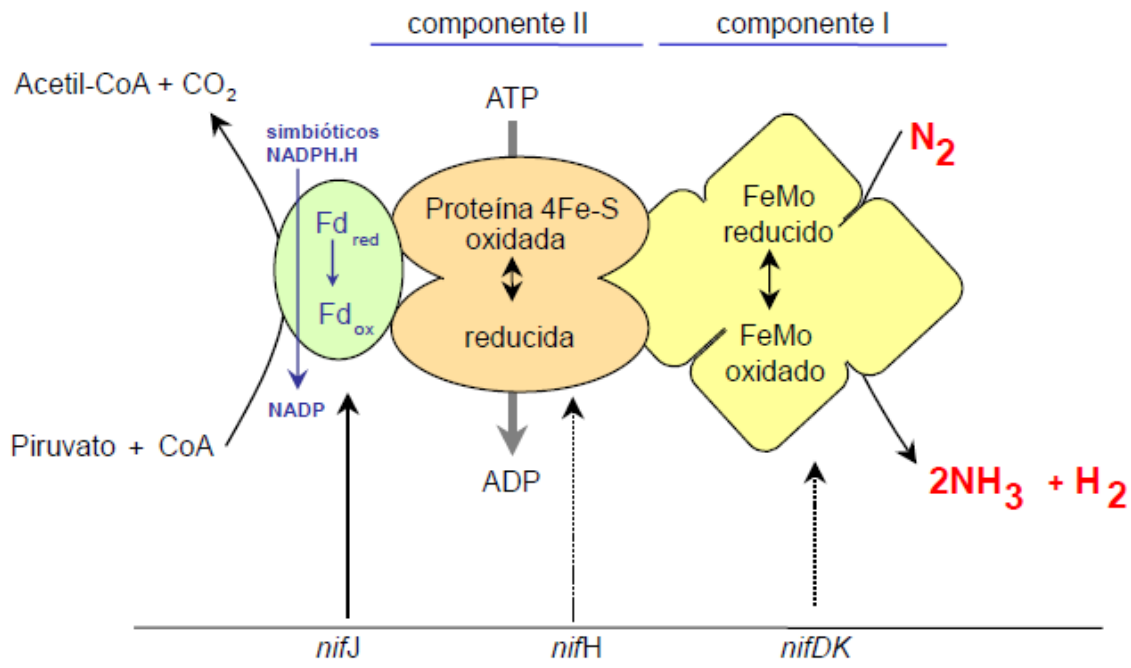


Figura 2. Estructura del complejo enzimático nitrogenasa. Tomado de [8].

Debido a que dicha enzima se inactiva en presencia de O₂, se postula que las primeras nitrogenasas debieron de haberse originado antes de que la condición reductora de la atmósfera primitiva se transformara en oxigénica, por la acumulación de O₂ como producto final de la fotosíntesis bacteriana. Es así que los diazótrofos antiguos recorrieron un largo camino evolutivo desde la aparición de las primeras plantas terrestres, hace aproximadamente 400 millones de años, conviviendo en la rizósfera como epifitos o en el interior de las plantas como endófitos. Durante este largo período, las líneas diazótroficas de procariontes se diversificaron y establecieron relaciones simbióticas con algunos linajes de plantas [4, 5, 9].

2.2. Rizobios

Los rizobios son un grupo polifilético de bacterias diazótroficas, Gram negativas, presentan un metabolismo aerobio y heterótrofo en su mayoría, y tienen la particularidad de asociarse a las raíces de las leguminosas. También se han encontrado asociados a los tallos de algunas leguminosas o a plantas del género *Parasponia*, aunque estos casos son poco frecuentes. Como parte de esta asociación se forman estructuras características denominadas nódulos, las cuales se desarrollan principalmente en el córtex radicular y excepcionalmente en el tallo [10]. Estimaciones recientes sugieren que en particular, las bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas de leguminosas contribuyen con unos 55 millones de toneladas de N fijado a los suelos por año [1].

2.2.1. “Beta-rizobios”

La taxonomía de los rizobios se basa en un enfoque polifásico que incluye caracterización de la morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia, entre otros aspectos. Primeramente, se intentó clasificar a los rizobios según su huésped ya que se había observado una cierta especificidad con la leguminosa que se encontraba asociada [11]. Posteriormente esto fue refutado ya que se reportaron estudios mostrando la hoy conocida promiscuidad simbiótica entre estos organismos. De todas maneras, sí se puede afirmar que las bacterias y plantas promiscuas, se encuentran mayormente en zonas cálidas o tropicales del mundo [12].

Una herramienta muy utilizada para clasificar las bacterias actualmente es la secuencia del gen que codifica para el ARN de la subunidad ribosomal menor (ARNr 16S). Su secuencia nucleotídica presenta una estructura de mosaico en donde existen regiones muy conservadas y otras variables, haciendo que sea un buen marcador para establecer relaciones filogenéticas. Mediante el análisis de esta subunidad, las Proteobacterias se agruparon en seis linajes designados como subdivisiones y nombrados por las letras del alfabeto griego α , β , γ , δ , ϵ y ζ [12, 13].

En la actualidad se considera que la división Proteobacteria es la más amplia y diversa dentro del dominio Bacteria. La interacción simbiótica entre diazótrofos y leguminosas, se ha estudiado principalmente en las bacterias del suelo perteneciente a las α -Proteobacterias y sobre todo en los géneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Rhizobium*, los cuales son llamados genéricamente rizobios [15].

Más recientemente se ha encontrado que las leguminosas (particularmente aquellas pertenecientes al género *Mimosa*), son noduladas por β -Proteobacterias, denominadas beta-rizobios donde los dos géneros nodulantes reconocidos actualmente son *Burkholderia* y *Cupriavidus*. Estos fueron descritos en 2001 en dos estudios paralelos. En uno se aislaron cepas de *Burkholderia* sp. de nódulos de *Aspalathus carnosa* (*Papilionoideae*) en Sudáfrica y de *Machaerium lunatum* (*Papilionoideae*) en la Guyana Francesa. Estas cepas fueron posteriormente denominadas como *Burkholderia tuberum* y *Burkholderia phymatum* [5], [14–16].

En el otro trabajo, también publicado en el año 2001, se obtuvo el aislamiento de *Ralstonia taiwanensis* a partir de dos especies de *Mimosa*, *Mimosa pudica* y *Mimosa diplotricha* (*Mimosoideae*) en Taiwán, el cual fue renombrado como *Cupriavidus taiwanensis* [17, 18].

2.3. Leguminosas

La familia *Leguminosae* surgió hace aproximadamente 120 millones de años como una gran familia de árboles, arbustos o hierbas, se pueden encontrar desde plantas acuáticas

hasta xerófitas, desde rastreras a trepadoras, desde árboles de gran porte hasta hierbas pequeñas. Desde el punto de vista evolutivo se encuentra África como el primer sitio de diversificación, luego se dispersan hacia Sudamérica y Asia y comprenden 700 géneros y 17.000 especies con una distribución cosmopolita en regiones templadas, tropicales y subtropicales [20]. Esta familia se encuentra subdividida en tres subfamilias: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae*. Se cree que las *Caesalpinioideae* son las más primitivas dentro de la familia y que de ellas derivan las dos subfamilias restantes en líneas divergentes, predominan especies arbóreas o arbustos, trepadoras leñosas y algunas herbáceas en regiones tropicales y subtropicales. Poseen distintos usos, desde laxantes comerciales hasta madera. Es difícil determinar el número de especies que constituyen a esta subfamilia ya que aún se están haciendo estudios con esa finalidad, particularmente en Uruguay, se han encontrado 10 géneros y 28 entidades taxonómicas [20]. La subfamilia *Mimosoideae* se encuentra más emparentada a las *Caesalpinioideae* que a las *Papilionoideae*, se cree que se debe a que su origen es muy poco posterior a éstas. Se distribuye en regiones tropicales, subtropicales y templadas cálidas principalmente, aunque ha penetrado en zonas templadas y excepcionalmente en las frías, la mayoría tienen uso forestal u ornamental y son muy pocas las de uso forrajero o como alimento para el hombre. Contiene más de 50 géneros, aunque la mayoría de especies conocidas integran los tres géneros mayores: *Acacia* (1200 especies aproximadamente), *Mimosa* (con más de 400) e *Inga* (con más de 350) [20].

La subfamilia *Papilionoidea* (*Faboideae*) es la más extensa de todas, posee una amplia distribución y gran diversidad debido a que son más de 12.000 las especies encontradas hasta el momento. Se concentran mayormente en las zonas cálidas y son de suma importancia ya que algunas especies pueden utilizarse como forrajeras así como en otros casos se utilizan las semillas y legumbres de otras como alimentos para el hombre y el ganado. En Uruguay, 56 géneros de leguminosas corresponden a esta subfamilia, con 201 especies, de las cuales 130 son nativas y 71 adventicias y cultivadas. Considerando especies y variedades, 232 son las entidades taxonómicas encontradas [21].

2.3.1. Mimosa

Mimosa es un género monofilético que incluye plantas herbáceas, arbustos, y árboles, dentro de la subfamilia *Mimosoideae* de las Leguminosas. Actualmente consta de más de 500 especies en todo el mundo y son capaces de crecer en hábitats ampliamente diversos, desde bosques tropicales, sabanas, bosques seco tropicales y subtropicales, matorrales, desiertos, praderas, hasta humedales; así como también viven en distintos tipos de suelos, ya sea con una baja concentración de nutrientes, con un pH bajo (ácido) o suelos contaminados con metales pesados [20–22].

El principal centro de diversificación es en la región del Cerrado/Caatinga en Brasil, habiéndose descrito más de 300 especies, donde la mayoría son endémicas, que abarca la

zona subtropical de Sudamérica (Paraguay, Argentina, Uruguay y el sur de Brasil) y México. De las 536 especies descritas hasta el momento, 496 se encuentran distribuidas entre Estados Unidos y Argentina, 34 en Madagascar y el resto en el este de África y el sur de Asia. Algunas de estas especies son consideradas malezas invasivas ya que abarcan un amplio rango geográfico. De todos modos, muchas de estas especies poseen un fin socio-económico de sumo interés ya que pueden ser utilizadas para la reforestación, la producción de madera, para la biorremediación de suelos o como plantas medicinales [23].

2.4. Interacción rizobio-leguminosa

La formación del nódulo se origina con lo que se conoce como “diálogo molecular”, y es cuando los rizobios establecen contacto con la rizósfera de las leguminosas. Sin embargo, este fenómeno denominado quimiotaxis no es suficiente para que se dé la interacción, razón por la cual la planta aumenta la secreción de flavonoides. Las bacterias responden a estas señales expresando los genes *nod*, los cuales son necesarios para la formación de este órgano [12]

Los flavonoides son compuestos aromáticos que consisten en dos anillos bencénicos unidos a través de un pirano (Figura 3). Sustituciones específicas en estos anillos producen derivados como flavinas, flavonas, flavononas e isoflavonoides. Hasta el momento se han identificado 4000 tipos de flavonoides diferentes en plantas vasculares, de los cuales un conjunto particular está involucrado en mediar la especificidad de las leguminosas por sus bacterias huéspedes. La especificidad en el reconocimiento de cada flavonoide por la bacteria, es lo que le permite distinguir a su hospedero particular. El flavonoide específico es responsable de inducir la expresión de los genes bacterianos *nod* que codifican para la expresión de los Factores Nod y la quimiotaxis entre rizobios [24].

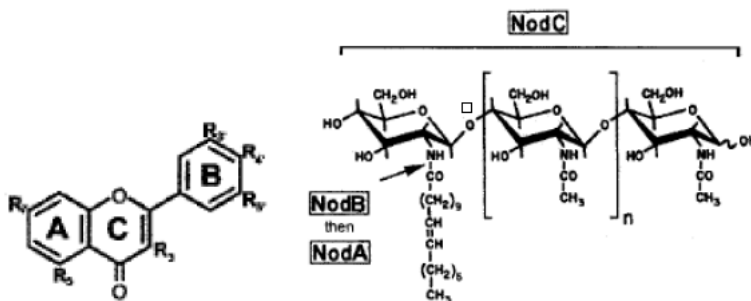


Figura 3. Estructura general de los flavonoides (izquierda) y de los Factores Nod (derecha). En recuadro se indican los nombres de las enzimas responsables de sintetizar las distintas partes de la molécula. Tomado de [24].

Los Factores Nod consisten en un esqueleto de residuos β -1,4-N-acetil-Dglucosamina, los cuales pueden diferir en número entre especies bacterianas e incluso dentro de la misma

especie. Los genes del operón *nodABC* codifican las proteínas necesarias para formar la estructura del núcleo de los factores Nod (Figura 3). Durante las distintas etapas del establecimiento de la simbiosis, los rizobios producen los factores Nod, los cuales afectan a la planta hospedera en diferentes formas: el doblamiento del pelo radicular, formación del primordio nodular y expresión de los genes tempranos de la nodulación [6, 11, 25]. Para que se lleve a cabo la formación del nódulo, los rizobios deben ingresar al tejido de la raíz de la leguminosa. El proceso comienza cuando las bacterias se adhieren a los pelos radiculares, éstos se enrollan atrapando a la bacteria. Luego se hidroliza localmente la pared celular, lo que permite la invaginación de la membrana formando el tubo de infección. Las bacterias ingresan a la planta a través del tubo de infección, llegando a las células corticales (Figura 4).

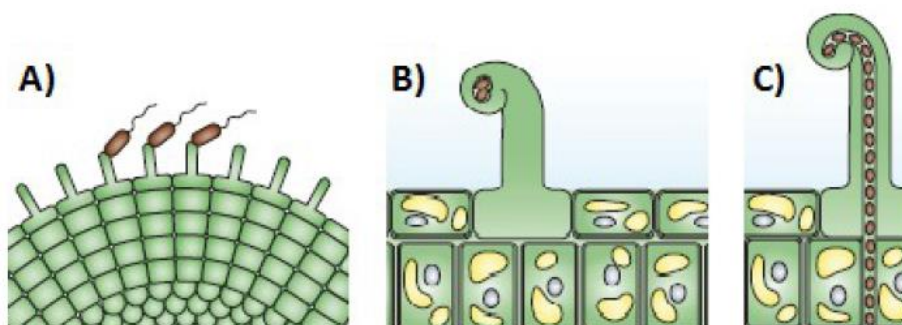


Figura 4. Establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa. **A)** Inicio del diálogo molecular rizobio-leguminosa, unión del rizobio al pelo radicular. **B)** Inicio del hilo de infección. **C)** Penetración del hilo de infección. Tomado de [26].

Como se observa en la Figura 5, las células corticales endocitan las bacterias formando los simbiosomas. Dentro de los simbiosomas, las bacterias maduran a bacteroides, los cuales se encuentran rodeados por la membrana peribacteroidea y constituyen la forma simbiótica donde se lleva a cabo el proceso de FBN [26].

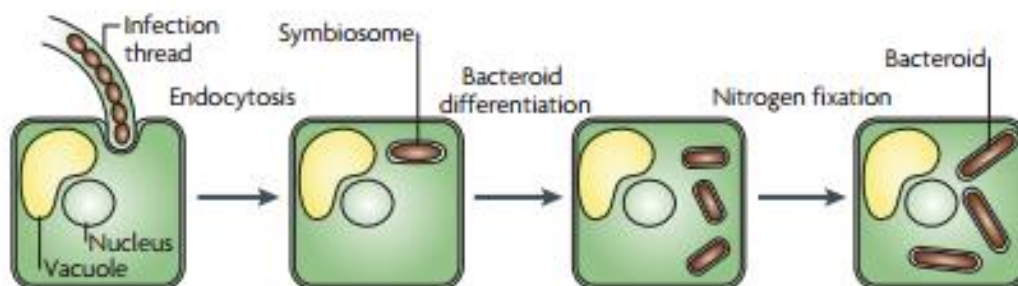


Figura 5. Establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa. Endocitosis y diferenciación del bacteroide. Tomado de [26].

2.5. Evolución de la interacción planta-microorganismo

La transición evolutiva para bacterias patógenas y simbiotes es variada, pero la mayoría implican la transferencia y pérdida de genes que ocurren dentro de los linajes bacterianos. En los genomas, parte de la información genética es indispensable, esta información es la considerada imprescindible para la vida, o sea los genes implicados en la traducción, transcripción, regulación y metabolismo primario [27].

Por otro lado, existe un pool de genes flexibles que codifican para funciones adicionales que no son consideradas esenciales para la vida de la bacteria pero que sí son capaces de otorgarles ventajas bajo determinadas condiciones como pueden ser un cambio en el ambiente o un nuevo hospedero. Dentro de este conjunto de genes se encuentran las islas genómicas, bloques de ADN que por lo general se insertan en genes de ARNt y se encuentran flanqueados por secuencias repetidas (IS) [28].

En rizobios este concepto puede ser aplicado al conjunto de genes que le permite establecer su relación simbiótica con las leguminosa, muchas de las funciones simbióticas son codificadas por genes localizados en el plásmido Sym o simbiótico. Dentro del mismo, se encuentran los genes *nif* (fijación biológica de nitrógeno) y los *nod* (nodulación). Por este motivo, la transferencia horizontal de genes simbióticos es un evento que le confiere una ventaja ecológica a aquellas que lo han adquirido, para establecer una simbiosis efectiva con especies de leguminosas introducidas o exóticas [29].

La existencia de un plásmido simbiótico fortalece la hipótesis de la transferencia horizontal de genes pero aún no es posible evidenciar la dirección de esta transferencia o la identidad del organismo donador.

La evolución de las plantas puede estar relacionada con restricciones reproductivas, geográficas y ambientales, y puede haber una fuerte presión selectiva por patógenos y otros factores además de rizobios, que la estén determinando. Además, se debe tener en cuenta que las bacterias no son simbiotes obligados, son capaces de sobrevivir y crecer en los suelos como un organismo independiente [30].

La diversidad de rizobios provee de un pool de bacterias para ser seleccionadas por la planta, y aquellas que cumplen con las propiedades de ajustarse a la variabilidad individual de la planta, sobrevivir a fluctuaciones en las condiciones ambientales y prevalecer a través del tiempo; serán las más adecuadas para el hospedero [31, 32].

Si la bacteria contribuye con suficiente nitrógeno a la planta, luego habrá suficientes semillas con buena afinidad a esas bacterias. Con ese proceso selectivo en curso, se podría esperar como resultado un incremento en la especificidad en la interacción leguminosa-rizobio, lo que explicaría también por qué se encuentra localmente a una bacteria específica nodulando a una leguminosa. En muchos casos, puede que no haya una coevolución entre leguminosas y rizobios pero sí una constante selección, por parte de la

planta, de microsimbiontes que tengan la capacidad de cambiar y/o adquirir genes simbióticos [33].

Otra hipótesis que ha surgido es que la transferencia horizontal de genes simbióticos puede ocurrir entre rizobios y otras bacterias filogenéticamente relacionadas no simbióticas [34].

Como por ejemplo cuando se analizó el genoma del beta-rizobio *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424 se observó que contiene genes plasmídicos involucrados en la nodulación, pudiendo de esta forma reforzar la hipótesis de que los genes necesarios para la nodulación han sido transferidos horizontalmente de bacteria a bacteria convirtiendo a los diazótrofos de vida libre en simbioses [24].

2.6. Leguminosas nativas en Uruguay

Interesantemente, nuestro país es un límite de distribución para muchas de estas especies lo que lo convierte en un sitio biogeográfico de sumo interés para el estudio de sistemas adaptativos ya sea de la especie vegetal como de los microsimbiontes asociados. Muchas de las especies que componen la flora arbórea y arbustiva del Uruguay viven exclusivamente en la región noreste, región considerada como uno de los hotspots a nivel nacional desde el punto de vista de las prioridades de conservación. Son alrededor del 10% del total, donde la familia de las *Fabaceae* es la tercera, éste se considera un número elevado en comparación con otras regiones de pastizales como las pampas argentinas. De todos modos la cantidad de especies por género es baja, esta es la razón por la cual se menciona que el territorio uruguayo forma parte de los extremos de las áreas de distribución de la región [35].

Dentro de las *Fabaceae*, *Mimosa* es el género con mayor abundancia de la subfamilia *Mimosoideae*, posee 48 entidades distribuidas en dos hábitats distintos: el serrano, donde las especies forman matorrales densos en el bosque y sus bordes, se presentan de hábito erecto o pueden formar colchones rastreros; y el hábitat ribereño, típico de las costas de ríos y arroyos donde se desarrollan con forma de arbustos o arbolitos erectos a semierectos, con follaje más delicado y legumbres y/o semillas adaptadas al traslado por las corrientes de agua. [20].

2.7. Antecedentes

Una de las principales líneas de investigación del Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas (BIOGEM) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) está centrada en el estudio de bacterias del suelo de uso potencial para el mejoramiento de plantas. Consideramos que el relevamiento y la conservación del germoplasma de las leguminosas nativas y de sus rizobios asociados permitirán mantener un acervo genético de una parte de la diversidad de nuestros bosques y pasturas. Los datos que se generen podrán contribuir al diseño de estrategias que permitan un aprovechamiento sustentable de los recursos naturales y de su conservación. Dentro de esta línea se han realizado estudios sobre una leguminosa arbórea nativa (*Parapiptadenia rigida* o angico) y los rizobios asociados a esta especie, donde se aislaron, identificaron y caracterizaron microsimbiontes provenientes de los nódulos de este árbol. Se observó que angico puede ser nodulado por cepas bacterianas que fueron aisladas de otras leguminosas y que la mayoría de sus aislamientos pertenecen al género *Burkholderia*, aunque también se encontraron microsimbiontes del género *Cupriavidus* y *Rhizobium*. De hecho, ese fue el primer estudio reportado en que angico puede ser eficientemente nodulado por cepas pertenecientes al género *Cupriavidus* [36]. Se ha caracterizado la diversidad botánica de leguminosas presentes en los Esteros de Farrapos e islas del río Uruguay, se encontró que al menos 30 de los 51 géneros nativos citados para el Uruguay se encuentran en esta región del país, concentrándose en los ambientes de arenal donde predominan plantas herbáceas de porte pequeño, tapizantes o rastreras. Sin embargo el número de poblaciones de algunas de estas especies es bajo. Además la presencia de las poblaciones en el tiempo no es constante, se presume que se debe a adaptaciones finas a condiciones abióticas que las hacen desaparecer transitoriamente como el nivel de precipitaciones invernales previos al desarrollo primaveral de los individuos. También se observaron las características germinativas de las semillas de las leguminosas colectadas y se creó una base de datos que contiene información sobre las especies de leguminosas, sus semillas y cepas bacterianas asociadas, permitiendo el intercambio y la actualización de la información entre pares, ya que cuanto mayor sea el conocimiento de las especies mejores serán los resultados en materia de conservación [37]. Y más recientemente se ha comenzado un relevamiento de los rizobios asociados a Mimosas. Se cuenta con una colección de microsimbiontes obtenidos a partir de *Mimosa uraguensis*, *M. adpressa*, *M. pilulifera*, *M. ramulosa*, *M. reptans*, *M. chelata*, *M. magentea* y *M. schleidenii*.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Contribuir a la sustentabilidad ambiental mediante la generación del conocimiento, preservación y uso de un recurso natural de nuestros suelos como son las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno asociadas a plantas nativas. En particular proponemos centrarnos en el estudio de bacterias asociadas a Mimosas en Uruguay.

3.2. Objetivos específicos

- i. Incrementar la colección disponible en el laboratorio, de microsimbiontes naturalmente presentes en nódulos de diferentes especies de Mimosas de Uruguay.
- ii. Identificar el género al que pertenecen los microsimbiontes y determinar su filogenia.
- iii. Seleccionar un grupo de microsimbiontes conformado por representantes de cada una de las diferentes especies de Mimosas prospectadas y caracterizarlos fisiológicamente según parámetros de interés ambiental.
- iv. Determinar su capacidad de promover el crecimiento de la planta.
- v. Caracterizar la interacción simbiótica establecida entre algunas cepas y las leguminosas hospederas.

4. Materiales y métodos

4.1. Aislamiento de microsimbiontes

Una vez colectados, los nódulos se lavaron con agua para retirar la tierra adherida. Para esterilizar su superficie se trataron primero con etanol 95% durante 5 minutos y luego con una solución de hipoclorito de sodio 2% durante 5-10 minutos. Por último se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril. Se efectuaron controles del proceso de desinfección frotando un nódulo, sin dañarlo, por la superficie de medio YMAG sólido (Yeast Extract Mannitol Glutamate) [38] (su composición se detalla en el Anexo 1), y se incubó a 30°C durante 48hs. Los nódulos desinfectados, se maceraron en forma individual entre dos portaobjetos estériles. La suspensión obtenida se sembró en medio YMAG sólido y los cultivos se incubaron a 30°C. Las colonias obtenidas fueron repicadas sucesivamente un par de veces, para asegurarse la obtención de cultivos puros. Finalmente, los aislamientos se crecieron en medio YMAG líquido y se guardaron en una solución de glicerol estéril 25% (v/v) a -80°C.

4.2. Caracterización genotípica

4.2.1. Criterio para la denominación de los aislamientos de la colección

Los aislamientos de la colección se nombraron con las letras en mayúscula “UY”, haciendo referencia al país; seguido de la primera letra del género y la primera letra del epíteto de la especie vegetal de la cual fueron aislados (también en mayúscula); y el número de referencia de la colecta. Por ejemplo el aislamiento de *Mimosa uragüensis*, con número de colecta 48, fue nombrado “UYMU48”.

4.2.2. Amplificación por PCR de una región del gen del ADNr 16S

Para el caso de los aislamientos *Cupriavidus sp.* UYPR2.512, UYMP09A, UYMR05A y UYME01A ya se contaba en el laboratorio con su ADN genómico purificado y se realizó la amplificación empleando ese ADN como molde. Para el resto de las cepas se colocó directamente las células bacterianas en la mezcla de reacción. Para ellos se tocó con la punta de un palillo estéril la colonia bacteriana crecida en medio sólido y las colonias adheridas al palillo se dispersaron en la solución de reacción. Se realizó la amplificación por PCR de un fragmento de aproximadamente 1500 pares de bases (pb), utilizando los cebadores 27f y 1492r cuyas secuencias se adjuntan en la Tabla 1. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl conteniendo 2,5 µl de *Dream Taq Buffer* 10X (Thermo Scientific #B65) que incluía MgCl₂ 20 mM; 1 µl de deoxi-nucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM, 1 µl de cada cebador 10 µM y 0,25 µl de ADN polimerasa (5 U/µl, *Dream Taq*

Polymerase, Thermo Scientific #). Como molde se utilizaron 1,0 µl de ADN genómico o directamente las células bacterianas. Para la reacción de amplificación se utilizó un termociclador con el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 59°C y 90 segundos a 72°C, estos tres últimos pasos corresponden a la desnaturalización del ADN, hibridación de los cebadores al molde de ADN y a la extensión de la cadena de ADN, respectivamente. Para finalizar se realizó un paso de elongación final de las cadenas de ADN de 7 minutos a 72°C [39].

4.2.3. Amplificación por PCR del gen *nifH*

La amplificación por PCR el gen *nifH*, gen que codifica para la subunidad estructural de la enzima nitrógeno reductasa, se realizó en forma similar al procedimiento seguido para la amplificación del ADNr 16S empleando dos juegos de cebadores diferentes: primero se emplearon los cebadores universales PolR y PolF obteniendo un fragmento conservado de 327 pb, para las cepas que no se obtuvo producto de amplificación se repitió el procedimiento pero con cebadores más específicos, diseñados específicamente a partir del gen *nifH* del género *Cupriavidus* lográndose un fragmento de aproximadamente 600 pb. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl conteniendo 2,5 µl de *Dream Taq Buffer* 10X (Thermo Scientific #B65) que incluía MgCl₂ 20 mM; 1 µl de deoxi-nucleótidos trifosfato (dNTPs) 10mM, 1 µl de cada cebador 10µM y 0,25 µl de ADN polimerasa (5 U/µl, *Dream Taq Polymerase*, Thermo Scientific #). Como molde se utilizaron directamente las células bacterianas crecidas en YMAG. Para la reacción de amplificación se utilizó un termociclador con el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 58°C y 45 segundos a 72°C, con un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72°C.

Tabla 1. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en la amplificación de los genes que codifican para los genes ADNr 16S y *nifH* y sus respectivas temperaturas de fusión.

Gen amplificado	Cebador	Secuencia de ácidos Nucleicos	Temp. de fusión (°C)
ADNr 16S	27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	Tm 53°C
	1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	Tm 55°C
<i>nifH</i>	PolF	5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3'	Tm 55°C
	PolR	5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3'	Tm 56°C
	<i>CupriaF</i>	5'-CCTTTTATGGTAAAGGCGGCATCGG-3'	Tm 55°C
	<i>CupriaR</i>	5'-CCATCAGCAGATCTTCCAACCTGGTCC-3'	Tm 56°C

4.2.4. Visualización y secuenciación de los productos de PCR

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% (p/v) en buffer Tris-Acético-EDTA (TAE 1X) sometido a 90 V y teñido con el intercalante molecular Syber Safe siguiendo las indicaciones del proveedor de 1 µl cada 50 ml de gel y se visualizaron mediante exposición al UV. Se incluyó el marcador de peso molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas #SM1332).

La purificación del ADN y la secuenciación de los amplicones correspondientes a los 11 aislamientos fueron llevadas a cabo por Macrogen Inc. (Corea). Las secuencias nucleotídicas resultantes se compararon con las disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando el algoritmo BLASTn (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) en el sitio <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>.

4.2.5. Análisis filogenético

Para llevar a cabo el alineamiento de secuencias y la construcción filogenética se utilizó el programa Mega 6.0 [40] utilizando los métodos *Neighbour joining* [41] y *Maximum Likelihood* [42]. Para este último, el apoyo estadístico a los nodos se evaluó mediante la técnica de bootstrap de 100 réplicas [43]. Fue elegido el modelo de sustitución *Tamura 3* parámetros + distribución Gamma, considerando 5 categorías discretas de Gamma y sitios invariantes (TN91+G+I). Además de las cepas a analizar se sumaron cepas ya reportadas como referencia, las cuales fueron tomadas de la base de datos del NCBI.

4.3. Caracterización fisiológica

4.3.1. Tolerancia y crecimiento de las cepas a distintos pH

Se determinó la tolerancia de las cepas en el medio sólido nutritivo YMAG, y su crecimiento en el mismo medio de cultivo pero líquido utilizando un rango de pHs de 5 a 9.

Para el primero, se modificó el pH del medio antes de colocarle el agar, se sembraron las 11 cepas y se incubaron por 48 horas a 30°C. Para los ensayos realizados en medio líquido, se seleccionaron tres cepas de la colección (*Cupriavidus sp.* UYPR2.512, *Cupriavidus sp.* UYMU48A, y *Cupriavidus sp.* UYMSc13B) teniendo en cuenta que procedan de distintas regiones del país. Se realizó un inóculo primario resuspendiendo en 5 ml de medio líquido una ansada de células provenientes de un cultivo fresco en medio sólido. Se incubó con agitación a 10000 rpm y a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 620 nm de aproximadamente 1 (luego de dos días). Se tomó una alícuota de 100 µl la cual se empleó para inocular 1 ml de medio YMAG líquido y los cultivos se mantuvieron a 30°C con agitación constante. Periódicamente, se tomaron alícuotas sucesivas para determinar la DO_{620nm} a lo largo del tiempo.

4.3.2. Solubilización de fosfatos inorgánicos

Para evaluar la capacidad de los aislamientos de solubilizar fosfato se utilizó el medio NBrip sólido. Su composición se encuentra detallada en el Anexo 1. Entre sus componentes, se encuentra el fosfato tricálcico, de modo que aquellas cepas capaces de solubilizar el precipitado de fosfato tricálcico (generalmente mediante la producción de ácidos orgánicos con la consecuente disminución de pH del medio) generarán un halo translúcido alrededor de la colonia. Los aislamientos se incubaron en este medio durante dos semanas a 30°C [44].

4.3.3. Actividad guaiacol oxidasa

Para detectar la actividad de la enzima guaiacol oxidasa se evaluó el crecimiento de las cepas bacterianas en medio sólido YMAG suplementado con 0,3 g/L de guaiacol y 40 mg/L de sulfato cúprico. El sulfato cúprico se agrega con la finalidad de suplementar el medio con cobre, el cual es necesario para la función de la lacasa ya que es su cofactor y el guaiacol es el sustrato que será oxidado por la enzima. Se considera un resultado positivo cuando se observa la formación de un compuesto amarronado debido a la oxidación del guaiacol. Los aislamientos se incubaron en este medio durante 72 horas a 30°C [45].

4.3.4. Producción de sideróforos

Se utilizó el ensayo de cromo azurol-S (CAS) para identificar los productores de sideróforos, ya que esta técnica permite detectar la presencia de compuestos quelantes de hierro. La composición del medio se encuentra detallada en el Anexo 1. El método está basado en que el CAS se une al ion férrico formando un complejo que le otorga al medio de cultivo una coloración azul mientras que el complejo sin hierro es de color naranja. Aquellos aislamientos que sinteticen y secreten compuestos quelantes con mayor afinidad hacia el hierro que el CAS, provocarán un viraje de color en el medio formando un halo anaranjado entorno a la colonia. Es necesario destacar que este medio de cultivo no se preparó suplementando con CAS al medio YMAG, ya que las cantidades de hierro presentes en el medio deben estar en una relación estequiométrica con el complejo y el pH rigurosamente ajustado. El complejo contiene también un detergente (hexadecil trimetil amonio o HDTMA) que puede resultar tóxico para algunas bacterias. Los cultivos en medio CAS se incubaron a 30°C durante una semana [46].

4.3.5. Crecimiento con distintas fuentes de carbono

Para evaluar la capacidad de las cepas para crecer con distintas fuentes de carbono: succinato, citrato, glicerol, fenol, tolueno o n-butanol se modificó el medio YMAG sólido quitando el manitol y el glutamato y disminuyendo la concentración de extracto de levadura a 0,05 g/L, además se adicionó como fuente de nitrógeno 5 g/L de NH₄Cl. El succinato, el citrato y el glicerol se agregaron como suplemento al medio YMAG sólido

modificado con una concentración de 100 g/L. En el caso del fenol, del tolueno y del n-butanol se procedió de manera distinta, se utilizó el mismo medio pero en estos caso como se trata de compuestos volátiles, la incorporación de las fuentes carbonadas se hizo por evaporación colocando 10 µL en la tapa de la placa de Petri (las placas deben de ser de vidrio para que los reactivos no perjudiquen la placa) y luego se cierran herméticamente con Parafilm. Se utilizó como control negativo el crecimiento de las cepas en el medio YMAG modificado sin fuente de carbono.

Los cultivos se incubaron a 30°C durante 10 días.

4.3.6. Resistencia a metales pesados

La tolerancia a metales de las cepas bacterianas se evaluó en medio sólido. El ensayo en medio sólido consistió en agregarle metales pesados como CdCl₂ (5 mM, 500 µM y 50 µM), K₂TeO₃ (4 mM, 500 µM y 50 µM), CdCl₂ (5 mM) + K₂TeO₃ (4 mM) CuSO₄ (1 mM y 500 µM), MnCl₂ (5 mM, 1 mM y 500 µM), CoCl₂ (1 mM, 750 µM y 500 µM), ZnCl₂ (1 mM y 500 µM), NiCl₂ (1 mM y 500 µM), AgNO₃ (200 µM, 100 µM y 50 µM) y FeCl₃ (1 mM y 500 µM) al medio YMAG. Se utilizó como referencia el trabajo hecho por Chen et al. [47].

4.3.7. Resistencia a antibióticos

Se evaluó la resistencia a los siguientes antibióticos: estreptomycin 50 µg/µl, cloranfenicol 20 µg/µl, ampicilina 20 µg/µl, gentamicina 20 µg/µl, neomicina 10 µg/µl y 5-hidroxinitrofurantoina 20 µg/µl agregados al medio YMAG sólido. Cada placa fue sembrada con rastrillo con 100 µl de inóculo a partir de cada una de las 11 cepas. Luego se colocaron 3 discos de papel de filtro que contenían cada uno un antibiótico distinto y se evaluó la presencia de halo generado por la ausencia de crecimiento alrededor del antibiótico en el caso de las cepas susceptibles. El ensayo se realizó por duplicado.

En el caso de obtener resultados dudosos se procedió a hacer un ensayo en medio líquido. En este caso se partió de un inóculo primario obtenido en forma similar a la descrita en la sección anterior. Se tomaron alícuotas de 200 µl de cultivo las que se usaron para inocular 1 ml de medio fresco suplementado con los distintos antibióticos. Se utilizó como control YMAG sin antibiótico y se consideró como cepa sensible si el crecimiento era igual o menor a la mitad del crecimiento del control [48]. Las cepas utilizadas en este caso fueron *Cupriavidus sp.* UYPR2.512, *Cupriavidus sp.* UYMA12B, *Burkholderia sp.* UYMP09A y *Cupriavidus sp.* UYMSc13B.

4.4. Promoción del crecimiento vegetal

4.4.1. Desinfección y germinación de semillas

Para este ensayo se utilizó *Mimosa pudica* como hospedero. Se llevó a cabo la esterilización de la superficie sumergiendo las semillas en H₂SO₄ concentrado (10 M) durante 5 minutos, luego se hicieron 5 lavados con agua estéril y las semillas se

sumergieron en una solución de HgCl₂ 9,2 mM y HCl 0,1 N durante 3 minutos, seguido de 7 lavados con agua estéril. Las semillas desinfectadas, se dejaron hinchando en el agua del último enjuague a 30°C durante un día.

Posteriormente se colocaron las semillas en Agar-Agua 0,8% (p/v) y se dejaron germinar a 30 °C.

4.4.2. Ensayo con plantas en condiciones gnotobióticas

Las semillas germinadas se colocaron en tubos de 20 cm de altura y 3 cm de diámetro conteniendo 15 ml de medio Jensen semi-sólido (0,8% de agar) sin nitrógeno agregado [38] y se crecieron en condiciones controladas a 26°C con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

A los 15 días las plántulas se inocularon con una suspensión bacteriana de 10⁷-10⁸ células por planta. Este inóculo se obtuvo mediante la dilución 1:100 en H₂O destilada estéril a partir un inóculo primario crecido hasta fase exponencial tardía que poseía una DO a 620 nm cercana a 1, lo cual equivale a unas 10⁹ células/ml. Como control negativo se agregó 1 ml de H₂O destilada estéril a las plantas testigo y como control positivo de fertilización nitrogenada se agregó 1ml de KNO₃ 0,5% por planta. Se emplearon 5 plántulas por tratamiento totalizando 65 plantas por ensayo.

4.4.3. Efectividad de nodulación

Para evaluar la efectividad de los nódulos formados se observó su coloración ya que en general los nódulos de color rosado son indicadores de la presencia de leghemoglobina y de efectividad en la FBN. Se determinó también la capacidad de promover el crecimiento vegetal en medios sin agregado de fuentes de nitrógeno. Esta última condición se evaluó determinando el peso seco de la parte aérea de cada plántula.

4.5. Análisis de la interacción planta-microorganismo

Para analizar la especificidad en la interacción entre la planta y el microorganismo se llevó a cabo un ensayo de promiscuidad de hospedero. Este consiste en probar la capacidad que tienen las cepas de infectar y formar nódulos en diferentes géneros y especies de leguminosas. Las leguminosas utilizadas fueron: *Medicago sativa* (alfalfa), *Mimosa pudica*, *Mimosa uragüensis*, *Mimosa polycarpa*, *Leucaena leucocephala* y *Chamaecrista flexuosa*. El ensayo se realizó en condiciones similares a las descritas en el ensayo anterior, modificando solamente el tiempo de desinfección de las semillas el cual fue de 10 minutos en el caso de *Ch. flexuosa* y *L. leucocephala* y 20 minutos para las semillas de *M. polycarpa*.

5. Resultados

5.1. Aislamiento de microsimbiontes

A partir de los nódulos adquiridos de *M. chelata* y de *M. exedentis* se obtuvieron al menos tres aislamientos bacterianos de cada especie vegetal, provenientes cada uno de diferentes nódulos. Los aislamientos obtenidos, se agregaron a la colección ya existente en el laboratorio. Se seleccionó al azar una cepa proveniente de cada una de las diferentes especie vegetales prospectadas (en total 11 cepas) para analizarlas con mayor profundidad (Tabla 2). Como se muestra en la tabla, las colectas provenían de diferentes lugares del país: dos del norte (uno de Artigas y otro de Rivera), tres del litoral (Río Negro), cuatro del este (Lavalleja) y dos del sureste (uno de Maldonado y otro de Rocha).

Tabla 2. Cepas aisladas en este trabajo.

CEPA	Hospedero	Lugar de colecta	Coordenadas geográficas	Fecha de colecta	Género según 16S ADNr
UYPR2.512	<i>Parapiptadenia rigida</i>	Artigas, Bosque nativo cerca de Arroyo Mandiyú	S 30° 31' 13.4" W 57° 41' 53.8"	Diciembre, 2006	<i>Cupriavidus sp</i>
UYMU48A	<i>Mimosa uruguensis</i>	Río Negro, Pto Viejo	S 32° 38' 18.52" W 58 °8' 53.51"	22/10/2010	<i>Cupriavidus sp</i>
UYMA12B	<i>Mimosa adpressa</i>	Río Negro, Nuevo Berín	S 32° 59' 02.0" W 58° 3' 49.2"	08/04/2011	<i>Cupriavidus sp</i>
UYMP09A	<i>Mimosa pilulifera</i>	Río Negro, Nuevo Berlin	S 32° 59' 02.0" W 58° 3' 49.2"	08/04/2011	<i>Burkholderia sp.</i>
UYMSp04A	<i>Mimosa springelii</i>	Rivera, Bajada de Pena	S 31° 08' 46.7" W 55° 53' 55.9"	11/05/2012	<i>Cupriavidus sp</i>
UYMR05A	<i>Mimosa ramulosa</i>	Lavalleja, Minas, Aguas Blancas	S 34° 31' 34.3" W 55° 19' 0.6"	11/10/2011	<i>Cupriavidus sp</i>
UYMSc13B	<i>Mimosa schleidenii</i>	Lavalleja, Minas, Aguas Blancas	S 34° 30' 47.2" W 55°21' 16.5"	20/04/2013	<i>Cupriavidus sp</i>
UYMM02A	<i>Mimosa magentea</i>	Lavalleja, Minas, Aguas Blancas	S 34° 30' 47.2" W 55°21' 16.5"	23/04/2012	<i>Cupriavidus sp</i>
UYMRe04A	<i>Mimosa reptans</i>	Lavalleja, Minas, Aguas Blancas	S 34° 30' 47.2" W 55°21' 16.5"	23/04/2012	<i>Cupriavidus sp</i>
UYMC03	<i>Mimosa chelata</i>	Maldonado, Punta Ballena	S 34° 54' 39.48" W 55° 2' 40.83"	28/09/2013	<i>Cupriavidus sp</i>
UYME01A	<i>Mimosa excedentis</i>	Rocha, Parque San Miguel	S 33° 41' 29.29" W 53° 32'49.06"	30/11/2013	<i>Cupriavidus sp</i>

5.2. Caracterización genotípica

5.2.1. Identificación de los aislamientos

Con el propósito de identificar los géneros a los que pertenecían las cepas bacterianas seleccionadas se analizaron las secuencias de los amplicones de una región del ADNr 16S. Hubieron distintos puntos de partida para llegar a la amplificación, en el laboratorio ya se contaba con el ADN genómico purificado de cuatro de las cepas (*Cupriavidus sp.* UYPR2.512, *Burkholderia sp.* UYMP09A, *Cupriavidus sp.* UYMR05A y *Cupriavidus sp.* UYME01A) y por lo tanto se utilizó como molde para la amplificación, para las cepas restantes se amplificó a partir de colonia. En el caso de *Cupriavidus sp.* UYMU48A, *Cupriavidus sp.* UYMA12B y *Cupriavidus sp.* UYMSp4A no fue posible la amplificación a partir directamente de la colonia, y se se procedió a obtener el lisado de estas colonias, obteniéndose mediante esta aproximación los amplicones esperados. Como era de esperar, los amplicones obtenidos tenían alrededor de 1450 pb, no observándose luego de la corrida electroforética, productos de amplificación inespecíficos ni producto de amplificación en el control negativo.

Se analizaron las secuencias mediante BLASTn empleando la base de datos del NCBI. Los géneros correspondientes a cada aislamiento se muestran en la Tabla 2, donde se puede observar que diez de los once aislamientos corresponden al género *Cupriavidus* y sólo uno (proveniente del aislamiento obtenido de nódulos de *M. pilulifera*) al género *Burkholderia*.

5.2.2. Presencia del gen *nifH* en los microsimbiontes

Al igual que para el gen que codifica el ADNr 16S se partió de distintos materiales para obtener la amplificación; colonia, lisado de colonia o ADN genómico. Se observaron productos de amplificación correspondientes a unos 300 pb como era de esperarse, indicando la presencia del gen *nifH*. No se encontraron productos de amplificación inespecíficos ni se observó banda en el control negativo. Sus secuencias fueron comparadas mediante el algoritmo BLASTn en las bases de datos y todas correspondieron a un fragmento del gen *nifH* de rizobio. Se obtuvieron resultados congruentes entre el género identificado mediante el análisis de la secuencia de ADNr 16S y el género correspondiente a la secuencia del gen *nifH*.

5.2.3. Análisis filogenético

Se alinearon las secuencias correspondientes a las cepas de interés, incluyendo en el análisis secuencias del gen que codifica para el ADNr 16S y del gen *nifH* de cepas de referencia, las cuales fueron obtenidas de la base de datos del NCBI. La construcción filogenética se realizó con el programa Mega 6 utilizando los métodos Neighbour joining y Maximum Likelihood. Mediante los dos métodos de construcción filogenética utilizados, se observó la misma topología de árbol. Se optó por trabajar con el que fue construido por

el método *Maximum Likelihood* ya que presentaba valores más altos de bootstrap en sus nodos. El árbol filogenético que se muestra en la Figura 6 es el obtenido luego del análisis del gen que codifica para el ADNr 16S. Los valores de bootstrap no fueron significativos.

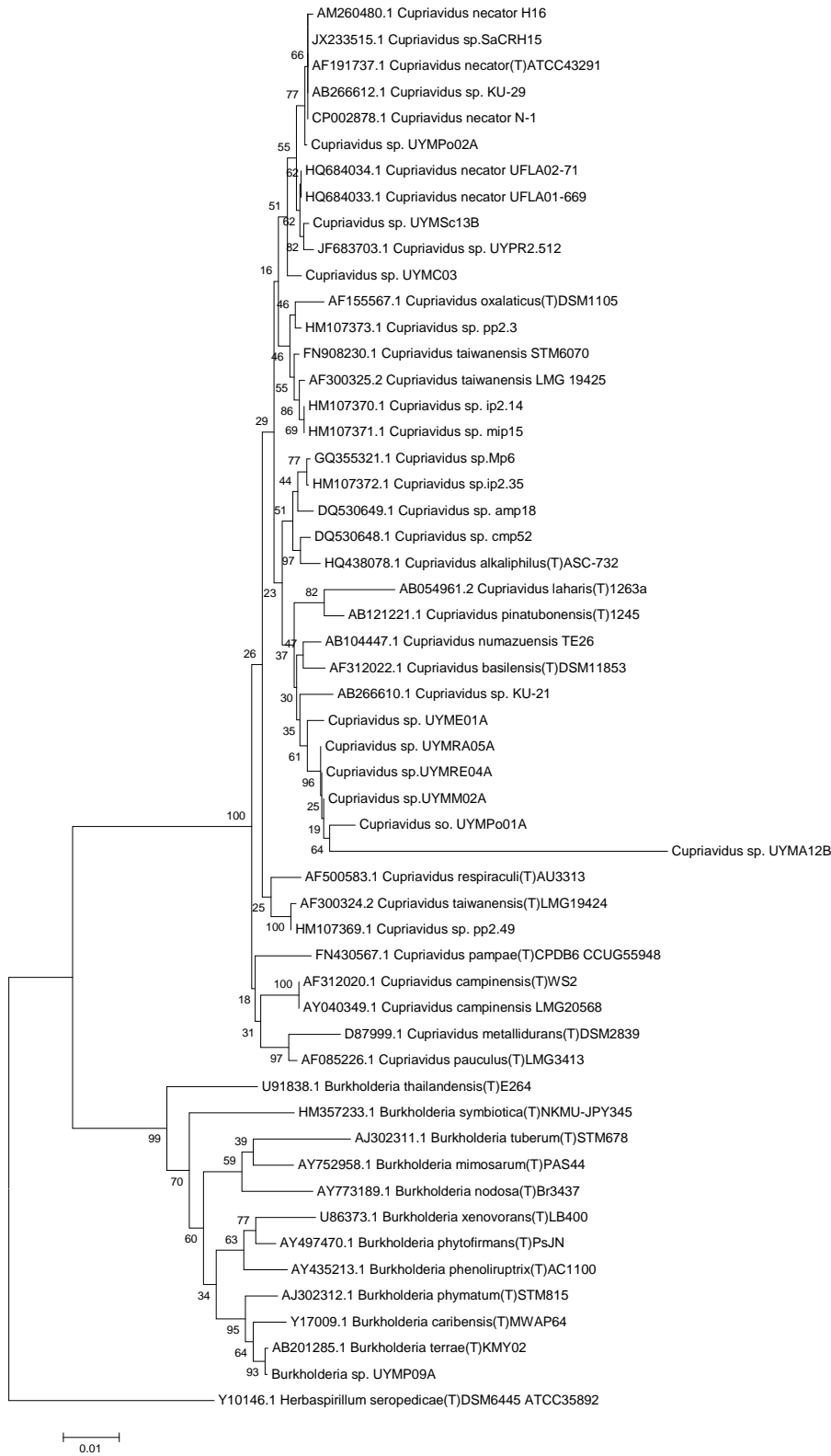


Figura 6. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias del gen del ADNr 16S.

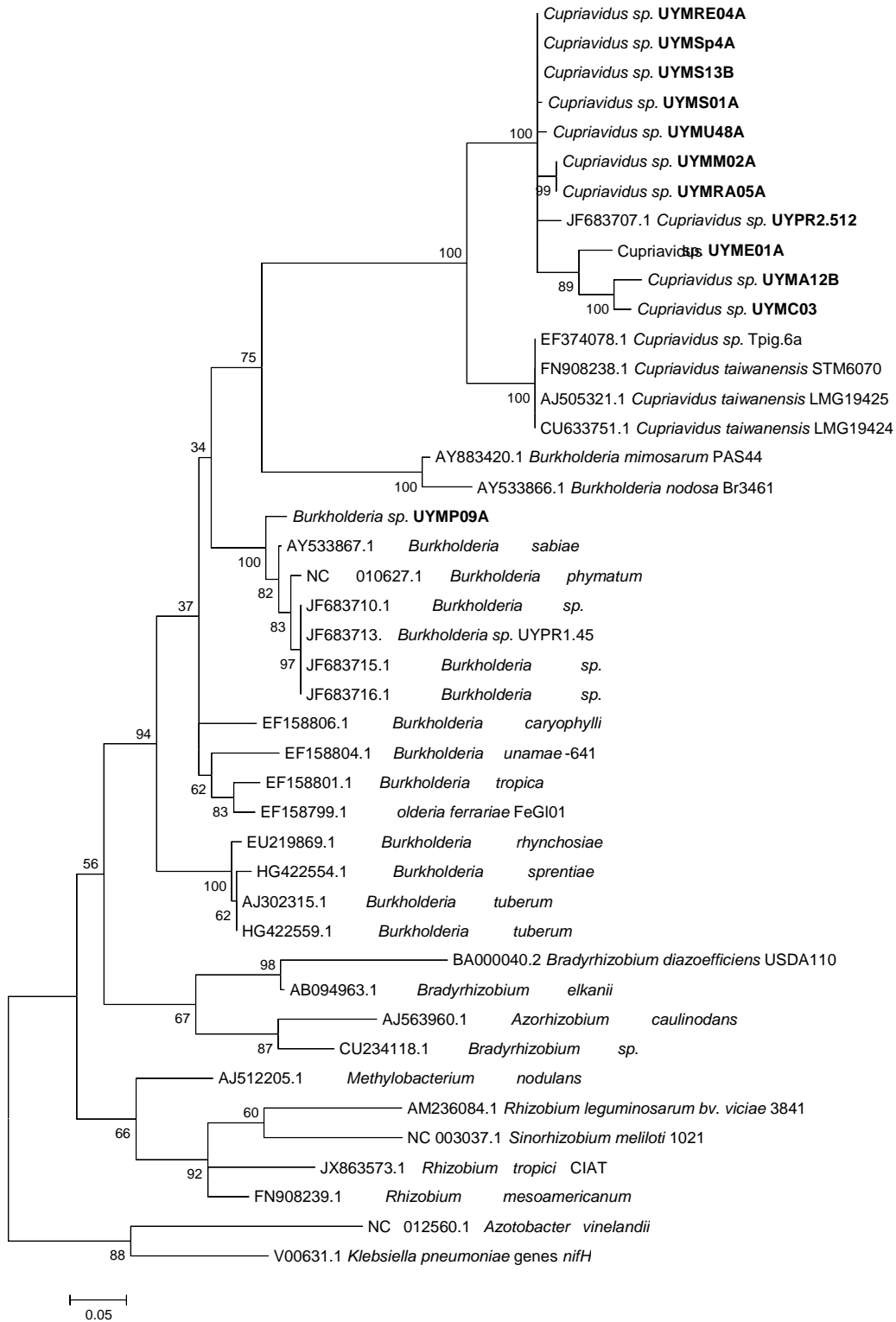


Figura 7. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias del gen *nifH*.

Con respecto al árbol filogenético obtenido para el gen *nifH*, los valores de bootstrap fueron significativos, en este caso también se observan grupos diferenciales, donde todas las cepas de interés que pertenecen al género *Cupriavidus* forman un mismo clado, mientras que *Burkholderia* sp. UYMP09A se integra al clado del género *Burkholderia* (Figura 7)

5.3. Caracterización fisiológica

5.3.1. Crecimiento de cepas a distintos pHs

El ensayo de crecimiento de los microsimbiontes a distintos pHs en medio sólido reveló que todos son capaces de tolerar un rango entre 5 y 8, a un pH de 9 el crecimiento se ve más comprometido para algunas cepas como es el caso de *Cupriavidus* sp. UYPR2.512, *Cupriavidus* sp. UYMU48A y *Burkholderia* sp. UYMP09A ya que se observan pocas colonias y de tamaño pequeño. Los resultados se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Tolerancia en medio sólido a distintos pHs.

CEPA	Crecimiento en YMAG a distintos pHs ^a				
	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
<i>Cupriavidus</i> sp. UYPR2.512	+	+	++	+	CA
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMU48A	+	+	+	+	CA
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMA12B	+	+	+	+	ND
<i>Burkholderia</i> sp. UYMP09A	++	++	++	++	CA
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMSp04A	++	++	+	++	+
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMR05A	++	++	++	++	+
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMM02A	++	++	++	++	++
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMR04A	+	++	++	++	+
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMSc13B	++	++	++	++	+
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMC03	++	++	++	++	++
<i>Cupriavidus</i> sp. UYME01A	+	+	++	+	+

^a +: Crecimiento moderado; ++: Buen crecimiento; CA: Pocas colonias pequeñas aisladas; ND: No determinado

Luego se seleccionaron tres cepas (*Cupriavidus* sp. UYMSc13B, *Cupriavidus* sp. UYMU48A y *Cupriavidus* sp. UYPR2.512), procedentes de distintas regiones del país y se evaluó su crecimiento en medio líquido a distintos pHs mediante la determinación de su DO_{620 nm} a diferentes tiempos.

El análisis de las curvas de crecimiento indica que en medio líquido el crecimiento se ve severamente afectado a pH 5, mientras que no se obtuvieron diferencias significativas en el crecimiento en el rango de pHs de 6 a 9 (Figura 8). Además se pudo observar para este rango un valor máximo de DO de alrededor de 6 y un comienzo de la fase exponencial del crecimiento cercano a 2 para las cepas *Cupriavidus* sp. UYMU48A y *Cupriavidus* sp.

UYPR2.512, mientras que para la cepa *Cupriavidus sp.* UYMSc13B la fase lag fue más extensa, pues la fase exponencial comenzó a una DO de 3 aproximadamente. En los cinco valores de pHs analizados se puede observar que la fase estacionaria comienza a las 20 hs de incubación aproximadamente, aunque a pH 5 no se observa con tanta claridad como en el resto de los casos.

Una vez finalizado el ensayo, se determinó el pH del cultivo, no observándose diferencias significativas con respecto al pH de partida. El ensayo se realizó en dos ocasiones donde se obtuvo como resultado un perfil similar. Se muestran los gráficos de una de las repeticiones de forma representativa.

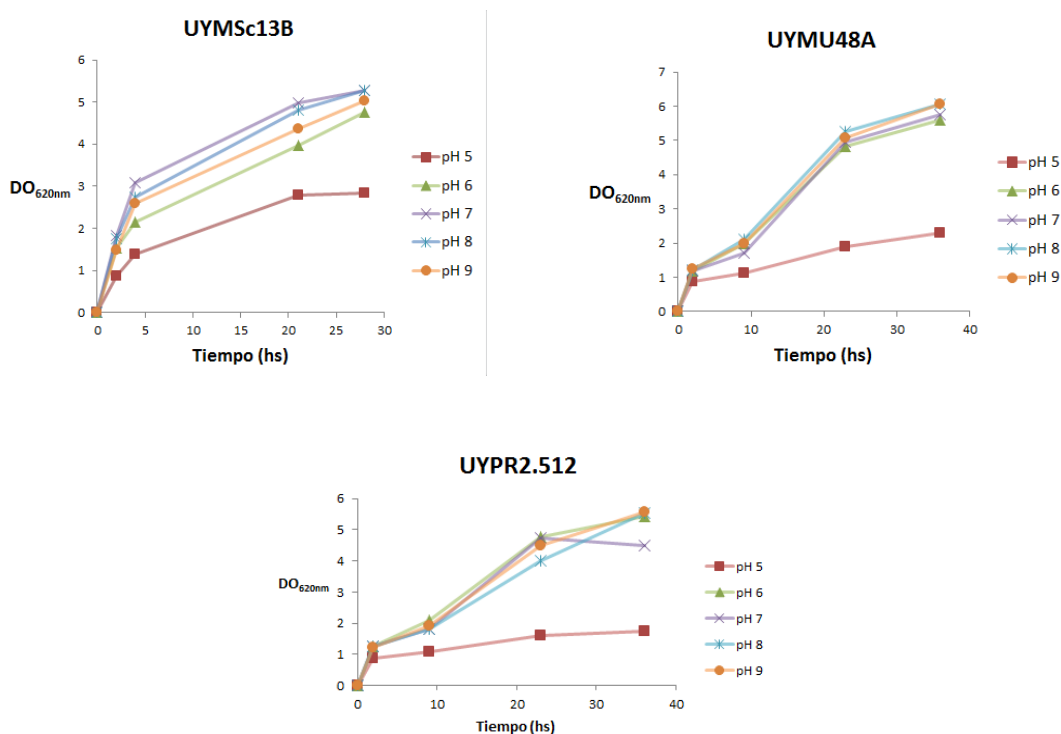


Figura 8. Crecimiento en medio líquido de las cepas *Cupriavidus sp.* UYMSc13B, *Cupriavidus sp.* UYMU48A y *Cupriavidus sp.* UYPR2.512 a diferentes pHs.

5.3.2. Solubilización de fosfato

Se llevó a cabo el ensayo de los once microsimbiontes en el medio de cultivo NBrip. Todas las cepas fueron capaces de tolerar este medio de cultivo, sin embargo sólo *Burkholderia sp.* UYMP09A fue capaz de solubilizar el precipitado de fosfato tricálcico, generando un halo translúcido alrededor de la colonia. Conjuntamente se observó un cambio en la morfología de la colonia, lo cual resultó interesante para tener en cuenta en estudios posteriores, ya que un cambio de este tipo puede deberse a la proliferación celular. Para este ensayo se utilizó como control positivo *Acinetobacter sp.* UYSO03 [49].

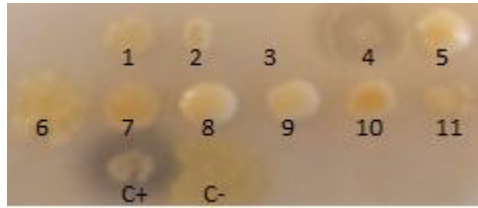


Figura 9. Solubilización de fosfato por parte de la cepa *Burkholderia sp.* UYMP09A.

1: *Cupriavidus sp.* UYPR2.512; 2: *Cupriavidus sp.* UYMU48A; 3: *Cupriavidus sp.* UYMA12B; 4: *Burkholderia sp.* UYMP09A; 5: *Cupriavidus sp.* UYMSp04A; 6: *Cupriavidus sp.* UYMR05A; 7: *Cupriavidus sp.* UYMM02A; 8: *Cupriavidus sp.* UYMSc13B; 9: *Cupriavidus sp.* UYMRe04A; 10: *Cupriavidus sp.* UYMC03; 11: *Cupriavidus sp.* UYME01A; C+: *Acinetobacter sp.* UYSO03.

5.3.3. Actividad guaiacol oxidasa

En el medio ensayado para detectar actividad guaiacol oxidasa hubo crecimiento de todos los aislamientos. Se observaron resultados positivos en *Cupriavidus sp.* UYPR2.512, *Cupriavidus sp.* UYMU48A, *Cupriavidus sp.* UYMM02A y *Cupriavidus sp.* UYMRe04A, donde las cepas presentaban la formación de un compuesto marrón debido a la oxidación de guaiacol.

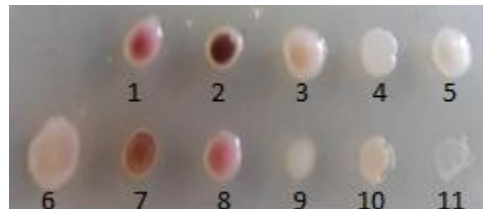


Figura 10. Oxidación de guaiacol por parte de las cepas *Cupriavidus sp.* UYPR2.512, *Cupriavidus sp.* UYMU48A, *Cupriavidus sp.* UYMM02A y *Cupriavidus sp.* UYMRe04A.

1: *Cupriavidus sp.* UYPR2.512; 2: *Cupriavidus sp.* UYMU48A; 3: *Cupriavidus sp.* UYMA12B; 4: *Burkholderia sp.* UYMP09A; 5: *Cupriavidus sp.* UYMSp04A; 6: *Cupriavidus sp.* UYMR05A; 7: *Cupriavidus sp.* UYMM02A; 8: *Cupriavidus sp.* UYMSc13B; 9: *Cupriavidus sp.* UYMRe04A; 10: *Cupriavidus sp.* UYMC03; 11: *Cupriavidus sp.* UYME01A.

5.3.4. Producción de sideróforos

La producción de sideróforos se visualiza como formación de un halo naranja alrededor de la colonia sobre el fondo azul del medio CAS. En este caso, fueron cinco las cepas que mostraron esta característica: *Burkholderia sp.* UYMP09A, *Cupriavidus sp.* UYMSp04A, *Cupriavidus sp.* UYMR05A, *Cupriavidus sp.* UYMSc13B y *Cupriavidus sp.* UYMC03.

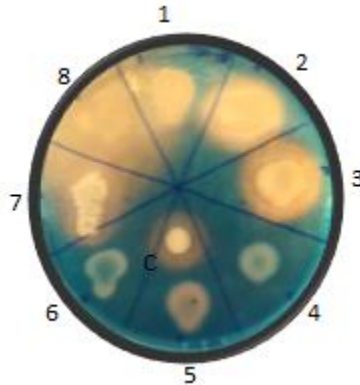


Figura 11. Producción de sideróforos en *Burkholderia sp.* UYMP09A, *Cupriavidus sp.* UYMSp04A, *Cupriavidus sp.* UYMR05A, *Cupriavidus sp.* UYMSc13B y *Cupriavidus sp.* UYMC03.

1: *Cupriavidus sp.* UYMR05A; 2: *Cupriavidus sp.* UYMSp04A; 3: *Burkholderia sp.* UYMP09A; 4: *Cupriavidus sp.* UYMA12B; 5: *Cupriavidus sp.* UYPR2.512; 6: *Cupriavidus sp.* UYME01A; 7: *Cupriavidus sp.* UYMC03; 8: *Cupriavidus sp.* UYMSc13B; C+: *Pseudomonas fluorescens*

5.3.5. Crecimiento de derivados fenólicos

Este ensayo permitió observar la habilidad que tienen los aislamientos de crecer frente a distintas fuentes de carbono (fenol, tolueno, n-butanol, citrato, succinato y glicerol). Los datos se muestran en la Tabla 4 donde se pudo observar que todos los aislamientos fueron capaces de crecer en citrato, succinato y glicerol. Para el caso de n-butanol como única fuente de carbono, se encontró que nueve de los once aislamientos fueron capaces de crecer de manera óptima, no hubo crecimiento por parte de las cepas *Cupriavidus sp.* UYPR2.512 y *Burkholderia sp.* UYMP09A. En cuanto al fenol siete fueron los microsimbiontes que crecieron (*Burkholderia sp.* UYMP09A, *Cupriavidus sp.* UYMSp04A, *Cupriavidus sp.* UYMR05A, *Cupriavidus sp.* UYMM02A, *Cupriavidus sp.* UYMRe04A, *Cupriavidus sp.* UYMC03 y *Cupriavidus sp.* UYME01A), mientras que con tolueno sólo cuatro, *Burkholderia sp.* UYMP09A, *Cupriavidus sp.* UYMSc13B, *Cupriavidus sp.* UYMRe04A y *Cupriavidus sp.* UYMC03. Los resultados obtenidos se consideran preliminares debido a que el experimento se realizó una vez.

Tabla 4. Evaluación de la capacidad de crecer en distintas fuentes de carbono.

CEPA	Crecimiento en distintas fuentes de C ^a					
	Fenol	Tolueno	n-butanol	Citrato	Succinato	Glicerol
<i>Cupriavidus sp.</i> UYPR2.512	-	-	-	++	+	+
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMU48A	-	-	++	++	+	+
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMA12B	-	-	++	+	+	+
<i>Burkholderia sp.</i> UYMP09A	+	+	-	+	+	+
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMSp04A	+	-	+	+	+	+
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMR05A	+	-	++	+	+	+
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMM02A	+	-	++	+	+	+
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMSc13B	-	+	+	+	+	+
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMRe04A	+	+	++	+	+	+
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMC03	+	+	++	++	+	+
<i>Cupriavidus sp.</i> UYME01A	+	-	++	++	+	+

^a -: Sin crecimiento; +: Crecimiento moderado; ++: Buen crecimiento

5.3.6. Tolerancia a metales pesados

Se evaluó la capacidad de los microsimbiontes de resistir frente a metales pesados como Cd, Te, Cu, Mn, Co, Zn, Ni, Ag y Fe en medio sólido. Los resultados se muestran en la Tablas 5, 6 y 7 donde se puede observar una buena respuesta de las cepas en general, excepto frente a los metales Cd, Te y Ag. En algunos casos como frente al CuSO₄ 1 mM, K₂TeO₃ 50 μM y para CoCl₂ 1 mM, se observó la formación de precipitados (Figura 12). Se observaron aumentos significativos en el tamaño de la colonia de *Burkholderia sp.* UYMP09A al crecerla en un medio suplementado con FeCl₃ 1 mM (Figura 14) y MnCl₂ 1 mM, con este último se observó un cambio de morfología por parte de *Cupriavidus sp.* UYMR05A y *Cupriavidus sp.* UYME01A (Figura 13) y la presencia de un halo translúcido alrededor de *Burkholderia sp.* UYMP09A pero cuando se encontraba suplementada con una menor concentración de MnCl₂ (500 μM).

Tabla 5. Ensayo de tolerancia a distintos metales variando su concentración en medio YMAG sólido.

CEPA	Tolerancia a metales ^a								
	NiCl ₂		AgNO ₃			FeCl ₃		CuSO ₄	
	1mM	500µM	200µM	100µM	50µM	1mM	500µM	1mM	500µM
<i>Cupriavidus sp.</i> UYPR2.512	-	+	-	-	-	++	++	++	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMU48A	+	++	-	-	-	++	++	++	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMA12B	-	++	-	-	-	++	++	++	++
<i>Burkholderia sp.</i> UYMP09A	-	-	-	-	-	++	++	++	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMSp04A	-	+	-	-	-	++	++	++	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMR05A	-	++	-	-	-	++	++	++	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMM02A	-	++	-	-	-	++	++	++	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMSc13B	-	++	-	-	-	++	++	++	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMRe04A	-	++	-	-	-	++	++	++	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMC03	-	-	-	-	-	++	++	++	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYME01A	-	++	-	-	-	++	++	++	++

^a -: Sin crecimiento; +: Crecimiento moderado; ++: Buen crecimiento

Tabla 6. Ensayo de tolerancia a distintos metales variando su concentración en medio YMAG sólido.

CEPA	Tolerancia a metales ^a							
	MnCl ₂			CoCl ₂			ZnCl ₂	
	5mM	1mM	500µM	1mM	750µM	500µM	1mM	500µM
<i>Cupriavidus sp.</i> UYPR2.512	+	+	+	+	+	+	++	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMU48A	+	+	+	+	+	+	++	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMA12B	+	+	+	-	-	+	++	++
<i>Burkholderia sp.</i> UYMP09A	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMSp04A	+	+	+	-	-	-	++	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMR05A	+	+	+	-	-	+	++	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMM02A	+	+	+	-	-	+	++	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMSc13B	+	+	+	+	+	+	++	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMRe04A	+	+	+	-	-	+	++	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMC03	+	+	+	-	-	+	++	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYME01A	+	+	+	-	-	+	++	++

^a -: Sin crecimiento; +: Crecimiento moderado; ++: Buen crecimiento

Tabla 7. Ensayo de tolerancia a distintos metales variando su concentración en medio YMAG sólido.

CEPA	Tolerancia a metales ^a							
	Control	CdCl ₂ 5mM	K ₂ TeO ₃ 4mM	CdCl ₂ 5mM + K ₂ TeO ₃ 4mM	CdCl ₂		K ₂ TeO ₃	
					500μM	50μM	500μM	50μM
<i>Cupriavidus sp.</i> UYPR2.512	++	-	-	-	+	++	-	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMU48A	++	-	-	-	+	++	-	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMA12B	++	-	-	-	+	++	-	++
<i>Burkholderia sp.</i> UYMP09A	++	-	-	-	-	+	-	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMSp04A	++	-	-	-	+	++	-	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMR05A	++	-	-	-	+	++	-	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMM02A	++	-	-	-	+	++	-	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMSc13B	++	-	-	-	+	++	-	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMR04A	++	-	-	-	+	++	-	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMC03	++	-	-	+	+	++	-	++
<i>Cupriavidus sp.</i> UYME01A	++	-	-	-	+	++	-	++

^a -: Sin crecimiento; +: Crecimiento moderado; ++: Buen crecimiento

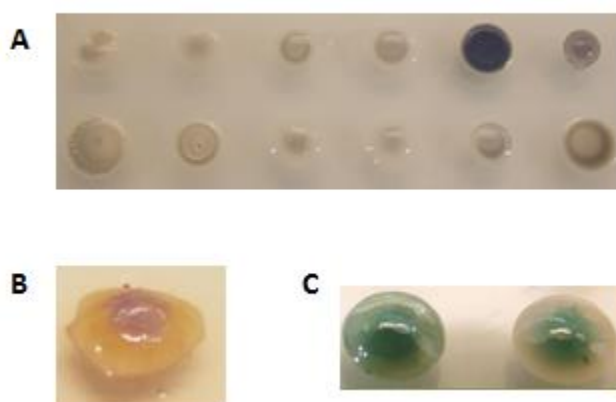


Figura 12. **A)** Cepas con buen crecimiento en presencia de K₂TeO₃ 50 μM. **B)** Cepa con buen crecimiento en presencia de CoCl₂ 1 mM. Se observa formación de precipitado lila. **C)** Cepa con buen crecimiento en presencia de al CuSO₄ 1 mM. Formación de precipitado de color verde.

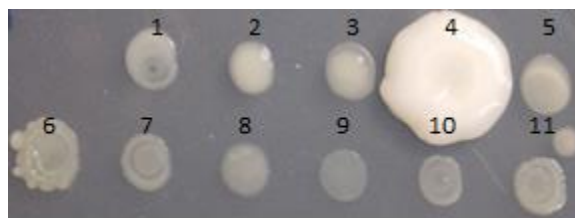


Figura 13. Cepas con buen crecimiento en presencia de $MnCl_2$ 500 μM .

1: *Cupriavidus sp.* UYPR2.512; 2: *Cupriavidus sp.* UYMU48A; 3: *Cupriavidus sp.* UYMA12B; 4: *Burkholderia sp.* UYMP09A; 5: *Cupriavidus sp.* UYMSp04A; 6: *Cupriavidus sp.* UYMR05A; 7: *Cupriavidus sp.* UYMM02A; 8: *Cupriavidus sp.* UYMSc13B; 9: *Cupriavidus sp.* UYMRe04A; 10: *Cupriavidus sp.* UYMC03; 11: *Cupriavidus sp.* UYME01A

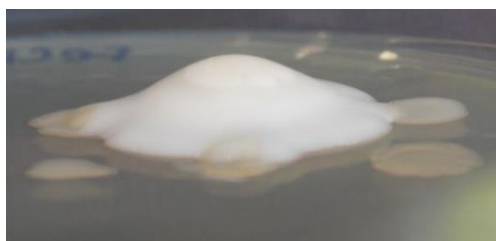


Figura 14. *Burkholderia sp.* UYMP09A crecida en medio YMAG suplementado con $FeCl_3$ 1 mM.

5.3.7. Resistencia a antibióticos

Se evaluó la resistencia a antibióticos que tienen las cepas observándose la presencia o ausencia de halo alrededor del disco con antibiótico. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla, donde se denomina sensible (S) a aquellas cepas que presentan halo y resistente (R) a las que no, para las concentraciones ensayadas.

Tabla 8. Evaluación de la capacidad de las cepas de resistir a distintos antibióticos en YMAG sólido.

CEPA	Resistencia a antibióticos					
	Antibiótico ($\mu g/\mu l$) ^a					
	St (50)	Nm (10)	Ap (20)	Cf (20)	Nf (20)	Gm (20)
<i>Cupriavidus sp.</i> UYPR2.512	S	S	?	?	R	S
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMU48A	S	S	S	S	R	S
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMA12B	S	S	S	S	R	S
<i>Burkholderia sp.</i> UYMP09A	S	S	?	S	R	S
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMSp04A	S	R	S	S	R	S
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMR05A	S	S	S	S	R	S
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMM02A	S	S	S	S	R	S
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMSc13B	S	S	?	?	R	S
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMRe04A	S	S	R	S	R	S
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMC03	S	S	?	S	R	S
<i>Cupriavidus sp.</i> UYME01A	S	S	S	S	R	S

^a R: cepa resistente a antibiótico; S: cepa sensible al antibiótico, ?: resultado dudoso, St: estreptomina, Nm: neomicina, Ap: ampicilina, Cf: cloranfenicol, Nf: 5-nitrofurantoína, Gm: gentamicina

Debido a que algunos datos resultaron dudosos se procedió a realizar el ensayo en medio líquido para las cepas en cuestión, los resultados se encuentran en el Anexo 2.

Se consideró una cepa resistente aquella capaz de tener una DO igual o mayor a la mitad de la DO que posee sin antibiótico (control). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9.

Como puede observarse, todas las cepas fueron sensibles a St 50 µg/ml y a Gm 20 µg/ml, y resistentes a Nf 20 µg/ml. Las cepas *Cupriavidus sp.* UYMU48A, *Cupriavidus sp.* UYMA12B, *Cupriavidus sp.* UYMR05A y *Cupriavidus sp.* UYMM02A fueron sensibles a todos los antibióticos en las concentraciones ensayadas mientras que la única cepa resistente a Nm 10 µg/ml fue *Cupriavidus sp.* UYMSp04A.

Tabla 9. Evaluación final de la capacidad de las cepas de resistir frente a distintos antibióticos.

CEPA	Resistencia a antibióticos					
	Antibiótico (µg/µl) ^a					
	St (50)	Nm (10)	Ap (20)	Cf (20)	Nf (20)	Gm (20)
<i>Cupriavidus sp.</i> UYPR2.512	S	S	R	R	R	S
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMU48A	S	S	S	S	R	S
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMA12B	S	S	S	S	R	S
<i>Burkholderia sp.</i> UYMP09A	S	S	R	S	R	S
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMSp04A	S	R	S	S	R	S
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMR05A	S	S	S	S	R	S
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMM02A	S	S	S	S	R	S
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMSc13B	S	S	R	R	R	S
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMRe04A	S	S	R	S	R	S
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMC03	S	S	R	S	R	S
<i>Cupriavidus sp.</i> UYME01A	S	S	S	S	R	S

^a R: cepa resistente a antibiótico; S: cepa sensible al antibiótico, St: estreptomina, Nm: neomicina, Ap: ampicilina, Cf: cloranfenicol, Nf: 5-nitrofurantóina, Gm: gentamicina

5.4. Caracterización de la simbiosis

5.4.1. Especificidad de hospedero

Se evaluó la habilidad de las cepas de infectar y formar nódulos en diferentes géneros y especies de leguminosas (*M. sativa*, *L. leucocephala*, *Ch. flexuosa* y diferentes especies de *Mimosa*) crecidas en condiciones gnotobióticas. En el caso de las plantas de *M. sativa* (alfalfa) y *Ch. flexuosa* no se observó la formación de nódulos en ninguno de los tratamientos. Se probaron tres especies distintas de *Mimosa*, *M. pudica* y *M. uraguensis* y *M. polycarpa*, las cuales fueron capaces de formar nódulos con los 11 aislamientos. *L. leucocephala* fue capaz de nodular cuando fue inoculada con *Cupriavidus sp.* UYPR2.512, *Cupriavidus sp.* UYMA12B, *Burkholderia sp.* UYMP09A, *Cupriavidus sp.* UYMSp04A, *Cupriavidus sp.* UYMRe04A y *Cupriavidus sp.* UYMC03. Interesantemente, no en todos los casos la nodulación fue efectiva. Son destacables en este sentido, las cepas *Cupriavidus sp.* UYPR2.512, *Cupriavidus sp.* UYMA12B, *Cupriavidus sp.* UYMSp04A y *Cupriavidus sp.* UYMRe04A debido a que formaron nódulos eficientes con al menos tres de ellas.

Tabla 10. Leguminosas pertenecientes a la familia *Mimosoideae* y cepas bacterianas pertenecientes a las β -Proteobacterias, con las que se llevó a cabo el ensayo de nodulación y promiscuidad.

CEPA	Planta ^a							
	<i>M. pudica</i>		<i>M. uruguensis</i>		<i>M. polycarpa</i>		<i>L. leucocephala</i>	
	Nódulo	Tipo de nódulo	Nódulo	Tipo de nódulo	Nódulo	Tipo de nódulo	Nódulo	Tipo de nódulo
<i>Cupriavidus sp.</i> UYPR2.512	+	R	+	B	+	R	+	R
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMU48A	+	B	+	B	+	B/R	-	-
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMA12B	+	B/R	+	B/R	+	R	+	B/R
<i>Burkholderia sp.</i> UYMP09A	+	B	+	B	+	B/R	+	B/R
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMSp04A	+	B/R	+	B	+	R	+	R
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMR05A	+	B/R	+	B	+	R	-	-
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMM02A	+	R	+	B	+	B/R	-	-
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMSc13B	+	R	+	B	+	R	-	-
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMRe04A	+	R	+	B/R	+	R	+	B/R
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMC03	+	B	+	B	+	B/R	+	R
<i>Cupriavidus sp.</i> UYME01A	+	B/R	+	B	+	R	-	-

^a +: Presencia de nódulos; -: Ausencia de nódulos; R: Nódulos rosados (efectivos); B: Nódulos blancos (inefectivos); B/R: Presencia de nódulos o blancos o rosados en una réplica

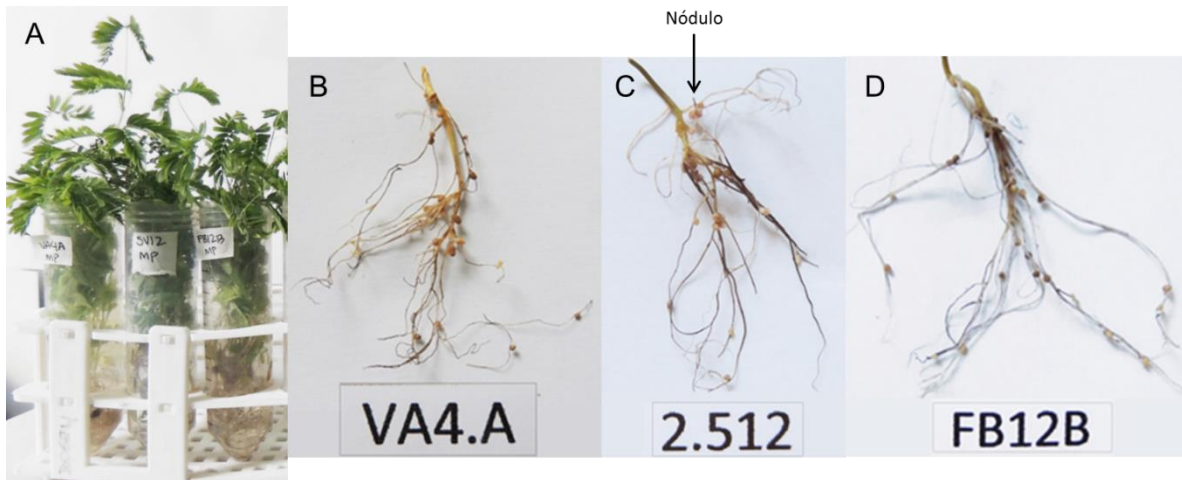


Figura 15. A) Plantines de *Mimosa pudica* ya cosechados inoculados con las cepas *Cupriavidus sp.* UYMR04A, *Cupriavidus sp.* UYPR2.512 y *Cupriavidus sp.* UYMA12B. **B)** Nódulos en las raíces de uno de los plantines inoculados con *Cupriavidus sp.* UYMR04A. **C)** Nódulos en las raíces de uno de los plantines inoculados con *Cupriavidus sp.* UYPR2.512. **D)** Nódulos en las raíces de uno de los plantines inoculados con *Cupriavidus sp.* UYMA12B. (Los nombres escritos en las fotos son los nombres designados luego de la colecta).



Figura 16. A) Plantines de *Mimosa uraguensis* ya cosechados inoculados con la cepa *Cupriavidus sp.* UYMSc13B. **B)** Nódulos en las raíces de uno de los plantines de A.

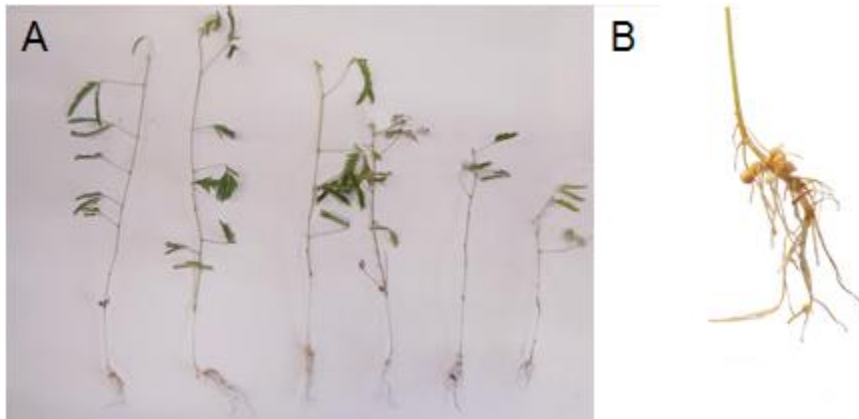


Figura 17. A) Plantines de *Mimosa polycarpa* ya cosechados inoculados con la cepa *Cupriavidus sp.* UYMA12B. **B)** Nódulos en las raíces de uno de los plantines de A.

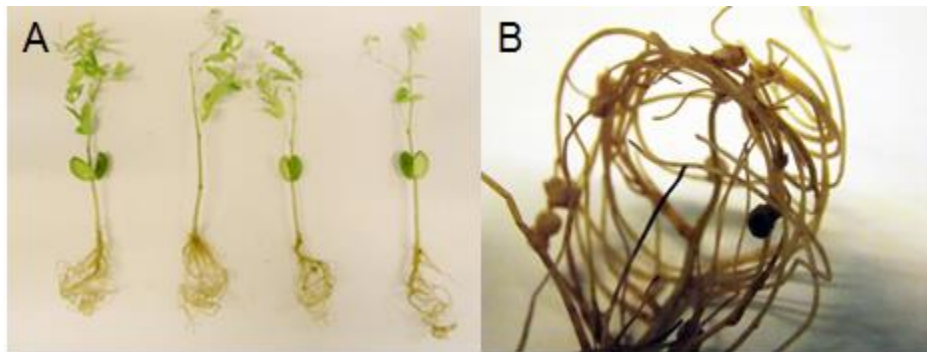


Figura 18. A) Plantines de *Leucaena leucocephala* ya cosechados inoculados con la cepa *Cupriavidus sp.* UYPR2.512. **B)** Nódulos en las raíces de uno de los plantines de A.

5.4.2. Capacidad de promover el crecimiento vegetal

M. pudica y *M. uragüensis* fueron las dos especies de Mimosas elegidas para determinar la FBN de los once aislamientos. Luego de tres meses se observó la formación de nódulos radiculares en todas las plantas menos en ambos controles como era de esperarse. Para el caso de *M. pudica*, las raíces que poseían nódulos efectivos, de color rosado, fueron las inoculadas con *Cupriavidus sp.* UYPR2.512, *Cupriavidus sp.* UYMA12B, *Cupriavidus sp.* UYMSp04A, *Cupriavidus sp.* UYMR05A, *Cupriavidus sp.* UYMR04A y *Cupriavidus sp.* UYME01A; el resto contenía nódulos blancos. Para esta especie de Mimosa también se empleó como control adicional *Cupriavidus sp.* LMG19424, cepa aislada de *M. pudica* en Taiwan. En cuanto a *M. urugüensis*, las plántulas inoculadas con *Cupriavidus sp.* UYMA12B, *Cupriavidus sp.* UYMM02A, *Cupriavidus sp.* UYMSc13B y *Cupriavidus sp.* UYME01A desarrollaron al menos un nódulo rosado, mientras que para las restantes fueron inefectivos.

Complementariamente se determinó el peso seco de la parte aérea de las plantas, los resultados se muestran en la Figura 19 y la Figura 20. La capacidad de promover el

crecimiento vegetal se correspondió con la presencia de nódulos rosados. En los gráficos se presenta el resultado del análisis de varianza de Tukey, donde se observa para *M. pudica* que los valores son significativos a partir de *Cupriavidus sp.* UYMSC13B, en cambio no ocurre lo mismo para *M. uragüensis* debido a que ningún valor fue capaz de promover el crecimiento vegetal en comparación con el control negativo ($p > 0,05$)

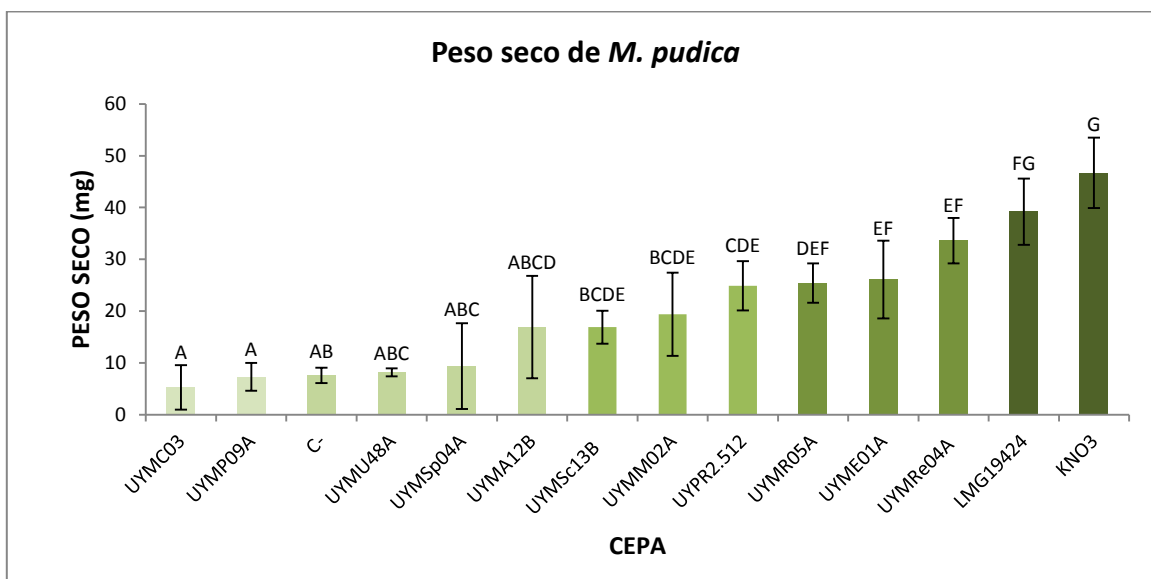


Figura 19. Análisis de la varianza del peso seco de la parte aérea de plantas de *M. pudica* inoculadas con los distintos aislamientos.

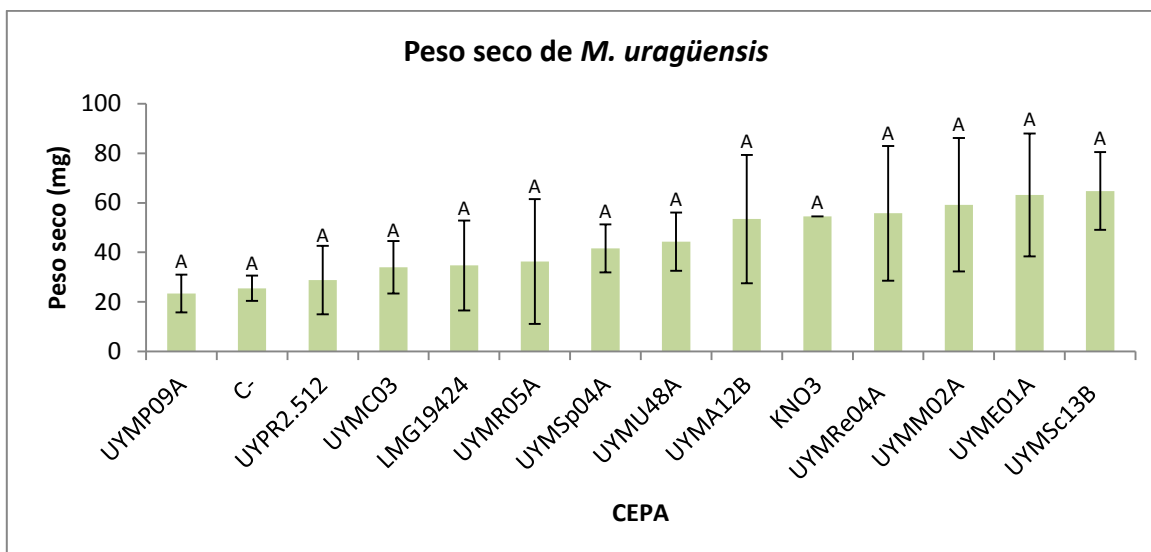


Figura 20. Análisis de la varianza del peso seco de la parte aérea de plantas de *M. uragüensis* inoculadas con los distintos aislamientos.

5.5. Cepas de mayor potencial

Para finalizar esta sección, se resumen los resultados resaltando las cepas que mostraron mayor potencial en los distintos ensayos, en donde a su vez se destacan *Cupriavidus sp.*UYPR2.512 y *Cupriavidus sp.*UYMC03 por su versatilidad fisiológica.

Tabla 11. Cepas de mayor potencial para los diferentes ensayos

Ensayos realizados	Cepa destacada
Tolerancia a pH	<i>Cupriavidus sp.</i> UYMM02A <i>Cupriavidus sp.</i>UYMC03
Solubilización de fosfatos inorgánicos	<i>Burkholderia sp.</i> UYMP09A
Actividad guaiacol oxidasa	<i>Cupriavidus sp.</i>UYPR2.512 <i>Cupriavidus sp.</i> UYMU48A <i>Cupriavidus sp.</i> UYMM02A <i>Cupriavidus sp.</i> UYMRe04A
Producción de sideróforos	<i>Burkholderia sp.</i> UYMP09A <i>Cupriavidus sp.</i> UYMSp04A <i>Cupriavidus sp.</i> UYMR05A <i>Cupriavidus sp.</i> UYMSc13B <i>Cupriavidus sp.</i>UYMC03
Crecimiento con distintas Fuentes C	<i>Cupriavidus sp.</i> UYMRe04A <i>Cupriavidus sp.</i>UYMC03
Resistencia a metales	<i>Cupriavidus sp.</i>UYPR2.512 <i>Cupriavidus sp.</i> UYMU48A <i>Cupriavidus sp.</i> UYMSc13B <i>Cupriavidus sp.</i>UYMC03
Resistencia a antibióticos	<i>Cupriavidus sp.</i>UYPR2.512 <i>Cupriavidus sp.</i> UYMSc13B
Capacidad de PCV	<i>Cupriavidus sp.</i>UYPR2.512 <i>Cupriavidus sp.</i> UYMR05A <i>Cupriavidus sp.</i> UYME01A <i>Cupriavidus sp.</i> UYMRe04A

6. Discusión

Es muy poco lo que se sabe sobre las especies de leguminosas nativas y sus bacterias asociadas en Uruguay, razón por la cual el objetivo principal del presente trabajo consistió en el estudio de las bacterias asociadas naturalmente a Mimosas presentes en diferentes partes del país. Para ello, se colectaron mimosas con presuntos nódulos en distintas salidas de campo, los cuales fueron luego analizados en el laboratorio. De la colección obtenida se seleccionaron 11 aislamientos para realizar su caracterización.

En cuanto a la caracterización genotípica se identificó el género microbiano utilizando el gen que codifica para el ADNr 16S como marcador taxonómico, ya que las secuencias de este gen constituyen una parte importante de bases de datos generales como el GenBank y su porcentaje de similitud ha sido aceptado como línea de corte para la descripción de especies nuevas de procariontes. No se obtuvo información a nivel de especie, ya que este gen no se considera suficientemente resolutivo debido al alto grado de conservación que existe dentro de algunas especies como es el caso de los rizobios. Una de las desventajas que mencionan Lloret et al. [4] es que existen inconvenientes en inferencia filogenética debido a que copias del mismo gen pueden no ser idénticas como resultado de los eventos de transferencia horizontal de genes ortólogos. Por todo lo mencionado anteriormente es que se debe utilizar más de un marcador molecular para lograr determinar a qué especie pertenecen estos aislamientos. Otros marcadores que se pudieron haber utilizado son: el gen que codifica para el ADNr 23S, los genes *glnA* y *glnII* que codifican para las enzimas glutamino sintetetas GSI y GSII respectivamente, *atpD* que codifican para la subunidad β de la ATP sintetasa, *recA* que codifica para la proteína esencial del sistema de recombinación homóloga en bacterias, *dnaK* que codifica para una proteína chaperona involucrada en varios procesos celulares que incluyen la asistencia en el plegamiento de polipéptidos nacientes y el ensamblaje de complejos de proteínas, y el gen *rpoB* que codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa [4, 6].

Al identificar los aislamientos se obtuvo que 10 de los 11 pertenecen al género *Cupriavidus* y el restante a *Burkholderia*, este es un resultado interesante debido a que estaría indicando que *Cupriavidus* se encuentra distribuido en distintas zonas en todo el país, lo cual no es concordante con lo que ocurre en otros países como Brasil o México, donde *Burkholderia* es el género predominante. En Brasil dos Reis et al. [22] demostraron que los simbiosomas de 47 especies distintas de Mimosa provenientes de importantes centros de diversificación para esta subfamilia de leguminosas pertenecen al género *Burkholderia*, esto está respaldado por el estudio de las secuencias de los genes ADNr 16S y *recA* de 148 aislamientos. Afirman que es posible que exista competencia entre los

géneros y que *Burkholderia* domine como simbiote de *Mimosa* spp. en esta región o que el bajo pH de los suelos de Cerrado y Caatinga juegue a su favor [22]. México posee simbioses del género *Burkholderia* asociados a plantas de carácter agrícola en diferentes regiones del país, principalmente en el centro, sur y sureste. Al norte el clima es más árido y se identificaron bacterias de los géneros *Burkholderia* y *Cupriavidus*. Sin embargo, la presencia de *Burkholderia* se encuentra limitada, ya que sólo unas pocas cepas fueron identificadas entre los aislamientos analizados. *C. respiraculi*, *B. gladioli* y *B. cenocepacia* fueron identificadas entre los aislamientos, pero muchas cepas parecen ser nuevas especies de *Cupriavidus* [50].

Con respecto al fenotipo de los aislamientos caracterizados, se observó que fueron capaces de crecer a diferentes pHs, esto sugiere que las cepas tienen una gran capacidad metabólica para adaptarse a pHs extremos, tanto en medio sólido como en medio líquido, aunque en medio líquido se observó una preferencia por los pHs más básicos. El comportamiento fue similar entre ellas. Gopalakrishnan et al. [51], observaron que algunas cepas de rizobios pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium* toleran pHs ácidos y que esta tolerancia a pHs bajos se correlaciona con la producción de polisacáridos extracelulares o con la concentración poliaminas/glutamato en la célula. También destacaron el rol del glutatión, un tripéptido utilizado para el crecimiento de *R. tropici* bajo condiciones ácidas [51]. El pH es uno de los factores que puede influenciar en el crecimiento de la planta y el rizobio, así como también del establecimiento del nódulo, siendo el responsable de pérdidas significantes en la producción de leguminosas a nivel global. Puede ser causado por un ciclado pobre de nutrientes, lixiviación de suelos y la acidificación debido a los efectos de los fertilizantes nitrogenados [52].

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) se destacan por su capacidad de fijar el nitrógeno del aire y proporcionárselo a la planta para que ésta pueda aumentar su tamaño, pero existen otras características de estos microsimbioses que colaboran para beneficiar a dicho organismo como por ejemplo el mejorar el ingreso de macronutrientes mediante la solubilización de fosfato. Después del nitrógeno el fósforo es el otro principal nutriente limitante para el crecimiento vegetal ya que se encuentra en el suelo de forma insoluble. Algunas bacterias del suelo logran solubilizarlo mediante la producción de ácidos orgánicos y quelantes oxoácidos de los azúcares [44, 50]. Algo similar ocurre con el hierro (Fe), pero en este caso las bacterias proporcionan un sistema de transporte, unos ligandos Fe^{3+} específicos de bajo peso molecular denominados sideróforos [46]. Además de estos factores, existen otros como la producción de fitohormonas, entre ellas el Ácido Indol Acético (AIA) que inciden directamente en la generación de mayor biomasa vegetal.

Varias de estas características fueron ensayadas y se obtuvo que algunos de nuestros aislamientos solubilizaron fosfato inorgánico o produjeron sideróforos.

Sumado a las características mencionadas anteriormente, se encuentra la capacidad de crecer de estos microsimbiontes utilizando distintas fuentes de carbono, de producir enzimas como lacasas o guaiacol oxidasas o de tolerar la presencia de diferentes metales pesados. El poseer estas características las convierte junto a su hospedero en un potencial sistema modelo para la biorremediación de suelos. Entre las fuentes de carbono ensayadas, se encuentran el fenol y el tolueno, compuestos aromáticos considerados xenobióticos que algunas de las cepas fueron capaces de utilizar. Ambos convergen a catecol por la misma vía catabólica, intermediario que luego gracias a la acción de oxigenasas sufre la ruptura del anillo y se dirige al ciclo de Krebs, razón por la cual existe gran interés en desarrollar y mejorar procesos de biorremediación en los cuales estas vías participan [53]. *Cupriavidus necator* JMP134 es considerada cepa referente en la degradación de compuestos aromáticos y demuestra la gran versatilidad metabólica que posee este género, debido a que posee 11 de las 12 rutas principales de degradación de las *Proteobacterias*. En su genoma se pueden encontrar genes que codifican para más de 70 oxigenasas implicadas en este metabolismo. Se cree que esto se debe a la exposición frente a distintas mezclas naturales de diferentes compuestos aromáticos que pudieron ser usadas como fuente de carbono, como por ejemplo los implicados en la degradación de lignina [54].

En cuanto a la tolerancia de metales pesados, se observó en general una buena respuesta de las cepas frente a Cu, Mn, Co, Zn, Ni y Fe; mientras que la suplementación con Cd, Te y Ag no fue exitosa. Interesantemente, algunas cepas formaron precipitados en presencia de CuSO_4 1 mM, K_2TeO_3 50 μM o CoCl_2 1 mM. Es posible que esta propiedad se deba a uno de los mecanismos de detoxificación que tienen estos microsimbiontes, como la precipitación dentro de las paredes y capas externas, la deposición de nanopartículas (biomineralización y transformación redox) [55]. Otros de los mecanismos empleados por las bacterias para tolerar la presencia de metales son la volatilización, impermeabilidad, precipitación y quelado intracelular, la producción de enzimas detoxificantes, una disminución del transporte en la membrana, mecanismos de eflujo y la liberación de metabolitos y quelantes de metales [55]. En este caso *Cupriavidus metallidurans*, quien antes se denominaba *Ralstonia metallidurans*, es la cepa modelo con respecto a esta característica en particular, posee los genes implicados en la resistencia a metales en dos megaplásmidos transferibles (pMOL28 y pMOL30) aunque algunos también se encuentran en el cromosoma. En plásmidos y cromosoma se hallaron genes implicados en la resistencia a Cd, Co, Zn, Cu y Cr; a nivel de plásmido Hg, Ni y Pb; mientras que a nivel solo de cromosoma se encontró para Ag. Esto sugiere que posiblemente la resistencia a metales de *Cupriavidus*, a través de la evolución, fue adquirida para poder adaptarse a

ambientes inhóspitos creados por situaciones antropogénicas extremas [56]. Estas funciones, importantes para la adaptación ambiental de las bacterias, podrían además de tener uso en la biorremediación de suelos ser de potencial interés para otros usos biotecnológicos.

En relación a la caracterización de la simbiosis, se evaluó la habilidad de las cepas de infectar y formar nódulos en diferentes géneros y especies de leguminosas (Tabla 10), esta propiedad se puede analizar tanto desde el punto de vista de la planta como de la bacteria. Desde el punto de vista de la planta podemos decir que las especies de leguminosas pueden ser clasificadas según su capacidad y eficacia de ser noduladas, de las seis especies ensayadas, las tres pertenecientes al género *Mimosa* fueron capaces de formar nódulos en asociación con los 11 aislamientos pero no en todos los casos la nodulación fue efectiva (nódulos rosados) (Figuras 15-17), la otra especie que presentó resultados favorables fue *L. leucocephala*, aunque no para todos los aislamientos ya que sólo con seis de ellos se observó la habilidad de formar nódulos radiculares, de los cuales la mitad tuvieron un fenotipo efectivo (Figura 18). La interacción con *M. uragüensis* sería más específica ya que sólo dos de los aislamientos ensayados produjeron nódulos fijadores. Desde el punto de vista de los microsimbiontes, éstos se pueden clasificar en promiscuos o no dependiendo del rango de hospedero con que forman nódulos. En este caso fueron destacables las cepas *Cupriavidus sp.* UYMA12B y *Cupriavidus sp.* UYMRe04A ya que al menos una de las diez réplicas de cada especie de leguminosa inoculada con estas cepas obtuvo nódulos capaces de fijar nitrógeno. Quizás nos estemos enfrentando a dos casos particulares de establecimiento de nuevos pares simbióticos, donde no se han expresado aún los genes de la fijación de nitrógeno, pero sí han coevolucionado para que se pudiese dar la infección radicular y expresión de los genes de nodulación. Como ya se mencionó anteriormente esta interacción planta-microorganismo, es considerada específica, por lo tanto hubiera sido interesante agregar en el ensayo las especies de las plantas hospedera de las cuales se aislaron estos rizobios. Lamentablemente, esto no fue posible hacerlo para los 11 aislamientos debido a la falta de semillas. En el caso de *Cupriavidus sp.* UYMU48A, donde se disponía de las semillas de su hospedero (*M. uragüensis*) los resultados no fueron los esperados, ya que si bien se obtuvieron nódulos, éstos no fueron efectivos. , otro caso fue el LMG19424 con su hospedero (*M. pudica*) donde se obtuvo una promoción de crecimiento vegetal cercano al nivel del control positivo (KNO_3), esta cepa no pertenece al grupo de las seleccionadas para caracterizar pero fue incluida aquí como un control extra. *M. pudica* ya ha sido reportada por presentar carácter promiscuo, y se ha observado su particular preferencia por los beta-rizobios, esto lo demuestra Mishra et al. [16] utilizando en paralelo plantas trampa de esta especie y de Siratro (hospedero originario de Brasil, de alto rango de promiscuidad, capaz de asociarse con α y β -

Proteobacterias). En los resultados obtenidos se observa que 96% de los aislamientos de Siratro pertenecían al género *Bradyrhizobium* (α -*Proteobacteria*) mientras que el 98% de los aislamientos de *M. pudica* pertenecen a las β -*Proteobacterias*. Esto permite resaltar la especificidad que tiene *M. púdica* hacia las β -*Proteobacterias* y no a una especie en particular, es por esto que se le otorga la característica de promiscua y se la tiene en cuenta para ser utilizada como plantas trampa para este grupo de bacterias [16, 57, 58]. Por último, vale la pena destacar la *M. polycarpa* ya que su comportamiento fue similar al de *M. pudica*, con la diferencia que no ha sido reportado nada referente a esta particularidad hasta el momento.

7. Conclusiones y perspectivas

Es de destacar el aporte que tuvo este trabajo a la línea de investigación que se desarrolla en el departamento de BIOGEM del IIBCE, permitiendo profundizar en el conocimiento del sistema Mimosa – beta-rizobio.

En general, cuando se habla de biodiversidad y preservación de recursos naturales, se asocia a especies animales, vegetales o macro-organismos. Sin embargo la mayor parte de la biodiversidad del suelo, el agua o el aire está sustentada por los microorganismos que allí se encuentran y que son responsables del mantenimiento del ecosistema y de brindar servicios ambientales de gran impacto. El relevamiento y la conservación del germoplasma de las Mimosas nativas y de sus rizobios asociados permiten mantener un acervo genético de una parte de la diversidad de nuestros bosques y pasturas. Los datos generados contribuirán al posterior diseño de estrategias que permitan un aprovechamiento sustentable de los recursos naturales y de su conservación con el fin de darle un uso eficiente a especies nativas de nuestro país y a su vez generar un beneficio de tipo agroeconómico. El uso y abuso que ha hecho el hombre en las últimas décadas del medio ambiente ha tenido impactos significativos en la estructura, composición y función de los ecosistemas naturales. Los cambios en la biodiversidad, como consecuencia de dichas acciones, repercuten directa o indirectamente en el bienestar humano debido a que comprometen su capacidad de generar servicios ecosistémicos esenciales. A menudo, los ecosistemas son explotados para obtener prioritariamente uno o varios servicios a expensas de otro; es así como muchos de los servicios brindados por los ecosistemas se han degradado como consecuencia de actuaciones llevadas a cabo para aumentar el suministro de otros servicios, como los alimentos. Un claro ejemplo de esto es la agricultura, la cual cubre las demandas locales de producción de alimentos pero a la vez puede implicar la destrucción de bosques para sustituirlos por tierra de cultivo, provocando una reducción en el suministro de madera y contaminación de las aguas de ríos que afectaría a las pesquerías y al abastecimiento de aguas de calidad. Éste es un ejemplo de tantos que ocurren diariamente, por lo tanto es nuestra responsabilidad intentar disminuir estos inconvenientes para lograr un mejor equilibrio en el medio ambiente.

Además, es considerable destacar que todos los rizobios aislados de nódulos de Mimosas pertenecieron al grupo de los beta-rizobios, donde 10 de las 11 cepas correspondieron al género *Cupriavidus* y sólo una al género *Burkholderia* sugiriendo la predominancia de *Cupriavidus* en Uruguay a diferencia de lo observado en otras regiones geográficas, donde se encontró la predominancia de alfa-rizobios o de beta rizobios pertenecientes al género *Burkholderia*. Interesantemente se observaron dos grupos diferentes de *Cupriavidus* y

quizás se estaría frente a la presencia de una nueva especie de rizobio. Este resultado es novedoso y corrobora observaciones previas encontradas en el laboratorio.

Algunas cepas presentaron características de interés biotecnológico como la resistencia a metales y la producción de guaiacol oxidasas; así como también características que podrían ser de interés para la mejora de la calidad de los suelos (resistencia a metales, crecimiento en derivados fenólicos, solubilización de fosfatos). Obtener los genomas completos permitiría ahondar en estos estudios y determinar los genes implicados en estas características y cómo se relacionan. Razón por la cual, en parte se realizaron los ensayos de resistencia a antibióticos y el crecimiento a distintos pHs, donde se encontraron cepas capaces de tolerar varias condiciones de las estudiadas.

Todos los microsimbiontes nodularon *M. pudica*, *M. uraguensis* y *M. polycarpa* pero sólo algunos fueron capaces de promover el crecimiento significativamente. El fenotipo simbiótico no fue el mismo con los diferentes hospederos, indicando especificidad en la interacción. Para comprobar una efectiva FBN se podría además analizar la presencia de los genes involucrados en la nodulación como los genes *nodA*, *nodC* y *nodD* y realizar el ensayo de reducción de acetileno o emplear isotopos de N. Sumado a esto sería válido realizar ensayos en invernáculo para poder acercarnos a las condiciones naturales, haciendo un escalado prudente y no pasar a probar su comportamiento directo a campo. Para asemejar las condiciones también se podría recolectar tierra de donde fueron recogidos estos aislamientos y ensayar la promoción del crecimiento en esas condiciones. Las leguminosas tienen un gran valor a nivel nacional ya que pueden utilizarse como alimento, forrajeras y árboles en montes nativos, por lo que los microorganismos asociados a sus raíces incitan a abrir el campo de investigación en busca de inoculantes capaces de promover el crecimiento vegetal de esta familia.

8. Anexo

8.1. Anexo 1: Medios de cultivo y soluciones

8.1.1. Medios de cultivo

YMA+G

Pesar y disolver los componentes de la Tabla A1 en agua destilada a excepción del agar. Ajustar el volumen a un litro con agua destilada y llevar el pH a 6,8 – 7,0 antes de agregar el agar.

Esterilizar 20 minutos a 121°C. El glutamato se agrega por último previamente esterilizado.

Tabla A1. Composición del medio YMAG

YMA+G	
Componente	Cantidad por litro
K ₂ HPO ₄ anh	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extracto de levadura	1,0 g
Manitol	10,0 g
Agar	18,0 g
Glutamato 10 % (p/v)	10,0 ml

YMA+G+Guaiacol

Agregar 2,0 g de Guaiacol a un litro de medio base de YMA+G (Tabla A1). Esterilizar 20 minutos a 121°C.

Cromo azurol-S (CAS)

Tabla A2. Composición del medio CAS

CAS	
Componente	Cantidad por 250 ml
Medio base	
Solución salina *	25 ml
H ₂ O	187 ml
Agar	3,75 g
PIPES	7,56 g
Extracto de levadura 5% (p/v)	5 ml
MgCl ₂ 1 M	0,25 ml
CaCl ₂ 0,1 M	0,25 ml
Manitol 10% (p/v)	2,5 ml
Glucosa 20% (p/v)	2,5 ml
Solución salina*	
KH ₂ PO ₄ anh	0,3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1,0 g
H ₂ O c.s.p.	100 ml
Solución colorante	
CAS	15,12 mg
H ₂ O	14,75 ml

La solución colorante se mezcla con 250 µl de FeCl₃.6H₂O (135 mg / 50 ml HCl 0,01 N).

Bajo agitación se agrega una solución de 18,22 mg de HDTMA en 10 ml de H₂O.

Luego de autoclavar las soluciones base, salina y HDTMA se mezcla primero la solución salina con la solución base, luego a la solución colorante se le agrega el cloruro férrico con HDTMA y finalmente esta mezcla se une a la mezcla anterior.

NBrip

Pesar y disolver los componentes de la Tabla A3 a excepción del agar. Llevar a volumen con agua destilada, mezclar hasta disolver los componentes y agregar agar. Esterilizar 20 minutos a 121 °C

Tabla A3. Composición del medio NBrip

NBrip	
Componente	Cantidad por litro
Glucosa	10 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g
MgCl ₂	2,34 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g
KCl	0,2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g
Agar	16 g

Ensayo en plantas

Medio Jensen

Pesar y disolver los componentes de la Tabla A4 a excepción del agar.

Agregar agua destilada hasta completar el volumen y ajustar el pH a 6,8 antes de agregar el agar. Esterilizar 10 minutos a 121 °C.

En la Tabla A5 se detalla la composición de la solución de micronutrientes.

Tabla A4. Composición del medio Jensen

Medio Jensen	
Componente	Cantidad por litro
Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl ₃ 6H ₂ O	0,17 g
Solución de micronutrientes	1,0 ml
Agar	8,0 g

Tabla A5. Composición de la solución de micronutrientes para el medio Jensen

Solución de Micronutrientes	
Componente	Cantidad por litro
H ₃ BO ₃	2,86 g
MnSO ₄ .4H ₂ O	2,03 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08 g
MoO ₃ .H ₂ O	0,09 g

8.1.2. Soluciones

Buffer Tris-Acético-EDTA (TAE)

Disolver en agua destilada los componentes de la Tabla A6 en cantidad suficiente para lograr la concentración indicada.

Tabla A6. Composición del buffer TAE

Composición del buffer TAE 1X	
Componente	Concentración
Tris-acetato	0,04 M
EDTA	0,001 M

Buffer de PCR

Se empleó el buffer provisto por la empresa donde se adquirió la enzima Taq polimerasa (Fermentas). En la Tabla A7 se muestra la composición del mismo.

Tabla A7. Composición del buffer de PCR

Buffer de PCR	
Componente	Concentración
Tris-HCl, pH 8,4	200 mM
KCl	500 mM

8.2. Anexo 2: Resultados complementarios

Tabla A8. Evaluación del crecimiento de las cepas (DO_{620nm}) frente a distintos antibióticos en YMAG líquido

CEPA	DO_{620nm} ^a						
	Antibiótico ($\mu g/\mu l$) ^b						
	St (50)	Nm (10)	Ap (20)	Cf (20)	Nf (20)	Gm (20)	s/Ab
<i>Burkholderia sp.</i> UYMP09A	0,257	0,241	1,898	1,383	1,865	0,110	2.345
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMC03	0,184	0,337	1,296	0,187	1,199	0,193	1,405
<i>Cupriavidus sp.</i> UYPR2.512	ND	0,201	1,105	0,682	0,991	0,227	1,055
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMSc13B	0,596	0,455	1,014	0,719	0,979	0,455	1,074

^a Se considera una cepa resistente a la cual posee una DO igual o mayor a la mitad de la DO alcanzada ante la ausencia de antibiótico

^b St: estreptomicina, Nm: neomicina, Ap: ampicilina, Cf: cloranfenicol, Nf: 5-nitrofurantoína, Gm: gentamicina, s/Ab: sin antibiótico

Tabla A9. Repetición de ensayo de resistencia a antibióticos con ampicilina y cloranfenicol

CEPA	DO_{620nm} ^a		
	Antibiótico ($\mu g/\mu l$) ^b		
	s/Ab	Ap (20)	Cf (20)
<i>Cupriavidus sp.</i> UYPR2.512	1,052	1,093	0,700
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMA12B	1,189	1,265	0,320
<i>Burkholderia sp.</i> UYMP09A	1,044	0,563	0,330
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMSc13B	1,092	1,026	0,589

^a Se considera una cepa resistente a la cual posee una DO igual o mayor a la mitad de la DO alcanzada ante la ausencia de antibiótico

^b s/Ab: sin antibiótico, Ap: ampicilina, Cf: cloranfenicol

9. Referencias bibliográficas

- [1] T. E. Crews and M. B. Peoples, "Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs," *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol. 102, pp. 279–297, 2004.
- [2] J. P. W. Young, "Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms," *Biol. nitrogen Fixat.*, p. 960, 1992.
- [3] J. Raymond, J. L. Siefert, C. R. Staples, and R. E. Blankenship, "The Natural History of Nitrogen Fixation," pp. 541–554, 2001.
- [4] L. Lloret and E. Martínez-romero, "Evolución y filogenia de *Rhizobium*," *Rev. Latinoam. Microbiol.*, vol. 47, pp. 43-60, 2005.
- [5] C. Franche and K. Lindström, "Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants," *Plant Soil*, vol. 321, pp. 35–59, 2009.
- [6] A. Untergasser, T. Bisseling and R. Geurts, "Rhizobia-Legume Symbioses," in *Prokaryotic Symbionts in Plants*, pp. 45-63, 2009.
- [7] J. W. Peters, K. Fisher, and D. R. Dean, "NITROGENASE STRUCTURE AND FUNCTION : A Biochemical-Genetic Perspective," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 49, pp. 335-366, 1995.
- [8] J. Monza and A. Márquez, "El Metabolismo del nitrógeno en las plantas", 2004.
- [9] E. S. Boyd, T. L. Hamilton, and J. W. Peters, "An alternative path for the evolution of biological nitrogen fixation," *Frontiers in Microbiology*, vol. 2, no. October, pp. 1–11, 2011.
- [10] H. R. Spaink, "The molecular basis of the host specificity of the *Rhizobium* bacteria," pp. 81–98, 1994.
- [11] E. W. Fred and I. Balwing, "Root nodule bacteria and leguminous plants", 1932.
- [12] X. Perret, C. Staehelin, and W. J. Broughton, "Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 64, no. 1, pp. 180–201, 2000.
- [13] G. Olsen and D. Lane, "Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach," *Annu. Rev.*, vol. 40, pp. 337–365, 1986.

- [14] C. Woese, "Bacterial evolution background," *Microbiology*, vol. 51, no. 2, pp. 221-271, 1987.
- [15] L. Moulin, A. Munive, B. Dreyfus, and C. Boivin-Masson, "Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria," *Nature*, vol. 411, no. June, pp. 948–950, 2001.
- [16] R. P. N. Mishra, P. Tisseyre, R. Melkonian, C. Chaintreuil, L. Miché, A. Klonowska, S. Gonzalez, G. Bena, G. Laguerre, and L. Moulin, "Genetic diversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: Investigating the origin and diversity of *Burkholderia phymatum* and other beta-rhizobia," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 79, no. 2, pp. 487–503, 2012.
- [17] P. Vandamme, J. Goris, W.-M. Chen, P. de Vos, and A. Willems, "*Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes.," *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 25, no. 4, pp. 507–512, 2002.
- [18] W. M. Chen, S. Laevens, T. M. Lee, T. Coenye, P. De Vos, M. Mergeay, and P. Vandamme, "*Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 51, no. 5, pp. 1729–1735, 2001.
- [19] W. M. Chen, E. K. James, J.-H. Chou, S. Y. Sheu, S.-Z. Yang, and J. I. Sprent, "Beta-Rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan;," *New Phytol*, pp. 1–15, 2005.
- [20] P. Izaguirre and R. Beyhaut, "Las leguminosas del Uruguay y regiones vecinas. Parte 2 y 3: *Caesalpinioideae* y *Mimosoideae*", 2003.
- [21] P. Izaguirre and R. Beyhaut, "Las leguminosas del Uruguay y regiones vecinas. Parte 1: *Papilionoidea*", 2003.
- [22] F. dos Reis, M. Simon, E. Gross, R. Boddey, G. Elliott, N. Neto, M. Loureiro, L. Queiroz, M. Scotti, W. M. Chen, A. Norén, M. Rubio, S.de Faria, C. Bontemps, S. Goi, J. P. Young, J. I. Sprent, E. K. James, "Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil," *New Phytol*, vol. 186(4), pp. 934–946, 2010.
- [23] M. F. Simon, R. Grether, L. P. De Queiroz, E. S. Tiina, F. Dutra, and C. E. Hughes, "The evolutionary of *Mimosa* (Leguminosae): toward a phylogeny of the sensitive plants," vol. 98, no. 7, pp. 1201–1221, 2011.

- [24] A. M. Hirsch, M. R. Lum, J. A. Downie, E. W. Fred, and I. L. Baldwin, "What makes the Rhizobia-Legume Symbiosis so special?", *Am. Soc. Plant Biol.*, vol. 127, pp. 1484–1492, 2001.
- [25] D. J. Gage, "Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes," vol. 68, no. 2, 2004.
- [26] G. Gualtieri and T. Bisseling, "The Evolution of nodulation," *Plant Mol. Biol.*, vol. 42, pp. 181–194, 2000.
- [27] H. Ochman and N. A. Moran, "Genes Lost and Genes Found : Evolution of Bacterial Pathogenesis and Symbiosis," vol. 292, pp. 1095–1099, 2001.
- [28] J. Hacker and E. Carniel, "Ecological fitness , genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes," vol. 2, no. 5, pp. 376–381, 2001.
- [29] F. Gomes Barcellos, J. Stefa, S. Batista, and M. Hungria, "Evidence of Horizontal Transfer of Symbiotic Genes from a *Bradyrhizobium japonicum* Inoculant Strain to Indigenous Diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah Soil", vol. 73, no. 8, pp. 2635–2643, 2007.
- [30] J. P. Young and J. A. Jonhston, "The evolution of specificity in the legume-rhizobium symbiosis," *Trends Ecol. Evol.*, vol. 4, no. 11, pp. 341–349, 1989.
- [31] J. T. Sullivan, J. R. Trzebiatowski, R. W. Cruickshank, J. Gouzy, S. D. Brown, R. M. Elliot, D. J. Fleetwood, N. G. Mccallum, U. Rossbach, G. S. Stuart, J. E. Weaver, R. J. Webby, F. J. De Bruijn, and C. W. Ronson, "Comparative Sequence Analysis of the Symbiosis Island of *Mesorhizobium loti* Strain R7A," *J. Bacteriol*, vol. 184, no. 11, pp. 3086–3095, 2002.
- [32] G. N. Elliott, J. Chou, W. Chen, G. V Bloemberg, C. Bontemps, E. Martínez-romero, E. Velázquez, J. P. W. Young, J. I. Sprent, and E. K. James, "*Burkholderia spp.* are the most competitive symbionts of *Mimosa* , particularly under N-limited conditions," *Environ. Microbiol.*, vol. 11, pp. 762–778, 2009.
- [33] Martinez-Romero E., "Controversies in Science. Coevolution in Rhizobium-Legume Symbiosis?," *DNA Cell Biol.*, vol. 28, no. 8, pp. 361–370, 2009.
- [34] A. Sy, E. Giraud, P. Jourand, N. Garcia, A. Willems, P. D. E. Lajudie, Y. Prin, M. Neyra, M. Gillis, C. Boivin-masson, and B. Dreyfus, "Methylotrophic *Methylobacterium* Bacteria Nodulate and Fix Nitrogen in Symbiosis with Legumes," *Jouranal Bacteriol.*, vol. 183, no. 1, pp. 214–220, 2001.

- [35] C. A. Brussa and I. A. Grela, "Flora Arborea del Uruguay con Enfasis en las Especies de Rivera y Tacuarembó", 2007.
- [36] C. Taulé, M. Zabaleta, C. Mareque, R. Platero, L. Sanjurjo, M. Sicardi, L. Frioni, E. Fabiano, and N. Parapiptadenia, "New Betaproteobacterial Rhizobium Strains Able To Efficiently Nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan," *Appl Env. Microbiol.*, vol. 78(6), pp. 1692–700, 2012.
- [37] M. Zabaleta, "Conservación de Leguminosae nativas y sus bacterias simbióticas del Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay (ROU)," 2013.
- [38] J. M. Vincent, *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria*, IBPHandbook. Oxford, UK, 1970.
- [39] Lane D.J., "16S/23S rRNA sequencing. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Sysematics," pp. 115-175, 1991.
- [40] K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar, "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 24, no. 8, pp. 1596–1599, 2007.
- [41] N. M. Saitou, "The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees," *Mol. Biol.*, vol. 4, no. 4, pp. 406–425, 1987.
- [42] J. Felsenstein, "Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach.," *J. Mol. Evol.*, vol. 17, no. 6, pp. 368–376, 1981.
- [43] S.B. Hedges, "The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 9, no. 2, pp. 366-369, 1992.
- [44] C. S. Nautiyal, "An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 170, no. 1, pp. 265–270, 1999.
- [45] L. L. Kiiskinen, M. Rättö, and K. Kruus, "Screening for novel laccase-producing microbes," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 97, no. 3, pp. 640–646, 2004.
- [46] B. Schwyn and J. B. Neilands, "Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores.," *Anal. Biochem.*, vol. 160, no. 1, pp. 47–56, 1987.
- [47] W. M. Chen, C. H. Wu, E. K. James, and J. S. Chang, "Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*," *J. Hazard. Mater.*, vol. 151, no. 2–3, pp. 364–371, 2008.

- [48] L. A. Florentino, P. M. D. Jaramillo, K. B. Silva, J. S. Da Silva, S. M. De Oliveira, and F. M. D. S. Moreira, "Physiological and symbiotic diversity of *Cupriavidus necator* strains isolated from nodules of Leguminosae species," *Sci. Agric.*, vol. 69, no. 4, pp. 247–258, 2012.
- [49] C. Taulé, C. Mareque, C. Barlocco, F. Hackembruch, V. M. Reis, M. Sicardi, and F. Battistoni, "The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community," *Plant Soil*, vol. 356, no. 1–2, pp. 35–49, 2011.
- [50] J. Caballero-Mellado, J. Onofre-Lemus, P. Estrada-de los Santos, and L. Martinez-Aguilar, "The Tomato Rhizosphere, an Environment Rich in Nitrogen-Fixing *Burkholderia* sp. with Capabilities of Interest for Agriculture and Bioremediation," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 16, pp. 5308–5319, 2007.
- [51] S. Gopalakrishnan, A. Sathya, R. Vijayabharathi, and R. K. Varshney, "Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities," *3 Biotech*, pp. 355–377, 2014.
- [52] B. J. Ferguson, M. Lin, and P. M. Gresshoff, "Regulation of legume nodulation by acidic growth conditions," *Plant Signaling & Behavior*, no. March, pp. 1–5, 2013.
- [53] D. Pérez-Pantoja, R. Donoso, L. Agulló, M. Córdova, M. Seeger, D. H. Pieper, and B. González, "Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in Burkholderiales," *Environ. Microbiol.*, vol. 14, no. 5, pp. 1091–1117, 2012.
- [54] D. Pérez-Pantoja, R. De La Iglesia, D. H. Pieper, and B. González, "Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134", vol. 32, no. 5, 2008.
- [55] G. M. Gadd, "Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation," *Microbiology*, vol. 156, no. 3, pp. 609–643, 2010.
- [56] M. Mergeay, S. Monchy, T. Vallaey, V. Auquier, A. Benotmane, P. Bertin, S. Taghavi, J. Dunn, D. Van Der Lelie, and R. Wattiez, "*Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: Towards a catalogue of metal-responsive genes," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 27, no. 2–3, pp. 385–410, 2003.
- [57] X. Liu, S. Wei, F. Wang, E. K. James, X. Guo, C. Zagar, L. G. Xia, X. Dong, and Y. P. Wang, "*Burkholderia* and *Cupriavidus* spp. are the preferred symbionts of *Mimosa* spp. in Southern China," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 80, pp. 417–426, 2012.

- [58] R. Melkonian, L. Moulin, G. Béna, P. Tisseyre, C. Chaintreuil, K. Heulin, N. Rezkallah, A. Klonowska, S. Gonzalez, M. Simon, W.-M. Chen, E. K. James, and G. Laguerre, "The geographical patterns of symbiont diversity in the invasive legume *Mimosa pudica* can be explained by the competitiveness of its symbionts and by the host genotype.," *Environ. Microbiol.*, vol. 16, no. 7, pp. 2099–2111, 2014.