



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA

**EFFECTO DE LA MUTACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA
LEVANSACARASA (*IsdA*) DE *Gluconacetobacter diazotrophicus*
SOBRE LA COLONIZACIÓN DE LA CAÑA DE AZÚCAR**

Tesis que presenta

M. C. Ma. de Lourdes Velázquez Hernández

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Opción en

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR AGROPECUARIA

Asesor: D. C. JUAN JOSÉ VALDÉZ ALARCÓN

Coasesor: D. C. JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA

Morelia, Michoacán, Enero 2011

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del D. C. Juan José Valdez Alarcón. En la realización de este trabajo se contó con el financiamiento de la Coordinación de la Investigación Científica de la U.M.S.N.H. (proyecto C.I.C.-U.M.S.N.H.-14.7) y del CONACYT (proyecto J31278B).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan José Valdez Alarcón por aceptar que fuera su alumna de doctorado formando parte de su proyecto de investigación. Por ayudarme a madurar gracias a su dirección, consejos y ejemplo. Y por supuesto por su amistad y confianza brindada.

Al Dr. Joel E. López Meza por formar parte del comité tutorial.

Al Dr. Victor Manuel Baizabal Aguirre por sus comentarios puntuales y acertados de este proyecto y que en algunos casos fueron trascendentales para el desarrollo del mismo.

Al Dr. Luis Ernesto Fuentes Ramírez por sus aportaciones y sugerencias que permitieron refinar el trabajo.

Al Dr. Alfredo Herrera Estrella por las sugerencias y su visión global del trabajo que permitieron pulirlo.

Al Dr. Carlos Sosa por aceptar ser parte de la mesa de sinodales.

Al Dr. Alejandro Bravo Patiño por aceptar ser parte de la mesa de sinodales y el apoyo brindado durante todo el proceso del trabajo experimental.

Al Dr. Marcos Cajero Juárez que a pesar de que no fue parte del comité tutorial en innumerables ocasiones nos brindó apoyo durante el desarrollo del trabajo en el laboratorio.

A la Dra. Janette S. Bayuelo Jiménez y el Dr. Raúl Cárdenas por las facilidades brindadas del uso de equipo del IIAF.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Consejo de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico que me dieron durante la realización de mis estudios de doctorado.

A mis amigos que conocí en este estado, ya que me ayudaron de una forma u otra durante mi estancia y gracias a su amistad aportaron algo a mi vida cada uno de ustedes: Adriana, Javier, Mayra, Gaby, Marilyn, Alejandro, Cecilia, Daniela, Gaspar, Yadira, Yessy, Richy, Daysi y Dorian.

Gracias a todas aquellas personas que me brindaron su tiempo, su palabra y oportunidad de conocerlas y aportaron algo positivo a mi vida durante mi estancia en Morelia.

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico nuevamente a mis padres Lidia y Luis.

A veces uno ya se cree autosuficiente y la vida nos ubica colocándonos en situaciones donde gracias a los padres que tengo supere esos escenarios que se presentaron, me ayudaron y me levantaron en los tropiezos que tuve. Ellos han sido mis amigos incondicionales y mi apoyo de toda la vida. Debo dar gracias a Dios por que están junto a mí.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	ix
SUMARY	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1. Las bacterias fijadores de nitrógeno	2
2.1.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno como modelos de estudio	3
2.1.2. Biofertilizantes	4
2.2. Interacción planta-microorganismo	4
2.2.1. Endófitos	5
2.2.2. Exopolisacáridos	5
2.2.3. Osmoadaptación	6
2.2.4. Biopelícula	7
2.3. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	8
2.3.1. Endófito de la caña de azúcar	8
2.3.2. Otros hospederos	10
2.3.3. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> como bacteria promotora del crecimiento	11
2.3.4. Biofertilizante	15
2.3.5. Genómica de la interacción <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> -caña de azúcar	15
2.4. Levansacarasa	17
2.4.1. Fructosiltransferasas	17
2.4.2. Levansacarasa de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	17
2.4.3. Levansacarasa de bacterias patógenas	19
2.4.4. El locus de <i>lsdA-lsdB</i> y el operón del sistema de secreción tipo II	20
2.4.5. El fructano levana	21
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	
5.1. OBJETIVO GENERAL	23
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24

7.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
7.1.	Material biológico y condiciones de crecimiento	25
7.2.	Extracción de ácidos nucleicos	26
7.2.1.	Extracción de ADN cromosómico de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	26
7.2.2.	Extracción de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	27
7.3.	Reacciones de PCR	28
7.3.1.	Amplificación de genes de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	28
7.3.2.	Reacciones de secuenciación	29
7.4.	Southern blot	29
7.5.	Cuantificación de la actividad de la levansacarasa	30
7.6.	Cuantificación de la biopelícula	30
7.7.	Micropropagación de la caña de azúcar	31
7.8.	Colonización de la caña de azúcar con <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	31
8.	RESULTADOS	32
8.1.	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> levansucrase in involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation	33
8.2.	Resultados complementarios	46
8.2.1.	Obtención de las mutantes del gen que codifica para la levansacarasa	46
	▪ Verificación del mapa de restricción del plásmido pLSDA::NPTII	46
	▪ Generación de las mutantes del gen de levansacarasa	46
	▪ Verificación por secuenciación de la interrupción del gen <i>lsdA</i>	50
	▪ Análisis de la interrupción del gen <i>lsdA</i> por hibridación tipo Southern blot	52
	▪ La interrupción del gen <i>lsdA</i> elimina la actividad de la levansacarasa	53
8.2.2.	Caracterización de las cepas mutantes de levansacarasa	54
	▪ Caracterización fenotípica de las cepas mutantes de levansacarasa	54
	▪ Cinéticas de crecimiento de las cepas de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	57
8.2.3.	Análisis de los factores abióticos en las cepas de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	61
8.2.4.	Análisis de la formación de biopelícula en las cepas de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	67
8.2.5.	Complementación del gen <i>lsdA</i> en la cepa L-3 de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	69
	▪ Amplificación del gen <i>lsdA</i>	69
	▪ Transformación en <i>Escherichia coli</i> DH5 α	70
	▪ Transformación en <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> L-3	71
8.3.	Colonización de la caña de azúcar	75
8.3.1.	Micropropagación de la caña de azúcar	75

8.3.2. Colonización de la caña de azúcar con las cepas de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	78
8.4. Análisis del dominio catalítico de las levansacarases microbianas	82
9. DISCUSIÓN GENERAL	89
9.1. La levansacarasa y el metabolismo del carbono	90
9.2. La levansacarasa y la tolerancia al estrés osmótico	91
9.3. La levansacarasa y la tolerancia a la desecación	93
9.4. La levansacarasa en la formación de biopelícula	93
9.5. La levansacarasa en la colonización de la caña de azúcar	94
9.6. La levansacarasa en la cepa complementada C-19	97
10. CONCLUSIONES	100
11. PERSPECTIVAS	101
12. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA	103
13. ANEXO	110
13.1. Microbial fructosyltransferases and the role of fructans	111
13.2. Fructanos, prebióticos versátiles	127
13.3. Efecto de la mutación del gen <i>lsdA</i> de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (syn. <i>Acetobacter diazotrophicus</i>) en la colonización de la raíz de la caña de azúcar	134
14. APÉNDICE	151
14.1. Medios de cultivo para la micropropagación de la caña de azúcar	151
14.2. Medios de cultivo para la bacteria <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	153
14.3. Método del número más probable (NMP): Tabla y cálculos	154

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Psi\pi$	Potencial osmótico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BFN	Bacterias fijadoras de nitrógeno
BPCV	Bacteria promotora del crecimiento vegetal
EDTA	Sal disódica del ácido etilendinitrilo tetracético
EPS	Exopolisacáridos
FBN	Fijación biológica de nitrógeno
FEH	Fructano exohidrolasa
FQN	Fertilizantes químicos de nitrógeno
FTF	Fructosiltransferasas
GH	Glucosilhidrolasas
GH32	Glucosilhidrolasas de la familia 32
GH68	Glucosilhidrolasas de la familia 68
Krpm	miles de revoluciones por minuto
LRR	Repetidos ricos en leucina, del inglés leucine-rich-repeat
MAMPs	Patrones moleculares asociados a microbios, del inglés: Microbe-Associated Molecular Patterns
MDOs	Oligosacáridos derivados de membrana, del inglés: Membrane-Derived Oligosaccharides
MS	Sales del medio de Murashige & Skoog
NAD-GDH	Glucosa deshidrogenasa dependiente de NAD
NMP	Número más probable
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés: Polymerase Chain Reaction
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG 400	Polietilenglicol 400
PQQ-GDH	Glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ
SDS	Dodecilo sulfato de sodio
Tris	Tris(hidroximetilo)amino metano
UFC	Unidades formadoras de colonia

RESUMEN

En la simbiosis *Gluconacetobacter diazotrophicus*-caña de azúcar, la bacteria es considerada promotora del crecimiento ya que es capaz de fijar N_2 atmosférico en la planta, produce fitohormonas, solubiliza sales minerales y produce sustancias que inhiben el desarrollo de patógenos de la caña de azúcar. La mayoría de las plantas que coloniza *G. diazotrophicus* tienen un abundante contenido de sacarosa. La bacteria *G. diazotrophicus* utiliza la sacarosa a través de la enzima levansacarasa; ésta exoenzima hidroliza la sacarosa y sintetiza los fructooligosacáridos nistosa y cestosa, y el fructano levana. La levana es responsable del aspecto mucoso de las colonias bacterianas cuando crecen en medio con una concentración alta de sacarosa y se le atribuye la formación de una cubierta que aísla a la bacteria durante su interacción con la planta. En este estudio se generó una mutación en el gen *lsdA* que codifica para la levansacarasa de *G. diazotrophicus* PAI 5 R para analizar su participación en la tolerancia a factores abióticos y la colonización de la caña de azúcar. La mutación se generó por la inserción de un casete de resistencia a kanamicina en el gen *lsdA*. Las transformantes generadas llamadas L-3, L-14 y L-24 fueron caracterizadas por reacciones de PCR, secuenciación de los fragmentos amplificados, medición de la actividad de la levansacarasa y análisis de Southern blot. Las cepas L-3, L-14 y L-24 no modificaron los patrones de utilización de otras fuentes de carbono. Se analizó la osmotolerancia a NaCl, polietilenglicol 400 (PEG 400) y sacarosa en las mutantes deficientes en levansacarasa. La osmotolerancia a NaCl se disminuyó en las mutantes del gen *lsdA* desde 50 mM, y a 200 mM disminuyó dos órdenes de magnitud tanto el crecimiento de la cepa PAI 5 R como el de las mutantes del gen *lsdA*. Todas las cepas fueron sensibles a una osmolalidad de -1.3 MPa. No observamos cambio en la tolerancia a PEG 400 en ninguna de las cepas. La osmotolerancia a sacarosa fue analizada hasta 30% de sacarosa (876 mM), ya que esta bacteria se considera osmotolerante a la sacarosa. Las cepas mutantes del gen *lsdA* disminuyeron su tolerancia a la sacarosa solo desde 876 mM y 900 mM. Al analizar la tolerancia a la desecación, la mutante de levansacarasa disminuyó su supervivencia desde las 18 horas de desecación y a las 72 horas se inhibe el crecimiento de las bacterias mutantes de levansacarasa. La formación de biopelícula es un proceso relacionado con la presencia de exopolisacáridos. Al analizar la formación de biopelícula en tubos de polipropileno y vidrio se observó la disminución del 30% al 58.5%, respectivamente, en la formación de biopelícula con las cepas L-3, L-14 y L-24. La cepa complementada C-19 en el gen de *lsdA* recuperó el fenotipo mucoso, pero la duración de la fase lag está prolongada. La cepa C-19 recupera la osmolerancia a NaCl, no se recupera la respuesta de osmotolerancia a sacarosa pero sí la formación de biopelícula aunque con una apariencia diferente. Cuando se analizó la colonización de la caña de azúcar por *G. diazotrophicus* a las 4 y 24 horas post-inoculación se observó una disminución de la colonización en la raíz de la caña de azúcar por la cepa L-3, pero no a tiempos posteriores de colonización. La participación de la levansacarasa en las primeras etapas de la colonización de la caña de azúcar como un factor de colonización, puede estar relacionada con la tolerancia a diferentes osmolitos y la formación de biopelícula o directamente por la formación de una barrera constituida en parte por la levana, que recubre a la bacteria en el interior de la planta.

SUMMARY

In the *Gluconacetobacter diazotrophicus*-sugarcane symbiosis, the bacteria is considered as a plant growth promoter, because it is able to fix atmospheric N₂ in the plant, produces phytohormones, contributes to mineral salts dissolution and produces substances that inhibit the development of sugarcane pathogens. Most plants colonized by *G. diazotrophicus* have an abundant content of sucrose. *G. diazotrophicus* hydrolyze sucrose by the action the enzyme levansucrase. This exoenzyme hydrolyses sucrose and synthesizes the oligofructans nystose and kestose, and the fructan levan. Levan is responsible of the mucoid appearance of bacterial colonies when grown on a medium with high sucrose content. It has been attributed to levan the formation of a layer that isolates the bacterium from the plant environment. In this study we generated a mutation in the *lsdA* gene encoding the levansucrase of *G. diazotrophicus* PAI 5 R, to analyze its role in tolerance to abiotic factors and colonization of sugarcane. The mutation was generated by the insertion of a kanamycin resistance cassette into *lsdA*. The transformants called L-3, L-14 and L-24, were analysed by PCR reactions, sequencing of the amplified fragments, measurement of the levansucrase activity and Southern blot analysis. L-3, L-14 and L-24 strains did not show alterations in their carbon source utilization patterns. The osmotolerance to NaCl was reduced with the absence of *lsdA* gene function from 50 mM, but at 200 mM growth was reduced both in the PAI 5 R and the mutant strains. All strains were sensitive to an osmolality of -1.3 MPa. The osmotolerance to sucrose was tested up to 30% sucrose (876 mM) because this bacterium is considered osmotolerant to this sucrose concentration. *lsdA* mutants decreased their tolerance to sucrose only at 876 mM and 900 mM, indicating that the levansucrase participates in an osmoregulatory response to sucrose. The levansucrase mutants showed decreased survival at 18 hours of desiccation, while by 72 h none of the strains survived. Biofilm formation on polypropylene tubes and glass flasks was decrease in *lsdA* mutant strains by 30% and 58.5%. The C-19 complemented strain recovered the mucoid phenotype, but its growth rate showed a delay in the lag phase. The C-19 strain recovered the osmotolerance a NaCl, but it does not recover the osmotolerance to sucrose, and it recovers the ability to form biofilm, which seem to have a different structure. When analyzing the colonization of sugarcane by *G. diazotrophicus* at 4 and 24 hours post-infection, *lsdA* defective strains showed a decrease in root colonization at 4 hours post-inoculation, but not at longer times. The role of levansucrase in the first stages of the colonization of sugarcane could be related to osmotolerance to different compounds, to the ability to form of biofilms or directly to the formation of a barrier that isolates the bacterium from the plant environment.

1. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar es uno de los principales cultivos del país al cosecharse 51.1 millones de toneladas en el año 2008 (FAOSTAT). A partir de este cultivo se obtiene azúcar estándar como producto principal. El azúcar constituye del 7 al 18% del peso de la caña. El contenido abundante de azúcar favorece el establecimiento de microorganismos en el interior de la caña de azúcar. La bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* es de los microorganismos más abundantes en el interior de la caña y establece una interacción simbiótica debido a que se le considera el responsable de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) y se transmite a través de la propagación vegetativa de la caña en campo (Sevilla y Kennedy, 2000). *G. diazotrophicus*, se ha aislado de raíces y tallos de la caña de azúcar de Brasil, Australia, México, India, Cuba y Uruguay (Cavalcante y Döbereiner, 1988; Li y MacRae, 1991; Fuentes-Ramírez *et al*, 1993; Muthukumarasamy *et al*, 1999; Dong *et al*, 1994; Ureta *et al*, 1995). La FBN que realiza este endófito se caracteriza por no requerir de la formación de una estructura diferenciada en la planta, además, la nitrogenasa se mantiene activa en presencia de nitratos y amonio y por tolerar concentraciones de oxígeno altas debido a un mecanismo de protección respiratorio asociado (Flores-Encarnación *et al*, 1999).

G. diazotrophicus coloniza *in vitro* la caña de azúcar a través de las aberturas naturales donde emergen las raíces secundarias, localizándose posteriormente en los espacios intercelulares de raíces y tallos (Boddey, 1995), y en los vasos del xilema donde se ha observado la formación de microcolonias (Dong *et al*, 1994).

La levansacarasa de *G. diazotrophicus* es una enzima extracelular que hidroliza la sacarosa y sintetiza los fructooligosacáridos (FOS) cestosos y nistosos y un homopolímero de fructosa con enlaces β (2 $\rightarrow$ 6) llamado levana. La biosíntesis de levana confiere un aspecto mucoso a las colonias bacterianas cuando está presente la sacarosa en el medio de cultivo. Esto sugiere que la microcolonia puede estar cubierta por levana y puede ser el material contrastante observado en las micrografías electrónicas de las colonias observadas en el parénquima de la caña de azúcar (Dong *et al*, 1994). La levana es un tipo de exopolisacárido (EPS) presente en bacterias de varios géneros. En algunas interacciones bacteria-planta se ha considerado que la levana contribuye a la colonización de superficies debido a la formación de biopelícula. Por ejemplo, en bacterias patógenas de plantas a las cuales se ha mutado el gen que codifica para la levansacarasa como *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora* y *Streptococcus mutans* (este

último patógeno de mamíferos), la levansacarasa demostró ser un factor de virulencia (Li y Ullrich, 2001; Geier y Geider, 1993; Schroeder *et al*, 1989). En otras bacterias de suelo como *Paenibacillus polymyxa* la levansacarasa favorece la adhesión de suelo a la raíz y en *Bacillus subtilis* se especula que uno de los productos de degradación de la levana funciona como una molécula señal (Bezzate *et al*, 2000; Daguer *et al*, 2004). Los exopolisacáridos bacterianos se han relacionado con la tolerancia a factores bióticos y abióticos presentes en su hábitat, con la formación de biopelícula y favoreciendo la adhesión a superficies (Dunne, 2002). Nosotros planteamos la hipótesis de que la presencia de la levana, producto de la levansacarasa en *G. diazotrophicus* participa en la tolerancia a factores abióticos y es necesaria para la colonización de la caña de azúcar. Esto se analizó por medio de la evaluación de la colonización de una mutante de *G. diazotrophicus* en el gen *lsdA* de la levansacarasa en plántulas axénicas de caña de azúcar.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Las bacterias fijadoras de nitrógeno

Las plantas y mamíferos son incapaces de utilizar el N₂ atmosférico a pesar de su abundancia, y es un elemento que forma parte de varias moléculas indispensables para los organismos, como ADN, ARN, proteínas y vitaminas. El consumo de plantas en el mundo ha aumentado exponencialmente y para su cultivo requiere de varios nutrientes, entre ellos el N. En el suelo las sales de nitrato y amonio son las formas más comúnmente asimilables para la planta, aunque en suelos destinados al cultivo intensivo, estos se agotan rápidamente. Las plantas adquieren N con la aplicación de fertilizantes químicos de nitrógeno (FQN) o con la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN). La aplicación de FQN genera varios problemas ecológicos, porque el 65% del fertilizante aplicado se pierde por la erosión y lixiviación, y esto genera contaminación ambiental de lagos y otros mantos acuíferos (Bhattacharjee *et al*, 2008). La producción de los FQN libera grandes cantidades de CO₂, esto provoca en el medio ambiente el efecto invernadero, la disminución de la capa de ozono en la atmósfera y la lluvia ácida. Por otro lado, la presencia de BFN es más favorable para las plantas y el medio ambiente. Las BFN se localizan en la rizósfera (rizosféricas) o en el interior de las plantas (endófitos). Entre las especies de BFN mas estudiadas se encuentran las que pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Azospirillum* y la especie *G. diazotrophicus*.

2.1.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno como modelos de estudio

Estos grupos de bacterias Gram negativas llevan a cabo la FBN en condiciones diferentes, algunas de estas condiciones se enlistan en la Tabla 1. La mayoría de las BFN se han aislado de la rizósfera y en menor proporción hay BFN endófitas. *Rhizobium* se ha aislado de la rizósfera de leguminosas de los géneros *Medicago*, *Melilotus*, *Pisum*, *Vicia* (Bais *et al*, 2006); *Azospirillum* se ha aislado de la rizósfera de cereales de gramíneas; y *G. diazotrophicus* se ha aislado del interior de la caña de azúcar, es decir, un endófito (Tabla 1). Las BFN además de brindar una forma disponible de N a la planta sintetizan otras sustancias que favorecen el crecimiento de la planta. Diversos microorganismos de estos géneros son considerados como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), debido a que incrementan la disponibilidad de nutrientes por mecanismos que incluyen: la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico, la biosíntesis de fitohormonas, la solubilización de minerales, la promoción de otras simbiosis benéficas para la planta, la síntesis sustancias que inhiben el desarrollo de patógenos en la planta, y una combinación de estos mecanismos de acción (Vessey, 2003; Saravanan *et al*, 2008). Estas características hacen a estas bacterias adecuadas para su uso como biofertilizantes.

Tabla 1. Características fisiológicas de bacterias que realizan fijación biológica de N₂.

Características	<i>G. diazotrophicus</i> ¹	<i>Azospirillum spp</i> ²	<i>Rhizobium spp</i> ³
Rango de hospedero	Gramíneas y leguminosas: caña de azúcar, mijo, camote, café, piña	Gramíneas y leguminosas: arroz, caña de azúcar, trigo	Leguminosas: frijol
Estructura especializada para la FBN	No requiere	No requiere	Forma un nódulo
Límite de pH para la FBN	Hasta pH 3.0	Hasta pH 5	Hasta pH 4.5
FBN en presencia de nitrato	Hasta 60 mM	No fija N ₂	No fija N ₂
Aumento del rendimiento del cultivo aplicando la bacteria	20%	5 – 30%	30%
Dosis de fertilizante químico que permite la FBN	Hasta 300 kg N ha ⁻¹	Hasta 45 – 90 kg N ha ⁻¹	Hasta 60 - 200 kg N ha ⁻¹
Límite máximo O₂ para la FBN	Hasta 4%	Hasta 2 %	Hasta 1%
FBN con 10% de sacarosa	Reduce 20% la FBN	Reduce 90% la FBN	No reportado
FBN con 0.1% de NaCl	Reduce 50% la FBN	Reduce 5% la FBN	No afecta la FBN

1) Sevilla *et al*, 2001; 2) Muthukumarasamy *et al*, 2000b; 3) Zahran, 1999.

2.1.2. Biofertilizantes

Ciertas bacterias rizosféricas y endofíticas que promueven el crecimiento de la planta incrementan la disponibilidad de nutrientes, por lo que podrían ser utilizadas como biofertilizantes para disminuir los insumos en la agricultura. Los biofertilizantes contienen organismos vivos aplicados a las semillas, superficie de las plantas o suelo y son capaces de colonizar la rizósfera o el interior de la planta y promover su crecimiento a través del aumento de la disponibilidad o suplemento de nutrientes a la planta (Vessey, 2003). Las bacterias rizosféricas colonizan el suelo cercano a la planta, la superficie de la raíz, o los espacios intercelulares de la epidermis de la raíz. Por su parte, las bacterias endofíticas colonizan el espacio intercelular apoplástico en el parénquima o los vasos del xilema, el interior de las raíces, tallos y hojas, además de semillas, frutos, etc. (Vessey, 2003). Estas bacterias rizosféricas o endófitas utilizadas como biofertilizantes interactúan con la planta de forma benéfica.

2.2. Interacciones planta-microorganismos

La interacción entre planta-microorganismos es un proceso de varias etapas complejas. Los microorganismos son atraídos hacia la raíz por metabolitos secundarios de la planta, se adhieren y distribuyen en los tejidos de la planta, y algunos llegan a colonizar las hojas. Ésto implica crecimiento y supervivencia del microorganismo en la planta, es decir, colonización. En algunos casos el microorganismo es capaz de colonizar la superficie y tejidos de la planta, metabolizar las fuentes de carbono derivadas de la planta y sintetizar fitohormonas o moléculas señal que modulen la fisiología o desarrollo de la planta (Preston *et al*, 1998). La planta reconoce una serie de señales como flagelinas bacterianas, oligo- o polisacáridos, lipopolisacáridos, quitina en hongos, etc. Estas señales son llamadas en conjunto patrones moleculares asociados a microbios (del inglés MAMPs, microbe-associated molecular patterns). Los MAMPs se han identificado en microorganismos patógenos y simbióticos, y son reconocidos por receptores de la planta, que en su mayoría son proteínas transmembranales que tienen un dominio extracelular rico en repetidos LRR (del inglés leucine-rich-repeat) (Bent y Mackey, 2007). El conocer los MAMPs en las diferentes interacciones planta-microorganismo y los receptores de estos en la planta, ayudaría a entender los mecanismos de interacción y a diseñar estrategias para tratar de disminuir la virulencia de los fitopatógenos o favorecer la colonización de microorganismos benéficos para las plantas.

2.2.1. Endófitos

Los microorganismos endófitos son las bacterias u hongos que pasan parte o todo su ciclo de vida colonizando tejidos de plantas vivas sin causar síntomas de enfermedad (Sturz *et al*, 2000; Baldani *et al*, 1997). Los endófitos se trasladan del suelo a la planta hospedera a través de la unión a partículas del suelo, agua o utensilios de la agricultura; y por medio de vectores como los humanos, pájaros, insectos y nematodos que se alimentan de bacterias. Los endófitos usan diferentes rutas de entrada a la planta durante la colonización, incluyendo los estomas, las lenticelas, radículas germinando, heridas de tejidos asociadas con la emergencia de raíces secundarias, a través de tricomas quebrados, heridas causadas por abrasión en la raíz durante su crecimiento en el suelo, lluvia o granizo. Hay bacterias que penetran la planta a través de la invaginación de la célula del pelo radicular, o entran a través de las uniones entre los pelos radiculares y las células epidérmicas adyacentes, o por la síntesis de enzimas que degradan la pared celular de la planta (Sturz *et al*, 2000).

En las plantas que se propagan vegetativamente, el órgano utilizado para la propagación puede ser la fuente de bacterias endofíticas que subsecuentemente coloniza las raíces y los brotes desarrollados a través de los tejidos vasculares (Boddey *et al*, 1995). Otra vía de entrada de las bacterias endofíticas es a través de las regiones apicales de las raíces, donde se desprenden las células del borde de la raíz (Boddey *et al*, 1995).

Algunos factores que participan en la colonización de los endófitos son la densidad del inóculo, la temperatura, la cepa bacteriana y la variedad de la planta (Sturz *et al*, 2000, Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado, 2003). Durante la colonización también participan algunas de las sustancias que secreta la bacteria como proteínas y polisacáridos, principalmente, y la planta además secreta varios tipos de compuestos orgánicos que pueden participar en la interacción.

2.2.2. Exopolisacáridos

Los exopolisacáridos bacterianos como su nombre lo indica, son polímeros de carbohidratos que secretan la mayoría de bacterias al espacio extracelular y permanecen en la superficie bacteriana para formar una película extracelular o una capsula. Los EPS se acumulan en el periplasma en las bacterias Gram negativas y en el medio extracelular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. De acuerdo a su composición y estructura, los polisacáridos se clasifican en homopolisacáridos y heteropolisacáridos. Los homopolisacáridos son

polímeros formados casi exclusivamente por un tipo de monosacárido, como es el caso de los glucanos, las inulinas y las levanas. Los heteropolisacáridos formados por diferentes monosacáridos como el alginato y la xantana. Las bacterias pueden sintetizar ambos grupos de polisacáridos. Los EPS participan en una gran variedad de funciones desde promover la colonización de superficies sólidas u otros organismos, acumular nutrientes, proteger de la desecación, u otro estrés ambiental (Leigh y Coplin, 1992; Ophir y Gutnick, 1994). Los EPS participan durante la colonización de bacterias patógenas de plantas, como *Pseudomonas* y *Erwinia* y patógenos de animales como *Streptococcus mutans* (Velázquez-Hernández *et al*, 2009a); o durante las simbiosis como la de *Rhizobium*-leguminosa (Somers *et al*, 2004). Cada vez hay mayor interés por el estudio de la participación de los EPS en la tolerancia a factores abióticos como en la osmotolerancia o en la formación de biopelículas.

2.2.3. Osmoadaptación

Las membranas de las células bacterianas son permeables al agua y menos permeables a solutos. Cuando hay cambios en la concentración externa del agua por el aumento o disminución de la concentración de solutos extracelulares que son excluidos por la membrana, hay un movimiento de entrada y salida de moléculas de agua en la célula. Este movimiento del agua induce cambios en el volumen y/o presión celular. Todo esto activa procesos de osmoadaptación, entre los que se incluyen cambios fisiológicos y de expresión de genes que responden a los cambios de osmolalidad extracelular (Sleator y Hill, 2001). La Tabla 2 enlista algunos términos comúnmente usados en la osmoadaptación.

La bacteria responde al aumento de la osmolalidad del medio extracelular en tres fases que se superponen: en la fase I hay deshidratación (pérdida de un poco de agua), la fase II incluye el ajuste la composición de solventes citoplasmáticos y rehidratación, y la fase III es el remodelamiento celular. La fase I de respuesta al aumento de osmolalidad sucede en los primeros minutos del cambio, además de la deshidratación hay otros cambios estructurales como la disminución de la actividad de agua, el incremento de moléculas en el citoplasma y la alteración de la pared y membrana celular. Los cambios fisiológicos que suceden en la fase I son la activación de Trk/ProP (transportador de potasio/simporter H^+), el cese de parte del transporte y respiración, un incremento temporal del pH y un incremento temporal de ATP. La fase II va de 20 a 60 min, en esta fase se inicia la rehidratación y como parte de los cambios

fisiológicos incluye el restaurar los niveles de ATP, reanudar la respiración, acumular glutamato, K^+ u otros solutos compatibles. La fase III tiene una duración desde una a más horas y en ésta ocurre un remodelamiento de la pared celular y del nucleóide, se reanuda la síntesis de proteínas y ADN, la división y crecimiento celular y el ajuste de la composición de cosolventes. Los cambios fisiológicos de la fase III incluyen el establecer el ciclo de flujo de solutos compatibles y la expresión de genes que a su vez responde a cambios en la osmolalidad (por ejemplo: *proP*, *proU*, *kdpFABC*, *betT*). Todos estos cambios llevan a la célula a osmoadaptarse al medio (Wood, 1999).

Tabla 2. Glosario de términos de osmoadaptación

Término*	Definición
Actividad de agua	Es la concentración (o fracción molar) efectiva de agua en una solución
Cosolvente	Es un soluto que afecta significativamente las propiedades del agua como un solvente
Osmolalidad	Es la presión osmótica de una solución a una particular temperatura, expresada en moles de soluto por kilogramo de solvente (osmolal). La osmolalidad puede ser medida pero no calculada
Osmolaridad	Es una aproximación de la osmolalidad, expresada en moles de soluto por litro de solución (osmolar). La osmolaridad puede ser calculada como la suma de las concentraciones de los solutos osmóticamente activos en una solución
Osmoprotector	Es un soluto exógeno que estimula el crecimiento bacteriano en medio con alta osmolalidad y es transportado al citoplasma
Osmosensor	Es un mecanismo que detecta cambios en la actividad del agua (osmosensor directo) o resulta de cambios en la estructura celular o composición (osmosensor indirecto)
Osmotolerancia	El rango de osmolalidad del medio que soporta el crecimiento bacteriano
Presión osmótica	Es la presión ejercida por el agua sobre una membrana cuando se mueve de un extremo con menor concentración de solutos a uno de mayor concentración de solutos, para alcanzar el equilibrio
Soluto compatible	Es una molécula que se acumula en el citoplasma durante condiciones de estrés osmótico y no afectan significativamente los procesos celulares

*Wood, 1999; Csonka, 1989.

2.2.4. Biopelícula

Las biopelículas probablemente sean el microambiente más común para las bacterias en la naturaleza. Las biopelículas son comunidades estructuradas de células bacterianas conglomeradas en una matriz polimérica producida por las mismas bacterias. La biopelícula se adhiere a superficies bióticas y abióticas (Dunne, 2002). Los componentes básicos de la

biopelícula son los microorganismos, un hidrogel y la superficie a la cual se adhiere. El hidrogel está formado por los EPS bacterianos y el agua, estos crean un campo tridimensional que rodea, ancla y protege a la bacteria (Dunne, 2002). En la biopelícula hay disponibilidad de nutrientes y cooperatividad metabólica, y en algunos casos adquisición de nuevas características genéticas por transferencia horizontal de genes (Davey y O’Toole, 2000). La estructura y composición de la biopelícula microbiana varía con el sitio de adherencia, el desarrollo de la población microbiana y las condiciones ambientales. Se han sugerido tres estructuras que forman las biopelículas: un mosaico heterogéneo, un confluente denso, es decir, microcolonias y la formación de canales de agua. Estos arreglos muestran la complejidad estructural de la biopelícula (Sutherland, 2001).

Las biopelículas microbianas en las plantas se forman en la superficie de la raíz y en el interior de la planta. En la raíz hay un ambiente heterogéneo rodeado por el suelo, las sustancias que secreta la raíz y las sustancias que secretan las bacterias. Lo anterior convierte a esta zona en un ambiente rico en fuentes de nutrimentos. En esta zona, llamada rizósfera, se presenta una mayor concentración de nutrientes disponibles para ciertas bacterias, las que toman ventaja para desarrollarse en la misma rizósfera o para penetrar al interior de la planta. Las bacterias se adhieren a la raíz por medio de componentes de la superficie celular de la bacteria como las proteínas de membrana, la cápsula, los lipopolisacáridos y las aglutininas.

Uno de los componentes importantes en la formación de la biopelícula son los EPS. Los EPS en la biopelícula promueven la agregación del suelo a la raíz, favorecen la adsorción de compuestos orgánicos, concentran nutrientes y componentes de crecimiento bacteriano, secuestran cationes, metales y toxinas, además restringen la difusión de compuestos como antibióticos hidrofílicos. También, la producción de EPS protege de estrés ambientales como la radiación UV, cambios de pH, cambios osmóticos y desecación (Davey y O’Toole, 2000).

2.3. *Gluconacetobacter diazotrophicus*

2.3.1. Endófito de la caña de azúcar

Buscando el responsable de la fijación biológica de nitrógeno en la caña de azúcar se identificó a una bacteria diazótrofa endofítica, denominada *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Cavalcante y Döbereiner, 1988; Gillis *et al*, 1989; Yamada *et al*, 1997). *G. diazotrophicus* es un bacilo Gram negativo de 0.7 μm por 2 μm y posee de 3 a 5 flagelos peritricos, inicialmente se aisló solamente a partir de muestras del interior de la caña de azúcar y no se pudo recuperar

de la rizósfera de la caña de azúcar en medios de cultivo apropiados. Por esta razón fue considerada un endófito obligado (Baldani *et al*, 1997).

Esta bacteria, se ha aislado del interior de raíces, tallos y hojas de caña de azúcar en Australia, India, México, Cuba, Canadá, Egipto y Uruguay. *G. diazotrophicus* coloniza la caña de azúcar en los espacios intercelulares de la raíz, los vasos del xilema del tallo y espacios intercelulares adyacentes. *G. diazotrophicus* se encuentra en el líquido intercelular de la caña de azúcar, el cual tiene pH de 5.5 y una concentración de sacarosa de 11 al 13% (p/v; 320-380 mM, respectivamente; Dong *et al*, 1994). La concentración de la bacteria en este fluido es de 1.1×10^4 bacterias/ml y en tejidos homogeneizados es de 10^6 a 10^7 bacterias/ml. Debido a que *G. diazotrophicus* en el campo se encuentra preferentemente en el interior de la caña de azúcar, y esta se propaga por reproducción vegetativa, la ausencia de una presión de selección por la poca variación que encuentra en su ambiente contribuye a su baja diversidad genética (Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado, 2003). *G. diazotrophicus* se transmite gracias a la propagación vegetativa de la caña, aunque se ha demostrado en el laboratorio que la bacteria penetra activamente en las raíces de plantas axénicas por las heridas formadas al emerger las raíces secundarias y a través del ápice de las raíces de la caña de azúcar (Boddey, 1995). También se ha asociado a los pelos radiculares cuando es inoculada *in vitro* en el frijol común (Trujillo-López *et al*, 2006). Se ha intentado de recuperar a esta bacteria a partir de suelo en cultivos de caña inoculado medios de cultivo específicos para este microorganismo. Su presencia en el suelo de cultivos de caña de azúcar se ha intentado poner de manifiesto con ensayos de detección mediante ELISA o PCR, en ningún caso se ha recuperado o detectado la presencia de *G. diazotrophicus* (Reis *et al*, 1994; Li y McRae, 1992; Franke-Whittle *et al*, 2005). Esto se ha asociado al bajo contenido de materia orgánica en el suelo de la caña de azúcar, debido a que la caña es quemada antes de cosecharla. *G. diazotrophicus* se ha recuperado de hojas senescentes depositadas en el suelo (Reis *et al*, 1994), esto sugiere que la bacteria requiere de abundante materia orgánica para tolerar el estrés abiótico al que está expuesta en el suelo.

El aislamiento de *G. diazotrophicus* de la caña de azúcar ha sido abordado por varios autores (Tabla 3). En diferentes variedades de caña de azúcar de varias partes del mundo se ha aislado esta bacteria. También se ha recuperado de diferentes órganos de la caña de azúcar en un rango de 10^4 a 10^7 bacterias/g de tejido (Tabla 3). Las variaciones en la colonización de la

caña de azúcar se debe a las diferentes variedades de la caña de azúcar en combinación con las diferentes cepas que la colonizan.

Tabla 3. Aislamientos de *G. diazotrophicus* en la caña de azúcar

Muestra	Bacterias/ml ó bacterias/g de tejido	Cepa bacteriana	Variedad de caña de azúcar	Método de conteo bacteriano	Referencia
Fluido intracelular	1.1×10^4 en apoplasto	PAI 5 ATCC 49037	Ja 60-5	UFC/ml	Dong <i>et al</i> , 1994
Raíz secas	$27.4-215 \times 10^5$	IS 16.5, Q	Variedades	NMP	Li y MacRae, 1992
Tallos secos	$16-51.8 \times 10^5$	138.3, 2S, etc.	australianas		
Hojas secas	$1.9-120 \times 10^5$				
Raíz fresca	10^5-10^7	PAI 5 ATCC	CB 45-3, NA 56-	NMP	Reis <i>et al</i> , 1994
Hojas senescentes	8×10^6	49037	79, RB 73-9735		
Rizósfera	10^4-10^5	Cepas indias	CoC 671, CoC	NMP	Muthukumarasamy <i>et al</i> , 1999
Raíz fresca	10^5-10^6		86062, CoC		
Tallos frescos	10^7		91061, CoC		
Hojas frescas	10^7		92061		

UFC, Unidades formadoras de colonia; NMP, Número más probable

2.3.2. Otros hospederos

G. diazotrophicus también se ha aislado de tejidos de otros cultivos como raíces y tubérculos de camote, raíces y tallos de café, raíces, tallos, hojas y en suelo rizosférico del ragi o mijo de la India (*Eleusine coracana* L.); raíces, tallos y hojas de la piña, dentro del fruto del mango, en la rizósfera del plátano y en el interior de la zanahoria, el rábano, la remolacha, el melón, el maíz, la papaya y en rosales (Jiménez-Salgado *et al*, 1997; Loganathan *et al*, 1999; Muthukumarasamy *et al*, 2002b; Dibut *et al*, 2005). *G. diazotrophicus* también se ha aislado de la chinche harinera *Saccharicoccus sacchari*, la cual puede estar involucrada en la transmisión de la bacteria de planta a planta (Ashbolt y Inkerman, 1990).

La colonización de *G. diazotrophicus* en plantas que no son sus hospederos convencionales genera efectos positivos al cultivo. Cuando el sorgo (*Sorghum bicolor*) fue inoculado con *G. diazotrophicus*, se indujo el aumento en la acumulación de glucosa y fructosa en brotes de plantas jóvenes. Esto sugiere que *G. diazotrophicus* estimula la actividad de invertasa u otros sistemas enzimáticos relacionados con la síntesis de monosacáridos, y que esta actividad mejora el crecimiento e incrementa la acumulación de carbohidratos del sorgo (Bastián *et al*, 1999). Otra enzima que podría participar en la acumulación de glucosa y fructosa sería la

levansacarasa de *G. diazotrophicus*, debido a que esta es una exoenzima que hidroliza la sacarosa para liberar glucosa y fructosa.

En un ensayo de colonización de *G. diazotrophicus* y frijol, utilizando luz UV como inductor abiótico de la acumulación de compuestos flavonoides, la cantidad de bacterias asociadas en las raíces se incrementó 5.6 veces y se indujo la acumulación de compuestos con propiedades cromatográficas similares a los flavonoides poniendo de manifiesto la respuesta de la planta ante la presencia de la bacteria (Trujillo-López *et al*, 2006). Es conveniente mencionar que los flavonoides son secretados por la raíz de leguminosas cuando interactúan con rizobacterias.

2.3.3. *Gluconacetobacter diazotrophicus* como bacteria promotora del crecimiento

G. diazotrophicus ha sido propuesta como una BPCV al cubrir los requisitos que promueven el crecimiento de la planta mencionados en la sección 2.1.2, cada uno de ellos se describe a continuación.

La FBN es una de las principales características de las BPCV. La FBN en *G. diazotrophicus* se lleva a cabo en condiciones diferentes a la mayoría de diazótrofos debido a la adaptación en su hábitat, probablemente. Este simbiote crece y fija N_2 en presencia de 10% de sacarosa a pH 5.5 ó hasta pH 3, y crece en microaerobiosis y carece de la enzima nitrato reductasa, aunque en presencia de nitrato disminuye la actividad de la nitrogenasa (comunicación personal del Dr. Fuentes-Ramírez). La enzima responsable de la fijación de nitrógeno es la nitrogenasa que en presencia de 80 mM nitrato y 10 mM amonio es aún activa. En la mayoría de BFN la nitrogenasa se inactiva en presencia de bajas concentraciones de nitrato u amonio (Tabla 1). Varios autores han estudiado como se afecta la colonización de la caña de azúcar por este endófito en presencia de FQN (Tabla 4). Los valores de la Tabla 3 muestran los aislamientos de *G. diazotrophicus* sin la presencia de FQN en el cultivo, comparado con los datos de la Tabla 4, se observa la disminución de tres órdenes de magnitud de la colonización en la caña por la bacteria en presencia de FQN. Es interesante que en presencia de FQN la fijación de nitrógeno con *G. diazotrophicus* en la caña de azúcar aunque disminuida es aun detectable, cuando en otras BPCV, la nitrogenasa se inactiva con esas concentraciones de FQN, y por lo tanto, no hay FBN (Tabla 1).

G. diazotrophicus presenta varios mecanismos para proteger a la actividad de nitrogenasa del efecto nocivo del oxígeno. En el mecanismo denominado protección respiratoria, en

condiciones de fijación de nitrógeno, las células de *G. diazotrophicus* expresan un citocromo a_1 que permite el incremento en la actividad respiratoria y por lo tanto el consumo acelerado de oxígeno, disminuyendo su concentración efectiva en el entorno y evitando su interacción con el sitio activo de la nitrogenasa (Flores-Encarnación *et al*, 1999). En el mecanismo de protección conformacional, en presencia de concentraciones elevadas de O_2 , una proteína FeSII (proteína Shethna) se oxida y se une a la nitrogenasa, ocasionando una inactivación reversible al recuperarse los niveles de O_2 con la consecuente reducción de la proteína FeSII y su separación de la nitrogenasa (Ureta y Nordlund, 2002).

Tabla 4. Colonización de la caña de azúcar por *G. diazotrophicus* en presencia de FQN.

Tejido	UFC/ml o bacterias/g ⁽¹⁾	Cepa bacteriana	Variedad de caña	Inoculo	Días post-inoculación	Contenido de FQN
Tallos ²	5.7×10^2	UAP 5541	MEX 5532,	10^7 bacterias/planta	30	11 mmol de NH_4NO_3
Raíz ²	2.7×10^2		MEX 57-473, etc.			
Rizósfera ³	10^4	PAI 5	Co 8021, Co	10^7 - 10^8 bacterias/ml	15	0-120 kg N/ha año
Raíz fresca ³	10^5	ATCC	86032			
Hojas frescas ³	10^4	49037				
Rizósfera ⁴	1.25×10^6	PAI 5 ^T ET3	MEX 57-473	Sumergieron la raíz 1 h en 2×10^8 bacterias/ml	35	10 mg de NH_4NO_3
Raíz ⁴	8.91×10^4					
Yema ⁴	3.31×10^2					
Raíz ⁵	11.5×10^4	T8	Co 86032	0.1 ml (10^8 células/ml)	60	280 kg/ha
Hoja ⁵	2×10^4					

1) Las bacterias fueron cuantificadas por el método del NMP; 2) Fuentes-Ramírez *et al*, 1999; 3) Muthukumarasamy *et al*, 2002a; 4) Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado, 2003; 5) Muthukumarasamy *et al*, 2006.

En ensayos *in vitro* se ha demostrado que el carácter mucilaginoso de la matriz extracelular en las colonias de *G. diazotrophicus* en medio sólido permite que las células se muevan en su interior. Así, a bajas concentraciones de oxígeno las células móviles se localizan en la superficie de la colonia, mientras que con altas concentraciones de oxígeno las células se desplazan a la base de la colonia. Aunque no se han determinado las concentraciones de oxígeno en el interior de la colonia, se cree que este fenómeno pudiera limitar la concentración efectiva de oxígeno en las células con actividad diazotrofa (Dong *et al*, 2002).

Lee *et al*, (2000) identificaron en *G. diazotrophicus* los genes *nif*, que codifican las subunidades de los componentes de la nitrogenasa, la dinitrogenasa reductasa (Fe-proteína) y dinitrogenasa (FeMo-proteína), así como las enzimas que participan en la biosíntesis de los núcleos de hierro-molibdeno en la FeMo-proteína. Sevilla *et al*, (2001) analizaron la infección con *G. diazotrophicus* silvestre y una mutante Nif^- en plántulas axénicas de caña de azúcar, la

cepa Nif⁻ fue deficiente en el gen *nifD* que codifica para la subunidad α de la apoproteína dinitrogenasa. Ambas fueron capaces de colonizar las plantas de caña de azúcar recuperando cantidades similares de células bacterianas asociadas a raíces, tallos y hojas. Esto sugiere que la fijación de nitrógeno no se necesita para la colonización endofítica de la caña. La inoculación de *G. diazotrophicus* silvestre aumentó el crecimiento de plántulas de caña de azúcar axénicas y el contenido total de nitrógeno comparado con las inoculadas con la cepa mutante Nif⁻. Al comparar las plántulas inoculadas con la cepa mutante Nif⁻, con las plántulas control sin inocular adicionadas con fertilizantes nitrogenados, observaron que las plántulas inoculadas con la cepa mutante Nif⁻ presentaron mejor crecimiento (mayor peso fresco) debido posiblemente a la participación de otros factores, como lo son los reguladores de crecimiento que sintetiza la bacteria (ácido indol-3-acético y giberilinas) que tal vez promuevan el desarrollo de la planta.

G. diazotrophicus produce las fitohormonas ácido indol-3-acético y giberelinas. El ácido indol-3-acético es una sustancia que promueve el crecimiento del tallo, la diferenciación del floema y el xilema y la dominancia apical. También promueve el alargamiento, la división y diferenciación celular, de esta forma puede mejorar el crecimiento de la caña de azúcar (Fuentes-Ramírez *et al*, 1993). La bacteria también produce las giberelinas GA₁ y GA₃, posiblemente involucradas en el incremento de la proliferación celular de meristemos apicales (Bastián *et al*, 1998). Estas fitohormonas son importantes para el aumento del área de superficie de la raíz en el suelo, la cual es importante para la absorción de nutrientes.

La producción del ácido 5-cetoglucónico por *G. diazotrophicus* favorece la solubilización de las sales de zinc, ZnO, ZnCO₃, y Zn₃(PO₄)₂ (Saravanan *et al*, 2007). La planta se favorece con la presencia de cationes de Zn⁺² en suelos deficientes, y se beneficia de la fitoextracción o fitoremediación de suelos contaminados con este metal. Para la planta el Zn es un componente de muchas metaloenzimas de diversas funciones. La deficiencia de Zn en plantas reduce la actividad enzimática, y por lo tanto, la disminución de la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y clorofila.

Otra característica de las BPCV es que sus beneficios se incrementan cuando son utilizadas en combinación con otros microorganismos. La combinación de *G. diazotrophicus* con otros simbiontes para promover el desarrollo de la planta fue planteada por primera vez por Paula *et al*, (1991), al infectar las esporas del hongo micorrízico *Glomus clarum* con *G. diazotrophicus*.

Esta interacción incrementó la traslocación de *G. diazotrophicus* a las partes aéreas del camote y la caña de azúcar, y aumentó la esporulación del hongo en suelo y dentro de las raíces del camote y la caña de azúcar. Posteriormente, en un estudio con diferentes variedades de caña de azúcar en la India, se verificó la contribución de esta asociación de microorganismos. En plantas micropropagadas inoculadas con *G. diazotrophicus* y *G. clarum* observaron que la hoja contenía mas N y biomasa que las plantas control (Muthukumarasamy y Rebathi, 1999). Otro género bacteriano endófito de la caña de azúcar son las bacterias del género *Herbaspirillum* spp. Una mezcla de *Herbaspirillum* sp. y *G. diazotrophicus* fue inoculada en plántulas de caña de azúcar, mostrando un aumento de la biomasa de las plántulas sembradas en suelo sin esterilizar, a los 45 días post-infección (Muthukumarasamy *et al*, 2006). Plantas de arroz inoculadas con *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp., *Burkholderia* spp., *G. diazotrophicus* y *Pseudomonas* spp., aisladas previamente de arroz, mostraron un aumento de la longitud de las raíces y los brotes en el arroz coreano; además observaron un aumento del 18% al 27% en la biomasa de la planta (Muthukumarasamy *et al*, 2007). Todos los ejemplos anteriores demuestran que la interacción de *G. diazotrophicus* con otros simbioses tienen un efecto sinérgico para promover el crecimiento de la planta.

G. diazotrophicus produce compuestos que inhiben el desarrollo de tres patógenos de la caña de azúcar. El primero es *Xanthomonas albilineans*, una bacteria causante de la escaldadura foliar de la caña de azúcar, la planta presenta los síntomas de manchas blancas, que se observan como una línea de pincel en la hoja con dirección de la vaina principal, se marchita y la planta muere. *G. diazotrophicus* sintetiza una lisozima que inhibe el crecimiento de *X. albilineans* en la caña de azúcar e induce la resistencia sistémica en la planta para protegerla de *X. albilineans* (Blanco *et al*, 2005; Arencibia *et al*, 2006). El segundo patógeno es *Meloidogyne incognita*, un nematodo que infesta la raíz de la caña de azúcar y muchos otros cultivos como el tomate. El nematodo penetra la raíz de las plantas, las raíces se deforman y desarrollan agallas, inhibiendo la adsorción de nutrientes por la raíz. La bacteria a través del metabolismo de la glucosa sintetiza el ácido 5-cetoglucónico (Figura 1), y este participa en la solubilización de sales de Zn como ZnO, ZnCO₃, y Zn₃(PO₄)₂. La presencia de Zn⁺² o quelatos de Zn en el cultivo promueve la actividad nematicida y reduce la penetración de la raíz por larvas de *M. incognita* (Saravanan *et al*, 2007). El tercer patógeno es *Colletotrichum falcatum*, un hongo causante de la pudrición roja de la caña de azúcar. En ensayos *in vitro* en agar PDA

identificaron cepas de *G. diazotrophicus* que inhibían el desarrollo del hongo, aunque no se identificó la sustancia antifúngica producida por la bacteria (Muthukumarasamy *et al*, 2000a).

El último mecanismo relacionado con la actividad de las BPCV es una combinación de todos los mecanismos anteriores. Esto puede suceder en *G. diazotrophicus*, ya que en la inoculación con otros diazótrofos en la mayoría de estas interacciones no se reporta un aumento del contenido de nitrógeno en la planta pero si un aumento en la biomasa de la planta, así que el aporte de N a la planta en ausencia de N inorgánico, no es el único mecanismo por el cual se promueve el desarrollo de la planta.

2.3.4. Biofertilizante

Las ventajas que ofrece *G. diazotrophicus* con respecto a otros diazótrofos con potencial para ser utilizado como biofertilizante se resumen en la Tabla 3, y son: 1) rango de hospedero amplio; 2) no requiere de la diferenciación de estructuras especializadas en la planta donde se realice la fijación de nitrógeno; 3) crece y fija nitrógeno en condiciones de pH extremas (3.0); 4) produce fitohormonas que contribuyen a mejorar el crecimiento y el desarrollo de la raíz; 5) fija nitrógeno en presencia de nitratos o sales de amonio; 6) la fijación de nitrógeno tolera altas concentraciones de O₂; 7) tolera condiciones con osmolalidad extrema. Así, *G. diazotrophicus* puede tener un impacto significativo en la agricultura al disminuir los consumos de FQN si se le utiliza en la elaboración de biofertilizantes. Ya existen en el mercado biofertilizantes preparados con *G. diazotrophicus*, un ejemplo es el llamado SugarPlus®.

2.3.5. Genómica de la interacción *Gluconacetobacter diazotrophicus*-caña de azúcar

La interacción *G. diazotrophicus*-caña de azúcar ha sido analizada por diferentes grupos de investigación, junto con la participación de otros endófitos de la caña de azúcar del género *Herbaspirillum*. El conocer como la planta responde a la presencia de *G. diazotrophicus* podría ayudar a conocer el nivel de participación de ambos organismos durante la colonización.

El transcriptoma de la caña fue analizado utilizando ESTs (Expressed Sequence Tags, Nogueira *et al*, 2001). Los ESTs que se identificaron sólo se expresaron en presencia de *G. diazotrophicus* y/o *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, fueron: 1) ESTs relacionados con el metabolismo del nitrógeno: reducción de nitrato, biosíntesis de aminoácidos, transportadores; 2) relacionados con el crecimiento de la planta: β -expansina y endo-1,4- β -glucanasa; ESTs de proteínas semejantes a las nodulinas ENOD8 y ENOD70; ESTs de genes que controlan el ciclo

celular (CYCD3 y CK1); y 3) ESTs relacionados con metabolismo secundario: chalcona sintasa y fenilalanina-amonio liasa.

Vettore *et al*, (2003) analizaron el transcriptoma de la caña de azúcar con la secuenciación de ESTs, generaron 26 genotecas de ADNc de diferentes tejidos y estados de desarrollo de la caña de azúcar. Solo una genoteca fue obtenida con la inoculación de *G. diazotrophicus* y otra genoteca con *H. rubrisubalbicans*, de ambas genotecas agruparon las SAS (Sugarcane Assembled Sequences) de acuerdo a categorías funcionales, los porcentajes más altos de la frecuencia de SAS de las genotecas obtenidas con ambos endófitos fueron en dinámica celular (18.5%), bioenergética (17.3%), metabolismo de proteínas (16.9%), respuesta a estrés (14.7%), traducción de señales/comunicación celular (10.7 %), y proteínas putativas (15.2%).

El grupo de Ma *et al*, (2004), también utilizaron EST para analizar el transcriptoma de la caña, elaborando 17 genotecas, 7 genotecas fueron de plántulas infectadas con *G. diazotrophicus* y 10 genotecas de plántulas infectadas con *H. rubrisubalbicans*. Los ADNc de mayor expresión se detectaron a partir de muestras de hojas e internodos. Estas evidencias indican que la planta participa activamente en la interacción con *G. diazotrophicus* al asimilar y metabolizar el nitrógeno fijado por la bacteria y beneficiar el crecimiento de la planta.

Wanderley-Nogueira *et al*, (2007) analizaron el transcriptoma de la caña de azúcar buscando la abundancia y diversidad de los genes de resistencia responsables de la interacción de la planta con microorganismos. Los genes de resistencia con motivos LRR (leucine-rich-repeat) fueron identificados como pertenecientes a dos clases, clase IV y V. Los de la clase IV (TM-LRR) están relacionados con la resistencia a hongos patógenos. Estos genes codifican para una proteína anclada a membrana (TM, transmembrane domain) con motivos LRR en un dominio extracelular y el extremo carboxilo corto como dominio intracelular. La clase V está constituida por genes que codifican cinasas con un receptor extracelular, conteniendo un TM, motivos LRR y un dominio intracelular de cinasa de serina/treonina.

La caña de azúcar responde activamente a la presencia de *G. diazotrophicus* al inducir genes relacionados con el ciclo celular, diferenciación, bioenergética, respuesta a estrés y las proteínas relacionadas con la síntesis de metabolitos secundarios.

2.4. Levansacarasa

2.4.1. Fructosiltransferasas

Las fructosiltransferasas (FTF) son enzimas que sintetizan fructooligosacáridos (FOS) y fructanos. Los FOS son carbohidratos con menos de 9 residuos de fructosa y los fructanos son homopolisacáridos que van desde 9 hasta más de 100 residuos de fructosa. Las FTF pertenecen a la familia de glucosilhidrolasas 68 (GH68) (Lammens *et al*, 2009). Las propiedades bioquímicas de las FTF microbianas, su sintenia, el control de la expresión de sus genes y su función biológica, se han revisado recientemente (Velázquez-Hernández *et al*, 2009a; Anexo 13.1). Las FTF hidrolizan la sacarosa y transfieren el grupo fructosilo liberado a otra molécula de sacarosa en el residuo de fructosa u otros receptores (Van Hijum *et al*, 2006). Las FTF se han aislado en plantas, bacterias y hongos. Para la síntesis de fructanos en plantas se requiere de al menos dos FTF, una que hidroliza la sacarosa y otra que transfiere los residuos de fructosa (Vijn y Smeekens, 1999). En bacterias y hongos solo se requiere de una enzima llamada levansacarasa, inulosacarasa o fructosiltransferasa. Las levansacarasas y fructosiltransferasas se han aislado de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las inulosacarasas solo se han aislado en bacterias ácido lácticas (Van Hijum *et al*, 2006). Las levansacarasas y fructosiltransferasas sintetizan fructanos de tipo levana, las levanas presentan enlaces $\beta(2\rightarrow6)$ entre sus subunidades, a diferencia de las inulosacarasas que sintetizan inulinas, fructanos con enlaces $\beta(2\rightarrow1)$.

2.4.2. Levansacarasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

G. diazotrophicus produce la enzima extracelular levansacarasa (sacarosa-2,6- β -fructano-6- β -D-fructosiltransferasa, EC 2.4.1.10) la cual utiliza como sustrato la sacarosa para sintetizar los FOS 1-nistosa y cestosa y el fructano levana con enlaces $\beta(2\rightarrow6)$ (Hernández *et al*, 1995). Es la única enzima que tiene *G. diazotrophicus* para hidrolizar la sacarosa, adicionalmente, esta bacteria carece de un sistema de transporte de la sacarosa. La levansacarasa representa el 70% de la proteína secretada al medio de cultivo cuando contiene glicerol (Hernández *et al*, 1995).

La enzima levansacarasa de *G. diazotrophicus* es la única exoenzima reportada hasta el momento dentro de las fructosiltransferasas de bacterias Gram negativas que tiene un péptido señal para su secreción (Hernández *et al*, 1999a). La levansacarasa de este endófito cuyo sustrato es la sacarosa, es monomérica de 58 kDa, su pH óptimo es 5 y no requiere algún metal

sustrato es la sacarosa, es monomérica de 58 kDa, su pH óptimo es 5 y no requiere algún metal como cofactor. Los valores de las constantes cinéticas son similares a las demás levansacarasa de bacterias Gram-negativas. La K_m fue 11.8 mM, k_{cat} de $3.6 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ y k_{cat}/K_m fue de $3.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Hernández *et al*, 1995; Velázquez-Hernández *et al*, 2009, anexo). El mecanismo de reacción de la levansacarasa es el llamado mecanismo de ping-pong, por esta razón la enzima lleva a cabo reacciones de transfructosilación de la fructosa a diferentes aceptores (Hernández *et al*, 1995). El mecanismo de ping pong para la levansacarasa es como sigue, el primer sustrato es la sacarosa que reacciona con la enzima y libera glucosa como primer producto, mientras el residuo de fructosa permanece unido covalentemente a un aminoácido en la enzima. En la segunda etapa, el residuo de fructosa unido a la enzima es transferido al segundo sustrato (aceptor) que puede ser agua, otra molécula de sacarosa, un FOS o el polímero levana, liberando el segundo producto que puede ser la síntesis de una nueva molécula de sacarosa, o la síntesis de FOS_{n+1} o levana_{n+1} (n = residuo de fructosa) (Frey y Hegeman, 2007). La transfructosilación de un residuo de fructosilo: a) al agua es una reacción de hidrólisis de la sacarosa; b) a un residuo glucosilo es una reacción de intercambio; c) a otra molécula de sacarosa es una reacción de síntesis de oligofructanos como la cestosa; y d) al polímero de fructosa, es una reacción de polimerización de la levana.

La levansacarasa de *G. diazotrophicus* SRT4 fue cristalizada, mostrando que su estructura es de 5 hojas β -propela. Los motivos considerados como centros catalíticos se encuentran localizados en el centro de esta estructura donde se lleva a cabo la hidrólisis de la sacarosa para la síntesis de FOS y la levana (Martínez-Fleites *et al*, 2005).

La levansacarasa hidroliza la sacarosa produciendo unidades de glucosa y fructosa, cada monosacárido puede seguir diferentes rutas en *G. diazotrophicus* (Figura 1). La levansacarasa une las fructosas liberadas a una molécula de sacarosa para producir levana y por otro lado la fructosa puede entrar al metabolismo de la bacteria a través de la fructocinasa.

La levansacarasa es una enzima extracelular donde sintetiza la levana, y también es activa en el medio periplásmico. La glucosa liberada por la levansacarasa puede entrar al metabolismo de la bacteria por tres rutas. La primera ruta es con la enzima periplásmica glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ (PQQ-GDH), esta convierte la glucosa a gluconato antes de que inicie el crecimiento exponencial (Galar y Boiardi, 1995; Stephan *et al*, 1991). La expresión de PQQ-GDH está regulada por las altas demandas energéticas como la FBN. La

segunda enzima es la glucosa deshidrogenasa citoplasmática dependiente de NAD (NAD-GDH), su expresión es constitutiva, pero su concentración disminuye en presencia de PQQ-GDH. La PQQ-GDH es la principal ruta para el metabolismo de la glucosa y la ruta alternativa es NAD-GDH (Luna *et al*, 2006). La tercera enzima es la glucocinasa, que fosforila a la glucosa generando glucosa 6-fosfato (Figura 1).

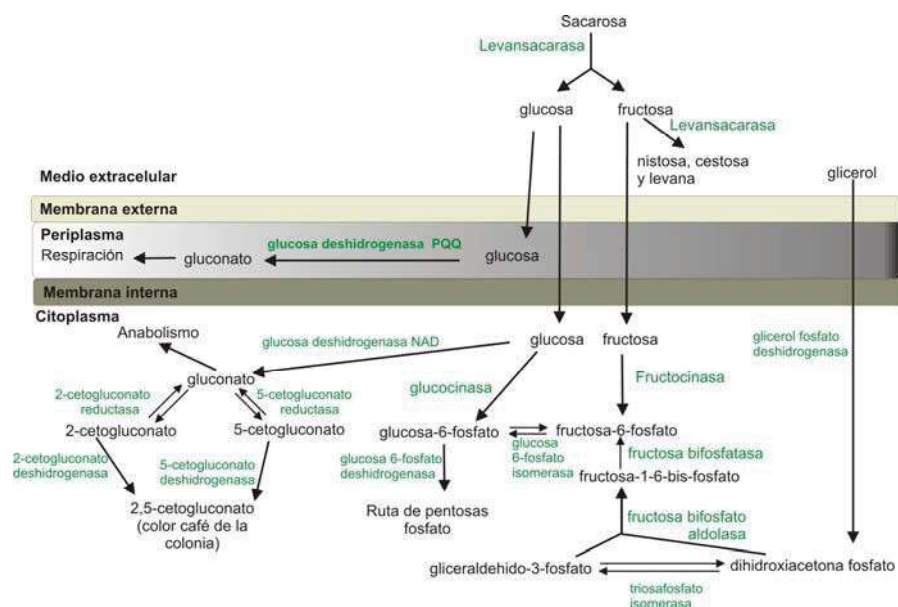


Figura 1. Metabolismo de sacarosa y el glicerol en *G. diazotrophicus*. Las letras verdes representan las enzimas y las negras los sustratos o productos (figura modificada de Alvarez y Martínez-Drets, 1995).

La glucosa 6-fosfato en presencia de NADP-GDH sintetiza 6-fosfogluconato que forma parte de la ruta pentosa-fosfato y así generar varios tipos de carbohidratos –C₄, C₅, C₆ y C₇– para la biosíntesis de otras moléculas o para el catabolismo de la célula (Alvarez y Martínez-Drets, 1995). Otra fuente de carbono importante para *G. diazotrophicus* es el glicerol. El glicerol lo utiliza por la acción de varias actividades enzimáticas hasta ser transformado a glucosa 6-fosfato (Figura 1). El gluconato representa el metabolito central del metabolismo del carbono en *G. diazotrophicus* (Luna *et al*, 2006).

2.4.3. Levansacarasa de bacterias patógenas

Las levansacarasas de las bacterias fitopatógenas *Erwinia amylovora*, patovares de *Pseudomonas syringae*, y de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans*, son consideradas factores de virulencia. *E. amylovora* causa la enfermedad conocida como el tizón del fuego en las plantas de la familia *Pomoideae*, principalmente en manzanas y peras. Cuando *E. amylovora* infecta estas plantas, la actividad de la levansacarasa parece acelerar la aparición de

soya. La actividad de la levansacarasa promueve el aumento de la aparición de los síntomas del tizón y la multiplicación bacteriana (Li y Ullrich, 2001). *S. mutans* es una de las principales bacterias causantes de la caries dental en humanos. La actividad de la levansacarasa promueve la aparición de caries dentales (Shroeder *et al*, 1989). En estos tres ejemplos de la participación de la levansacarasa fueron investigados a través de la generación de mutantes en el gen de la levansacarasa. En los tres casos la levansacarasa participa en la adaptación al hábitat de cada bacteria. En la interacción *G. diazotrophicus*-caña de azúcar la planta interactúa con bacteria simbiótica, para la cual sería interesante analizar la participación de la levansacarasa en la colonización de la caña de azúcar.

2.4.4 El locus *lsdA-lsdB* y el operón del sistema de secreción tipo II

La enzima levansacarasa es la FTF más común en bacterias, y es responsable de la síntesis de levana. La levansacarasa de *G. diazotrophicus* es codificada por el gen *lsdA* de 2.7 kb (Arrieta *et al*, 1996). El gen *lsdA* se localiza en un operón bicistrónico junto con el gen que codifica para la levanasa (*lsdB*) (Menéndez *et al*, 2009; Figura 2). La levanasa es la enzima que utiliza como sustrato la levana y la hidroliza a FOS. Dentro del mismo locus hacia el extremo 3' se encuentra el operón que codifica para los componentes del sistema de secreción tipo II compuesto por 12 proteínas codificadas en un solo operón (Figura 2), y que participa en la secreción de la levansacarasa (Arrieta *et al*, 2004). En el extremo 3' del gen *lsdA* hay una secuencia semejante a un terminador tipo tallo-asa, y después se encuentra la región codificante del gen *lsdB*. No se localizan secuencias promotoras características en la región del extremo 3' del gen *lsdA* hacia el extremo 5' del gen *lsdB*.



Figura 2. Mapa genético del locus de levansacarasa-levanasa (*lsdA-lsdB*) y el operón del sistema de secreción tipo II (*lsdXGOEFHIJLMND*). Los genes son representados por flechas, las flechas dobladas indican la localización de los promotores (figura modificada de Arrieta *et al*, 2004).

Recientemente, Menéndez *et al*, (2009) describieron que el gen *lsdB* se expresa a bajas concentraciones de fructosa, es reprimido por glucosa y la enzima levanasa es transportada al exterior de la célula utilizando el sistema de secreción tipo II, el mismo que usa la levansacarasa.

2.4.5 El fructano levana

La levana es un fructano con características diferentes a otros polisacáridos, que lo hacen un polímero interesante para la industria, y para su estudio en modelos biológicos. La levana es un polímero de fructosas unidas por enlaces $\beta(2\rightarrow6)$ con un residuo de glucosa en un extremo proveniente de la molécula precursora, la sacarosa. Las características interesantes de la levana son sus propiedades reológicas como viscosidad intrínseca, solubilidad y la resistencia a la tracción. La viscosidad es una propiedad de los líquidos y gases newtonianos que se relaciona con su resistencia al flujo. La viscosidad depende del solvente en que se resuspende el polímero. Un dato interesante es la viscosidad relativa. La viscosidad relativa es la relación entre la viscosidad de una disolución y la viscosidad del disolvente. También la viscosidad depende la concentración del polímero ya que el incremento de la concentración aumenta las interacciones entre las cadenas (Acosta, 2005). Como función de la concentración del polímero contra la viscosidad relativa, se obtiene una recta y que al extrapolarla al eje de la viscosidad relativa (eje de las ordenadas), la concentración del polímetro tiende a cero, obteniendo un número de viscosidad límite o viscosidad intrínseca. La viscosidad intrínseca es un índice del volumen ocupado por una molécula del polímero. La viscosidad intrínseca de la levana es $[\eta] \approx 0.17 \text{ dl g}^{-1}$ (a 20°C), este valor es relativamente bajo para un polímero tan grande como la levana; esto indica que cada molécula de levana es muy compacta (Kasapis *et al*, 1994).

La levana es soluble en agua y forma una suspensión. La levana no se resuspende en la mayoría de los solventes orgánicos y no la afectan los alcoholes. La levana tiene una resistencia a la tracción relativamente alta de 991 psi, comparada con la inulina de 124 psi y la goma de xantana de 33 psi. Esta característica ha llevado a la elaboración de pegamentos a base de levana. También se están elaborando películas mezclando la levana con el glicerol (Barone y Medynets, 2007). Las propiedades reológicas de la levana al tener una baja viscosidad intrínseca, y la resistencia a la tracción relativamente alta, tal vez sean las características responsables del comportamiento de exclusión e incompatibilidad con polisacáridos de plantas como la pectina (Kasapis *et al*, 1994), ya que la alta compactación de la levana y la interacción intermolecular producen una red estable difícil de deformar.

La levana, junto con otros fructanos como la inulina y los FOS, poseen propiedades como nutracéticos del tipo de los prebióticos. Los efectos de los fructanos en la dieta de humanos y

animales de granja y compañía ya han sido revisados previamente (Velázquez-Hernández *et al*, 2009b).

3. JUSTIFICACIÓN

Gluconacetobacter diazotrophicus es una diazótrofo endofítico de amplio rango de hospedero, con características que lo hacen un candidato potencial para la formulación de biofertilizantes útiles para su aplicación en cultivos de cereales para la alimentación humana y forrajes para la alimentación animal. Estas características son: 1) se ha aislado de una gran variedad de hospederos, por lo tanto, se puede utilizar para diferentes cultivos; 2) produce fitohormonas que promueven el desarrollo de la planta favoreciendo su crecimiento; 3) crece y fija nitrógeno en condiciones extremas de osmolalidad y pH, adecuado para algunas plantas que están bajo estas condiciones de estrés; 4) su presencia en el apoplasto aumenta la biodisponibilidad de azúcares solubles, de fácil asimilación facilitando el metabolismo de los carbohidratos; 5) la nitrogenasa es activa en presencia de amonio, entonces se puede inocular la bacteria junto con los FQN; y 6) la nitrogenasa tiene varios mecanismos de protección contra el oxígeno (protección respiratoria, protección conformacional y estructura colonial) y esto permite que se mantenga activa por más tiempo.

La levansacarasa ha demostrado ser un factor de virulencia en modelos de interacción microorganismo patógeno-hospedero, pero también puede participar en la adaptación de la bacteria a su entorno dentro de la planta y en el balance de carbohidratos en dicho entorno. Algunas plantas tienen fructohidrolasas capaces de hidrolizar la levana bacteriana a fructosa o a levanobiosa que puede actuar como molécula señal que induzca respuestas en la planta hospedera. Existen antecedentes de que la levansacarasa se considera un factor de virulencia en bacterias patógenas y en interacciones benéficas planta-bacteria no se conoce su función, además de la capacidad de la levana de participar en la formación de biopelículas.

4. HIPÓTESIS

La levansacarasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* participa en la adaptación de la bacteria a su entorno y en la colonización de la caña de azúcar.

5. OBJETIVOS

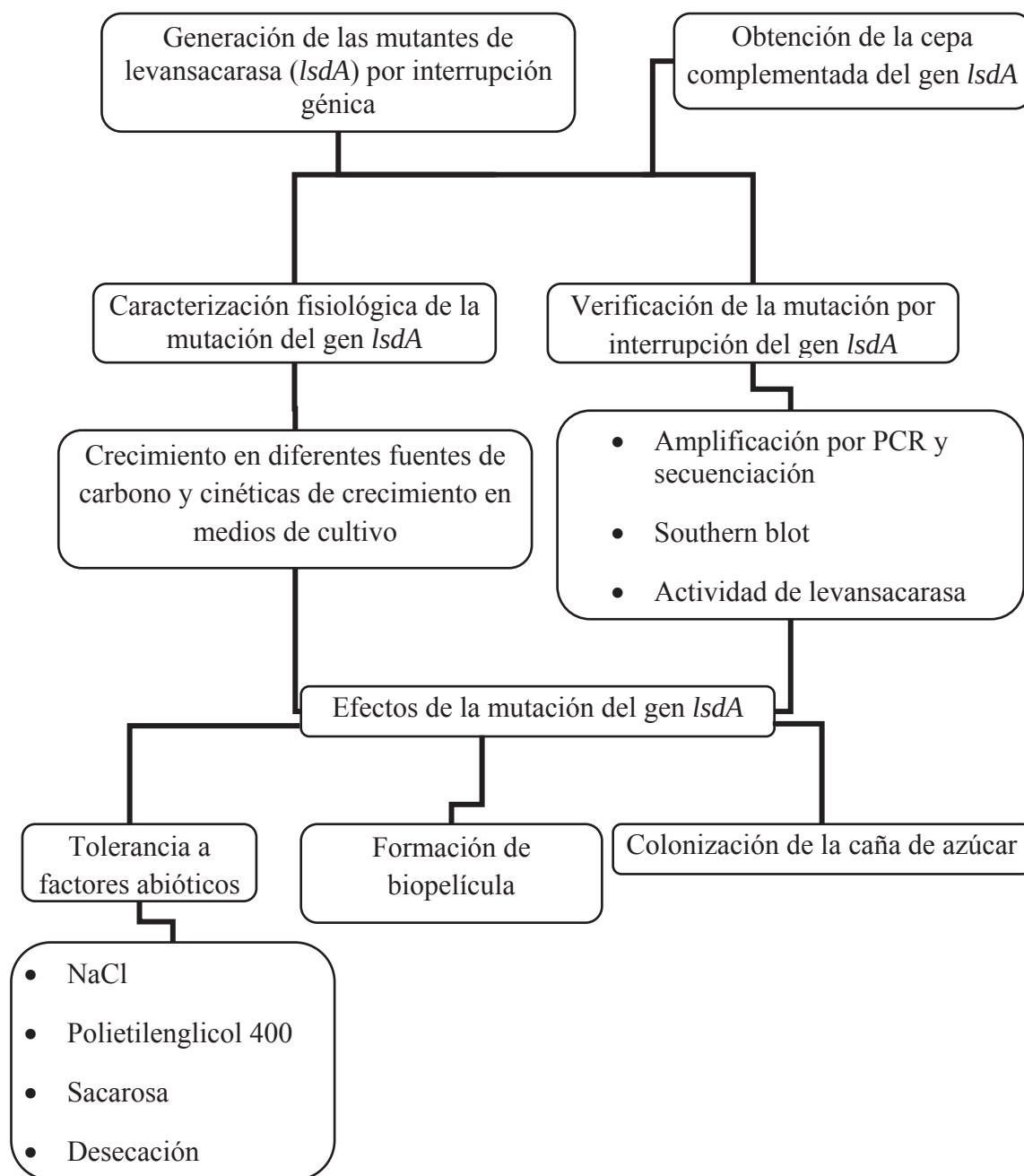
5.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar la participación de la levansacarasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en la adaptación a su entorno y en la colonización de la raíz de la caña de azúcar

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar el fenotipo y genotipo de una mutante de *G. diazotrophicus* (PAI 5 *lsdA::nptII*) deficiente en la síntesis de levansacarasa.
2. Evaluar la participación de la levansacarasa de *G. diazotrophicus* en la tolerancia a factores abióticos y formación de biopelícula.
3. Evaluar la participación de la levansacarasa de *G. diazotrophicus* en la colonización de la caña de azúcar.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Material biológico y condiciones de crecimiento

En la Tabla 5 se enlistan las cepas, los plásmidos, los oligonucleótidos y la variedad de planta utilizada para los ensayos de infección de este trabajo.

Tabla 5. Cepas, plásmidos, oligonucleótidos y plantas usados en este estudio.

Material biológico	Características relevantes	Medio de cultivo de mantenimiento *	Referencia o fuente
Cepas			
<i>G. diazotrophicus</i> PAI 5	Cepa ATCC 49037	PDA	Alagoas, Brasil
<i>G. diazotrophicus</i> PAI 5 R	Mutante espontanea a Rif	PDA con Rif ₅₀	Trujillo-López <i>et al</i> , 2006
<i>G. diazotrophicus</i> L-3, L-14 y L-24	Mutantes de <i>lsdA</i> , deficiente en la producción de levana	PDA con Rif ₅₀ y Km ₁₂₀	En este estudio
<i>G. diazotrophicus</i> C-19	Cepa L-3 complementada con el plásmido pBBR1MCS-LSDA	PDA con Rif ₅₀ Km ₁₂₀ , Tc ₁₀	En este estudio
<i>E. coli</i> DH5α	F-Φ80dlacZΔM15Δ(lacZYA-argF)	LB con Ac. Na ₁₅	
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	<i>Tc^r recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZDM15 Tn10]</i>	LB con Tc ₁₀	Stratagene
Plásmidos			
pLSD1.4::NPTII	Contiene el gen <i>lsdA</i> interrumpido en el sitio <i>Bam</i> HI con un casete de <i>nptII</i>	LB con Amp ₁₀₀ y Km ₆₀	Cruz-Vázquez, 2002
pBBR1MCS-3	Contiene un casete de resistencia a Tc	LB con Tc ₁₀	Kovach <i>et al</i> , 1995
pBBR1MCS-LSDA	Plásmido con el fragmento de 2.7 kb del gen <i>lsdA</i>	LB con Tc ₁₀ , Ac. Na ₁₅	En este estudio
Oligonucleótidos			
<i>lsu</i>	Secuencia 5'-3' GACTTTACCGCCCGCTGGACAC		Cruz-Vázquez, 2002
<i>lsl</i>	GTGGACGCCTGCGCCGCCAGAC		Cruz-Vázquez, 2002
<i>16Su</i>	TGAGTAACGCGTAGGGATCTG		Franke-Whittle <i>et al</i> , 2005
<i>16Sl</i>	GGAAACAGCCATCTCTGACTG		Franke-Whittle <i>et al</i> , 2005
<i>lskmu</i>	GTGACGCCAACGCCAACAAC		En este estudio
<i>lskml</i>	GTGAAGCCCGTGAACCAGA		En este estudio
<i>lsdAf</i>	CGCTTTCGGGGGTGGAGACTTGTT		En este estudio
<i>lsdAr</i>	TCCCCAGACCCGAGCGATTGAG		En este estudio
Planta			
Caña de azúcar <i>Saccharum officinarum</i>	Variedad MEX 57-473	MS líquido 50%	Ingenio Lázaro Cárdenas de Taretán, Michoacán, México

* Los medios de cultivo están descritos en el apéndice 14.1 y 14.2; Rif₅₀, rifampicina 50 µg/ml; Amp₁₀₀, ampicilina 100 µg/ml; Km₆₀ y Km₁₂₀, kanamicina 60 o 120 µg/ml; *nptII*, neomicina fosfotransferasa, casete de resistencia a kanamicina; Tc₁₀, 10 µg/ml; Ac. Na₁₅, ácido nalidíxico 15 µg/ml.

En la Tabla 5 se indica el medio de cultivo en que se mantuvieron las cepas bacterianas y las plantas. Las formulas de los medios de cultivo se describen en el Apéndice 14.1 y 14.2. Para las curvas de crecimiento, la DO se midió en el espectrofotómetro Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech) y el pH en el pH-metro Accumet basic (Fisher Scientific, USA). La cuantificación bacteriana por el método del numero más probable (NMP) se calculó con la tabla de Alexander (Apéndice 14.3). En los ensayos de preliminares de osmotolerancia a NaCl se inocularon por estria cruzada en placas de medio sólido de LGIP con 0.8 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, glucosa o sacarosa al 1% y 10%, y diferentes concentraciones de NaCl, se dejaron incubando a 30°C durante 6 días (Tejera *et al*, 2003).

El plásmido pBBR1MCS-3 fue donado por el Dr. Alejandro García de los Santos del Centro de Ciencias Genómicas (UNAM). El diseño de los oligonucleótidos fue en el programa DNASTAR (Lasergene, UK). La Figura 3 muestra la posición de los fragmentos que amplifican los oligonucleótidos de la Tabla 5 y las sondas utilizadas en el Southern blot.

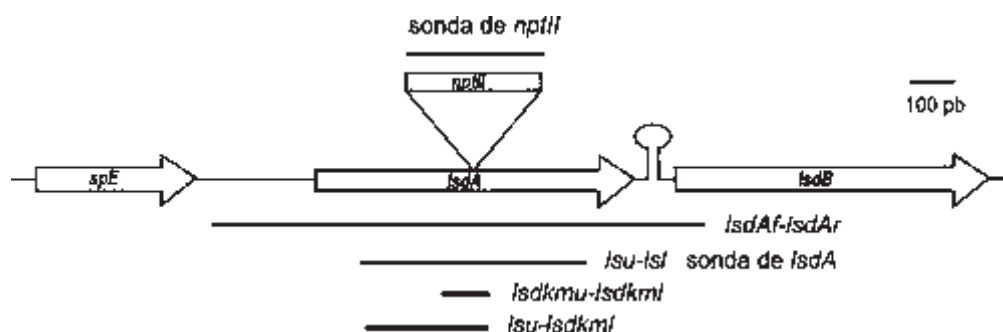


Figura 3. Organización estructural del locus *lsdA*. Los genes son representados con flechas, el gen *lsdA* fue interrumpido con un casete de resistencia a kanamicina (*nptII*) representado con un triángulo invertido que se inserta en el gen *lsdA*, las líneas debajo de los genes representan los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos indicados, son los fragmentos obtenidos con la cepa del gen silvestre de *lsdA*. Se indica que fragmentos de amplificación se utilizaron como sondas en el Southern blot.

7.2. Extracción de ácidos nucleicos

7.2.1 Extracción de ADN cromosómico de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

El ADN cromosómico se extrajo a partir de células de *G. diazotrophicus* cultivadas en medio LGITA (10 ml) (Apéndice 14.2), incubadas con agitación a 30°C durante 48 h. Las células bacterianas se recuperaron centrifugando el cultivo durante 10 min a 10 Krpm a 4°C

(IEC Centre MP4R, International Equipment Company, USA). Las células se lavaron dos veces con 5 ml de NaCl 5 M y se colectaron en cada lavado por centrifugación. El paquete celular se resuspendió suavemente en 5 ml de TE_{50/20} (Tris 50 mM pH 8.0, EDTA 20 mM) y centrifugó durante 10 min a 5 Krpm, este lavado se realizó dos veces. El paquete celular se resuspendió en 400 µl de TE_{50/20} y se transfirió a un tubo de 1.5 ml, se adicionaron 40 µl de lisozima (40 mg/ml en TE_{10/1}), y se incubó durante 30 min a 37°C (Incubator Sheldon Manufacturing, USA). Después se adicionaron 40 µl de proteinasa K (4 mg/ml en TE_{10/1}) y 25 µl de SDS al 20%, esta mezcla se incubó durante 1 h a 50°C (Thermolyne Dri-bath, USA). Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 50 µl de acetato de sodio 3 M y un volumen (550 µl) de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1; saturado con Tris 0.1 M, pH 8.0). Las fases se mezclaron por agitación suave por inversión y se centrifugó a temperatura ambiente en minifuga durante 5 min a 10 Krpm (Eppendorf Centrifuge 5415C, Germany). La extracción con fenol se repitió hasta desaparecer la fase blanca. La fase acuosa se extrajo con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1; saturado con Tris 0.1 M, pH 8.0). La fase acuosa se mezcló con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío (1375 µl), se mezcló suavemente por inversión, y se mantuvo durante 30 min a -20°C. El precipitado obtenido se empastilló por centrifugación a 10 Krpm durante 5 min. El sobrenadante se decantó, se agregó un volumen de etanol al 70% frío, y se resuspendió con agitación suave. La pastilla se centrifugó a 10 Krpm durante 5 min, se decantó el etanol, y la pastilla de ADN se resuspendió en TE_{10/1} con agitación suave y se almacenó a 7°C (Ureta *et al*, 1995; Ausubel *et al*, 1999)

7.2.2. Extracción de ADN plasmídico de *Escherichia coli*

El ADN plasmídico se extrajo a partir de *E. coli* cultivada en medio Luria-Bertani (3 ml) (Apéndice 14.2) con agitación a 37°C durante toda la noche. Las células bacterianas fueron recuperadas por centrifugación durante 1 min a 12 Krpm en minifuga. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 100 µl de solución **Birbonim I** (Tris-HCl pH 8.0, 25 mM; EDTA 10 mM, glucosa 50 mM) por agitación en vortex. Se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se agregaron 200 µl de solución **Birbonim II** (NaOH 0.2 N; SDS 1%; se preparó al momento de usarse), se agitó suavemente por inversión varias veces y se dejó reposando en hielo 5 min. Posteriormente, se agregaron 150 µl de solución **Birbonim III** (acetato de potasio 5 M/3 M; se preparó pesando acetato de potasio para una

solución 3 M y se ajustó el pH a 4.8 con ácido acético glacial) y se agitó con vortex manteniendo el tubo en posición invertida. Se dejó reposando durante 5 min en hielo. Para recuperar el sobrenadante del tubo se centrifugó a 12 Krpm a 4°C durante 5 min. Al sobrenadante recuperado se le agregó un volumen de isopropanol y se dejó incubar a -20°C por unos minutos. Se recuperó la pastilla por centrifugación a 12 Krpm a temperatura ambiente durante 5 min. El sobrenadante se eliminó y se adicionó un volumen de etanol al 70% frío, se agitó con vortex y se centrifugó a 12 Krpm a temperatura ambiente durante 5 min. El sobrenadante se eliminó, se dejó secar la pastilla y posteriormente se resuspendió en 50 µl de amortiguador TE_{10/0.1} (Tris-HCl pH 8.0, 10 mM; EDTA 0.1 mM) (Ausubel *et al*, 1999; Birnboim y Doly, 1979).

7.3. Reacciones de PCR

7.3.1 Amplificación de genes de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en estas reacciones se mostraron en la Tabla 5, las condiciones para cada reacción se muestran en la Tabla 6. Para las reacciones de PCR se utilizó la *Taq* ADN polimerasa (Boehringer Mannheim) con el termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany).

Tabla 6. Condiciones de las reacciones de PCR

Oligonucleótidos	<i>lsu-lsl</i>	<i>16Su-16Sl</i>	<i>lsdkmu-lsdkml</i>
Fragmento amplificado	1460 pb de la región codificante del gen <i>lsdA</i>	913 pb del gen 16S ribosomal	100 pb del gen <i>lsdA</i> con un sitio <i>Bgl</i> II dentro de la secuencia amplificada
ADN	500 ng	500 ng	500 ng
Oligonucleótidos	200 nM	100 nM	200 nM
dNTPs	200 µM	200 µM	200 µM
Mg₂Cl	1.5 mM	1.5 mM	1.5 mM
<i>Taq</i> ADN polimerasa	1 U	1 U	1 U
PCR: Desnaturalización Ciclos	94°C 3 min 35 { 94°C 1 min 55°C 1 min 72°C 2 min	94°C 5 min 35 { 60.5°C 30 s 72°C 1 min 92°C 1 min	94°C 3 min 35 { 94°C 1 min 61°C 1 min 72°C 2 min
Extensión final	72°C 10 min	60.5°C 15 s 72°C 10 min	72°C 10 min

7.3.2 Reacciones de secuenciación

Los productos de PCR se aforaron a 100 µl y se les adicionaron 10 µl de acetato de potasio 3 M pH 8. Se realizó una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, pH 8) y se centrifugó durante 5 min a 10 Krpm. Se realizó otra extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, pH 8). El ADN se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto durante 30 min a -20°C. El precipitado se recuperó por centrifugación durante 10 min a 10 Krpm. La pastilla se resuspendió en TE_{10/1} con el volumen original del PCR. La reacción de secuenciación se realizó con 3.2 pmol del oligonucleótido, 40 ng de ADN molde, 4 µl de Ready Reaction Premix y 2 µl de BigDye sequencing Buffer del kit Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). La reacción se llevó a cabo en un termociclador Master gradient (Eppendorf, USA), utilizando el siguiente programa: un ciclo a 96°C durante 1 min, 25 ciclos a 96°C durante 10 s, 55°C durante 5 s y 60°C durante 4 min.

Los productos de secuenciación obtenidos se limpiaron como se indica a continuación: la reacción de secuenciación se pasó a un tubo de 1.5 ml para adicionar 2 µl de EDTA 125 mM pH 8.0, y 50 µl de etanol absoluto. La reacción se mezcló con vortex e incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Para recuperar los productos de ADN se centrifugaron en minifuga a 13 Krpm durante 20 min, se descartó el sobrenadante, se adicionó 250 µl de etanol al 70% y se mezcló con vortex. Los productos de ADN se recuperaron por centrifugación a 13 Krpm durante 10 min. La pastilla se dejó secar y se resuspendió en 15 µl de formamida High Light®. Las muestras se analizaron secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

7.4. Southern blot

Para el ensayo de hibridación tipo Southern blot el ADN se digirió con endonucleasas de restricción, los fragmentos de ADN se separaron en un gel de agarosa por electroforesis y se transfirieron por capilaridad a una membrana de Hybond-N + (Amersham Pharmacia Biotech, UK), y el ADN se fijó en la membrana con luz UV durante 45 s (120 mJ, UV Stratalinker 2400, USA). El ADN genómico se digirió con las enzimas *Bgl*III, *Sall* y *Hind*III. La sonda de *lsdA* se obtuvo por medio de una reacción de PCR amplificando el gen *lsdA* clonado en el plásmido pLSDA1.4 con los oligonucleótidos *lsl-lsu* (Figura 3). La sonda de *nptII* fue obtenida con digestión con *Bam*HI del fragmento de PCR obtenido del plásmido pLSDA1.4::NPTII con los

oligonucleótidos *lsu-lsl*. Las sondas fueron marcadas con digoxigenina usando el DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter kit II (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). La temperatura de hibridación para la sonda *lsdA* fue a 55°C y para la sonda *nptII* fue a 47°C. Los Southern blots fueron visualizados con una película de Ortho T2 film (Juama, México).

7.5 Cuantificación de la actividad de la levansacarasa

La actividad de la levansacarasa fue determinada cada 6 min hasta 18 min usando 0.25 M de sacarosa en buffer de acetato de sodio 0.1 M, a pH 5.2 a 40°C (Hernández *et al*, 2000). Una unidad de LsdA es definida como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa durante un minuto bajo las condiciones de reacción analizadas. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford (1976) usando albúmina como estándar.

La actividad de la levansacarasa fue cuantificada con la medición de la glucosa acoplada a un ensayo enzimático de reducción de NAD^+ (Figura 4). La sacarosa se hidrolizó con la levansacarasa y la glucosa liberada se fosforiló con una hexocinasa, los productos fosforilados en presencia de NAD^+ , se oxidaron con la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Durante la oxidación, una cantidad equimolar de NAD^+ es reducido a NADH, con el consecuente incremento de la absorbancia a 340 nm, este incremento es directamente proporcional a la concentración de glucosa liberada debido a la hidrólisis de la sacarosa.

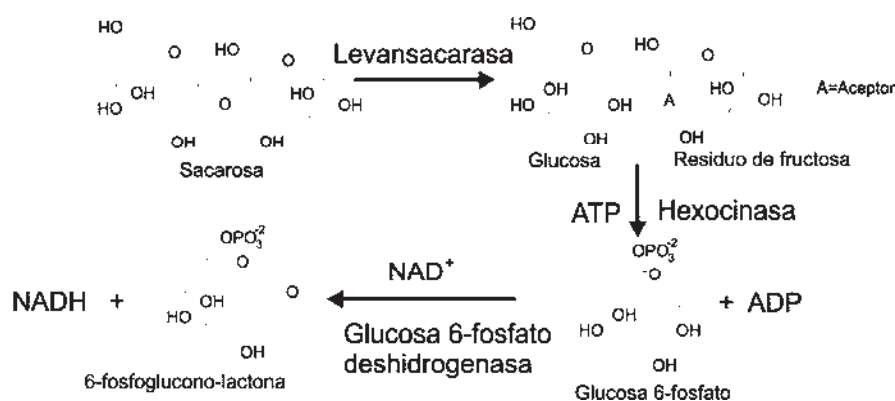


Figura 4. Reacciones para medir la actividad de la levansacarasa.

7.6 Cuantificación de la biopelícula

Los ensayos de biopelícula fueron realizados en medio LGIE inoculados con las cepas bacterianas a una DO_{620} inicial de 0.2. Los inóculos fueron incubados durante 72 horas sin agitación en tubos de polipropileno o con agitación con tubos de vidrio o matraces de vidrio. La

cuantificación de la biopelícula se hizo decantando el cultivo y se tiñó con cristal violeta como se describió en Prithiviraj *et al.* (2005). La cuantificación de las bacterias de la biopelícula se hizo decantando el cultivo, la biopelícula se resuspendió en sales de LGIP 1x al volumen original del cultivo y se empleo el método del NMP.

7.7. Micropropagación de la caña de azúcar

A partir de plantas de caña azúcar de la variedad MEX 57-473, de aproximadamente 50 cm de longitud (3 meses de edad), se extrajo la yema apical o los primordios foliares. La asepsia de los explantes se realizó sumergiendo 1 min en etanol al 70%, 3 lavados con agua destilada estéril, un lavado de 20 min con hipoclorito de sodio comercial al 20% y 7 lavados en agua destilada estéril. La micropropagación se realizó mediante la obtención de callo o brotes de acuerdo al protocolo de Lee (1987, ver Apéndice 14.1) con la modificación del medio de enraizamiento de Payán *et al.* (1977, ver Apéndice 14.1). Las plántulas se transfirieron a 15 ml de medio de Murashige y Skoog (MS, Murashige y Skoog 1962) diluidas las sales al 50% de la fórmula original (Lee 1987) sin hormonas y vitaminas. Las plántulas se mantuvieron en la cámara de crecimiento Biotronette Mark III (Lab-Line) con un fotoperiodo de 16 h luz y 120 W de intensidad de luz.

7.8. Colonización de la caña de azúcar con *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Los ensayos de colonización de la caña de azúcar con *G. diazotrophicus* se realizaron según el protocolo de Reis *et al.* (1999) con algunas modificaciones. Brevemente, las plántulas de caña de azúcar fueron transferidas a medio MS con las sales diluidas al 10% de su concentración original y sin fuente de nitrógeno (MS 10%) (Reis *et al.*, 1999). El inóculo bacteriano se creció en medio de extracto de papa G con 2% de glucosa hasta la fase exponencial (DO₆₂₀ 0.8) (Stephan *et al.*, 1991). Las cepas bacterianas se lavaron una vez con MS 10% y se resuspendieron en su volumen original con MS 10%. Las plántulas se inocularon con 10⁸ bacterias/ml de medio de la plántula. Las bacterias del inóculo fueron cuantificadas tanto con cámara de Neubauer como por el método del NMP. Las plántulas infectadas con las cepas de *G. diazotrophicus* fueron transferidas a papel absorbente estéril para quitar el exceso de medio líquido y se maceraron en morteros estériles con sales de LGIP. Las bacterias fueron cuantificadas con el método del NMP. El NMP de bacterias obtenidas de los ensayos de colonización fue normalizado con el NMP de bacterias obtenidas del inóculo.

8. RESULTADOS

8.1. *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation

Gluconacetobacter diazotrophicus levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation

M. Lourdes Velázquez-Hernández · Víctor M. Baizabal-Aguirre ·
Fermín Cruz-Vázquez · Mayra J. Trejo-Contreras · Luis E. Fuentes-Ramírez ·
Alejandro Bravo-Patiño · Marcos Cajero-Juárez · Martha P. Chávez-Moctezuma ·
Juan J. Valdez-Alarcón

Received: 11 August 2010 / Revised: 7 October 2010 / Accepted: 29 October 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract *Gluconacetobacter diazotrophicus* is a nitrogen-fixing bacterium and endophyte of sugarcane, which expresses levansucrase, a fructosyltransferase exoenzyme with sucrose hydrolytic and levan biosynthetic activities. As a result of their physical properties, the levan can provide protection against stress caused by abiotic or biotic factors and participate in the formation of biofilms. In this study, we investigated the construction and function of a levansucrase-defective mutant of *G. diazotrophicus*. The

lsdA mutant showed a decreased tolerance (65.5%) to 50–150 mM NaCl and a decrease of 89% in 876 mM (30%) sucrose, a reduction (99%) in tolerance to desiccation after 18 h, and a decrease (36.9–58.5%) in the ability to form cell aggregates on abiotic surfaces. Complementation of the mutant with the complete *lsdA* gene leads to a recovery of the ability to grow on sucrose-containing medium and to form slimy colonies, the ability to form the cell aggregates on abiotic surfaces and the tolerance to NaCl. This report demonstrates the importance of levansucrase in environmental adaptation of *G. diazotrophicus* under high osmotic stress and in biofilm formation.

Communicated by Jorge Membrillo-Hernández.

M. L. Velázquez-Hernández · V. M. Baizabal-Aguirre ·
M. J. Trejo-Contreras · A. Bravo-Patiño · M. Cajero-Juárez ·
J. J. Valdez-Alarcón
Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología,
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo,
Michoacán, México

F. Cruz-Vázquez · L. E. Fuentes-Ramírez
Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad
Autónoma de Puebla, Puebla, México

M. P. Chávez-Moctezuma
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas,
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo,
Michoacán, México

J. J. Valdez-Alarcón (✉)
Km 9.5 Carr. Morelia-Zinapécuaro, C.P. 58893,
La Palma, Tarímbaro, Michoacán, México
e-mail: jjvaldez@umich.mx; jjvaldez_a@hotmail.com

Present Address:
F. Cruz-Vázquez
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología,
Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Distrito Federal, México

Keywords Levansucrase · Osmotic stress · Biofilm ·
Diazotroph

Introduction

The Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Yamada and Yukphan 2008; Deppenmeier and Ehrenreich 2009) is a nitrogen-fixing endophyte that has been found in roots, stems, and leaves of sugarcane (Cavalcante and Döbereiner 1988). It has a wide host range and is able to colonize sucrose-rich plants like Cameroon grass, sweet potato, and pineapple; as well as plants of coffee, raggi, and tea (Muthukumarasamy et al. 2002). It also has the ability to colonize other plants such as sorghum, wheat, and common bean, which are not its common hosts (Bastían et al. 1999; Youssef et al. 2004; Trujillo-López et al. 2006). *G. diazotrophicus* has been considered as a potential biofertilizer (Saravanan et al. 2008). It lives in the apoplast of sugarcane, where there is an abundance of sucrose (Dong et al. 1994). *G. diazotrophicus* is unable to transport or respire sucrose; therefore, it depends on the hydrolytic action of levansucrase

to produce glucose and fructose, which are readily transported into the cell (Alvarez and Martínez-Drets 1995). Glucose is catabolized in the pentose-phosphate pathway (Alvarez and Martínez-Drets 1995) fructose is channeled to the synthesis of 1-kestose, 6-nystose and levan (Támbara et al. 1999).

Levansucrases are bacterial extracellular fructosyltransferases that synthesize the fructan levan and fructo-oligosaccharides. Levans are linear fructose polymers with $\beta(2 \rightarrow 6)$ links and more than 100 fructosyl residues, while fructo-oligosaccharides are also linear but only contain 2–9 fructosyl units. Fructosyltransferases are distributed widely among bacteria, fungi, and plants (Velázquez-Hernández et al. 2009; Pons et al. 2000). Analysis of genomes from archaea has revealed that they also contain fructosyltransferase-encoding genes (Baliga et al. 2004; Velázquez-Hernández et al. 2009). Disruption of levansucrase-encoding genes in several bacteria associated with soil or plants alters their association with their corresponding host or impairs their adaptation to the environment (Bezzate et al. 2000; Daguer et al. 2004; Geier and Geider 1993; Li and Ullrich 2001; Schroeder et al. 1989). Levans are responsible for the mucoid phenotype of the colony when *G. diazotrophicus* is grown in solid culture medium with 5% sucrose (Arrieta et al. 1996). Bacterial exopolysaccharides (EPS) participate in adherence and colonization of inert surfaces (Danese et al. 2000), biofilm formation (Laue et al. 2006, Russo et al. 2006), protection against abiotic factors (Lerner et al. 2009), resistance to extreme temperatures and osmotic conditions, nutrient acquisition, and as adherence or virulence factors (Dunne 2002). As the major EPS secreted by *G. diazotrophicus*, levan, the biosynthetic product of levansucrase, may also provide protection against stress generated by high osmolality and desiccation. In plant pathogenic bacteria, their major EPS and levan (Laue et al. 2006, Koczan et al. 2009) have been shown to be involved in biofilm structure.

The levansucrase of *G. diazotrophicus* is encoded by the *lsdA* gene, which is 1.7 kb in length. *lsdA* is located at the beginning of a bi-cistronic operon, followed by the *lsdB* gene, which encodes a levanase (Arrieta et al. 1996; Menéndez et al. 2009). In the present study, we disrupted the *lsdA* gene in *G. diazotrophicus*, and analyzed the effect of the mutation on its tolerance to high osmolality caused by NaCl, sucrose or polyethylenglycol, its tolerance to desiccation conditions, and on its ability to form cell aggregates on abiotic surfaces.

Materials and methods

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *G. diazotrophicus* PAI 5 R is a spontaneous

rifampicin-resistant mutant that was isolated by the plate dilution method (Trujillo-López et al. 2006). *G. diazotrophicus* was grown on LGI medium: K_2HPO_4 , 0.2 g/L; KH_2PO_4 , 0.6 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g/L; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.02 g/L; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.002 g/L; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.01 g/L; bromothymol blue 0.5% solution in 0.2 N KOH, 5 ml; final pH 5.5. (Cavalcante and Döbereiner 1988). *G. diazotrophicus* strains were maintained on LGIE agar plates [LGI supplemented with 1 g/L tryptone, 0.2 g/L yeast extract, 1% (w/v) glucose, and 1% (v/v) glycerol] at 30°C as previously reported (Arrieta et al. 1996). For liquid cultures, bacteria were incubated at 30°C with shaking at 200 rpm in LGIP medium (Reis et al. 1994), which contains de LGI basal salts medium supplemented with 0.8 mM $(NH_4)_2SO_4$ as a starter nitrogen source to prime bacterial growth and nitrogen fixation, and 1% (0.029 M) sucrose, and 1% (0.108 M) glycerol (Stephan et al. 1991). In LGITA medium, the phosphate buffer of LGIP was substituted for 5 g/L citric acid (26 mM) plus 4 g/L mono- and 5 g/L dipotassium phosphates (58 mM) (Stephan et al. 1991). Bacterial counts were calculated by the most probable number method (MPN; Alexander 1986) using LGIP agar medium without a nitrogen source that contained 1% glucose as the sole carbon source. These medium was inoculated by the surface drop-plating method using five drops (20 μ l) of each dilution, and incubated at 30°C for 6 days (Tejera et al. 2003). *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA, USA) was used as the cloning host and was grown in Luria–Bertani broth at 37°C. Microbial growth was monitored by measuring the optical density at 620 nm (OD_{620}). The media were supplemented with the following antibiotics as required: rifampicin, 50 μ g/ml; kanamycin, 120 μ g/ml; ampicillin, 50 μ g/ml; and tetracycline, 10 μ g/ml.

PCR

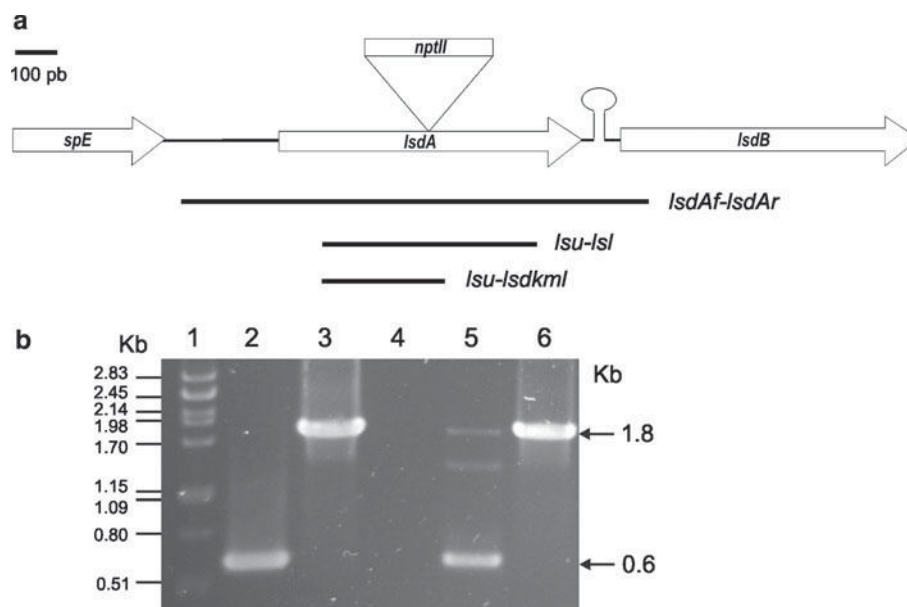
DNA was isolated from *G. diazotrophicus* cells, as described by Ureta et al. (1995). Primers used in this study are described in Table 1. *lsdA* gene fragments amplified with each primer pair are depicted in Fig. 1a. PCR mixtures (50 μ l) contained 50–100 ng genomic DNA template, 200 nM primers, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, and 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). PCR conditions were: initial denaturation at 94°C for 3 min, 35 cycles at 94°C for 1 min, aligning at 55°C (for *lsu*—*lsl* primer pair), 61°C (for *lsdkmu*—*lsdkml*), or 59°C (for *lsu*—*lsdkml*) for 1 min, 72°C for 2 min, and a final extension at 72°C for 10 min. For the amplification of the 2.7-kb DNA fragment containing the complete *lsdA* gene using primer pair *lsdAf*—*lsdAr*, conditions were initial denaturation at 94°C for 3 min, 35 cycles at 94°C for 45 seg, 61°C for 45 seg, 72°C for 2 min 45 seg, and a final

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Biological material	Relevant characteristic(s)	Reference or source
Strains		
<i>G. diazotrophicus</i> PAI 5 R	Spontaneous mutant, Rif ^r , levan producer	Trujillo-López et al. (2006)
<i>G. diazotrophicus</i> L-3	<i>lsdA</i> mutant Rif ^r /Km ^r , levan deficient	This study
<i>G. diazotrophicus</i> C-19	<i>lsdA</i> mutant Rif ^r /Km ^r , L-3 strain harboring pBBR1MCS-LSDA	This study
<i>Escherichia coli</i> XL-1 blue	<i>Tc^r recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZDM15 Tn10]</i>	Stratagene
Plasmids		
pBluescript II KS-	Amp ^r , cloning vector	Stratagene
pBSL46	Amp ^r , Km ^r , 1.3 kb <i>nptII</i> cassette	Alexeyev et al. (1995)
pLSD1.4	Amp ^r , <i>lsdA</i> 1.4 kb fragment in pBluescript II KS-	This study
pLSD1.4::NPTII	Amp ^r , Km ^r , contains <i>lsdA</i> mutagenized by insertion of a <i>nptII</i> cassette in <i>Bam</i> HI sites of <i>lsdA</i> of pLSD1.4	This study
pBBR1MCS-3	Tc ^r , cloning vector	Kovach et al. (1995)
pBBR1MCS-LSDA	Tc ^r , <i>lsdA</i> 2.7 kb	This study
Primers		
<i>G. diazotrophicus</i> -specific 16S forward	5' TGAGTAACGCGTAGGGATCTG 3'	Franke-Whittle et al. (2005)
<i>G. diazotrophicus</i> -specific 16S reverse	5' GGAAACAGCCATCTCTGACTG 3'	Franke-Whittle et al. (2005)
<i>lsu</i>	5' GACTTTACGCCCGCTGGACAC 3'	This study
<i>lsl</i>	5' GTGGACGCCTGCGCCGCCAGAC 3'	This study
<i>lskmu</i>	5' GTGACGCCAACGCCAACAAAC 3'	This study
<i>lskml</i>	5' GTGAAGCCCGTGAACCAGA 3'	This study
<i>lsdAf</i>	5' CGCTTTTCGGGGGTGGAGACTTGTT 3'	This study
<i>lsdAr</i>	5' TCCCCAGACCCGAGCGATTTCAG 3'	This study

Rif^r rifampin resistant; Amp^r ampicillin resistant; Km^r kanamycin resistant; *nptII* neomycin phosphotransferase II; Tc^r tetracycline resistant

Fig. 1 Genetic characterization of *lsdA* mutants. **a** Map of the locus containing *G. diazotrophicus* PAI 5 R *lsdA* gene and the insertion of *nptII* cassette. **b** PCR amplification of the *lsdA* gene with the *lsu*—*lsdkml* primer pair. λ -*Pst*I DNA marker (Lane 1), PAI 5 R (Lane 2), L-3 (Lane 3), control without DNA (Lane 4), C-19 (Lane 5), pLSD1.4::NPTII (Lane 6)



extension at 72°C for 10 min. PCR amplification of the 16S rDNA region specific for *G. diazotrophicus* was performed as previously reported by Franke-Whittle et al. (2005). The PCR products were visualized by electrophoresis at

approximately 90 V on a 0.8% agarose gel that was stained with SYBR Safe (Invitrogen, Oregon, USA), and documented with a Gel Logic 200 Imaging System (Kodak, NY, USA).

Generation of *G. diazotrophicus* *lsdA* mutant and complemented strains

The *lsdA* mutants derived from strain PAI 5 R were generated by insertional mutagenesis. A 1.46-kb PCR fragment obtained with the *lsu-lsl* primer pair from *G. diazotrophicus* PAI 5 R was ligated to the plasmid pBluescript II KS(−) (Stratagene, La Jolla, CA, USA) in the *EcoRV* restriction site, where *T* nucleotides were added to the 3′ end using the *Taq* DNA polymerase terminal nucleotidyl-transferase activity (Marchuk et al. 1991). The generated plasmid was named pLSDA1.4, which was transformed into *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, CA, USA) for further manipulation. To disrupt the *lsdA* gene fragment in pLSDA1.4, the kanamycin resistance *nptII* cassette was obtained with *Bam*HI endonuclease digestion from plasmid pBSL46 (Alexeyev et al. 1995) and ligated to the same site into the *lsdA* gene in pLSDA1.4, to create plasmid pLSDA1.4::NPTII which was also transformed into *E. coli* XL-1 Blue. The pLSDA1.4::NPTII plasmid was transformed into PAI 5 R by electroporation (2.5 kV) in 0.2-mm cuvettes, with an “E. coli Pulser” (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Transformants were incubated in LGIE liquid medium at 30°C for 3 h with slow shaking. Bacterial dilutions were plated on LGIE medium supplemented with kanamycin and rifampicin at 30°C (Arrieta et al. 1996). Transformants were selected by their inability to grow on sucrose and their resistance to kanamycin and rifampicin. To complement the *lsdA* mutant strain, we amplified a 2.7-kb fragment from the *lsdA* gene using total genomic DNA from *G. diazotrophicus* as template and *lsdAf*—*lsdAr* oligonucleotides. The fragment was blunt ended with T4 DNA polymerase and ligated into pBBR1MCS-3 (Kovach et al. 1995) *Sma*I site to generate pBBR1MCS-LSDA. No *E. coli* clones containing this plasmid were obtained after several attempts to electroporate the ligation reaction, so the ligation reaction was directly electroporated (2.5 kV) into *G. diazotrophicus* strain L-3. Transformants were selected by its ability to grow in the presence of tetracycline, kanamycin, rifampicin and sucrose as the sole carbon source, and by the recovery of the mucoid phenotype. Images of the colony morphologies were captured with an inverted microscope (ID03, Zeiss, Germany). Restriction and DNA-modifying enzymes were from New England Biolabs (MA, USA) and Invitrogen (CA, USA). Standard molecular biology techniques were as described in Sambrook and Russell (2001). Identity of the constructed plasmids was verified by sequencing at the Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (Langebio) at Irapuato, Guanajuato, México.

Levansucrase activity assay

LsdA activity was measured as the amount of glucose released from sucrose by the hydrolytic activity of

levansucrase, using a Glucose (HK) Assay kit (Sigma–Aldrich, Germany). Extracellular levansucrase activity was determined in the supernatant of cultures in LGIE medium supplemented with sucrose and yeast extract, incubated for 154 h at 30°C. Activity was measured in 1 ml of the supernatant after 18 min in the presence of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.2) and 0.25 M sucrose, at 40°C (Hernández et al. 2000). Hydrolysis was measured as NADH reduction in OD units at 340 nm. One unit of LsdA was defined as the amount of enzyme that released 1 μmol glucose (equivalent to 1 μmol NADH) per minute under the reaction conditions used. Quantification of proteins was by the method of Bradford (1976) using BSA (Sigma–Aldrich, Germany) as a standard.

Tolerance to NaCl, polyethylene glycol (PEG) 400 and sucrose

Growth estimation on LGIP medium with NaCl was performed as described by Tejera et al. (2003). *G. diazotrophicus* strains were grown in LGIP liquid medium with 0.8 mM (NH₄)₂SO₄, 1% sucrose and 1% glycerol (w/v). The inocula were adjusted to a final OD₆₂₀ of 0.2. NaCl concentrations tested were 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, and 350 mM. After 36 h of incubation at 30°C with rotatory shaking, the growth in NaCl containing media was evaluated by the MPN method (Alexander 1986). When PEG 400 was used as osmolyte, the same osmolality as with NaCl was used; 0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, and 500 mM PEG 400. When sucrose was used as an osmolyte, we used the same osmolality conditions; 0, 30 (1%), 50, 100, 150, 200, 300 (10%), 400, 500, 600, 700, 800, 876 (30%), and 900 mM sucrose. Osmolality of the culture media was measured with a Vapor Pressure Osmometer 5520 (Wescor, Logan, UT, USA), to obtain osmotic pressure (Ψπ) values for each concentration of NaCl, PEG 400, and sucrose.

Resistance to desiccation

The resistance of *G. diazotrophicus* to desiccation was performed as follows (Tejera et al. 2003): *G. diazotrophicus* strains were grown in LGIP broth with 10 mM (NH₄)₂SO₄, 1% sucrose, and 1% (w/v) glycerol. After three successive transfers to fresh medium, cultures were centrifuged at 12,000g for 8 min. The bacterial cells were washed with sterile saline solution (0.9%), resuspended to an OD₆₂₀ of 0.6–0.8, and collected by filtration through an HAWP04500 membrane (Millipore, Ireland) with a 0.45 μm pore. The filters were transferred to a Petri dish with absorbent paper in a static incubator at 30°C. After 0, 18, 48, 72, and 144 h, the bacteria were removed from the filters by vigorous shaking and sonication for 2 s in sterile

saline solution with an Ultrasonic Cleaner FS30H (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA). Viable bacteria were quantified by the MPN method.

Biofilm formation assay

Biofilm formation by *G. diazotrophicus* was measured by the crystal violet method in glass flasks containing 25 ml of LGIE broth adjusted to an initial OD₆₂₀ of 0.2 as previously described (Prithiviraj et al. 2005). Eluted crystal violet was measured as the OD₅₇₀. For cell number estimation in biofilms, *G. diazotrophicus* strains were grown in 25 ml of LGIE liquid medium to an initial OD₆₂₀ of 0.2 and were incubated in a rotatory shaker at 200 rpm at 30°C for 72 h in glass Erlenmeyer flasks. Liquid medium with the planktonic culture was discarded, and the cells adhering to the glass surfaces were resuspended in 25 ml of LGI basal salts medium and were quantified by measuring the MPN of bacteria/ml.

Data analysis

All data were analyzed statistically using Tukey test, Pair-wise Multiple Comparison Procedures from SigmaStat for Windows version 2.3 (SPSS Inc., San Rafael, CA, USA).

Results

Characterization of *lsdA*-deficient mutants

Previously, a spontaneous rifampicin-resistant mutant, *G. diazotrophicus* PAI 5 R, was generated from *G. diazotrophicus* PAI 5 (Trujillo-López et al. 2006). *G. diazotrophicus* PAI 5 R was then transformed with pLSDA1.4::NPTII to promote disruption of the *lsdA* gene by integration of the *nptII* cassette by a homologous recombination event. Integration of the *nptII* cassette into the *lsdA* gene (Fig. 1a) was confirmed by PCR analysis with *lsu*—*lsdkml* primer pair (Fig. 1b). The transformants yielded 1.8-kb fragments that corresponded to the 0.6-kb fragment of the *lsdA* wild-type gene and the insertion of the 1.2-kb *nptII* cassette (Fig. 1b Lane 3). Three of these transformants were isolated and named L-3, L-14, and L-24 and were used for further characterization. Since results were similar for the three of the aforementioned strains, only results for transformant L-3 are shown in this report. To confirm that the presence of the *lsdA*::*nptII* fragment in the transformant strains was to the result of a single integration event by allele replacement, Southern blot analysis was performed (data not shown). Altogether, these results confirmed that the *lsdA* gene was interrupted by the *nptII* cassette by means of a gene replacement event.

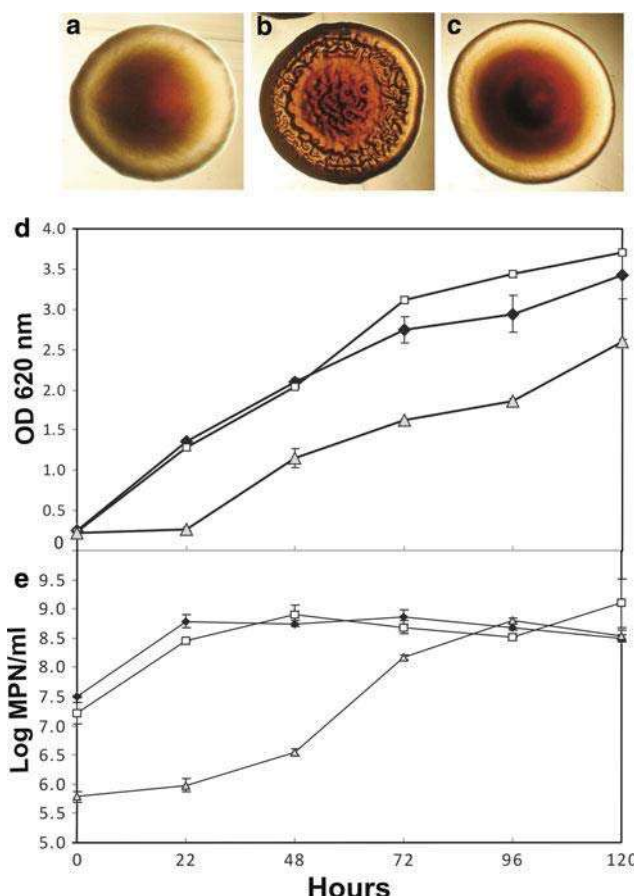


Fig. 2 Phenotypic characterization of *G. diazotrophicus* strains. Colony morphology of PAI 5 R (a), L-3 (b) and C-19 (c) strains. Growth kinetics of PAI 5 R (filled diamond), L-3 (open square), C-19 (filled triangle). d OD₆₂₀, e log MPN bacteria/ml. Error bars indicate SE

Levan formation and levansucrase activity of *G. diazotrophicus* strains

G. diazotrophicus levansucrase possesses two enzymatic activities: hydrolysis of sucrose and polymerization of fructosyl residues to produce levan. To observe qualitatively the production of levan in *lsdA* mutants, the colonial morphology of strains was examined on LGIE agar plates that contained 5% sucrose and 1% glycerol (Fig. 2a, b). The PAI 5 R strain grew as slimy orange colonies (Fig. 2a). L-3 strain did not show the colonies with a slimy phenotype (Fig. 2b), which suggested that the *lsdA* mutant strain was unable to produce levan. To determine quantitatively the absence of levansucrase activity in the *lsdA* mutants, the hydrolytic activity against sucrose was evaluated spectrophotometrically in supernatants of *G. diazotrophicus* cultures. Levansucrase-specific activity was reduced by a factor of 10 in *lsdA* mutant strains, when compared with that of the PAI 5 R strain (Table 2). The low values of glucose measured for the mutant strain did not increase

Table 2 Levansucrase activity from cell-free supernatants of cultures on LGIE medium

Strain	Protein (mg/ml)	Total activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)
PAI 5 R	0.098 ± 0.005	5.706 ± 0.224	57.770 ± 1.014
L-3	0.113 ± 0.001	0.787 ± 0.029	6.936 ± 0.290
C-19	0.122 ± 0.005	0.594 ± 0.023	4.871 ± 0.187

Data represent means of three independent replicates, ±SE

with the incubation time (data not shown), thus suggesting that they may not have been generated by a bacterium-derived, sucrose-hydrolyzing activity.

Growth of *G. diazotrophicus* strains

To discard possible effects of *lsdA* gene disruption on the utilization of other carbon sources, we evaluated the growth rate of PAI 5 R and *lsdA* mutant strains under different conditions. Similar growth kinetics were observed for all strains grown in LGITA liquid medium that contained 1% glucose as a carbon source (data not shown). *G. diazotrophicus* strains were grown on nitrogen-free LGIP semisolid medium in the presence of several carbon sources with a concentration of 1%, to show if there was an effect of *lsdA* mutation on nitrogen fixation. All of the strains grew under these conditions when glucose, fructose, commercially available cane sugar, glycerol, ethanol or inositol were used as the sole carbon sources (data not shown). The PAI 5 R strain, but not the *lsdA* mutant, was able to grow using sucrose as the sole carbon source (data not shown). Typical growth of *G. diazotrophicus*, which forms a yellow pellicle beneath the surface of nitrogen-free LGIP semisolid medium (Reis et al. 1994), was observed for all carbon sources tested.

Arrieta et al. (1996) have reported that glycerol induced levansucrase activity, and it is a carbon source that can be metabolized by PAI 5 R and L-3 strain. Sucrose is the substrate of levansucrase for the synthesis of levan. So, for comparative assays, PAI 5 R and *lsdA* mutant strain were grown in LGIP liquid medium that contained 1% sucrose, 1% glycerol, and a starter inorganic nitrogen source, to ensure the highest induction of levansucrase activity and growth of the mutant strains. *G. diazotrophicus lsdA*-defective strain did not show any difference in growth kinetics when compared to PAI 5 R (Fig. 2d, e).

Tolerance to NaCl, PEG 400, and sucrose

Hartmann et al. (1991) have demonstrated that *G. diazotrophicus* is able to survive in vitro in 200 mM NaCl. To elucidate if levan has a role in conferring tolerance to NaCl in *G. diazotrophicus*, we estimated the minimum inhibitory

concentration of NaCl for PAI 5 R and L-3 strains under nitrogen-fixation conditions in LGIP semisolid medium with 1% glucose as a carbon source. The strains were able to grow in up to 200 mM NaCl. The growth layer beneath the surface in semisolid medium was thinner for the L-3 strain than the PAI 5 R strain (data not shown). To confirm quantitatively the differences in growth observed in semisolid medium, *G. diazotrophicus* cells were grown in LGIP liquid medium with 1% sucrose, 1% glycerol, and a starter dose of inorganic nitrogen in the presence of variable concentrations of NaCl. Cell survival decreased (65.5%) for the *lsdA*-defective strain when compared with the PAI 5 R strain (Fig. 3a) between 50 and 150 mM NaCl ($\Psi\pi = -0.712$ and -1.173 MPa, respectively; $P < 0.05$ Tukey). Between 200 and 300 mM NaCl ($\Psi\pi = -1.385$ and -1.838 MPa, respectively), a statistically significant decrease (89.4%) was also observed for the L-3 strain when compared with the PAI 5 R strain ($P < 0.05$, Tukey), but the overall survival of both strains decreased by two orders of magnitude with respect to lower concentrations of NaCl. At 350 mM NaCl, none of the strains survived.

To establish if the salt stress was caused by high osmotic pressure or high ionic strength, we assayed PEG 400 as an osmotic agent, because of its non-ionic character. *G. diazotrophicus* does not metabolize PEG 400 (Hartmann et al. 1991). The tolerance to PEG 400 was analyzed at concentrations that were equivalent to the osmotic pressures tested for NaCl. There were no differences in the growth of PAI 5 R and L-3 strains at any of the concentrations of PEG 400 assayed (data not shown). All of the strains were sensitive to 300 mM PEG 400 ($\Psi\pi = -1.168$ MPa). At a similar osmotic pressure, we observed an evident decrease in survival in NaCl ($\Psi\pi = -1.173$ MPa) for both strains.

G. diazotrophicus has been shown to have osmotolerance to 30% sucrose (Cavalcante and Döbereiner 1988), and Hartmann et al. (1991) have demonstrated its tolerance to 20% sucrose for nitrogen fixation activity. To elucidate if levansucrase confers tolerance to sucrose in *G. diazotrophicus*, sucrose osmotolerance was assayed at concentrations that were equivalent to the osmotic pressures tested for NaCl (Fig. 3b). A reduction of 89% in the growth of the L-3 strain was observed at 876 mM (30%) of sucrose ($\Psi\pi = -3.607$ MPa) when compared with the PAI 5 R strain ($P < 0.05$, Tukey). This also was observed at 900 mM ($\Psi\pi = -3.685$ MPa). From these results, we conclude that the tolerance to high NaCl concentrations and the osmotolerance to sucrose, but not to PEG 400, were affected by disruption of *lsdA* gene.

Tolerance to desiccation

Bacterial EPS have a role in survival in dry environments such as soil (Ophir and Gutnick 1994). To test if levan

Fig. 3 Osmotolerance of *G. diazotrophicus* strains. PAI 5 R, black bars; L-3, white bars, C-19 gray bars. **a** Tolerance to NaCl. **b** Tolerance to sucrose. **c** Complementation of the NaCl tolerant phenotype. Ψ_{π} is the osmotic pressure. Assay represents mean values of three replicates. Error bars indicate SE. Different number of asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$; Tukey), black circles indicate absence of growth

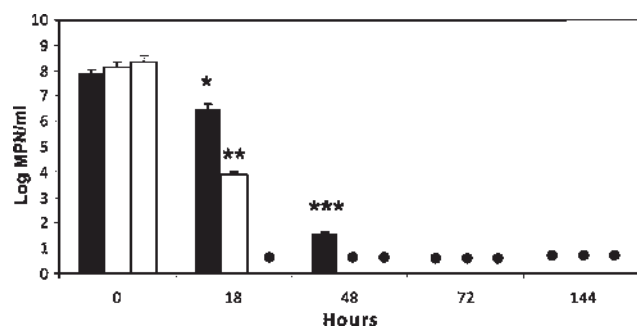
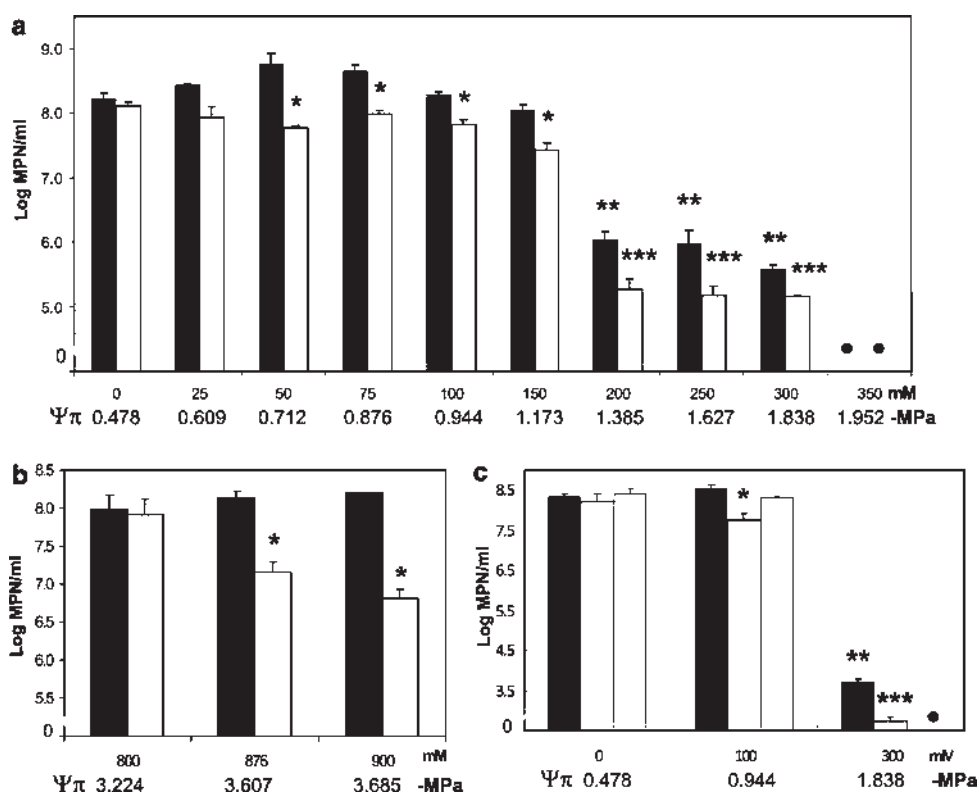


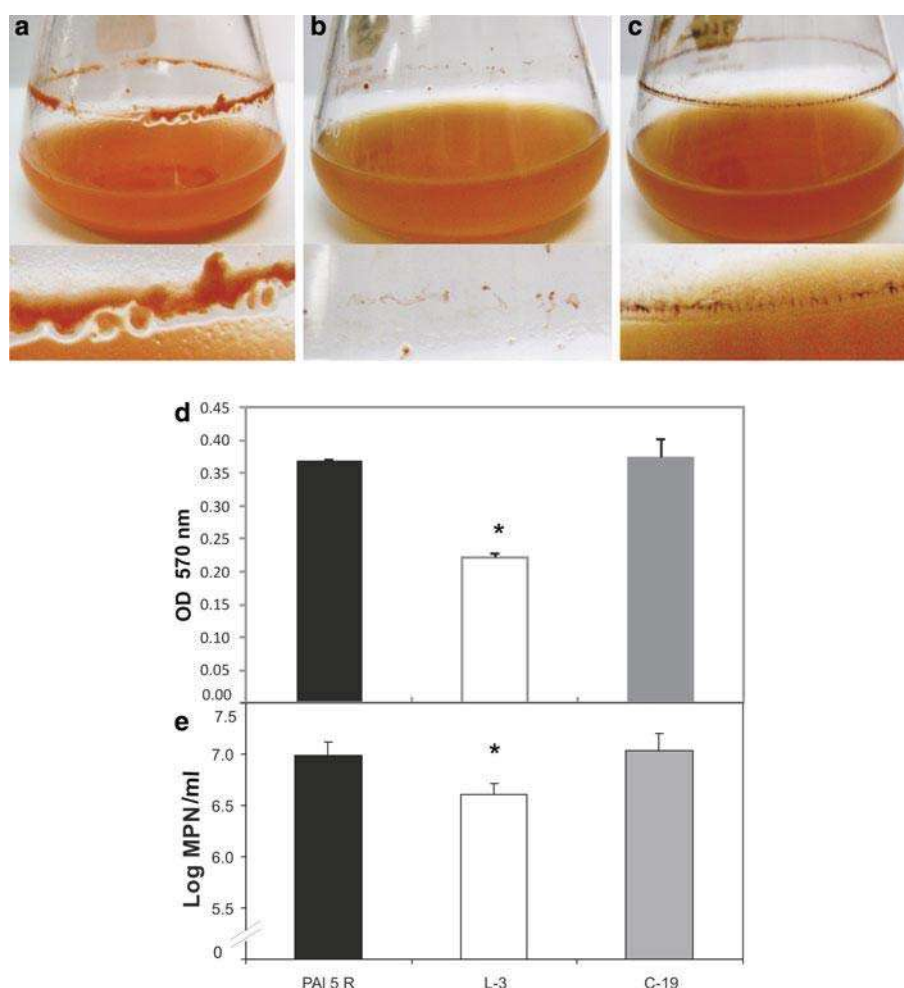
Fig. 4 Effect of desiccation on *G. diazotrophicus* strains. PAI 5 R, black bars; L-3, white bars; C-19, gray bars. Assay represents mean values of four replicates. Error bars indicate SE. Different number of asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$; Tukey), black circles indicate absence of growth

could confer protection against desiccation, *G. diazotrophicus* PAI 5 R and the L-3 strains were subjected to desiccation conditions in cellulose filters as described by Tejera et al. (2003) and survival was measured. A decrease (99%) in tolerance to desiccation after 18 h of incubation was observed for the L-3 strain when compared with PAI 5 R strain ($P < 0.05$, Tukey, Fig. 4). After 48 h, the PAI 5 R strain still survived in the filter, while the *lsdA* mutant strain did not survive at all. At 72 h (3 days) of desiccation, none of the strains survived. These observations suggested that the EPS produced by levansucrase conferred resistance to short periods of desiccation.

Biofilm formation assay

Biofilm formation is related to bacterial EPS production (Davey and O'Toole 2000, Sutherland 2001, Danhorn and Fuqua 2007). To investigate if there is a role of levan in biofilm formation in *G. diazotrophicus*, we established if the PAI 5 R and the L-3 strain differed in their ability to form biofilms on an abiotic surface. Cell aggregates formed by PAI 5 R strain were observed as an orange pellicle with a mucoid consistency adhered to the glass (Fig. 5a). The amount of cells in aggregates observed for the L-3 strain was lower than for the PAI 5 R strain and also showed low adherence to the glass (Fig. 5b). Biofilm formation was estimated by staining the cell aggregates adhered to the glass surface with crystal violet followed by elution and further quantification of the crystal violet solution. As shown in Fig. 5d, a reduction (39.9%) in the amount of crystal violet recovered from the L-3 strain was observed when compared to that of the PAI 5 R strain ($P < 0.05$, Tukey). Biofilm formation was also estimated in static cultures in polypropylene Eppendorf tubes (0.6 ml). A reduction in the amount of crystal violet recovered (36.9%) was also observed for the L-3 strain when compared with PAI 5 R (data not shown). Since crystal violet may stain the levan produced by *G. diazotrophicus*, and levan content would be altered in the L-3 strain, to ensure that biofilm formation was altered by the loss of levansucrase or levan, the effect of *lsdA* mutation on the biofilm was determined

Fig. 5 Biofilm production in *G. diazotrophicus* strains. Cell aggregate—formation in glass flasks for PAI 5 R (a), L-3 (b) and C-19 (c) strains. Lower images in each panel are higher magnifications of the biofilm. **d** Quantification of biofilm with the crystal violet method. **e** Estimation of the number of cells in the aggregate. Each data represents mean values of four replicates. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$; Tukey). Error bars indicate SE



as the MPN of bacteria adhered to the glass surface. Figure 5e shows that the ability to form cell aggregates in the L-3 strain in aerated liquid cultures in glass flasks decreased by 58.5% ($P < 0.05$, Tukey) when compared with PAI 5 R. These observations suggest that the products of levansucrase activity may contribute to cell aggregation and biofilm maturation.

Complementation of the *lsdA* mutation

To ensure that the phenotypes observed in the L-3 strain could be attributed to levansucrase loss-of-function, the L-3 strain was complemented with the wild-type *lsdA* gene. The complete *lsdA* gene was amplified with oligonucleotides *lsdAf* and *lsdAr* (Table 1 and Fig. 1a). The amplified region covered 524 bp of the 5' end from the translation start codon and 438 bp after the translation stop codon of the 3' end of the *lsdA* gene, including the sequence region for which a hairpin structure with probable terminator activity has been described (Arrieta et al. 1996). The 2.7-kb amplified fragment was cloned into the broad host range cloning vector pBBR1MCS-3 (Kovach et al. 1995). The

resulting plasmid, named pBBR1MCS-LSDA, was transformed into *E. coli* strain DH5 α . It was not possible to recover colonies containing the pBBR1MCS-LSDA plasmid. Since previous reports had suggested that expression of the *G. diazotrophicus lsdA* gene in *E. coli* may lead to intracellular accumulation of levansucrase and low fructan production, affecting *E. coli* growth (Arrieta et al. 1996; Trujillo et al. 2001), we decided to transform the ligation reaction directly into *G. diazotrophicus* L-3 strain. Four transformants that showed the recovery of the mucoid phenotype (Fig. 2c) and resistance to tetracycline were selected. Only results for strain C-19 are shown. To verify the presence of the wild type and the mutant *lsdA* gene in the transformant strain, PCR reactions were carried out using oligonucleotide pair *lsu*—*lsdkml*, which covers 0.6 kb of the *lsdA* gene—encoding region including the *nptII* insertion site. The 0.6-kb fragment from the wild-type gene and the 1.8-kb fragment containing the same *lsdA* region, but disrupted with the *nptII* cassette, were obtained by PCR amplification from the C-19 strain (Fig. 1b Lane 5). This result confirmed that the strains transformed with the pBBR1MCS-LSDA plasmid that showed the recovery

of the wild-type phenotype were in fact complemented by the *lsdA* gene. The C-19 strain showed differences in growth kinetics when compared with PAI 5 R and L-3 strains (Fig. 2d). An increase in the lag phase of C-19 strain was observed when growth in LGIE medium was measured as OD₆₂₀ (Fig. 2d) or as log of MPN of bacteria/ml (Fig. 2e). Generation times were similar between PAI 5 R (5.2 h) and L-3 strains (5.4 h) and it was larger for the C-19 strain (8.0 h). These differences are in accordance with the longer incubation times that the C-19 strain needed to form bacterial colonies with slimy phenotype in solid medium. Levansucrase enzymatic activity was measured for the C-19 strain growth at the same optical density as the PAI 5 R and L-3 strains. No activity was detected in intracellular or extracellular samples of the C-19 strain. This result was unexpected considering that the complemented strain recovered the mucoid phenotype and the ability to grow in sucrose as the sole carbon source. Complementation was also evident when C-19 cells were grown up to the same OD₆₂₀ as the PAI 5 R and L-3 strains in NaCl tolerance (Fig. 3) and cell aggregate formation assays (Fig. 5). No complementation of the levansucrase defective phenotype was observed in the desiccation assay (Fig. 4), but the C-19 strain showed a recovery in the ability to form cell aggregates in biofilm determination assays. The erratic behavior of the C-19 strain regarding levansucrase-associated phenotype will be discussed below.

Discussion

Experiments in which levansucrase synthesis is eliminated in plant-pathogenic bacteria, dental-caries-causative organisms, and in gut commensal bacteria, have shown its role as colonization factors (see Velázquez-Hernández et al. 2009 for a review). Rheological properties of levan such as water solubility, low intrinsic viscosity ($\eta = 0.17$ dl/g) and a high tensile strength of 991 psi (Kasapis et al. 1994; Barone and Medynets 2007) make them a very compact polymer that may be responsible for cell aggregation, tolerance to osmotic stress, and desiccation. To test all these, we evaluated the biological role of the levansucrase of *G. diazotrophicus* in a levansucrase mutant strain. *lsdA* interruption had no effect on *G. diazotrophicus* ability to grow in the presence of several carbon sources, particularly in glycerol-containing media, and under nitrogen-fixing conditions. This is possible because only sucrose utilization ability is impaired by the abolition of levansucrase activity. Glucose (in growth kinetics assays) and glycerol (in combination with sucrose in the rest of the experiments) utilization as carbon sources may not be affected in the L-3 strain. In the osmotolerance, desiccation, and biofilm formation assays, sucrose and glycerol

were used as carbon sources for PAI 5 R, L-3, and C-19 strains. Glucose, sucrose, and glycerol have been described as carbon sources similarly metabolized by *G. diazotrophicus* (Tejera et al. 2004). This may explain why growth kinetics is not affected in the L-3 strain when compared with the PAI 5 R strain.

G. diazotrophicus has been isolated from the rhizosphere of coffee, raggi, and trash from sugarcane (Jiménez-Salgado et al. 1997; Reis et al. 1994), conditions in which high osmolality and a low-water-content environment prevail. It is also able to survive in the apoplast of sugarcane, where sucrose concentrations reach 350–876 mM (12–30%, Dong et al. 1997). These are conditions of high osmotic stress in which *G. diazotrophicus* can survive. *G. diazotrophicus* tolerates NaCl concentrations below 300 mM (Hartmann et al. 1991). Osmotic stress tolerance of *G. diazotrophicus* PAI 5 R and *lsdA* mutant strains was evaluated in planktonic cultures in the presence of NaCl, PEG, and sucrose. The two steps in NaCl tolerance reduction observed for the PAI 5 R and L-3 strains suggest that a common mechanism for salt tolerance operates independently of levansucrase activity at low NaCl concentrations. The significant difference in cell survival between PAI 5 R and the *lsdA* mutant at NaCl concentrations larger than 50 mM suggest a second mechanism of salt tolerance that is dependent on levansucrase activity. The osmoregulatory mechanism of *G. diazotrophicus* is unknown for NaCl, but it has been suggested that glutamate and proline do not participate in the osmoregulation of this bacterium (Hartmann et al. 1991). In another report, Kunst and Rapoport (1995) demonstrated that salt stress induced the expression the levansucrase-encoding gene in *Bacillus subtilis* via the DegS-DegU two-component system. It remains to be determined if *lsdA* expression is induced by salt stress in *G. diazotrophicus*. Recently, Siqueira et al. (2009) demonstrated that glycine-betaine added to *G. diazotrophicus* liquid cultures conferred protection to up to 300 mM NaCl. *G. diazotrophicus* is also osmotolerant to sucrose (Hartmann et al. 1991; this work). This carbon source functions as a non-accumulated osmoprotectant (exogenous solute that stimulates bacterial growth in media with high osmolality, Wood 2007) in *Sinorhizobium meliloti* with 500 mM NaCl, because it induces accumulation of endogenous osmolytes such as glutamate and N-acetylglutaminylglutamine amide (Gouffi et al. 1998). It is possible that levan acts as a non-accumulated osmoprotectant in *G. diazotrophicus*, and hydrolysis by levansucrase induces endogenous accumulation of glucose and/or fructose, which stimulates bacterial growth in high-osmolality conditions. In this way, levan metabolism may contribute to NaCl tolerance in *G. diazotrophicus*.

The osmotolerance to sucrose was reported originally by Cavalcante and Döbereiner (1988) when they isolated *G. diazotrophicus* in sucrose-rich medium. The mechanism

by which this bacterium tolerates high sucrose concentrations is unknown. Hernández et al. (1995) have reported that *G. diazotrophicus* levansucrase preferentially synthesizes oligofructosides at short incubation times, to further synthesize levan. At high concentrations of sucrose, either oligofructosides or levan may be accumulated and act as osmoprotectants. Besides, sucrose at high concentrations should become an osmotic stress for the L-3 strain, which cannot reduce the levels of the osmolyte because of the absence of levansucrase hydrolytic activity. Several genes potentially involved in diverse mechanism of osmotic tolerance have been identified in the sequenced genome of *G. diazotrophicus* (Bertalan et al. 2009). Among these were found genes encoding for glycine-betaine transport, ion transporters, di- and tri-peptide transporters, EnvZ-OmpR regulatory sensor and effector. However, the role of these genes in osmotic tolerance remains to be experimentally demonstrated. From our results, we propose that the levansucrase activity is needed to tolerate to osmotic stress caused by high concentrations of NaCl and sucrose.

The lack of levansucrase activity leads to a loss of desiccation tolerance in the *lsdA* mutant strain. There is not much information about the role of fructans in conferring protection against desiccation in bacteria. However in plants, it has been reported that fructans provide resistance to cold and drought stress (Vijn and Smeekens 1999), for example, in tobacco transgenic plants expressing the levansucrase-encoding gene from *Bacillus subtilis* (Pilon-Smits et al. 1995). Moreover, Vereyken et al. (2003) have established that fructans inserted between the head groups of phospholipids preserve motional freedom for the acyl chains, thus rendering the membrane tolerant to desiccation. It is also possible that, because of its high hygroscopy, levan does not allow the water loss that may occur in levan-deficient strains. Tejera et al. (2003) have reported also that under desiccation conditions, *G. diazotrophicus* PAI 5 cell viability decreased dramatically after 1 day of incubation, but the cells remained viable after 28 days of incubation. In our study, cell viability was lost by the third day of incubation. We do not know the reason for this difference, but it may be attributed to the presence of glycerol in our media, which was added to induce levan production. Culture conditions used for the observation of the slimy phenotype of the colonies and in the assays of osmotolerance and tolerance to desiccation differ in their nitrogen source and content. These conditions alter the carbon/nitrogen balance of the culture medium, thus possibly affecting the regulation of exopolysaccharide production. Despite this difference, the effect of *lsdA* disruption on tolerance to these kinds of abiotic stress was evident in each of the conditions tested. More research is needed in order to understand the metabolic regulation of exopolysaccharide production in *G. diazotrophicus*.

It is possible that some of the phenotypes observed in the L-3 strain may be attributed to a polar effect on *lsdB* gene expression, since it is part of the same operon with the *lsdA* gene. Recently, Menéndez et al. (2009) analyzed gene expression of the *lsdB* gene. They demonstrated that *lsdA* and *lsdB* constitute a bicistronic operon and *lsdB* is transcribed when low fructose concentration (0.44–33.3 mM) is used as the sole carbon source or in the presence of 0.1% glycerol. These authors did not detect *lsdB* transcription when glucose or sucrose were used as carbon sources. In our experimental conditions, high sucrose levels were used; thus, the *lsdB* gene would not be expressed and the phenotypes may be attributed to *lsdA* disruption. However, further experiments are needed to discard a role of a polar effect on *lsdB* gene expression caused by *lsdA* disruption.

In this study, we showed that PAI 5 R strain was able to form cell aggregates in the liquid–air interface of shaken cultures. The cell aggregates were formed on glass surfaces, but we also observed them on polypropylene surfaces (data not shown), and were much denser in the liquid–air interface. The fact that *lsdA* mutant strain showed lower levels of cells adhered to the inert surface indicated that levan contributed, to some extent, to biofilm formation. There are several elements that contribute to biofilm development, such as the presence of EPS, flagella, proteins, and water (Danhorn and Fuqua 2007; Davey and O'Toole 2000). Recently, a flagellar mutant from *G. diazotrophicus* PAI 5 displayed a decrease in biofilm formation capacity (Rouws et al. 2008). The presence of this flagellum may explain why *lsdA* disruption does not abolish biofilm formation in *lsdA* mutants. The participation of levansucrase in biofilm formation has also been reported in *Streptococcus mutans* (Rozen et al. 2004) and in *P. syringae* pv. *glycinea* (Laue et al. 2006). It is likely that levan, as one of the major EPS of *G. diazotrophicus*, may be an important component of biofilms formed by this bacterium. In fact, the L-3 strain also showed lower levels of adherence to the glass surface as determined by the estimation of bacterial cell numbers in cell aggregates. EPS are commonly accumulated in the maturation phase of biofilm formation, which is preceded by adherence to the surface, microcolony formation or cell aggregation steps (Davey and O'Toole 2000; Hall-Stoodley et al. 2004; Danhorn and Fuqua 2007). From our results, it seems that *G. diazotrophicus* levansucrase may affect the maturation of the biofilm, since L-3 strain is still able to adhere to the inert surface but is not able to reach the same cell density as the PAI 5 R strain. Whether the cell aggregates attached to inert surfaces constitute a functional biofilm remains to be determined. It has been suggested that for the plant pathogens *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*, levan is allocated in the biofilm structure and contributes to its function, but it is not required for biofilm formation,

since other EPS produced by these bacteria (amylovoran and alginate, respectively) are essential for biofilm formation (Laue et al. 2006; Koczan et al. 2009). *G. diazotrophicus* is also a plant-associated bacteria that has been allocated in the apoplast of sugarcane. Scanning electronic microscopy images showed that *G. diazotrophicus* forms microcolonies in the apoplast (Dong et al. 1994). Since microcolony formation is an initial step in biofilm formation, we suggest that biofilms may be formed by this bacteria in the apoplast of sugarcane. Levan is the major polysaccharide produced by *G. diazotrophicus*, so it remains to be characterized in detail its contribution to biofilm formation in relation to other potential biofilm components. In this sense, *G. diazotrophicus* genome (NCBI Refseq NC011365) contains genes homologous to a glucosyltransferase, a glucan biosynthesis protein G, a 4- α -glucanotransferase and a 1,4- α -glucan branching enzyme, which may be involved in glucan biosynthesis. The presence of glucans has not yet been reported for *G. diazotrophicus*. Besides, Stephan et al. (1995) have reported the presence of a mannose-rich capsule produced after 70 h of incubation. In our hands, no recovery of the slimy phenotype of the colonies was observed in the *lsdA* defective strains after 6 days of incubation. So, the recovery of colonial morphology in the complemented strain may not be attributed to this mannose-rich exopolysaccharide.

Complementation of the L-3 strain with the *lsdA* gene in the C-19 strain was performed to show the recovery of mutant phenotypes by restoration of the levansucrase activity. Although it was not possible to measure levansucrase activity in the C-19 strain, the mucoid phenotype in solid medium, the ability to grow in sucrose, the tolerance to NaCl and the ability to form cell aggregates were recovered in this strain. This may be explained by a low but undetectable levansucrase activity which may contribute to low levels of levan accumulation. This would be enough to restore the aforementioned phenotypes. Interestingly, the recovered phenotypes may be explained by the restoration of levansucrase metabolic activity, either as sucrose-hydrolyzing or as levan-accumulating activities. In contrast, tolerance to desiccation may be explained by the hygroscopic properties of the levan. It seems likely that huge amounts of levan may be necessary to guarantee the manifestation of the water-retention properties of the polymer that contributes to tolerate desiccation. Both the L-3 and the C-19 strains showed low levels of sucrose hydrolytic activity when compared with the PAI 5 R strain (Table 2). This residual hydrolytic activity may be attributed to levansucrase. It has been shown that *G. diazotrophicus* levansucrase expressed in *Pichia pastoris* and further purified, presented about 30% of sucrose hydrolytic activity when compared with the exo-levansucrase activity (Menéndez et al. 2004).

Three phenotypic features were clearly contrasting for the C-19 strain: undetectable levansucrase activity, alteration of growth kinetics and a lack of recovery of the tolerance to desiccation. Within the limits of this work, it is not possible for us to explain the particular behavior of the C-19 strain. However, some possible scenarios may occur: (1) there is a larger copy number of the wild-type *lsdA* gene due to the presence of several copies of the plasmid pBBR1MCS-LSDA that causes overexpression of levansucrase. This is supported by our observation of a larger amount of the respective PCR product of the C-19 strain than that derived from the disrupted gene (Fig. 2b). (2) Overexpression of levansucrase may saturate the Type II secretion pathway involved in levansucrase secretion leading to intracellular accumulation of levansucrase. (3) Toxicity of intracellular levansucrase. This has been previously reported and a levansucrase-encoding gene has been used as a positive selection marker in cloning and expression vectors (Pelicic et al. 1996; Lombardo et al. 2007). (4) An unidentified feedback mechanism that reduces *lsdA* expression or levansucrase activity in the presence of large amounts of levansucrase or its products. (5) Interference of plasmid pBBR1MCS-LSDA with endogenous plasmid replication or function. From the genome sequence of *G. diazotrophicus* PAI 5, two plasmids, of 16.6 kb and 38.8 kb, have been described. These plasmids encode proteins probably involved in conjugation and chromosomal segregation (Bertalan et al. 2009). pBBR1, the parental plasmid from which pBBR1MCS-LSDA is derived, is a medium copy number plasmid (Antoine and Locht 1992). These would explain our inability to detect levansucrase activity. Further investigation is needed to understand the behavior of the C-19 strain. In a previous work, Arrieta et al. (1996) complemented a mutant of the *lsdA* gene obtained by chemical mutagenesis that was used for the isolation of the gene. This work described the recovery of the slimy phenotype on sucrose-containing solid medium and the ability to hydrolyze sucrose for the complemented strain gene and showed molecular evidence of the presence of both the disrupted and the wild-type genes. However, no further characterization of the complemented strain was described.

The observed effects of the disruption of the *lsdA* gene in *G. diazotrophicus* suggested that levansucrase has an important role in the adaptation of the bacteria to its environment. Osmotolerance, tolerance to desiccation, and cell aggregate formation showed significant impairments in the *lsdA*-defective strain. It would be interesting to study the relative contribution of other cellular components in osmotic stress, desiccation and biofilm formation in relation to levansucrase. High osmolality tolerance and resistance to water deprivation are also attributed to biofilms. In this report, high osmolality and desiccation tolerance were

evaluated in planktonic cultures. So, the role of biofilm in environmental adaptation of *G. diazotrophicus* should be further explored.

Acknowledgments This work was supported with grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología—México (No. J31278-B) and from the Coordinación de la Investigación Científica—U.M.S.N.H. to J.J.V.A. M.L.V.H. and F.C.V. were recipients of PhD and MSc scholarships from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología—México, respectively. The pBB1RMCS-3 plasmid was a kind gift from A. García de los Santos. We are grateful to J.S. Bayuelo-Jiménez for the use of the osmometer and sonicator and J. E. López-Meza for sequencing support.

References

- Alexander M (1986) Most probable number method for microbial populations. In: methods of soil analysis: chemical and microbiological properties, 2nd edn. American Society for Agronomy, Madison, WI, pp 815–820
- Alexeyev MF, Shokolenko IN, Croughan TP (1995) Improve antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160:63–67
- Alvarez B, Martínez-Drets G (1995) Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. *Can J Microbiol* 41:918–924
- Antoine R, Loch C (1992) Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Mol Microbiol* 6:1785–1799
- Arrieta J, Hernández L, Coego A, Suárez V, Balmori E, Menéndez C, Petit-Glatron MF, Chambert R, Selman-Housein G (1996) Molecular characterization of the levansucrase gene from the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Microbiology* 142:1077–1085
- Baliga NS, Bonneau R, Facciotti MT, Pan M, Glusman G et al (2004) Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: a halophilic archaeon from the Dead Sea. *Genome Res* 14:2221–2234
- Barone JR, Medynets M (2007) Thermally processed levan polymers. *Carbohydr Polym* 69:554–561
- Bastián F, Rapparini F, Baraldi R, Piccoli P, Bottini R (1999) Inoculation with *Acetobacter diazotrophicus* increases glucose and fructose content in shoots of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Symbiosis* 27:147–156
- Bertalan M, Albano R, Pádua V, Rouws L et al (2009) Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics* 10:450–466
- Bezzate S, Aymerich S, Chambert R, Czarnes S, Berge O, Heulin T (2000) Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere. *Environ Microbiol* 2:333–342
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Cavalcante V, Döbereiner J (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108:23–31
- Daguer JP, Geissmann T, Petit-Glatron MF, Chambert R (2004) Autogenous modulation of the *Bacillus subtilis* *sacB-levB-yveA* levansucrase operon by the *levB* transcript. *Microbiology* 150:3669–3679
- Danese PN, Pratt LA, Kolter R (2000) Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* 182:3593–3596
- Danhorn T, Fuqua C (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Microbiol* 61:401–422
- Davey ME, O'Toole GA (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:847–867
- Deppenmeier U, Ehrenreich A (2009) Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 16:69–80
- Dong Z, Canny MJ, McCully ME, Robredo MR, Fernandez-Cabadilla C, Ortega E, Rodés R (1994) A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. *Plant Physiol* 105:1139–1147
- Dong Z, McCully ME, Canny MJ (1997) Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Anatomical and physiological data. *Ann Bot* 80:147–158
- Dunne WM (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 15:155–166
- Franke-Whittle IH, O'Shea MG, Leonard GJ, Sly LI (2005) Design, development, and use of molecular primers and probes for the detection of *Gluconacetobacter* species in the pink sugarcane mealybug. *Microb Ecol* 50:128–139
- Geier G, Geider K (1993) Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiol Mol Plant Pathol* 42:387–404
- Gouffé K, Pichereau V, Rolland JP, Thomas D, Bernard T, Blanco C (1998) Sucrose is a nonaccumulated osmoprotectant in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 180:5044–5051
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004) Bacterial biofilm: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2:95–108
- Hartmann A, Prabhu SR, Galinski EA (1991) Osmotolerance of diazotrophic rhizosphere bacteria. *Plant Soil* 137:105–109
- Hernández L, Arrieta J, Menéndez C, Vázquez R, Coego A, Suárez V, Selman G, Petit-Glatron MF, Chambert R (1995) Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem J* 309:113–118
- Hernández L, Sotolongo M, Rosabal Y, Menéndez C, Ramírez R, Caballero-Mellado J, Arrieta J (2000) Structural levansucrase gene (*lsdA*) constitutes a functional locus conserved in the species *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Arch Microbiol* 174:120–124
- Jiménez-Salgado T, Fuentes-Ramírez LE, Tapia-Hernández A, Mascaraña-Esparza MA, Martínez-Romero E, Caballero-Mellado J (1997) *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of the other nitrogen-fixing acetobacteria. *Appl Environ Microbiol* 63:3676–3683
- Kasapis S, Morris ER, Gross M, Rudolph K (1994) Solution properties of levan polysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, and its possible primary role as a blocker of recognition during pathogenesis. *Carbohydr Polym* 23:55–64
- Koczan JM, McGrath MJ, Zhao Y, Sundin GW (2009) Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: implications in pathogenicity. *Phytopathology* 99:1237–1244
- Kovach ME, Elzer PH, Hill SD, Robertson GT, Farris MA, Roop RM II, Peterson KM (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBB1RMCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166:175–176
- Kunst F, Rapoport G (1995) Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzymes in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 177:2403–2407
- Laue H, Schenk A, Li H, Lambertsen L, Neu TR, Molin S, Ullrich MS (2006) Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology* 152:2909–2918

- Lerner A, Castro-Sowinski S, Lerner H, Okon Y, Burdman S (2009) Glycogen phosphorylase is involved in stress endurance and biofilm formation in *Azospirillum brasilense* Sp7. *FEMS Microbiol Lett* 300:75–82
- Li H, Ullrich MS (2001) Characterization and mutational analysis of three allelic *lsc* genes encoding levansucrase in *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* 183:3282–3292
- Lombardo MJ, Michalski J, Martinez-Wilson H, Morin C, Hilton T, Osorio CG, Nataro JP, Tacket CO, Camilli A, Kaper JB (2007) An in vivo expression technology screen for *Vibrio cholera* genes expressed in human volunteers. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18229–18234
- Marchuk D, Drumm M, Saulino A, Collins FS (1991) Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res* 19:1154
- Menéndez C, Hernández L, Banguela A, País J (2004) Functional production and secretion of the *Gluconacetobacter diazotrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol* 34:446–452
- Menéndez C, Banguela A, Caballero-Mellado J, Hernández L (2009) Transcriptional regulation and signal-peptide-dependent secretion of exolevanase (LsdB) in the endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Appl Environ Microbiol* 75:1782–1785
- Muthukumarasamy R, Revathi G, Seshadri S, Lakshminarasimhan C (2002) *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Curr Sci* 83:137–145
- Ophir T, Gutnick DL (1994) A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl Environ Microbiol* 60:740–745
- Pellic V, Reyat JM, Gicquel B (1996) Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J Bacteriol* 178:1197–1199
- Pilon-Smits EAH, Ebskamp MJM, Paul MJ, Jeuken MJW, Weisbeek PJ, Smeekens SCM (1995) Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol* 107:125–130
- Pons T, Hernández L, Batista FR, Chinae G (2000) Prediction of a common β -propeller catalytic domain for fructosyltransferases of different origin and substrate specificity. *Protein Sci* 9:2285–2291
- Prithiviraj B, Bais HP, Jha AK, Vivanco JM (2005) *Staphylococcus aureus* pathogenicity on *Arabidopsis thaliana* is mediated either by a direct effect of salicylic acid on the pathogen or by SA-dependent, NPR1-independent host responses. *Plant J* 42:417–432
- Reis VM, Olivares FL, Döbereiner J (1994) Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World J Microbiol Biotechnol* 10:401–405
- Rouws LF, Simões-Araújo JL, Hemerly AS, Baldani JJ (2008) Validation of a Tn5 transposon mutagenesis system for *Gluconacetobacter diazotrophicus* through characterization of a flagellar mutant. *Arch Microbiol* 189:397–405
- Rozen R, Bachrach G, Steinberg D (2004) Effect of carbohydrates on fructosyltransferase expression and distribution in *Streptococcus mutans* GS-5 biofilms. *Carbohydr Res* 339:2883–2888
- Russo DM, Williams A, Edwards A, Posadas DM, Finnie C, Dankert M, Downie JA, Zorreguita A (2006) Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* 188:4474–4486
- Sambrook J, Russell DW (2001) Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS. In: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp 1.31–1.42
- Saravanan VS, Madhaiyan M, Osborne J, Thangaraju M, Sa TM (2008) Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* members: their possible role in plant growth promotion. *Microb Ecol* 55:130–140
- Schroeder VA, Michalek SM, Macrina FL (1989) Biochemical characterization and evaluation of virulence of a fructosyltransferase-deficient mutant of *Streptococcus mutans* V403. *Infect Immun* 57:3560–3569
- Siqueira F, Cardoso R, Oliveira E, Moura M, Quintana VM, Berbert-Molina MA (2009) Glycine betaine enhances growth of nitrogen-fixing bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 under saline stress conditions. *Curr Microbiol* 59:593–599
- Stephan MP, Oliveira M, Teixeira KRS, Martinez-Drets G, Döbereiner J (1991) Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol Lett* 77:67–72
- Stephan MP, Fontaine T, Previato JO, Mendonça-Previato L (1995) Differentiation of capsular polysaccharides from *Acetobacter diazotrophicus* strains isolated from sugarcane. *Microbiol Immunol* 39:237–242
- Sutherland IW (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147:3–9
- Támbora Y, Hormaza JV, Pérez C, León A, Arrieta J, Hernández L (1999) Structural analysis and optimised production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Biotechnol Lett* 21:117–121
- Tejera NA, Ortega E, González-López J, Lluch C (2003) Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *J Appl Microbiol* 95:528–535
- Tejera NA, Ortega E, Rodés R, Lluch C (2004) Influence of carbon and nitrogen sources on growth, nitrogenase activity and carbon metabolism of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Can J Microbiol* 50:745–750
- Trujillo LE, Arrieta JG, Dafnis F, García J, Valdés J, Tambara Y, Pérez M, Hernández L (2001) Fructo-oligosaccharides production by the *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol* 28:139–144
- Trujillo-López A, Camargo-Zendejas O, Salgado-Garciglia R, Cano-Camacho H, Baizabal-Aguirre VM, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE, Valdéz-Alarcón JJ (2006) Association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* with roots of common bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings is promoted in vitro by UV light. *Can J Bot* 84:321–327 Erratum *Can J Bot* 84:514
- Ureta A, Alvarez B, Ramón A, Vera MA, Martínez-Drets G (1995) Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. *Plant Soil* 172:271–277
- Velázquez-Hernández ML, Baizabal-Aguirre VM, Bravo-Patiño A, Cajero-Juárez M, Chavéz-Moctezuma MP, Valdez-Alarcón JJ (2009) Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. *J Appl Microbiol* 106:1763–1778
- Vereyken IJ, Chupin V, Hoekstra FA, Smeekens SC, Kruijff B (2003) The effect of fructan on membrane lipid organization and dynamics in the dry state. *Biophys J* 84:3759–3766
- Vijn I, Smeekens S (1999) Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol* 120:351–360
- Wood JM (2007) Bacterial osmosensing transporters. *Methods Enzymol* 428:77–107
- Yamada Y, Yukphan P (2008) Genera and species in acetic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 125:15–24
- Youssef HH, Fayeze M, Monib M, Hegazi N (2004) *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a natural endophytic diazotroph of Nile Delta sugarcane capable of establishing an endophytic association with wheat. *Biol Fertil Soils* 39:391–397

8.2. Resultados complementarios

8.2.1. Obtención de las mutantes del gen *lsdA* que codifica para la levansacarasa

Verificación del mapa de restricción del plásmido pLSDA::NPTII

Para la generación de la mutante del gen *lsdA* que codifica para la levansacarasa de *G. diazotrophicus* se utilizó el plásmido pLSDA::NPTII. Para verificar la presencia del gen *lsdA* interrumpido por *nptII* y la orientación de ambos genes en el plásmido construido por Cruz-Vázquez (2002), se revisó el mapa físico del plásmido pLSDA::NPTII, utilizando distintas enzimas de restricción (Figura 5). El plásmido pLSDA::NPTII fue secuenciado, parte de la secuencia se muestra en las Figuras 11 y 12. El mapa físico y la secuencia mostraron que el gen *lsdA* fue interrumpido por el gen *nptII* y fue insertado en la misma dirección que el gen *lsdA*. Este se utilizó para la generación de la mutante del gen *lsdA*.

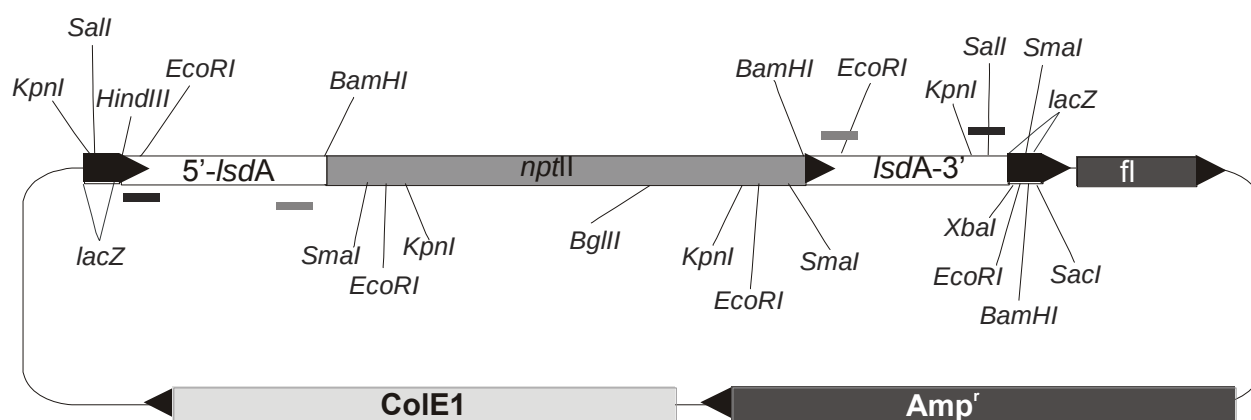


Figura 5. Mapa físico del plásmido pLSDA::NPTII. El gen *lsdA* codifica para la levansacarasa, el gen *nptII* codifica para una neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia a kanamicina, el gen *lacZ* codifica el fragmento α de la β -galactosidasa, el locus *fl* es el origen de replicación del bacteriófago *fl* de cadena sencilla, el gen *Amp^r* confiere resistencia ampicilina, y *ColE1* es un origen de replicación de *E. coli*. Las barras negras ubicadas en los extremos del gen *lsdA* indican la localización de los oligonucleótidos *lsu-lsl*, y las barras grises localizadas cerca de los extremos del gen *nptII* son los oligonucleótidos *lskmu-lskml*.

Generación de las mutantes de levansacarasa

La obtención de las mutantes de levansacarasa de *G. diazotrophicus* fue por medio de interrupción génica. La transformación de las células bacterianas con el plásmido pLSDA::NPTII fue por electroporación a 1.4 kV durante 4 ms y con 500 ng de plásmido. Las transformantes obtenidas se seleccionaron por la pérdida del fenotipo mucoide y crecimiento en presencia de kanamicina en medio LGIE con sacarosa (Arrieta *et al*, 1996). A las transformantes obtenidas se les designó con la nomenclatura “L-número”. Se obtuvieron 32 transformantes para su

posterior caracterización. A las transformantes se les extrajo ADN y se realizó un PCR con los oligonucleótidos *lsu-lsl* para amplificar el gen de *lsdA* que contendría insertado al gen *nptII* (Tabla 5 y Figura 3). Las transformantes L-3, L-14 y L-24 generaron un fragmento de 2.8 kb que corresponde al gen *lsdA* interrumpido con el casete de *nptII*, integrado en el genoma de *G. diazotrophicus*. Las transformantes L-3, L-14 y L-24 fueron seleccionadas para los siguientes ensayos debido a que no se observaron productos de amplificación derivados del gen silvestre (Figura 6, carriles 5, 10 y 11). Es interesante destacar que las cepas L-1, L-2, L-6, L-8, L-9 y L-11 (Figura 6), que no presentaron el fragmento de 2.8 kb, como único producto, presentaron el producto de 1.4 Kb, lo cual sugiere eventos de recombinación “ilegítima” que permiten la integración del casete *lsdA::nptII* en algún locus diferente al de *lsdA*, lo cual explica la resistencia a kanamicina.

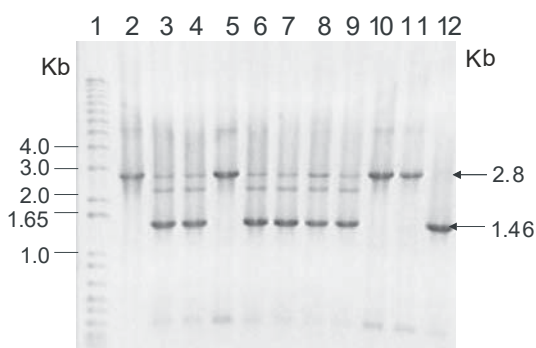


Figura 6. Amplificación por PCR del fragmento *lsdA* en las transformantes obtenidas con el pLSDA::NPTII. Electroforesis del gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. El carril 1 es el marcador de 1 kb. Amplificación por PCR del gen *lsdA* con los oligonucleótidos *lsu-lsl* a partir de: carril 2 pLSDA::NPTII; carril 3, transformante L-1; carril 4, transformante L-2; carril 5, transformante L-3; carril 6, transformante L-6; carril 7, transformante L-8; carril 8, transformante L-9; carril 9, transformante L-11; carril 10, transformante L-14; carril 11, transformante L-24; carril 12, *G. diazotrophicus* PAI 5 R. El marcador de tamaño molecular está indicado con líneas a la izquierda y el tamaño de los fragmentos obtenidos por amplificación está indicado con flechas a la derecha.

El ADN de las transformantes L-3, L-14 y L-24 fue amplificado con los oligonucleótidos *lskmu-lskml* (Tabla 5 y Figura 3), estos oligonucleótidos se alinean cerca del sitio donde se insertó el casete de km en el gen *lsdA* (Figura 7), generando un fragmento de 1.4 kb a partir de ADN de las transformantes y del plásmido pLSDA::NPTII. La amplificación con el ADN de la cepa PAI 5 R generó un fragmento de 120 pb del gen *lsdA*. Las amplificaciones generadas nos indicaron que posiblemente se obtuvieron mutantes por interrupción del gen *lsdA* de *G. diazotrophicus*.

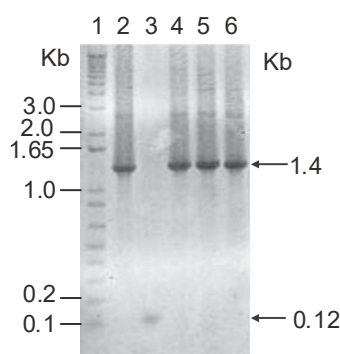


Figura 7. Amplificación por PCR del fragmento *lsdA* en las transformantes obtenidas con el pLSDA::NPTII. Amplificación por PCR del gen *lsdA* con los oligonucleótidos *lskmu-lskml*. Electroforesis del gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. El carril 1 corresponde al marcador de 1 kb; carril 2, pLSDA::NPTII; carril 3, *G. diazotrophicus* PAI 5 R; carril 4, transformante L-3; carril 5, transformante L-14; carril 6, transformante L-24. El marcador de tamaño molecular está indicado con líneas a la izquierda y el tamaño de los fragmentos obtenidos por amplificación está indicado con flechas a la derecha.

Las transformantes de *G. diazotrophicus* PAI 5 R *lsdA::nptII* pierden la capacidad de utilizar la sacarosa como fuente de carbono y la capacidad de sintetizar levana, lo cual se refleja en la formación colonias carentes del aspecto mucoso, las colonias de la cepa silvestre PAI 5 R presentan colonias mucoides como se muestra en la Figura 8.

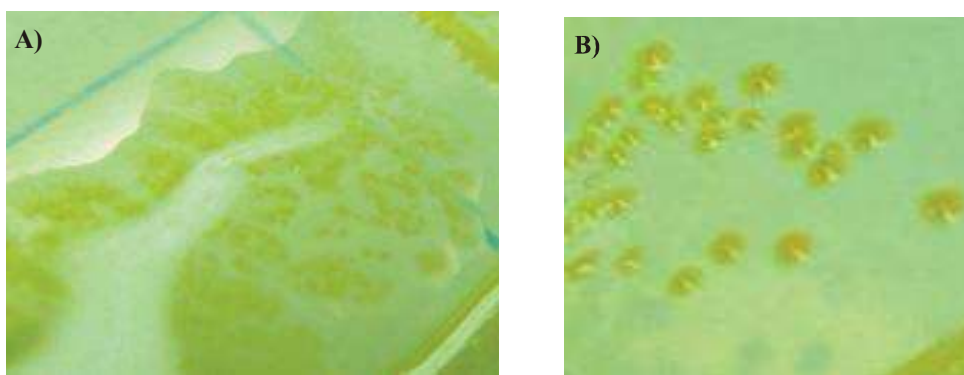


Figura 8. Ausencia del fenotipo mucoso en las mutantes del gen *lsdA* de *G. diazotrophicus*. Medio LGIE sacarosa incubado a 30°C durante 65 horas, con la cepa PAI 5 R mucoso (A) y la cepa L-3 carente de fenotipo mucoso (B).

La generación de los mutantes en el gen que codifica para la levansacarasa en otras bacterias como *Streptococcus mutans*, *Erwinia amylovora* y *Pseudomonas syringae*, también se obtienen colonias carentes del aspecto mucoso cuando se crece con sacarosa (Schroeder *et al*, 1989; Li y Ullrich, 2001; Geier y Geider, 1993).

Debido a la diferencia tan marcada en la morfología colonial de las transformantes, era necesario verificar su identidad demostrando que efectivamente derivaban de *G. diazotrophicus*

PAI 5 R. Para identificar a la bacteria, se realizó un PCR con oligonucleótidos específicos para el ARNr 16S de *G. diazotrophicus* (Franke-Whittle *et al*, 2005) a partir de muestras de ADN de las cepas PAI 5 R y a las transformantes L-3, L-14 y L-24. En todas se obtuvo un fragmento esperado de 913 pb (Figura 9). El fragmento de 913 pares de bases no se obtuvo cuando se utilizó como molde ADN de otras especies bacterianas como *E. coli*; *Staphylococcus aureus* o *Bacillus thuringiensis* (Figura 9, carriles 6, 7 y 8). Los fragmentos obtenidos de *G. diazotrophicus* fueron secuenciados utilizando los mismos oligonucleótidos (Figura 10). Las secuencias nos permitieron confirmar que las tres transformantes, a pesar de las diferencias en su morfología colonial con respecto a la silvestre, correspondían a la especie *G. diazotrophicus*.

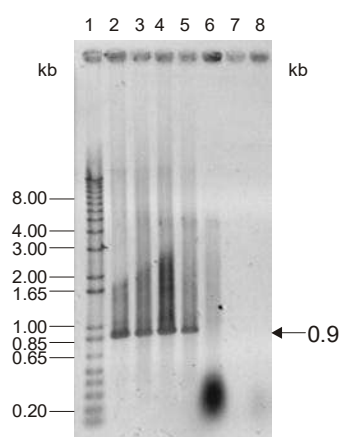


Figura 9. Amplificación por PCR del ARNr 16S específico de *G. diazotrophicus*. Electroforesis del gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de 1 Kb; carril 2, PAI 5 R; carril 3, transformante L-3; carril 4, transformante L-14; carril 5, transformante L-24; carril 6, *Escherichia coli* XL1-Blue; carril 7, *Staphylococcus aureus* ATCC 27543; carril 8, *Bacillus thuringiensis* INTA Mol4-4.

PAI 5 R	AGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT	60
L-3	AGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT	60
L-14	AGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT	60
Clona CFNE-550	AGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT	60
L-24	AGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT	60

PAI 5 R	GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAA	120
L-3	GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAA	120
L-14	GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAA	120
Clona CFNE-550	GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAA	120
L-24	GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAA	120

PAI 5 R	GCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGAC	180
L-3	GCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGAC	180
L-14	GCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGAC	180
Clona CFNE-550	GCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGAC	180
L-24	GCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGAC	180

PAI 5 R	GGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGC	240
L-3	GGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGC	240

L-14	GGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGC	240
Clona CFNE-550	GGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGC	240
L-24	GGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGC	240

PA1 5 R	GGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGG	300
L-3	GGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGG	300
L-14	GGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGG	300
Clona CFNE-550	GGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGG	300
L-24	GGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGG	300

PA1 5 R	TTTGGACAGTCAGATGTGAAATTCTGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTATA	360
L-3	TTTGGACAGTCAGATGTGAAATTCTGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTATA	360
L-14	TTTGGACAGTCAGATGTGAAATTCTGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTATA	360
Clona CFNE-550	TTTGGACAGTCAGATGTGAAATTCTGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTATA	360
L-24	TTTGGACAGTCAGATGTGAAATTCTGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTATA	360

PA1 5 R	GA CTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTC C CAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATT	420
L-3	GA CTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTC C CAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATT	420
L-14	GA CTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTC C CAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATT	420
Clona CFNE-550	GA CTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTC C CAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATT	420
L-24	GA CTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTC C CAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATT	420

PA1 5 R	GGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATAACTGACGCTGAGGCGCGAAA	480
L-3	GGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATAACTGACGCTGAGGCGCGAAA	480
L-14	GGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATAACTGACGCTGAGGCGCGAAA	480
Clona CFNE-550	GGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATAACTGACGCTGAGGCGCGAAA	480
L-24	GGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATAACTGACGCTGAGGCGCGAAA	480

PA1 5 R	GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTG	540
L-3	GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTG	540
L-14	GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTG	540
Clona CFNE-550	GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTG	540
L-24	GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTG	540

PA1 5 R	GATGTTGGGTGGCTTAGCCCCCTCAGTGTCGTAGTTAACGCGATAAGCAC	589
L-3	GATGTTGGGTGGCTTAGCCCCCTCAGTGTCGTAGTTAACGCGATAAGCAC	589
L-14	GATGTTGGGTGGCTTAGCCCCCTCAGTGTCGTAGTTAACGCGATAAGCAC	589
Clona CFNE-550	GATGTTGGGTGGCTTAGCCCCCTCAGTGTCGTAGTTAACGCGATAAGCAC	589
L-24	GATGTTGGGTGGCTTAGCCCCCTCAGTGTCGTAGTTAACGCGATAAGCAC	589

Figura 10. Secuencias de los fragmentos amplificados por PCR del ARNr 16S específico de *G. diazotrophicus*. Las secuencias se alinearon con EMBL-EBI. CFNE-550 representa la secuencia de un fragmento de la secuencia 16S ribosomal de la cepa PA1 5 de *G. diazotrophicus*, su número de acceso en el GenBank es AY230811. El alineamiento fue con el método de ClustalW v 1.83. Los asteriscos indican identidad entre todas las secuencias.

Verificación por secuenciación de la interrupción del gen *lsdA*

La interrupción del gen *lsdA* en las transformantes L-3, L-14 y L-24, fueron verificadas por secuenciación con los oligonucleótidos *lskmu-lskml* (previamente se hizo el PCR con estos oligonucleótidos, Figura 7) confirmando que el gen *lsdA* fue interrumpido con el gen *nptII* (Figura 11 y 12). La Figura 11 representa el extremo 5' de la secuencia de las cepas PA1 5 R,

las transformantes L-3, L-24, y la secuencia del pLSDA::NPTII. La inserción del gen *nptII* en el sitio *Bam*HI de la secuencia de *lsdA* generó una fusión transcripcional donde el gen *lsdA* y el gen *nptII* son traducidos con sus propias regiones de iniciación traduccionales. La traducción del gen *lsdA* se continúa en la fusión hasta que esta encuentra un codón de paro en fase, como se indica con los nucleótidos subrayados y el codón de paro está indicado con un punto en la Figura 11. El transcrito generado por la fusión transcripcional es el molde para traducir el fragmento 5' del gen *lsdA* y producir una proteína truncada de LsdA y la proteína completa de la fosfotransferasa codificada por el gen *nptII*, así las células transformantes L-3, l-14 y L-24 son resistentes al antibiótico kanamicina.

PAL 5 R	CCAGACCCTGGGGCGGATCC-----	
L-3	--ACCGCCCGCAGGCCCATCA-TCACCCAGACCCTGGGGCGGATCCCGGGGTACCGAGC	56
pLSDA::NPTII	CCCCCCCCGAAAGGCCATCAATCACCCAGACCCTGGGGCGGATCCCGGGGTACCGAGC	59
L-24	--CCGCCCCGCGGGGCCATCT-TCACTCAGACCCTGGGGCGGATCCCGGGGTACCGAG-	56
	* * * * *	
Traducción	T Q T L A R I P G Y R A	
PAL 5 R	-----	
L-3	TCGAATTC-CTCCGAGCCCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATGAAA	115
pLSDA::NPTII	TCGAATTCCTCTGCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATGAAA	119
L-24	TCGAATTCCTTTGGAGGGCCAGAGGAAAGCTCAGAAGAACTCGTCA--GAAGTTTTCGAA	114
	***** * ** * ***** * * * *	
Traducción	R I L C E P Q S P A Q K N S S R R R •	
PAL 5 R	-----	
L-3	GGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTCAGCCCCA	175
pLSDA::NPTII	GGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTCAGCCCCA	179
L-24	GGCGATGCGCGGAGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTCAGCCCCA	174
	***** * *****	
PAL 5 R	-----	
L-3	TTGCGCCGCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTGATAGCGGTC	235
pLSDA::NPTII	TTGCGCCGCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTGATAGCGGTC	239
L-24	TTGCGCCGC-AAGCTCTTCAGAAATATCACGGTAAACCAACGCTATGACCTGAAAGCGGTC	233
	***** ***** * *****	

Figura 11. Secuencias de los fragmentos amplificados por PCR del gen *nptII* del extremo 5'. Las secuencias se alinearon en EMBL-EBI. La secuencia es del extremo 5' con el oligonucleótido *lskmu*. El alineamiento fue con el método de ClustalW (1.83). Los asteriscos indican identidad de las bases, las letras azules itálicas representan la secuencia del gen *lsdA*; continuando hacia el extremo 3' las letras negras son la secuencia de reconocimiento de la enzima *Bam*HI, y las siguientes bases hacia el extremo 3' son la secuencia del gen *nptII*. Las letras subrayadas negritas son un codón de paro representado por un punto en la secuencia de aminoácidos, y las letras subrayadas son los aminoácidos traducidos de la secuencia obtenida.

La Figura 12 representa el extremo 3' de la secuencia de las cepas PAL 5 R, las transformantes L-3, L-14, L-24, y la secuencia del pLSDA::NPTII. Las letras negritas son el sitio *Bam*HI, que corresponde a la secuencia del gen *lsdA*, y en seguida se presenta la secuencia del casete de kanamicina que se insertó en el mismo sitio, en las transformantes.


```

PAL 5 R          CGGCGTGGATCC-----
L-3              GATGGGGGGTTGGTTGAACGGCGTGTATCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCCGCTAGCTTC 60
L-14            ---CGCGAGTTGGA-AATCGGCGTGAACC CGGGTACCGAGCTCGAATTCCGCTAGCTTC 56
L-24            -----AGCCTC 6
pLSDA::NPTII    -----CTAGCTTC 8
                  *** **

PAL 5 R          -----
L-3              ACGCTGCCGCACGCGCTGCGGGGGGCAAGGGCTGCTAAAGGAAGCGGAACACGTAGAAA 120
L-14            ACGCTGCCGC-CTCTCACTCAGGGCGCAAGGGCTGCTAAAGGAAGCGGAACACGTAGAAA 115
L-24            TCCCCCCCCGC-CACTAAAGGGGGGCAAGGGCTGCTAAAGGAAGCGGAACACGTATTTTC 65
pLSDA::NPTII    ACGCTGCCGCAAGCACT--CAGGGCGCAAGGGCTGCTAAAGGAAGCGGAACACGTAGAAA 66
                  * * ** * * * * *
                  *** *****

PAL 5 R          -----
L-3              -GCCAGTCCGCAGAAACGGTGCTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGAC 179
L-14            -GCCAGTCCGCAGAGACGGTGCTGACCCCGGATGAGGGTCAGCTACTGGGCTATCTGGAC 174
L-24            CGCGAGTCCGCAGGGACGGTGCTGACCCCGGATGAGGGTCAGCTACTGGGCTATCTGGAC 125
pLSDA::NPTII    -GCCAGTCCGCAGAAACGGTGCTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGAC 125
                  *****

PAL 5 R          -----
L-3              AAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCACTGGGCTTACATGGCGATA 239
L-14            AAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCACTGGGCTTACATGGCGATA 234
L-24            AAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCACTGGGCTTACATGGCGATA 185
pLSDA::NPTII    AAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCACTGGGCTTACATGGCGATA 185
                  *****

PAL 5 R          -----
L-3              GCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTC 299
L-14            GCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTC 294
L-24            GCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTC 245
pLSDA::NPTII    GCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTC 245
                  *****

```

Figura 12. Secuencias de los fragmentos amplificados por PCR del gen *nptII* del extremo 3'. Las secuencias se alinearon en EMBL-EBI. La secuencia es del extremo 3' amplificada con el oligonucleótido *lskml*. El alineamiento se realizó con el método de ClustalW (1.83). Los asteriscos indican identidad de las bases, las letras azules itálicas la secuencia del gen *lsdA*; la secuencia de reconocimiento de la enzima *Bam*HI, donde se insertó el casete de resistencia a kanamicina, se indica en letras negritas.

Análisis de la interrupción del gen *lsdA* por hibridación tipo Southern blot

Para verificar la inserción del casete de resistencia a kanamicina (*nptII*) en el gen *lsdA* del genoma de *G. diazotrophicus*, debido a un evento de integración por reemplazo alélico se realizó un ensayo de tipo Southern blot. En la Figura 3 se muestra la región de apareamiento de la sonda *lsdA*. La sonda *lsdA* hibridó con un fragmento de 1.4 kb del gen *lsdA* en el ADN de la cepa PAI 5 R, cuando fue digerido con *Bgl*III. Las transformantes L-3, L-14 y L-24 generaron dos señales de hibridación de 1.7 y 1.8 kb debido a la presencia de un sitio *Bgl*III interno en el gen *nptII* (Figura 13A). Cuando el ADN de *G. diazotrophicus* fue digerido con *Sal*I, la cepa PAI 5 R generó una señal de hibridación de 2.3 kb, y las transformantes L-3, L-14 y L-24 generaron un fragmento de 3.9 kb que corresponden al fragmento del gen *lsdA* mas el casete *nptII* (Figura 13A). El ADN digerido con *Hind*III generó una señal de hibridación de 12.9 kb

con la cepa PAI 5 R, y con las transformantes L-3, L-14 y L-24 generaron un fragmento de 14.2 kb (Figura 13A). El Southern blot también se realizó con la sonda *nptII*, la localización de la sonda *nptII* en el locus de *lsdA* se muestra en la Figura 3. La sonda *nptII* generó las mismas señales de hibridación que la sonda *lsdA* en las transformantes L-3, L-14 y L-24 (Figura 13B). Ninguna señal de hibridación fue detectada con la sonda *nptII* con el ADN de la cepa PAI 5 R. Todos estos resultados confirmaron que el gen *lsdA* de *G. diazotrophicus* fue interrumpido con el casete de resistencia a kanamicina (*nptII*), mediante reemplazo del alelo silvestre por el fragmento del gen *lsdA* interrumpido. Del Southern blot se puede concluir que en las transformantes L-3, L-14 y L-24, no ocurrieron eventos de recombinación ilegítima que promovieran la inserción del casete de kanamicina en *loci* diferentes al del gen *lsdA*.

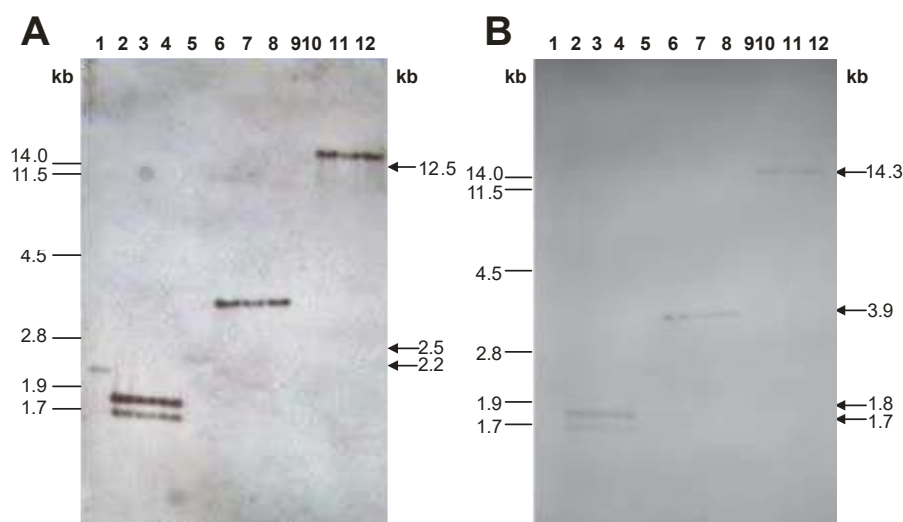


Figura 13. Análisis de tipo Southern blot del ADN de *G. diazotrophicus*. A) Sonda *lsdA*: PAI 5 R (carriles: 1, 5, 9), L-3 (carriles: 2, 6, 10), L-14 (carriles: 3, 7, 11), y L-24 (carriles: 4, 8, 12). ADN digerido con *Bgl*III (carriles: 1-4), *Sal*II (carriles: 5-8) o *Hind*III (carriles: 9-12). B) Sonda *nptII*, los carriles tienen los mismos ADN que en A.

La interrupción del gen *lsdA* elimina la actividad de la levansacarasa

La actividad de la levansacarasa fue cuantificada en las cepas PAI 5 R y las transformantes L-3, L-14 y L-24, con la cuantificación de glucosa liberada por la hidrólisis de la sacarosa por la levansacarasa. Se cuantificó la actividad de la levansacarasa durante 18 min cada 6 min observando un aumento de 3 a 19 U/mg de proteína en la actividad de LsdA de la cepa *G. diazotrophicus* PAI 5 R (Figura 14). En las cepas L-3, L-14 y L-24 se mantuvo una actividad residual de al menos 1.2 U/mg de proteína en todos los tiempos analizados (Figura 14). Los

valores a 18 minutos se utilizaron para el cálculo de la actividad específica y se muestran en la Tabla 7.

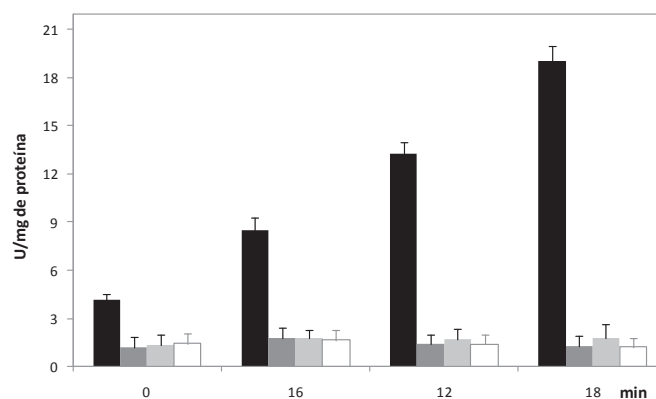


Figura 14. Actividad de la levansacarasa de *G. diazotrophicus*. Los valores corresponden la actividad de la levansacarasa a partir del sobrenadante del cultivo bacteriano en fase estacionaria (96 horas) en medio LGIE y representa el promedio de tres replicas. Las barras negras corresponden la cepa PAI 5 R, las barras gris oscuro son de la cepa L-3, las barras gris claro son de L-14 y las barras blancas corresponden a la cepa L-24.

Table 7. La actividad de la levansacarasa en los sobrenadantes del cultivos en medio LGIE a los 18 min de reacción

Cepa	Proteína (mg/ml)	Actividad total (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
PAI 5 R	0.044 ± 0.001	4.124 ± 0.417	19.055 ± 1.196
L-3	0.040 ± 0.004	1.168 ± 0.700	1.274 ± 0.860
L-14	0.042 ± 0.006	1.352 ± 0.652	1.738 ± 1.219
L-24	0.042 ± 0.008	1.419 ± 0.638	1.226 ± 0.746

Los datos representan el promedio de tres replicas independientes, ± error estándar.

Los resultados de los análisis de detección de la mutación por interrupción del gen *lsdA* mediante PCR de la región interrumpida, secuenciación e hibridación confirmaron que las mutantes obtenidas en el gen de levansacarasa (*lsdA*) son por interrupción génica con el casete de resistencia a kanamicina (*nptII*).

8.2.2. Caracterización de las cepas mutantes de levansacarasa

Caracterización fenotípica de las cepas mutantes de levansacarasa

Debido a que la levansacarasa es una enzima central en la utilización de sacarosa y provisión de glucosa y sacarosa al metabolismo de *G. diazotrophicus*, es posible que la mutación de la levansacarasa hubiera modificado la utilización de otras fuentes de carbono.

Para verificar lo anterior, las cuatro cepas se crecieron en las fuentes de carbono sacarosa, glucosa, fructosa, glicerol y combinación entre ellas por que se ha reportado que las metaboliza *G. diazotrophicus* (Cavalcante y Döbereiner, 1988). *G. diazotrophicus* PAI 5 R y las mutantes L-3, L-14 y L-24 se crecieron en diferentes fuentes de carbono al 1% en medio LGIP sólido a 30°C durante 6 días para observar la morfología colonial. En sacarosa la cepa PAI 5 R presentó su crecimiento típico de colonias mucoides por la producción de levana. Las colonias viran el azul de bromotimol presente en el medio LGIP (Apéndice 14.2) a color amarillo por la producción de ácido (pH 3). En las fuentes de carbono en que no se produce ácido se conserva el color verde del medio (pH 5.5). Las mutantes L-3, L-14 y L-24 crecieron en sacarosa como colonias puntiformes sin virar el medio. Este crecimiento lo asociamos a la hidrólisis parcial de la sacarosa en el medio de cultivo ya que la sacarosa se hidroliza rápidamente por la acidez del medio y la temperatura de esterilización por calor húmedo (Figura 15A). En fructosa todas las bacterias produjeron ácido durante los dos primeros días de crecimiento. Durante la utilización de fructosa por *G. diazotrophicus* se produce ácido pero en menor proporción que en otras fuentes de carbono (Figura 15C). En glucosa y glicerol el crecimiento fue típico, sin diferencias entre las cepas silvestre o mutantes (Figura 15D y 15G). En placas de LGIP con sacarosa y glucosa se observó la formación de colonias mucoides hasta después de 6 días de crecimiento. Tal vez la bacteria, en éstas condiciones, está metabolizando primero la glucosa y después de la sacarosa, debido a que la glucosa puede ser utilizada por tres rutas (Figura 1) y la sacarosa solo se hidrolizada a través de la levansacarasa y no se transporta a citoplasma. El crecimiento en medio sólido con las diferentes fuentes de carbono no presentó cambios excepto cuando se creció con glucosa. La combinación de sacarosa y glicerol se seleccionó para los ensayos de factores abióticos porque la sacarosa es el sustrato de la levansacarasa y se ha reportado que el glicerol induce la actividad de la levansacarasa (Arrieta *et al*, 1996).

La cepa silvestre y las cepas mutantes se crecieron en medio LGIP semisólido sin fuente de nitrógeno y solo una fuente de carbono al 1% para confirmar su capacidad de fijar nitrógeno bajo condiciones de microaerobiosis (Reis *et al*, 1994), las cepas mutantes mostraron crecimiento escaso o casi nulo en presencia de sacarosa. En medio de LGIP semisólido con glucosa, fructosa, azúcar de caña, glicerol, manitol, inositol y extracto de levadura, el crecimiento fue similar entre la cepa PAI 5 R y las mutantes (Figura 16), excepto en azúcar de caña y glicerol donde se observa un mayor crecimiento en la cepa PAI 5 R.

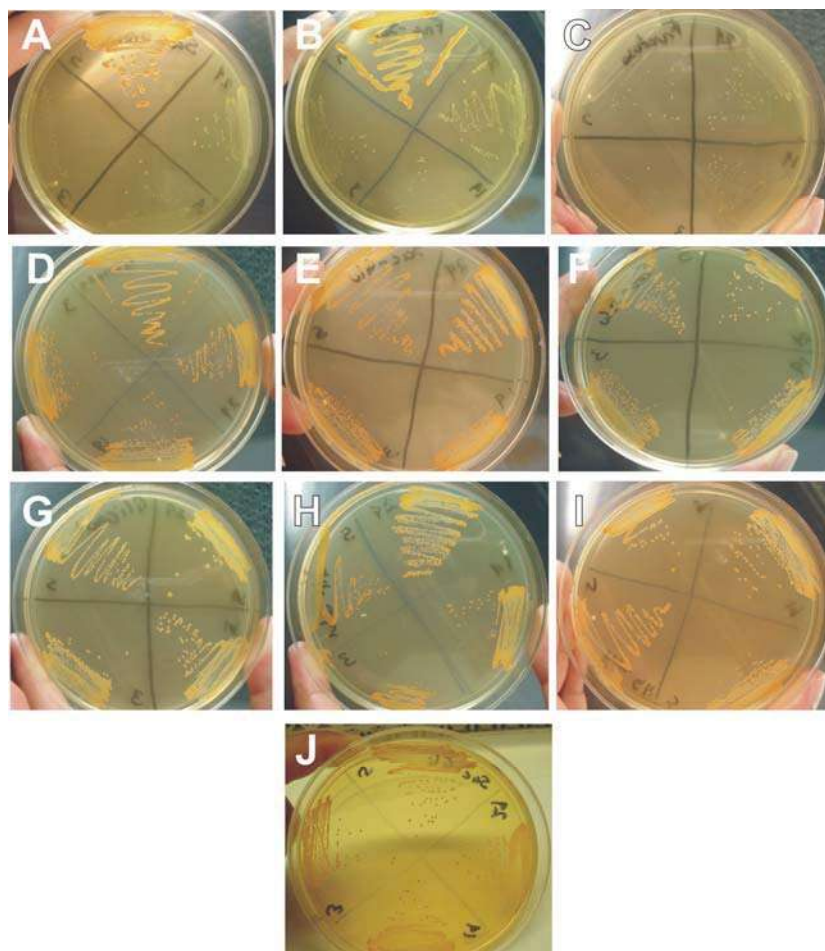


Figura 15. Morfología colonial en diferentes fuentes de carbono. Medio LGIP con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A, sacarosa; B, fructosa y sacarosa; C, fructosa; D, glucosa; E, sacarosa y glucosa; F, glucosa y fructosa; G, glicerol; H, glucosa y glicerol; I, glicerol y fructosa; y J, sacarosa y glicerol. La cepa PAI 5 R se localiza arriba o en el ángulo superior izquierdo y las cepas L-3, L-14 y L-24 se encuentran a lado de la cepa PAI 5 R en sentido contrario de las manecillas del reloj, respectivamente.

El crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio LGIP semisólido, se observa como una capa por debajo de la superficie del medio donde disminuye la difusión de oxígeno y se crean condiciones microaerofílicas que permiten la fijación de nitrógeno atmosférico. La presencia de crecimiento en medio LGIP semisólido confirma la capacidad de *G. diazotrophicus* de fijar N_2 atmosférico. Analizamos la capacidad de fijar nitrógeno en ensayos preliminares de reducción de acetileno analizando la producción de etileno con cromatografía de gases en la cepa PAI 5 R y las mutantes L-3, L-14 y L-24 (Figura 17, datos proporcionados por el Dr. Fuentes-Ramírez). La Figura 17 muestra una disminución de la FBN en las cepas mutantes L-3, L-14 y L-24 al compararlas con la cepa PAI 5 R.

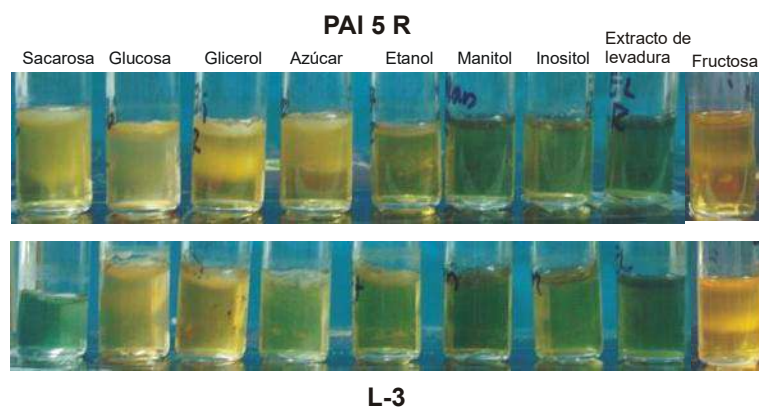


Figura 16. Fijación de nitrógeno en medio LGIP semisólido. Viales con medio LGIP sin fuente de nitrógeno, incubados durante 10 días a 30°C.

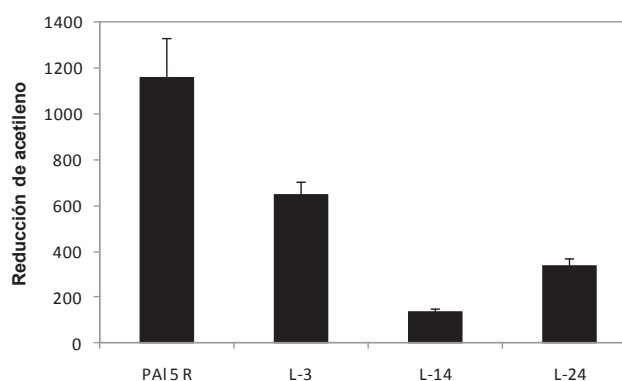


Figura 17. Cuantificación de la actividad de la nitrogenasa de las cepas de *G. diazotrophicus*. El medio contenía las fuentes de carbono sacarosa al 1% y glicerol al 1%.

Cinéticas de crecimiento de las cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

A las cepas de *G. diazotrophicus* PAI 5 R y las mutantes L-3, L-14 y L-24 se les realizaron curvas de crecimiento, para verificar que la velocidad de crecimiento no se afectó por la mutación. La Figura 18 muestra que las cuatro cepas no presentaron diferencias en la velocidad de crecimiento en medio LGITA con glucosa, los valores de las velocidades de crecimiento (representada como el valor del cambio de DO_{620} por hora), se muestran en el recuadro de la Figura 18. La interrupción del gen *lsdA* no afecta la velocidad de crecimiento en medio LGITA líquido con glucosa.

A la cinética de crecimiento de LGITA con glucosa se midió el pH a los mismos tiempos, observando una disminución del pH a valores menores de 5 al final de la fase exponencial e inicios de la fase estacionaria (Figura 19), esto se debe a que el metabolismo de glucosa genera ácido glucónico, y tal vez después es metabolizado como fuente de carbono en la fase

exponencial media (después de 28 horas) y por eso hay una recuperación del pH del medio de cultivo.

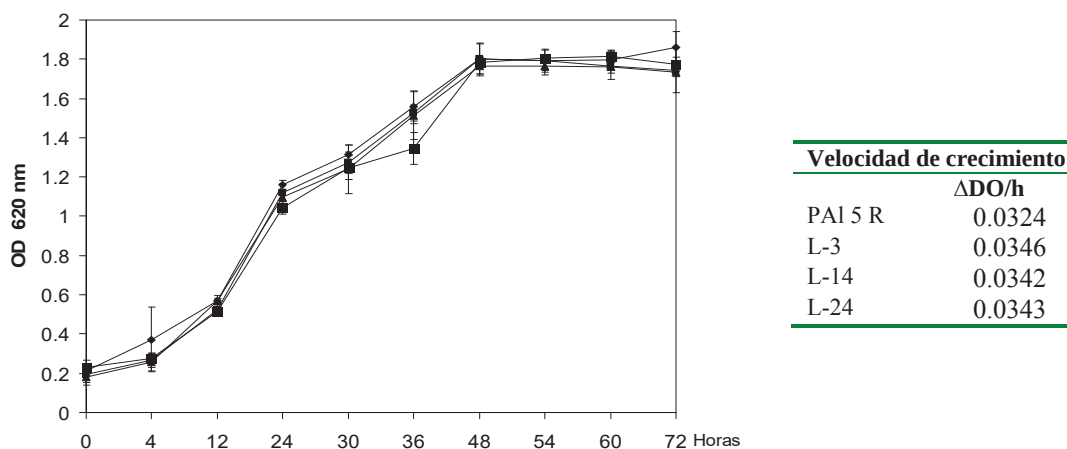


Figura 18. Cinética de crecimiento de las cepas de *G. diazotrophicus* PAI 5 R y mutantes en levansacarasa L-3, L-14 y L-24 con glucosa. La grafica representa el promedio de dos replicas de cada cepa. Las cepas de *G. diazotrophicus* son representadas por: PAI 5 R, $\blacklozenge$; L-3, $\blacksquare$; L-14, $\blacktriangle$; y L-24, $\times$. Medio de cultivo es LGITA con glucosa.

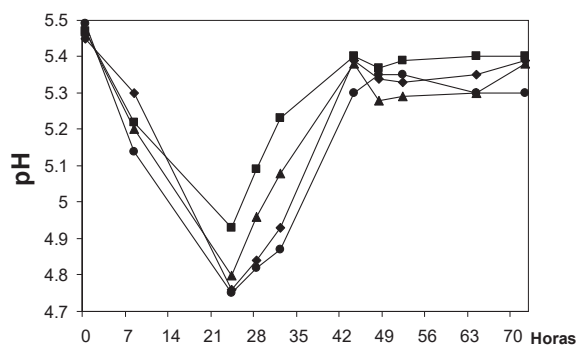


Figura 19. Cuantificación del pH de los cultivos de *G. diazotrophicus* en medio LGITA con glucosa. La grafica representa el promedio de dos replicas de cada cepa. Las cepas de *Ga diazotrophicus* son representadas por: PAI 5 R, $\blacklozenge$; L-3, $\blacksquare$; L-14, $\blacktriangle$; y L-24, $\bullet$.

La fructosa es otra fuente de carbono en la que crece *G. diazotrophicus* y se puede obtener de la hidrólisis de la sacarosa. Al generar una mutante incapaz de hidrolizar la sacarosa, queda aún la posibilidad de que la fructosa pudiera utilizarse directamente como fuente de carbono (Figura 20).

La cinética de crecimiento en fructosa demostró que no hubo cambios en el crecimiento de las cuatro cepas, así que no observamos cambios en la utilización de la fructosa en las mutantes del gen *lsdA*. Este resultado sugiere que la entrada de la fructosa a la célula bacteriana es independiente de la actividad de levansacarasa y en general su crecimiento en esta fuente de

carbono es menor a comparar las DO máximas alcanzadas en medio con glucosa o fructosa, que fueron de 1.8 y 0.5, respectivamente (Figura 18 y 20).

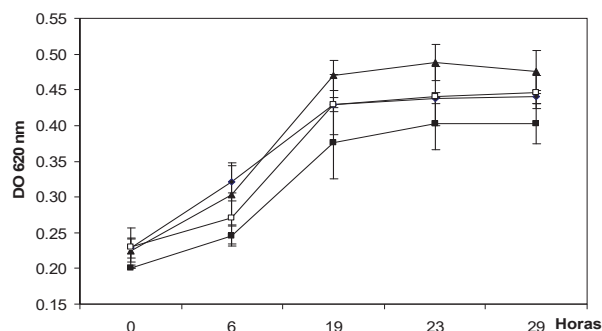


Figura 20. Cinética de crecimiento de las cepas de *G. diazotrophicus* PAI 5 R y mutantes en levansacarasa L-3, L-14 y L-24 con fructosa. La grafica representa el promedio de dos replicas de cada cepa. Las cepas de *G. diazotrophicus* son representadas por: PAI 5 R, ◆; L-3, ■; L-14, ▲; y L-24, □. Medio de cultivo es LGIP con fructosa y 0.8 mM de sulfato de amonio.

Para analizar el crecimiento de la cepa PAI 5 R y las cepas mutantes L-3, L-14 y L-24, se crecieron en medio LGIP líquido con sacarosa al 1%, glicerol al 1% y una dosis inicial de nitrógeno (Figura 21).

Las cepas mutantes del gen *lsdA* no mostraron diferencias en el crecimiento con respecto a la cepa PAI 5 R. No se observaron cambios en la DO, el pH o en la cantidad de bacterias analizada por el NMP (Figura 21). No se observaron cambios en el crecimiento entre las cepas mutantes en el gen *lsdA* y la cepa PAI 5 R. Además tampoco hubo diferencias entre las cepas mutantes L-3, L-14 y L-24, por esta razón algunos ensayos posteriores se realizaron solo con la cepa L-3.

Para descartar posibles efectos de la mutación del gen *lsdA* sobre el metabolismo otras fuentes de carbono, las cepas de *G. diazotrophicus* PAI 5 R y las tres transformantes, se analizaron en su capacidad para la utilización de otras fuentes de carbono por respiración, utilizando el sistema Biolog (Advanced Instruments).

Se utilizaron las placas indicadas para bacterias Gram negativas GN2; a cada fuente de carbono se le adicionó un inóculo ajustado al 62% de transmitancia y se incubaron a 30°C durante 70 horas. Tanto la cepa PAI 5 R como las transformantes solo presentaron actividad respiratoria y crecimiento en glucosa, glicerol, galactosa y ácido glucónico (Figura 22). Se

calcularon las velocidades de crecimiento para cada fuente de carbono como se muestra en la Tabla 8.

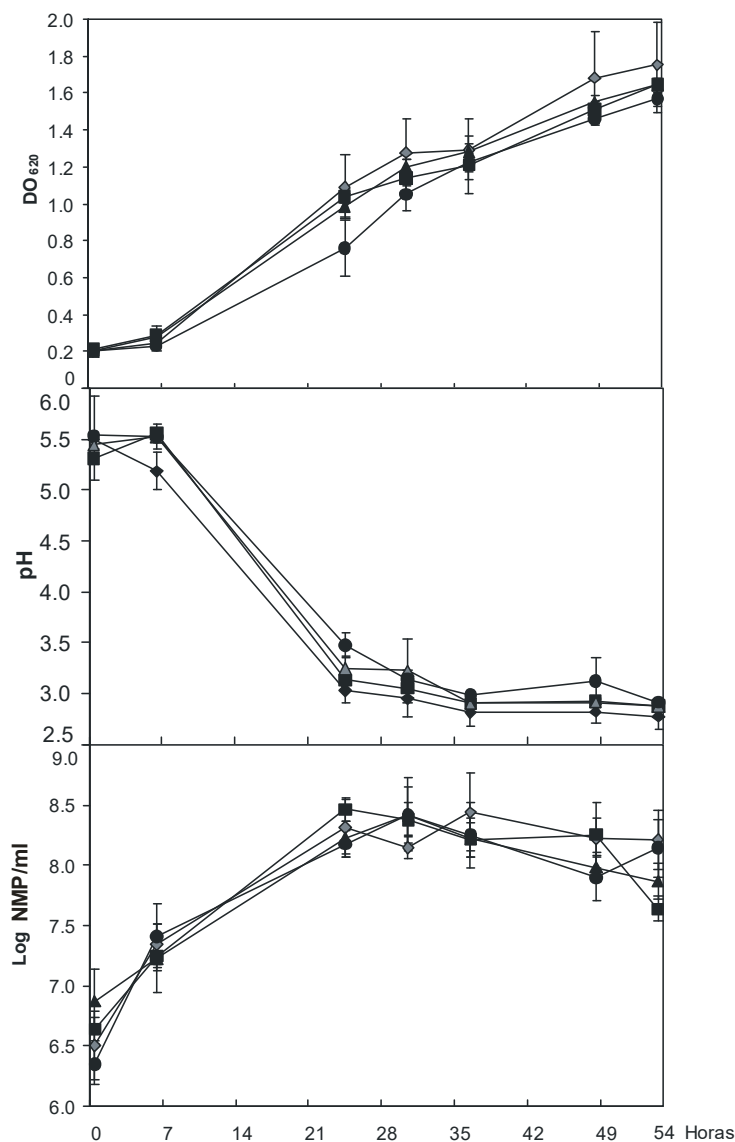


Figura 21. Cinética de crecimiento de las cepas de *G. diazotrophicus* PAI 5 R y mutantes en levansacarasa L-3, L-14 y L-24 en medio LGIP. La grafica representa el promedio de dos replicas de cada cepa. Las cepas de *G. diazotrophicus* son representadas por: PAI 5 R, ♦; L-3, ■; L-14, ▲; y L-24, ■. Medio de cultivo es LGIP con sacarosa y glicerol al 1% cada uno y 0.8 mM de sulfato de amonio. Los datos representan el promedio de tres replicas independientes. Las barras representan el error estándar.

En el caso de glucosa podemos observar una tendencia disminuida en el consumo de glucosa en las mutantes respecto a la cepa PAI 5 R (Figura 22A, Tabla 8). Hasta el momento no es posible definir si esta tendencia en la utilización de la glucosa por respiración se deba a la ausencia de la levana o a algún otro efecto pleiotrópico de la mutación del gen *lsdA*.

Tabla 8. Velocidad de crecimiento de *G. diazotrophicus* PAL 5 R y las mutantes en las fuentes de carbono analizadas en el Biolog.

	Velocidad de Crecimiento= $\Delta DO/h$			
	Glucosa	Glicerol	Galactosa	Ac. D-glucónico
PAL 5 R	0.0218	0.0221	0.0087	0.0131
L-3	0.0057	0.0118	0.0003	0.0130
L-14	0.0136	0.0130	0.0072	0.0122
L-24	0.0057	0.0138	0.0079	0.0142

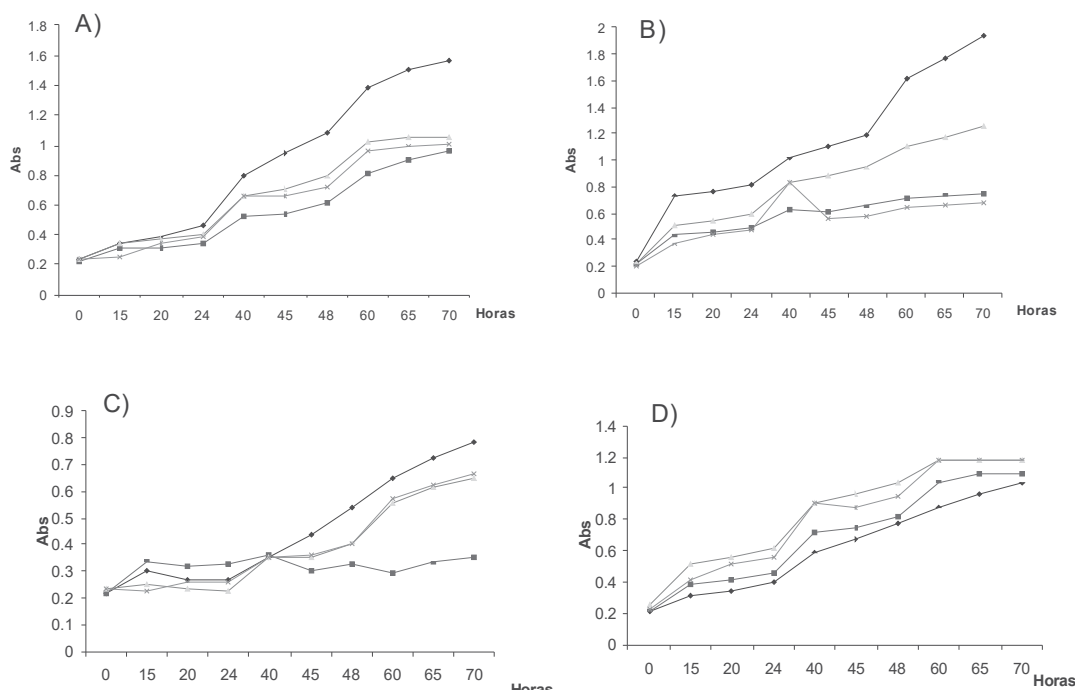


Figura 22. Gráficos del crecimiento de *G. diazotrophicus* en diferentes fuentes de carbono con el sistema Biolog. A) Glucosa; B) Glicerol; C) Galactosa y D) Ac. D-glucónico. Las cepas de *G. diazotrophicus* son representadas por: PAL 5 R, ◆; L-3, ■; L-14, ▲; y L-24, x. Los resultados representan un experimento con una réplica.

8.2.3. Análisis del efecto de los factores abióticos en las cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Tejera *et al.*, (2003) analizó la osmotolerancia a NaCl en *G. diazotrophicus*. En las mutantes del gen *lsdA* se investigó el efecto del NaCl sobre la osmotolerancia.

Para estimar las concentraciones de NaCl a las que *G. diazotrophicus* es sensible las cepas de *G. diazotrophicus* se inocularon por estría en medio LGIP sólido adicionado con 0.8 mM de $(NH_4)_2SO_4$ y glucosa o sacarosa (1% y 10% w/v), con diferentes concentraciones de NaCl (0-600 mM). Los resultados obtenidos de este experimento mostraron (Tabla 9) que la cepa PAL 5 R tolera hasta 200 mM de NaCl con glucosa o sacarosa al 1% ó 10%.

Tabla 9. Crecimiento de *G. diazotrophicus* PAI 5 R y las mutantes L-3, L-14 y L-24 en medio LGIP sólido con diferentes concentraciones de NaCl, en sacarosa o glucosa después de la incubación a 30°C durante 6 días.

Cepa	NaCl (mM)								NaCl (mM)							
	Sacarosa %								Glucosa %							
		0	50	100	200	300	600			0	50	100	200	300	600	
PAI 5 R	1	+++	+++	+++	-	-	-		1	+++	+++	++	-	-	-	
PAI 5 R	10	+++	+++	+++	-	-	-		10	+++	+++	++	-	-	-	
L-3	1	++	++	+	-	-	-		1	+++	+++	+++	-	-	-	
L-3	10	+++	++	+	-	-	-		10	+++	+++	++	-	-	-	
L-14	1	++	++	+	-	-	-		1	+++	++	+	-	-	-	
L-14	10	+++	++	+	-	-	-		10	+++	++	++	-	-	-	
L-24	1	++	++	+	-	-	-		1	+++	+++	++	-	-	-	
L-24	10	++	++	+	-	-	-		10	+++	+++	+++	-	-	-	

Crecimiento de colonias después de 6 días: (+++) abundante, (++) moderado, (+) escaso y (-) nulo. El ensayo fue por triplicado.

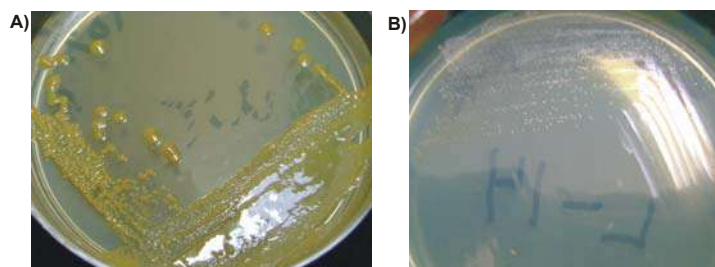


Figura 23. Morfología colonial de *G. diazotrophicus* en medio LGIP con sacarosa al 10% y 100 mM de NaCl. A) Cepa PAI 5 R; B) cepa L-14.

La morfología colonial de la cepa PAI 5 R fue diferente, las colonias formadas en sacarosa al 10% fueron más grandes y mucoides que las formadas en glucosa al 10%. Estas observaciones coinciden con lo reportado por Tejera *et al*, (2003). Las transformantes L-3, L-14 y L-24 también crecieron hasta 100 mM de NaCl y sacarosa, pero formaron colonias puntiformes, de diámetro aproximadamente de 0.5 mm, de dos a tres veces menor que el diámetro de la cepa PAI 5 R este crecimiento se debe probablemente a la hidrólisis de la sacarosa por la esterilización del medio (Figura 23). Al hidrolizarse algunas moléculas de sacarosa, liberan la glucosa y fructosa que son fuentes de carbono que pueden utilizar las cepas mutantes lo que puede explicar el poco de crecimiento en presencia de sacarosa (Tabla 9 y Figura 23B).

Para observar el crecimiento de las cepas de *G. diazotrophicus*, a diferentes concentraciones de NaCl y glucosa al 10% en medio LGIP semisólido en condiciones de fijación de nitrógeno (Figura 24). Las cepas de *G. diazotrophicus* L-3, L-14 y L-24 mostraron una disminución del crecimiento desde 50 mM de NaCl. Se observó la formación de una capa más delgada debajo de la superficie del medio para las mutantes (Figura 24B) respecto a la cepa PAI 5 R (Figura 24A), y se observó crecimiento hasta 200 mM bajo estas condiciones, por esta razón se analizó la osmotolerancia a mayores concentraciones. La figura 24 muestra lo observado para la cepa L-14, este ensayo se realizó con las tres cepas mutantes del gen *lsdA* obteniendo similares resultados. Para cuantificar el crecimiento bacteriano y observar si tiene una participación la función de la levansacarasa como se observa cualitativamente en la figura 24, se realizaron ensayos en medio líquido con sacarosa y glicerol y una dosis inicial de amonio como fuente de N.

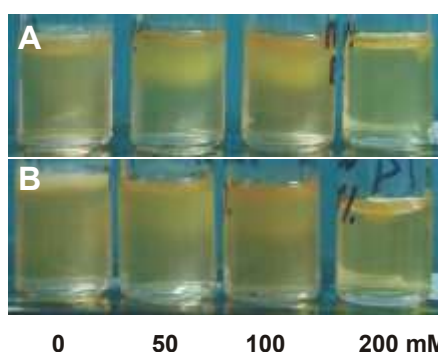


Figura 24. Tolerancia a NaCl con glucosa al 10% en medio LGIP semisólido. A) Cepa PAI 5 R; B) cepa L-14.

En presencia de NaCl *G. diazotrophicus* creció hasta 300 mM ($\Psi\pi = -1.838$ MPa), observando que desde 50 mM ($\Psi\pi = -0.712$ MPa) hubo una disminución de la tolerancia de las tres cepas mutantes del gen *lsdA*, pero a 200 mM ($\Psi\pi = -1.385$ MPa) hubo una disminución de tres órdenes de magnitud en el crecimiento de las cuatro cepas (Figura 25). La unidad de la presión osmótica ($\Psi\pi$) utilizada es megapascuales (MPa). El inciso A en las siguientes figuras representa un ensayo independiente que incluyen a la cepa silvestre PAI 5, la mutante espontánea a rifampicina PAI 5 R y la mutante de levansacarasa L-3. Estos experimentos se realizaron para comparar el comportamiento de la cepa PAI 5 con respecto a la cepa PAI 5 R y las mutantes generadas. El comportamiento de la cepa PAI 5 fue similar al comportamiento de la cepa PAI 5 R, esta última cepa es una mutante espontánea a rifampicina. Lo anterior demuestra que la mutación que confiere resistencia a rifampicina no afecta la osmotolerancia.

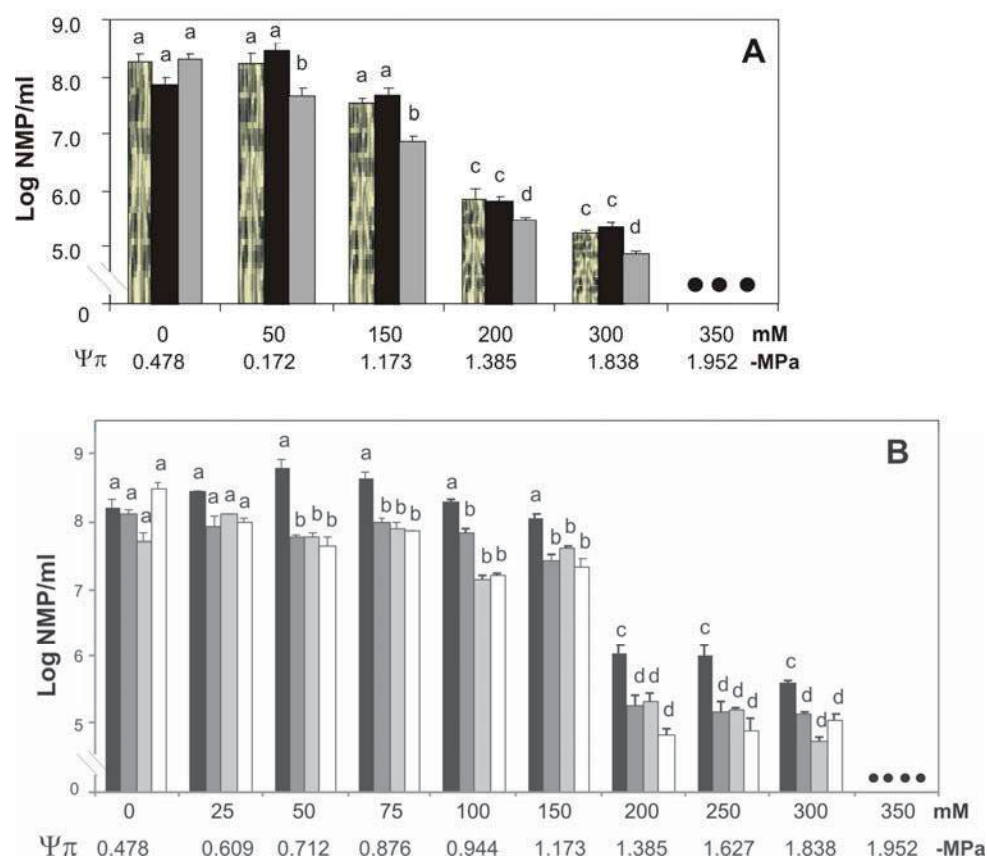


Figura 25. Osmotolerancia al NaCl en las cepas de *G. diazotrophicus*. A) Representa un ensayo independiente con las cepas PAI 5, PAI 5 R y L-3. B) Representa un ensayo independiente con las cepas PAI 5 R y las mutantes L-3, L-14 y L-24. Las barras de textura corresponden a la cepa PAI 5, las barras negras corresponden a la cepa PAI 5 R, las barras gris oscuro corresponden a L-3, las barras gris claro corresponden a L-14 y las barras blancas corresponden a L-24. Los círculos negros representan ausencia de crecimiento. $\Psi\pi$ es la presión osmótica. El ensayo es el promedio de tres replicas. Las barras de error simbolizan los errores estándar y las letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$, Tukey).

La osmotolerancia a polietilenglicol 400 (PEG 400) fue analizada por ser un compuesto no iónico, la bacteria es incapaz de utilizar esta sustancia como fuente de carbono y Hartmann *et al*, (1991) analizó el estrés osmótico inducido por diferentes concentraciones de PEG 400 bajo condiciones de fijación de nitrógeno. No se observaron diferencias en el crecimiento de las cepas PAI 5 R y las mutantes con las diferentes concentraciones analizadas. A partir de 400 mM ($\Psi\pi = -1.357$ MPa) de PEG 400, no fue posible detectar el crecimiento de ninguna de las cepas (Figura 26). Tampoco se observaron cambios en el crecimiento de la cepa PAI 5 con las diferentes concentraciones de PEG 400 (Figura 26A).

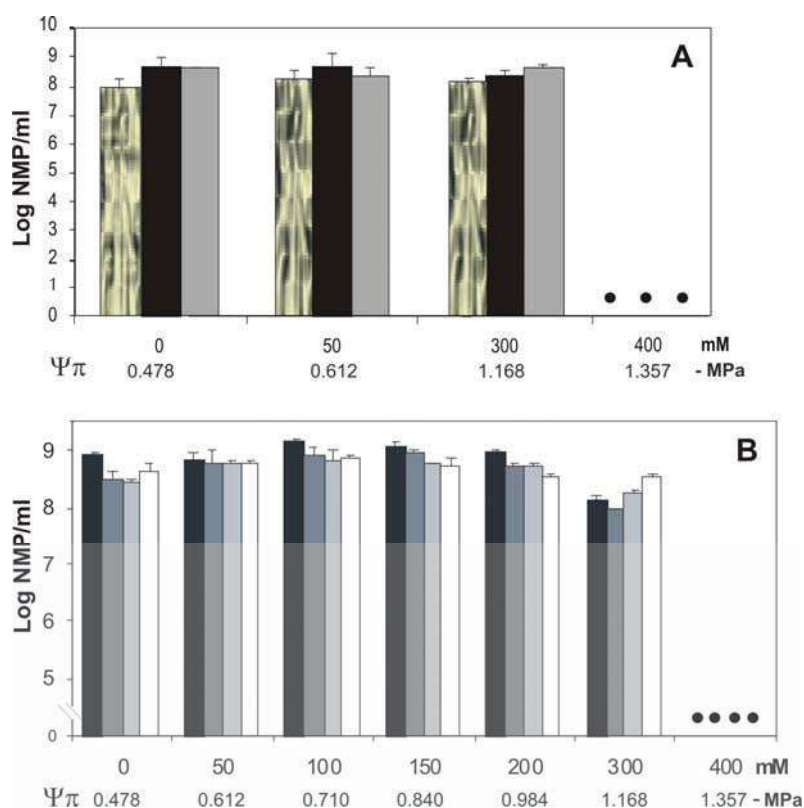


Figura 26. Osmotolerancia al PEG 400 en las cepas de *G. diazotrophicus*. A) Representa un ensayo independiente con las cepas PAI 5, PAI 5 R y L-3. B) Representa un ensayo independiente con las cepas PAI 5 R y las mutantes L-3, L-14 y L-24. Las barras de textura corresponden a la cepa PAI 5, las barras negras corresponden a la cepa PAI 5 R, las barras gris oscuro corresponden a L-3, las barras gris claro corresponden a L-14 y las barras blancas corresponden a L-24. Los círculos negros representan ausencia de crecimiento. Ψ_{π} es la presión osmótica. El ensayo es el promedio de tres replicas. Las barras de error simbolizan los errores estándar y las letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$, Tukey).

La osmotolerancia a sacarosa fue analizada debido a que era necesario examinar si la levansacarasa podría tener un participación esencial en la osmotolerancia a sacarosa, porque esta bacteria es osmotolerante a sacarosa (30%, Cavalcante y Döbereiner, 1988), y es el único mecanismo de *G. diazotrophicus* para catabolizar la sacarosa. La osmotolerancia a sacarosa fue analizada hasta potenciales osmóticos equivalentes a 30 % de sacarosa (876 mM; $\Psi_{\pi} = -3.607$ MPa) y se observó crecimiento hasta 900 mM ($\Psi_{\pi} = -3.685$ MPa), demostrando la tolerancia de esta bacteria a la sacarosa. La cepa L-3 presentó una disminución del crecimiento significativa a 876 mM y 900 mM (Figura 27). A pesar de que la cepa L-3 es incapaz de utilizar la sacarosa por la ausencia de la levansacarasa, ya que este es el único mecanismo para utilizar la sacarosa, la mutante aun crece en presencia de altas concentraciones de sacarosa (30%). La levansacarasa

participa en la osmotolerancia a la sacarosa a partir de 30% de sacarosa. Este ensayo solo se realizó para la cepa L-3.

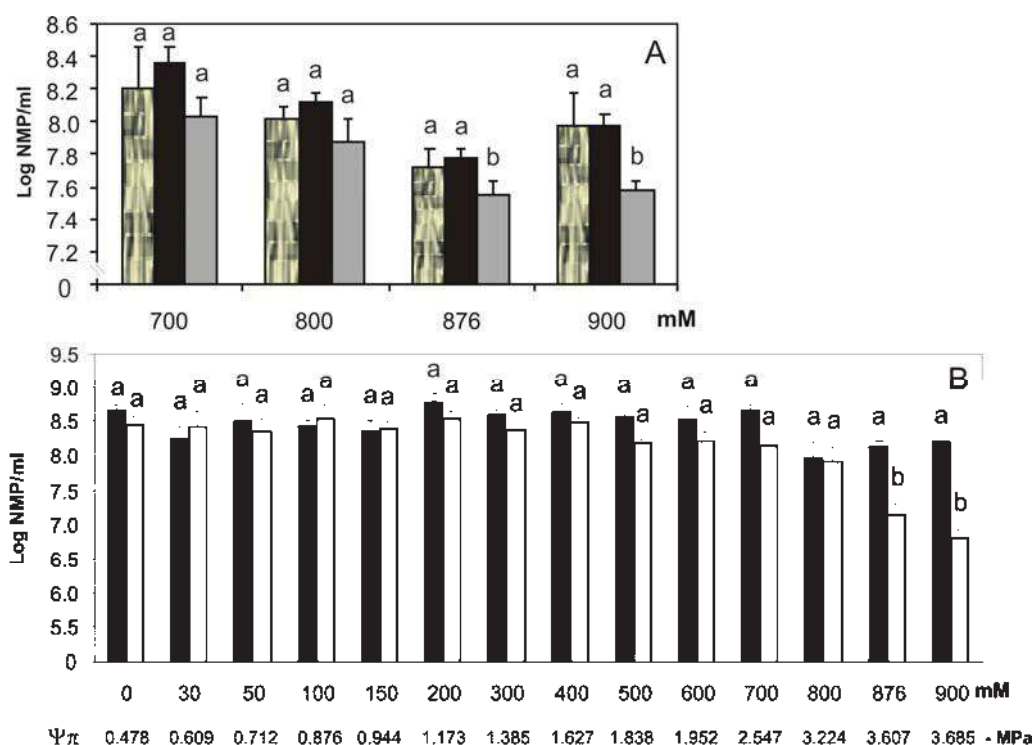


Figura 27. Osmotolerancia a la sacarosa en las cepas de *G. diazotrophicus*. A) Ensayo independiente con las cepas PAI 5, PAI 5 R y L-3. B) Ensayo independiente con las cepas PAI 5 R y L-3. Las barras de textura corresponden a la cepa PAI 5, las barras negras corresponden a la cepa PAI 5 R, las barras gris oscuro corresponden a L-3. $\Psi\pi$ es la presión osmótica. El ensayo es el promedio de tres replicas. Las barras de error simbolizan los errores estándar y las letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$, Tukey).

La desecación en las mutantes del gen *lsdA* fue analizada por que se ha relacionado a los disacáridos no reductores como la trealosa y la sacarosa, su participación en preservar la integridad de las membranas y proteínas (Potts, 1994).

En el ensayo de desecación se observó la disminución de la supervivencia desde las 18 h de desecación en las cepas mutantes L-3, L-14 y L-24 con respecto a la cepa PAI 5 R. A las 48 h de desecación disminuyó al 50% aproximadamente la supervivencia de las cepas mutantes L-3, L-14 y L-24 y a las 72 h ya no hubo crecimiento de estas cepas. A las 144 h ninguna de las cuatro cepas de *G. diazotrophicus* sobrevive (Figura 28). El mismo comportamiento presento la cepa PAI 5 y la cepa PAI 5 R en todos los ensayos analizados.

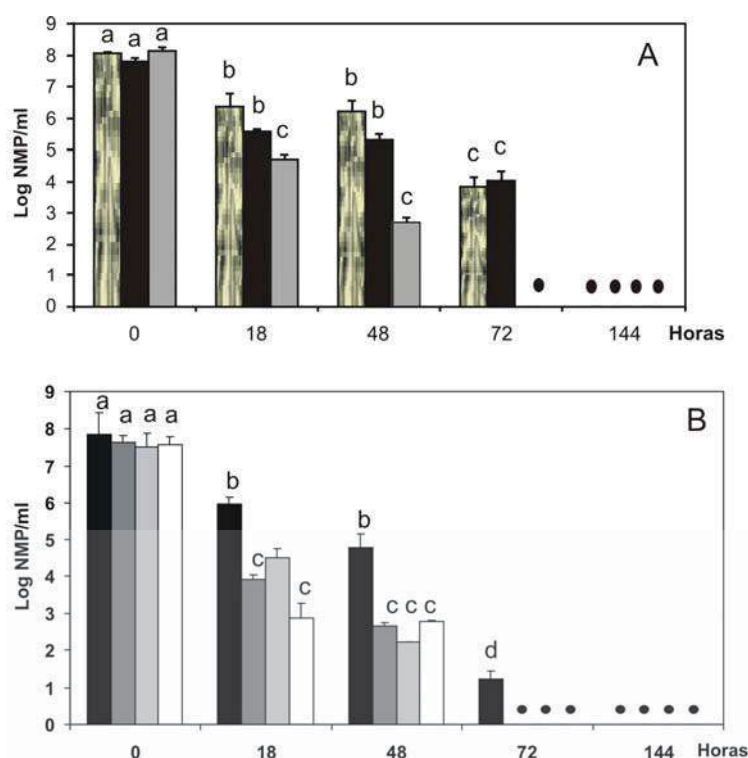


Figura 28. Supervivencia de *G. diazotrophicus* en condiciones de desecación. A) Representa un ensayo independiente con las cepas PAI 5, PAI 5 R y L-3. B) Representa un ensayo independiente con las cepas PAI 5 R y las mutantes L-3, L-14 y L-24. Las barras de textura corresponden a la cepa PAI 5, las barras negras corresponden a la cepa PAI 5 R, las barras gris oscuro corresponden a L-3, las barras gris claro corresponden a L-14 y las barras blancas corresponden a L-24. Las barras de error simbolizan los errores estándar y las letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$, Tukey). Los círculos negros representan ausencia de crecimiento. Las graficas representan el promedio de cuatro replicas.

La osmotolerancia a NaCl y a altas concentraciones de sacarosa y la supervivencia en condiciones de desecación se afectaron con la ausencia de la función de la levansacarasa en *G. diazotrophicus*. La levansacarasa tiene una participación en la adaptación al medio ambiente en esta bacteria.

8.2.4. Análisis de la formación de biopelícula en las cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

La capacidad de formación de biopelícula en superficies inertes se evaluó en las cepas PAI 5 R y las mutantes en el gen de la levansacarasa, ya que la presencia de EPS se ha descrito como un elemento básico de la biopelícula. La levansacarasa sintetiza el EPS levana, el cual puede participar en la formación de la biopelícula.

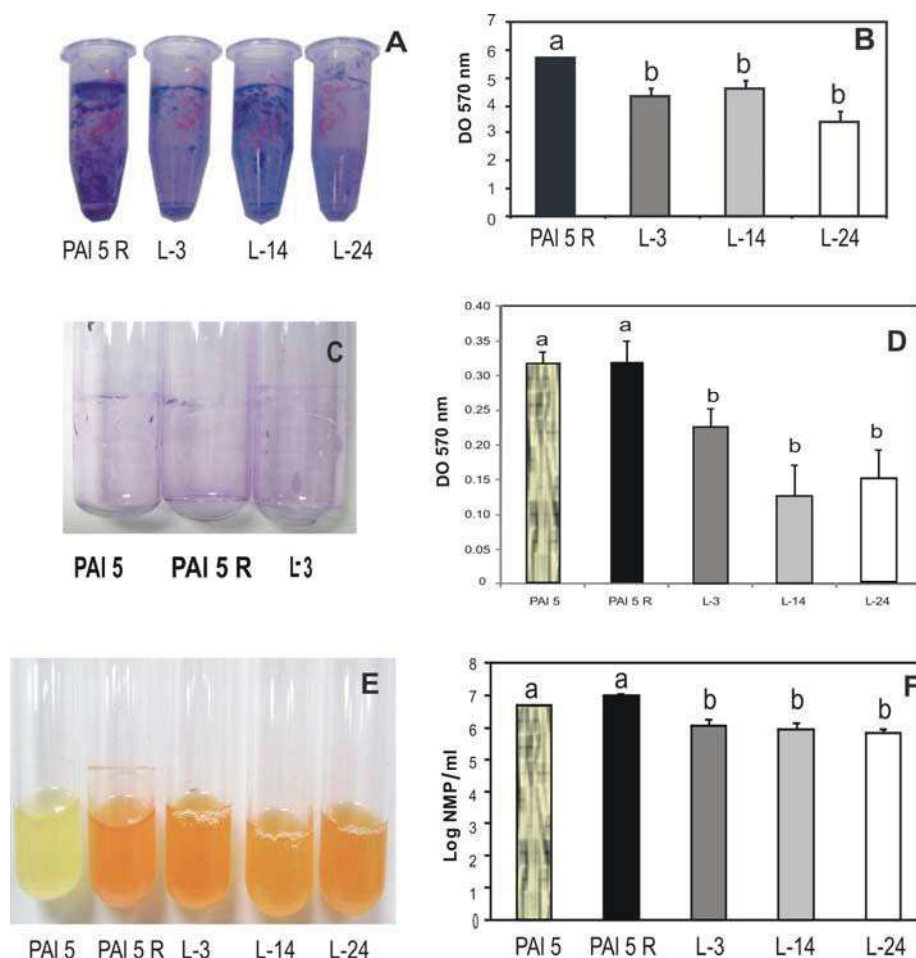


Figura 29. Formación de biopelícula por las cepas de *G. diazotrophicus*. Los cultivos de 72 horas en medio LGIE se decantaron y se tiñeron con cristal violeta 1% (A-D) o se cuantificó las bacterias con el método del NMP (E-F). A) Imagen de la tinción de la biopelícula en los tubos de polipropileno mantenidos sin agitación. B) Cuantificación de la biopelícula por DO₅₇₀. C) Imagen de la tinción de la biopelícula en los tubos de vidrio mantenidos con agitación. D) Cuantificación de la biopelícula por DO₅₇₀. E) Imagen de la formación de biopelícula en los tubos de vidrio mantenidos con agitación. F) Cuantificación de la formación de biopelícula por el método del NMP. La grafica representa el promedio de cuatro replicas. Las letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$; Tukey).

La formación de biopelícula en tubos de polipropileno sin agitación disminuyó en un 30% aproximadamente en las cepas mutantes del gen *lsdA*, L-3, L-14 y L-24 comparada con *G. diazotrophicus* PAI 5 R cuando se analizó con la tinción de cristal violeta (Figura 29A y 29B). La formación de biopelícula se analizó también en tubos de vidrio con agitación y se cuantificó con la tinción de cristal violeta. La biopelícula adherida al vidrio disminuyó en un 30% en las cepas mutantes L-3, L-14 y L-24 al compararlas con la cepa silvestre PAI 5 R (Figura 29C y 29D).

Para verificar que la disminución de la formación de la biopelícula en las cepas mutantes se debía a una disminución de la cantidad de bacterias que constituían la biopelícula, fue

necesario cuantificar las bacterias de la biopelícula. La cuantificación bacteriana en la biopelícula también demostró una disminución del 30% en las cepas mutantes al compararlas con la cepa PAI 5 R (Figura 29E y 29F).

En un ensayo utilizando matraces de vidrio también se observó la disminución de la formación de biopelícula en las cepas mutantes (Figura 5 del capítulo 8.1). De acuerdo a lo anterior, la levana tiene una participación en la formación de la biopelícula en estas condiciones.

8.2.5. Complementación del gen *lsdA* en la cepa L-3 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Solo se ha reportado la generación y caracterización de dos mutantes de *G. diazotrophicus*. La primera para la caracterización molecular del gen *lsdA*, la construcción de la mutante por interrupción del gen, usando una estrategia semejante a la reportada en este trabajo, y la subsecuente complementación de la mutación (Arrieta *et al*, 1996). La otra mutante fue en el gen *nifD* que codifica para la subunidad α de la proteína Fe-Mo que forma parte de la estructura de la nitrogenasa. Esta mutante fue generada por inserción de un casete de resistencia a kanamicina (*aph*) y el gen reportero *gus*. El gen *nifD* forma parte del operón *nifHDK* responsables de la fijación biológica de nitrógeno en *G. diazotrophicus*, las mutantes eran incapaces de fijar nitrógeno atmosférico (Sevilla *et al*, 1997). La mutante *nifD* fue inoculada en plántulas axénicas de caña de azúcar para analizar la participación de la fijación de nitrógeno en la promoción del crecimiento de la planta (Sevilla *et al*, 2001). En este último trabajo no se describe la complementación de la mutante del gen *nifD*, tal vez debido a la amplia caracterización previamente reportada de este gen.

Para demostrar que los efectos observados por la disrupción del gen *lsdA* no son debidos a los efectos polares sobre el gen de la levanasa (*lsdB*), codificado en el mismo operón, la cepa L-3 se complementó con el gen *lsdA* de *G. diazotrophicus*.

Amplificación del gen *lsdA*

Para amplificar el gen *lsdA* de *G. diazotrophicus* fueron diseñados los oligonucleótidos *lsdAf-lsdAr* (Tabal 1) con el programa DNASTAR PrimerSelect. Los oligonucleótidos *lsdAf-lsdAr* amplifican un fragmento de 2.7 kb que comprende la secuencia 3' inmediata al marco de lectura abierto del gen *speE*, el gen *lsdA*, y la secuencia 5'contigua al gen *lsdB* (Figura 3). Los

oligonucleótidos generaron más de un fragmento de amplificación en la reacción de PCR a pesar de los intentos para estandarizar la reacción de PCR. La temperatura óptima de alineamiento fue a 60.5°C (carril 4 en la Figura 30). Una reacción de PCR se realizó a 60.5°C y el fragmento de 2.7 kb fue aislado del gel de agarosa con el método de extracción con fenol (Ausubel *et al*, 1999).

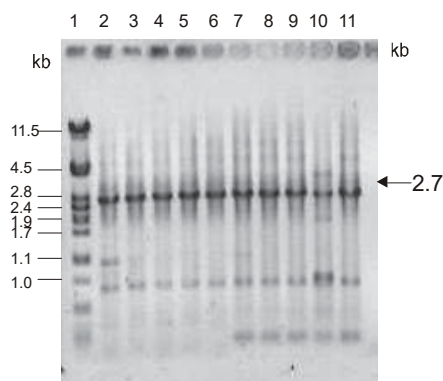


Figura 30. Amplificación por PCR del gen *lsdA*. Electroforesis del gel de agarosa al 0.8% teñido con SYBR-Safe. El carril 1 es el marcador de λ digerido con *Pst*I. Amplificación por PCR del gen *lsdA* con los oligonucleótidos *lsdAf-lsdAr*, los carriles del 2 al 11 son PCR con ADN de *G. diazotrophicus* PAI 5 R con un gradiente de temperatura de alineamiento que va de 55°C a 65°C. El marcador de tamaño molecular está indicado con líneas a la izquierda y el tamaño de los fragmentos obtenidos por amplificación está indicado con flechas a la derecha.

Transformación en *Escherichia coli* DH5 α

El fragmento de 2.7 kb fue clonado en el plásmido pBBR1MCS-3. El plásmido pBBR1MCS-3 fue seleccionado por ser un plásmido de amplio rango de hospedero, ser relativamente pequeño con 5.2 kb y confiere resistencia a tetraciclina (Kovach *et al*, 1995), un antibiótico al cual *G. diazotrophicus* es sensible (Ureta *et al*, 1995). Este plásmido se ha usado en bacterias cuyo hábitat es la planta (Ramey *et al*, 2004).

El fragmento de *lsdA* de 2.7 kb fue tratado con T4 DNA polimerasa para generar extremos romos y este fragmento se ligó al plásmido pBBR1MCS-3 que fue digerido con la enzima *Sma*I que también genera extremos romos. La ligación se realizó en una proporción molar de 5:1 entre fragmento de *lsdA* y el plásmido pBBR1MCS-3, y fue transformada en células competentes de *E. coli* DH5 α . La reacción de ligación generaría el plásmido pBBR1MCS-3-*LSDA* (Figura 31). Se realizaron varios ensayos de ligación y transformación sin obtener el fragmento de *lsdA* clonado en la cepa de *E. coli*, esto fue verificado con digestiones con enzimas de restricción y reacciones de PCR (datos no mostrados).

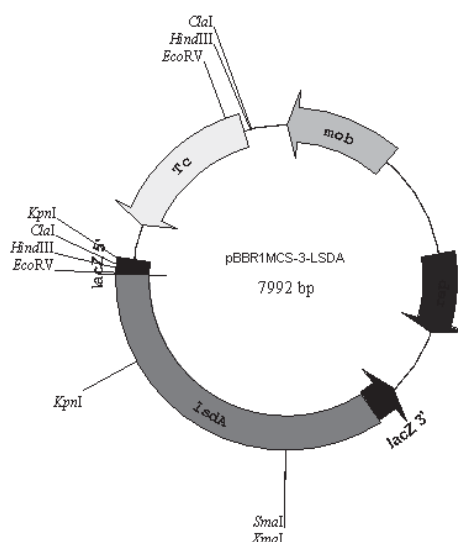


Figura 31. Mapa físico del plásmido pBBR1MCS-3-LSDA. El gen *lacZ* codifica el fragmento α de la β -galactosidasa y en el sitio *SmaI* tiene insertado el gen *lsdA* de 2.7 kb que codifica para la levansacarasa. El gen *rep* es el origen de replicación representado como una flecha negra en sentido de las manecillas del reloj, el gen *mob* que codifica para una proteína de movilización; el fragmento Tc confiere resistencia a tetraciclina. Las líneas indican algunos sitios de reconocimiento de endonucleasas.

Transformación en *Gluconacetobacter diazotrophicus* L-3

La reacción de ligación con el pBBR1MCS-3 y el fragmento 2.7 kb del gen *lsdA* en las células competentes de *E. coli* no generaron transformantes después de varios ensayos, así que se procedió a transformar directamente la reacción de ligación en células competentes de *G. diazotrophicus* L-3. La transformación de la reacción de ligación de pBBR1MCS-3 y el gen *lsdA* en *G. diazotrophicus* L-3 generó más de 40 transformantes, se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico de *G. diazotrophicus* utilizando una modificación de los protocolos reportados para *E. coli* (Birnboim y Doly, 1979) y no se observó ADN plasmídico. El ADN cromosómico que se obtuvo de las transformantes se analizó por reacciones de PCR con los oligonucleótidos *lskmu-lskml* (Figura 32). La cepa PAI 5 R generó un fragmento de 0.1 kb del gen *lsdA* (Figura 32 carril 5). Las transformantes generaron dos fragmentos, un fragmento de 0.1 kb del gen *lsdA* y otro de 1.4 kb que incluye los 100 pb del gen *lsdA* y el casete de resistencia a kanamicina (*nptII*) de 1.3 kb (Figura 32, carril 7). Estas transformantes se crecieron en medio LGIE con sacarosa durante 15 días a 30°C para observar la recuperación del fenotipo mucoso característico de *G. diazotrophicus* cuando tiene como fuente de carbono sacarosa.

La caracterización de la cepa complementada se presenta en el capítulo 8.1. Aquí se presenta algunos ensayos que se describen como no mostrados en el capítulo 8.1 relacionados con la complementación.

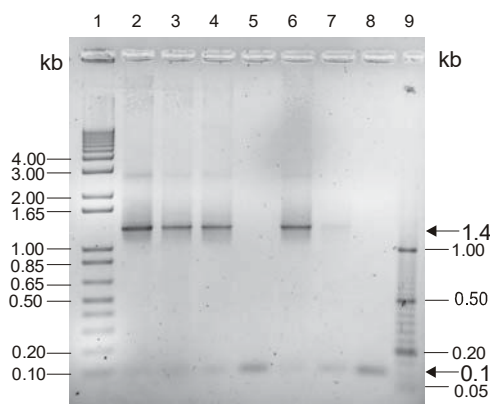


Figura 32. Amplificación por PCR con los oligonucleótidos *lskmu-lskml* en las transformantes obtenidas con el pBBR1MCS-LSDA. Electroforesis del gel de agarosa al 0.8% teñido con SYBR. El carril 1 es el marcador de λ digerido con *Pst*I. Los carriles del 2 al 4 son productos de PCR con ADN de las mutantes L-3, L-14 y L-24 respectivamente. El carril 5 productos de PCR de ADN de PAI 5 R. El carril 6 corresponde al plásmido pLSDA1.4::NPTII. El carril 7 es el producto de PCR del ADN de una cepa transformada con el pBB1MCS-LSDA. El carril 8 es el producto de PCR del ADN de la cepa PAI 5. El carril 9 representa el marcador de 50 pb. El marcador de tamaño molecular está indicado con líneas y el tamaño de los fragmentos obtenidos por amplificación está indicado con flechas a la derecha.

Nosotros seleccionamos la transformante C-19 por presentar el fenotipo mucoide en menor tiempo que las otras tres transformantes obtenidas que generaban el fenotipo mucoide en medio LGIE con sacarosa. Para verificar la identidad de la cepa C-19, debido a la diferencias fenotípicas entre las cepas PAI 5 R, L-3 y C-19, se realizó un PCR con oligonucleótidos específicos para el ARNr 16S de esta bacteria (Franke-Whittle *et al*, 2005) a partir de muestras de ADN de *G. diazotrophicus* PAI 5 R y las cepas L-3, L-14, L-24 y la transformante C-19, para identificar a la bacteria. En todas se obtuvo un fragmento único esperado de 0.913 kb (Figura 33). El fragmento amplificado de 913 pb corresponde al obtenido previamente en la figura 9 que fue secuenciado (Figura 10).

La transformante C-19 se creció en medio LGIE con rifampicina, tetraciclina y en presencia o ausencia de kanamicina. Además en la misma placa se inocularon las cepas PAI 5 R y L-3 observando la ausencia de crecimiento de estas dos últimas cepas debido a la presencia de tetraciclina (Figura 34). Esto nos indica que la transformante C-19 tiene el casete de resistencia a tetraciclina.

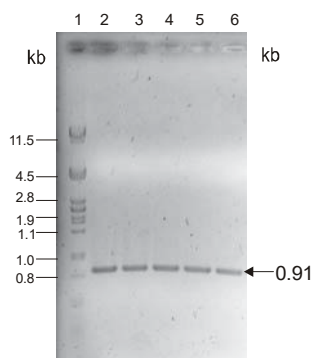


Figura 33 Amplificación por PCR del ARNr 16S específico de *G. diazotrophicus*. Electroforesis del gel de agarosa al 0.8% teñido con SYBR. Carriles: 1) Marcador de λ digerido con *Pst*I; 2) PAI 5 R; 3) L-3; 4) L-14; 5) L-24; 6) C-19.

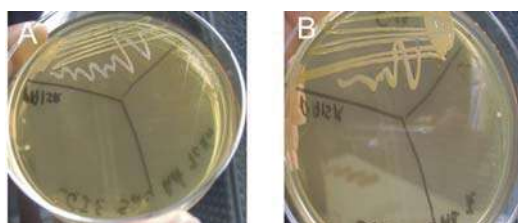


Figura 34. Crecimiento de las cepas de *G. diazotrophicus* en medio LGIE con tetraciclina. Medio LGIE sacarosa incubado a 30°C durante 7 días con tetraciclina. A, arriba de la caja transformante C-19, debajo se inocularon las cepas PAI 5 R y L-3 en presencia de kanamicina; B, arriba de la caja transformante C-19, debajo se inocularon las cepas PAI 5 R y L-3 en ausencia de kanamicina.

A las cepas de *G. diazotrophicus* PAI 5 R y la mutante L-3 y la cepa complementada se les realizaron curvas de crecimiento, para verificar que la velocidad de crecimiento no se afectó por la mutación y la complementación. La Figura 35 muestra una cinética de crecimiento con glucosa y una dosis inicial de amonio. El crecimiento en las cepas PAI 5 y L-3 fue similar entre ellas, pero el crecimiento de la cepa C-19 fue más lento ($\Delta DO = 0.007/h$) para alcanzar la fase estacionaria al compararlos con las cepas PAI 5 R y L-3 ($\Delta DO = 0.031/h$ y $\Delta DO = 0.027/h$, respectivamente) en el periodo de 20 a 45 h en la cinética de crecimiento. La interrupción del gen *lsdA* no afecta la velocidad de crecimiento en medio LGIP líquido con glucosa y la complementación afectó la velocidad de crecimiento en glucosa.

A la cinética de crecimiento de LGIP con glucosa se midió el pH a los mismos tiempos, observando una disminución del pH a las 20 h con valores 2.5 durante la fase exponencial e inicios de la fase estacionaria (Figura 35), esto se debe a que el metabolismo de glucosa genera ácido glucónico, y tal vez después es metabolizado como fuente de carbono en la fase exponencial media (después de 33 h) y por eso hay una recuperación del pH del medio de

cultivo. Sin embargo, la recuperación del pH a cerca de 5 fue más lento en la cepa C-19, por que estaba disminuido su crecimiento en ese periodo.

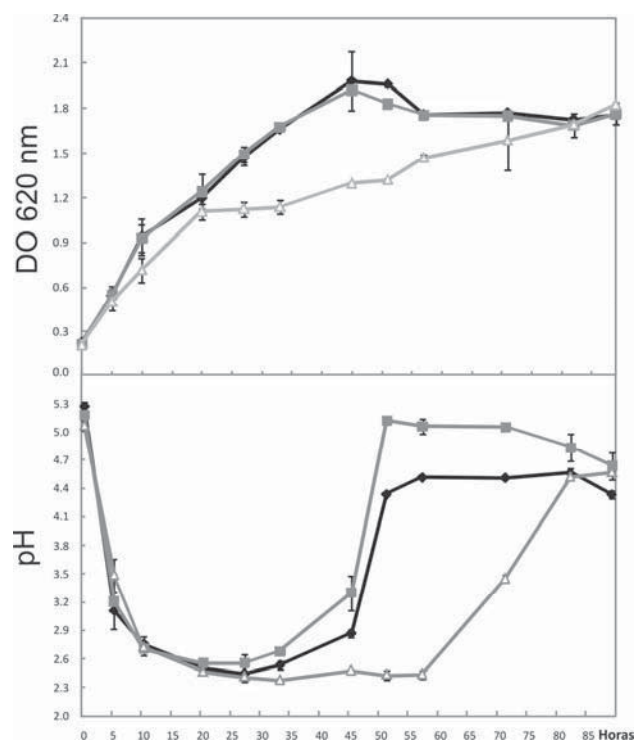


Figura 35. Cinética de crecimiento en glucosa. Las graficas representa el promedio de tres replicas de cada cepa. Las cepas de *G. diazotrophicus* son representadas por: PAI 5 R, ♦; L-3, ■; y C-19, △. Medio de cultivo fue LGIP con glucosa y sulfato de amonio 0.8 mM.

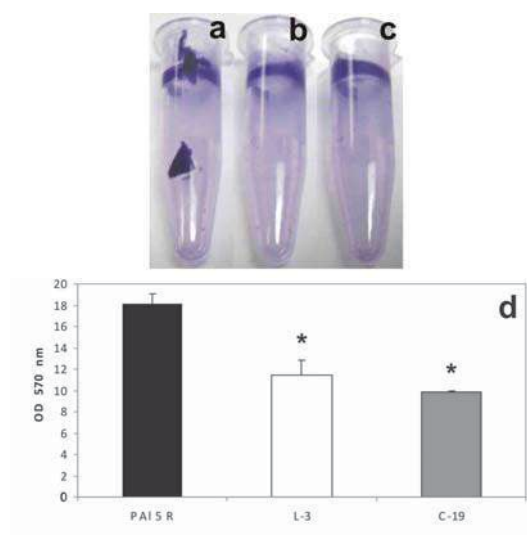


Figura 36. Formación de biopelículas en cultivo estático. a, PAI 5 R; b, L-3; c, C-19. Cuantificación de la biopelícula con cristal violeta. Los asteriscos indican diferencias significativas comparadas con PAI 5 R ($P < 0.05$, Tukey).

La formación de biopelícula en tubo de polipropileno en cultivos estáticos disminuyó en un 36.9% en la cepa L-3 al compararla con la cepa PAI 5 R. La cepa C-19 no recuperó el fenotipo de la formación de biopelícula en los tubos de polipropileno al compararla con la cepa PAI 5 R, su comportamiento fue similar al de la cepa L-3 bajo estas condiciones.

Los ensayos de tolerancia a factores abióticos y formación de biopelícula en matraces con agitación fueron mostrados en el capítulo 8.1 como parte del artículo enviado a la revista Archives of Microbiology.

8.3. Colonización de la caña de azúcar

8.3.1. Micropropagación de la caña de azúcar

La caña de azúcar alberga en su interior diferentes géneros bacterianos en simbiosis, entre ellos el endófito diazotrófico *G. diazotrophicus*. Para realizar los ensayos de infección con las diferentes cepas de *G. diazotrophicus*, se realizó la micropropagación de caña de azúcar, libre de microorganismos endófitos. Para la propagación vegetativa de la caña de azúcar se seleccionó la variedad MEX 57-473 porque se ha demostrado que la cepa PAI 5 de *G. diazotrophicus* tiene la habilidad de colonizar esta variedad de caña (Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado, 2003). La micropropagación se realizó a partir de dos estrategias distintas: la proliferación del meristemo de la yema apical o la obtención de callos a partir de los primordios foliares. Una vez que cada uno de los explantes produjo la proliferación de tejidos no diferenciados, se transfirieron a medio MP (Apéndice 14.1) para la formación de brotes. A partir de los brotes se generaron tallos que se cortaron y transfirieron a medio MR (Apéndice 14.1) para la formación de la raíz; la plántula completa se transfirió a medio de sales MS 50% (Apéndice 14.1; Figuras 37 y 38).

De la micropropagación a partir 10 explantes de meristemo apical se obtuvieron 23.8 ± 3.9 plántulas/explante y a partir de callos derivados de 10 explantes de hojas se obtuvieron 69.2 ± 8.6 plántulas/explante (los datos son mostrados con el cálculo del error estándar). Los mejores rendimientos de la micropropagación se lograron a partir de los primordios foliares. Por esta razón se procedió a propagar la caña a través de la obtención de callo.

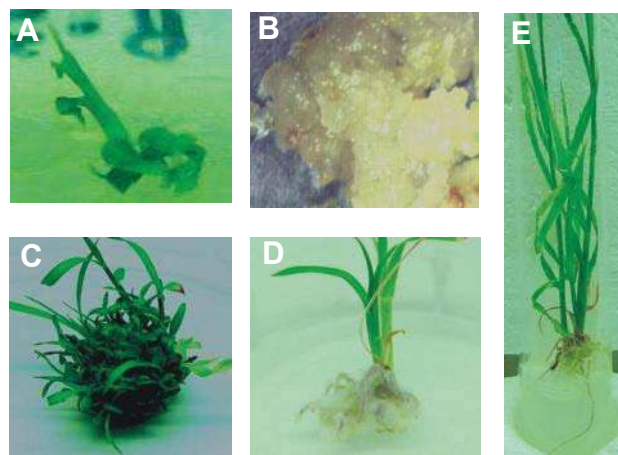


Figura 37. Micropropagación de la caña de azúcar variedad MEX 57-473 por medio de la generación de callos. Micropropagación a partir de primordios foliares como explante. A) Explante, B) generación de callo, C) generación de tallo, D) generación de raíz y E) plántula.

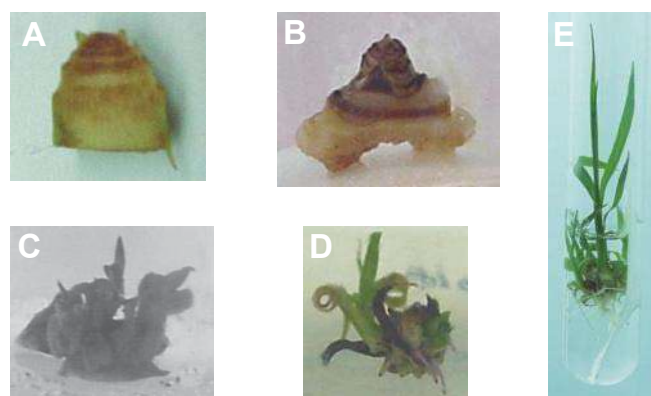


Figura 38. Micropropagación de la caña de azúcar variedad MEX 57-473 por medio de la generación de brotes. Micropropagación a partir de meristemo apical como explante. A) Explante, B) generación de brote, C) generación de tallo, D) generación de raíz y E) plántula.

Ya que se conoce que *G. diazotrophicus* coloniza el interior de raíces, tallos y hojas de la caña de azúcar, fue necesario verificar el carácter axénico de las plántulas obtenidas por ambos métodos de micropropagación (James y Olivares, 1997). Los macerados de diferentes tejidos de las plántulas regeneradas se inocularon en diferentes medios de cultivo específicos para *G. diazotrophicus* siguiendo el protocolo del NMP. El medio LGIE es un medio complejo y rico, que contiene glucosa, glicerol, extracto de levadura y triptona como fuentes de carbono y nitrógeno (ver apéndice 14.2). En medio LGIE, en el que *G. diazotrophicus* crece rápidamente en 3 días, a 30°C, no se observó crecimiento cuando se inocularon los macerados de la caña (Figura 39). En medio PDA no hubo crecimiento de *G. diazotrophicus* ni a partir de muestras de tallo, ni de muestras de hoja. También se inocularon los macerados en medio LB, donde se

observó la ausencia de crecimiento. Los medios de cultivo se dejaron incubando hasta 10 días a 30°C.

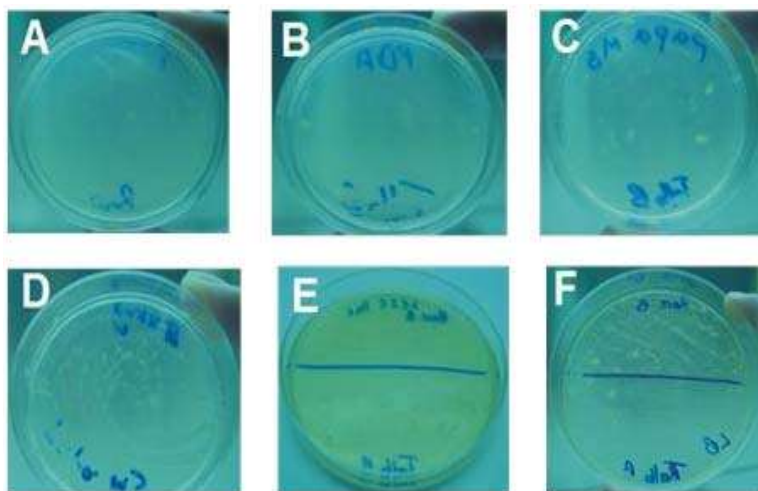


Figura 39. Macerados de las plántulas de caña de azúcar. Placas de PDA inoculadas con los macerados de raíz (A) y tallo (B); placas de medio Papa S inoculadas con tallo (C) y raíz (D); placa de LGIE (E) inoculada con macerados de raíz (arriba) y tallo (abajo); y placa de LB inoculada con los macerados de raíz (arriba) y tallo (abajo). Todas las placas se incubaron a 30°C durante 10 días.

La ausencia de crecimiento en los medios de cultivo demuestra que se obtuvieron plántulas axénicas por ambos métodos de micropropagación. Con ADN obtenido de estas plántulas también se analizó amplificar un fragmento del gen 16S de *G. diazotrophicus* (Franke-Whittle *et al*, 2005), el resultado que fue negativo (Figura 40). Con todo lo anterior se confirmó el carácter axénico de las plántulas de caña de azúcar obtenidas de la micropropagación.

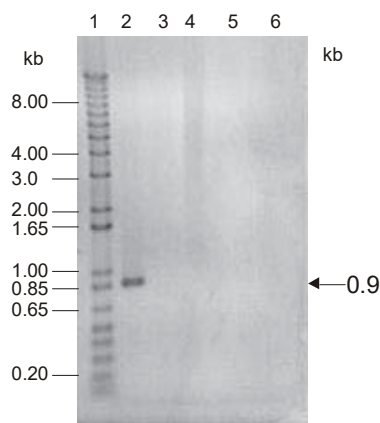


Figura 40. Amplificación por PCR del ARNr 16S específico de *G. diazotrophicus*. Electroforesis del gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. El carril 1 corresponde al marcador de 1 Kb; carril 2, PAI 5 R; carril 3, raíz de callo; carril 4, hoja de callo; carril 5, raíz de brote; carril 6 hoja de brote.

8.3.2. Colonización de la caña de azúcar con las cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

La colonización de la caña de azúcar se realizó con plántulas de aproximadamente un mes de edad debido a que a ese tiempo se ha reportado la formación de raíces secundarias en la caña (James y Olivares, 1997). Las raíces y las hojas fueron maceradas para la cuantificación de la bacteria por el método del NMP. La colonización de la caña de azúcar con las cepas de *G. diazotrophicus* PAI 5 R, L-3, L-14 y L-24 se dejó transcurrir hasta los 18 días, ya que James y Olivares, (1997) reportaron que *G. diazotrophicus* inoculada en raíz requiere de 15 días para poder ser aislada de las partes aéreas de las plántulas de caña de azúcar. La cinética de infección se realizó de 0 a 18 días con cuantificación de la bacteria a las 24 horas y posteriormente cada 5 días. La Figura 41 muestra la colonización de la caña a los 3 y 5 días posteriores a la infección donde se observó que no hubo diferencias en la colonización de la caña de azúcar por las cepas mutantes del gen *lsdA* con respecto a la cepa PAI 5 R. Aunque se observan diferencias en la colonización de la caña de azúcar entre la cepa PAI 5 R y las cepas mutantes L-3, L-14 y L-24 no son estadísticamente significativas.

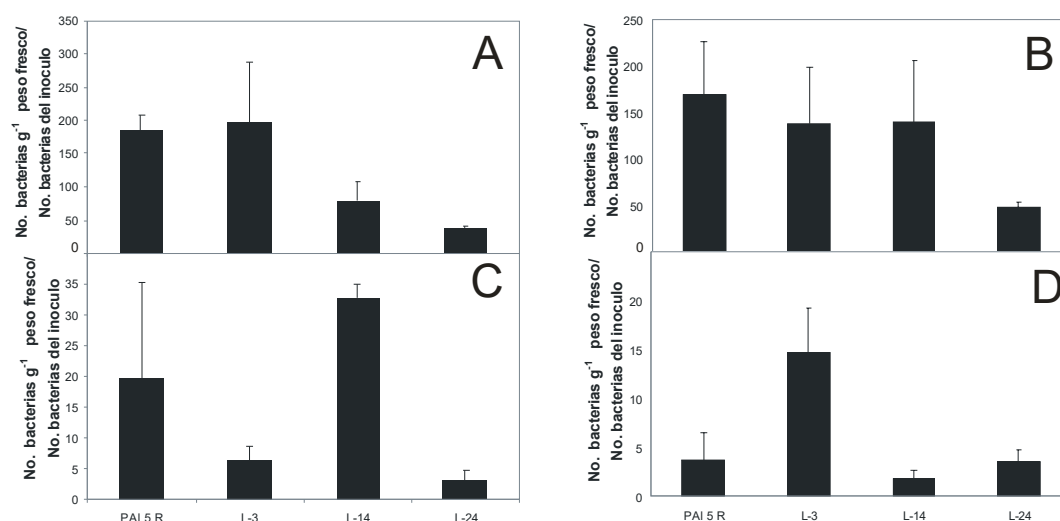


Figura 41. Colonización de la caña de azúcar por las cepas de *G. diazotrophicus* a los 3 y 5 días. Las plántulas fueron inoculadas con aproximadamente 10^8 NMP/ml de medio de cultivo. A y B colonización de la raíz; C y D colonización de la hoja. A y C representan 3 días posteriores a la infección; y B y D representan 5 días posteriores a la infección. Las barras de error representan el error estándar.

La colonización de la caña de azúcar no se afectó después de las 24 horas posteriores a la infección de la raíz por las cepas mutantes del gen *lsdA*, entonces se decidió analizar tiempos tempranos de la interacción, antes de las 24 h posteriores a la infección. En un ensayo de

infección de *G. diazotrophicus* en plántulas de frijol previamente irradiadas con luz UV, para incrementar la producción de metabolitos secundarios, se observó el incremento de 6.65 veces el número de bacterias asociadas a la raíz del frijol a las 4 h posteriores a la infección con la formación de agregados en los pelos radiculares y en las células del borde de la raíz similares a la formación de biopelícula (Trujillo-López *et al*, 2006).

La colonización de la caña de azúcar con las cepas PAI 5 R, L-3, L-14 y L-24 se analizó con ensayos de infección cuantificando las bacterias a las 4 y 24 h posteriores a la inoculación de la plántula debido a que a tiempos posteriores no se observaron cambios en la colonización de la caña de azúcar (Figura 42). Después de 4 horas de infección de la raíz de la caña de azúcar, el número de bacterias asociadas a la raíz de la caña de azúcar se incrementó seis y dos veces en la cepa silvestre PAI 5 R y las cepas mutantes de levansacarasa con respecto al inoculo, respectivamente. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$; Figura 42A). Cuando se analizaron las hojas hubo incrementos del 0.15 y 0.03 veces en la cepa PAI 5 R y mutantes con respecto al inoculo, respectivamente. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 42B).

A las 24 horas posteriores a la infección obtuvimos incrementos en la cantidad de bacterias con respecto al inoculo de cada cepa. Los incrementos fueron de 44 y 10 veces en la cepa PAI 5 R y las mutantes, respectivamente. (Figura 42C). La diferencia entre las bacterias que colonizaban la raíz con la cepa PAI 5 R y las cepas mutantes fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$). La colonización de las hojas a las 24 horas posteriores a la infección por las cepas PAI 5 R y las mutantes del gen *lsdA* no presentó diferencias estadísticamente significativas (Figura 42D).

También se realizaron ensayos de competencia entre la cepa silvestre PAI 5 R y la cepa mutante L-3 a las 4 horas posteriores a la infección. La colonización de la raíz de la caña de azúcar con la cepa L-3 en los ensayos de competencia no mostró diferencias significativas con la cepa silvestre PAI 5 R (Figura 43A). Sin embargo en los ensayos de colonización en la hoja no se recupera la colonización de la cepa L-3 con respecto a PAI 5 R en los ensayos de competencia (Figura 43B).

La colonización de la caña de azúcar también se analizó con la cepa complementada (Figura 44). La colonización de la caña a las 4 h posteriores a la infección se analizó con las cepas PAI 5 R, L-3 y C-19. La cepa C-19 complementada con el gen *lsdA* no recupera la colonización de la caña de azúcar ni en raíz ni en hojas al compararla con la cepa PAI 5 R (Figura 44). La colonización de la raíz fue similar entre la cepa L-3 y la cepa complementada C-19, sin embargo en hoja la colonización con la cepa C-19 es mucho menor que en las cepas PAI 5 R y L-3 (Figura 44).

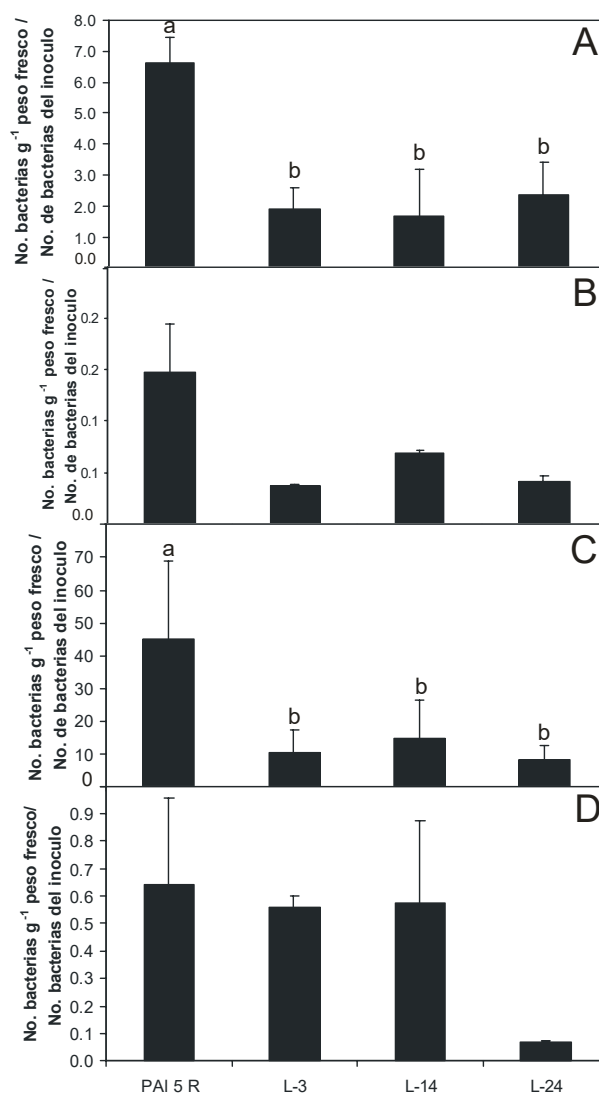


Figura 42. Colonización de la caña de azúcar por las cepas de *G. diazotrophicus* a las 4 y 24 horas. Las plántulas fueron inoculadas con aproximadamente 10^8 NMP ml^{-1} de medio de cultivo. A y B representan muestras colectadas 4 horas después de la adición del inoculo. C y D representan muestras colectadas después de 24 horas posteriores a la adición del inoculo. A y C son datos de colonización de la raíz, y B y D son datos de colonización de la hoja. Las barras de error representan el error estándar. Letras minúsculas diferentes representan diferencia significativa ($P < 0.05$; Student-Newman-Keuls).

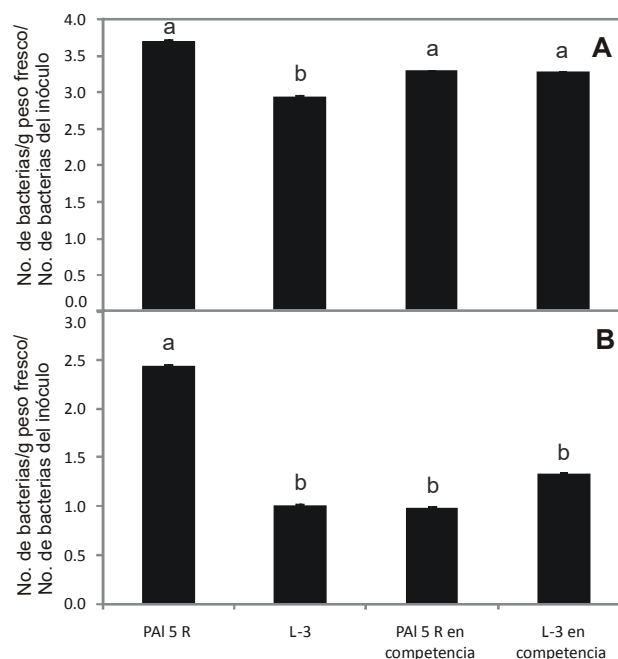


Figura 43. Colonización de la caña de azúcar con las cepas de *G. diazotrophicus* PAI 5 R y L-3 en competencia a las 4 h. Las plántulas fueron inoculadas con aproximadamente 10^6 NMP/ml de células bacterianas en 15 ml de medio de cultivo de la planta. Las barras de A representan muestras de raíz; y las barras de B representan muestras de hoja. Las barras de error representan el error estándar. Letras minúsculas diferentes representan diferencia significativa ($P < 0.05$; Student-Newman-Keuls).

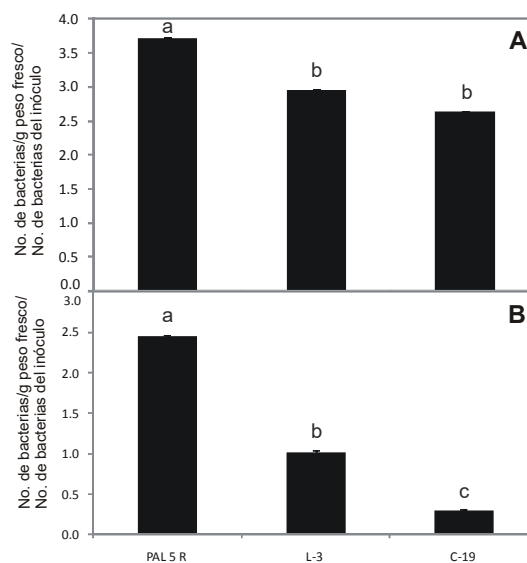


Figura 44. Colonización de la caña de azúcar con las cepas de *G. diazotrophicus* PAI 5 R, L-3 y C-19 a las 4 h. Las plántulas fueron inoculadas con aproximadamente 10^6 NMP ml^{-1} de medio de cultivo. Las barras de A representan muestras de raíz; y las barras de B representan muestras de hoja. Las barras de error representan el error estándar. Letras minúsculas diferentes representan diferencia significativa ($P < 0.05$; Student-Newman-Keuls).

8.4. Análisis del dominio catalítico de las fructosiltransferasas microbianas

Como parte del desarrollo de este proyecto y para tratar de comprender mejor el funcionamiento de la levansacarasa, se realizó un análisis de la estructura de los genes de fructosiltransferasas microbianas que incluyeron un análisis filogenético (Velázquez-Hernández *et al*, 2009, anexo 14.1) y la identificación de posibles motivos funcionales comunes y diferenciales en estas enzimas. En esta sección se presenta el análisis de los motivos funcionales y una propuesta de la evolución de los genes de las fructosiltransferasas derivada de dicho análisis. Las fructosiltransferasas microbianas incluyen las de bacterias, arqueas y hongos. De éstas, solamente se han caracterizado bioquímicamente 15 FTFs de diferentes géneros bacterianos (Velázquez-Hernández *et al*, 2009a, anexo). Sin embargo hay reportadas más de 80 secuencias de levansacarasa obtenidas de los proyectos de secuenciación de genomas de una gran variedad de bacterias, hongos y arqueas. Los EPS que se han identificado que producen las levansacarasa tienen estructuras diferentes y esto se debe a la sustitución de algunos aminoácidos en el dominio catalítico de las levansacarasa. El analizar las secuencias del dominio catalítico de las levansacarasa podría dar información de cómo han evolucionado e identificar las secuencias características que comparten los diferentes grupos filogenéticos.

Para este análisis se seleccionaron 82 secuencias de proteínas completas, 15 de ellas han sido analizadas bioquímicamente y las demás se han deducido de los marcos de lectura abiertos obtenidos de genomas secuenciados. Se escogieron secuencias de diferentes cepas bacterianas de los mismos géneros, secuencias identificadas como levansacarasa, inulosacarasa o fructosiltransferasas, y se incluyeron copias de las proteínas de la misma cepa, es decir, proteínas parálogas. A estas secuencias se les eliminaron los extremos amino y carboxilo terminal para solo dejar el dominio catalítico y realizar un alineamiento de secuencias, para posteriormente construir un árbol filogenético.

El dominio catalítico de las fructosiltransferasas microbianas es de aproximadamente 500 aminoácidos. La mayoría de las FTF de bacterias Gram negativas tienen en los extremos amino y carboxilo terminal pocos aminoácidos extras a la secuencia del dominio catalítico. Sin embargo, los extremos amino y carboxilo de las FTF de bacterias Gram positivas tienen secuencias de diferentes motivos de unión a pared celular entre otros y algunas FTF presentan

dominios amino o carboxilo terminal de hasta 500 aminoácidos con diferentes motivos integrados.

Al analizar el alineamiento de las secuencias se identificaron otros motivos diferentes a los reportados previamente en el dominio catalítico (van Hijum *et al*, 2006). Estos son representados en la Figura 45. La mayoría de motivos representados están conservados entre los miembros de la familia de glucosilhidrolasas 68 (GH68) a la cual pertenece las levansacarinas (EC 2.4.1.10), las inulosacarinas (EC 2.4.1.9) y las fructofuranosidasas (EC 3.2.1.26). Varios motivos conservados entre las fructosiltransferasas presentaron similitud con β -fructosidasas (EC 3.2.1.153 y EC 3.2.1.154), o invertasas (EC 3.2.1.26), las cuales pertenecen a la familia de glucosilhidrolasas 32 (GH32). Ambas familias de GH se han agrupado en el clan GH-J (Henrissat y Bairoch, 1993; Lammens *et al*, 2009), estas familias se caracterizan por tener dominios catalíticos con 5 hojas en arreglo espacial de β -propela y tres aminoácidos ácidos conservados en el sitio activo. Los aminoácidos son Asp de los motivos VWDSW y RDP, el Glu del motivo DEIDER, descritos como la triada catalítica y son imprescindibles para la unión del sustrato y catálisis de estas enzimas.

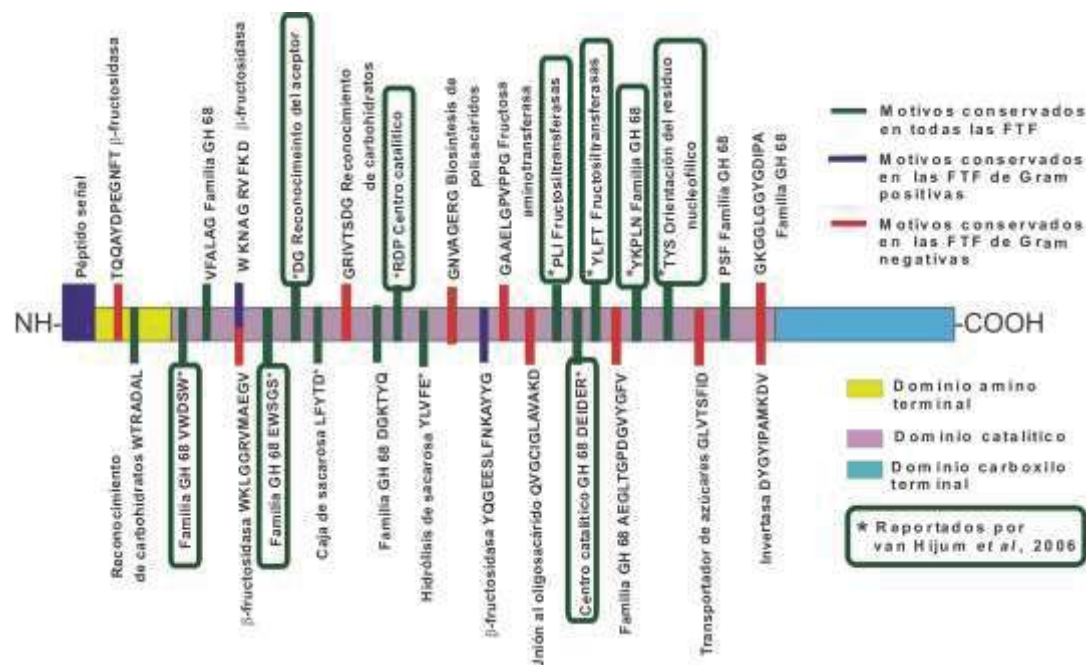


Figura 45. Representación de los motivos conservados entre las fructosiltransferasas microbianas. NH representa el extremo amino-terminal y COOH el extremo carboxilo-terminal de las proteínas.

Un motivo interesante para las inulosacararas es el que contiene la secuencia LFYTR. Solo en las inulosacararas se encuentra una Arg (R358, *Lactobacillus reuteri*) en este motivo, las levansacararas presentan un Asp (D181, *Bacillus subtilis*), Cys (C166, *Pseudomonas syringae* pv) o Ala (A213, *Burkholderia* spp). A la fecha no se han reportado mutaciones puntuales en este aminoácido que pudieran soportar la hipótesis de que este residuo está involucrado en conferir el tipo de enlace al fructano. Sería interesante demostrar si la sustitución de éste aminoácido afecta la especificidad de la fructosiltransferasa, generando inulina o levana como productos.

El dominio catalítico de las 82 secuencias seleccionadas de FTF se utilizó para la construcción de un árbol filogenético (Figura 46). Nosotros seleccionamos el método de Máxima Parsimonia para la elaboración del árbol filogenético, porque, es un método que considera que la divergencia de las secuencias es baja como es de esperarse en el dominio catalítico, el método es útil para un numero de aminoácidos grande, y asume que los cambios de aminoácidos ocurren en todas direcciones (Neir y Kumar, 2000).

Las FTF se agruparon en tres ramas que corresponden a las FTF de las bacterias Gram negativas (Figura 46, grupo *i* que incluye los grupos A, B y C), el grupo que integran las FTF de bacterias Gram positivas (Figura 46, grupo *ii* que incluye los grupos D y E), y el grupo F representado por las FTF de los hongos del genero *Aspergillus* y de dos proteínas bacterianas *Paenibacillus polymyxa* y *Arthrobacter aurescens*. *Oceanicola granulosus* es una bacteria Gram negativa, una α -proteobacteria aislada de ambientes marinos. El análisis la colocó como un grupo externo a las demás FTF y su secuencia es la más pequeña de todas las enzimas, ya que solo abarca el dominio catalítico de las FTF y conserva los motivos del dominio catalítico (Tabla 2 del anexo 13.1). Previamente se construyó un árbol filogenético con la secuencia completa de las mismas proteínas (Figura 2 del Anexo 13.1); en ese árbol la FTF de *O. granulosus* se ubicó entre los grupos de las FTF bacterianas y las FTF de hongos. La proteína FTF de *O. granulosus* probablemente sea equivalente a la secuencia mínima funcional con actividad de FTF.

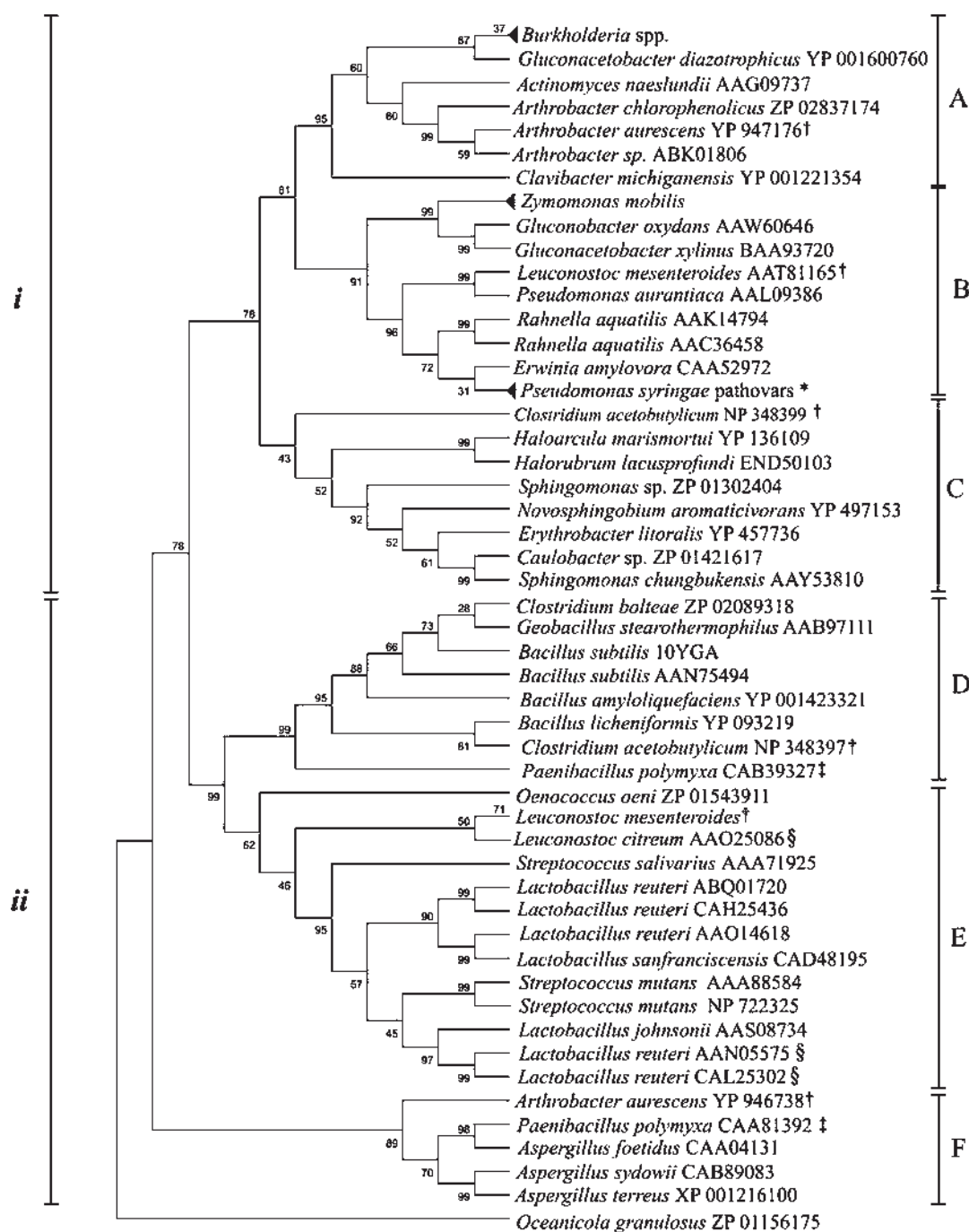


Figura 46. Análisis filogenético del dominio catalítico de las fructosiltransferasas microbianas. El análisis fue con el método de Máxima Parsimonia, en el programa MEGA 4. Los números en los nodos indican el porcentaje de bootstrap de 1000 replicas. Las secuencias están representadas por el nombre de los microorganismos y el número de acceso al GenBank de la proteína. Las ramas con más de tres proteínas de la misma especie fueron comprimidas y están integradas por las siguientes secuencias: *Burkholderia* spp., ZP01502250, EAY65004, ZP01564363, ZP01553422, ABO57793, YP440066, EDK82978, ABN00553, ABN94007, ABN86027, CAH38000, YP337253, YP623958, ABI91660, ZP02099713, ZP02113195; *Zymomonas mobilis* BAA04475, AAA27702, AAV88998; *Pseudomonas syringae* patovares YP277079, AAZ36063, AAZ38051, AAC36063, AAZ37865; YP235184, YP233850, NP791279, NP792124, NP808690; y *Leuconostoc mesenteroides* AAY19523, YP818875, YP818876, YP818877. *, proteínas parálogas; †, proteínas parálogas en diferentes grupos filogenéticos; ‡, proteínas ortólogas en diferentes grupos filogenéticos; §, inulosacarasas.

Las FTF se agruparon con base a su origen filogenético formando seis grupos designados de la A-F. El grupo A lo integran principalmente actinobacterias, una alfaproteobacteria y una betaproteobacteria. El grupo B está formado por las levansacarasa de distintas gammaproteobacterias, *Zymomonas mobilis*, dos acetobacterias y una secuencia de Firmicutes. El grupo C lo integran microorganismos de los grupos Alfaproteobacterias, firmicutes y dos arqueas. El grupo D lo forman firmicutes de los órdenes Bacillales y Clostridiales. El grupo E lo integran proteínas de levansacarasa e inulosacarasa de la orden Lactobacillales.

El último grupo lo formaron levansacarasa de hongos del genero *Aspergillus* y dos de origen bacteriano de los géneros *Arthrobacter aurescens* y *Paenibacillus polymyxa*. Las proteínas parálogas de la Figura 46 corresponden a dos a tres copias del gen de levansacarasa en el cromosoma de *Pseudomonas syringae*, donde una enzima se localiza en el citosol y las otras son extracelulares. La Figura 46 tiene la rama de *Pseudomonas* comprimida para facilitar la visualización del árbol, en la Figura 47 se presenta esta rama expandida con las 10 proteínas de levansacarasa. La Figura 47 muestra que las proteínas de los patovares de *P. syringae* se separan en dos ramas principales, en una de ellas se agruparon las tres proteínas de *P. syringae* pv *tomato* de la cepa DC3000, en la otra rama se agruparon dos proteínas de *P. syringae* pv *phaseolicola* de la cepa 1448. Las proteínas de *P. syringae* pv *syringae* y otras del pv *phaseolica* se dividieron entre las dos ramas principales del grupo de *Pseudomonas*. A pesar de que la identidad de estas proteínas es de más del 90%, las levansacarasa de estos patovares se dividen en dos grupos, esto tal vez se deba a diferencias en su localización en la célula bacteriana. Está reportado para algunas cepas de *Pseudomonas* que las levansacarasa intracelulares son inactivas mientras que las periplásmicas o extracelulares son funcionales (Li y Ullrich, 2001).

Otras proteínas consideradas parálogas por que presentan en sus genomas dos copias del gen de levansacarasa son las bacterias *Arthrobacter aurescens*, y *Clostridium acetobutylicum* ya que se agruparon en diferentes grupos del árbol filogenético. Además se agruparon levansacarasa de diferentes cepas de la misma especie en distintos grupos filogenéticos: *Paenibacillus polymyxa* y *Leuconostoc mesenteroides* (Figura 46). Las secuencias entre los motivos descritos en la Figura 45, forman bloques de secuencias de aminoácidos que están directamente distribuidos con la formación de los grupos en ambos arboles filogenéticos, si se

analizaran estas regiones tal vez ayudarían a inferir como evolucionaron estas secuencias y ayudaría a explicar porque se agrupan en diferentes ramas del árbol filogenético.

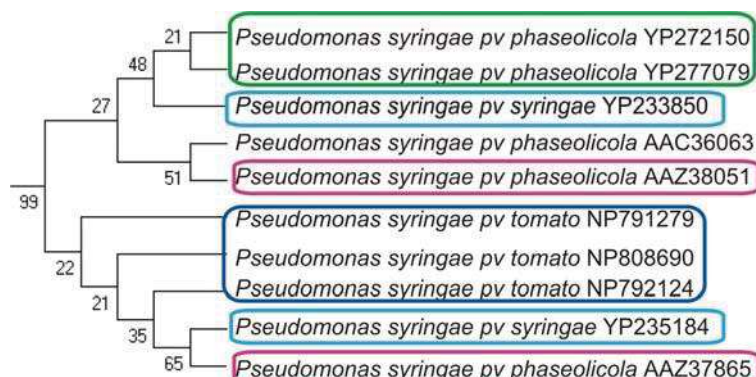


Figura 47. Rama de las proteínas de levansacarasa de *Pseudomonas* del análisis filogenético del dominio catalítico de las fructosiltransferasas microbianas. Rama expandida del árbol filogenético de la figura 44. Los rectángulos del mismo color representan proteínas que pertenecen a la misma cepa de *Pseudomonas*.

Tratando de relacionar los motivos de las FTF se muestra un esquema de como pudo haberse integrando cada motivo en el proceso evolutivo de las FTF (Figura 48). En las FTF de Gram negativas casi no hay diferencias en sus secuencias, solo el caso de la levansacarasa de *G. diazotrophicus* que tiene péptido señal en su extremo amino-terminal (Figura 48).

En cambio, entre las FTF de las Gram positivas hay gran variedad de motivos en los dominios amino y carboxilo terminal pertenecientes a la Clase *Bacilli*. La bacteria *O. granulosus* solo contiene la secuencia correspondiente al dominio catalítico de las FTF, *B. subtilis* es otra secuencia proteica pequeña entre las Gram positivas, ya que la mayoría de estas tienen varios motivos extras en el dominio carboxilo terminal. Todas las FTF de Gram positivas tienen péptido señal en el extremo amino-terminal y en el carboxilo-terminal tienen motivos de unión a pared celular o unión a glucanos, principalmente (Figura 48). A pesar de que comparten motivos de unión a glucanos estos tienen diferentes secuencias de aminoácidos entre algunas cepas bacterianas. La inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* que tiene dominios de enzimas relacionadas con la síntesis de otros carbohidratos como la alternansacarasa.

Las FTF del genero *Streptococcus* en el extremo carboxilo terminal tienen un número similar de aminoácidos que las FTF del genero de *Lactobacillus* y algunos aminoácidos similares en los correspondientes motivos de unión a glucanos pero ya no presentan esta función, probablemente la función de estos motivos se perdió en estas proteínas con la evolución.

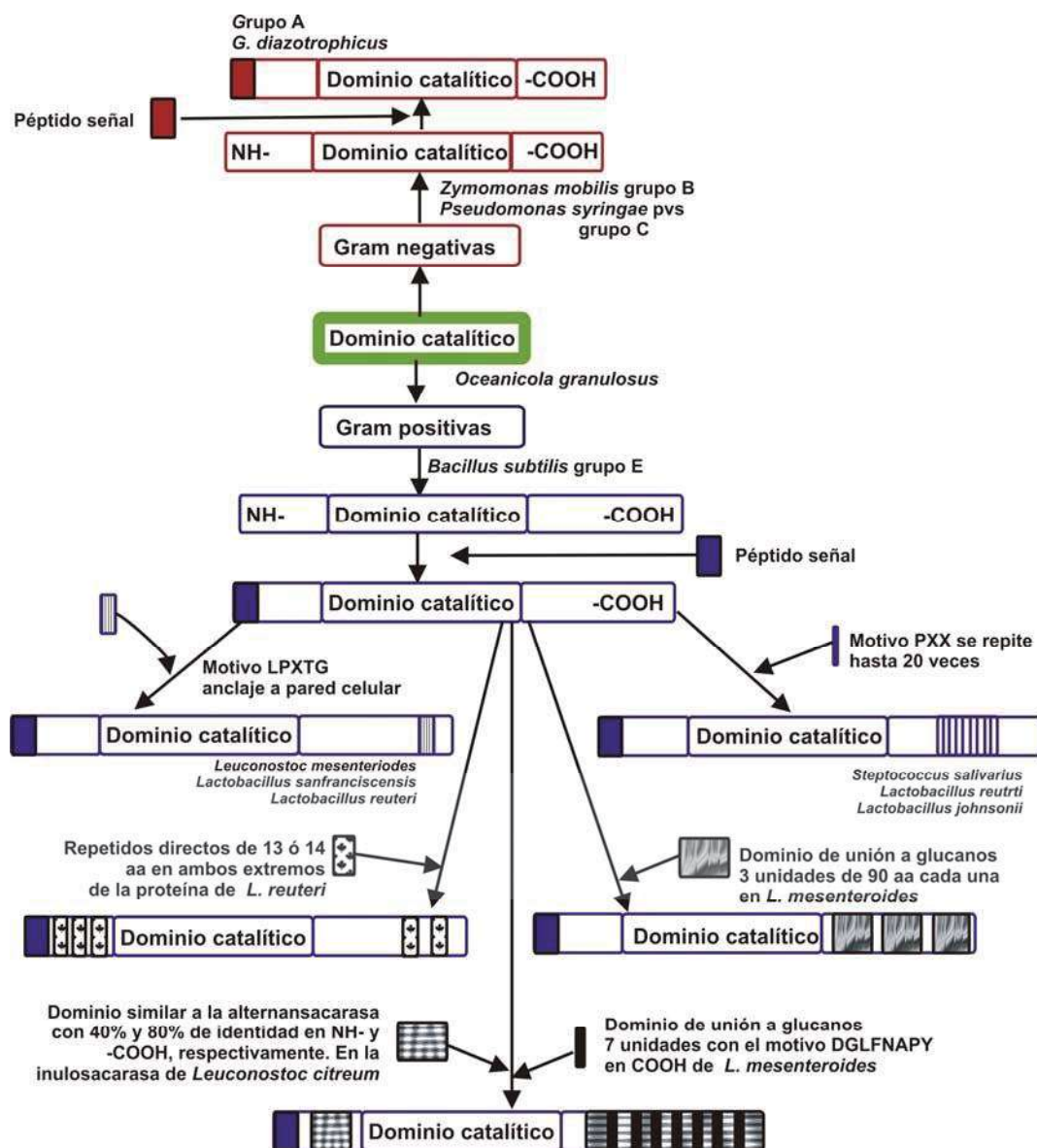


Figura 48. Análisis de los diferentes motivos en los dominios carboxilo y amino terminal en algunas levansacarinas. Las levansacarinas de bacterias Gram positivas están representadas en violeta y las levansacarinas de Gram negativas están en rojo. Cada motivo con función distinta está representado con diferente textura.

Este análisis de secuencias proteicas nos muestra la variedad potencial de FTF en los diferentes géneros bacterianos adaptados a diferentes tipos de hábitat. Sería interesante explorar la función de las FTF en algunas de estas bacterias para analizar la participación de las FTF en la adaptación al medio ambiente, como se ha demostrado en algunos otros modelos bacterianos.

9. DISCUSIÓN GENERAL

La colonización de bacterias endófitas en plantas es afectada por una gran variedad de factores bióticos y abióticos; entre los factores bióticos están la variedad de la planta, la cepa bacteriana, la densidad del inóculo y la presencia de otros endófitos (Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado, 2003; Sturz *et al*, 2000). Los factores abióticos más comunes son la temperatura, el potencial osmótico del hábitat, los compuestos químicos que liberan las plantas, tales como iones, enzimas, aminoácidos, mucilagos, ácidos orgánicos, carbohidratos, compuestos fenólicos y otros metabolitos secundarios de la planta (Somers *et al*, 2004). La bacteria también secreta una gran variedad de sustancias como fitohormonas, sustancias que favorecen o inhiben el desarrollo de otros microorganismos, iones o sales, enzimas, proteínas y exopolisacáridos, principalmente (Vessey, 2003). Algunas de las sustancias antes mencionadas participan en la adaptación de la bacteria a su medio ambiente o en su interacción con otros organismos o microorganismos.

La mutante del gen *lsdA* de *G. diazotrophicus* forma colonias carentes del fenotipo mucoide. La ausencia del fenotipo mucoide debido a la mutación del gen de levansacarasa se ha reportado previamente en *Streptococcus mutans*, *Erwinia amylovora*, *Paenibacillus polymyxa* y *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* (Schroeder *et al*, 1989; Geier y Geider, 1993; Bezzate *et al*, 2000; y Li y Ullrich, 2001). La participación de los fructanos en la actividad de la nitrogenasa en *G. diazotrophicus* se desconoce, pero en los reportes de ensayos relacionados con la participación del EPS se observa una disminución de la actividad de la nitrogenasa. Dong *et al*, (2002) midieron la actividad de la nitrogenasa en colonias bacterianas después de 7 días de incubación a 30°C. En este tiempo la colonia bacteriana ya perdió su estructura por la producción de EPS. Esto se reflejó en la disminución de la actividad de la nitrogenasa, lo cual se atribuyó al aumento de la difusión de oxígeno en la colonia bacteriana, porque la barrera que formaba la capa de EPS sufrió una disrupción física y esto aumentó la difusión de oxígeno. Esto sugiere que la ausencia de los fructanos de *G. diazotrophicus* podrían afectar la actividad de la nitrogenasa en las cepas *lsdA*.

La ausencia de la levana disminuyó la fijación de nitrógeno, tal vez por el aumento de difusión de oxígeno en la célula como lo sugiere Dong *et al*, (2002), o la disminución de glucosa disponible ya que este monosacárido es liberado por la hidrólisis de la sacarosa y

utilizado como fuente de carbono por la bacteria, ya que se ha reportado que la FBN es un proceso demandante de mucha energía para la célula bacteriana (Fischer 1994) y la glucosa puede participar en la generación de energía para la FBN.

9.1. La levansacarasa y el metabolismo del carbono

La levansacarasa hidroliza la sacarosa y libera glucosa que participa en el catabolismo bacteriano como fuente de energía, y la fructosa la utiliza para sintetizar nistosa, cestosa y levana en el medio extracelular.

El catabolismo de la glucosa es principalmente por las enzimas PQQ-GDH, la NAD-GDH y la glucocinasa (Figura 1). Tejera *et al*, (2004) midieron la actividad de NAD-GDH en extractos bacterianos con los sustratos de glucosa y sacarosa, observaron que había un aumento de dos órdenes de magnitud en la actividad de NAD-GDH con sacarosa en comparación con glucosa como sustrato. La disminución del crecimiento de las cepas *lsdA*⁻ en presencia de glucosa, quizá se deba a que la ausencia de la función de la levansacarasa limita la disponibilidad de glucosa para la enzima NAD-GDH periplásmica pero no para transporte y catabolismo, por que esta reportado una mayor concentración de NAD-GDH en condiciones de fijación de nitrógeno. La glucosa liberada por la hidrólisis de la sacarosa probablemente es transferida directamente a la NAD-GDH bajo condiciones de fijación de N, debido a que en la FBN hay una gran demanda de energía en la bacteria (Fischer 1994). La energía puede ser adquirida de la glucosa liberada por la levansacarasa.

El glicerol en *G. diazotrophicus* puede ser transformado a glucosa a través de cuatro enzimas, la glicerol-fosfato deshidrogenasa, la fructosa bifosfatoaldolasa, la fructosa bifosfatasa y la glucosa 6-fosfato isomerasa produciendo glucosa-6-fosfato y participar en la ruta de pentosas fosfato, que es otra ruta importante para el catabolismo de esta bacteria (Figura 1). No se conoce el mecanismo por el cual el glicerol induce la actividad de la levansacarasa, sin embargo nosotros observamos una disminución del crecimiento bacteriano en los viales de glicerol bajo condiciones de fijación de N en las cepas *lsdA*⁻. El azúcar estándar es una mezcla de varias sustancias entre ellas esta la glucosa, entonces la disminución del crecimiento en azúcar estándar bajo condiciones de fijación de N en las cepas *lsdA*⁻, se puede explicar también por el catabolismo de la glucosa.

En medio LGIP con sacarosa y glicerol las cepas PAI 5 R y *lsdA*⁻ crecen a la misma velocidad, esto se debe posiblemente a la semejanza en la eficiencia para respirar ambas fuentes de carbono (Tejera *et al*, 2004). La cepa PAI 5 R tal vez este utilizando preferentemente la sacarosa y después el glicerol, este proceso de uso secuencial de fuentes de carbono se denomina represión catabólica. La represión catabólica del carbono se ha reportado en varios géneros bacterianos (Deutscher 2008).

9.2. Levansacarasa y tolerancia al estrés osmótico.

G. diazotrophicus es una rizobacteria en el café y el ragi, donde está expuesta a una gran variedad de iones y sales que disminuyen la actividad del agua y estas condiciones generan un estrés osmótico. No se conocen los mecanismos que regulan la osmoadaptación a iones de Na⁺ y Cl⁻ en *G. diazotrophicus*. Una relación entre levansacarasa y estrés osmótico por NaCl de forma indirecta ya se ha documentado en *Bacillus subtilis*. En presencia de NaCl se induce la expresión del gen que codifica para la levansacarasa a través del sistema de dos componentes DegS-DegU (Kunst y Rapoport, 1995), lo que sugiere que este gen esté involucrado en la osmotolerancia a NaCl. La disminución de la osmotolerancia a NaCl en cepas *lsdA*⁻ no se ha reportado en otros géneros bacterianos

El crecimiento de *G. diazotrophicus* hasta 100 mM de NaCl fue previamente reportado por Tejera *et al*, (2003). La osmotolerancia en condiciones de fijación de N en medio semisólido se analizó en medio LGIP, bajo estas condiciones observamos crecimiento hasta 200 mM. En ensayos de *G. diazotrophicus* con 128 mM de NaCl observaron la disminución de la actividad de la nitrogenasa con 1% de sacarosa (Reis y Döbereiner, 1998). Tal vez la disminución a la osmotolerancia a NaCl esté relacionada con la ausencia de la levana que regula la difusión de oxígeno en la bacteria y esto afecte la actividad de la nitrogenasa. La disminución de la FBN en bacterias por estrés osmótico generado por NaCl ha sido reportado en la rizobacteria *Bradyrhizobium japonicum*, donde la nodulación fue inhibida completamente con 210 mM de NaCl, por que los pelos radiculares se deforman en presencia de NaCl, y se sabe que estos son esenciales para la colonización de *Rhizobium* (Tu, 1981).

La tolerancia al NaCl por bacterias que colonizan plantas varia ampliamente, en *Rhizobium japonicum* su crecimiento se inhibió con 100 mM de NaCl; mientras, *Rhizobium meliloti* tolera hasta 700 mM de NaCl (Yelton *et al*, 1983; Mohammmand *et al*, 1989). La osmotolerancia en rizobacterias, se debe a que la mayoría de las rizobacterias utilizan los solutos compatibles

como glicina betaina y prolina como mecanismos de osmoregulación (Csonka and Hanson, 1991).

Otro osmolito que se utilizó fue el PEG. El PEG de diferentes grados de polimerización se ha utilizado para la cristalización y precipitación de proteínas por medio de la exclusión estérica. Esto ocurre desde concentraciones de 10% de PEG (Bhat and Timasheff, 1992). El PEG 400 a concentraciones mayores a 400 mM tal vez desestabiliza termodinámicamente a las proteínas de las células de *G. diazotrophicus*, causando su precipitación y la muerte de la bacteria. Esto se ha demostrado cuando la adición de PEG al medio de cultivo puede suprimir la abertura de canales de iones y alterar la K_m de la hexocinasa en presencia de glucosa (Wood, 1999). Por lo tanto la estructura y función de las proteínas responden al estrés osmótico causado por ciertos cosolventes.

Se ha reportado que *G. diazotrophicus* tolera hasta un 30% de sacarosa (876 mM), y se desconocen las respuestas osmoregulatorias para la sacarosa (Cavalcante and Döbereiner, 1988), la formación de levana puede ser parte de estos mecanismos a altas concentraciones de sacarosa. La levana y/o la sacarosa podrían funcionar como osmoprotectores no acumulables debido a que no son transportados al interior de la célula, entonces se acumulan en el medio extracelular y funcionar como un osmoprotector no compatible al inducir la síntesis de solutos compatibles en el citoplasma de la bacteria. Esto se ha demostrado que sucede con *Sinorhizobium meliloti* (Gouffi *et al*, 1999).

La adaptación al hábitat depende de varios factores, la bacteria debe generar diferentes respuestas osmoregulatorias. Entre ellas el transporte del Na^+ , este ión es transportado al interior del citoplasma a través de canales de Na^+ y antiportadores Na^+/H^+ en bacterias. En el caso de sacarosa, levana y PEG 400 no son transportados al citoplasma bacteriano, así que los mecanismos osmoregulatorios para estos osmolitos pueden ser diferentes de los mecanismos activados para el NaCl. Bertalan *et al*, (2009) secuenciaron el genoma de *G. diazotrophicus*, ellos reportaron la presencia de genes que codifican para el transporte de glicina betaina, iones, di y tripéptidos y el sistema de dos componentes EnvZ-OmpR, estos sistemas relacionados con la osmotolerancia son conocidos en otras bacterias que no son osmotolerantes a sacarosa. Así que *G. diazotrophicus* puede utilizar otros sistemas para la osmoregulación de la sacarosa.

9.3. Levansacarasa y la tolerancia a la desecación.

La levana es un fructano que es soluble en agua, esto sugiere que la levana sintetizada por la levansacarasa podría atrapar en su matriz una gran cantidad de moléculas de agua que le brindan a la bacteria una mayor supervivencia en condiciones de desecación. La información de la participación de los fructanos en la desecación de bacterias es escasa. Sin embargo en plantas, fue reportado que los fructanos brindan resistencia al estrés por frío y desecación (Vijn and Smeekens, 1999; Pilon-Smits *et al*, 1995). Vereyken *et al*, (2003) demostró que las moléculas de fructanos se insertan entre los grupos cabeza de los fosfolípidos de las membranas con fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilcolina (PC), estabilizando la membrana y conservando el libre movimiento de las cadenas de ácido graso. Tal vez, este mecanismo también sucede en las membranas de *G. diazotrophicus* con la levana, ya que se ha reportado PC en membranas de acetobacterias, y ambos fosfolípidos PE y PC son componentes de las membranas de bacterias asociadas a plantas (Hanada *et al*, 2001; López-Lara *et al*, 2003; Vereyken *et al*, 2003). Recientemente fue secuenciado el genoma completo de *G. diazotrophicus* PAI 5 (Bertalan *et al*, 2009) y tiene los genes que codifican para los fosfolípidos PE y PC, así que probablemente la inserción de la levana entre estos fosfolípidos favorezca la tolerancia de la bacteria en condiciones de desecación.

9.4. La levansacarasa en la formación de biopelícula

Otro aspecto importante de los EPS es su participación en la formación de biopelícula, ya que estos son considerados el andamio de una biopelícula madura (Dunne, 2002). Existen reportes de la participación de la levana en la formación de biopelícula en las bacterias *P. syringae* y *S. mutans* (Laue *et al*, 2006; Rozen *et al*, 2004). En *P. syringae* utilizaron una mutante en la producción de levana y analizaron su participación en la biopelícula con microscopia confocal de barrido observando la disminución de formación de biopelícula. En *S. mutans* analizaron diferentes fuentes de carbono detectando la presencia de FTF en la biopelícula con anticuerpos dirigidos contra la enzima y en presencia de sacarosa. En la formación de biopelícula en *G. diazotrophicus* también participa un flagelo (Rouws *et al*, 2008), lo cual explica por qué la mutación del gen *lsdA* no elimina totalmente la formación de la biopelícula. La mutación en una proteína flagelar codificada por el gen *flgA*, generó la ausencia del fenotipo móvil en la bacteria y la disminución de la formación de biopelícula. En *G. diazotrophicus* los EPS de la levansacarasa y los flagelos participan en la formación de

biopelículas. *G. diazotrophicus* sintetiza otros EPS ricos en manosa a las 70 h de incubación, estos forman parte de la capsula que pueden participar en la formación de biopelícula (Stephan *et al*, 1995). Recientemente fue secuenciado el genoma de *G. diazotrophicus* PAI 5 (Bertalan *et al*, 2009), entre los genes identificados están los relacionados con la síntesis de glucanos. Los glucanos son otros EPS que se han relacionado con la síntesis biopelícula como se demostró con *Lactobacillus reuteri* (Walter *et al*, 2008). El glucano y la inulina producidos por *L. reuteri* participan en la colonización del tracto gastrointestinal del ratón al formar parte de la biopelícula y generar agregados bacterianos. Sería interesante investigar la posible participación de otros EPS en la formación de biopelícula en *G. diazotrophicus*. La formación de biopelícula en *G. diazotrophicus* tal vez está participando en la tolerancia a estrés osmótico y desecación, porque la biopelícula se caracteriza por brindar tolerancia a estas condiciones de crecimiento, esto se ha reportado en *Pseudomonas putida*. La biopelícula de *P. putida* formada por alginato brinda tolerancia al estrés osmótico y la desecación (Chang *et al*, 2007).

9.5. La levansacarasa en la colonización de la caña de azúcar

La presencia de EPS se ha relacionado con la adaptación al hábitat (Schroeder *et al*, 1989; Geier and Geider, 1993; Bezzate *et al*, 2000; Li and Ullrich, 2001). La levana producida por la levansacarasa puede tener una participación en la adaptación al medio ambiente y en la colonización de la caña de azúcar. Además en el interior de la caña de azúcar se pueden presentar concentraciones de sacarosa de aproximadamente 350 mM (~12%, Zhu *et al*, 1997) y la bacteria puede utilizar la sacarosa solo por medio de la acción hidrolítica de la levansacarasa. Por lo tanto, la colonización de la caña de azúcar podría estar afectada en las cepas *lsdA*⁻.

La mutación del gen *lsdA* de *G. diazotrophicus* disminuyó la colonización de las raíces de la caña de azúcar a las 4 y 24 horas posteriores a la infección, es decir, durante las primeras horas de interacción entre la bacteria y la planta. Desde las primeras horas de interacción entre las bacterias y las plantas se ha reportado la participación de ambos organismos, como en el modelo *G. diazotrophicus* y el frijol. Plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Flor de mayo-bajío) con 5 días de germinación fueron tratadas con luz UV para inducir la producción de metabolitos secundarios, posteriormente fueron infectadas con *G. diazotrophicus*, y a las 24 horas post-infección se cuantificó la bacteria que colonizaba las raíces del frijol. La colonización bacteriana se incrementó 5.6 veces en la raíz, y se detectó la producción de compuestos de tipo flavonoides (Trujillo-López *et al*, 2006). La biosíntesis de flavonoides en

plantas se ha reportado que sucede desde las primeras horas de exposición a un estímulo (Lawton *et al*, 1983).

En las interacciones bacteria-planta también se ha analizado la participación de la bacteria. Por ejemplo en el modelo planta-*Pseudomonas fluorescens* se identificó la expresión de 20 genes bacterianos durante la colonización de la rizósfera, estos relacionados con la respuesta a estrés, adquisición de nutrientes, secreción, formación de biopelícula, y síntesis de fitohormonas y antibióticos (Rainey, 1999). En el modelo *Streptomyces coelicolor*-planta identificaron en la bacteria la producción de proteínas relacionadas con la adquisición de nutrientes y adaptación a estrés (Langlois *et al*, 2003). Los dos ejemplos anteriores relacionan al ARNm o las proteínas bacterianas específicas con la respuesta a estrés y formación de biopelícula durante la colonización de la planta. Nosotros analizamos el crecimiento de la bacteria en condiciones de estrés osmótico, desecación y la formación de biopelícula y en estrés osmótico se afectó el crecimiento bacteriano, la supervivencia en los ensayos de desecación y la disminución de la formación de biopelícula en las cepas *lsdA*⁻, puede existir una relación de la disminución de la tolerancia a condiciones de estrés y la disminución de la colonización de la caña de azúcar.

Los ensayos *in vitro* donde se demostró una disminución de la osmotolerancia, desecación y formación de biopelícula sugieren que puede haber un efecto de la adaptación de la bacteria sobre la colonización de la caña de azúcar. La levansacarasa es considerada como un factor de virulencia en interacciones de bacterias patógenas (Li and Ullrich, 2001; Geier and Geider, 1993; Schroeder *et al*, 1989). La ausencia de la levansacarasa en *G. diazotrophicus* disminuye la colonización de las raíces, pero no en hojas. La disminución de la colonización en raíz puede estar directamente relacionada con la disminución de la formación de biopelícula, probablemente afectando la etapa de maduración de la biopelícula, porque es donde se acumulan los EPS para estabilizar la biopelícula.

La levansacarasa participa en la tolerancia a condiciones de estrés osmótico, desecación y formación de biopelícula con la consecuente disminución de la colonización de la raíz de la caña de azúcar durante las primeras horas de interacción. La función de la levansacarasa es multifactorial en la interacción con la caña de azúcar. La participación de la levana como bloqueador del reconocimiento bacteriano tal vez no sea la principal función de la levana en

estas interacciones. La formación de biopelícula (brindando tolerancia a estrés osmótico y desecación) para la adaptación al hábitat puede ser tal vez más importante durante la colonización. La biopelícula en el interior de la caña de azúcar a *G. diazotrophicus* le brindaría mayor tolerancia a las condiciones de estrés osmótico debido a las altas concentraciones de sacarosa en la caña. Previamente se han tomado imágenes de *G. diazotrophicus* colonizando el exterior o el interior de la caña de azúcar y otras plantas donde se describe la formación de una región clara en la microscopía electrónica de transmisión que rodea las células bacterianas o una sustancia que une o recubre varias células bacterianas en la microscopía electrónica de barrido. Dong *et al* (1994) presenta imágenes de la colonización del apoplasto por colonias en la caña de azúcar consideradas microcolonias. James *et al* (2001) muestra una micrografía electrónica de células de *G. diazotrophicus* colonizando el metaxilema de la caña de azúcar, donde las células bacterianas están rodeadas por un halo transparente. Youssef *et al* (2004) muestra micrografías electrónicas donde se observa la presencia de *G. diazotrophicus* en los vasos del xilema de la raíz del trigo y estas bacterias están rodeadas por una sustancia mucoide. Trujillo-López *et al* (2006) observaron la formación de agregados bacterianos en los pelos radiculares del frijol infectado con *G. diazotrophicus*, y la formación de un mucigel que rodeaba a las células del borde de la raíz. Probablemente estos productos deriven de la secreción de las células de la raíz en combinación con productos secretados por la bacteria. Estas sustancias que rodean a *G. diazotrophicus* en cada ensayo pueden estar formadas por la levana ya que la levansacarasa es una proteína extracelular (Hernández *et al*, 1995) y formar parte de la biopelícula que se pueda establecer en el interior de la caña de azúcar cuando es colonizada por *G. diazotrophicus*.

Kasapis *et al*, (1994) sugiere que la levana bacteriana en las interacciones planta-bacteria funciona como una sustancia que bloquea el reconocimiento entre estos microorganismos como lo demostró en un ensayo *in vitro*, la planta no reconoce a la bacteria por la presencia de la levana como una barrera entre ambos. En los ensayos de colonización de la caña de azúcar no fue posible observar algún tipo de respuesta de defensa por parte de la planta ante la presencia de las cepas mutantes deficientes en levansacarasa. Dentro de los alcances de este trabajo, no es posible refutar ni confirmar la hipótesis de que la levansacarasa constituye una barrera contra los sistemas de defensa de la planta.

En las plantas se ha reportado la presencia de enzimas fructano exohidrolasas (FEH) las cuales degradan los extremos de fructanos liberando la unidad de fructosilo terminal usando el agua como aceptor, estas FEH se sintetizan en algunas plantas que no tienen la maquinaria proteica para sintetizar fructanos. En plantas como *Arabidopsis thaliana* y en la remolacha (*Beta vulgaris*) se han identificado la actividad de FEH y estas plantas no sintetizan ningún tipo de fructano (van den Ende *et al*, 2004). Las FEH en estas plantas pueden tener la función de defensa contra las bacterias que infecten estas plantas y degradar la capa de levana que recubre la bacteria. Hasta el momento no se sabe si la caña de azúcar sintetiza FEH, por que podría ser el mecanismo que utilizaría la planta para permitir la colonización de *G. diazotrophicus* además de representar una fuente de energía con la liberación de fructosas.

9.6. La levansacarasa en la cepa complementada C-19

El gen que codifica para la levansacarasa (*lsdA*) y el gen de la levanasa (*lsdB*) fueron clonados *Pichia pastoris* porque se acumulaban en el citoplasma estas proteínas en *Escherichia coli* (Menéndez *et al*, 2004, Trujillo *et al*, 2001). Las proteínas acumuladas en el citoplasma pueden causar un desequilibrio osmótico y esto puede ser tóxico para la célula bacteriana.

La clonación del gen *lsdA* en *E. coli* fue reportada por Arieta *et al*, (1996) en el vector p21R1, que contiene un fragmento de 20 kb que incluye el gen *lsdA* de *G. diazotrophicus* SRT4 pero reportaron que se acumula intracelularmente, esto obstaculiza su purificación y tiene una baja producción de fructanos (Arrieta *et al*, 1996; Trujillo *et al*, 2001). La acumulación de la proteína levansacarasa es debido a que se requiere del sistema de secreción tipo II para su secreción al medio extracelular. Por esta razón Arrieta *et al*, (1996) decidieron clonar el gen *lsdA* modificado bajo el control del promotor de la alcohol oxidasa 1 (AOX1) en la levadura *Pichia pastoris* (Trujillo *et al*, 2001). La proteína fue glucosilada en el extremo amino terminal para facilitar su secreción al medio extracelular, esto incrementó su estabilidad térmica y la secreción de la proteína levansacarasa sin alterar sus propiedades catalíticas (Trujillo *et al*, 2004). Estos antecedentes nos indican que la enzima levansacarasa expresada en *E. coli* probablemente es toxica para la bacteria debido a que se acumula en citoplasma y/o periplasma, tal vez por esta razón nosotros no pudimos obtener la clonación del gen *lsdA* en las cepas de *E. coli*. Además cuando un soluto se acumula en periplasma afecta de forma directa el equilibrio osmótico de la célula bacteriana disminuyendo su viabilidad (Miller, 1996).

La cepa C-19 recuperó el fenotipo mucóide, el crecimiento en sacarosa como única fuente de carbono, la osmotolerancia a NaCl y la formación de biopelícula. La formación del fenotipo mucóide en las colonias de C-19 se observó cerca de 3 días después al compararla con la cepa PAI 5 R. A pesar de que ya está reportada la generación de la cepa complementada del gen *lsdA* en *G. diazotrophicus* (Arrieta *et al*, 1996), no hay reportados detalles de su crecimiento, solo que se recupera el fenotipo mucóide. La cepa C-19 presentó un aumento de la duración de la fase lag al compararla con las cepas PAI 5 R o L-3.

La actividad de la levansacarasa no se recuperó, presentó la misma actividad que la cepa L-3, la cual se atribuyó a la actividad de la levanasa. Previamente se reportó que el gen *lsdB* expresado en *Pichia pastoris* y presentó un 30% de actividad hidrolítica de la sacarosa (Menendez *et al*, 2004). La sacarosa probablemente fue hidrolizada por la levanasa en las cepas mutantes del gen *lsdA*. Hernández *et al*, (1999b) reportaron una cepa que sobre expresa el gen *lsdA* aumentó su actividad extracelular 1.7 veces al compararla con la actividad intracelular que aumentó 6 veces, pero estos incrementos de actividad se observaron a partir de la DO₆₂₀ 6.0-9.0, respectivamente. También analizando la actividad de la levansacarasa en diferentes valores de pH del medio de cultivo y se observó un incremento de la actividad extracelular de la levansacarasa solo hasta DO₆₂₀ de 6.0 a 8.0 (Hernández *et al*, 1999b). En los ensayos de factores abióticos que realizamos se utilizaron DO₆₂₀ de 1.5 a 2.0. La cepa C-19 se dejó incubando más tiempo porque tiene prolongado la duración de la fase lag y así igualar la DO final de las cepas PAI 5 R o L-3 a la cual se trabajaron, fase exponencial tardía.

La cepa C-19 en el ensayo de desecación no presentó crecimiento desde las 18 h tal vez esto se deba a que su crecimiento en la fase lag fue prolongado comparada con las cepas PAI 5 R o L-3. Bajo estas condiciones de desecación la cepa C-19 no logra sintetizar todas las proteínas o macromoléculas necesarias para recuperarse la bacteria de esas condiciones adversas.

En el ensayo de biopelícula se observó que la cepa C-19 recuperó la formación de la biopelícula como en la cepa PAI 5 R, aunque desarrollando una biopelícula de estructura aparentemente diferente, pero fue necesario prolongar los tiempos de crecimiento por 48 horas más para igualar la DO con las cepas de PAI 5 R o L-3. La estructura de la biopelícula de la

cepa PAI 5 R, L-3 y C-19 presentaron diferencias en su estructura que sería interesante analizar más en detalle con técnicas de microscopía confocal de barrido.

La cepa C-19 presentó tres diferencias importantes: la disminución de la velocidad de crecimiento durante la fase lag, no se recuperó la actividad de la levansacarasa ni la supervivencia a la desecación. Sin embargo, tenemos antecedentes que nos permiten sugerir algunos escenarios los cuales se discutieron ampliamente en el capítulo 8.1. Los experimentos realizados no nos permiten explicar el comportamiento de la cepa C-19, por lo tanto, es necesaria más investigación en la caracterización de la cepa C-19 y la generación de otra cepa complementada en el gen *lsdA* con otro plásmido.

10. CONCLUSIONES

- La levansacarasa es la enzima responsable del metabolismo de la sacarosa en *G. diazotrophicus* y de la síntesis de levana, nistosa y cestosa. Las mutantes generadas en el gen de *lsdA* que codifica para la levansacarasa fueron analizadas en su metabolismo con otras fuentes de carbono al crecer la bacteria en diferentes medios de cultivo y fuentes de carbono, observando que estaba alterada la utilización de sacarosa y aun la bacteria era capaz de fijar nitrógeno con otras fuentes de carbono.
- La osmotolerancia en las cepas *lsdA*⁻ disminuyó con NaCl, y no cambio su crecimiento en presencia de PEG 400.
- Solo hasta 30% de sacarosa se observó disminución de la tolerancia a sacarosa en las cepas *lsdA*⁻.
- La ausencia de la función de la levansacarasa disminuyó la supervivencia de *G. diazotrophicus*, entonces la función de la levansacarasa tiene una participación en la tolerancia a condiciones de desecación.
- La ausencia de la función del gen *lsdA* en *G. diazotrophicus* disminuyó la formación de biopelícula, ya que la maduración de la biopelícula requiere de EPS.
- La colonización de la caña de azúcar (superficie biótica) por las cepas *lsdA*⁻ disminuyó durante las primeras horas de la colonización en la raíz.
- La disminución de la formación de biopelícula puede ser una de las causas de la disminución de la colonización de la raíz de la caña de azúcar durante las primeras horas de la interacción.
- La participación de la levansacarasa como factor de colonización en la raíz de la caña de azúcar durante las primeras horas de interacción puede ser debido a que participa la levansacarasa en la respuesta a varios estreses abióticos en la bacteria.

11. PERSPECTIVAS

- Analizar el transcriptoma o el proteoma de la caña de azúcar y de la bacteria *G. diazotrophicus* PA1 5 R y la mutante del gen *lsdA* brindaría información importante acerca de la participación de la levansacarasa en el proceso de colonización de esta simbiosis y ayudaría a elucidar los mecanismos de colonización de esta bacteria en la caña de azúcar u otras plantas.
- La osmotolerancia y desecación se investigaron en cultivos plantónicos. El analizar la osmotolerancia a NaCl y sacarosa y la desecación en condiciones de formación de biopelícula brindaría nueva información de la función de la biopelícula en *G. diazotrophicus*.
- La osmotolerancia a NaCl disminuyó en las cepas mutantes del gen *lsdA*, y se ha reportado que la capa de exopolisacáridos que recubre a la colonia bacteriana tiene una participación en la difusión de oxígeno que es importante para la fijación de nitrógeno. El analizar la fijación de nitrógeno a diferentes concentraciones de NaCl en las mutantes del gen *lsdA* nos ayudaría a comprender la participación de la levana como un EPS que protege a la nitrogenasa del efecto tóxico del oxígeno.
- La levansacarasa hidroliza la sacarosa liberando glucosa y fructosa. La glucosa puede ser utilizada por las glucosa deshidrogenasas de *G. diazotrophicus*. La NAD-GDH mostró actividad en sobrenadantes obtenidos de células lisadas, cuando el sustrato fue sacarosa y no detectaron actividad con glucosa. La función de la levansacarasa puede tener una relación con la actividad de la NAD-GDH, y podría ser analizada con las cepas mutantes del gen *lsdA*.
- Analizar que otros elementos participan en la formación de biopelícula, como otros exopolisacáridos como los glucanos y la función de estos en la colonización de la caña de azúcar.
- La colonización de la caña de azúcar por *G. diazotrophicus* disminuyó en las cepas mutantes del gen *lsdA*, nosotros observamos una disminución de la cantidad de bacterias que colonizan la raíz, sería interesante analizar la distribución de las bacterias

mutantes *lsdA*⁻ en la colonización de la raíz de la caña de azúcar, examinando la formación de biopelícula en la superficie de la raíz y la distribución bacteriana en el interior de la planta.

- La capacidad de *G. diazotrophicus* de colonizar diferentes géneros de plantas, así como otras plantas que no son sus hospederos naturales sin causar daño aparente a la planta es característico de esta bacteria. El analizar la participación de la levansacarasa en la colonización de sus otros hospederos o en las plantas donde se ha establecido la colonización de la bacteria ratificaría la participación de la levansacarasa en la adaptación al hábitat como factor de colonización.
- La colonización de la caña de azúcar por *G. diazotrophicus* fue realizada en ensayos *in vitro* en el laboratorio con plántulas axénicas de caña de azúcar en medio líquido. El analizar esta interacción en condiciones de invernadero nos daría información de la participación de la levansacarasa en condiciones de campo.
- La cepa complementada C-19 requiere mayor caracterización para establecer las condiciones de crecimiento para favorecer la producción de FOS y levana, ya que estos fructanos pueden tener aplicaciones directas para el consumo humano como prebióticos.
- La cepa complementada C-19 puede ser una herramienta para el estudio de la regulación y expresión del gen *lsdA* de *G. diazotrophicus* debido a sus diferentes características de crecimiento.

12. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

- Acosta, J. M. 2005. Diccionario de química física. Ed. Díaz de Santos. Barcelona, España pp 622.
- Alvarez, B., and G. Martinez-Drets. 1995. Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. Can. J. Microbiol. 41:918-924.
- Arencibia, A. D., F. Vinagre, Y. Estevez, A. Bernal, J. Perez, J. Cavalcanti, I. Santana, and A. S. Hemerly. 2006. *Gluconacetobacter diazotrophicus* elicits a sugarcane defense response against a pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans*. Plant Signaling & Behavior. 1:5:265-273.
- Arrieta, J. G., M. Sotolongo, C. Menéndez, D. Alfonso, L. E. Trujillo, M. Soto, R. Ramírez, and L. Hernández. 2004. A type II protein secretory pathway required for levansucrase secretion by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. J. Bacteriol. 186:5031-5039.
- Arrieta, J., L. Hernández, A. Coego, V. Suárez, E. Balmori, C. Menéndez, M.-F. Petit-Glatron, R. Chambert, and G. Selman-Housein. 1996. Molecular characterization of the levansucrase gene from the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. Microbiology. 142:1077-1085.
- Ashbolt, N. J., and P. A. Inkerman. 1990. Acetic acid bacterial biota of the pink sugar cane mealybug, *Saccharococcus sacchari*, and its environs. Appl. Environ. Microbiol. 56:707-712.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1999. Short protocols in molecular biology. Ed 4th, John Wiley & Sons, New York, USA.
- Bais, H. P., T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy, and J. M. Vivanco. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annu. Rev. Plant Biol. 57:233-266.
- Baldani, J. I., L. Caruso, V. L. D. Baldani, S. R. Goe, and J. Döbereiner. 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. Soil Biol. Biochem. 29:911-922.
- Barone, J. R., and M. Medynets. 2007. Thermally processed levan polymers. Carbohydr. Polym. 69:554-561.
- Bastián, F., A. Cohen, P. Piccoli, V. Luna, R. Baraldi, and R. Bottini. 1998. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A₁ and A₃ by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. Plant Growth Regulation. 24:7-11.
- Bastián, F., F. Rapparini, R. Baraldi, P. Piccoli, and R. Bottini. 1999. Inoculation with *Acetobacter diazotrophicus* increases glucose and fructose content in shoots on *Sorghum bicolor* (L.) moench. Symbiosis. 27:147-156.
- Bent, A. F., and D. Mackey. 2007. Elicitors, effectors, and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions. Annu. Rev. Phytopathol. 45:399-436.
- Bertalan, M., R. Albano, V. Pádua, et al. 2009. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal 5. BCM Genomics. 10:450-467.
- Bezzate, S., S. Aymerich, R. Chambert, S. Czarnes, O. Berge, and T. Heulin. 2000. Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere. Environ. Microbiol. 2:333-342.
- Bhat, R. A. J. I. V., and N. Timasheff. 1992. Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols. Protein Sci. 1:1113-1143.
- Bhattacharjee, R. B., A. Singh, and S. N. Mukhopadhyay. 2008. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. Appl. Microbiol. Biotechnol. 80:199-209.
- Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7:1513.
- Blanco, Y., M. Blanch, D. Piñón, M. E. Legaz, and C. Vicente. 2005. Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. J. Biosci. Bioengi. 99:366-371.
- Boddey, R. M. 1995. Biological nitrogen fixation in sugar cane: A key to energetically viable biofuel production. Crit. Rev. Plant Sci. 14:263-279.
- Boddey, R. M., O. C. de Oliveira, S. Urquiaga, V. M. Reis, E. L. de Olivares, V. L. D. Baldani, and J. Döbereiner. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. Plant Soil. 174:195-209.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Cangelosi, G. A., G. Martinetti, and E. W. Nester. 1990. Osmosensitivity phenotypes of *Agrobacterium tumefaciens* mutants that lack periplasmic β -1,2 glucan. *J. Bacteriol.* 172:2172-2174.
- Cavalcante, V. and J. Döbereiner. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil.* 108:23-31.
- Chang, W. S., M. Mortel, L. Nielsen, G. N. Guzman, X. Li, and L. J. Halverson. 2007. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *J. Bacteriol.* 189:8290-8299.
- Combie, J., A. Steel, and R. Sweizer. 2004. Adhesive designed by nature (and tested at redstone arsenal). *Clean Techn. Environ. Policy.* 6:258-262.
- Cruz-Vázquez, F. 2002. Papel de la levansacarasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en el establecimiento de la interacción endofítica con la caña de azúcar. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Tesis de maestría.
- Csonka, L. N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* 53:121-147.
- Csonka, L. N. and A. D. Hanson. 1991. Prokaryotic osmoregulation: Genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 45:569-606.
- Daguer J. P., T. Geissmann, M. F. Petit-Glatron, and R. Chambert. 2004. Autogenous modulation of the *Bacillus subtilis* *sacB-levB-yveA* levansucrase operon by the *levB* transcript. *Microbiology.* 150:3660-3679.
- Davey, M. E. and G. A. O'toole. 2000. Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:847-852.
- Deutscher, J. 2008. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 11:87-93.
- Dibut, B., M. Ortega, R. Martínez, L. Fey, y Y. Ríos. 2005. Nuevos aislados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cultivos de importancia económica para Cuba. *Cultivos tropicales.* 26:5-10.
- Dong, Z., C. D. Zelmer, M. J. Canny, M. E. McCully, B. Luit, B. Pan, R. S. Faustino, G. N. Pierce, and J. K. Vessey. 2002. Evidence for protection of nitrogenase from O_2 by colony structure in the aerobic diazotroph *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Microbiology.* 148: 2293-2298.
- Dong, Z., M. J. Canny, M. E. McCully, M. R. Regla-Roboredo, C. Fernandez-Cebadilla, E. Ortega, and R. Rodés. 1994. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems: A new role for the apoplast. *Plant Physiol.* 105: 1139-1147.
- Dunne, W. M. 2002. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 155-166.
- Dylan, T., D. R. Helinski, and G. S. Ditta. 1990. Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires β -(1 $\rightarrow$ 2)-glucan. *J. Bacteriol.* 172:1400-1408.
- FAOSTAT. 2010: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Fischer, H. M. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation rhizobia. *Microbial Rev.* 58:352-386.
- Flores-Encarnación, M., M. Contreras-Zentella, L. Soto-Urzuá, G. R. Aguilar, B. E. Baca, and J. E. Escamilla. 1999. The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL 5. *J. Bacteriol.* 181: 6987-6995.
- Franke-Whittle, I. H., M. G. O'Shea, G. J. Leonard, and L. I. Sly. 2005. Design, development, and use of molecular primers and probes for the detection of *Gluconacetobacter* species in the pink sugarcane mealybug. *Microbial Ecology.* 50:128-139.
- Frey, P. A., and A. D. Hegeman. 2007. Enzymatic reactions mechanisms. Oxford University Press, Oxford NY.
- Fuentes-Ramírez, L. E., J. Caballero-Mellado, J. Sepúlveda, and E. Martínez-Romero. 1999. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29:117-128.

- Fuentes-Ramírez, L. E., T. Jiménez-Salgado, I. R. Abarca-Ocampo, and J. Caballero-Mellado. 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. *Plant Soil*. 154:145-150.
- Galar, M. L., and J. L. Boiardi. 1995. Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:713-716.
- Geier, G., and K. Geider. 1993. Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiological Molecular Plant Pathology*. 42:387-404.
- Gillis, M., K. Kersters, B. Hoste, D. Janssens, R. M. Kroppensted, M. P. Stephan, K. R. S. Teixeira, J. Döbereiner, and J. Deley. 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic bacterium associated, with sugarcane. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:361-364.
- Gouffi, K., N. Pica, V. Pichereau, and C. Blanco. 1999. Disaccharides as a new class of noaccumulated osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1491-1500.
- Hanada, T., Y. Kashima, A. Kosugi, Y. Koizumi F. Yanagida, and S. Udaka. 2001. A gene encoding phosphatidylethanolamine N-methyltransferase from *Acetobacter acetii* and some properties of its disruptant. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:2741-2748.
- Hartmann, A., S. R. Pragh, and E. A. Galinski. 1991. Osmotolerance of diazotrophic rhizosphere bacteria. *Plant Soil*. 137:105-109.
- Henrissat, B., and A. Bairoch. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293:781-788.
- Hernández, L., J. Arrieta, C. Menéndez, R. Vazquez, A. Coego, V. Suárez, M. Selman, M.-F. Petit-Glatron, and R. Chambert. 1995. Isolation and enzymatic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem. J.* 309:113-118.
- Hernández, L., J. Arrieta, L. Betancourt, V. Falcón, J. Madrazo, A. Coego, and C. Menéndez. 1999a. Levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4 is secreted via periplasm by a signal-peptide-dependent pathway. *Curr. Microbiol.* 39:146-152.
- Hernández, L., M. Sotolongo, Y. Rosabal, C. Menéndez, R. Ramírez, J. Caballero-Mellado, and J. Arrieta. 2000. Structural levansucrase gene (*lsdA*) constitutes a functional locus conserved in the species *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Arch. Microbiol.* 174:120-124.
- Hernández, L., R. Ramírez, J. V. Hormaza, J. Madrazo and J. Arrieta. 1999b. Increased levansucrase production by a genetically modified *Acetobacter diazotrophicus* strain in shaking batch cultures. *Letters Appl. Microbiol.* 28:41-44.
- James, E. K., and F. L. Olivares. 1997. Infection and colonization of sugar cane and other Gramineous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17:77-119.
- James, E. K., F. L. Olivares, A. L. M. Oliveira, F. B. dos Reis Jr, L. G. da Silva and V. M. Reis. 2001. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *J. Experimental botany*. 52:747-760.
- Jimenez-Salgado, T., L. E. Fuentes-Ramírez, A. Tapia-Hernández, M. A. Mascarua-Esparza, E. Martínez-Romero, and J. Caballero-Mellado. 1997. Coffea arabica L., a new host plant *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen fixing acetobacteria. *Appl. Environment. Microbiol.* 63:3676-3686.
- Kasapis, S., E. R. Morris, M. Gross, and K. Rodolph. 1994. Solution properties of levan polysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, and its possible primary role as a blocker of recognition during pathogenesis. *Carbohydr. Polym.* 23:55-64.
- Kovach, M.E., P. H. Elzer, S. d. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop II, and K. M. Peterson. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*. 166:175-176.
- Kunst F., and G. Rapoport. 1995. Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzymes in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177:2403-2407.

- Lammens, W., K. L. Roy, L. Schroeven, A. Van Laere, A. Rabijns, and W. Van den Ende. 2009. Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *J. Exper. Botany*. 3:727-740.
- Langlois, P., S. Bourassa, G. G. Poirier, and C. Beaulieu. 2003. Identification of *Streptomyces coelicolor* proteins that are differentially expressed in the presence of the plant material. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1884-1889.
- Laue, H. A. Schenk, H. Li, L. Lambertsen, T. R. Neu, S. Molin, and M. S. Ullrich. 2006. Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology*. 152:2909-2918.
- Lawton, M. A., R. A. Dixon, K. Hahlbrock, and C. Lamb. 1983. Rapid induction of the synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and of chalcone synthase in elicitor-treated plant cells. *Eur. J. Biochem.* 129:593-601.
- Lee, S., A. Reth, D. Meletzus, M. Sevilla, and C. Kennedy. 2000. Characterization of a major cluster of *nif*, *fix*, and associated genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Bacteriol.* 182:7088-7091.
- Lee, T. S. G. 1987. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 10:47-55.
- Leigh, J.A., and D. L. Coplin. 1992. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:307-346.
- Li R., and I. C. MacRae. 1991. Specific association of diazotrophic *Acetobacters* with sugarcane. *Soil Biol. Biochem.* 23:999-1002.
- Li R., and I. C. MacRae. 1992. Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane. *Soil Biol. Biochem.* 24:413-419.
- Li, H., and M. S. Ullrich. 2001. Characterization and mutational analysis of three allelic *lsc* genes encoding levansucrase in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 183:3282-3292.
- Loganathan, P., R. Sunita; A. K. Parida and S. Nair. 1999. Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant *Eleusine corarana* L. *J. Appl. Microbiol.* 87:167-172.
- López-Lara, I. M., C. Sohlenkamp and O. Geiger. 2003. Membrane lipids in plant-associated bacteria: Their biosyntheses and possible functions. *Mol. Plant-Microbe Interactions*. 16:567-579.
- Luna, M. F., C. E. Bernardelli, M. L. Galar, and J. L. Boiardi. 2006. Glucose metabolism in batch and continuous cultures of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 3. *Curr. Microbiol.* 52:163-168.
- Ma, H. M., S. Schulze, S. Lee, M. Yang, E. Mirkov, J. Irvine, P. Moore, and A. Paterson. 2004. An EST survey of the sugarcane transcriptoma. *Theor. Appl. Genet.* 108:851-863.
- Martínez-Fleites, C., M. Ortiz-Lombardía, T. Pons, N. Tarbouriech, E. J. Taylor, J. G. Arrieta, L. Hernández, and G. J. Davies. 2005. Cristal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem. J.* 390:19-27.
- Menéndez, C., A. Banguela, J. Caballero-Mellado, and L. Hernández. 2009. Transcriptional regulation and signal-peptide-dependent secretion of exolevanase (LsdB) in the endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1782-1785.
- Menéndez, C., L. Hernández, A. Banguela, and J. País. 2004. Functional production and secretion of the *Gluconacetobacter diazotrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Technol.* 34:446-452.
- Miller, K. J. and J. M. Wood. 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:101-136.
- Mohammand, R. M., W. F. Camphell, and M. D. Rumbaugh. 1989. Acetylene reduction activity in salt-tolerant alfalfa/*Rhizobium* under drought stress. *Arid Soil Res. Rehad.* 3:431-438.
- Muñoz-Rojas, J., and J. Caballero-Mellado. 2003. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microb. Ecol.* 46: 454-464.
- Murashige, T., and F. A. Skoog. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Muthukumarasamy, R., and G. Revathi. 1999. Diazotrophic associations in sugar cane cultivation in South India. *Trop. Agric.* 76:171-178.

- Muthukumarasamy, R., G. Revathi, and C. Lakshminarasimhan. 1999. Influence of N fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. *Biol. Fertil. Soil.* 29:157-164.
- Muthukumarasamy, R., G. Revathi, and M. Vadivelu. 2000a. Antagonistic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotricum falcatum* Went., a causal organism of red-rot of sugarcane. *Curr. Sci.* 78:1063-1066.
- Muthukumarasamy, R., G. Revathi, and M. Vadivelu. 2000b. *Acetobacter diazotrophicus*: Prospects and potentialities –an overview, p. 126-153. En Yadav, Singh and Raychaudhuri (ed.), *Recent Advances in Biofertilizer Technology*.
- Muthukumarasamy, R., G. Revathi, and P. Loganathan. 2002a. Effect of inorganic N on the population, *in vitro* colonization and morphology of *Acetobacter diazotrophicus* (syn. *Gluconacetobacter diazotrophicus*). *Plant Soil.* 243:91-102.
- Muthukumarasamy, R., G. Revathi, S. Seshadri, and C. Lakshminarasimhan. 2002b. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science.* 83:137-145.
- Muthukumarasamy, R., M. Govindarajan, M. Vadivelu, and G. Revathi. 2006. N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micropropagated sugarcane plants. *Microbiological Research.* 161:238-245.
- Muthukumarasamy, R., U. G. Kang, K. D. Park, W. T. Jeon, C. Y. Park, J. S. Cho, S. W. Kwon, J. Song, D. H. Roh, and G. Revathi. 2007. Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-time inoculation effect on rice plants. *J. Appl. Microbiol.* 102:981-991.
- Nei, M., and S. Kumar. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, USA.
- Nogueira, E. M., F. Vinagre, H. P. Masuda, C. Vargas, V. L. M. Pádua, F. R. Silva, R. V. Santos, J. I. Baldani, P. C. G. Ferreira, A. S. Hemerly. 2001. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. *Genetics Mol. Biol.* 24:199-206.
- Ophir T, Gutnick DL. 1994. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:740-745.
- Paula, M. A., V. M. Reis, and J. Döbereiner. 1991. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). *Biol. Fertil. Soil.* 11:111-115.
- Payán, F., H. Carmen, and G. Tascón. 1977. Técnicas para la micropropagación de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) mediante el cultivo de tejidos y yemas. *Acta Agronómica.* 27:43-79.
- Pilon-Smits, E. A. H., M. J. M. Ebskamp, M. J. Paul, M. J. W. Jeuken, P. J. Weisbeek, and S. C. M. Smeekens. 1995. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.* 107:125-130.
- Potts, M. 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 58:755-805.
- Preston, G. M., B. Haubold, and P. Rainey. 1998. Bacterial genomics and adaptation to life on plants: implications for the evolution of pathogenicity and symbiosis. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:589-597.
- Prithiviraj, B., H. P. Bais, A. K. Jha and J. M. Vivanco. 2005. *Staphylococcus aureus* pathogenicity on *Arabidopsis thaliana* is mediated either by a direct effect of salicylic acid on the pathogen or by SA-dependent, NPR1-independent host responses. *Plant J.* 42:417-432.
- Rainey, P. B. 1999. Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 1:243.
- Ramey, B. E., A. G. Matthysse and C. Fuqua. 2004. The FNR-type transcriptional SinR controls maturation of *Agrobacterium tumefaciens* biofilms. *Mol. Microbiol.* 52:1495-1511.
- Reis, V. M., and J. Döbereiner. 1998. Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. *Arch. Microbiol.* 171:13-18.
- Reis, V. M., F. L. Olivares and J. Döbereiner. 1994. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10:401-405.

- Reis, V. M., F. L. Olivares, A. L. M. Oliveira, F. B. Reis J., J. I. Baldani, and J. Döbereiner. 1999. Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants were *Acetobacter diazotrophicus*. *Plant Soil*. 206:205-211.
- Rouws, L. F. M., J. L. Simoes-Araújo, A. Hemerly, and J. I. Baldani. 2008. Validation of a Tn5 transposon mutagenesis system for *Gluconacetobacter diazotrophicus* through characterization of a flagellar mutant. *Arch. Microbiol.* 189:397-405.
- Rozen, R., G. Bachrach, and D. Steinberg. 2004. Effect of carbohydrates on fructosyltransferase expression and distribution in *Streptococcus mutans* GS-5 biofilms. *Carbohydr. Res.* 339:2883-2888.
- Saravanan b, V. S., P. Kalaiarasan, M. Madhaiyan, and M. Thangaraju. 2007. Solubilization of insoluble zinc compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the detrimental action of zinc ion (Zn^{+2}) and zinc chelates on root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Letters Appl. Microbiol.* 44:235-241.
- Saravanan, V. S., M. Madhaiyan, J. Osborne, M. Thangaraju, and T. M. Sa. 2008. Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* members: Their possible role in plant growth promotion. *Microbial Ecology*. 55:130-140.
- Schroeder, V. A., S. M. Michalek, and F. L. Macrina. 1989. Biochemical characterization and evaluation of virulence of a fructosyltransferase-deficient mutant of *Streptococcus mutans* V403. *Infect. Immun.* 57:3560-3569.
- Sevilla, M., and C. Kennedy. 2000. Genetic analysis of nitrogen fixation and plant-growth stimulating properties of *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane, p. 737-760. En *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A model System for Analysis of a Biological Process*. Horizon Scientific Press, Wymondham. UK.
- Sevilla, M., D. Meletzus, K. Teixeira, S. Lee, A. Nutakki, I. Baldani, and C. Kennedy. 1997. Analysis of *nif* and regulatory genes in *Acetobacter diazotrophicus*. *Soil Biol. Biochem.* 29:871-874.
- Sevilla, M., R. H. Burris, N. Gunapala, and C. Kennedy. 2001. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}N_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *Nif* mutant strains. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 14:358-366.
- Sleator R. D., and C. Hill. 2001. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:49-71.
- Somers, E., J. Vanderleyden, and M. Srinivasan. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. *Critical Rev. Microbiol.* 30:205-240.
- Stephan, M. P., M. Oliveira, K. R. S. Teixeira, G. Martinez-Drets, and J. Döbereiner. 1991. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 77:67-72.
- Stephan, M. P., T. Fontaine, J. O. Previato, and L. Mandoça-Previato. 1995. Differentiation of capsular polysaccharides from *Acetobacter diazotrophicus* strains isolated from sugarcane. *Microbiol. Immunol.* 39:237-242.
- Sturz, A. V., B. R. Christie, and J. Nowak. 2000. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19:1-30.
- Sutherland, I. W. 2001. The biofilm matrix –an immobilized but dynamic microbial environment. *TRENDS Microbiol.* 9:222-227.
- Tejera, N. A., E. Ortega, J. González-López, and C. Lluch. 2003. Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *J. Appl. Microbiol.* 95:528-535.
- Tejera, N. A., E. Ortega, R. Rodés, and C. Lluch. 2004. Influence of carbon and nitrogen sources on growth, nitrogenase activity, and carbon metabolism of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Canadian J. Microbiol.* 50:745-750.
- Trujillo L. E., J.G. Arrieta, F. Dafhnisa, J. García, J. Valdés, Y. Tambara, M. Pérez, L. Hernández. 2001. Fructo-oligosaccharides production by the *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Enzyme Microbial Technol.* 28:139-144.
- Trujillo L. E., R. Gómez, A. Banguela, M. Soto, J.G. Arrieta, L. Hernández. 2001. Catalytical properties of N-glycosylated *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase produced in yeast. *Electronic J. Biotechnol.* 7:115-123

- Trujillo-López, M. A., O. Camargo-Zendejas, R. Salgado-Garciglia, H. Cano-Camacho, V. M. Baizabal-Aguirre, A. Ochoa-Zarzosa, J. E. López-Meza, and J. J. Valdez-Alarcón. 2006. Association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* with roots of common bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings in promoted in vitro by UV light. *Can. J. Bot.* 84:321-327. Erratum: *Can. J. Bot.* 84:514.
- Tu, J. C. 1981. Effect of salinity on *Rhizobium* root hair interaction, nodulation and growth of soybean. *Can. J. Plant Sci.* 61:231-239.
- Ureta, A., B. Alvarez, A. Ramon, M. A. Vera, and G. Martinez-Drets. 1995. Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. *Plant Soil.* 172:271-277.
- Ureta, A., and S. Nordlund. 2002. Evidence for conformational protection of nitrogenase against oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a putative FeSII protein. *J. Bacteriol.* 184: 5805-5809.
- Van den Ende, W., B. Coninck, and A. Van Laere. 2004. Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense? *TRENDS Plant Sci.* 9:523-528.
- Van Hijum, S. A. F. T., S. Kralj, L. K. Ozimek, L. Dijkhuizen, and G. H. van Geel-Schutten. 2006. Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:157-176.
- Velázquez-Hernández, M. L., V. M. Baizabal-Aguirre, A. Bravo-Patiño, M. Cajero-Juárez, M. P. Chávez-Moctezuma and J. J. Valdez-Alarcón. 2009a. Microbial fructosyltransferases and of fructans. *J. Appl. Microbiol.* 106:1763-1778.
- Velázquez-Hernández, M. L., V. M. Baizabal-Aguirre, A. Bravo-Patiño, M. P. Chávez-Moctezuma and J. J. Valdez-Alarcón. 2009b. Fructanos: prebióticos versátiles. *DESDE las ciencias de la salud.* 1:46-52.
- Vereyken, I. J., V. Chupin, F. A. Hoekstra, S. C. M. Smeekens, and B. Kruijff. 2003. The effect of fructan on membrane lipid organization and dynamics in the dry state. *Biophys. J.* 84:3759-3766.
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.* 255:571-586.
- Vettore, A. L., F.R. da Silva, E.L. Kemper, *et al.* 2003. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome Res.* 13:2725-2735.
- Vijn, I., and S. Smeekens. 1999. Fructan: More than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol.* 120:351-359.
- Walter, J., C. Schwab, D. M. Loach, M. G. Gänzle, and W. Tannock. 2008. Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, *in vitro* biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Microbiology.* 154:72-80.
- Wanderley-Nogueira, A. C., N. M. Soares-Cavalcanti, D. A. L. Morais, L. C. Belarmino, A. Barbosa-Silva, and A. M. Benko-Iseppon. 2007. Abundance and diversity of resistance genes in the sugarcane transcriptome revealed by *in silico* analysis. *Genetics Mol. Research.* 6:866-889.
- Wood, J. M. 1999. Osmosensing by bacteria: Signals and membrane-based sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:230-262.
- Yamada, Y., K. I. Hoshino, and T. Ishikawa. 1997. The phylogeny of acid acetic bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61:1244-1251.
- Yelton, M. M., S. S. Yang, S. A. Edie, and S. T. Lim. 1983. Characterization of an effective salt-tolerant, fast-growing strain of *Rhizobium japonicum*. *J. Gen. Microbiol.* 129:1537-1547.
- Youssef, H. H., M. Fayez, M. Monib, and N. Hegazi. 2004. *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a natural endophytic diazotroph of Nile Delta sugarcane capable of establishing an endophytic association with wheat. *Biol. Fertil. Soils.* 39:391-397.
- Zahrán, H. H. 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews.* 63:968-989.
- Zhu, Y. J., E. Komor, and P. H. Moore. 1997. Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. *Plant Physiol.* 115:609-616.

13. ANEXO

13.1. Microbial fructosyltransferases and the role of fructans

14.2. Fructanos, prebióticos versátiles

13.3. Efecto de la mutación del gen *lsdA* de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*) en la colonización de la caña de azúcar

REVIEW ARTICLE

Microbial fructosyltransferases and the role of fructans

M.L. Velázquez-Hernández¹, V.M. Baizabal-Aguirre¹, A. Bravo-Patiño¹, M. Cajero-Juárez¹,
M.P. Chávez-Moctezuma² and J.J. Valdez-Alarcón¹

¹ Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México

² Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México

Keywords

biofilm, fructan, fructosyltransferase, inulin, inulosucrase, levan, levansucrase.

Correspondence

Juan José Valdez Alarcón, Km. 9.5 carretera
Morelia-Zinapécuaro, 58893, La Palma,
Tarímbaro, Michoacán, México.
E-mail: jivaldez@zeus.umich.mx

2008/0994: received 12 June 2008, revised
22 August 2008 and accepted 29 August
2008

doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04120.x

Summary

Microbial fructosyltransferases are polymerases that are involved in microbial fructan (levan, inulin and fructo-oligosaccharide) biosynthesis. Structurally, microbial fructosyltransferase proteins share the catalytic domain of glycoside hydrolases 68 family and are grouped in seven phylogenetically related clusters. Fructosyltransferase-encoding genes are organized in operons or in clusters associated with other genes related to carbohydrate metabolism or fructosyltransferase secretion. Fructosyltransferase gene expression is mainly regulated by two-component systems or phosphorelay mechanisms that respond to sucrose availability or other environmental signals. Microbial fructans are involved in conferring resistance to environmental stress such as water deprivation, nutrient assimilation, biofilm formation, and as virulence factors in colonization. As a result of the biological and industrial importance of fructans, fructosyltransferases have been the subject of extensive research, conducted to improve their enzymatic activity or to elucidate their biological role in nature.

Introduction**Fructans**

Microbial fructans have been isolated from Gram-positive and Gram-negative bacteria, and fungi from the genera *Aspergillus* and *Rhodotorula*. Several excellent reviews have been published on plant fructan metabolism and their physiological roles (Pontis 1990; Pollock and Cairns 1991; Vijn and Smeekens 1999), beneficial roles as prebiotics in human and animal feeding (Roberfroid and Delzenne 1998; Delzenne *et al.* 2005; Roberfroid 2005, Verdonk *et al.* 2005), industrial applications (Han 1990) and biosynthesis in transgenic plants (Cairns 2003; Ritsema and Smeekens 2003; Banguela and Hernández 2006). In this review, we focus on microbial fructosyltransferases including their structure, structural organization of their genes, the main mechanism controlling their expression and how these are related to fructan accumulation and their possible role in nature.

Fructans are classified as inulins, levans (fleins in plants), mixed levans (gramminans in plants) and the

so-called neo-series (neo-inulin and neo-levan, in plants), according to the type of bond that the extended β -D-fructosyl chain forms with sucrose (Fig. 1). Inulins are linear polymers of fructose with $\beta(2 \rightarrow 1)$ bonds. Addition of fructosyl residues in a $\beta(2 \rightarrow 1)$ bond to sucrose results in the formation of 1-kestose, an inulin precursor. Inulin polymers from plants have a degree of polymerization (DP) of 30–150 fructosyl residues, while microbial inulins have a DP of 20–10 000 (Van Hijum *et al.* 2006). Levans are also linear polymers of fructose, but with $\beta(2 \rightarrow 6)$ bonds. The addition of a fructosyl residue to sucrose with a $\beta(2 \rightarrow 6)$ bond results in the formation of 6-kestose, the first intermediate of levan biosynthesis. Levans of plant origin (fleins) have a DP < 100 fructosyl residues, while microbial levans usually have a DP > 100. Mixed levans (gramminans) are of plant origin and have both $\beta(2 \rightarrow 1)$ and $\beta(2 \rightarrow 6)$ linked fructosyl residues. The precursor of mixed levans is the tetrasaccharide bifurcose (Fig. 1). In the inulin neo-series, the β -D-fructosyl units are linked by a $(2 \rightarrow 1)$ bond as in inulin, but the fructosyl chains are attached either to C1 or C6 of the glucose moiety of sucrose. The same occurs for levan

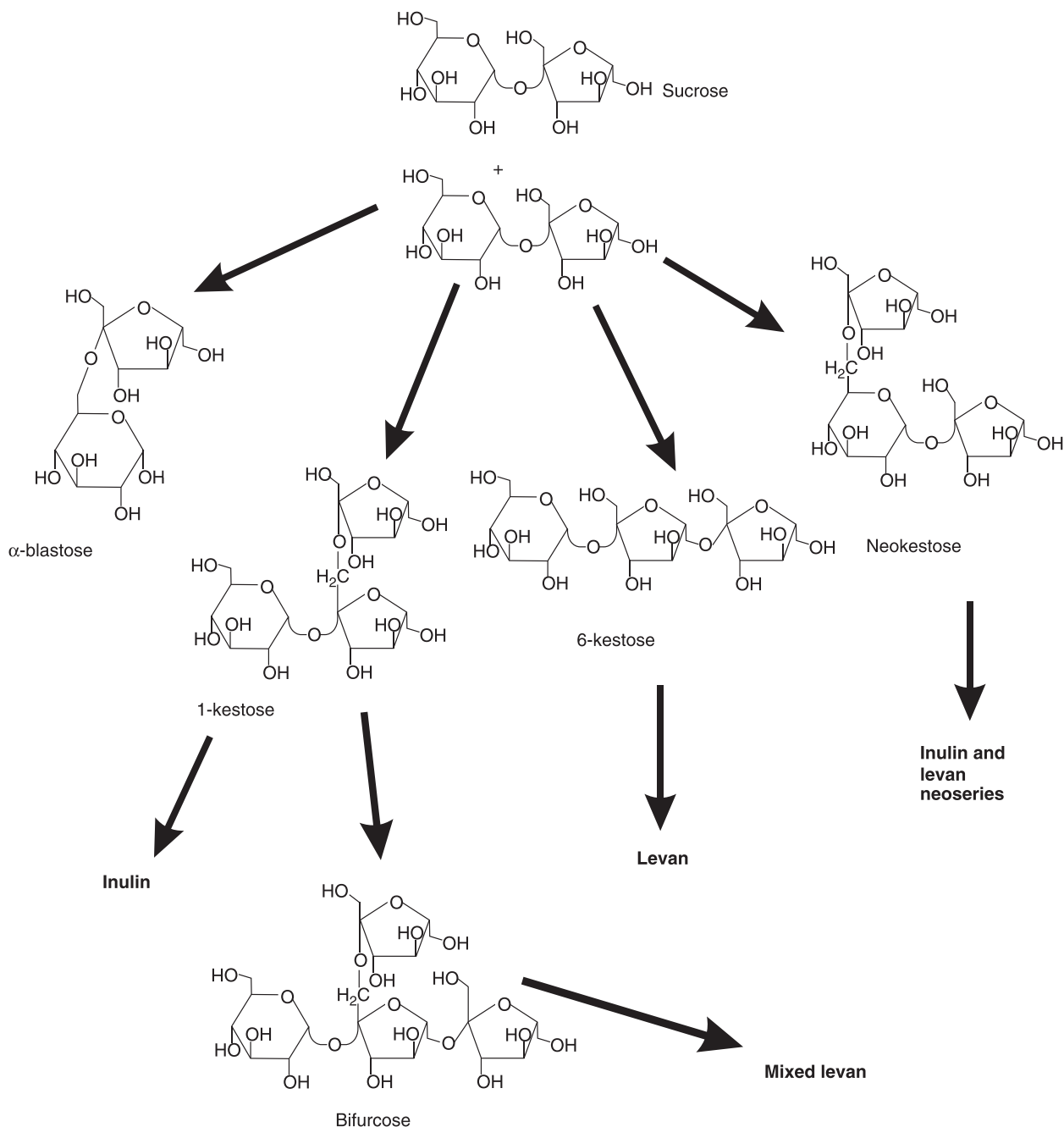


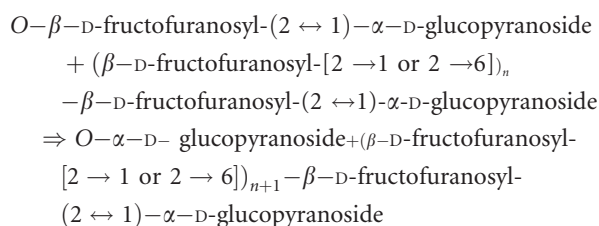
Figure 1 Fructan structure. Di-, tri- and tetrasaccharide precursor names are in normal type; fructan polymer names are in bold type.

neo-series, in which β -D-fructosyl units are linked by a $(2 \rightarrow 6)$ bond as in levan, and the fructosyl chains are linked to C1 or C6 of the glucose moiety of sucrose (Lewis 1993). As sucrose is a precursor of all types of fructans, they usually have a glucose moiety at one extreme. Small chain oligosaccharides ($DP < 9$) are termed oligofructosides, fructo-oligosaccharides (FOS) or short-chain FOSs.

Microbial fructan biosynthesis

Plants need at least two distinct enzymatic activities to catalyse priming and elongation reactions in fructan biosynthesis. In contrast, microbial biosynthesis of fructans requires a single fructosyltransferase activity for both reactions. Microbial fructosyltransferases are classified according to: (i) the type of linkage between β -D-fructosyl

units in the polymer that they synthesize and (ii) their enzymatic properties. Microbial fructosyltransferases transfer a fructosyl residue to a sucrose acceptor molecule according to the general reaction:



where $n \geq 0$.

An exception occurs for *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC, which uses maltose instead of sucrose as an acceptor molecule, which forms the priming trisaccharide erlose ($O-\alpha\text{-D-glucopyranosyl}-(1 \rightarrow 4)-O-\alpha\text{-D-glucopyranosyl}-(1 \rightarrow 2)-\beta\text{-D-fructofuranoside}$ (Kang *et al.* 2005). Another exception is that of *Bacillus megaterium*, which synthesizes the disaccharide 6- $O-\beta\text{-D-fructofuranosyl}-\alpha\text{-D-glucopyranoside}$ (blastose; Homann *et al.* 2007).

Levansucrases (EC 2.4.1.10, sucrose:2,6- β -fructan:6- β -D-fructosyltransferase) are the best characterized fructosyltransferases and synthesize most microbial levans by transferring a β -D-fructosyl residue to the acceptor molecule (sucrose or levan) with (2 $\rightarrow$ 6) linkages. Microbial levansucrases use different acceptors *in vitro*, such as water (in sucrose hydrolysis reactions), glucose (in interchange reactions) and sucrose or fructan (in polymerization reactions). *Rahnella aquatilis* JMC 1683 levansucrase also uses D-xylose, D-arabinose, L-arabinose, lactose, maltose, maltotriose, cellobiose and melibiose as acceptors. *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 levansucrase (E.C. 2.4.1.162) uses at least 10 different glycopyranosides and several disaccharides as acceptors (Seibel *et al.* 2006). General kinetic properties of levansucrase enzymes are described in Table 1. Most levansucrases are monomeric enzymes with a molecular weight of 46–73 kDa, with the exception of *R. aquatilis* JMC-1683, *Leuc. mesenteroides* B-512 FMC and *Actinomyces viscosus* T-14V levansucrases that form dimers (Pabst 1977; Ohtsuka *et al.* 1992; Kang *et al.* 2005), and therefore have the highest molecular

Table 1 Kinetic properties of microbial fructosyltransferases

Organism	Enzyme*	Substrate†	Product‡	M _r (kDa)	T (°C)§	pH§	pl	K _m Suc¶	Reference
<i>Bacillus subtilis</i>	Lev	Suc	Len	75.0	30	5.5	nd	4.0	Gay <i>et al.</i> 1983; Van Hijum <i>et al.</i> 2004
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Lev	Suc	Len, 1-k	nd	30	nd	nd	nd	Bezzate <i>et al.</i> 2000
<i>Bacillus megaterium</i>	Lev	Suc	Len, 1-k, 6-k, nys, blastose, neokestose	52.0	45	6.0	nd	6.6	Homann <i>et al.</i> 2007
<i>Erwinia amylovora</i>	Lev	Suc	Len	46.0	28	nd	4.0	nd	Geier and Geider 1993
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Lev	Suc	Len, 1-k, nys	58.0	30	5.0	5.5	11.8	Hernández <i>et al.</i> 1995
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	Lev	Suc	Len, 1-k	73.0	35	5.4	nd	13.1	Tiekling <i>et al.</i> 2005
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Lev	Suc	Len	90.0	30	6.0	nd	36.7	Morales-Arrieta <i>et al.</i> 2006
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Lev	Suc	Len	103.0	30	6.2	nd	26.6	Kang <i>et al.</i> 2005
<i>Pseudomonas s. phaseolicola</i>	Lev	Suc	Len	45.0	18	6.2	3.5	160.0	Hettwer <i>et al.</i> 1995
<i>Rahnella aquatilis</i>	Lev	Suc	Len	120.0	60	6.0	nd	50.0	Ohtsuka <i>et al.</i> 1992
<i>Zymomonas mobilis</i>	Lev	Suc	Len	56.0	50	5.0	2.6	122.0	Yanase <i>et al.</i> 1992
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Lev	Suc, raf	Len	63.8	50	4.5	nd	21.0	Van Hijum <i>et al.</i> 2004
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ins	Suc	Inu, nys	85.0	50	5.0	nd	nd	Van Hijum <i>et al.</i> 2002
<i>Leuconostoc citreum</i>	Ins	Suc, mal, lac	Inu	170.0	45	6.5	5.0	66.0	Olivares-Illana <i>et al.</i> 2002
<i>Streptococcus mutans</i>	Fft	Suc	Inu	97.0	nd	nd	nd	nd	Schroeder <i>et al.</i> 1989
<i>Streptococcus salivarius</i>	Fft	Suc, raf	Len	125.4	37	6.0	nd	5.0	Song and Jacques 1999
<i>Actinomyces viscosus</i>	Fft	Suc, raf	Len	220.0	37	7.5	4.2	12.0	Pabst 1977
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Ftf	Suc, raf	1-k, nys, fructosylnystose	170.0	65	5.5	nd	27.0	Ghazi <i>et al.</i> 2007
<i>Aspergillus foetidus</i>	Fft	Suc	1-k, nys	180.0	nd	nd	nd	nd	Rehm <i>et al.</i> 1998
<i>Aspergillus sydowii</i>	Fft	Suc	Inu	75.0	nd	nd	nd	nd	Heyer and Wendenburg 2001
<i>Rhodotorula sp.</i>	Ftf	Suc	1-k, nys, fructosylnystose	170.0	67	4.5	nd	770.4	Hernalsteens and Maugeri 2008

*Lev, levansucrase; Ins, inulosucrase; Ftf, fructosyltransferase.

†Suc, sucrose; raf, raffinose; mal, maltose; lac, lactose.

‡Len, levan; 1-k, 1-kestose; 6-k, 6-kestose; nys, nystose; inu, inulin.

§T and pH indicate optimal temperature and pH values.

¶K_m values are expressed in mmol l⁻¹.

weights (Table 1). pI for levansucrases ranges between 2.6 and 5.5, while optimum pH values range from 5.0 to 6.2. The reported K_m values for levansucrases range from 4.0 to 160.0 mmol l⁻¹ (Table 1). A requirement for metal ions as cofactors has only been reported for *Lactobacillus reuteri*, *Leuc. mesenteroides* and *B. subtilis* levansucrases, which require Ca²⁺ (Van Hijum *et al.* 2004; Ozimek *et al.* 2005; Morales-Arrieta *et al.* 2006), and some strains of *B. subtilis* require Fe³⁺ instead of Ca²⁺ (Gay *et al.* 1983). Fructosyltransferase activity in levansucrases occurs by a ping-pong reaction mechanism that has been confirmed in *B. subtilis* (Chambert *et al.* 1974), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Hernández *et al.* 1995) and *Streptococcus salivarius* (Song and Jacques 1999).

Inulosucrases (EC 2.4.1.9; sucrose:2,1- β -D-fructan:1- β -D-fructosyltransferase) transfer β -D-fructosyl residues to sucrose or inulin acceptors with (2 $\rightarrow$ 1) bonds. Although inulin is a typical plant fructan, *Lact. reuteri* (Van Hijum *et al.* 2002), *Leuconostoc citreum* (Olivaes-Illana *et al.* 2003) and *Streptococcus mutans* (Ebisu *et al.* 1975) also show inulosucrase activities. The molecular weights of inulosucrases from *Lact. reuteri* and *Leuc. citreum* are 85 and 170 kDa, their pIs are 4.5 and 5.0, their optimum pHs are 5.0 and 6.5 and their K_m s for sucrose are 21.0 and 66.0 mmol l⁻¹, respectively. No kinetic properties have been reported for *Strep. mutans* inulosucrase. Reaction mechanisms for inulosucrases have not been elucidated, and there are no reports on the use of water or glucose as alternative fructosyl acceptors.

Fructosyltransferases (EC 2.4.1.10; sucrose:2,6- β -fructan:6- β -D-fructosyltransferases) also catalyse the synthesis of levan, but they do not catalyse hydrolysis or exchange reactions as levansucrases do. Fructosyltransferases kinetic properties are listed in Table 1. Molecular weights are between 75.0 and 180.0 kDa, optimum pHs are 4.5–7.5,

and K_m values for sucrose are 5.0–770.4 mmol l⁻¹. Enzymes from *Rhodotorula* sp. LEB-V10 and *Aspergillus aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L, Novozymes, Denmark) are dimeric enzymes (Ghazi *et al.* 2007; Hernalsteens and Maugeri 2008).

Structure of microbial fructosyltransferases

Microbial levansucrases, inulosucrases and fructosyltransferases that synthesize fructans belong to the glycoside hydrolases 68 (GH68) family. Microbial fructosyltransferases share five main domains: (i) a signal peptide (in Gram-positive bacteria and *G. diazotrophicus*), (ii) an N-terminal domain which is variable in length, (iii) a catalytic domain with a mean length of 500 amino acids, (iv) a cell-wall-binding domain (in some Gram-positive bacteria) and (v) a region with variable length in the C-terminal domain (Van Hijum *et al.* 2006). Signal peptides in the N-terminal domain of Gram-negative bacteria have only been reported for the levansucrase of *G. diazotrophicus*. They are located in the first 30 amino acids, which are recognized by a type II secretion system (Arrieta *et al.* 2004). Other fructosyltransferases from Gram-negative bacteria may be secreted by different pathways. Also, in fructosyltransferases from Gram-negative bacteria, there is a conserved motif in the N-terminal domain, with the sequence WT(R/I)ADA(L/M), which is also present in internal membrane-located proteins (Tajima *et al.* 2000). The N-terminal domain of fructosyltransferases is generally about 90 amino acids in length. In *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW1.392 levansucrase, the N-terminal domain has a 16-amino-acid sequence (DNATSGSTKQESSIAN) that is repeated seven times (Tieking *et al.* 2005). *Lactobacillus reuteri*, *Leuc. mesenteroides*, *Strep. mutans* and *Strep. salivarius* show sequences that have a similar length, but

Table 2 Conserved motifs among microbial fructosyltransferases

Motif number	Motif designation*	Consensus sequence	Position*	Function†
I	VWDSW	(V/L)WD(T/S)S(W/M)	84–88	Catalytic nucleophile, conserved in GH68 family
II	EWSGS	(E/Q)W(A/S)G(T/S)	162–166	Sucrose box I, conserved in GH68 family
III	DG	DG	172–173	Involved in acceptor recognition
IV	LFYTD	L(F/Y)T(D/C)	177–181	Sucrose box II and acceptor recognition
V	RDP	RDP	246–248	Catalytic centre, stabilizes transition state and contributes to sucrose hydrolysis and fructan polymerization
VI	YLVFE	Y(M/L)VFE	258–262	Sucrose hydrolysis and transfructosylation
VII	PLI	PL(V/I)	330–332	Conserved among fructosyltransferases; unknown function
VIII	DEIER	D(Q/E)(T/I)ER	339–343	Catalytic centre, acid-base catalyst, conserved in GH68 family
IX	YLFT	YLF(T/S)	354–357	Conserved in microbial fructosyltransferases
X	YKPLN	YXP(L/M)N	388–392	Conserved in GH68 family
XI	TYS	TYS	410–412	Orientates nucleophilic residue for transfructosylation

*Motif designation and amino acids positions are relative to *Bacillus subtilis* levansucrase sequence 10YGA.

†Meng and Fütterer 2003; Martínez-Fleites *et al.* 2005; Van Hijum *et al.* 2006.

they are not similar in terms of amino acid sequence, although they have some conserved residues. It is likely that the seven-repeat motif remains functional in *Lact. sanfranciscensis*, but this function may be lost in other bacteria. The catalytic domains of microbial fructosyltransferases have 11 conserved sequence motifs that are described in Table 2 (Meng and Fütterer 2003). The residue that is involved in Ca^{2+} binding in *B. subtilis* levansucrase has been identified as D339, and equivalent residues have been proposed as D520 and D500 for *Lact. reuteri* inulosucrase and levansucrase, respectively (Ozimek *et al.* 2005). Interestingly, the D residue is conserved only in fructosyltransferases of Gram-positive origin (Ozimek *et al.* 2005). The cell-wall-binding domain in the C-terminal of Gram-positive bacteria contains a PXX motif, a conserved LPXTG sortase recognition motif and a hydrophobic region typical of the C-terminal domain of cell-wall-anchored proteins from Gram-positive bacteria (Tieking *et al.* 2005). In the C-terminal domain of fructosyltransferases from Gram-negative bacteria, there is a glycine-rich region that is similar to that in glucan binding proteins (Song *et al.* 1998).

The three-dimensional structure of the catalytic site of bacterial fructosyltransferases has been deduced from X-ray crystallography of *B. subtilis* and *G. diazotrophicus* levansucrases (Meng and Fütterer 2003; Martínez-Fleites *et al.* 2005). Highly similar space distribution has been observed for catalytic residues between *B. subtilis* D86, D247 and E342, and *G. diazotrophicus* D135, D309 and E401. These residues correspond to the catalytic nucleophile, transition state stabilizer and acid-base catalyst, respectively. Prediction of the three-dimensional structure of fructosyltransferases has revealed a five-bladed β -propeller catalytic domain in the active site that is also present in family GH32, which includes plant and yeast fructosyltransferases (Pons *et al.* 2000). Altogether, these data confirm the high structural homology shared by fructosyltransferases. A combination of enzyme kinetics, nuclear magnetic resonance analysis and computational modelling has been used to further assess the role of specific amino acid residues associated with the catalytic site in a recombinant fructosyltransferase from *B. subtilis* NCIMB 11871 expressed in *Escherichia coli*. Residues W85, D86, S164, R246, D247, E340, E342 and Y411 present in *B. subtilis* levansucrase conserved motifs (Table 2) seem to establish multiple hydrogen bonding interactions with sucrose and other disaccharide analogues in the active site. These interactions are needed to activate the disaccharide for catalysis. This study has also highlighted the role of residues R360, K363 and Y429, which are not usually considered as part of the conserved motifs, in the establishment of the hydrogen bonding network (Seibel *et al.* 2006).

Leuconostoc citreum CW28 inulosucrase is the largest fructosyltransferase reported to date and presents three

domains similar to those of glycosyltransferases. The first domain is located at 138 amino acids from the N-terminal domain and shows low similarity (40% identity) with an alternansucrase of *Leuc. mesenteroides*. The second one is the catalytic domain that confers inulosucrase activity and is similar to *B. subtilis* levansucrase (39% identity). The third domain shows high identity (80%) with an alternansucrase C-terminal domain that is responsible for polymer binding (Olivares-Illana *et al.* 2003). Alternansucrases biosynthesize glucans from sucrose with alternative $\alpha(1 \rightarrow 6)$ and $\alpha(1 \rightarrow 3)$ linkages. Expression of a C-terminal domain-truncated version of *Leuc. citreum* inulosucrase that contains the fructosyltransferase catalytic domain, but not the domain that is highly similar to alternansucrase, shows an increase in specific activity of the enzyme and a decrease in thermal stability at 40°C. The C-terminal domain in *Leuc. citreum* inulosucrase that is homologous to alternansucrase may therefore decrease its reaction rate and increase its thermal stability. This chimerical enzyme may be generated by recombination among sucrose-dependent glycosyltransferase genes with alternansucrase and inulosucrase activities (Olivares-Illana *et al.* 2003).

Phylogenetic analysis of microbial fructosyltransferase proteins has revealed that they are grouped in seven main clusters, A–G (Fig. 2). Cluster A corresponds to the fructosyltransferases from β - and γ -proteobacteria of the genus *Burkholderia* and *G. diazotrophicus*, as well as those of the high GC class actinobacteria. Cluster B is composed of levansucrases from different strains of the α -proteobacteria *Zymomonas mobilis* and the acetobacteria *Gluconobacter oxidans* and *Gluconacetobacter xylinus*. Cluster C is formed of levansucrases from γ -proteobacteria of the genus *Pseudomonas*, *Erwinia amylovora*, *R. aquatilis* and from Gram-positive *Leuc. mesenteroides*. Cluster D contains levansucrases from the order Sphingomonadales, *Caulobacter* sp. and archaeas. Cluster E is composed of levansucrases from the orders Bacillales and Clostridiales. Cluster F contains levansucrases and inulosucrases from the order Lactobacillales. A 7th highly divergent cluster, G, consists of fructosyltransferases of eukaryotic origin and homologous sequences from *Arthrobacter aurescens* and *Paenibacillus polymyxa*. The levansucrase from *Oceanicola granulosus* is clearly separated with a high bootstrap value from the previously described clusters, and is located between clusters F and G.

The distribution of fructosyltransferases shown in Fig. 2 is consistent with that observed by Pons *et al.* (2000), who have described a wider range of fructosyltransferase enzymes, including invertases, sucrases and fructosyltransferases from bacteria, fungi and plants, all included in the family GH32. Each cluster in Fig. 2 is

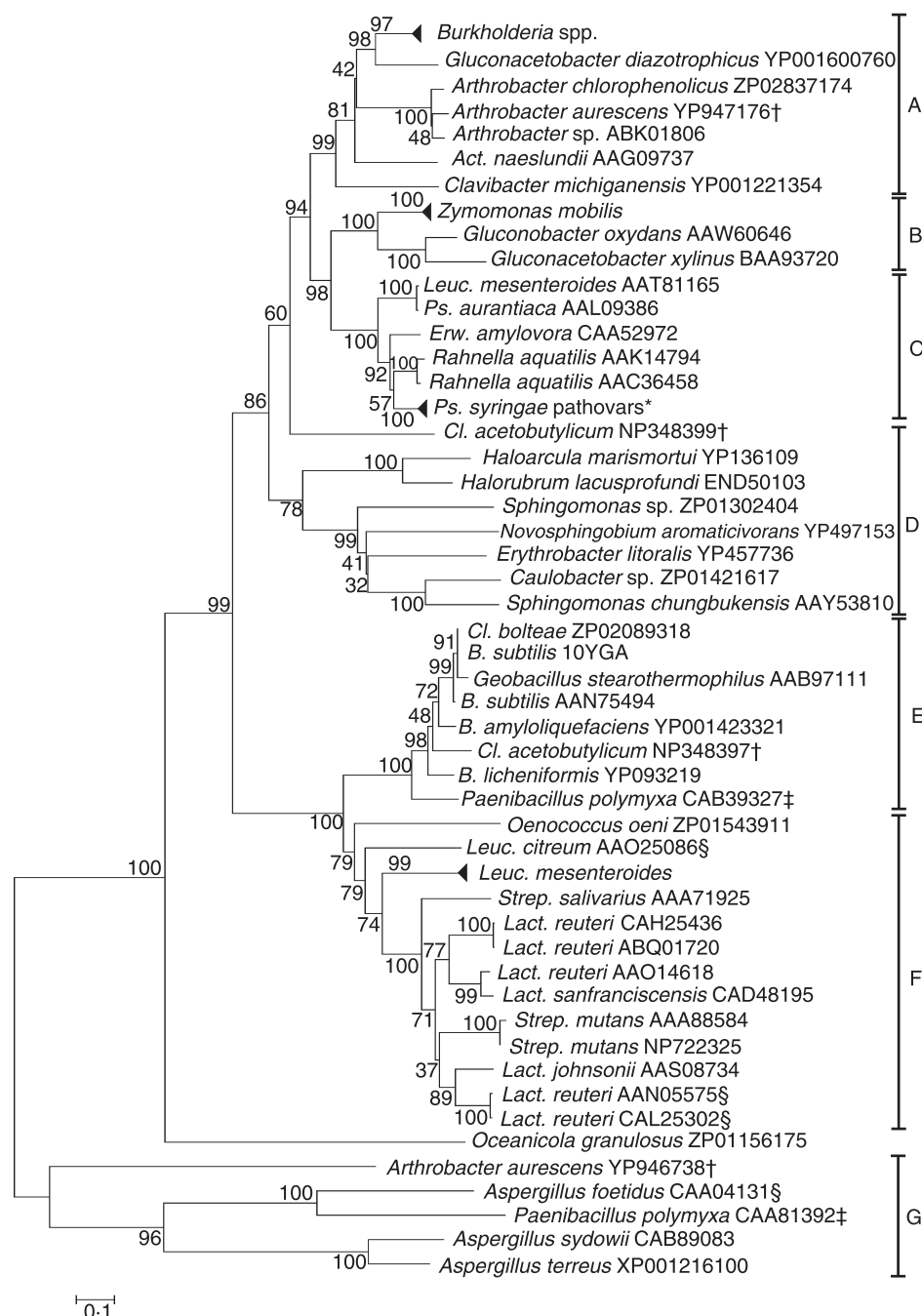


Figure 2 Phylogenetic analysis of microbial fructosyltransferases. Analysis was performed by the neighbour-joining method using Poisson correction. Number at the nodes indicates confidence bootstrap percentages of 1000 repeats. Scale bar indicates number of changes per amino acid. Sequences are represented by the names of the microorganisms followed by the GenBank accession number of the corresponding fructosyltransferase protein. Branches represented by more than three proteins of the same species were compressed and are composed by the following sequences: for *Pseudomonas syringae* pathovars, YP277079, AAZ36063, AAZ38051, AAC36063, AAZ37865, YP235184, YP233850, NP791279, NP792124, NP808690; for *Zymomonas mobilis*, BAA04475, AAA27702, AAV88998; for *Burkholderia* sp., ZP01502250, EAY65004, ZP01564363, ZP01553422, ABO57793, YP440066, EDK82978, ABN00553, ABN94007, ABN86027, CAH38000, YP337253, YP623958, ABI91660, ZP02099713, ZP02113195; for *Leuconostoc mesenteroides*, AAY19523, YP818875, YP818876, YP818877. *, Paralog proteins; †, paralog proteins in different clusters; ‡, ortholog proteins; §, inulosucrases.

almost entirely composed of fructosyltransferases from phylogenetically related organisms. A clear exception is observed for the levansucrase from the Gram-positive *Leuc. mesenteroides*, which is included in cluster C with the Gram-negative levansucrases. *Leuconostoc mesenteroides* levansucrase can be obtained by means of horizontal gene transfer from Gram-negative bacteria. In fact, this levansucrase is similar to that of *Pseudomonas aurantica*. It has been speculated that genomes from bacteria of the genus *Pseudomonas* are highly dynamic, and it is common to find duplicated genes in their genomes. The large inulosucrase of *Leuc. citreum* that contains alternansucrase-related domains is closely related to the levansucrase from *Leuc. mesenteroides*, thus emphasizing its chimeric nature. Both of the dimeric levansucrases from *R. aquatilis* JCM-1683 (Ohtsuka *et al.* 1992) and from *Leuc. citreum* CW28 (Olivares-Illana *et al.* 2002) belong to clusters C and F respectively. *Arthrobacter aureus*, *Clostridium acetobutylicum* and several pathovars of *Pseudomonas syringae* contain two or more copies of levansucrase-encoding genes. In the first two cases, both gene copies are grouped in different fructosyltransferase clusters, while those from *Ps. syringae* pathovars are all grouped in cluster C. *Pseudomonas syringae* paralog genes have evolved to cytosolic and extracellular locations (Li and Ullrich 2001). On the other hand, two strains of *Leuc. mesenteroides* contain a levansucrase that belongs to cluster C and a fructosyltransferase that belongs to cluster G. The same is true for a levansucrase and a fructosyltransferase of different strains of *P. polymyxa* that are grouped in clusters E and G respectively. These observations support the hypothesis that fructosyltransferase-encoding genes have evolved by means of gene duplication and horizontal gene transfer. The three larger groups of fructosyltransferases are constituted by Gram-negative bacteria (clusters A–D), Gram-positive bacteria (clusters E and F) and fungi (cluster G). Among bacterial fructosyltransferases that belong to the family GH68, the catalytic-domain motifs are conserved (Table 2), while fungal fructosyltransferases that belong to family GH32, which includes plant invertases and fructosyltransferases, only share the signature motif for fructosyltransferases H-x(2)-[PTV]-x(4)-[LIVMA]-[NSCAYG]-[DE]-P-[NDSC]-[GA] (Pons *et al.* 2000). This suggests a monophyletic origin. A common ancestor seems possible for both prokaryotic and eukaryotic fructosyltransferases.

Gene organization of microbial fructosyltransferases

Levansucrase genes from *Z. mobilis*, *G. diazotrophicus* and *B. subtilis* are organized in putative operons associated in clusters with other genes or operons (Fig. 3). The levan-

sucrase-encoding gene from *Z. mobilis* B4286, *levU* (*sacB*) forms a chromosome-located operon (Fig. 3a) with a sucrose-encoding gene *invB* (*sacC*). Sucrose induces expression of the operon as a bicistronic mRNA (Song *et al.* 1999). The promoter region is located 5' to the *levU* (*sacB*) gene, which is followed by a stem-loop structure that resembles a transcriptional terminator, thus suggesting that *invB* (*sacC*) expression is controlled by an anti-termination mechanism. In the region located 5' to the *levU*-*invB* (*sacB*-*sacC*) operon, there is the *glk* operon, which encodes four enzymes of the glycolytic pathway. Two open reading frames (ORFs) are located between both operons. ORF3 encodes a protein similar (34% identity, 56% similarity) to the Lpr family of regulator proteins that share helix-turn-helix DNA-binding motifs, which have been shown to control amino acid biosynthesis and degradation. ORF4 encodes a protein homologous to an aspartate racemase from *Archaeoglobus fulgidus* (50% identity and 69% similarity; Song *et al.* 1999). Levansucrase and sucrose from *Z. mobilis* contribute with 30% and 70%, respectively, of the extracellular sucrose hydrolysing activity. *levU* (*sacB*) mutants are still able to grow in sucrose as the only carbon source, but they are not able to accumulate levan and also accumulate high levels of ethanol (Kannan *et al.* 1995). This suggests that sucrose hydrolysis products are diverted to fermentative catabolism in the absence of levan biosynthetic activity. On the contrary, *invB* (*sacC*) mutants accumulate three times more levan than the wild-type does, and ethanol production is diminished (Senthilkumar *et al.* 2004).

The gene that encodes *G. diazotrophicus* SRT4 levansucrase (*lsdA*) is located in the chromosome as part of a putative operon, together with a gene that encodes an exolevanase (*lsdB*, Fig. 3b), a levan-hydrolysing enzyme. The 3' end of the *lsdA* gene contains a stem-loop structure that resembles a terminator that possibly controls *lsdB* gene expression. It has been reported that *lsdA* gene expression is constitutive, although its 5' noncoding region does not contain a canonical consensus sequence typical of prokaryotic promoters (Hernández *et al.* 2000). It is not known under which conditions *lsdB* is transcribed, or if it can be transcribed at all. *lsdA* shows restriction fragment length polymorphisms (Hernández *et al.* 2000) among strains isolated from Australia, Brazil, Cuba or México, which show low genetic variability by multilocus enzyme electrophoresis typing (Caballero-Mellado *et al.* 1995). Near the 3' end of *lsdB*, there is a cluster of genes that encode components of a type II secretion system, probably constituting an operon (Arrieta *et al.* 2004). Type II secretion systems are involved in exoenzyme and toxin secretion in Gram-negative bacteria. The role of type II secretion system in levansucrase secretion in *G. diazotrophicus* has been demonstrated by the

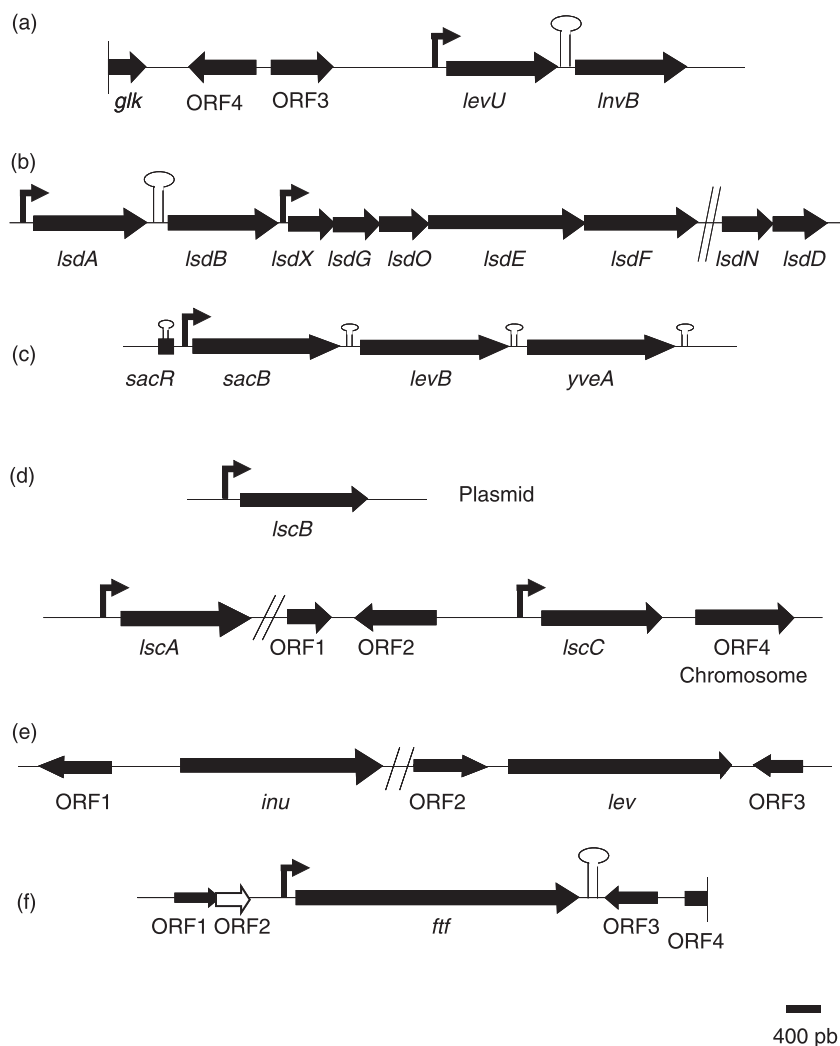


Figure 3 Structural organization of fructosyltransferase genes (a) *Zymomonas mobilis*, adapted from Song et al. 1999. (b) *Gluconacetobacter diazotrophicus*, adapted from Arrieta et al. 2004; *lsdA*, levansucrase; *lsdB*, exolevanase; *lsdX*, *lsdG*, *lsdO*, *lsdE*, *lsdF*, *lsdH*, *lsdI*, *lsdJ*, *lsdL*, *lsdM*, *lsdN* y *lsdD* type II secretion system proteins. (c) *Bacillus subtilis* adapted from Pereira et al. 2001. (d) *Pseudomonas s. phaseolicola* adapted from Li and Ullrich 2001. (e) *Lactobacillus reuteri* adapted from Van Hijum et al. 2002. (f) *Streptococcus mutans* adapted from Shiroza and Kuramitsu 1988.

analysis of *lsdG*, *lsdO* and *lsdF* gene disruption, which reduces extracellular levan accumulation and increases intracellular activity of levansucrase by a factor of 4 (Arrieta et al. 2004). The association of *lsdA*–*lsdB* and type II secretion system putative operons in the same locus and their relationship with levansucrase secretion suggest that they are part of a genomic island related to levan metabolism.

The gene that encodes *B. subtilis* QB112 levansucrase (*sacB*) is located in the chromosome as part of a tricistronic operon [*sacB*–*yveB*(*levB*)–*yveA*, Pereira et al. 2001]. As in previous examples, in the 3' region of *sacB*, there is a stem-loop structure that resembles a transcriptional terminator. Similar structures are present at the 3' ends of *yveB* (*levB*) and *yveA* (Fig. 3c). *yveB* encodes an

endolevanase that generates levansucrose from levan. Apparently, levansucrose is not metabolized by *B. subtilis*, thus suggesting that it is used as a signal molecule (Daguer et al. 2004). *yveA* encodes for a putative membrane protein with unknown function.

Pseudomonas s. phaseolicola strain PG4180 contains three genes that encode levansucrases, *lscA*, *lscB* and *lscC* (Fig. 3d). *lscA* is located at the chromosome and seems to be nonfunctional. *lscB* is expressed from the native plasmid p4180D and encodes an extracellular levansucrase that is secreted into the culture medium. *lscC* is also found at the chromosome and encodes a periplasmic levansucrase. The three genes share 95% similarity and 86% identity (Li and Ullrich 2001). The same authors have also found multiple isozymes in several pathogens of

Ps. syringae. It is likely that the allelic genes in strain PG4180, as well as the isozymes in different pathovars, are generated by duplication events to generate paralog genes, as has been reported for other genes in *Ps. syringae* (Sawada *et al.* 2002). Structural analysis of levans accumulated, as well as physiological and pathological behaviour of mutants in *Ps. syringae*, will help to elucidate the ecological role of each gene product.

Lactobacillus reuteri 121 contains genes that encode levansucrase (*lev*) and inulosucrase (*inu*) (Fig. 3e). At the 5' end of the levansucrase gene, there is an ORF2 that encodes for a protein highly similar (41% identity, 60% similarity) to a hypothetical protein NMA1791 from *Neisseria meningitidis*. At the 3' end of *lev*, there is an ORF3 that shares 59 amino acids (74% identity, 89% similarity) with a transposase of *Lactobacillus casei*, and some similarity with a Rho factor from *Neisseria gonorrhoeae* and the catalytic domain of an integrase from HIV-1 (Van Hijum *et al.* 2004). It is not clear if this ORF3 is related to genetic mobility of the locus. In the 5' region of *inu*, there is an ORF1 that encodes a protein similar (34% identity, 54% similarity in 279 amino acids) to a phosphoesterase from *Cl. acetobutylicum* (Van Hijum *et al.* 2002).

The gene that encodes *S. mutans* fructosyltransferase (*ftf*) is located at the chromosome and is surrounded by several ORFs with unknown function (Fig. 3f). In the 3' region of *ftf*, there is a stem-loop structure that could function as a transcriptional terminator for *ftf* or ORF3. ORF2 and ORF3 contain DNA-binding motifs, and ORF4 partial sequence is similar to that of *gtfB* from strain GS-5, which suggests that it encodes an extracellular protein (Shiroza and Kuramitsu 1988).

Microbial fructosyltransferase gene expression

Control of levansucrase gene expression has been extensively studied in only four bacteria, *Erw. amylovora*, *Strep. mutans*, *B. subtilis* and *R. aquatilis*. In *Erw. amylovora*, *B. subtilis* and *Strep. mutans*, levansucrase gene expression is under the control of two-component or similar sensor-regulator systems. The two-component systems are common mechanisms that control gene expression in bacteria, and are composed of a transmembrane sensor protein with protein kinase activity and a response regulator protein. The sensor protein binds a signal molecule, which promotes phosphorylation of the response regulator protein, which activates transcription or other cellular responses. The sensor-activator proteins related to microbial fructosyltransferase gene expression are: RcsC–RcsB in *Erw. amylovora*, CovS–CovR (VicK–VicR) in *Strep. mutans* and SacX–SacY and DegS–DegU in *B. subtilis* (Fig. 4). The particularities of each species are described below.

Although RcsC–RcsB was originally identified as a two-component system, these proteins are considered as members of a complex phosphorelay signalling pathway involved in capsule biosynthesis, biofilm formation and virulence and pathogenesis in several Gram-negative bacteria (Majdalani and Gottesman 2006). It is not yet clear what is specifically sensed by RcsC sensor protein in *Erw. amylovora* Ea1/79. Phosphorylated RcsB activates the expression of genes involved in the synthesis of amylovoran (a heteropolysaccharide composed of galactose and glucuronic acid units) but represses the expression of *lsc* (Fig. 4a, Bereswill and Geider 1997). Two other independent transcriptional regulators have been described in *Erw. amylovora* for levansucrase gene expression control. RlsA is a transcriptional activator of *lsc* that is similar to the LysR family, which includes the helix-turn-helix DNA-binding domain in the N-terminal region (Zhang and Geider 1999). RlsB is a transcriptional activator similar to LsrS in *R. aquatilis* (see below) and two members of the superfamily of zinc-finger-containing transcriptional activators Ogr of P2 phage, which control the expression of late genes (Du and Geider 2002).

The CovS–CovR (VicK–VicR) two-component system regulates virulence gene expression in both group A and group B streptococci (Churchward 2007), and has been described as a positive control mechanism of *ftf* expression in *Strep. mutans* strains NG8 and UA159. The role of CovR has been confirmed by disruption of the corresponding gene in strain NG8. The mutant increases the accumulation, by a factor of three, of an exopolysaccharide (EPS) constituted by glucose and glucuronic acid, but not by fructose (Lee *et al.* 2004). In strain UA159, disruption of *vicR* is lethal, while *vicK* null mutants show decreased expression of genes that encode fructosyltransferase, glucosyltransferase and glucan-binding protein, form aberrant biofilms and have reduced genetic competence (Senadheera *et al.* 2005).

In *B. subtilis*, SacX is a putative sucrose permease that is related to the sugar phosphotransferase system. It also functions like a sensor protein in the SacX–SacY phosphorylation cascade. SacY in *B. subtilis* has the particular feature of joining to levansucrase-encoding *sacB* and endolevanase-encoding *levB* (*yveB*) mRNAs, but with different mechanisms. SacY participates in an anti-termination mechanism by interacting with *sacRt* internal transcriptional terminator in the 5' region of *sacB* mRNA (Crutz *et al.* 1990). Additionally, SacY N-terminal domain has high affinity for a sequence motif in *levB* mRNA (5'-AAAGCAGGCAA-3'); this complex activates transcription of the *sacB-yveB(levB)-yveA* operon by an autogenous control mechanism of anti-termination (Fig. 4a, Daguer *et al.* 2004). The DegS–DegU two-component system is activated by salt stress and exerts a dual

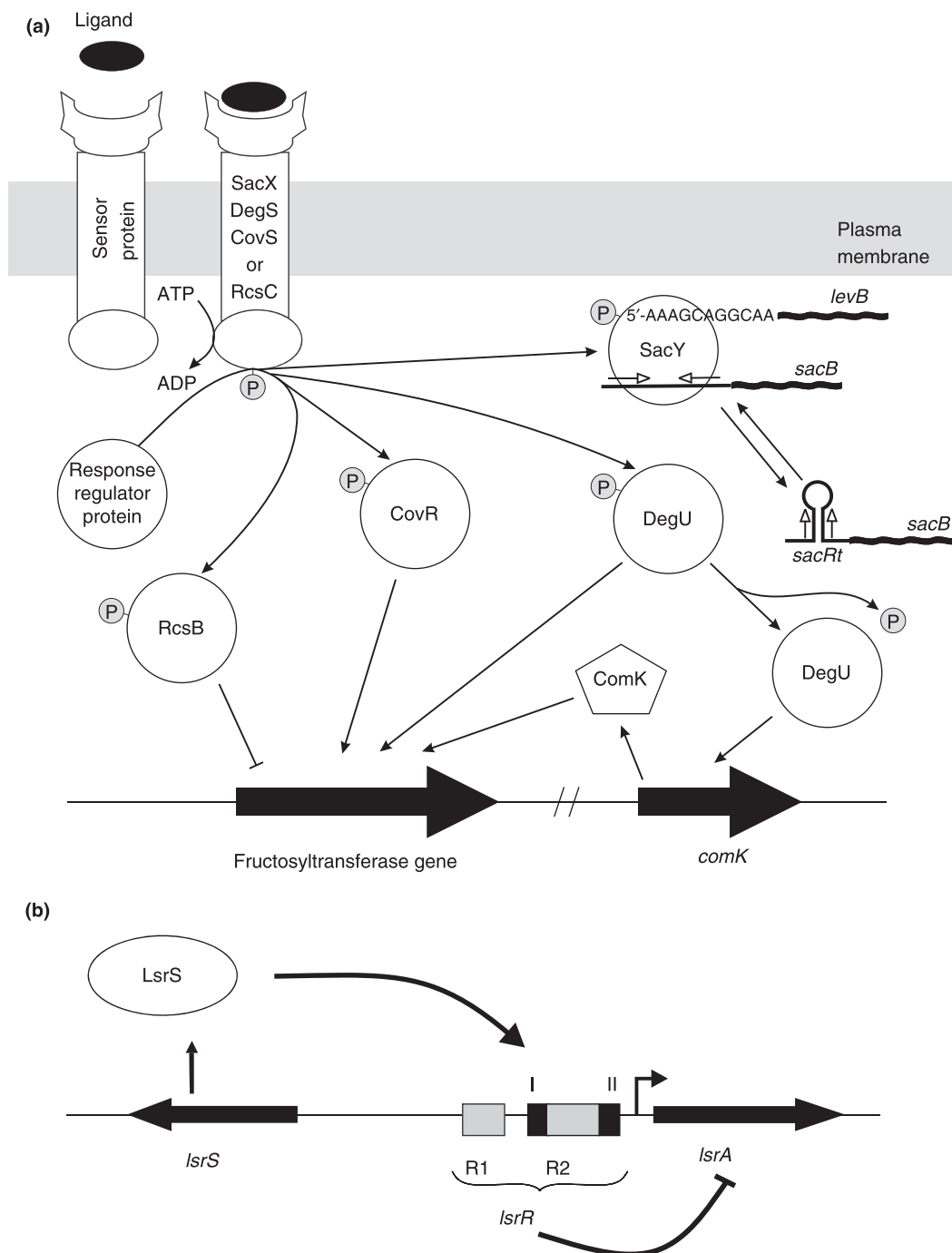


Figure 4 Regulation of bacterial fructosyltransferase gene expression. (a) Two-component systems and phosphorelay components in *B. subtilis* (SacX–SacY and DegS–DegU), *Streptococcus mutans* (CovS–CovR/VicK–VicR) and *Erwinia amylovora* (RcsC–RcsR). (b) Transcriptional regulation of *lsrA* expression in *Rahnella aquatilis*. Arrowheads mean activation, perpendicular arrowheads mean inhibition (modified from Seo et al. 2002).

control over *sacB* expression. Phosphorylated DegU activates transcription of *sacB* and *aprE* (a gene that encodes subtilisin), while dephosphorylated DegU activates *comK* transcription. ComK acts as a transcriptional activator of *sacB* (Fig. 4a, Kunst and Rapoport 1995).

In *R. aquatilis* ATCC33071, the LsrS protein is a functional homolog of RlsB from *Erw. amylovora* (Du and Geider 2002; Seo et al. 2002), and functions as a positive regulator of *lsrA* expression during the stationary phase of growth. In the 5' region of the *lsrA*, the *lsrR* region

contains two sequences designated II (5'-TG TAGTCAAC-TACACA-3') and I (5'-TGTATACATAATGGCACA-3') at positions -125 and -64 from the transcription start site, respectively, which are recognized by the LsrS activator protein. Two other regions detected by deletion analysis, R1 and R2, located at positions -204 to -175 and -67 to -55, respectively, are recognized by a hypothetical repressor protein that decreases *lsrA* expression by a factor of 10 (Seo *et al.* 2002).

There are no reports regarding the mechanisms of regulation of fungal fructosyltransferase gene expression, but there should be at least cell-specific control because fructosyltransferase activity has only been detected in conidia (Heyer and Wendenburg 2001).

Biological role of microbial fructosyltransferases and fructans

Most bacteria that biosynthesize fructans interact with eukaryotic hosts. *Pseudomonas s. phaseolicola* is a recognized pathogen of soybean, whilst *Erw. amylovora* is one of the pear and apple plants. *Actinomyces naeslundii*, *Act. viscosus*, *Strep. mutans* and *Strep. salivarius* are commonly found in the oral cavity, associated with dental plaque formation, and are therefore considered causal agents of dental caries. Fructan-producing bacteria are also found in symbiotic associations with plants, as is the case of *G. diazotrophicus* with sugarcane, *Burkholderia pseudomallei* with maize and *Z. mobilis* with agave. Levan-producing bacteria *B. subtilis* and *R. aquatilis* are found in soil, but their interactions with the environment are also related to the presence of fructans.

The role of microbial fructans has been elucidated by analysing the effect of gene disruption of fructan-biosynthesizing enzyme-encoding genes. Bacteria with mutations in the fructosyltransferase genes have common features: (i) impaired ability to grow in sucrose as the sole carbon source if the fructosyltransferase is the only enzyme involved in sucrose hydrolysis, (ii) lack of the mucoid phenotype conferred by the presence of the levan and (iii) changes in the way the bacteria interact with their close environment.

Streptococcus mutans strain V403 is an inhabitant of the human oral cavity, which is involved in the development of dental caries. Disruption of the *ftf* gene leads to a decrease in virulence to c. 70% of the cariogenic activity of the wild-type strain, which is measured as the ability to produce caries in gnotobiotic rats (Schroeder *et al.* 1989). Reduction of fructan accumulation in the mutant strain may affect virulence in *Strep. mutans* because fructans are commonly used by this species as a reserve carbohydrate. However, there is contrasting evidence on the role of fructans in colonization of teeth. Schroeder *et al.*

(1989) have observed that mutant strains are not affected in their ability to adhere to inert surfaces, but they produce larger quantities of an EPS formed with glucose units. Rozen *et al.* (2004) have shown that the ability to form biofilms by *Strep. mutans* GS-5 is dependent on carbon source. Biofilm depth is thicker in sucrose (70 µm) than in glucose (22 µm) or fructose (21 µm) as carbon sources. This subtle difference in biofilm formation may account for the altered virulence in *Strep. mutans* V403 deficient in fructosyltransferase activity, which is also impaired in sucrose utilization (Schroeder *et al.* 1989). In *Strep. mutans* GS-5, the fructosyltransferase-encoding gene is upregulated in a biofilm environment when compared with that in planktonic culture. Genes that encode glucosyltransferases, glucan-binding protein and VicR response regulator protein are also upregulated during biofilm formation. Addition of sucrose to the biofilm environment produces a further increase in the expression of the above genes (Shemesh *et al.* 2007).

Erwinia amylovora is a pathogen of Pomoideae plants such as apple, pear and rose. Disruption of the levansucrase-encoding gene results in an increase in the incubation period prior to the appearance of symptoms of fireblight disease, after inoculation of pear seeds with the mutant strain. The mutant strain took 10 days to develop symptoms, while the wild-type developed them in 3–4 days. This suggests that levan or levansucrase activity acts as a virulence factor in this pathogen (Geier and Geider 1993).

Pseudomonas s. phaseolicola is the causal agent of blight disease in soybean leaves. A mutant strain with disruption of the levansucrase-encoding gene was still able to infect the leaves but with a reduction in symptom severity and the number of bacteria isolated from the infected leaves, thus suggesting that levansucrase acts also as a virulent factor in this pathogen (Li and Ullrich 2001). Expression of the levansucrase-encoding gene *lscB* is increased at 18°C, a condition that is coincident with its ability to cause the disease in fields with low ambient temperatures and high humidity (Li *et al.* 2006). Levansucrase has been detected in the intercellular spaces of microcolonies during the initial phase of growth or early biofilm formation (Laue *et al.* 2006).

Paenibacillus polymyxa is a nitrogen-fixing rhizosphere bacterium associated with wheat, sorghum and millet. Bezzate *et al.* (2000) have reported that there was no significant difference in the number of bacteria associated with wheat rhizospheres when they compared the wild-type strain with a mutant defective in levansucrase production. However, they have observed that rhizospheres from mutant-inoculated plants contained less soil aggregated to the root.

In the case of *B. subtilis*, a soil and rhizosphere bacterium, Daguer *et al.* (2004) have proposed an interesting

role for levan. *Bacillus subtilis* contains genes that encode levansucrase (*sacB*) and levanase (*levB*). Levanobiose, the product of levan hydrolysis by levanase, is not transported into *B. subtilis* cells, therefore, it accumulates in the extracellular space as levan does. Levanobiose could thus act as a signalling molecule within *B. subtilis* in soil to modulate survival functions, or between *B. subtilis* and other microorganisms or plants as part of a molecular dialog to establish the corresponding interactions. Monosaccharides (such as glucose) or disaccharides (sucrose or trehalose) are recognized as signalling molecules that regulate gene expression related to carbon metabolism, growth and development in plant cells. Also, FOSs have been implicated as signalling molecules in the defense of plants against pathogenic bacteria (Van den Ende *et al.* 2004). Plants have fructan exohydrolytic enzyme activity that hydrolyse long-chain fructans to fructose. As bacterial levan is toxic when produced in plant tissues, it is possible that extracellular fructan exohydrolytic enzymes are involved in detoxification by elimination of bacterial levans from plant pathogens such as *Erw. amylovora* and *P. syringae* (Van den Ende *et al.* 2004).

Lactobacillus spp. synthesize glucan and fructan polymers are common inhabitants of the mammalian and avian gastrointestinal tract. The role of the respective glycosyltransferases has been analysed by insertional inactivation of the genes that encode glucosyltransferase (*gtfA*) and inulosucrase (*inu*) in *Lact. reuteri* TMW1.106 strain. Disruption of the fructosyltransferase-encoding gene (*ftfA*) has been analysed in *Lact. reuteri* LTH5448 strain. Inactivation of *gtfA* and *inu* resulted in impaired sucrose utilization and altered sucrose turnover and growth rates at short times of growth (1 day). These effects were overcome after 2 days, possibly because of expression of alternative sucrose-metabolizing enzymes. In contrast, disruption of *ftfA* slightly affected sucrose utilization and growth, but not sucrose metabolism (Schwab *et al.* 2007). Auto- and co-aggregation with several lactobacilli strains in the presence of sucrose were clearly altered in the *gtfA* mutant, but not in the *inu* and *ftf* mutants. Besides, both *gtfA* and *inu* mutations reduced biofilm formation, with a greater reduction being observed in the *gtfA* mutant. The *inu* mutant, but not the *gtfA* and *ftf* mutants, showed reduced competitiveness against its corresponding wild-type strain in gastrointestinal tract colonization (Walter *et al.* 2008). It is clear from these results that *gtfA* and *inu*, but not *ftf*, have an important role in colonization of the gastrointestinal tract. These results contrast with the behaviour of fructosyltransferase mutants described above, and open the question of how different sugar homopolymers interact and contribute to colonization.

Current advances in fructan research

Many efforts have been devoted to understand the structure–function relationship of the fructosyltransferases, to improve their accumulation or specific activity by means of protein engineering. For *Z. mobilis* and *G. diazotrophicus*, mutants have been obtained that have lost their sucrose hydrolytic activity but not their fructan polymerizing activity (Batista *et al.* 1999; Yanase *et al.* 2002). Recently, Trujillo-Toledo *et al.* (2004) have expressed *G. diazotrophicus* levansucrase in a genetically engineered strain of *Pichia pastoris*, a yeast commonly used in the utilization of sugarcane molasses to obtain alcohol. The fructosyltransferase-encoding gene of *Aspergillus sydowii* IAM 2544 has also been successfully expressed in *E. coli*, the invertase-defective yeast strain YSH 2.64-1A and transgenic potato plants (Heyer and Wendenburg 2001). Recovery is an important step in polymer production. It has recently been reported that addition of 2-methyl, 2-propanol (an organic solvent miscible in water) to a final concentration of 50% (v/v) in a fermentation vessel, increased levansucrase activity by 35% and precipitated levan as an hydrogel that was easily recovered from the vessel in continuous culture (Castillo and López-Munguía 2004).

Plant fructans confer protection against cold and water stress by stabilizing the structure of cell membranes under these conditions. The protective role of fructans has been analysed using liposomes as a model. FOSs with a DP of 2–7 stabilize liposomes after liophilization. The protective effect was increased with the DP (Hinch *et al.* 2002).

Microbial fructans have also attracted the interest of research groups because of their nutraceutical properties as: (i) natural noncaloric sweeteners, (ii) dietetic soluble fibre, (iii) prebiotic promoters of bifidobacterial growth, which is related to pH regulation mediated by short-chain fatty-acid accumulation, (iv) promoters of mineral absorption, (v) immunomodulators and (vi) anti-carcinogens, as well as for their benefits as prebiotics in farm animals and pet feed.

Levansucrase-encoding genes are also useful as tools for molecular biology. The *B. subtilis* levansucrase-encoding gene (*sacB*) expressed in *Mycobacterium smegmatis* kills the bacteria when they are grown in 10% sucrose. Levan accumulates in the space between the plasma membrane and the mycolic-acid layer that forms a pseudoperiplasmic space that is toxic to the cell. Therefore, *B. subtilis* *sacB* gene may be used as a counterselective marker in *Myco. smegmatis* (Pelicic *et al.* 1996).

Conclusions and future directions

The structural diversity of fructans implies a wide variety of specific applications. Therefore, understanding their

mechanism of biosynthesis and its regulation will allow the engineering of fructosyltransferases with the ability to synthesize fructans with the desired DP and type of glycosidic linkages. For example, the production of sugar from cane or beet has been affected by the increasing acceptance of low-calorie sweeteners obtained from maize. A novel approach that will aid the economic recovery of this industry will be to express microbial fructosyltransferases in sugarcane or beet, to obtain fructans of low DP, which are generally accepted as sweeteners. Bacterial genomics have provided a rich source of fructosyltransferase-encoding gene sequences that will help in performing detailed phylogenetic analysis and prediction of structure–function relationships. The biological role of fructans is also a major topic of research because of their role in human, animal and plant pathogens and symbionts. Understanding the role of fructans in biofilm formation and in their interaction with other bacteria will contribute to design strategies to prevent or improve biofilm formation, either to block the colonization of the host by pathogenic bacteria or to promote host interaction with beneficial bacteria.

Two emerging issues about fructosyltransferase gene organization and evolution are of particular interest. First, the presence of multiple copies of fructosyltransferase genes in *P. s. pathovars*, the high similarity of the Gram-positive *Leuc. citreum* and *Act. naeslundii* with Gram-negative fructosyltransferases and the chimeric nature of *Leuc. citreum* inulosucrase suggest that fructosyltransferases have been subjected to gene duplication and/or horizontal transfer events that have contributed to their variability. A second issue is related to fructosyltransferase gene organization in putative operons and genomic islands (as may be the case in *G. diazotrophicus*), together with the fact that some fructosyltransferase-encoding genes are co-regulated with virulence genes. Together, these suggest co-evolution of fructosyltransferase genes with other genes that are related to their function and open new opportunities for functional genomic studies.

Acknowledgements

We are grateful to C. Sosa-Aguirre for critical reading of the manuscript. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-México (J31278-B) and Coordinación de la Investigación Científica-U.M.S.N.H. to J.J.V.A. M.L.V.H. was the recipient of a PhD scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-México.

References

Arrieta, J.G., Sotolongo, M., Menéndez, C., Alfonso, D., Trujillo, L.E., Soto, M., Ramírez, R. and Hernández, L. (2004)

A type II protein secretory pathway required for levansucrase secretion by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *J Bacteriol* **186**, 5031–5039.

- Banguela, A. and Hernández, L. (2006) Fructans: from natural sources to transgenic plants. *Biotechnol Aplicada* **23**, 202–210.
- Batista, F.R., Hernández, L., Fernández, J.R., Arrieta, J., Menéndez, C., Gómez, R., Támara, Y. and Pons, T. (1999) Substitution of Asp-309 by Asn in the Arg-Asp-Pro (RDP) motif of *Acetobacter diazotrophicus* levansucrase affects sucrose hydrolysis but not enzyme specificity. *Biochem J* **337**, 503–506.
- Bereswill, S. and Geider, K. (1997) Characterization of the *rcsB* gene from *Erwinia amylovora* and its influence on exopolysaccharides synthesis and virulence of the fire blight pathogen. *J Bacteriol* **179**, 1354–1361.
- Bezzate, S., Aymerich, S., Chambert, R., Czarnes, S., Berge, O. and Heulin, T. (2000) Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere. *Environ Microbiol* **2**, 333–342.
- Caballero-Mellado, J., Fuentes-Ramírez, L.E., Reis, V.M. and Martínez-Romero, E. (1995) Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3008–3013.
- Cairns, A.J. (2003) Fructan biosynthesis in transgenic plants. *J Exp Bot* **54**, 549–567.
- Castillo, E. and López-Munguía, A. (2004) Synthesis of levan in water-miscible organic solvents. *J Biotechnol* **114**, 209–217.
- Chambert, R., Treboul, G. and Dedonder, R. (1974) Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* **41**, 285–300.
- Churchward, G. (2007) The two faces of Janus: virulence gene regulation by CovR/S in group A streptococci. *Mol Microbiol* **64**, 34–41.
- Crutz, A.M., Steinmetz, M., Aymerich, S., Richter, R. and Le Coq, D. (1990) Induction of levansucrase in *Bacillus subtilis*: an antitermination mechanism negatively controlled by the phosphotransferase system. *J Bacteriol* **172**, 1043–1050.
- Daguer, J.P., Geissmann, T., Petit-Glatron, M.F. and Chambert, R. (2004) Autogenous modulation of the *Bacillus subtilis* *sacB-levB-yveA* levansucrase operon by the *levB* transcript. *Microbiology* **150**, 3669–3679.
- Delzenne, N.M., Cani, P.D., Daubioul, C. and Neyrinck, A.M. (2005) Impact of inulin and oligofructose on gastrointestinal peptides. *Br J Nutr* **93**, S157–S161.
- Du, Z. and Geider, K. (2002) Characterization of an activator gene upstream of *lsc*, involved in levan synthesis of *Erwinia amylovora*. *Physiol Mol Plant Pathol* **60**, 9–17.
- Ebisu, S., Kato, K., Kotani, S. and Misaki, A. (1975) Structural differences in fructans elaborated by *Streptococcus mutans* and *Strep. salivarius*. *J Biochem* **78**, 879–887.
- Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Ferrari, E. and Hoch, J.A. (1983) Cloning structural gene *sacB*, which codes for

- exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **153**, 1424–1431.
- Geier, G. and Geider, K.K. (1993) Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fire-blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiol Mol Plant Pathol* **42**, 387–404.
- Ghazi, I., Fernandez-Arrojo, L., Garcia-Arellano, H., Ferrer, M., Ballesteros, A. and Plou, F.J. (2007) Purification and kinetic properties of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *J Biotechnol* **128**, 204–211.
- Han, Y.W. (1990) Microbial levan. *Adv Appl Microbiol* **35**, 171–194.
- Hernalsteens, S. and Maugeri, F. (2008) Purification and characterization of a fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* **79**, 589–596.
- Hernández, L., Arrieta, J., Menendez, C., Vazquez, R., Coego, A., Suarez, V., Selman, G., Petit-Glatron, M.F. et al. (1995) Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem J* **309**, 113–118.
- Hernández, L., Sotolongo, M., Rosabal, Y., Menéndez, C., Ramírez, R., Caballero-Mellado, J. and Arrieta, J. (2000) Structural levansucrase gene (*lsdA*) constitutes a functional locus conserved in the species *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Arch Microbiol* **174**, 120–124.
- Hettwer, U., Gross, M. and Rudolph, K. (1995) Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *J Bacteriol* **177**, 2834–2839.
- Heyer, A.G. and Wendenburg, R. (2001) Gene cloning and functional characterization by heterologous expression of the fructosyltransferase of *Aspergillus sydowi* IAM 2544. *Appl Environ Microbiol* **67**, 363–370.
- Hincha, D.K., Zuther, E., Hellwege, E.M. and Heyer, A.G. (2002) Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. *Glycobiology* **12**, 103–110.
- Homann, A., Biedendieck, R., Götze, S., Jahn, D. and Seibel, J. (2007) Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochem J* **407**, 189–198.
- Kang, H.K., Seo, M.Y., Seo, E.S., Kim, D., Chung, S.Y., Kimura, A., Day, D.F. and Robyt, J.F. (2005) Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1727**, 5–15.
- Kannan, R., Mukundan, G., Ait-Abdelkader, N., Augier-Magro, V., Baratti, J. and Gunasekaran, P. (1995) Molecular cloning and characterization of the extracellular sucrase gene (*sacC*) of *Zymomonas mobilis*. *Arch Microbiol* **163**, 195–204.
- Kunst, F. and Rapoport, G. (1995) Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**, 2403–2407.
- Laue, H., Schenk, A., Li, H., Lambertsen, L., Neu, T.R., Molin, S. and Ullrich, M.S. (2006) Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology* **152**, 2909–2918.
- Lee, S.F., Delaney, G.D. and Elkhateeb, M. (2004) A two-component *covRS* regulatory system regulates expression of fructosyltransferase and a novel extracellular carbohydrate in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* **72**, 3968–3973.
- Lewis, D.H. (1993) Nomenclature and diagrammatic representation of oligomeric fructans – a paper for discussion. *New Phytol* **124**, 583–594.
- Li, H. and Ullrich, M.S. (2001) Characterization and mutational analysis of three allelic *lsc* genes encoding levansucrase in *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* **183**, 3282–3292.
- Li, H., Schenk, A., Srivastava, A., Zhurina, D. and Ullrich, M.S. (2006) Thermo-responsive expression and differential secretion of the extracellular enzyme levansucrase in the plant pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *FEMS Microbiol Lett* **265**, 178–185.
- Majdalan, N. and Gottesman, S. (2006) The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol* **59**, 379–405.
- Martínez-Fleites, C., Ortiz-Lombardía, M., Pons, T., Tarbouriech, N., Taylor, E.J., Arrieta, J.G., Hernández, L. and Davies, G.J. (2005) Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem J* **390**, 19–27.
- Meng, G. and Fütterer, K. (2003) Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat Struct Biol* **10**, 935–941.
- Morales-Arrieta, S., Rodríguez, M.E., Segovia, L., López-Munguía, A. and Olvera-Carranza, C. (2006) Identification and functional characterization of *levS*, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. *Gene* **376**, 59–67.
- Ohtsuka, K., Hino, S., Fukushima, T., Osawa, O., Kanematsu, T. and Uchida, T. (1992) Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1683. *Biosci Biotech Biochem* **56**, 1373–1377.
- Olivares-Illana, V., Wachter-Odarte, C., Le Borgne, S. and López-Munguía, A. (2002) Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: a *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin. *J Ind Microb Biotechnol* **28**, 112–117.
- Olivares-Illana, V., López-Munguía, A. and Olvera, C. (2003) Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase. *J Bacteriol* **185**, 3606–3612.
- Ozimek, L.K., Euverink, G.J.W., van der Maarel, M.J. and Dijkhuizen, L. (2005) Mutational analysis of the role of calcium ions in the *Lactobacillus reuteri* strain 121 fructosyltransferase (levansucrase and inulosucrase) enzymes. *FEBS Lett* **579**, 1124–1128.
- Pabst, M.J. (1977) Levan and levansucrase of *Actinomyces viscosus*. *Infect Immun* **15**, 518–526.

- Pellicic, V., Reyrat, J.M. and Gicquel, B. (1996) Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J Bacteriol* **178**, 1197–1199.
- Pereira, Y., Petit-Glatron, M.F. and Chambert, R. (2001) *yveB*, encoding endolevanase LevB, is part of the *sacB-yveB-yveA* levansucrase tricistronic operon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **147**, 3413–3419.
- Pollock, C.J. and Cairns, A.J. (1991) Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**, 77–101.
- Pons, T., Hernández, L., Batista, F.R. and Chinae, G. (2000) Prediction of a common β -propeller catalytic domain for fructosyltransferases of different origin and substrate specificity. *Protein Sci* **9**, 2285–2291.
- Pontis, H.G. (1990) Fructans. *Meth Plant Biochem* **2**, 353–369.
- Rehm, J., Willmitzer, L. and Heyer, A.G. (1998) Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*. *J Bacteriol* **180**, 1305–1310.
- Ritsem, T. and Smeekens, S.C. (2003) Engineering fructan metabolism in plants. *J Plant Physiol* **160**, 811–820.
- Roberfroid, M.B. (2005) Introducing inuline-type fructans. *Br J Nutr* **93**, S13–S25.
- Roberfroid, M.B. and Delzenne, N.M. (1998) Dietary fructans. *Annu Rev Nutr* **18**, 117–143.
- Rozen, R., Bachrach, G. and Steinberg, D. (2004) Effect of carbohydrates on fructosyltransferase expression and distribution in *Streptococcus mutans* GS-5 biofilms. *Carbohydr Res* **339**, 2883–2888.
- Sawada, H., Kanaya, S., Tsuda, M., Susuki, F., Azegami, K. and Saitou, N. (2002) A phylogenomic study of the OCTase genes in *Pseudomonas syringae* pathovars: the horizontal transfer of the *argK-tox* cluster and the evolutionary history of OCTase genes on their genomes. *J Mol Evol* **54**, 437–457.
- Schroeder, V.A., Michalek, S.M. and Macrina, F.L. (1989) Biochemical characterization and evaluation of virulence of a fructosyltransferase-deficient mutant of *Streptococcus mutans* V403. *Infect Immun* **57**, 3560–3569.
- Schwab, C., Walter, J., Tannock, G.W., Vogel, R.F. and Gänzle, M.G. (2007) Sucrose utilization and impact of sucrose on glycosyltransferase expression in *Lactobacillus reuteri*. *Syst Appl Microbiol* **30**, 433–443.
- Seibel, J., Moraru, R., Götze, S., Buchholz, K., Na’amnieh, S., Pawlowski, A. and Hecht, H.-J. (2006) Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase). *Carbohydr Res* **341**, 2335–2349.
- Senadheera, M.D., Guggenheim, B., Spatafora, G.A., Huang, Y.C., Choi, J., Hung, D.C.I., Treglown, J.S., Goodman, S.D. *et al.* (2005) A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects *gtfBCD*, *gbpB*, and *ftf* expression, biofilm formation, and genetic competence development. *J Bacteriol* **187**, 4064–4076.
- Senthilkumar, V., Rameshkumar, N., Busby, S.J.W. and Gunasekaran, P. (2004) Disruption of the *Zymomonas mobilis* extracellular sucrose gene (*sacC*) improves levan production. *J Appl Microbiol* **96**, 671–676.
- Seo, J.W., Jang, K.H., Kang, S.A., Song, K.B., Jang, E.K., Park, B.S., Kim, C.H. and Rhee, S.K. (2002) Molecular characterization of the growth phase-dependent expression of the *lsrA* gene, encoding levansucrase of *Rahnella aquatilis*. *J Bacteriol* **184**, 5862–5870.
- Shemesh, M., Tam, A. and Steinberg, D. (2007) Expression of biofilm-associated genes of *Streptococcus mutans* in response to glucose and sucrose. *J Med Microbiol* **56**, 1528–1535.
- Shiroza, T. and Kuramitsu, H.K. (1988) Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* fructosyltransferase gene and flanking regions. *J Bacteriol* **170**, 810–816.
- Song, D.D. and Jacques, N.A. (1999) Purification and enzymic properties of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Biochem J* **341**, 285–291.
- Song, K.B., Seo, J.W., Kim, M.G. and Rhee, S.K. (1998) Levansucrase of *Rahnella aquatilis* ATCC33071. *Ann N Y Acad Sci* **864**, 506–511.
- Song, K.B., Seo, J.W. and Rhee, S.K. (1999) Transcriptional analysis of *levU* operon encoding saccharolytic enzymes and two apparent genes involved in amino acid biosynthesis in *Zymomonas mobilis*. *Gene* **232**, 107–114.
- Tajima, K., Tanio, T., Kobayashi, Y., Khono, H., Fujiwara, M., Shiba, T., Erata, T., Munekata, M. *et al.* (2000) Cloning and sequencing of the levansucrase gene from *Acetobacter xylinum* NCI 1005. *DNA Res* **7**, 237–242.
- Tieking, M., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F. and Gänzle, M.G. (2005) Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Appl Microbiol Biotechnol* **66**, 655–663.
- Trujillo-Toledo, L.E., Gómez-Riera, R., Banguela-Castillo, A., Soto-Romero, M., Arrieta-Sosa, J.G. and Hernández-García, L. (2004) Catalytic properties of N-glycosylated *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase produced in yeast. *Electronic J Biotechnol* **7**, 115–123.
- Van den Ende, W., De Coninck, B. and van Laere, A. (2004) Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense? *Trends Plant Sci* **9**, 523–528.
- Van Hijum, S.A.T.F., van Geel-Schutten, G.H., Rahaoui, H., van der Maarel, M.J.E.C. and Dijkhuizen, L. (2002) Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl Environ Microbiol* **68**, 4390–4398.
- Van Hijum, S.A.T.F., Szalowska, E., van der Maarel, M.J.E.C. and Dijkhuizen, L. (2004) Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology* **150**, 621–630.
- Van Hijum, S.A.F.T., Kralj, S., Ozimek, L.K., Dijkhuizen, L. and van Geel-Schutten, I.G.H. (2006) Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes

- from lactic acid bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 157–176.
- Verdonk, J.M.A.J., Shim, S.B., van Leeuwen, P. and Verstegen, W.A. (2005) Application of inulin-type fructans in animal feed and pet food. *Br J Nutr* **93**, S125–S138.
- Vijn, I. and Smeekens, S. (1999) Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol* **120**, 351–359.
- Walter, J., Schwab, C., Loach, D.M., Gänzle, M.G. and Tannock, G.W. (2008) Glucosyltransferase A (*gtfA*) and inulosucrase (*inu*) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, *in vitro* biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Microbiology* **154**, 72–80.
- Yanase, H., Iwata, M., Nakahigashi, R., Kita, K., Kato, N. and Tonomura, K. (1992) Purification, crystallization and properties of the extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**, 1335–1337.
- Yanase, H., Maeda, M., Hagiwara, E., Yagi, H., Taniguchi, K. and Okamoto, K. (2002) Identification of functionally important amino acid residues in *Zymomonas mobilis* levansucrase. *J Biochem* **132**, 565–572.
- Zhang, Y. and Geider, K. (1999) Molecular analysis of the *rlsA* gene regulating levan production by the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiol Mol Plant Pathol* **54**, 187–201.

Fructanos: prebióticos versátiles

Ma. de Lourdes Velázquez Hernández, Víctor Manuel Baizabal Aguirre,
Alejandro Bravo-Patiño, Martha Patricia Chávez Moctezuma,
Juan José Valdez Alarcón

En los últimos años se ha intensificado la investigación en los prebióticos.

Los prebióticos son compuestos alimentarios no digeribles que benefician al consumidor mediante la estimulación selectiva de una población bacteriana particular en el colón. Los prebióticos de tipo fructano se han estudiado ampliamente por fácil obtención a partir de bacterias o plantas. Los fructanos son polímeros de fructosa con enlaces $\beta(2 \rightarrow 6)$ y/o $\beta(2 \rightarrow 1)$ sintetizados a partir de la sacarosa. El enlace de estos polímeros es hidrolizado por las enzimas de bifidobacterias y por la tanto funcionan como un alimento edulcorante no calorigénico. Entre los beneficios del consumo de los fructanos son: a) permiten obtener una frecuencia normal de evacuaciones fecales, disminuir el estreñimiento y tener una flora intestinal saludable; b) estimulan el crecimiento y/o la actividad metabólica de las bifidobacterias; c) incrementan la producción de ácidos orgánicos de cadena corta; d) promueven la biodisponibilidad de minerales; e) disminuyen las concentraciones de triglicéridos y colesterol en el suero y f) disminuyen el riesgo de cáncer de colon. Por estas razones se ha intensificado la producción de alimentos con fructanos como productos bajos en calorías, una forma de fibra natural y con beneficios para la salud debido a su consumo.

INTRODUCCIÓN

El hombre ha tratado por años de desarrollar productos alimentarios nuevos, y analizar los beneficios que puede brindar su consumo. Cualquier producto alimentario que mejore la absorción de nutrimentos en el intestino, ofrece beneficios múltiples para la salud del humano. Los prebióticos son compuestos alimentarios no digeribles que benefician al consumidor mediante la estimulación selectiva del crecimiento o actividad de una población bacteriana particular en el colón (Gibson

and Roberfroid, 1995). Para que una sustancia sea considerada como prebiótico debe reunir las siguientes características: a) no debe ser hidrolizada o absorbida en el tracto gastrointestinal; b) debe ser un sustrato selectivo para una población particular de microorganismos comensales benéficos en el colón, que estimule su crecimiento y/o active su metabolismo; c) como una consecuencia de modificar la abundancia relativa de una población particular en la flora microbiana colónica, el organismo debe adquirir una condición mas

saludable; y d) debe inducir efectos locales (en el lumen del tracto gastrointestinal) o sistémicos que sean benéficos para la salud del hospedero (Simmering and Blaut, 2001). El uso de los prebióticos sobre probióticos (microorganismos vivos como parte del alimento) ha resultado práctico, porque se evitan los problemas de conservación y mantenimiento de la viabilidad de estos últimos. Tal es el caso de los productos lácteos como el yogurt, los quesos o el jocoque, que requieren refrigeración. Algunas sustancias que actúan como prebióticos son ciertos péptidos y proteínas y determinados lípidos (éteres y ésteres). Los prebióticos más estudiados son carbohidratos no digeribles que ayudan a la función del intestino grueso, por ejemplo los fructanos, xilooligosacáridos, galactooligosacáridos e isomaltooligosacáridos.

El concepto de prebióticos se originó precisamente de la utilización de los fructanos en la alimentación, al observar que estos no eran digeribles y que eran la fuente de carbono que estimula el crecimiento de bifidobacterias, las cuales son consideradas benéficas para la salud humana (Simmering and Blaut, 2001). Además, cierto tipo de fructanos con grado de polimerización (GP) de 3 a 6 se empezaron a utilizar como edulcorantes alternativos de los alimentos, debido a su alto contenido de fructosa. Por esta razón en Japón se producen actualmente de manera comercial edulcorantes compuestos de mezclas de FOS en los productos llamados Neosugar®, desde 1982 (Han, 1990) y Meioligo®, desde 1983 (Hirayama, 2002). En esta revisión se describen algunos de los avances en la investigación de los beneficios que aporta el consumo de fructanos.

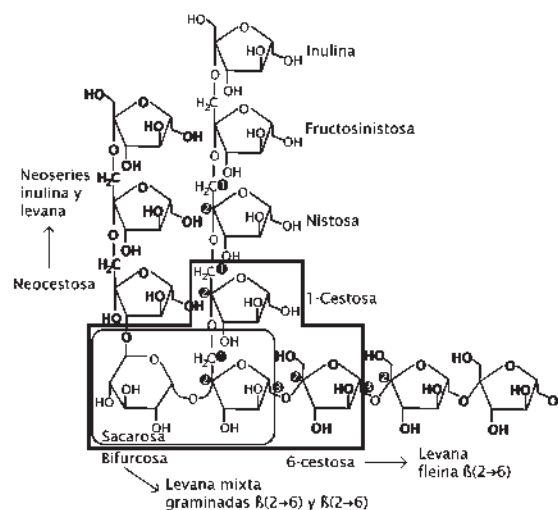
ESTRUCTURA DE LOS FRUCTANOS

Los fructanos son polímeros de fructosa derivados de la transfructosilación de la sacarosa y se clasifican en inulinas, levanas, y levanas mixtas o graminanas. A continuación se describe la estructura de cada uno de ellos (Lewis, 1993; Vijn and Smeekens, 1999).

Inulina. Son polímeros que en su mayoría se derivan de plantas, son lineales y presentan enlaces $\beta(2 \rightarrow 1)$. Los polímeros de la llamada “neoserie” de la inulina presentan enlaces de fructosa tanto en el carbono 1 como en el carbono 6 de la glucosa (Figura 1).

Levanas. Son polímeros producidos por bacterias, hongos y algunas plantas, con un GP > 60 unidades de fructosa, aunque en algunos casos las de origen bacteriano pueden presentar más de 100 unidades de fructosa. Las levanas se definen como polímeros lineales con enlaces $\beta(2 \rightarrow 6)$ aunque pueden presentar algunas ramificaciones con enlaces $\beta(2 \rightarrow 1)$, (ver Figura 1; Han, 1990). Los fructanos con enlaces $\beta(2 \rightarrow 6)$, derivados de plantas, suelen tener un GP < 100 y reciben el nombre de fleinas. La neoserie de las levanas presenta enlaces con los carbonos 1 y 6 del residuo de glucosa y se obtienen de plantas (Figura 1).

Figura 1



Levanas mixtas. Son polímeros que presentan tanto enlaces $\beta(2 \rightarrow 1)$ como $\beta(2 \rightarrow 6)$, se les encuentra en plantas y también se les conoce como graminanas.

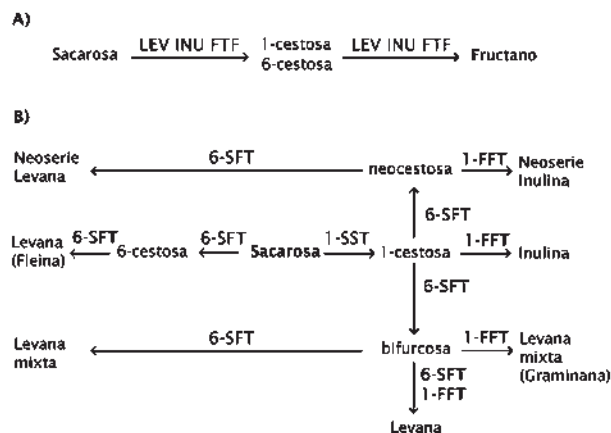
El término “fructooligosacáridos” (FOS) refiere a los fructanos de GP 2 a 9 los cuales se han utilizado ampliamente como prebióticos. Este término es independiente del tipo

de enlace que presentan y queda fuera de las definiciones descritas anteriormente, pero su uso es ampliamente utilizado en nutrición. Algunos fructanos considerados como FOS son la 1-cestosa (isocestosa), la 6-cestosa, la neocestosa y la bifurcosa que son los precursores de las inulinas, las levanas, las “neoserias” de inulinas y levanas y las levanas mixtas, respectivamente. (Figura 1).

BIOSÍNTESIS DE LOS FRUCTANOS

Los fructanos en bacterias y hongos son biosintetizados por una sola enzima con actividad de fructosiltransferasa (Figura 2A). Dependiendo de su mecanismo de reacción y del producto que generan, se clasifican en levansacarasas, inulosacarasas o fructosiltransferasas. En cambio, las plantas requieren de al menos dos enzimas para la biosíntesis de cada tipo de polímero.

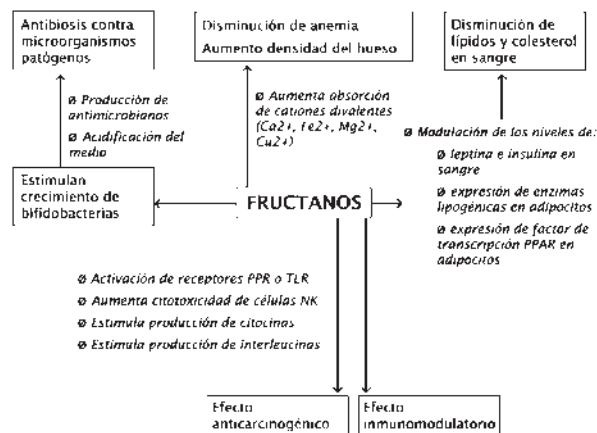
Figura 2



En todos los casos, la síntesis de fructanos utiliza inicialmente dos moléculas de sacarosa. En microorganismos la enzima correspondiente va adicionando secuencialmente residuos de fructosilo para extender la cadena. En plantas (Figura 2B), una primera actividad genera los trisacáridos 1-cestosa (sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa, 1-SST), bifurcosa, 6-cestosa (saca-

rosa:fructano 6-fructosiltransferasa, 6-SFT) o neocestosa (fructano:fructano 6G-fructosiltransferasa, 1-FFT). Posteriormente, en la extensión de la cadena participa una fructano:fructano 1-fructosiltransferasa (1-FFT, Vijn and Smeekens, 1999). El papel que desempeñan los fructanos en las plantas o bacterias que los biosintetizan se relaciona con la adaptación al medio ambiente (Velázquez-Hernández et al. 2009). En las plantas se relacionan con la tolerancia al frío y las sequia. La levana en bacterias patógenas de plantas (*Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*) o patógenas de mamíferos (*Streptococcus mutans*) se ha relacionado como un factor de virulencia en estos modelos, debido a la participación en la aparición de los síntomas. En bacterias de suelo se ha relacionado que funciona como una molécula señal de los productos de degradación de la levana (Velázquez-Hernández et al. 2009).

Figura 3



Los humanos no son capaces de digerir los fructanos en el intestino delgado, pero éstos son fermentados en el colon por la microflora residente. Son varios los beneficios que se obtienen al consumir los fructanos (Simmering and Blaut, 2001): a) permiten obtener una frecuencia normal de evacuaciones fecales, disminuir el estreñimiento y tener una flora intestinal saludable;

b) estimulan el crecimiento y/o la actividad metabólica de las bifidobacterias; c) incrementan la producción de ácidos orgánicos de cadena corta; d) promueven la biodisponibilidad de minerales; e) disminuyen las concentraciones de triglicéridos y colesterol en el suero y f) disminuyen el riesgo de cáncer de colon. Algunos de estos beneficios se relacionan entre sí como se muestra en la Figura 3, y han sido verificados cada uno de manera experimental. A continuación detallaremos cada uno de ellos.

LOS FRUCTANOS AYUDAN AL BUEN FUNCIONAMIENTO DEL INTESTINO

Los fructanos al ser compuestos no digeribles en el tracto digestivo humano, pero ser fermentados por bacterias de la flora colónica, brindan dos funciones fisiológicas directas al consumirlos: tener una frecuencia normal de evacuaciones y estimular el crecimiento de bifidobacterias que colonizan la región del colon y representan el 25% del total de la población en adultos y el 95% en recién nacidos (Gibson et al. 1995), por lo que se consideran la barrera principal contra infecciones. Las bifidobacterias producen varios antimicrobianos que son activos contra bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas (Rastall, 2005). Por ejemplo, las *Bifidobacteria* spp. secretan una sustancia similar a una bacteriocina que es activa contra *Clostridium* spp., *E. coli*, y otras bacterias patógenas, como *Listeria* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp. y *Vibrio cholerae*. Las bifidobacterias pueden fermentar los fructanos microbianos gracias a que presentan actividad de β -fructofuranosidasa (fructano-exohidrolasa) intracelular o extracelular (Rossi et al. 2005). Las bifidobacterias biosintetizan ácidos orgánicos como producto de la fermentación de los fructanos (acetato, lactato y ácidos grasos de cadena corta), lo cual disminuye el pH del colon e inhibe de esta manera el crecimiento de bacterias patógenas. Las bifidobacterias promueven la absorción de minerales y producen vitaminas del grupo

B, además de enzimas digestivas como la caseína fosfatasa y la lisozima (Gibson et al. 1995), con lo que se integran a la red metabólica compleja que conforman los microorganismos del tracto gastrointestinal.

Las bifidobacterias son microorganismos anaerobios estrictos, lo cual dificulta la preparación de productos alimentarios que contengan este tipo de bacterias para consumo humano. Así que es más factible consumir productos que estimulen la fermentación selectiva por estas bacterias. La ingestión de Actilight™ un producto francés con 44% de 1-kestosa, 46% de nistosa y 10% de 1F- β -fructofuranosil nistosa, en dosis de 2.5-10g/día en adultos saludables, indujo un aumento en el número de bifidobacterias proporcional a la cantidad ingerida de Actilight™, sin afectar el número de bacteroides, lactobacilos y enterobacterias, lo cual promueve una frecuencia normal de evacuaciones por día (Bouhnik et al. 2006). El efecto de disminución o inhibición de bacterias patógenas entéricas, importante en adultos, resulta mucho más relevante en infantes. En niños, el consumo de una dieta con 90% de galactooligosacáridos y 10% de FOS en concentración de 1 g/día estimulan el crecimiento de las bifidobacterias y, por lo tanto, aumenta la protección contra infecciones entéricas (Knol et al. 2005). Los fructanos como prebióticos y/o el consumo de alimentos que contienen bifidobacterias, suele ser ampliamente recomendados para la restauración de la flora del colon después de un tratamiento prolongado con antibióticos.

LOS FRUCTANOS AUMENTAN LA BIODISPONIBILIDAD DE MINERALES

El consumo de fructanos aumenta la absorción de Ca^{+2} , Mg^{+2} y Fe^{+2} . En ratas alimentadas con 15% de FOS (Hirayama, 2002), el aumento de la absorción de Ca^{+2} ocasiona un incremento en la densidad del hueso. La absorción de Fe^{+2} también se incrementa por el consumo de FOS. En ratas con anemia inducida por gastrectomía, la alimentación con FOS ocasiona una

recuperación de los niveles de hemoglobina en sangre (Hirayama, 2002). La absorción de Cu^{+2} aumenta en mujeres posmenopáusicas con dietas de 10 g/día de FOS, aunque se desconoce la importancia del Cu^{+2} en este estado fisiológico (Ducros et al. 2005). En un estudio para analizar cuantitativamente el efecto del consumo de FOS en la absorción de Ca^{+2} y Mg^{+2} , a ratas alimentadas con 3.7% de inulina se les administraron isótopos de Ca^{+2} y Mg^{+2} durante 4 días. Se observó un enriquecimiento del 10 al 20% de Ca^{+2} . La excreción de Ca^{+2} se incremento directamente con la edad de la rata, la absorción de Ca^{+2} fue menor en ratas viejas que en ratas jóvenes. El promedio de Ca^{+2} fue de 95-102 mg/l mostrando una tendencia al aumento (2%) con el consumo de inulina y disminuyó a mayor edad de la rata. El promedio de Ca^{+2} en hueso aumentó significativamente con la edad. El promedio de Mg^{+2} en suero fue de 16.9 – 18.2 mg/l mostrando una tendencia al aumento (6.7%) con el consumo de inulina, este efecto fue independiente de la edad de la rata (Coudray et al. 2005).

LOS FRUCTANOS DISMINUYEN LÍPIDOS EN SUERO

El consumo de fructanos trae otros beneficios como la disminución de lípidos en suero. Yamamoto y col., (1999) administraron levana de peso molecular alto (ca. 2,000,000); en dosis de 1% ó 5% a ratas y observaron una disminución de los niveles de colesterol en suero de 59% y 83%, respectivamente, lo cual se correlacionó con el aumento de la excreción de lípidos en heces. Lo anterior sugiere que la levana se une a los esteroides en el intestino grueso impidiendo su reabsorción. Estos resultados se complementan con evidencias de que la levana se une al taurocolato in vitro. Yamamoto y col., (1999) analizaron que la levana de peso molecular alto (ca. 2,000,000) que fue hidrolizada a levana de peso molecular menor (ca. 6,000) por los jugos gástricos in vitro, sin formar FOS. El jugo pancreático y las enzimas del intestino delgado no hidrolizaron esta levana.

Además al medir el pH de medios de cultivo con levana y diferentes especies de bifidobacterias (*Bifidobacterium vulgatus*, *B. infantis*, *B. leiberorum*, *B. bifidum*), no se observaron cambios en el pH, lo que sugiere que la levana (ca. 6,000) no es fermentada por bifidobacterias, como sucede con los FOS.

La disminución de lípidos en sangre es necesaria para mejorar la salud de personas con obesidad, por esta razón se ha estudiado el efecto de consumir levana en ratas obesas. En ratas alimentadas con una dieta rica en grasas suplementadas con 1, 5 y 10% de levana biosintetizada por *Zymomonas mobilis*, se observó una disminución en la ganancia de peso, proporcional al consumo de levana. Además, la leptina y la insulina, hormonas relacionadas con el control de la obesidad y la concentración de glucosa en sangre, recuperaron sus niveles normales en suero cuando se administró 10% de levana en la dieta rica en grasas (Kang et al. 2005). La leptina es una hormona secretada por el adipocito, que actúa como un factor de saciedad, es decir, tiene un papel en la homeostasis del peso corporal. La insulina es una hormona secretada por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas, funciona como un mensajero extracelular que ayuda a regular el metabolismo de la glucosa en animales. En los experimentos citados anteriormente, también se analizó la expresión de enzimas lipogénicas. Los niveles de expresión de la ácido graso sintetasa y de la acetil-CoA carboxilasa fueron más bajos cuando las ratas se alimentaron con levana. El factor de transcripción PPARs (receptores que activan la proliferación de peroxisomas) tienen un efecto importante en la homeostasis de lípidos, al regular la expresión de genes involucrados en su metabolismo. PPARs se expresa en hígado y en tejido adiposo blanco. En las ratas alimentadas con la dieta rica en grasas y 1, 5 y 10% de levana se observó que la expresión de PPARs en hígado fue menor que en las ratas alimentadas solo con grasas. La expresión de PPARs en el tejido adiposo blanco no mostró dife-

rencias con la de las ratas alimentadas con o sin levana (Kang et al. 2005). Con estos hallazgos se demostró que la dieta suplementada con levana disminuye la obesidad a pesar de una dieta rica en grasas, debido a la activación del metabolismo de lípidos y la supresión de la lipogénesis en el hígado.

EFFECTO ANTICARCINOGENICO DE LOS FRUCTANOS

Los fructanos pueden funcionar como anticarcinogénicos que actúan como factores de prevención en la iniciación y posible promoción del cáncer. En un estudio preliminar en ratas con carcinogénesis mamaria inducida con metilnitrosurea, mantenidas con una dieta del 15% de FOS o con inulina, la carcinogénesis se modulo de manera negativa. Se disminuyó el crecimiento de los tumores y la cantidad de los mismos (Taper and Roberfroid, 1999). Los FOS también reducen la incidencia de tumores de colon en ratones, debido a la modulación del ecosistema colónico (Pierre et al. 1997). Así, el tratamiento dietético con sustancias no tóxicas como los fructanos, parece ser accesible y libre de riesgos para los pacientes cuando se aplica como un factor adyuvante a los protocolos clásicos de terapias de cáncer humano (Taper and Roberfroid, 1999). Parte del efecto anticarcinogénico de los fructanos se debe a un incremento en la citotoxicidad de las células asesinas naturales (NK) que son las encargadas de eliminar las células tumorales. Adicionalmente, los fructanos pueden inducir la producción de citocinas moduladoras en las placas de Peyer del intestino o en los esplenocitos. La respuesta del sistema inmune innato a la presencia de fructanos puede deberse a que estimulan el crecimiento de algunas bacterias (especialmente bifidobacterias) que presentan en su superficie moléculas que son reconocidas por los receptores de tipo PRR (receptores de reconocimiento de patrones) o TLR (receptores de tipo Toll). La estimulación de los TRL induce la secreción de citocinas proinflamatorias. Adicionalmente, las bifidobacterias producen ácidos grasos de

cadena corta que son reconocidos por receptores acoplados a proteínas G y que suprimen la proliferación de linfocitos, inhiben la producción de citocinas por linfocitos Th1 y aumentan la producción de interleucina 10 (Watzl et al. 2005).

LOS FRUCTANOS EN LA DIETA DE ANIMALES DE GRANJA O DE COMPAÑÍA

El uso profiláctico de antibióticos como promotores del crecimiento y para evitar las enfermedades gastrointestinales en animales aumenta el riesgo de seleccionar cepas bacterianas multiresistentes. La eliminación de los antibióticos en la dieta animal condujo a la búsqueda de estrategias nuevas y más seguras para mejorar su salud a través de la alimentación, pero fue hasta hace apenas 20 años que se reconoció el efecto potencial de los prebióticos. Los fructanos del tipo de la inulina son los más comúnmente utilizados, sobre todo como fórmulas que sustituyen a la leche durante el destete temprano, común en los animales de granja y compañía. En el caso de los pollos, el tracto digestivo es prácticamente libre de microorganismos al nacer, por lo que el establecimiento de la flora intestinal se ve fuertemente influenciado con la dieta. El efecto de la inulina en los pollos es similar al reportado en los humanos, sobre todo en lo que respecta al incremento en la población de bifidobacterias y la disminución de poblaciones potencialmente patógenas, como *E. coli*, *Clostridium* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, etc. Aunado a lo anterior, se ha observado que una dieta rica en inulinas promueve cambios en la morfología de las células de la mucosa del intestino grueso en cerdos y una reducción significativa del olor de las heces en los perros (Verdonk et al. 2005).

El papel que desempeñan los fructanos en las plantas o bacterias que los biosintetizan se relaciona con la adaptación al medio ambiente (Velázquez-Hernández et al. 2009). En las plantas se relacionan con la toleran-

cia al frío y las sequia. La levana en bacterias patógenas de plantas (*Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*) o patógenas de mamíferos (*Streptococcus mutans*) se ha relacionado como un factor de virulencia en estos modelos, debido a la participación en la aparición de los síntomas (Velázquez-Hernández et al. 2009).

COMENTARIOS FINALES

A pesar de que los beneficios en el uso de fructanos como prebióticos se han documentado ampliamente, los mecanismos por los que los fructanos ocasionan tales efectos solo se han estudiado de manera parcial. Los avances más importantes se han dado con la comprensión de los fenómenos físicos, bioquímicos y microbiológicos asociados al consumo de fructanos en el intestino. Sin embargo, poco o nada es lo que se

sabe acerca de cómo pueden ocasionar cambios en los niveles de expresión de enzimas digestivas específicas o en la producción de hormonas. El uso de fructanos en la dieta ha demostrado ser seguro y viable para la alimentación humana y animal.



_____ Bouhnik Y, Raskine L, Simoneau G, Paineau D, Bornet F. The capacity of short-chain fructo-oligosaccharides to stimulate faecal bifidobacteria: a dose-response relationship study in healthy humans. *Nutr J*. 2006; 5: 8-13.

_____ Coudray C, Rambeau M, Feillet-Coudray C, Tressol JC, Demigne C, Gueux E, et al. Dietary inulin intake and age can significantly affect intestinal absorption of calcium and magnesium in rats: a stable isotope approach. *Nutr J*. 2005; 4: 29-36.

_____ Ducros V, Arnaud J, Tahiri M, Coudray C, Bornet F, Bouteloup-Demange C, et al. Influence of short-chain fructo-oligosaccharides (sc-FOS) on absorption of Cu, Zn, and Se in healthy postmenopausal women. *J. Am Coll Nutr*. 2005; 24: 30-37.

_____ Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*. 1995; 125: 1401-1412.

_____ Gibson GR, Beatty

ER, Wang X, Cummings JH. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* 1995; 108: 975-982.

_____ Han YW. Microbial levan. *Adv Appl Microbiol*. 1990; 35: 171-194.

_____ Hirayama M. Novel physiological functions of oligosaccharides. *Pure Appl Chem*. 2002; 74: 1271-1279.

_____ Kang SA, Hong K, Jang KH, Kim YY, Choue R, Lim Y. Altered mRNA expression of hepatic lipogenic enzyme and PPAR α in rats fed dietary levan from *Zymomonas mobilis*. *J Nutr Biochem*. 2005; 17: 419-426.

_____ Knol J, Boehm G, Lidestri M, Negretti F, Jelinek J, Agosti M, et al. Increase of faecal bifidobacteria due to dietary oligosaccharides induces a reduction of clinically relevant pathogen germs in the faeces of formula-fed pre-term infants. *Acta Paediatr Suppl*. 2005; 94: 31-33.

_____ Lewis DH. Nomenclature and diagrammatic

representation of oligomeric fructans—a paper for discussion. *New Phytol*. 1993; 124: 583-594.

_____ Pierre F, Perrin P, Champ M, Bornet F, Meflah K, Menanteau J. Short-chain fructo-oligosaccharides reduce the occurrence of colon tumors and develop gut-associated lymphoid tissue in Min mice. *Cancer Res*. 1997; 57: 225-228.

_____ Rastall RA. Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. *J Nutr*. 2005; 134: 2022S-2026S.

_____ Rossi M, Corradini C, Amaretti A, Nicolini M, Pompei A, Zannoni S, et al. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71: 6150-6158.

_____ Simmering R, Blaut M. Pro- and prebiotics—the tasty guardian angels? *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001; 55: 19-28.

_____ Taper HS, Roberfroid M. Influence of inulin and oli-

gofructose on breast cancer and tumor growth. *J Nutr*. 1999; 129: 1488S-1491S.

_____ Velázquez-Hernández ML, Baizabal-Aguirre VM, Bravo-Patiño A, Cajero-Juárez M, Chávez-Moctezuma MP, Valdez-Alarcón JJ. Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. *J Appl Microbiol*. 2009; 106: 1763-1778.

_____ Verdonk JMAJ, Shim SB, van Leeuwen P, Verstegen MWA. Application of inulin-type fructans in animal feed and pet food. *Br J Nutr*. 2005; 93: S125-S138.

_____ Vijn I, Smeekens S. Fructan: More than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol*. 1999; 120: 351-359.

_____ Waltz B, Gierbach S, Roller M. Inulin, oligofructose and immunomodulation. *Br J Nutr*. 2005; 93: S49-S55.

_____ Yamamoto Y, Takahashi Y, Kawano M, Iizuka M, Matsumoto T, Saeki S, et al. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *J Nutr Biochem*. 1999; 10: 13-18.

Efecto de la mutación del gen *lsdA* de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

(syn. *Acetobacter diazotrophicus*) en la colonización de la raíz de la caña de azúcar

M.L. Velázquez-Hernández¹, F. Cruz-Vázquez², A.N. Zavala-Hernández¹, V. M. Baizabal-Aguirre¹, A. Ochoa-Zarzosa¹, J.E. López-Meza¹, H. Cano-Camacho¹, J.J. Valdez-Alarcón^{1*}

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UMSNH;

²Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. *Autor responsable.

Resumen

Gluconacetobacter diazotrophicus es una bacteria diazotrófica endofítica de la caña de azúcar. Esta bacteria sintetiza la enzima extracelular levansacarasa, codificada por el gen *lsdA*. La levansacarasa presenta tanto actividad hidrolítica sobre sacarosa como de fructosil-transferasa para la síntesis de oligosacáridos tipo levana. La levana actúa como un factor de virulencia en bacterias fitopatógenas. Utilizando una cepa mutante de *G. diazotrophicus*, obtenida por interrupción del gen *lsdA* (PAI 5 *lsdA::nptII*), se realizaron ensayos de colonización de plántulas de caña de azúcar (cv. MEX 57-473) obtenidas por micropropagación. Esta cepa presentó una capacidad disminuida (por un factor de 383) para colonizar la raíz de la caña de azúcar. En ensayos de competencia con una cepa que contiene el gen *lsdA* silvestre (PAI 5 R), el número de bacterias de la cepa mutante asociadas a la raíz es menor (por un factor de 250 y 13), uno y cinco días posteriores a la inoculación (DPI). A pesar de la magnitud de las diferencias, estas no fueron estadísticamente significativas. La capacidad de la cepa mutante para asociarse con las células del borde de la raíz fue mayor (por un factor de 4.8, $p=0.001$) que la de la silvestre.

Abstract

“Effect of mutation of the *IsdA* gene from *Gluconacetobacter diazotrophicus* on sugarcane root colonization” *Gluconacetobacter diazotrophicus* is an endophytic diazotrophic bacterium of sugarcane which synthesizes the extracellular enzyme levansucrase, encoded by the *IsdA* gene. Levansucrase shows sucrose hydrolase and fructosyl transferase activities involved in levan-type oligosaccharide synthesis. Levan has a role as a virulence factor in phytopathogenic bacteria. A *G. diazotrophicus* mutant strain which *IsdA* gene was disrupted (PAI 5 *IsdA*::*nptII*), was used in colonization assays of micropropagated sugarcane plantlets (cv MEX 57-473). This strain shows a diminished ability to colonize sugarcane roots (383-fold) and leaves. In competition assays with a strain containing the wild type *IsdA* gene (PAI 5 R), the number of bacteria of the strain PAI 5 *IsdA*::*nptII* associated to root was less (250- and 13-fold) than that observed for PAI 5 R strain. Nevertheless, the differences observed were not statistically significant. The ability of the mutant strain to associate to root border cells was higher (4.8-fold, $p=0.001$) than wild type strain.

Palabras clave: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, levansacarasa, caña de azúcar, gen *IsdA*.

Keywords: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, levansucrase, sugarcane, *IsdA* gene

Introducción

México es uno de los cinco países que encabezan la producción de azúcar de caña a nivel mundial, con una producción anual de 45 millones de toneladas métricas (FAOSTAT, 2004). La caña de azúcar es la principal materia prima para la extracción del azúcar y melaza. En Brasil, además, se le ha utilizado para la producción de etanol como biocombustible y el bagazo de caña se ha utilizado en la alimentación de rumiantes productores de carne y leche (Muthukumarasamy et al., 2002).

Gluconacetobacter diazotrophicus (syn. *Acetobacter diazotrophicus*) es una bacteria endofítica (habita en el interior de la planta) y diazotrófica (fija nitrógeno) asociada a la caña de azúcar. Sintetiza las fitohormonas ácido indolacético (AIA) y giberelinas GA₁ y GA₃, promotoras del crecimiento de la raíz y el tallo. Además de colonizar la caña de azúcar, se le ha aislado del camote, el café, la piña y puede colonizar el sorgo y el maíz. La producción de fitohormonas y el amplio rango de hospedero, hacen de *G. diazotrophicus* una bacteria con una aplicación potencial como biofertilizante (Muthukumarasamy et al., 2002). Además, *G. diazotrophicus* utiliza un mecanismo de protección respiratoria para su actividad de nitrógenasa (enzima encargada de la fijación de nitrógeno) que depende de la oxidación de la glucosa por una deshidrogenasa asociada a la membrana (Flores-Encarnación, 1999).

Se ha observado, mediante microscopía electrónica de transmisión, que las células de *G. diazotrophicus* se encuentran rodeadas de una sustancia con baja electrodensidad en

el inicio de la colonización y durante su establecimiento en el interior de la raíz de la caña de azúcar. Mediante microscopía electrónica de barrido se ha evidenciado que esta especie forma microcolonias adheridas a la pared celular vegetal (Muthukumarasamy et al., 2002). Lo anterior sugiere la presencia de exopolisacáridos producidos por la bacteria involucrados en el establecimiento de la asociación con la caña de azúcar.

El polisacárido más abundante producido por *G. diazotrophicus* es la levana, un polímero lineal de fructosa con enlaces β -2,6 (Hernández et al., 1995), sintetizado por la enzima levansacarasa (sacarosa:2,6- β -D-fructano 6- β -D fructosiltransferasa; EC 2.4.1.10). La levansacarasa de *G. diazotrophicus* es una enzima extracelular de 58 kilodaltones, codificada por el gen *IsdA* (Arrieta et al., 1996). Se secreta al periplasma por un mecanismo dependiente de un péptido señal (Figura 1A) en el extremo amino-terminal (Hernández et al., 1999) y se trasloca a través de la membrana externa por un mecanismo de secreción tipo II (Arrieta et al., 2004). Esta enzima produce fructanos de bajo grado de polimerización que pueden tener aplicación como edulcorantes de poco aporte calórico y con bajo potencial cariogénico (Arrieta et al., 1996). La levansacarasa cataliza reacciones de transfructosilación de la sacarosa a diferentes aceptores (Hernández et al., 1995) como: el agua (reacción de hidrólisis de sacarosa); la glucosa (reacción de intercambio); los fructanos (reacción de polimerización, síntesis de levana y oligofructanos de bajo peso molecular) y la sacarosa (síntesis de neo-kestosa [fructosil- β -2,6-glucosil- β -1,4-fructosa], precursor de la levana).

La mutación del gen que codifica la levansacarasa en bacterias de la rizósfera o fitopatógenas afecta la interacción con las plantas hospedadoras. En *Erwinia amylovora*, agente causal del tizón de fuego en los frutales, la mutación del gen de la levansacarasa ocasiona una disminución de la capacidad del patógeno para diseminarse, sugiriendo que funciona como un factor de virulencia (Geier and Gaider, 1993). La inoculación de una mutante de *Bacillus polymyxa* deficiente en la síntesis de levansacarasa en la rizósfera del trigo, disminuye la formación de agregados del suelo sin afectar la capacidad de colonizar a la planta (Bezzante et al., 2000). Se ha sugerido que la levana funciona en la patogénesis como una barrera entre la planta y la bacteria, impidiendo así el reconocimiento e iniciación de la respuesta hipersensible de la planta (Kasapis et al., 1994).

Por lo anterior, se sugiere que la mutación del gen *IsdA*, de *G. diazotrophicus* puede afectar su capacidad para colonizar la raíz de la caña de azúcar. El presente trabajo describe la obtención y caracterización de una mutante de *G. diazotrophicus* por interrupción del gen *IsdA*, y el estudio de su efecto sobre la colonización de la caña de azúcar.

Efecto de la mutación del gen <i>IsdA</i> ...		
TABLA 1 Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.		
Cepas/plásmidos	Genotipo o fenotipo	Referencia/Fuente
Cepas bacterianas		
<i>G. diazotrophicus</i>		
Pal 5 (ATCC 49037)	(syn. <i>Acetobacter diazotrophicus</i>) Cepa aislada de cultivo de caña de azúcar, Alagoas, Brazil	Cavalcante y Döbereiner, 1988
Pal 5 R	Mutante espontánea R ^f derivada de la cepa Pal 5	Este trabajo
Pal 5 <i>IsdA::nptII</i>	Cepa Pal 5 R con la interrupción del gen <i>IsdA</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
XL1-Blue	Tc ^r <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^f</i> ZΔM15 Tn10]	Stratagene, USA
Plásmidos		
pBluescript II KS-	Ap ^r	Stratagene, USA
pBSL46	Ap ^r Km ^r ; contiene el gen <i>nptII</i>	Alexeyev et al., 1995
pLSDA1.4	Fragmento de 1.4 kb del gen <i>IsdA</i> de <i>G. diazotrophicus</i> clonado en el sitio <i>EcoRV</i> de pBluescript II KS-	Este trabajo
pLSDA::NPTII	pLSDA1.4 con el gen <i>nptII</i> insertado en el sitio <i>Bam</i> HI	Este trabajo
Ap ^r , resistencia a ampicilina; Km ^r , resistencia a kanamicina; R ^f , resistencia a rifampicina; <i>nptII</i> , neomicina fosfotransferasa II, confiere la resistencia a kanamicina.		

Materiales y métodos

Material biológico

Las cepas y los plásmidos utilizados en el presente trabajo se enlistan en la Tabla 1. La cepa PAI 5 (ATCC 49037) fue donada por la Dra. B.E. Baca de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. La cepa *G. diazotrophicus* PAI 5 Rif^r (PAI 5 R), una mutante espontánea resistente a rifampicina, derivada de la cepa PAI 5 fue seleccionada por el método de dilución en placa (Eisenstadt, 1994). Esta cepa se creció en medio de agar papa-dextrosa (PDA, Bioxón) adicionado con 50 µg/ml de rifampicina. La cepa *G. diazotrophicus* PAI 5 *IsdA::nptII* (Tabla 1) se creció en el mismo medio adicionado con 120 µg/ml de kanamicina o en un medio definido LGIE a base de glucosa, sales minerales, extracto de levadura y azul de bromotimol como indicador de pH (Stephan et al., 1991), utilizando los mismos antibióticos. Para verificar la movilidad, la capacidad de fijar nitrógeno y la producción de ácido a par-

tir de las diferentes fuentes de carbono, las cepas se crecieron en medio semisólido LGIP, que consiste en la fuente de carbono y sales minerales del medio LGIE, excepto por el extracto de levadura, la concentración de agar (2 g/l), y la carencia de una fuente de nitrógeno (Stephan et al., 1991). La cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene, USA) se transformó con el plásmido pLSDA1.4 (Tabla 1) se creció en medio Luria-Bertani (LB) adicionado con 100 µg/ml de carbenicilina cuando fue necesario. Se utilizó caña de azúcar (*Saccharum* spp.) de la variedad MEX 57-473 obtenida del campo experimental del Consorcio Azucarero Escorpión (CAZE) en Atencingo, Puebla, o del Ingenio Lázaro Cárdenas en Taretan, Michoacán.

Amplificación de un fragmento del gen *IsdA* por PCR

De la secuencia del gen *IsdA* de *G. diazotrophicus* (No. de acceso a GenBank: L41732) se diseñaron los oligonucleótidos *Isu* (5'-GACTTTACCGCCCGCTGGACAC-3') y *Isl* (5'-GTGGACGCCTGCGCCGCCAGAC-3'), que comprenden 1460 pares de bases (pb) de la región codificante del gen. La amplificación se realizó con 200 nM de oligonucleótidos, 500 µM de desoxinucleótidos trifosfato, 1.5 mM de MgCl₂ y 2.5 U de *Taq* ADN polimerasa (Boehringer Mannheim), en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), utilizando el siguiente programa: un ciclo de 94°C / 3 min, 30 ciclos de 94°C / 1min, 55°C / 1min, 72°C / 2 min y un ciclo final de 72°C / 10 min.

Clonación y secuenciación del fragmento del gen *IsdA* amplificado por PCR

El producto de amplificación del gen *IsdA*, de 1.4 kb se clonó en el sitio *EcoRV* en el vector pBluescript II KS(-) (Stratagene) para generar el plásmido pLSDA1.4 (Tabla 1). La secuenciación se llevó a cabo por el método de Sanger et al., (1977) utilizando los análogos de didesoxirribonucleótidos del paquete Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA). La polimerización se realizó en las siguientes condiciones: 1 ciclo por 5 min a 95°C; 25 ciclos de 30 seg a 96°C, 30 seg a 50°C y 4 min a 60°C; 1 ciclo sostenido de enfriamiento a 4°C. Los productos de extensión se resolvieron en una columna capilar de gel de 47 cm de longitud, en el equipo de secuenciación automática ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), utilizando un tiempo de inyección de 30 seg, y la electroforesis a 15 kV, 50°C y 45 min de corrida.

Interrupción del gen *IsdA* de *G. diazotrophicus* y caracterización de las mutantes

El fragmento *Bam*HI de 1.2 kb del plásmido pBSL46 (Alexeyev et al., 1995) que contiene al gen *nptII* que codifica para la neomicina fosfotransferasa II y confiere resistencia a kanamicina, se clonó en el sitio *Bam*HI interno del fragmento de 1.4 kb del gen *IsdA* en el plásmido pLSDA1.4, para generar el plásmido pLSDA1.4::NPTII (Tabla 1; Figura 1A). Se obtuvieron células electrocompetentes de *G. diazotrophicus* PAI 5 R (Arrieta et al., 1996). La

electroporación se realizó en un electroporador BioRad EN-61326 con celdas de 2 mm, 40 µl de suspensión de células electrocompetentes y 300 ng del plásmido pLSDA1.4::NPTII. Las condiciones de electroporación fueron: 1800 V (9000 V/cm), 4-4.8 mseg, 600 W, 10 µF. Las células transformantes se seleccionaron en medio LGIE adicionado con 120 µg/ml de kanamicina. Para verificar la interrupción del gen en el genoma de *G. diazotrophicus*, se realizaron amplificaciones por PCR de la región del gen *IsdA* con la inserción del fragmento que contiene al gen *nptII*. La identidad de los productos de PCR se verificó mediante hibridaciones tipo Southern blot con el paquete de marcaje con digoxigenina y detección de ADN por quimioluminiscencia (Boehringer-Mannheim), según instrucciones del fabricante, utilizando los fragmentos de los genes *IsdA* (producto de PCR de 1.4 kb) y *nptII* (fragmento *Bam*HI de 1.2 kb) como sondas.

Micropropagación de la caña de azúcar

A partir de plantas de caña de azúcar de la variedad MEX 57-473, de aproximadamente 50 cm de longitud (3 meses de edad), se extrajo la yema apical. La asepsia de las yemas se realizó sumergiendo 1 min en etanol al 70% y 20 min con hipoclorito de sodio comercial al 20% con lavados posteriores en agua estéril. La micropropagación se realizó de acuerdo al protocolo de Lee (1987) con la modificación del medio de enraizamiento de Páyan et al. (1977).

Infección de plántulas con *G. diazotrophicus*

Para los ensayos de infección se empleó el medio de Murashige y Skoog (MS) reducido 10 veces en el contenido de sacarosa y de sales y sin fuente de nitrógeno (medio MS 10%-N) para la cepa PAI 5 R (Reis et al., 1999); para la cepa PAI 5 *IsdA*::*nptII*, la sacarosa se sustituyó por glucosa. Los inóculos se ajustaron a 10⁶ bacterias/ml en el medio de infección. Se realizaron dos tipos de ensayos de infección: en el primero, las cepas silvestre y mutante se inocularon de manera independiente; en el segundo, se agregaron ambas cepas simultáneamente con el fin de evaluar si prevalecía el fenotipo conferido por la presencia del gen silvestre.

Las plántulas de un mes de edad, obtenidas de la micropropagación, inoculadas con las cepas *G. diazotrophicus* silvestre y mutante, se mantuvieron en una cámara ambiental Biotronette Mark III (Lab-line) a 30°C con iluminación de 120 W y un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. Para estimar el número de microorganismos presentes en las plántulas inoculadas, las raíces y las hojas se disectaron, se maceraron en condiciones asépticas, se diluyeron 10 veces según el peso fresco de la muestra con medio MS 10%-N y se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻⁶. De cada dilución se inocularon 100 µL en viales con medio LGIP semisólido, que permite evaluar la movilidad de la bacteria, su capacidad de fijar nitrógeno en condiciones microaerófilas, y la capacidad de producir ácidos orgánicos (Reis et al., 1999). Se adicionaron 50 µg/ml de rifampicina para la cepa silvestre y 120 µg/ml de kanamicina para la cepa mutante, junto con la rifampicina. Se inocularon tres viales por dilución y

se contó el número de viales con crecimiento. El número más probable (NMP) de bacterias por gramo de peso fresco se determinó según Reis et al. (1994).

Para los ensayos de competencia, las cepas silvestre y mutante se inocularon cada una a una densidad de 5×10^5 bacterias/ml. La estimación de bacterias asociadas a la raíz y la parte aérea (hojas) de las plántulas, se realizó en presencia y ausencia de kanamicina, y el número de bacterias silvestres asociadas a la raíz se determinó por la diferencia. La estimación del NMP de bacterias asociadas a la raíz o las hojas se realizó a los 1, 5 y 15 días posteriores a la inoculación (DPI).

Interacción de las células del borde de la raíz con *G. diazotrophicus*

Para el estudio de la interacción de las cepas de *G. diazotrophicus* con las células del borde de la raíz, se utilizó frijol como un modelo heterólogo. Las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* Flor de mayo-bajo) se desinfectaron con etanol e hipoclorito de sodio comercial, como se describió anteriormente, se germinaron en condiciones axénicas en medio MS 10%-N sólido durante 4 días a 30°C. Sobre el medio se colocó una hoja de papel filtro para evitar que la raíz penetrara en el medio con el consecuente desprendimiento de células del borde de la raíz. Las raíces se sumergieron en 500 µl de MS 10%-N líquido, y las células del borde se desprendieron con agitación suave. La densidad celular se determinó por conteo en una cámara de Neubauer. En tubos de 1.5 ml se colocaron 3×10^4 células del borde/ml con 1×10^6 células bacterianas en un volumen final de 500 µl del mismo medio, las muestras se incubaron a temperatura ambiente y se fijaron con un volumen de solución FAA (formaldehído:ácido acético glacial:metanol 10:5:85) a las 0.5, 2 y 4 horas posteriores a la inoculación, y se observaron en un microscopio de contraste de fases Leica-DMLB. Las imágenes se capturaron con una cámara digital DC-200 utilizando el software QWin (Leica). El número de bacterias asociadas a las células del borde de la raíz se determinó por conteo directo en las imágenes. Se obtuvo el promedio de 10 campos por cada muestra. Se analizaron 5 muestras por cada tratamiento.

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Kruskal Wallis para el análisis de varianza en rangos, con el fin de encontrar posibles diferencias entre los valores de NMP de bacterias en los ensayos de colonización de hojas, de raíces, o de células del borde de la raíz. Las diferencias entre tratamientos, se determinaron mediante la prueba de Tukey, utilizando el software SigmaStat v2.03 (SPSS Inc.).

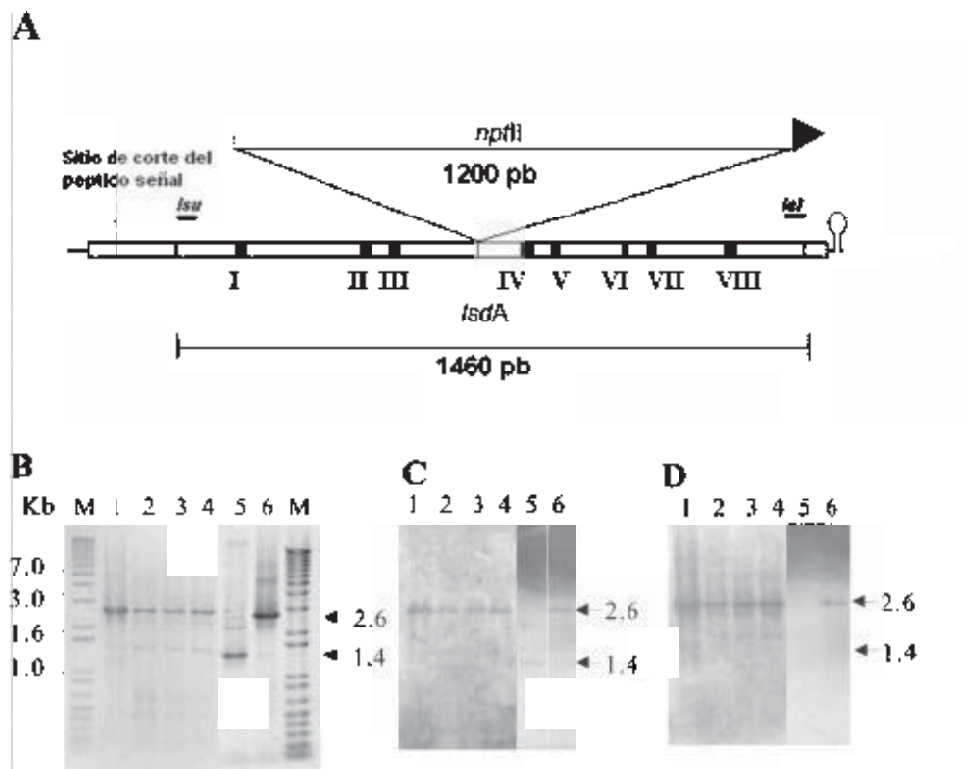


Figura 1. Caracterización genotípica de las mutantes de *G. diazotrophicus* con interrupción del gen *IsdA*. **A.** Mapa físico del gen *IsdA* de *G. diazotrophicus*. Los números romanos representan los 8 dominios conservados (barras negras) entre las levansacararas de bacterias Gram negativas. Se indica el sitio de inserción del gen *nptII*. La punta de flecha negra indica la orientación del gen *nptII*. Las barras horizontales (Isu, Isl) indican los sitios de unión a oligonucleótidos con los que se amplificó el fragmento de 1460 pb. La horquilla representa una estructura tipo terminador de la transcripción. **B.** Amplificación del gen *IsdA*. Carriles: M, marcador de tamaño molecular "1 Kb plus ladder" (Invitrogen); 1-4, productos de amplificación obtenidos de las clonas recombinantes T12, T18, T32 y T44; 5, producto de amplificación del plásmido pLSDA1.4; 6, producto de amplificación del fragmento de 2.6 kb del plásmido pLSDA::nptII. **C.** Hibridación tipo Southern con la sonda *IsdA*. Carriles: como en B. **D.** Hibridación tipo Southern con la sonda *nptII*. Carriles: como en B.

Resultados

Transformación de *G. diazotrophicus* transformadas con el plásmido pLSDA1.4::NPTII.

Para interrumpir la secuencia del gen *IsdA* se amplificó por PCR un fragmento de 1.4 kb, que comprende 91% de la secuencia que codifica para la proteína madura y los ocho dominios conservados entre las levansacararas de bacterias Gram negativas (Figura 1A;

Arrieta et al., 1996). y se le insertó un fragmento de 1.2 kb que contiene el gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina. La inserción se realizó en el vector pBluescript II KS(-) que solo puede replicarse en *E. coli*, y se comporta como un vector suicida en *G. diazotrophicus*. De esta manera, al transformar la cepa *G. diazotrophicus* PAI 5 R con el plásmido pLSDA1.4::NPTII, se espera que el vector se integre en el genoma mediante un evento de recombinación homóloga. Se obtuvieron alrededor de 100 colonias transformantes y se seleccionaron por su crecimiento en medio LGIE en presencia de kanamicina, la carencia del aspecto mucoso por la ausencia de la levana (Figura 2A), y la incapacidad de crecer en medio base de sales de LGIE con sacarosa como única fuente de carbono, por la falta de la actividad de levansacarasa. Se seleccionaron al azar cuatro transformantes denominadas T12, T18, T32 y T44.

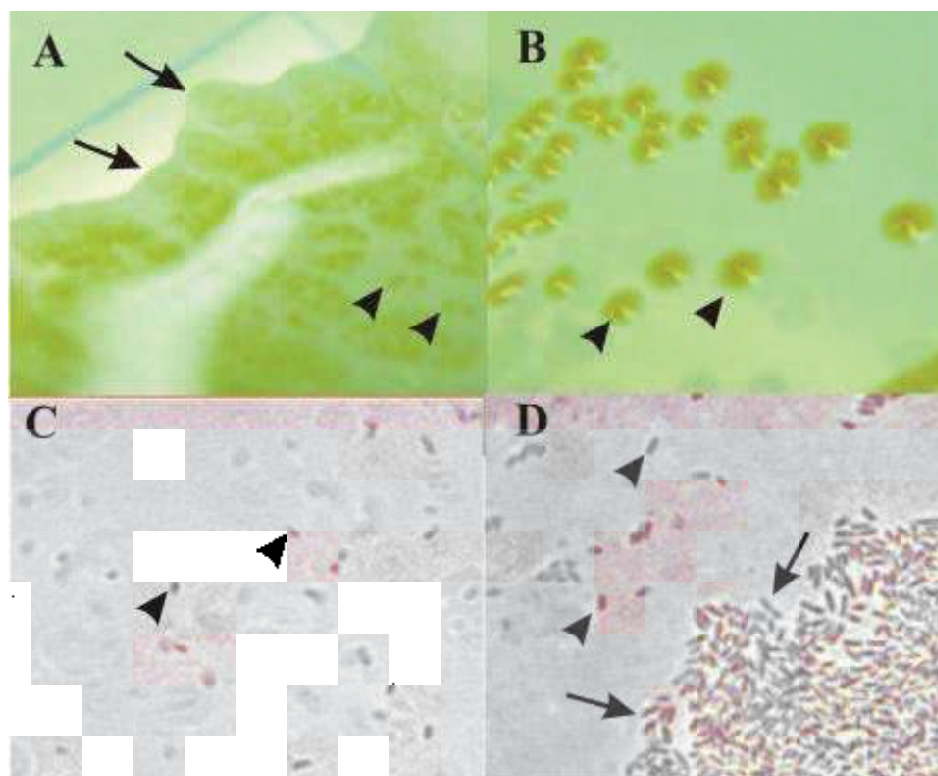


Figura 2. Caracterización fenotípica de la mutante. Morfología colonial de las cepas PAI 5 R (A) y PAI 5 *IsdA::nptII* (B) en medio LGIE. Las puntas de flecha señalan las colonias individuales. Las flechas señalan el borde de la capa mucosa que recubre a las colonias en A y que está ausente en B. Agregación de la mutante en medio líquido. Micrografías de las cepas PAI 5 R (C) y PAI 5 *IsdA::nptII* (D). Las puntas de flecha señalan a las bacterias en suspensión. Las flechas señalan a las bacterias individuales dentro de los aglomerados que forma la mutante.

Caracterización de las transformantes con el plásmido pLSDA1.4::NPTII

Para verificar la interrupción del gen *IsdA*, como resultado de un evento de recombinación entre el plásmido pLSDA1.4::NPTII y el ADN genómico de las transformantes de *G. diazotrophicus*, se realizó una amplificación por PCR del fragmento del gen *IsdA*. Los productos de PCR presentaron un tamaño de 2.6 kb, que corresponde al fragmento del gen *IsdA* (1.4 kb) y el del gen de resistencia a kanamicina (1.2 kb; Figura 1B). Estos productos se hibridaron con las sondas correspondientes. Ambas sondas hibridaron con el fragmento de 2.6 kb, correspondiente al gen *IsdA* interrumpido (Figuras 1C y 1D, carriles 1-4). Aunque en los productos de amplificación se observó un producto de 1.4 kb (Figura 1B, carriles 1-4), éste no produjo una señal de hibridación con la sonda de los genes *IsdA* o *nptII* (Figuras 1C y 1D, carriles 1-4). El único producto de amplificación homólogo al gen *IsdA* fue el de 2.6 kb (Figura 1D), y cuyo tamaño corresponde con el fragmento del gen *IsdA* interrumpido en el plásmido pLSDA1.4::NPTII (Figuras 1B, 1C y 1D, carril 5). Los patrones de amplificación e hibridación sugieren que ocurrió un evento de reemplazo génico, por un evento de doble recombinación homóloga entre el plásmido pLSDA1.4::NPTII y el genoma de *G. diazotrophicus* en la región del gen *IsdA*, ya que no se detectó un producto de amplificación correspondiente con el gen *IsdA* silvestre.

TABLA 2
Crecimiento y producción de ácido por *G. diazotrophicus* en presencia de diferentes fuentes de carbono.

Cepa	Sacarosa	Glucosa	Azúcar de caña	Etanol	Glicerol	Inositol	Manitol
Pal 5 R	+/Ac ¹	+/Ac	+/Ac	+/Ac	+/N	+/N	+/N
Pal 5 <i>IsdA::nptII</i>	-/-	+/N	+/Ac	+/N	+/N	+/N	+/N

1. +, crecimiento; -, ausencia de crecimiento o producción de ácido; Ac, acidificación del medio; N, no cambia el pH

Caracterización fenotípica de la cepa PAI 5 *IsdA::nptII*

Las colonias de las transformantes elegidas, crecidas en medio LGIE mostraron ser de apariencia seca, planas, no presentaron el carácter mucoide (Figuras 2A y 2B), y no viraron el indicador en el medio LGIE (no mostrado), indicando que no lo acidifican, como sucede con la cepa silvestre. Además, en el cultivo líquido se observó la formación de aglomerados de bacterias en las clonas transformantes (Figura 2D). Debido a que las cepas transformantes caracterizadas presentaban características fenotípicas y genotípicas semejantes, se seleccionó al azar la transformante T18 (PAI 5 *IsdA::nptII*) para análisis posteriores. Como *G. diazotrophicus* requiere de la levansacarasa para la hidrólisis y posterior metabolismo de la sacarosa, se decidió evaluar la capacidad de la bacteria para crecer y fijar nitrógeno en presencia de sacarosa y de otras fuentes de carbono (Cavalcante y Döbereiner, 1988; Tabla 2). La cepa PAI 5 *IsdA::nptII* creció en presencia de todas las fuentes de car-

Efecto de la mutación del gen *IsdA*...

bono que se ensayaron, excepto sacarosa. La cepa PAI 5 R, acidificó los medios que contenían sacarosa, glucosa, etanol o azúcar de caña, pero no los que contenían glicerol, inositol y manitol. La cepa PAI 5 *IsdA::nptII* acidificó únicamente el medio que contenía azúcar de caña, y no acidificó los medios que contenían glucosa o etanol. Esta observación sugiere una correlación entre la capacidad de hidrolizar sacarosa por acción de la levansacarasa, y la capacidad de acidificar el medio de cultivo.

Efecto de la mutación del gen *IsdA* de *G. diazotrophicus* sobre la colonización de la caña de azúcar

Debido a que *G. diazotrophicus* es un endófito de la caña de azúcar, fue necesario generar plántulas por micropropagación para eliminar las bacterias nativas para llevar a cabo los ensayos de colonización. Además, se utilizó como inóculo una mutante espontánea resistente a rifampicina (PAI 5 R) derivada de la cepa de referencia PAI 5 (Tabla 1), lo cual nos permitió corroborar que las bacterias aisladas en los ensayos para la estimación del número más probable, correspondían con la cepa inoculada. Se realizaron dos tipos de ensayo para evaluar la capacidad de colonización, uno con cada una de las cepas, PAI 5 R o PAI 5 *IsdA::nptII* inoculadas de manera independiente, y un ensayo de competencia entre ambas cepas para investigar si la presencia de la levana o la levansacarasa confiere características dominantes al establecerse en el interior de la planta. Se consideraron los tiempos de 1, 5 y 15 días posteriores a la inoculación (DPI) teniendo en cuenta los siguientes aspectos: 1) durante el primer día se establece la interacción primaria (reconocimiento bacteria-planta, adhesión de la bacteria a la superficie de las células vegetales; James et al., 1994); 2) entre cuatro y siete días después de la inoculación la bacteria ha consumido la mayor parte de la fuente de carbono del medio (Reis et al., 1999) y ha iniciado la colonización de la superficie y el ápice de la raíz, así como la penetración a los espacios intercelulares de la raíz (James y col., 1994); 3) a los 15 días, la bacteria ya se localiza en las hojas (James et al., 1994). En la Tabla 3, se presentan los resultados del número más probable (NMP) de bacterias asociadas a la raíz y las hojas de la plántula.

El número de bacterias de la cepa PAI 5 R asociadas a la raíz osciló en el orden de 10^4 a 10^5 bacterias / g de peso fresco de tejido para la mayoría de las determinaciones, ya sea cuando se inoculó de manera independiente o cuando se inoculó con la cepa PAI 5 *IsdA::nptII* en los ensayos de competencia. El número de bacterias de la cepa PAI 5 *IsdA::nptII* asociadas a la raíz se comportó de manera similar a los 1 y 5 DPI cuando se inoculó de manera independiente, y a los 15 DPI en el ensayo de competencia. En cambio, a los 15 DPI se observó una disminución, por un factor de 383, en el número de bacterias asociadas a la raíz con respecto a la cepa PAI 5 R cuando se inocularon de manera independiente. A los 1 y 5 DPI en los ensayos de competencia se observó una disminución similar en el NMP de bacterias de la cepa PAI 5 *IsdA::nptII* asociadas a la raíz. Las diferencias fueron por un factor de 250 y 13, respectivamente. A los 15 DPI, el número de bacterias asociados a la raíz para las dos cepas se equiparó. No obstante la magnitud de las diferencias descritas, el aná-

Efecto de la mutación del gen *IsdA*...

lisis de varianza para los datos anteriores, no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p=0.063$).

TABLA 3 NMP de bacterias asociadas a la raíz o la hoja de la caña de azúcar.				
DPI ^a	NMP bacterias / g de peso fresco ^b			
	Pal 5 R	Pal 5 <i>IsdA::nptII</i>	Pal 5 R (competencia)	Pal 5 <i>IsdA::nptII</i> (competencia)
Raíz				
1	$(6.12 \pm 6.06) \times 10^4$	$(2.56 \pm 1.45) \times 10^4$	$(4.82 \pm 4.28) \times 10^4$	$(1.93 \pm 0.41) \times 10^2$
5	$(2.10 \pm 2.01) \times 10^5$	$(8.69 \pm 8.06) \times 10^4$	$(2.84 \pm 1.26) \times 10^4$	$(2.13 \pm 1.56) \times 10^3$
15	$(7.21 \pm 4.78) \times 10^4$	$(1.88 \pm 1.08) \times 10^2$	$(1.85 \pm 1.74) \times 10^5$	$(1.80 \pm 1.79) \times 10^5$
Hoja				
1	$(1.05 \pm 0.98) \times 10^4$	$(1.29 \pm 1.28) \times 10^5$	$(6.45 \pm 6.42) \times 10^4$	$(5.31 \pm 5.28) \times 10^4$
5	$(2.66 \pm 2.05) \times 10^3$	$(1.56 \pm 1.03) \times 10^4$	$(1.25 \pm 0.80) \times 10^3$	$(5.95 \pm 1.94) \times 10^2$
15	$(1.73 \pm 1.70) \times 10^3$	$(1.04 \pm 0.95) \times 10^4$	$(2.97 \pm 2.90) \times 10^2$	$(5.23 \pm 1.31) \times 10^2$
^a DPI: Días posteriores a la inoculación. ^b Los datos representan la media (n=2) del número más probable (NMP) de bacterias $\pm$ la desviación estándar. El exponente se factorizó para simplificar la expresión.				

En el caso de los ensayos de colonización de las hojas, los valores de NMP de bacterias / g de peso fresco oscilaron entre 10^2 y 10^4 , tanto para la cepa PAI 5 R como para la cepa PAI 5 *IsdA::nptII*. Esta dispersión de los datos no permitió observar diferencias claras entre los tratamientos. A pesar de que en todos los ensayos se observa una tendencia a la disminución del NMP de bacterias asociadas a la hoja entre los 1 y 15 DPI. El análisis de varianza de los datos de colonización de las hojas no indicó diferencias estadísticamente significativas ($p=0.597$).

Las células del borde de la raíz realizan funciones de control en el establecimiento de las poblaciones microbianas de la rizósfera (Zhu et al., 1997). Para ello, se utilizaron células del borde de la raíz del frijol, el cual previamente se había utilizado como sistema heterólogo para evaluar la producción de metabolitos secundarios en respuesta a la presencia de *G. diazotrophicus*. En este caso, la comunicación química entre las bacterias y las células del borde de la raíz y el establecimiento de la interacción, ocurrieron en 1 a 4 horas (Trujillo-López, 2001). La media del número de bacterias / célula del borde de la raíz y el error estándar (n=5) para la cepa PAI 5 R fueron de 2.0 ± 0.55 , 2.2 ± 0.37 y 3.8 ± 1.0 a las 0.5, 2 y 4 horas posteriores a la inoculación, respectivamente. Para la cepa PAI 5 *IsdA::nptII*, los valores (n=5) fueron de 7.2 ± 3.8 , 1.8 ± 0.4 y 18.4 ± 6.4 . A las 4 horas posteriores a la inoculación, se observó un aumento, por un factor de 4.8, en el número de bacterias de la cepa PAI 5

IsdA::nptII asociadas a las células del borde de la raíz, respecto a la PAI 5 R. Ésta fue la única diferencia estadísticamente significativa ($p=0.001$) encontrada.

Discusión

La levansacarasa es la enzima que sintetiza la levana, el exopolisacárido más abundante secretado por *G. diazotrophicus* (Arrieta et al., 1996). Esta enzima está codificada por el gen *IsdA*, por lo que su interrupción en la cepa PAI 5 *IsdA::nptII* elimina la síntesis de levansacarasa y la acumulación de la levana, ocasionando que las colonias no presenten el fenotipo mucoide en medio sólido (Figuras 2A y 2B). La formación de aglomerados de bacterias de la cepa PAI 5 *IsdA::nptII* en medio de cultivo líquido (Figura 2B y 2C), puede ocurrir debido a que la ausencia del exopolisacárido permite la exposición de alguno(s) determinante(s) de superficie que favorecen la aglomeración. Desconocemos si esta característica fenotípica se relaciona con las diferencias observadas en el número de bacterias asociadas a la raíz o las células del borde de la raíz durante la colonización, o bien a la amplia dispersión de los datos en los ensayos de colonización.

En la cepa PAI 5 R, la levansacarasa hidroliza la sacarosa incorporando a la fructosa a un polisacárido (la levana) y liberando glucosa, la cual es oxidada por una glucosa deshidrogenasa membranal (Flores-Encarnación et al., 1999) formando el ácido glucónico (Attwood et al., 1991). La acumulación de este producto disminuye el pH con el subsecuente viraje del indicador en el medio LGIP. La interrupción del gen *IsdA* en la cepa PAI 5 *IsdA::nptII* provoca la pérdida de la capacidad de hidrolizar la sacarosa, por lo que esta cepa no crece en un medio con esta fuente de carbono; en cambio, puede crecer y acidificar el medio de cultivo en presencia de azúcar de caña, lo cual puede deberse a la presencia de glucosa, fructosa u otros azúcares simples. La incapacidad de producir ácido glucónico a partir de la glucosa en la cepa PAI 5 *IsdA::nptII*, sugiere que existe una asociación física entre la levansacarasa y la glucosa deshidrogenasa (Flores-Encarnación et al., 1999). Es probable que la glucosa obtenida de la hidrólisis de la sacarosa por la levansacarasa, sea transferida directamente a la glucosa deshidrogenasa membranal para su oxidación a ácido glucónico, mientras que la glucosa libre ingrese a la célula bacteriana para su oxidación en la vía de las pentosas-fosfato (Álvarez y Martínez-Dretz, 1995), sin la acumulación de ácido glucónico. La actividad de glucosa deshidrogenasa membranal se ha asociado al mecanismo de protección respiratoria de la nitrogenasa contra el oxígeno (Flores-Encarnación, 1999). Es necesario cuantificar la actividad de glucosa deshidrogenasa y la fijación de nitrógeno en la cepa PAI 5 *IsdA::nptII* para establecer si existe una correlación con la ausencia de la actividad de levansacarasa en *G. diazotrophicus*.

No fue posible detectar diferencias estadísticamente significativas en los ensayos de colonización de las raíces o de las hojas. La amplia dispersión de los datos del NMP de bacterias asociadas a las raíces o a las hojas, puede deberse en parte a la heterogeneidad de las raíces (peso fresco, longitud y número de raíces secundarias) de las plántulas de caña de azúcar generadas *in vitro*. Otro factor que puede afectar la dispersión de los datos es la

capacidad de la bacteria para formar agregados (biopelículas) durante la colonización (Muthukumarasamy et al., 2002). Dicha capacidad parece verse afectada en la cepa mutante en el gen *IsdA*. Sin embargo, los datos muestran tendencias hacia la disminución del NMP de bacterias asociadas a la raíz a los 15 DPI en los ensayos de colonización con la mutante y a los 1 y 5 DPI para la cepa mutante en los ensayos de competencia. Esta tendencia posiblemente se deba a que la ausencia de la levana puede afectar la formación de microcolonias en la superficie o el interior de la raíz, afectando la evasión de la respuesta de defensa de la planta (Kasapis et al., 1994) o la difusión de oxígeno a las células bacterianas, inhibiendo la fijación de nitrógeno (Dong et al., 1995; Dong et al., 2002). Por otro lado, la ausencia de la levansacarasa, además de afectar la hidrólisis de la sacarosa, parece tener un efecto pleiotrópico sobre el catabolismo de glucosa y etanol, ya que también afecta la producción de ácido en éstas fuentes de carbono. La cepa mutante creció en todas las fuentes de carbono ensayadas (excepto en sacarosa), en el medio LGIP que carece de fuente de nitrógeno. Lo anterior sugiere que la mutación en el gen *IsdA* no afecta la fijación de nitrógeno, aunque no se puede saber si ocurren variaciones cuantitativas en este proceso.

Las células del borde de la raíz se desprenden de manera programada del ápice y modulan la ecología microbiana de la rizósfera a través de la liberación de metabolitos (Zhu et al., 1997). Desconocemos el significado del aumento en el número de células de la cepa PAI 5 *IsdA::nptII* asociadas a las células del borde de la raíz del frijol después de 4 horas. Por el momento no es posible descartar que este fenómeno se relacione con la capacidad de formar aglomerados.

Conclusiones

La mutación en el gen *IsdA* que codifica para la levansacarasa de *G. diazotrophicus* afecta: 1) la capacidad de producir ácido a partir de glucosa y glicerol y posiblemente en la protección de la nitrogenasa de la acción del oxígeno; 2) la dinámica de colonización de los tejidos de la caña de azúcar, principalmente en la raíz y en las células del borde de la raíz. Con los datos presentados en este trabajo, no es posible elaborar una conclusión definitiva acerca del papel de la levansacarasa de *G. diazotrophicus* como factor de colonización de la caña de azúcar, aunque se aprecia una tendencia a la disminución en el NMP de bacterias de la cepa mutante asociadas a la raíz.

Agradecimientos.

Financiado por CONACYT (I26551-B; J31278-B) y CIC-UMSNH (13.7-2001). Al Ing. J. Martínez Arroyo del campo experimental del Consorcio Azucarero Escorpión (CAZE) en Atencingo, Puebla y al Ing. L. Chávez Carrillo del Ingenio Lázaro Cárdenas en Taretan, Michoacán, por la donación de las yemas de caña de azúcar. Al Dr. Y. Martínez Laguna por la donación del plásmido pBSL46, y a la Dra. B.E Baca por la donación de la cepa *G. diazotrophicus* PAI 5. F.C.V., A.N.Z.H. y M.L.V.H. fueron becarios de CONACYT. M.L.V.H. es becaria de la U.M.S.N.H. y el CONACYT en el Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas.

Referencias

- Alexeyev, M.F., I.N. Shokolenko, y T.P. Croughan. 1995. Improved antibiotic resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and *in vitro* deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160: 63-67.
- Alvarez, B. y G. Martínez-Drets. 1995. Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. *Can. J. Microbiol.* 41: 918-924.
- Arrieta, J., L. Hernández, A. Coego, V. Suárez, E. Balmori, C. Menéndez, M.F. Petit-Glatron, R. Chambert y G. Selman-Housein. 1996. Molecular characterization of the levansucrase gene from the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Microbiology* 142: 1077-1085.
- Arrieta, J., M. Sotolongo, C. Menéndez, D. Alfonso, E. Trujillo, M. Soto, R. Ramírez, y L. Hernández. 2004. A type II protein secretory pathway required for levansucrase secretion by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *J. Bacteriol.* 186: 5031-5039.
- Attwood, N.M., J.P. Van Dijken y J.T. Pronk. 1991. Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Ferment. Bioeng.* 72: 101-105.
- Bezzate, S., S. Aymerich, R. Chambert, S. Czarnes, O. Berge y T. Heulin. 2000. Disruption of the *Paenibacillus polymixa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 2: 333-342.
- Cavalcante, V.A. y J. Döbereiner. 1988. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacteria associated with sugar cane. *Plant Soil* 108: 23-31.
- Dong, Z., M. Heydrich, K. Bernard y M.E. McCully. 1995. Further evidence that the N₂-fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1843-1846.
- Dong, Z., C.D. Zelmer, M.J. Canny, M.E. McCully, B. Luit, B. Pan, R.S. Faustino, G.N. Pierce y J.K. Vessey. 2002. Evidence for protection of nitrogenase from O₂ by colony structure in the aerobic diazotroph *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Microbiology* 148: 2293-2298.
- Éisenstadt, J.D. 1994. Gene mutation. En: Gerhardt P., Murray R.R.E., Costilow R.N., Nester E.W., Krieg N.R. y Phillips G.B. (eds.). *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington D.C. pp 304-308.
- FAOSTAT. 2004. FAOSTAT Agricultural Data. FAO. En línea [<http://faostat.fao.org/faostat>].
- Flores-Encarnación, M., M. Contreras-Zentella, L. Soto Urzúa, G.R. Aguilar, B.E. Baca y J.E. Escamilla. 1999. The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAI 5. *J. Bacteriol.* 181: 6987-6995.
- Geier, G. y K. Geider. 1993. Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 42: 387-404.

- Hernández, J., J. Arrieta, C. Menéndez, R. Vázquez, A. Coego, V. Suárez, G. Selman, M-F. Petit-Glatron y R. Chambert. 1995. Isolation and enzymatic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem. J.* 309: 113-118.
- Hernández, L., J. Arrieta, L. Betancourt, V. Falcón, J. Madrazo, A. Coego y C. Menéndez. 1999. Levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4 is secreted via periplasm by a signal-peptide-dependent pathway. *Curr. Microbiol.* 39: 146–152
- James, E.K., V.M. Reis, F.L. Olivares, J.I. Baldani y J. Döbereiner. 1994. Infection of sugar-cane by the nitrogen fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Exp. Bot.* 45: 757-766.
- James, E.K., F.L. Olivares, A.L.M. de Olivera, F. B. Dos Reis Jr., L.G. da Silva y V.M. Reis. 2001. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and green house conditions. *J. Exp. Bot.* 52: 747- 760.
- Kasapis, S., Morris, E.R. Gross M., y K. Rudolph. 1994 Solution properties of levan polysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, and its possible primary role as a blocker of recognition pathogenesis, *Carbohydr. Polym.* 23: 55-64
- Lee, T.S.G. 1987. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum spp.*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 10: 47-55.
- Muthukumarasamy, R., G. Rebatí, S. Seshadri y C. Lakshminarasimhan. 2002. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn, *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Curr. Sci.* . 83:137-145.
- Payán, F. A., H. Carmen y G. Tascón. 1977. Técnicas para la micropropagación de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) mediante el cultivo de tejidos y yemas. *Acta Agronómica* 27: 43-79.
- Reis, V.M., F.L. Olivares y J. Döbereiner. 1994. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 401-405.
- Reis, V.M., F.L. Olivares, A.L. Martinez de Oliveira, F. Bueno, J.I. Baldani y J. Döbereiner. 1999. Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants with *Acetobacter diazotrophicus*. *Plant Soil.* 206: 205-211.
- Sampietro, A. R. 1995. The plant invertases. En: Pontis, H. G.; Salerno, G. L.; Echeverría Eds. *Sucrose Metabolism, Biochemistry, Physiology and Molecular Biology. Current Topics in Plant Physiology.* American Society of Plant Biologists Series Vol. 14. pp 65-71.
- Sanger F., S. Nicklen y A.R.Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463–5467.

Efecto de la mutación del gen *IsdA*...

- Stephan, M.P., M. Oliveira, K.R.S. Teixeira, G. Martínez-Drets y J. Döbereiner. 1991. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. FEMS Microbiol. Lett. 77: 67-72.
- Trujillo-López M.A. 2001. Análisis del papel de los flavonoides en la colonización de la caña de azúcar por *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 63 pp.
- Zhu. Y., L. S. Pierson III, y M. C. Hawes. 1997. Induction of microbial genes for pathogenesis and symbiosis by chemicals from root border cells. Plant Physiol. 115:1691-1698.

14. APÉNDICE

14.1 Medios de cultivo para la micropropagación de la caña de azúcar

Medios usados para la micropropagación de la caña de azúcar.

Componentes	MPII ² (mg/L)	MC ² (mg/L)	MP ² (mg/L)	MPR ³ (mg/L)	MS 50% ² (mg/L)
Macroelementos	1x	1x	1x	1x	0.5x
Microelementos	1x	1x	1x	1x	0.5x
Fe-EDTA	1x	1x	1x	1x	0.5
Vitaminas					
Inositol	100	100	100	100	---
Tiamina	1	1	1	1	---
Fitohormonas					
Cinetina	0.1	---	1	---	---
BAP	0.2	---	---	---	---
NAA	---	---	1	6	---
2,4-D	---	3	---	---	---
Otros suplementos					
Agua de coco	---	---	10 % (v/v)	---	---
Arginina	---	60	---	---	---
Sacarosa	20000	20000	20000	20000	10000
Agar	8000	8000	8000	8000	---
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

1) Soluciones stock: Macroelementos 10x, Microelementos 50x, Fe-EDTA 10X; tiamina 1 mg/ml, cinetina 1 mg/ml, BAP (bencil-animopurina) 0.2 mg/ml, NAA (ácido naftaleno acético) 1 mg/ml, y la arginina 60 mg/ml. Las fitohormonas, vitaminas y el agua de coco son lábiles al calor, por lo tanto, se adicionan al medio después de esterilizarlo en autoclave. El inositol y 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) se puede adicionar al medio de cultivo antes de esterilizarlo. Ajustar el pH con 0.1 N de KOH.

2) Lee, 1987.

3) Payán *et al*, 1977

Sales de Murashige y Skoog (MS, 1962)

Solución stock 1x	Compuesto	mg/L
Macroelementos	NH_4NO_3	1650
	KNO_3	1900
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
	$\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	370
	KH_2PO_4	170
Microelementos	H_3BO_3	6.2
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22.3
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.6
	KI	0.83
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Fe-EDTA	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8

MS 10%, las sales del MS al 10% sin amonio y 2 % de sacarosa, pH 5.8 (Reis *et al*, 1999)

14.2 Medios de cultivo para la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Medio LGIE sólido (Arrieta *et al*, 1996), **Medio LGIP** (Reis *et al*, 1994) y **Medio LGITA** (Stephan *et al*, 1991).

Componente	LGIE (g/L)	LGIP (g/L)	LGITA (g/L)
Ácido cítrico	---	---	5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	---	---	1.32
K ₂ HPO ₄	0.2	0.2	5.0
KH ₂ PO ₄	0.6	0.6	4.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	0.2	0.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02	0.02	0.02
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.002	0.002	0.002
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.01	0.01	0.01
Azul de bromotimol al 5% en 0.2 N de KOH	5 mL	5 mL	---
Triptona	1.0	---	---
Extracto de levadura	0.2	---	---
Fuente de carbono	50.0	100.0	5.0
Glicerol	1% (v/v)	---	---
Agar	15.0	2.0	
Ajustar el pH a 6.0 con 0.1 N de HCl		Ajustar el pH a 5.5 con ácido acético	

Medio de papa (G) (Stephan *et al*, 1991)

Componente	Cantidad/L
Extracto de papa	500 mL
Glucosa o sacarosa	2.5 g
Agar	15 g
Ajustar pH a 6.0	

El extracto de papa se prepara con 200g de papa cortadas en trozos pequeños y 500 mL de agua destilada, se hierve por 30 minutos a fuego lento, el extracto se filtra con algodón y se afora a 500 mL.

Medio de papa dextrosa (BIOXON)

Componente	g/L
Infusión de papa	200.0
Glucosa	20.0
Agar	15.0
pH final 5.6	

Medio Luria-Bertani

Componente	g/L
Extracto de levadura	5.0
Triptona	10.0
NaCl	5.0
Agar	14.0
pH final 7.0 ajustar con NaOH 5N	

14.3 Método del número más probable (NMP): Tabla y cálculos

Para calcular el NMP de organismos en la muestra, seleccionar como p_1 el número de gotas positivas en la dilución menos concentrada en la cual todas las gotas son positivas (hay crecimiento bacteriano), p_2 y p_3 representan los números de gotas positivas en las siguientes diluciones superiores. Buscar en la tabla el NMP. Se realizaron diluciones en base 10 y se inocularon 5 gotas por dilución en medio LGIP sólido, buscar el número de gotas positivas obtenidas para las tres diluciones p_1 , p_2 y p_3 y seguir la fila donde coincidan los tres valores y corresponderá a la dilución de p_2 . p_1 siempre debe ser 5 gotas positivas.

Número más probable para los valores de p_3							
p_1	p_2	0	1	2	3	4	5
5	0	0.23	0.31	0.43	0.58	0.76	0.95
5	1	0.33	0.46	0.64	0.84	1.1	1.3
5	2	0.49	0.70	0.95	1.2	1.5	1.8
5	3	0.79	1.1	1.4	1.8	2.1	2.5
5	4	1.3	1.7	2.2	2.8	3.5	4.3
5	5	2.4	3.5	5.4	9.2	16	---

Ejemplo, con 5 gotas por dilución se obtuvieron los siguientes números de gotas positivas después de la incubación: 5 a 10^{-5} , 5 a 10^{-6} , 3 a 10^{-7} , 1 a 10^{-8} , y 0 a 10^{-9} . En esta serie $p_1 = 5$, $p_2 = 3$ y $p_3 = 1$. Con esta combinación el NMP es 1.1 de microorganismos en la cantidad de inóculo aplicado en la dilución 10^{-7} . Multiplicando este número por el factor de dilución 10^7 se obtiene 11 millones de microorganismos como valor del NMP de la muestra original.