

## Estudio de la biopelícula formada por dos especies de *Pseudomonas* asociadas a plantas.

Heredia-Ponce, Z.M.<sup>1</sup>\*, Gutiérrez-B arranquero, J.A.<sup>1</sup>, Purtschert, G.<sup>2</sup>, Eberl, L.<sup>2</sup>, Cazorla, F.M.<sup>1</sup>, de Vicente, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus Universitario de Teatinos, Málaga (España). <sup>2</sup>Department of Plant and Microbial Biology, Universidad de Zúrich, Zúrich (Suiza). \*[zahiraheredia@uma.es](mailto:zahiraheredia@uma.es)

### INTRODUCCIÓN

Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* constituyen un modelo de estudio de la interacción microorganismo-planta. *Pseudomonas syringae* es una especie que produce enfermedades en la parte aérea de algunas plantas. Por otro lado, *Pseudomonas chlororaphis* interacciona con la raíz y ha demostrado ser un agente de control biológico.

Ambas especies forman biopelículas y, a pesar de su diferente estilo de vida, análisis *in silico* han puesto de manifiesto la existencia de regiones genómicas tanto comunes como diferenciales que parecen estar implicadas en la biosíntesis de matriz extracelular. Se han construido mutantes de estas regiones y analizado su implicación en la formación de biopelícula y aspectos relacionados.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Análisis *in silico*: los análisis *in silico* se han llevado a cabo utilizando la plataforma online NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) y la base de datos de pseudomonas ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)).

Construcción de mutantes: los mutantes se han construido por delección utilizando el protocolo descrito por Matas *et al.* (2014).

Análisis de la formación de biopelícula en placas multipocillo: las condiciones de cultivo han sido medio Triptona-Peptona-Glicerol (TPG) a 25 °C. Los cultivos se han ajustado a 0,08 u.a a 600 nm y se ha analizado la formación de biopelícula desde las 24 horas hasta varios días.

Análisis de la formación de biopelículas en "Flow-cell chambers": El medio utilizado ha sido medio mínimo ABC. En *P. syringae*, se ha suplementado con glucosa 1 mM y extracto de levadura al 0,005%. En *P. chlororaphis*, se ha suplementado con citrato sódico 1 mM. El flujo se ha mantenido constante a 0,7 rpm. Se ha analizado el progreso de la formación de biopelícula a 25 °C durante 24, 48 y 72 h.

Análisis de la movilidad tipo swimming y swarming: en *P. syringae*, la movilidad tipo swimming y swarming se ha analizado en medio KB diluido 20 veces con 0,3% y 0,5% de agar, respectivamente. En *P. chlororaphis*, en medio TPG.

Unión de Rojo Congo en placa: se ha analizado en medio TPG suplementado con rojo Congo a una concentración de 20 µg/ml y a 25 °C de incubación.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* UMAF0158 (PssUMAF0158) y *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 (PcPCL1606), las cepas utilizadas en este estudio se han localizado regiones genómicas ortólogas a las regiones codificantes para los polisacáridos alginato y Psi de *Pseudomonas aeruginosa* PAOI. Como regiones diferenciales, en PssUMAF0158 se ha elegido la región codificante del polisacárido celulosa y en PcPCL1606 se ha localizado la región codificante de la proteína amiloide Fap (Dueholm *et al.*, 2010). De cada región ortóloga, se ha delecionado un gen que, según bibliografía codifica para una proteína esencial para la producción de cada componente extracelular mencionado (Arrebola *et al.*, 2015; Dueholm *et al.*, 2010; Franklin *et al.*, 2011). De entre la batería de mutantes simples, dobles y triples de PssUMAF0158 hasta el momento se han encontrado alteraciones en la formación de biopelícula, movilidad y unión de Rojo Congo en placa. En PcPCL1606, sólo el mutante en la producción del polisacárido Psl presenta alteraciones en la formación de la biopelícula. Los resultados conseguidos hasta el momento sugieren seguir profundizando en el papel del polisacárido Psi en la arquitectura de la biopelícula y por ello en ambas cepas en estudio se hipotetiza sobre su posible rol en la interacción con la planta huésped.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto de Excelencia de la CICE, Junta de Andalucía (P12-AGR-1473) y el Proyecto del Plan Nacional I+D+I MINECO (AGL2017-83368-C2-1-R), cofinanciados ambos con fondos FEDER; y Universidad de Málaga, Campus de Excelencia Internacional Andalucía Tech. Zaira María Heredia está financiada por un contrato del programa FPU del Ministerio de Educación (referencia FPU15/03644).

### BIBLIOGRAFÍA

- Arrebola, E., *et al.* (2015) FEMS Microbiol. Ecol. 91:fiv071.  
Dueholm, M.S., *et al.* (2010) Mol. Microbiol. 77:1009-1020.  
Franklin, M.J., *et al.* (2011) Front. Microbiol. 2:167.  
Matas, I.M., *et al.* (2014) Mol. Plant-Microbe Interact. 27:424-436.