



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**SEÑALIZACIÓN ENTRE LA AUTOFAGIA Y LA RESPUESTA A  
PROTEÍNAS NO PLEGADAS DURANTE EL PROCESO DE  
NODULACIÓN EN *Phaseolus vulgaris***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
EUNICE ALEJANDRA ZAYAS DEL MORAL

DIRECTOR DE TESIS:  
MIBB. MA. DEL CARMEN M. QUINTO HERNÁNDEZ  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:  
DRA. ALEJANDRA A. COVARRUBIAS ROBLES  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
DRA. MA. DE LOURDES MASSIEU TRIGO  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

EN MEMORIA DEL DR. FEDERICO E. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

CUERNAVACA, MORELOS

ENERO DE 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# **Agradecimiento institucional**

El trabajo presentado en esta tesis fue realizado como parte del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, sede Centro de Ciencias Genómicas e Instituto de Biotecnología con apoyo de la beca CONACYT No. 317533, bajo la dirección del Dr. Federico Sánchez y la MIBB Carmen Quinto, en el Instituto de Biotecnología, UNAM.

# Dedicatoria

## Federico y su último cambio de oficina

### *Genómicas y el primer encuentro en la oficina de Fede*

La primera vez que pisé tu oficina fue para pedir un espacio en tu grupo al terminar mi primer semestre en la LCG. Iba llena de miedo, había tenido medio año de cambios muy drásticos a la par con la entrada a la licenciatura, las cosas no estaban yendo tan bien, pero estaba muy segura de que quería trabajar con plantas. Y me topé con el mejor primer mentor y profesor en la Licenciatura en Ciencias Genómicas que pude tener, el cual, además, era experto en plantas: Federico Sánchez. Sin dudarlo, me diste la bienvenida a tu grupo y ahí comenzó esta historia. El trabajo con los Sánchez fue un gran impulso para seguir en todo (diría un salvavidas), y hasta tuve mi primer seminario con pastel de cumpleaños, ¿cómo no me iba a querer quedar un buen rato ahí?

### *Los alumnos no caben, recorten la oficina*

Sin duda visitarte en tu oficina era un acontecimiento emocionante: entrabas con una pregunta o una idea y salías con veinte más y mucho trabajo por hacer. No era extraño escuchar salir de ahí una buena carcajada, y claro, ¿por qué no?, de vez en cuando algún regaño. Además, era como visitar el museo: tus libros, tus fotos, tus fósiles, tus calendarios y orquídeas, el lugar ideal para uno que le gusta descubrir cosas emocionantes. También era la adrenalina de reportar algún resultado. Y si bien era un espacio para concentrarte en tu trabajo, siempre tenías un momento y disposición para cada uno de tus –muchos– visitantes. Un día decidiste recortarla, ante la necesidad de espacio para todos los estudiantes que tuvimos la fortuna de pasar por tu grupo, todos los que junto con tu equipo de asociados, técnicos y extranjeros visitantes fuimos parte de “Los Sánchez”.

Entre experimentos, ideas, hipótesis por probar y buen ambiente, después de la licenciatura no fue nada difícil decidirse a continuar el proyecto que había iniciado y emprender el doctorado contigo.

### *¿Cómo llegar a la oficina de un científico o científica?*

Agradezco todas las oportunidades que abriste para nosotros durante este tiempo: de experimentar, de aprender, de conocer nuevos horizontes, de amar a nuestro país y nuestros recursos, de disfrutar haciendo ciencia y compartirla con el mundo. Pero en particular, agradezco una muy importante: la de permitirnos dedicar un tiempo para enseñar a sembrar curiosidad y amor por la ciencia en otras personas. Si algo sabías hacer muy bien era justo eso, y día a día nos lo transmitiste, y nos remarcaste lo importante de sembrar esas semillitas principalmente en niños y jóvenes. Y de ahí que cada Sánchez tuvo que sacar el poquito de gracia –que parecía requisito en la solicitud de entrada al grupo– para divulgar la ciencia. Sigue

siendo indispensable mostrar a más personas que llegar a la oficina de un científico como tú puede ser una experiencia increíble.

### *Federico Sánchez y su último cambio de oficina*

Recientemente en una conferencia en el Colegio en el que trabajo, nos dejaron una reflexión: ¿quién fue ese profesor que marcó tu vida?

Recuerdo la mañana en que nos llamaste temprano a tu oficina. Íbamos llegando apenas, y con urgencia nos hiciste entrar... No era para trabajo, era para ver los primeros rayos de sol alumbrando la raíz del árbol que se veía por tu ventana. En verdad era una obra de arte natural, ver las curvas de esa raíz con sus sombras, en tonalidades sepia por los rayos del sol.



Fue un privilegio tener un profesor de vida como tú, alguien que con el ejemplo nos enseñó a disfrutar y conectar la ciencia con el arte, la música, la comida, la bebida, el deporte y mil cosas más. La última vez que nos vimos fue en tu nueva oficina del tercer piso, después de una plática de esas en las que para no variar salí con un post-it lleno de ideas. Aunque se me hacía tarde, esperé platicando lo más que pude antes de ir a clase, mientras llegaban por ti, porque irías a nadar. ¡Siempre ejemplo de energía!

Luego, hiciste un último cambio de oficina. Tardé unos cuantos meses en localizarla después de despedirte físicamente. Fue un día en el que estaba en el salón con mis alumnos de prepa trabajando en sus proyectos de investigación, el ejercicio consistía en generar preguntas para elegir sus temas, invitarlos a pensar, cuestionarlos. De repente volteé a la ventana y miré el árbol que se ve desde ahí. Sus raíces. Así como las de tu ventana, más largas, más grandes, más ramificadas. En ese momento entendí que ahí seguías, que esta vez solo habías ampliado

tu oficina, y que ahora te podíamos encontrar ahí: en las raíces, en las preguntas, en cada idea de cada estudiante, en cada lectura o canción que nos recomendaste, en cada tema del que nos hablaste, en cada historia que un día sembraste y que ahora germina en el corazón de quienes tuvimos el gusto de conocerte, y hace eco en muchos más.



Gracias por ser ese “padre académico”, mío y de muchos, gracias por hacernos sentir familia a “Los Sánchez”, que a la fecha seguimos conectados y transmitiendo eso que sembraste desde nuestras diferentes trincheras. Gracias por mostrarnos y compartirnos el gran amor por tu familia, sin duda ejemplar. Me tomó mucho tiempo entender cómo cerrar esta parte del camino que aprecio tanto, pero estoy lista.

Te dedico esta tesis, con todo mi cariño y admiración, hasta todos los rincones de tu oficina ampliada, desde donde nos sigues acompañando, mi querido Profesor, Federico Sánchez.

# Agradecimientos

Gracias mamá por ser guerrera y valiente, agradezco infinitamente que podamos seguir compartiendo estos momentos. Gracias papá por tu incondicional apoyo. Gracias por todo su amor y paciencia en esta parte del camino. Gracias a mi familia, por estar ahí siempre apoyando en todo con mucho amor.

Gracias a mis amistades que estuvieron siendo siempre el motor, compañía, crítica y apoyo invaluable. Son esa familia que la vida me dejó elegir para compartir la vida, les quiero mucho.

Gracias a todos los Sánchez, por ser colegas, amigos, familia, por convertir esta época en algo invaluable.

Gracias a todos los Quinto y los Cárdenas, terminar proyectos y experimentos habría sido imposible sin su invaluable amistad, compañía y apoyo.

## Agradecimientos académicos

### **A mi comité tutor:**

Al Dr. Federico Sánchez, por compartirnos toda su energía como tutor, profesor, amigo entrañable.

A la Dra. Carmen Quinto por su gran disposición y apoyo en todo momento para concluir el doctorado, por su gran ejemplo de frotaleza. Gracias por tu paciencia, gracias por insistir.

A las Dras. Alejandra Covarrubias y Lourdes Massieu, con quienes siempre fue un placer compartir y discutir los resultados, y recibir su retroalimentación.

### **A los académicos del Instituto de Biotecnología:**

Al Dr. Luis Cárdenas y todos los miembros que fueron o son parte de los grupos que conforman el consorcio, por su apoyo y amistad, indispensables para concluir esta tesis.

A la Dra. Georgina Estrada Navarrete, por compartirme toda su experiencia y disposición, apoyando siempre en la planeación y desarrollo de estos proyectos.

A la Dra. Claudia Díaz por su colaboración en la discusión de resultados y redacción del artículo, esenciales para concluir este trabajo.

Al MB. Juan Elías Olivares, por su apoyo en el manejo de anticuerpos y en la electroforesis con geles de acrilamida.

A la QFB. Xóchitl Alvarado-Affantranger, por su apoyo en el trabajo de Microscopía de tejidos vegetales.

Al M. en C. Damián Martínez Reyes, estudiante de la LCG, cuya colaboración en este proyecto fue muy valiosa.

A los miembros de la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática, el Dr. Fidel Alejandro Sánchez, la M. en C. Verónica Jiménez Jacinto, la Dra. Leticia Vega Alvarado y al Dr. Ricardo Alfredo Grande por su asesoría y apoyo en la secuenciación y en los análisis transcriptómicos.

Eugenio López y Jorge Yañez por la síntesis de oligonucleótidos y secuencia de ADN.

A la Biol. Olivia Santana por su apoyo y cuidado del cepario del laboratorio.

A la Biol. Noreide Nava por su apoyo y disposición como técnico experimental.

**A los académicos del Centro de Ciencias Genómicas:**

Al Dr. Alfonso Leija por su apoyo en los experimentos de reducción de acetileno.

A la Dra. Esperanza Martínez y al Dr. Luis Servín (ahora Investigador en la ENES-Morelia) por invitarme a colaborar descubriendo las bacterias predilectas de cada especie de *Phaseolus* y ver mi calle llena de leguminosas y mi jardín como los lugares biodiversos y fascinantes que son.

A los que nos abrieron la puerta de su laboratorio para la realización de proyectos experimentales con estudiantes de secundaria y bachillerato en este período.

**A los miembros del jurado**

Carmen Quinto Hernández

Instituto de Biotecnología, UNAM

Esperanza Martínez Romero

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Georgina Hernández Delgado

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Miguel Lara Flores

Instituto de Biología, UNAM

Lorenzo Segovia Forcella

Instituto de Biotecnología, UNAM



# Índice

<b>Agradecimiento institucional</b>	<b>2</b>
<b>Dedicatoria</b>	<b>3</b>
Federico Sánchez y su último cambio de oficina	4
<b>Agradecimientos</b>	<b>6</b>
Agradecimientos académicos	6
<b>Índice</b>	<b>9</b>
<b>Resumen</b>	<b>9</b>
<b>Introducción general</b>	<b>12</b>
<i>Phaseolus vulgaris: una leguminosa modelo de importancia mundial</i>	12
La interacción simbiótica Rhizobium – Phaseolus vulgaris	14
La interacción entre frijol y Rhizobium, un escenario de estrés	17
<b>I. Señalización entre la autofagia y la respuesta a proteínas no plegadas durante el proceso de nodulación en Phaseolus vulgaris</b>	<b>23</b>
Respuesta a proteínas no plegadas	23
Respuesta a proteínas no plegadas en plantas	26
La interacción simbiótica como un escenario de estrés	26
UPR: un mecanismo por evaluar durante la nodulación	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS PARTICULARES	28
METODOLOGÍA	28
Identificación bioinformática de los componentes de la vía de UPR en frijol	28
Inmuno detección de la autofosforilación de IRE1	29
Detección de actividad del dominio de ribonucleasa de IRE1 medida a través del mensajero blanco, homólogo a AtbZIP60	29
Crecimiento de las plantas para la cinética de nodulación	31
Extracción de ARN	32
RT-PCR semicuantitativo	32
Cuantificación de los niveles de transcrito por análisis de transcripción reversa cuantitativa (PCR cuantitativa)	33
RESULTADOS	34
Identificación de los componentes de la vía de UPR en frijol	34
Actividad del dominio de ribonucleasa de IRE1 detectada a través del procesamiento del mensajero blanco PvbZIP60, homólogo a AtbZIP60	35
Procesamiento del mensajero blanco PvbZIP60 durante el desarrollo del nódulo simbiótico en Phaseolus vulgaris	41

DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	44
Perspectivas	46
Autofagia	46
Phaseolus vulgaris como modelo de estudio de UPR	47
<b>II. Transcriptómica, Identificación génica y análisis de genómica funcional de nódulos fijadores de nitrógeno de Phaseolus vulgaris, Phaseolus acutifolius (Tepari bean) y Vigna unguiculata (cowpea) en cultivos resistentes a calor</b>	<b>47</b>
Antecedentes	47
Simbiosis en otras especies del género Phaseolus	50
Objetivos de la investigación y productos anticipados	51
Objetivo general	51
Objetivos específicos:	51
Plan de trabajo:	52
Materiales y métodos	52
Cultivares	52
Substrato	52
Riego	52
Cepas bacterianas	52
Condiciones de la cámara de crecimiento	52
Selección de genotipos tolerantes a estrés por calor	53
Crecimiento de las plantas	53
Extracción de ARN	55
Secuenciación de transcriptomas (RNA-seq)	55
Análisis de transcriptomas	55
RT-PCR cuantitativa	56
Inmunolocalización	56
RESULTADOS	57
Selección de genotipos tolerantes y sus correspondientes bacterias simbióticas	57
Efectos del estrés por calor sobre los niveles de fijación de nitrógeno	59
Análisis de transcriptomas de nódulos bajo condiciones de estrés por calor	63
Genes diferencialmente regulados en nódulos de 20 dpi bajo condiciones de estrés por calor	65
CONCLUSIONES	1
BIBLIOGRAFÍA	69
Abreviaturas	80
<b>III. Divulgación y Docencia</b>	<b>80</b>
A) Docencia	80
B) Más Ciencia Por México	82

C) Libro: Un Mundo de Bacterias	83
D) Obra de teatro El Romance de una Bacteria Benéfica y Una Planta	83

# Resumen

La relación simbiótica entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium*, es un proceso que ha sido ampliamente estudiado por la importancia que tiene a nivel de ecosistema, y en la producción de cultivos. El desarrollo de los nódulos simbióticos que se forman para que *Rhizobium* pueda efectuar la fijación de nitrógeno implica una serie de cambios a nivel celular que conllevan el remodelamiento al interior de las células y gran actividad en la regulación de diversas vías metabólicas para recibir y albergar al hospedero. Dentro de estos procesos, se han identificado diversos factores asociados al estrés como la producción de especies reactivas de oxígeno, flujos de calcio, producción de hormonas y la expresión de factores de transcripción compartidos en vías de respuesta a estrés biótico y abiótico. Esto sugiere que las células del nódulo enfrentan condiciones de estrés con las cuales deben contender a lo largo del proceso para que la infección y actividad del nódulo se lleven a cabo. En este trabajo, doy continuidad a mi tesis de licenciatura en la cual, a través del estudio de la expresión, localización y silenciamiento de la chaperona Hsp70/BiP, asociada a estrés por calor y respuesta a proteínas mal plegadas, identificamos que tiene un papel importante en la actividad e integridad de los simbiosomas en nódulos determinados de 18 a 22 días post inoculación. La gran cantidad de membranas de simbiosomas, la presencia de Hsp70/BiP en la membrana de estos y el gran incremento en la síntesis de proteínas como la leghemoglobina durante la etapa activa de fijación de nitrógeno sugería que la actividad de Hsp70 podía tener un papel importante como regulador de estrés. En la última década, una de las respuestas a estrés más estudiadas en plantas es la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR por sus siglas en inglés), la cual tiene como uno de sus principales y muy conservados reguladores a Hsp70/BiP. En este proyecto evaluamos la actividad de UPR empleando diversos marcadores a lo largo del desarrollo del nódulo e identificamos que está activa en momentos clave como lo es la etapa de fijación de nitrógeno y la senescencia, lo cual sugiere que mantener la homeostasis del abundante retículo endoplásmico de las células infectadas, y posiblemente también del simbiosoma, es un proceso clave para mantener la actividad de fijación de nitrógeno. La conexión de esta respuesta con otras vías como la autofagia, nos abren más preguntas para estudiar cómo interactúan entre ellas para mantener la homeostasis de las células infectadas.

Por otra parte, entender los mecanismos de estrés en el nódulo simbiótico, nos abre la puerta para estudiar en un escenario de campo, cómo contienden los diferentes genotipos de *Phaseolus vulgaris* con las condiciones adversas que se presentan actualmente, como lo es el estrés por calor. Por lo que, como segunda parte de este proyecto, presentamos un análisis transcriptómico en el que buscamos identificar genes que se regulan diferencialmente ante condiciones de calor en genotipos sensibles y resistentes de *Phaseolus vulgaris*.

# Introducción general

## *Phaseolus vulgaris*: una leguminosa modelo de importancia mundial

*Phaseolus vulgaris* L., el frijol común, es una leguminosa relevante, económica y socialmente a nivel mundial, ya que representa una importante fuente de proteína y carbohidratos, principalmente en países en desarrollo. Pertenece al género *Phaseolus* L. de la familia Leguminosae, tribu Phaseoleae, y es el más diverso de la subtribu *Phaseolinae*. Es una especie diploide con 11 cromosomas, un tamaño mediano de genoma, un rango de 588 a 637 Mbp (Bennet and Leitch, 2005) y un contenido de G+C del 39.4% (Baxter y Kirk, 1969). Esta leguminosa establece una interacción simbiótica con bacterias del suelo del género *Rhizobium*. Estas bacterias inducen el desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces del frijol común, proveyendo amonio como fertilizante a partir del N<sub>2</sub> atmosférico, muy relevante en la producción de sus semillas.

Ante su gran importancia, el frijol común ha sido una especie ampliamente estudiada en diversos aspectos. A nivel de genoma, en el 2005, fueron reportados los primeros marcadores de secuencia expresada (Expressed Sequence Tags; ESTs) de *P. vulgaris* y *P. coccineous*, incluyendo información de secuencias de nódulos fijadores de nitrógeno, raíces deficientes de fósforo, vainas en desarrollo y hojas (en la ahora extinta base de datos <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>). Dos grupos en paralelo trabajaron para obtener la secuencia del genoma completo de *P. vulgaris*. El primer genoma correspondiente a *P. vulgaris* L. se liberó en el 2014, encabezado por el Dr. Scott Jackson, de la Universidad de Georgia, bajo la supervisión de los protocolos del Joint Genome Institute (JGI), con la secuencia del genoma del genotipo andino G19833 (Schumtz *et al.* 2014). A partir de entonces, la curación de este genoma ha sido mejorada en varias versiones disponibles en la base de datos Phytozome

(<https://phytozome.jgi.doe.gov>). Un esfuerzo paralelo realizado por el Phasibeam – Genome CYTED International Initiative (Mexico-Spain-Brazil-Argentina) obtuvo el genoma de *Phaseolus vulgaris* BAT93, en conjunto con el transcriptoma (bajo diferentes condiciones de desarrollo y condiciones de estrés) de este genotipo Mesoamericano sensible a sequía y calor. La publicación fue presentada en enero del 2016 por Vlasova *et al.* con la liberación de la secuencia completa de su genoma, consorcio en el cual participó el grupo del Dr. Federico Sánchez.

En las últimas dos décadas gracias a las tecnologías “ómicas” hemos podido integrar cada vez más información de campo y experimental con la de las secuencias genómicas de los frijoles andino y mesoamericano, así como analizar sus transcriptomas y proteomas en diversas condiciones para develar su origen e historia de domesticación, y aportar a la comprensión de un sinnúmero de procesos (O’Rourke *et al.* 2014, Rendón-Anaya *et al.* 2017).

## La interacción simbiótica *Rhizobium* – *Phaseolus vulgaris*

El nitrógeno es uno de los nutrientes más relevantes para la planta, cuya disponibilidad es una limitante para su crecimiento y desarrollo. A pesar de que el  $N_2$  es el elemento más abundante en la atmósfera, no se encuentra disponible en una forma asimilable para el metabolismo de la planta. La molécula de  $N_2$  es muy estable al tener un triple enlace covalente, por lo que requiere grandes cantidades de energía y condiciones reductoras para reducirla a  $NH_3$  ( $NH_4^+$ ), por lo que la mayoría de las plantas dependen del nitrógeno reducido en el suelo en forma de nitrato ( $NO_3^-$ ), que puede obtenerse a partir de la mineralización del nitrógeno contenido en la materia orgánica del suelo, en condiciones de temperatura y humedad muy específicas, lo cual sigue haciendo muy limitante su disponibilidad (Philippot y Germon, 2005). Sin embargo, existen algunos microorganismos procariotas que pueden reducir el  $N_2$  en  $NH_4^+$  empleando la enzima

nitrogenasa, permitiendo el aprovechamiento de nitrógeno para su supervivencia. Se estima que la fijación biológica de nitrógeno contribuye anualmente con 140 millones de toneladas de nitrógeno (Skot, 2003). Algunos de estos microorganismos se encuentran en vida libre, mientras que otros se asocian a un hospedero. Es el caso de una parte importante de la familia de las leguminosas, las cuales a través de un proceso simbiótico pueden alojar microorganismos fijadores de nitrógeno recibiendo nitrógeno reducido a cambio de proporcionar carbono a la bacteria. El crecimiento poblacional y el aumento en la demanda de cultivos a nivel mundial que conlleva, han generado el uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados, cuya producción industrial es cara económica y ecológicamente, por lo que el estudio de este proceso simbiótico ha adquirido una gran importancia en las últimas tres décadas (Skot 2003).

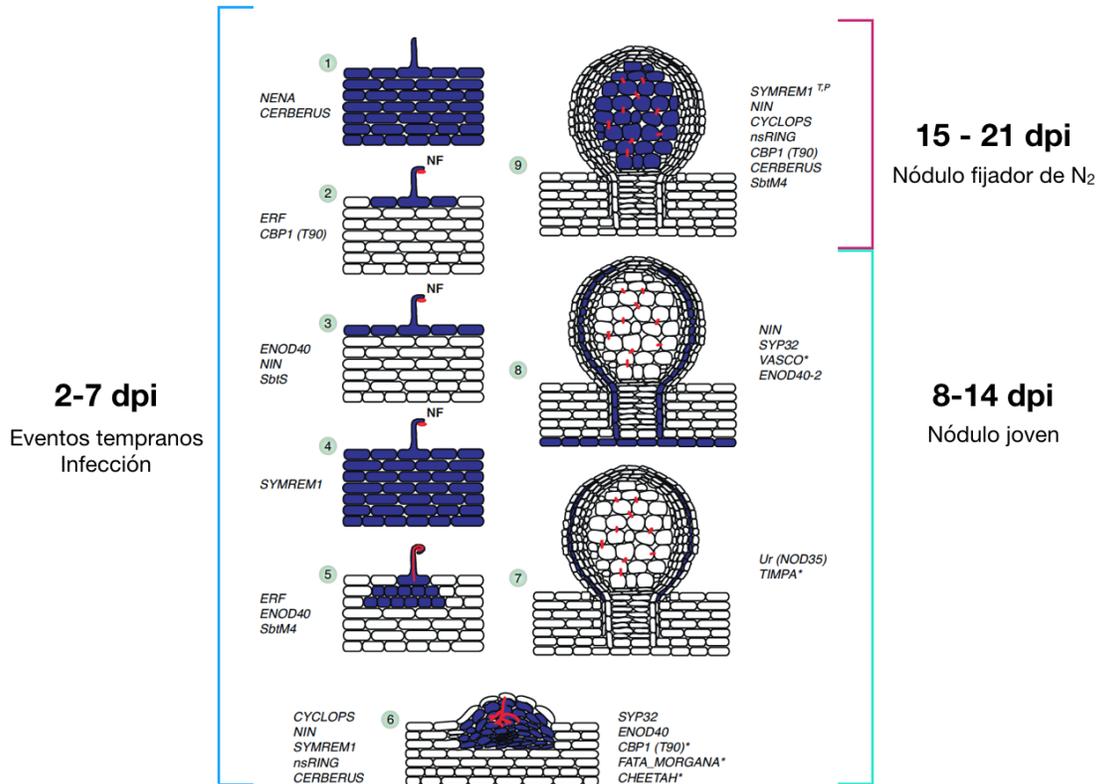
Como mencionamos previamente, el género *Phaseolus* representa una fuente de nitrógeno para los humanos. Provee de fertilización biológica estableciendo una relación simbiótica entre bacterias fijadoras de nitrógeno y su raíz, que en condiciones limitantes de nitrógeno, da lugar a los nódulos simbióticos. La formación del nódulo que alberga las bacterias implica un diálogo molecular entre la raíz y los microorganismos del suelo. Este diálogo comienza cuando los flavonoides secretados por la raíz de la planta inducen en la bacteria la expresión de genes *nod*, la cual culmina en la síntesis y secreción de los factores de nodulación (factores Nod). Cuando el pelo radical reconoce específicamente dichos factores, éste atraviesa cambios morfológicos y fisiológicos que permiten a *Rhizobium* infectar y colonizar la raíz. Algunos de estos cambios –deformación del pelo radical, variaciones en el flujo de calcio, producción de especies reactivas de oxígeno, cambios en la estructura del citoesqueleto y relocalización de organelos– constituyen señales necesarias para que las células del córtex se dividan y progrese el avance del hilo de infección, una nueva estructura tipo túnel por donde las bacterias penetran a través del pelo a la raíz de la planta. Como resultado se forma un nuevo órgano, el nódulo simbiótico, en donde se lleva a cabo el proceso de fijación de nitrógeno (descripción detallada del proceso en Popp y Ott, 2011).

Las leguminosas pueden desarrollar dos tipos de nódulos: los indeterminados, los cuales tienen un meristemo persistente y presentan una infección continua (por ejemplo, en el género *Medicago*), y los determinados, que tienen un tiempo de vida definido, pierden su meristemo central y no pueden infectarse continuamente a lo largo de su maduración (por ejemplo, los de *Glycine max*) (Popp y Ott, 2011).

El género *Phaseolus* desarrolla nódulos determinados, los cuales toman una forma esférica y tienen un período de vida de entre 25 y 30 días posteriores a la inoculación (dpi) con la bacteria. Tras los primeros 7 a 10 dpi es posible observar un primordio de nódulo, un primer abultamiento en la raíz en donde se han comenzado a dividir las células que dan lugar al nuevo órgano, y se comienzan a desarrollar hilos de infección en los pelos radicales. Durante este período, en el interior de cada célula infectada se produce una membrana que envuelve a las bacterias, que ahora toman el nombre de bacteroides, a esta membrana se le conoce como membrana peribacteroidal y, en conjunto con sus huéspedes, simbiosoma. Posteriormente en los siguientes 8 a 14 dpi el nódulo joven comienza a madurar y entre los 15 y 21 dpi presenta la actividad de fijación de nitrógeno (Fig. 1). En esta etapa, el transporte de nutrientes –siendo la fuente de carbono para la bacteria a cambio de nitrógeno fijado–, y de diversos solutos y sus transportadores que participan en la transducción de señales entre la célula infectada y el interior de sus simbiosomas es esencial para que los bacteroides lleven a cabo la fijación de nitrógeno (Clarke *et al.*, 2014). El nódulo fijador de nitrógeno tiene un característico color rosado, que se intensifica en el interior debido a la expresión de la leghemoglobina, proteína que regula el transporte de oxígeno que recibe la bacteria para mantener el funcionamiento de la nitrogenasa (Appleby, 1984; Appleby, 1992).

Posteriormente, ocurre la senescencia del nódulo, la cual se identifica por un rápido decaimiento en la fijación biológica del N y su contenido de leghemoglobina y culmina

con la muerte del nódulo (Fernández-Luqueño *et al.* 2008). En cada una de estas etapas se ha caracterizado la expresión de genes específicos relacionados a los eventos que se presentan, mismos que conectan diferentes vías de señalización. Dada la complejidad de las redes metabólicas implicadas en este proceso, aún hay mucho por investigar al respecto para comprender la organogénesis del nódulo y su funcionamiento (Pop y Ott, 2011).



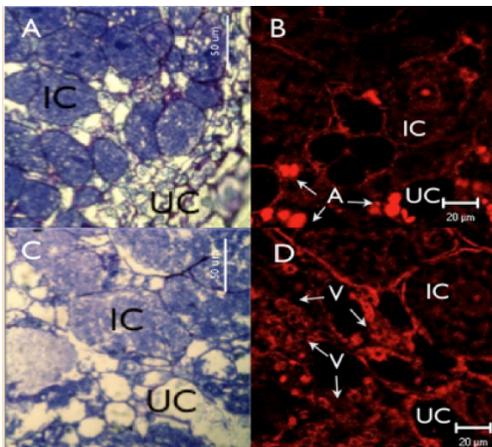
**Fig. 1. Organogénesis del nódulo determinado.** El desarrollo del nódulo simbiótico desde el reconocimiento entre la bacteria y la raíz, hasta la maduración del nódulo fijador de nitrógeno, están marcados por eventos particulares de cada etapa, asociados a la expresión de los genes que se muestran en la figura. Los primeros 7 días se caracterizan por eventos tempranos de reconocimiento entre la bacteria y el pelo radical, y la generación del hilo infección (1-6). De los 8 a 14 dpi la bacteria va infectando las células (7-8), las cuales forman los simbiosomas para albergar a los bacteroides y atienden la demanda energética regulando la señalización a través de la membrana peribacteroidal. De los 15 a 21 dpi, una vez que el nódulo ha madurado, comienza la fijación de nitrógeno (9). Imagen modificada de Popp y Ott, 2011.

## **La interacción entre frijol y *Rhizobium*, un escenario de estrés**

Los análisis experimentales y bioinformáticos realizados en los laboratorios para estudiar la interacción simbiótica entre el frijol y *Rhizobium* han generado un panorama cada vez más completo de los mecanismos involucrados, sin embargo, la realidad en los diversos ecosistemas donde se presenta implica muchas más variables a considerar. Existen factores bióticos –microorganismos patógenos, o no, que interactúan con *Rhizobium* en el suelo o los que interactúan directamente con la planta– y abióticos –temperatura, pH, disponibilidad de agua, composición del suelo, concentración salina, presencia de muy diversas sustancias químicas– que pueden alterar e incluso inhibir parcial o totalmente la interacción simbiótica (Andrés J *et al.*, 2012). Ante la importancia de la nodulación en la naturaleza y en la producción de alimentos, es fundamental conocer cómo contienda con estos factores, estudiando mecanismos de defensa y respuesta a estrés a la par con el proceso de nodulación, en sus distintas etapas.

Ante este panorama, el antecedente directo de este trabajo fue mi tesis de licenciatura, en la cual analicé el papel de la “Heat Shock Protein” 70 (Hsp70) en los nódulos simbióticos, una chaperona con actividad importante en respuesta a estrés, cuya expresión ha sido reportada en proteomas de la membrana peribacteroidal, particularmente la que tiene un péptido HDEL en el extremo C-terminal que la localiza en el retículo endoplásmico (a partir de ahora la nombraremos Hsp70/BiP) (Panter *et al.*, 2000). El objetivo en dicho trabajo fue analizar el efecto del estrés por calor en la expresión y localización de Hsp70 sobre los nódulos maduros, en uno de los días con mayor actividad de fijación de nitrógeno (20 dpi). La expresión de Hsp70 es clave en el restablecimiento de plantas sometidas a estrés por calor y estrés por sequía (Lin *et al.*, 2001, Valente *et al.*, 2009). Nuestra hipótesis sugería que la proteína se relocalizaría en los nódulos, principalmente en células infectadas para protegerlas y esto podría permitir

mantener la actividad de fijación de nitrógeno. De manera interesante, encontramos que en los nódulos control la proteína colocalizaba con una fuerte señal en el núcleo y nucleolo de la célula, la cual es una señal característica de estrés (Velazquez & Lindquist, 1984), lo que sugiere que una célula infectada, en su etapa activa de fijación de nitrógeno presenta condiciones de estrés (Fig. 2). Por otra parte, en los nódulos sometidos a estrés por calor, observamos que la expresión de Hsp70 se redujo en el núcleo respecto al control, pero se incrementó en las regiones donde hay membranas peribacteroidales, en las células infectadas. Con este resultado, decidimos continuar esta investigación para analizar cómo las respuestas a estrés asociadas a Hsp70/BiP podrían estar participando e interviniendo en el desarrollo de los nódulos fijadores de nitrógeno control y sometidos a estrés por calor. En muchas ocasiones se asume que dados los procesos activos y condiciones hay estrés a lo largo de la nodulación, pero hay información por explorar y conectar respecto a las vías de respuesta a estrés que están activas y cómo se regulan o qué desencadenan a lo largo del proceso.



**Fig. 2 La inmunolocalización de Hsp70 en nódulos de 20 dpi de frijol sugiere estrés celular en condiciones control**

(A) Nódulo de planta de 20 dpi de *Phaseolus vulgaris* Negro Jamapa

(C) Nódulo de planta de *Phaseolus vulgaris* Negro Jamapa, sometida a estrés por calor; 45°C, 2 h.

Cortes semifinos de nódulos, teñidos con azul de toluidina, procesados a partir de los nódulos utilizados para inmunolocalización. Amplificación de imagen: 40X

Inmunolocalización de Hsp70 en cortes semifinos de nódulos, con anti-Hsp70 monoclonal (MA3-008; Thermo Scientific)

(B) Nódulo de planta de 20 dpi de *Phaseolus vulgaris* Negro Jamapa

(D) Nódulo de planta de *Phaseolus vulgaris* Negro Jamapa, sometida a estrés por calor; 45°C, 2 h

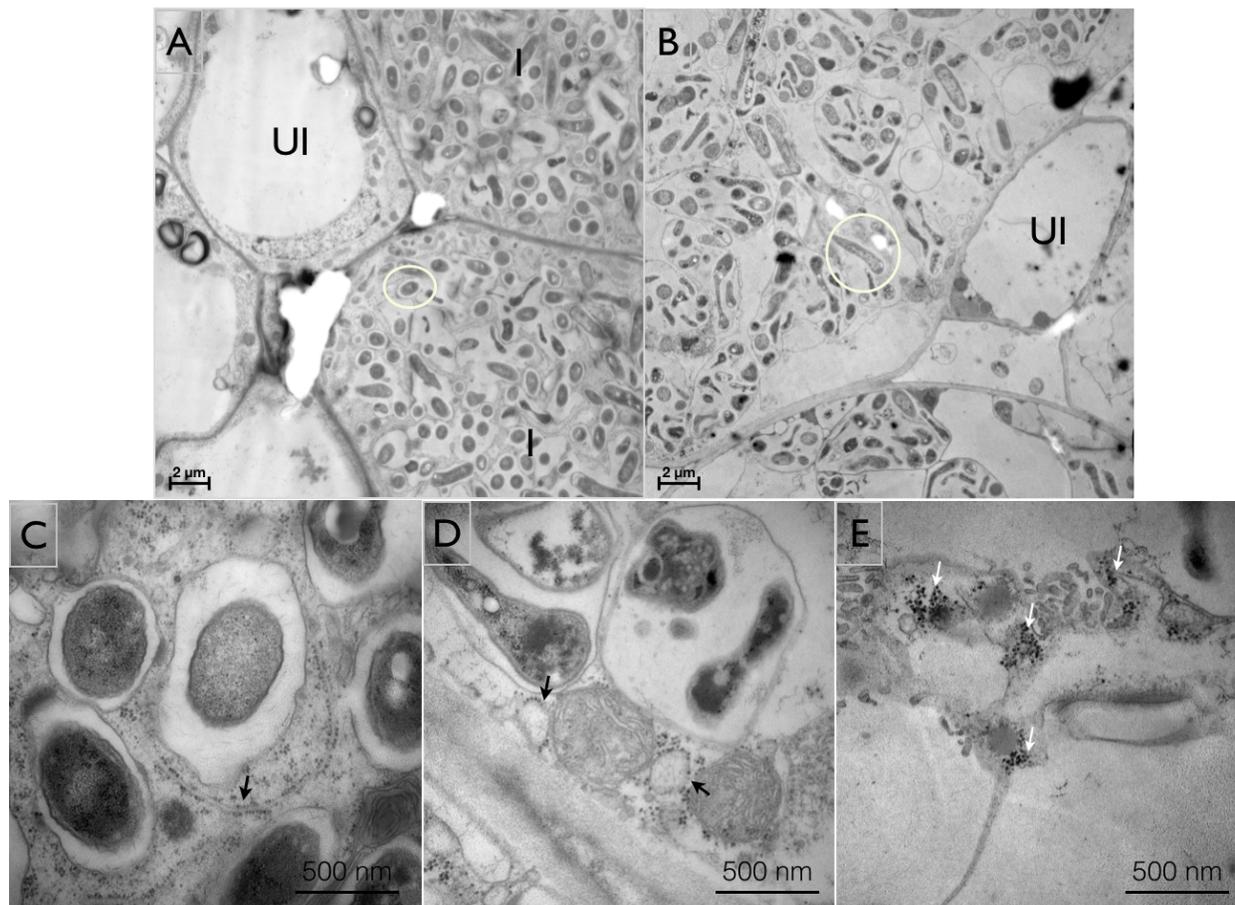
Amplificación de imagen: 63X. IC, células infectadas, UC, células no infectadas. V+ flecha blanca: vesículas. A+ flecha blanca: amiloplastos.

Li *et al.*, (2008) reportó el papel de la chaperona Hsp70 de retículo endoplásmico (Hsp70/BiP, en dicho artículo nombrada GRP78/BiP) como regulador importante en una respuesta a estrés ampliamente conservada desde levaduras hasta mamíferos: la respuesta a proteínas mal plegadas. El escenario de estrés que se mostraba en células HEK293 y HeLa en las que se hizo el estudio, comparte ciertas características reportadas en las células infectadas a lo largo del desarrollo del nódulo: cambios en flujo de calcio, producción de especies reactivas de oxígeno, autofagia, remodelaje de membranas mediado por cambios en el citoesqueleto, entre otras. Esto nos sugirió a dicha respuesta como un punto de partida para generar una nueva hipótesis.

Para conocer más la función de Hsp70/BiP en los nódulos de frijol, realizamos un silenciamiento en raíces transgénicas de frijol utilizando un RNAi dirigido a la región 3' que contiene la secuencia de localización en el retículo HDEL. Los nódulos se formaron y tenían un aspecto normal a los 20 dpi, en apariencia similar a los de las raíces transformadas con el vector vacío. Sin embargo, a nivel celular, en imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica, en las células infectadas, el sistema de membranas de los simbiosomas y el RE se vieron severamente afectados, observando fragmentación tanto de las membranas peribacteroidales, como del retículo endoplásmico (Fig. 3).

El silenciamiento no es letal, dado que, por la alta conservación de la familia Hsp70, otras Hsp70 como las de citosol pueden cubrir algunas funciones de esta proteína. Sin embargo, dado que no tienen la señal HDEL que las localiza en la membrana del RE, las funciones que se asocien directamente con este sistema de membranas se pueden ver afectadas. En este caso, sabemos que esta secuencia de localización también está presente en las Hsp70 encontradas en las membranas del simbiosoma, por lo que el papel en la señalización directa o indirectamente podría estar asociado a la pérdida de integridad de las membranas del simbiosoma y del retículo endoplásmico que se

observa en las células infectadas de los nódulos silenciados. En conjunto con el resultado de la inmunolocalización, propusimos que Hsp70/BiP puede participar regulando un estrés prolongado en la célula infectada y que, al reducir su expresión, esto conlleva a la fragmentación de las membranas del retículo endoplásmico debida a estrés. El retículo endoplásmico es un organelo con curvaturas y topología que se remodelan y movilizan constantemente ante distintas condiciones celulares. La fragmentación de este organelo se ha reportado previa a la degradación por autofagia ante diversas condiciones de estrés (Khaminets *et al.* 2015). En las micrografías de los nódulos con silenciamiento de Hsp70/BiP donde observamos fragmentación del RE, encontramos en la periferia fragmentos circulares de RE y, en las regiones centrales, los ribosomas en acumulaciones dispersas entre los simbiosomas y no observamos autofagosomas (3d y 3e), lo cual, aunque requiere muchas más evidencias, nos sugirió que este proceso importante en la nodulación podría estar relacionado y afectado por la reducción en la expresión de Hsp70/BiP.



**Fig. 3. Fenotipo del silenciamiento de Hsp70/BiP en retículo endoplásmico y simbiosomas de nódulos de frijol de 20 dpi.**

(A) y (B) Micrografías electrónicas de células infectadas por *R. tropici* de nódulos de 20 dpi. (A), control pTdt-DC-RNAi-vacío, (B) pTdt-PvBiP-RNAi. UI: células no infectadas. I: células infectadas. Los círculos señalan un bacteroide de la célula infectada. Amplificación 6K, barra: 2 $\mu$ m. En el control (A) observamos bacteroides definidos envueltos en su membrana peribacteroidal, mientras que en las células de BiP-RNAi (B), los bacteroides se ven afectados, deformes y las membranas peribacteroidales no están definidas.

(C), (D) y (E) Micrografías electrónicas representativas de células de nódulos simbióticos en células infectadas. (C) pTdt-DC-RNAi-vacío (región central de la célula), (D) pTdt-BiP-RNAi (región cercana a la membrana plasmática y la pared celular), (E) pTdt-BiP-RNAi (región central de la célula). RE: flechas negras. Cúmulo de ribosomas: flechas blancas. Amplificación: 50K, barra: 500 nm. En el panel (C) observamos en el control un simbiosoma con membrana peribacteroidal bien definida y el RE rodeando dicha membrana, panorama ejemplo de cada simbiosoma en la célula infectada. En las células BiP-RNAi, en el panel (D) se observan los bacteroides dañados en uno de los pocos simbiosomas íntegros que se encontraban particularmente en regiones cercanas a la membrana citoplasmática y pared celular. El RE se observa fragmentado, en forma de círculos en dichas regiones (D), lo cual corresponde a un fenotipo asociado a estrés severo. Por otra parte en las regiones centrales, no es posible identificar la membrana del RE, y se observan cúmulos de ribosomas cercanos a pequeñas membranas que pudieron formar parte del RE o los simbiosomas.

Ante este panorama, surgió la propuesta de evaluar la respuesta a proteínas mal plegadas en los nódulos dado el papel que tiene en la manutención de la homeostasis en el RE. En esos años se publicaron los primeros reportes acerca de la conservación de los principales reguladores de la respuesta a proteínas mal plegadas en plantas, mismos que describo a detalle en la siguiente sección. La pregunta que dio pie a este proyecto de doctorado fue ¿cuál es el perfil de actividad de la respuesta a proteínas mal plegadas en las células del nódulo a lo largo de su desarrollo? ¿es un mecanismo de regulación de estrés ante la infección por la bacteria simbiote? Con los antecedentes presentados, proponemos que la respuesta puede estar activa en etapas particulares del desarrollo de los nódulos simbióticos debido a los cambios que genera la presencia de *Rhizobium* a lo largo del proceso de infección, conforme el nódulo madura y fija nitrógeno y/o durante la senescencia, ya que también en estas etapas hemos observado procesos de degradación que pueden estar relacionados, como la autofagia (Estrada-Navarrete *et al*, 2016).

Por otra parte, al inicio de este proyecto, surgió la oportunidad de colaborar con la Agencia Internacional Atómica de Energía (por sus siglas en inglés, IAEA) en un Proyecto de Investigación Coordinada con la temática de mejoramiento en la adaptación de cultivos a altas temperaturas. Dando continuidad al trabajo previo de licenciatura referente a estrés por calor y complementando nuestro objetivo del doctorado de evaluar la actividad de respuestas a estrés en los nódulos del frijol ante condiciones control y de altas temperaturas, decidimos investigar si en la etapa activa de fijación de nitrógeno existen genes diferencialmente expresados que nos indiquen la actividad y efectos de dicho estrés, así como mecanismos importantes para contender con él.

A continuación, presento el trabajo desarrollado en estos dos proyectos durante el doctorado.

# I. Señalización entre la autofagia y la respuesta a proteínas no plegadas durante el proceso de nodulación en *Phaseolus vulgaris*

## Respuesta a proteínas no plegadas

El correcto plegamiento de los péptidos recién sintetizados en el ribosoma es uno de los procesos más importantes para la célula, de ello depende el funcionamiento adecuado de muchas proteínas, y por lo tanto el buen funcionamiento celular. Tanto en organismos procariotas como eucariotas encontramos mecanismos muy conservados para asegurar el plegamiento correcto. Por una parte, las proteínas altamente traducidas tienden a ser más solubles que las de baja expresión, disminuyendo la propensión a la agregación. Por otro lado, el ribosoma por sí mismo tiene la capacidad de comenzar a plegar el péptido naciente antes de que salga del complejo, y posteriormente se apoya con el uso de las proteínas conocidas como chaperonas para plegar adecuadamente los péptidos.

Diversos experimentos han demostrado que la traducción y el proceso natural de plegamiento han coevolucionado, generando nuevos mecanismos para el control adecuado de este proceso, principalmente ante la gran variedad de condiciones y estímulos que se presentan en las células de un organismo, donde los mecanismos iniciales no siempre son suficientes para lograr el adecuado plegamiento (Sabate *et al*, 2010). Es así como en organismos eucariotas se ha caracterizado la respuesta a

proteínas no plegadas –conocida por sus siglas en inglés como UPR; Unfolded Protein Response–.

La UPR es el conjunto de mecanismos que se activan en el retículo endoplásmico (RE) a consecuencia de la acumulación de péptidos no plegados o mal plegados, ante diversas condiciones de estrés tales como: bajos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , estrés oxidativo, hipoxia, deprivación de energía, estimulación metabólica, glicosilación alterada, respuestas inflamatorias, incremento en la síntesis de proteínas o la expresión de proteínas mal plegadas o subunidades no ensambladas (Bernales *et al*, 2006, Ciyan & Kaufman, 2012). La UPR se caracteriza por la actividad de tres vías principales: plegamiento, traducción y degradación. Algunos de los principales componentes de estas vías están funcionalmente conservados en levadura, mamíferos y plantas, aunque no todos conservan homología en sus secuencias.

En mamíferos, las principales proteínas reguladoras de la vía de UPR son IRE1, ATF6 y PERK. Estas proteínas están ancladas a la membrana del RE, donde detectan a los péptidos no plegados en el lumen del RE en estrecho vínculo con la chaperona BiP (Hsp70 localizada en el RE) y su co-chaperona Hsp40. Ante una acumulación excesiva de péptidos mal plegados, estas proteínas se oligomerizan, activando sus dominios funcionales y desencadenan la cascada de señalización de la UPR. En estos organismos, la respuesta tiene dos posibles desenlaces: la suspensión o arresto de la respuesta debida a la recuperación de la homeostasis dentro del RE, o, tras una exposición crónica al estrés, el aparato secretor se daña, y eventualmente desencadena la muerte celular inducida por apoptosis. A pesar de los estudios realizados durante varias décadas, no existe una caracterización completa de las señales que inducen o evitan la muerte celular.

La actividad de esta respuesta ha sido ampliamente estudiada en diversos organismos y tejidos, con especial atención en levaduras y mamíferos debido a su participación en el desarrollo de patologías como síndrome metabólico, enfermedades neurodegenerativas, inflamatorias y cáncer, por lo que es considerada un blanco importante para sus respectivos tratamientos (Ciyan & Kaufman, 2012).

**Tabla 1. Reguladores de UPR y sus funciones**

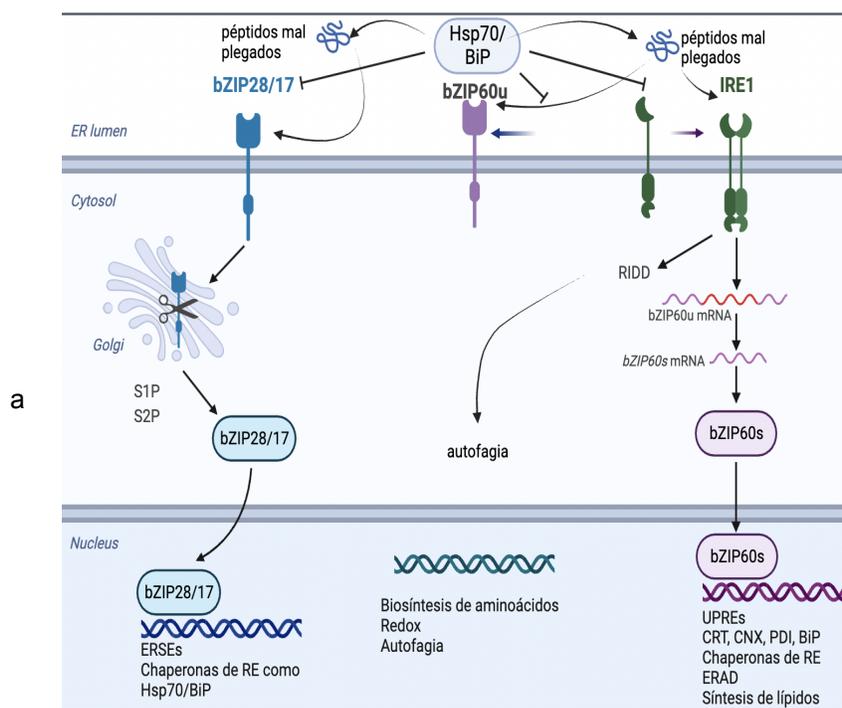
Levadura	Mamíferos	Plantas	Anotación funcional	Referencias
IRE1-p	IRE1a, IRE1b	IRE1a, IRE1b	Proteína localizada en la membrana del RE, con dominios de cinasa y ribonucleasa. En condiciones de estrés, se dimeriza y se autofosforila en trans para activar el dominio de ribonucleasa y procesar RNA en el citosol.	Ron y Walter, 2007 Hetz and libmcher, 2009 Liu et al., 2012 Koizumi et al., 2001
HAC1	XBP1	bZIP60	Factor transcripcional de tipo bZIP, se une a ERSEs. En condiciones de estrés, el dominio de ribonucleasa de IRE1 procesa el mRNA para el que codifica este gen, modificando su dominio transmembranal y activándolo como factor transcripcional.	Cox and Walter, 1996 Yoshida et al., 2001 Deng et al., 2011
No identificada	ATF6	bZIP28/ bZIP17	Proteína transmembranal de tipo II, de RE. Se asocia con BiP/Grp78/Hsp70 en condiciones normales, se activa y transloca a Golgi para ser procesada, en condiciones de estrés en RE.	Liu et al., 2007 Iwata and Koizumi, 2012

- Tabla tomada y modificada de Zeng *et al.*, 2019

## Respuesta a proteínas no plegadas en plantas

El estudio de esta respuesta en plantas ha cobrado importancia desde que Martínez y Chrispeels (2003) reportaron la expresión de genes relacionados con el plegamiento y

degradación de proteínas en *Arabidopsis thaliana* ante el tratamiento con tunicamicina y DTT, inductores de UPR. Este resultado abrió paso para demostrar que la UPR está conservada también en plantas, y a identificar los sensores transmembranales que activan la respuesta. Desde entonces *Arabidopsis* ha sido empleada como modelo de estudio para UPR, acompañada por algunos estudios en *Nicotiana tabacum*, en donde esta respuesta en plantas es activada ante estrés por calor (Deng *et al.*, 2011), infección por bacterias (Moreno *et al.*, 2012) y también por virus (Ye *et al.*, 2011), y que algunos de sus componentes tienen implicaciones en la regulación del desarrollo de la planta (Chen & Brandizzi 2011, Deng *et al.*, 2013). A pesar de que varios componentes están ya funcionalmente identificados, como los sensores transmembranales IRE1 y AtbZIP28, ortólogo de ATF6, en los últimos tres años se han registrado otros componentes hasta ahora específicos de plantas (Arraño-Salinas *et al.*, 2018, Hossain *et al.*, 2016, Pu *et al.*, 2019) y aún hay conexiones con otras vías y mecanismos poco estudiados que podrían ser parte importante en esta respuesta en plantas, y que ayudarían a dilucidar cuáles son las diferencias que disparan la UPR de acuerdo a los diferentes tipos de estrés (Fig 1.0).



**Fig. 1.0 Respuesta a proteínas mal plegadas en plantas.** En este esquema mostramos los principales reguladores de UPR identificados en plantas. Hsp70 se une a los reguladores bZIP28, bZIP17 e IRE1 en el lumen del RE, impidiendo su dimerización. Se propone que HSP70 tiene mayor afinidad a los péptidos mal plegados que a dichos reguladores, y ante su presencia deja de interactuar con ellos, quedando libres para homo o heterodimerizarse, activando con ello otros dominios que desencadenan el procesamiento de mensajeros que activan las diversas vías de UPR: plegamiento, traducción y degradación. Imagen elaborada con *BioRender.com*

## La interacción simbiótica como un escenario de estrés

Los cambios orquestados a lo largo del proceso de nodulación, representan señales potenciales de estrés para las células. Por ejemplo, la infección por *Rhizobium* genera migración de los organelos durante el proceso (Perrine-Walker *et al.*, 2014), acompañado de la remodelación del citoesqueleto de actina (Zhang *et al.*, 2018). Una vez que la bacteria ha infectado a las células, se induce la producción de 30 veces más membrana, con respecto a la membrana plasmática, para formar la membrana peribacteroidal. Esta membrana engloba a las bacterias en el interior de las células infectadas, las cuales contienen a las bacterias diferenciadas, que no se dividen y que fijan nitrógeno, a las que se les da el nombre de bacteroides (Verma 1992). Asimismo, la síntesis y plegamiento de proteínas que participan en este proceso de desarrollo del nódulo se incrementa en sus diversas etapas. Por ejemplo, la leghemoglobina, proteína que regula la cantidad de oxígeno que llega a los bacteroides, llega a representar el 20% de la proteína total del nódulo, también algunas proteínas de la vía de asimilación de amonio en las células infectadas y la producción de ureidos en las células no infectadas son ejemplos de este incremento. Adicionalmente, se ha sugerido que los bacteroides se vuelven simbiosomas auxótrofos para la leucina, por lo que la planta se los suministra (Prell *et al.*, 2009, Mulley *et al.*, 2011, revisado en Dunn, 2014.).

Las respuestas a estrés son muy diversas, al igual que las rutas metabólicas que intervienen en su regulación, algunas muy generales, otras muy específicas acorde al estímulo. Ante los distintos escenarios de estrés, es interesante analizar cómo las leguminosas que realizan esta interacción simbiótica contenden con estos cambios en los puntos donde la regulación de la respuesta a estrés pueda ser crucial para la sobrevivencia de las células ante la infección.

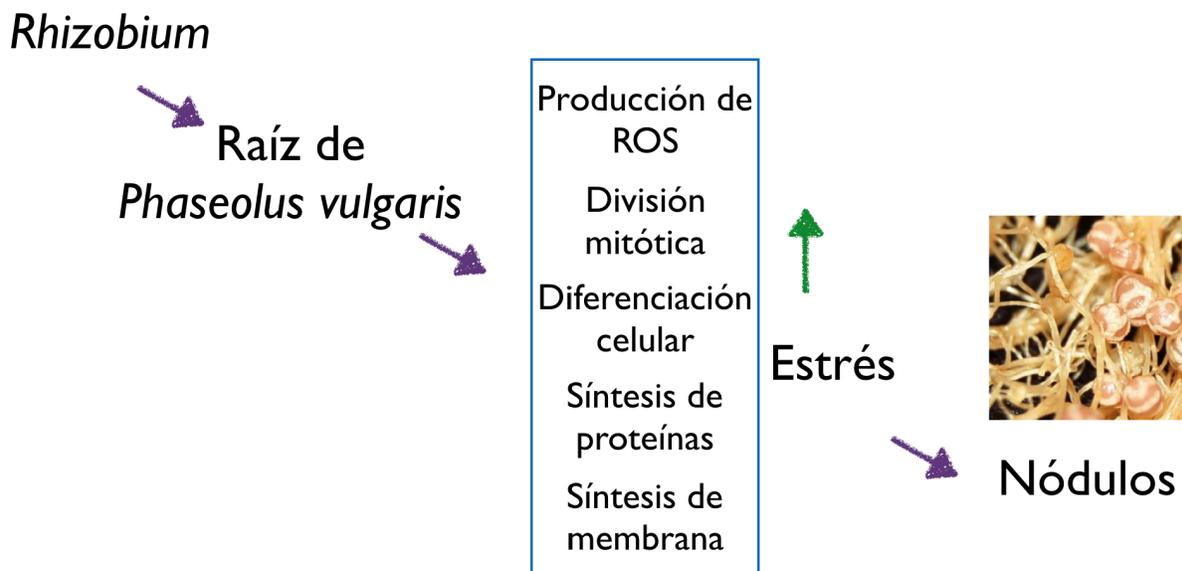
## UPR: un mecanismo por evaluar durante la nodulación

Ante el escenario de constantes cambios que generan estrés en las células del nódulo –tanto infectadas como no infectadas–, particularmente la alta expresión de Hsp70 en

el núcleo, surgió la propuesta de investigar en qué momento a lo largo del desarrollo la respuesta a proteínas mal plegadas es un mecanismo de respuesta a estrés que se presentan durante el desarrollo del nódulo de *Phaseolus vulgaris*. ¿Qué marcadores de la respuesta a proteínas mal plegadas se activan a lo largo del desarrollo del nódulo de *Phaseolus vulgaris*? ¿En qué etapas se encuentra activa la respuesta durante el desarrollo del nódulo? Para lograr nuestro objetivo, diseñamos una metodología que combina técnicas bioinformáticas y de biología molecular para detectar la actividad de la respuesta en etapas iniciales y avanzadas del proceso de nodulación, la cual describimos a continuación.

## HIPÓTESIS

Dado el estrés inducido en las células que dan lugar al nódulo de *Phaseolus vulgaris* ante la infección de *Rhizobium*, y el exacerbado incremento en la síntesis de proteínas ante la infección, la respuesta a proteínas mal plegadas participa dentro de los mecanismos para contender con el estrés durante la ontogenia del nódulo.



## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión a nivel transcripcional de los principales genes involucrados en UPR durante el desarrollo del nódulo en *Phaseolus vulgaris* y comparar con aquellos descritos en procesos importantes durante la nodulación, particularmente la autofagia.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar los genes homólogos más relevantes de la vía de UPR en el genoma de *Phaseolus vulgaris*.
2. Validar los métodos para evaluar la actividad de la UPR en frijol.
3. Evaluar la actividad de UPR en diferentes etapas del desarrollo del nódulo.
4. Una vez evaluada la actividad, analizar si la expresión de genes marcadores de UPR correlaciona con genes asociados al proceso de autofagia.

## METODOLOGÍA

### Identificación bioinformática de los componentes de la vía de UPR en frijol

Se realizó una búsqueda bioinformática de los genes involucrados en UPR tomando como base los genes reportados en *A. thaliana*. (Lee *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2008). Inicialmente la búsqueda se realizó en la base de datos DFCI Bean Gene Index ([http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=p\\_vulgaris](http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=p_vulgaris), actualmente inactiva) seleccionando los contigs de ESTs con alta identidad. Tras la liberación del genoma de *P. vulgaris*, se repitió la búsqueda en la base de datos Phytozome ([www.phytozome.net/commonbean](http://www.phytozome.net/commonbean)). Se analizaron las secuencias obtenidas como resultado de los alineamientos con sus homólogos en Arabidopsis.

## Inmuno detección de la autofosforilación de IRE1

La proteína transmembranal IRE1 tras detectar los péptidos mal plegados se dimeriza (homo y/o heterodiméricamente). Al oligomerizarse adquiere una conformación activa en la cual su dominio de cinasa autofosforila en trans el oligómero, activando el dominio de ribonucleasa. Existen anticuerpos comerciales para detectar la serina fosforilada de IRE1 en mamíferos. Dada la conservación de IRE1 y, particularmente, del sitio de fosforilación se hizo un ensayo de Western blotting empleando el anticuerpo para mamíferos, con tejidos de raíz de frijol tratados con taspigargina (2 $\mu$ M) y tunicamicina (10  $\mu$ g/ml) para probar el anticuerpo, sin embargo resultó ser inespecífico en plantas, por lo que se descartó de momento esta opción.

## Detección de actividad del dominio de ribonucleasa de IRE1 medida a través del mensajero blanco, homólogo a AtbZIP60

En el análisis de la secuencia obtenida en *Phytozome* correspondiente al homólogo en frijol de AtbZIP60 (Phvulv091021443), fue necesario verificar la presencia de los dominios característicos de los factores transcripcionales tipo bZIP, así como de la secuencia y estructura secundaria de doble tallo asa del fragmento característico que es procesado por el dominio de ribonucleasa de IRE1. Se realizó la predicción estructural del mensajero utilizando el software Centroidfold (<http://www.ncrna.org/centroidfold>). Una vez identificado un posible doble tallo asa, se verificó que la secuencia correspondía a la reportada en otros organismos, y la conservación de los sitios de corte característicos de las asas.

Con base en las predicciones bioinformáticas, y en reportes previos, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar un fragmento del mensajero que ahora nombraremos *PvbZIP60* (Phvulv091021443), que incluye la región que hipotéticamente se procesa por IRE1. Debido a que la diferencia de tamaño de las bandas esperadas es de 23 nts,

el producto de RT-PCR se corrió en geles de agarosa de alta densidad y en geles de acrilamida, siendo estos últimos los que arrojaron mejores resultados, mostrando dos bandas bien definidas. Para estandarizar el método con los geles de acrilamida empleamos el producto de RT-PCR de los oligonucleótidos reportados por Nagashima *et al.*, 2011, amplificando a partir del cDNA de tejidos de Arabidopsis Col-0 tratados con inductores de UPR (tapsigargina [TG] 10 ug/ul, 2h; tunicamicina [TM] 10 ug/ul, 5h; dithiothreitol [DTT], 5h). Una vez replicado el resultado de Nagashima, realizamos pruebas amplificando con los oligonucleótidos específicos para la secuencia de frijol PvZIP60 a partir de cDNA de plántulas de 3 días tratadas en las mismas condiciones que Arabidopsis (tapsigargina [TG] 10 ug/ul, 2h; tunicamicina [TM] 10 ug/ul, 5h; dithiothreitol [DTT], 5h).

### Crecimiento de las plantas para la cinética de nodulación

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* negro jamapa fueron germinadas e inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT 899 GFP bajo condiciones control. Las semillas maduras fueron germinadas a 25°C en la oscuridad, en charolas con toallas de papel estéril durante 48 h, e inoculadas acorde a la metodología de Ramírez *et al.*, 2005; Estrada-Navarrete *et al.*, 2007; González de Mejía *et al.*, 2003 y Verdoy *et al.*, 2004. Las plantas inoculadas crecieron bajo condiciones de humedad, luz y temperatura controladas durante los 20 días post inoculación (dpi) a un régimen de 28°C/18°C (día/noche), 65% humedad relativa, y un fotoperíodo de 14 h en una cámara de crecimiento y riego con solución nutritiva B&D sin nitrógeno (30 ml por planta de 0 a 10 dpi, 50 ml por planta de 10 a 20 dpi). Las raíces de cinco plántulas inoculadas fueron colectadas cada media hora de 0 a 5 h post inoculación para la primera cinética. Para la cinética de nódulos jóvenes y maduros, se colectaron los nódulos de 5 plantas cada tercer día a partir del día 10, hasta el día 30 post inoculación (10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 y 30 dpi) y se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de su recolección y fueron almacenados a -80°C. Este experimento se repitió por triplicado para cada día de la cinética.

## Extracción de ARN

El tejido de las raíces de las plántulas y los nódulos congelados fue molido e inmediatamente procesado para la extracción del ARN total a partir de los repositorios de las tres réplicas biológicas para cada genotipo y tratamiento (24 librerías) utilizando el kit de extracción ZYMO RESEARCH RNA “ZR Plant RNA MiniPrep” Cat. No. R2024, como indica el protocolo ([www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/160/r2024i.pdf](http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/160/r2024i.pdf)).

## RT-PCR semicuantitativo

A partir del ARN extraído de las cinéticas, se sintetizó el cDNA y realizó la PCR. El cDNA fue sintetizado empleando M-MLVRT y oligodT<sub>25</sub> -VN de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR se hicieron con 2  $\mu$ L de cDNA, 0.5 U de *Taq* Polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, CA, EUA), buffer 10X, dNTPs 0.2 mM y 0.1  $\mu$ M de cada oligo. Para amplificar la región del gen AtZIP60 se utilizaron los oligonucleótidos empleados por Nagashima *et al.* (2011) y PvZIP60 diseñamos los oligos *Pvbzip60uF-Pvbzip60uR* los cuales amplifican una región de 208 pb en su versión no procesada y de 185 pb cuando hay procesamiento. Como control negativo utilizamos para amplificar el cDNA obtenido a partir de las plántulas de frijol tratadas con tapsigargina y como positivo el cDNA de las plántulas tratadas con tunicamicina. Las condiciones de la reacción fueron 60 s a 94°C; 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 63 °C y 45 s a 72°C en un termociclador DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer, EUA). Los productos de PCR se detectaron empleando geles de acrilamida, 7  $\mu$ L de muestra, al 12 % de acrilamida acorde a la resolución obtenida, con un corrimiento lento a 70 V.

## Cuantificación de los niveles de transcrito por análisis de transcripción reversa cuantitativa (PCR cuantitativa)

El cDNA de las raíces y nódulos de frijol de la cinética de 10 a 30 dpi fue empleado para la amplificación y cuantificación de los genes *PvZIP60* y *PvZIP28*, utilizando los

oligos *Pvbzip60uF-Pvbzip60uR* y *Pvbzip28F-Pvbzip28R* respectivamente. La RT-qPCR se realizó en dos etapas utilizando el RNA total previamente purificado y cuantificado de los tejidos de la cinética; se utilizó el kit de síntesis de cDNA Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit para RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) y el kit Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para eliminar el ADN genómico, las muestras de ARN total fueron previamente tratadas con 1 uL de DNAsal, libre de RNasa (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, MA, EUA) a 37°C por 30 min, la cual se inactivó a 65°C por 10 min. Se adicionaron 2 uL de oligonucleótido dT<sub>18</sub> (0.25 ug/uL) y se incubaron 5 min a 65°C, después se añadió a cada tubo 8 uL de una mezcla de buffer de reacción 5X, 2 uL de inhibidor de RNasa (RiboLock), 1 uL de la mezcla de dNTPs 10 mM y 1 uL de transcriptasa reversa para tener un volumen final de 20 uL; se incubó por 1 h a 42°C y posteriormente se transfirieron los tubos a 65°C por 10 min.

Para la reacción de qPCR se prepararon 10 ng de ARN como molde en un volumen final de 20 uL. Se utilizaron los oligonucleótidos específicos para cada gen (*PvZIP60* y *PvZIP28*). Las qPCRs se realizaron en el termociclador LightCycler480 (Roche, Penzberg, Alemania), bajo las siguientes condiciones: una preincubación de 95°C, 10 s; 40 ciclos a 95°C 10s, 60°C 10s y 72°C 10s; y un enfriamiento a 37°C 30s. Se utilizó como gen de referencia el factor de elongación 1alfa, como se describió en Islas *et al.* (2011) y Montiel *et al.* (2012). El protocolo y cálculo para la cuantificación de la abundancia relativa de los transcritos se realizó acorde a Estrada-Navarrete *et al.*, 2016. Las gráficas que se presentan son el promedio de tres experimentos independientes o réplicas biológicas y cada muestra se evaluó por triplicado dentro de cada experimento.

## RESULTADOS

### Identificación de los componentes de la vía de UPR en frijol

Los genes identificados seleccionados mediante la búsqueda bioinformática son IRE1 A y B (proteínas transmembranales activadoras de UPR); bZIP28 (proteína transmembranal activadora de UPR, factor transcripcional de BiP); bZIP60 (factor transcripcional activado por IRE1) y BIP3 (chaperona de la familia Hsp70, regulador negativo de IRE1 y bZIP28). Se comprobó la conservación de los dominios catalíticos para los activadores de UPR, IRE1 A y B, bZIP28 y bZIP60, así como la del sitio de fosforilación de IRE1A y B como posible blanco para detección de actividad. El análisis se repitió en cada actualización de la base de datos *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) en donde se albergan las secuencias de *P. vulgaris* G19833. Encontramos algunos cambios en el gen con respecto a las secuencias obtenidas previamente, sin embargo, validamos las registradas con los ESTs inicialmente obtenidos previamente en DFCI (base de datos ahora inactiva).

**Tabla 1. Genes principales de UPR identificados por identidad de secuencia en el genoma de frijol**

Genes	Phytozome ID	Homólogo en <i>Arabidopsis thaliana</i>	Función
<i>IRE1 A y B</i>	Phvul.002G117600 Phvul.003G271000	AT2G17520.1 (IRE1-2/A) AT5G24360.2 (IRE1-1/B)	Proteína transmembranal activadora de UPR
<i>bZIP28</i>	Phvul.001G119300	AT3G10800.1 (bZIP28) AT2G40950.1 (bZIP17) AT3G56660.1 (bZIP49)	Proteína transmembranal activadora de UPR, factor transcripcional de BiP
<i>bZIP60</i>	Phvul.006029200	AT1G42990.1 (bZIP60)	Factor transcripcional activado por IRE1

<i>BIP3</i>	Phvul.002G328904.1	AT1G09080.1 (BiP3)	Chaperona de la familia Hsp70, regulador negativo de IRE1 y bZIP28
-------------	--------------------	--------------------	--------------------------------------------------------------------

A partir de este resultado se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes para evaluar la expresión de *bZIP28*, *bZIP60* y *BiP3* (*Hsp70*) como marcadores ante la inducción de UPR en tejido de raíz y nódulo de frijol. La expresión de IRE1 A y B no varía cuantitativamente, sólo en actividad al formar homodímeros cuando la UPR está activa.

Es importante mencionar que UPR no es la única vía en la que participan los genes que utilizaremos como marcadores. Sin embargo, las variaciones simultáneas en su expresión son informativas y servirán para apoyar los resultados en conjunto con la evaluación del procesamiento de *bZIP60*.

### Actividad del dominio de ribonucleasa de IRE1 detectada a través del procesamiento del mensajero blanco *PvbZIP60*, homólogo a *AtbZIP60*

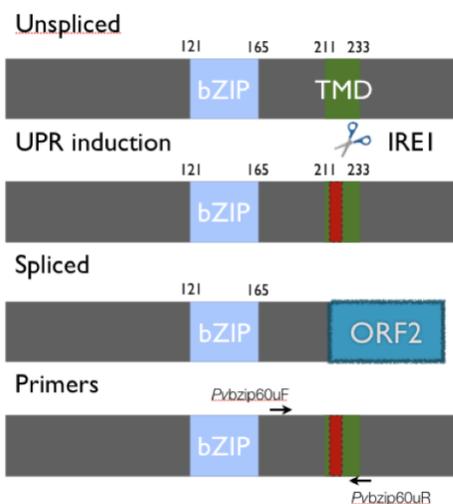
Al activarse el dominio de ribonucleasa de IRE1, ésta lleva a cabo el procesamiento en el citosol del mensajero de *AtbZIP60* en *Arabidopsis* a modo de un *splicing* atípico, cuya finalidad es eliminar un fragmento de 23 nts que forma parte de la región que codifica para un dominio transmembranal que ubica a la proteína en el retículo endoplásmico, en condiciones de homeostasis. Al perder este fragmento, cambia el marco de lectura y se activa su función como factor transcripcional de genes relacionados con plegamiento y degradación. Este procesamiento se puede detectar en plántulas tratadas con tunicamicina (la cual inhibe glicosilación de los péptidos nacientes, evitando su correcto plegamiento) mediante la amplificación por RT-PCR de

un fragmento del gen que contenga la región procesada, utilizando oligonucleótidos que flanquean dicha región y electroforesis en geles de agarosa de alta densidad. Esto dio como resultado dos bandas de tan solo 23 nts de diferencia, correspondientes a su forma no procesada y procesada (Ju *et al.*, 2005, Liu *et al.*, 2007, Nagashima *et al.*, 2011, Li *et al.*, 2012).

La secuencia identificada en el genoma de frijol como posible homólogo de *AtbZIP60* (Phvulv091021443) presentó un bajo porcentaje de identidad y similitud a nivel de nucleótidos, sin embargo, a nivel de aminoácidos, los dominios que contiene sí corresponden a un factor transcripcional tipo bZIP (Fig.1.1). A pesar del bajo porcentaje de identidad en la secuencia del gen, se identificó la presencia y conservación al 100% con respecto a la secuencia reportada en *Arabidopsis* de los 23 nucleótidos que son procesados por el dominio de ribonucleasa de IRE1.

La predicción de la estructura secundaria se realizó acorde a lo reportado por Nagashima *et al.*, (2011).

## PvbZIP60



```
MFFFSQFQFKFLIPMDSLEQTLLTQFDWDSFFDQVPEFDAVDFLQDDTAPVTVAGDNPSPNDPVLS  
QIENQLMDHAENDAVFSGTMLSESESESEYYRLLLEEILVEPEEGPESERSKTESEEGSEKDRTD  
DAI  
PDEPTSKKLRKRLRNRDAAVKSRRERKKVYVKNLEMKSRYLEGECCRLLGHLLQCCYAENNALRLC  
LQ  
SRGAYGASKTLQESAVLLLEPLLLGSLLLWFMGIMCHLSLPLMLCLTAVLPRESIVQKGLRRVTQ  
KG  
PESNISKCFQMOSFVKSRRCRASRTKMKFILMMFQGSITSKI*
```

### Fig. 1.1 Secuencia de aminoácidos correspondiente a PvZIP60

En esta figura se esquematizan los dominios presentes en la secuencia de aminoácidos en condiciones de homeostasis (bZIP y TMD [transmembranal domain]) y posteriormente, ante la inducción de UPR debida a estrés, en la cual se procesa un fragmento del dominio transmembranal, cambiando el marco de lectura y dejando sólo el dominio bZIP íntegro y activo.

Se identificaron y confirmaron la conservación de los sitios de corte en la secuencia codificante de nucleótidos, como se señala a continuación y que se ilustra en la figura correspondiente y en la secuencia que se encuentra a continuación.

Región subrayada: corresponde a la secuencia con la que se forman los dos tallos asa necesarios para efectuar el procesamiento.

**Región negritas**: corresponde a los 23 pb procesados por la ribonucleasa IRE1

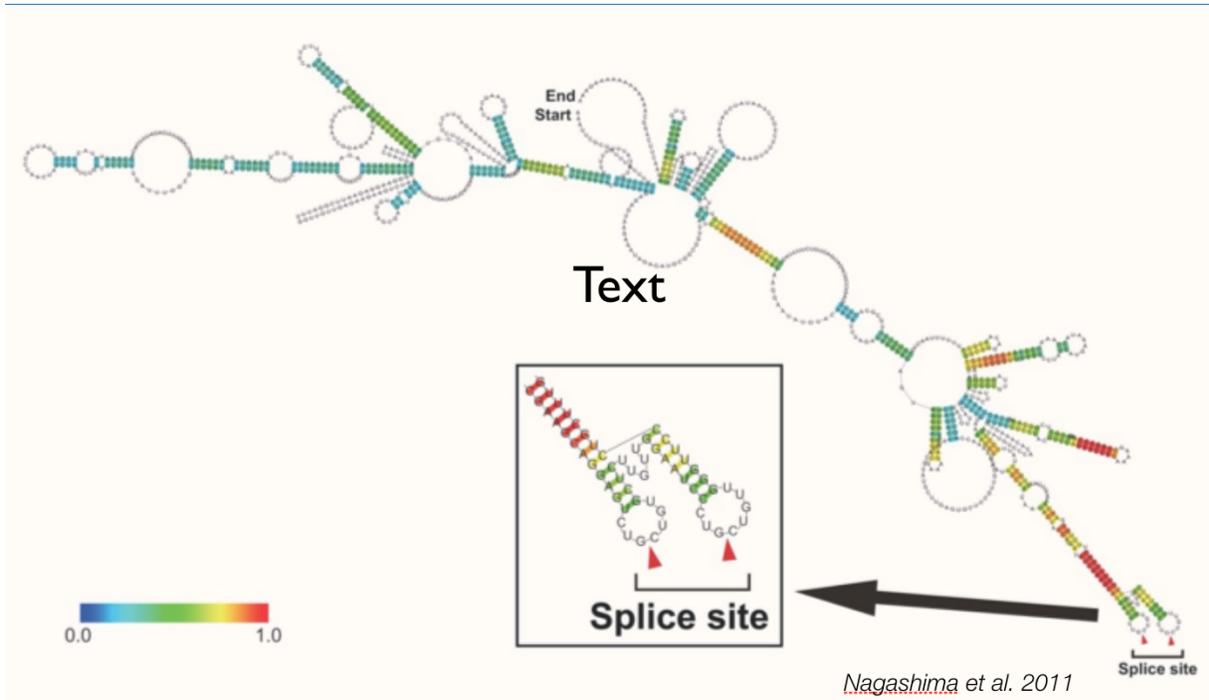
*En cursivas*: oligos diseñados para amplificar el fragmento que incluye el sitio de procesamiento *Pvbzip60uF-Pvbzip60uR* amplifican un fragmento de 208 pb en su versión no procesada y de 185 pb cuando hay procesamiento.

>Phvulv091021443 CDS

```
ATGTTTTTTTTTCTCCCAATTTCAATTCAAATTCTTAATCCCATGGACTCTCTCGAACAAACCCTACTC
ACCCAATTCGATTGGGATTCGTTCTTCGACCAGGTGCCGGAATTCGACGCCGTTGATTTTTTGCAGGAT
GACACCGCTCCTGTTACCGTCGCCGGCGACAATCCCTCCCCGAACGACCCCGTTTTGTCCCAGATCGAG
AACCAGCTCATGGACCACGCCGAAAACGACGCCGTCTTCTCCGGAACGATGTTGTCTGAGTCGTCTGAG
TCCGAGTACTACAGGCTTCTTGAGGAGATTCTGGTGGAGCCCGAGGAGGGCCCGAAAGTGAGCGTTCC
AAGACTGAGTCTGAGGAAGGCTCCGAAAAAGACAGAACGGATGATGCAATCCCCGATGAACCCACTTCC
AAGAAGTTAAAGAGGAAGCTGAGGAATAGGGATGCTGCCGTGAAATCGAGGGAGAGGAAGAAGGTTTAT
GTGAAAAA CCTGGAGATGAAGAGTAGGTATTTAGAAGGGGAATGCAGAAGACTGGGGCATTGCTTCAGT
GCTGCTATGCTGAGAACAATGCTTTGCGGCTTTGCTTGCAATCGCGTGGTGCATACGGTGCTTCCAAGA
CCTTGCCAGGAGTCTGCTGTGCTCTTGTGGAACCTCTGCTGTTGGGTT CCCTGCTCTGGTTCATGGGCAT
CATGTGCCATCTCAGCCTGCCCTAATGCTGTGTCTCACAGCAGTGCTTCCAAGAGAAAGCATCGTACA
GAAGGGCTTAAGAAGGGTAACTCAAAAAGGTCCAGAAAGTAATATCTCCAAGTGTTCAGATGCAATC
ATTTGTAAAGAGTAGAAGATGCCGAGCTTCAAGAACAAAGATGAAATTCATTTAATGATGTTCCAAGG
TTCTATAACTTCTAAAATATGA
```

Sumado a esto, se identificó la presencia del mensajero procesado en la base de datos de transcritos DFCI *Phaseolus vulgaris* Gene Index (<http://compbio.dfci.harvard.edu>, actualmente inactiva; RTS\_125\_E02 GO355380), confirmando que es un transcrito que se expresa en frijol.

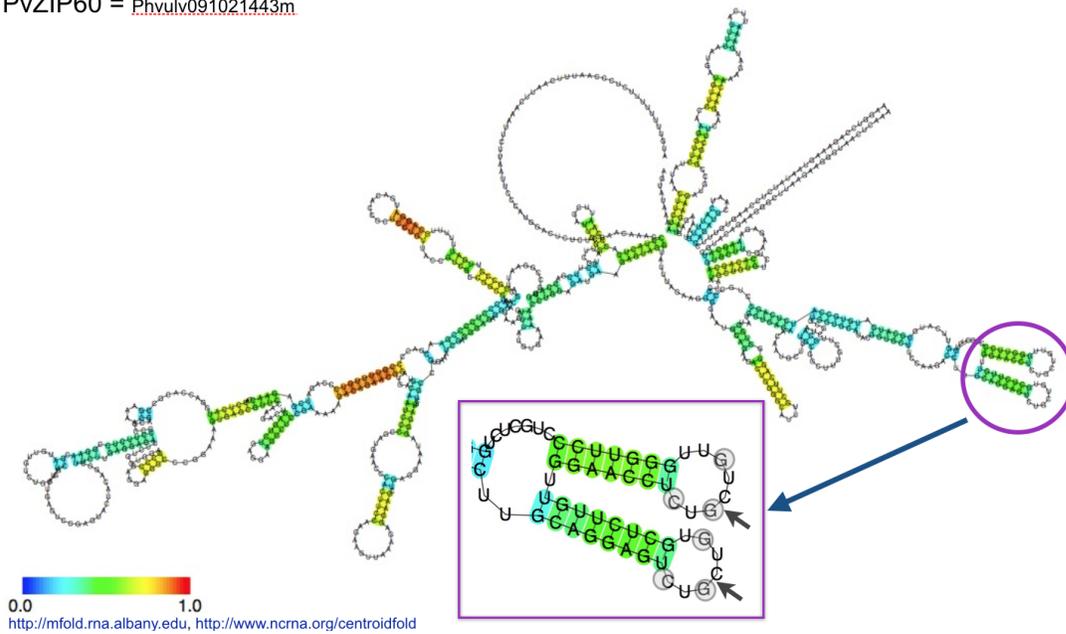
Tras analizar las predicciones de la estructura secundaria de esta secuencia, se identificó que en un extremo de las estructuras formadas se encuentra el doble tallo asa, acorde a los nucleótidos identificados en la secuencia. A continuación, mostramos las imágenes comparativas entre la estructura de *AtbZIP60* presentada por Nagashima *et al.*, 2011 y la predicción estructural que obtuvimos con el software *Centroidfold* para *PvZIP60*.



### 1.2 Predicción estructural de *AtbZIP60* presentada por Nagashima et al. (2011)

En el extremo se observa el doble tallo asa. En el recuadro se muestra un acercamiento a los dos tallos asa donde las flechas indican los sitios de corte característicos por la presencia de GC.

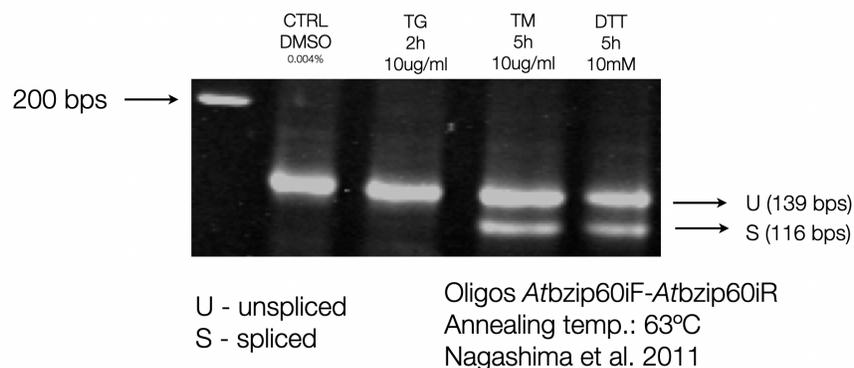
PvZIP60 = [Phyvu091021443m](http://Phyvu091021443m)



### 1.3 Predicción estructural de *PvbZIP60*

En el extremo se observa el doble tallo asa y las flechas indican los sitios de corte característicos por la presencia de GC.

Con los resultados anteriores, concluimos que la secuencia identificada como *PvZIP60* era un candidato potencial para probar la actividad de IRE1 y procedimos a sintetizar y probar los oligos correspondientes. En primera instancia, estandarizamos las condiciones de la electroforesis en gel, ya que al ser dos fragmentos con tan sólo 23 nts de diferencia, requiere geles que los separen con alta definición. Probamos el corrimiento en geles de acrilamida al 10 y 12%, siendo este último el de mejor definición. Estandarizamos este porcentaje replicando el experimento de Nagashima *et al.* (2011) corroborando la presencia de las dos bandas del tamaño esperado en los tratamientos con los inductores de UPR tunicamicina y ditrioteitol, y obteniendo una sola banda correspondiente al fragmento no procesado en el control sin tratamiento, y el control negativo (tapsigargina). Estos resultados se muestran en la siguiente figura.

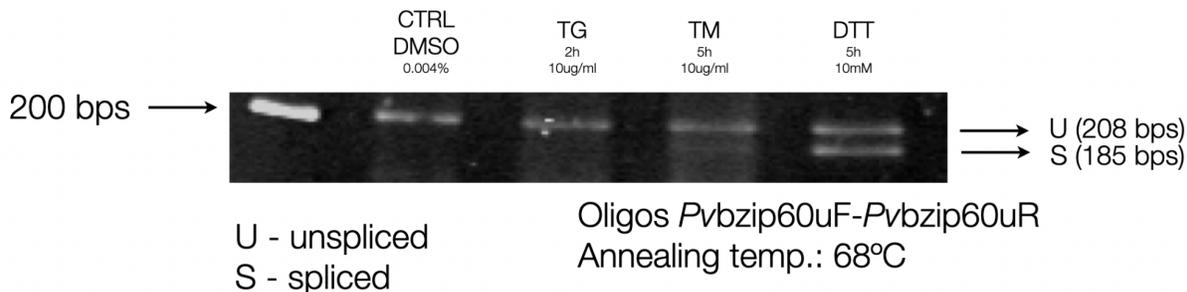


#### 1.4 Procesamiento de *AtbZIP60* en *Arabidopsis*.

Réplica del experimento que muestra el procesamiento de *AtbZIP60* en plántulas de *Arabidopsis* utilizando los oligonucleótidos reportados por Nagashima *et al.* (2011). Como inductores de estrés se usaron tapsigargina [TG] 10 ug/ul (control negativo de UPR en el caso de plantas), 2h; tunicamicina [TM] 10 ug/ul, 5h; dithiothreitol [DTT], 5h, para estandarizar las condiciones del gel de acrilamida. U - fragmento sin procesamiento; S - fragmento procesado.

En el siguiente corrimiento de electroforesis, se replicaron las condiciones del gel de acrilamida empleado para observar los fragmentos generados con la amplificación de *PvZIP60*, a partir de los tejidos de raíz de plántula de 48 h con los tratamientos indicados. Con este objetivo, se utilizaron los oligonucleótidos diseñados para la secuencia *Phvulv091021443* CDS, *Pvbzip60uF* - *Pvbzip60uR*. Corroboramos la

inducción del procesamiento observando la presencia de las dos bandas del tamaño esperado, la cual fue más evidente ante el tratamiento con DTT (Fig 1.5).



### 1.5 Procesamiento de *PvbZIP60* en *P. vulgaris*

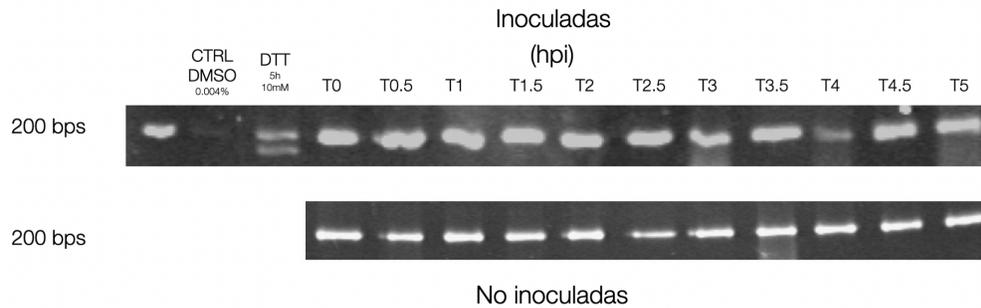
Réplica de las condiciones utilizadas para el corrimiento en gel que muestra el procesamiento de *PvbZIP60* en raíces de plántulas de frijol negro jamapa utilizando los oligonucleótidos diseñados para el fragmento de la secuencia Phvulv091021443, tratadas con los inductores de estrés tapsigargina [TG] 10 ug/ul (control negativo de UPR en el caso de plantas), 2h; tunicamicina [TM] 10 ug/ul, 5h; Dithiothreitol [DTT], 5h. Esto con el objetivo de corroborar las condiciones del gel de acrilamida. U - fragmento sin procesamiento; S - fragmento procesado.

### Procesamiento del mensajero blanco *PvbZIP60* durante el desarrollo del nódulo simbiótico en *Phaseolus vulgaris*

Una vez estandarizado el método de detección del procesamiento de *PvbZIP60*, procedimos a evaluarlo a lo largo de la cinética de nódulación tomando tiempos muy tempranos (0-5 h). Al amplificar el fragmento de *PvbZIP60* a partir de cDNA de la cinética de plántulas de frijol inoculadas y no inoculadas, con *R. tropici* (0 a 5 h post inoculación), ya que de acuerdo al reporte de Moreno *et al.*, 2012, en *Arabidopsis* se observa inducción de UPR tras 4 h post infección con *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, por lo que decidimos observar lo que pasa tras infectar la plántula de frijol con una bacteria simbiote. De acuerdo a los resultados de esta cinética, semicuantitativamente hay ligeras variaciones en el mensajero no procesado, sin embargo, no se observa mensajero procesado, lo cual puede deberse a que los cambios debidos a la infección por *Rhizobium* pueden presentarse después de un día

post inoculación (Fig.1.6). Por lo tanto, se propone evaluar una cinética durante los primeros 10 dpi para analizar el procesamiento durante la formación de primordios.

Posteriormente se pasa a un período en el desarrollo del nódulo de gran interés debido a la maduración, actividad de fijación de nitrógeno y posterior senescencia del nódulo.

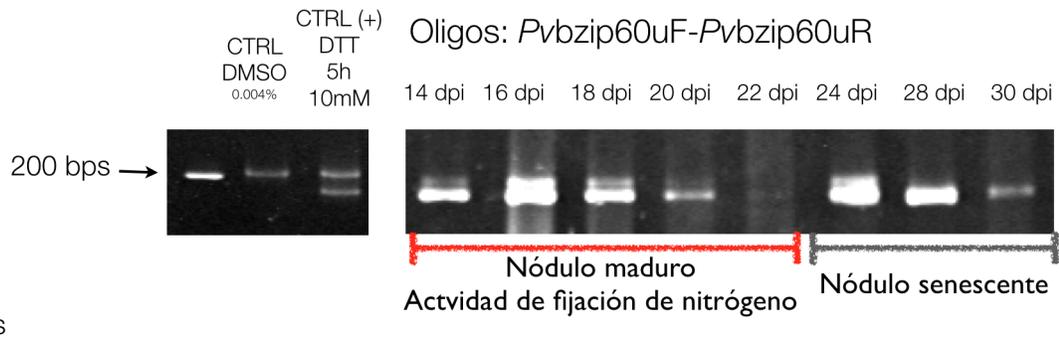


RT-PCR  
Oligos *Pvbzip60uF-Pvbzip60uR*

**1.6 Procesamiento de *PvbZIP60* en cinética de plántulas de frijol inoculadas con con *R. tropici* CIAT 899 GFP colectadas cada media hora, de 0 a 5 h post inoculación**

Amplificación de la secuencia *PvbZIP60* a partir de cDNA de la cinética de nodulación de frijol negro jamapa, inoculado con *R. tropici* cada tercer día a partir de 0 a 5 h post inoculación.

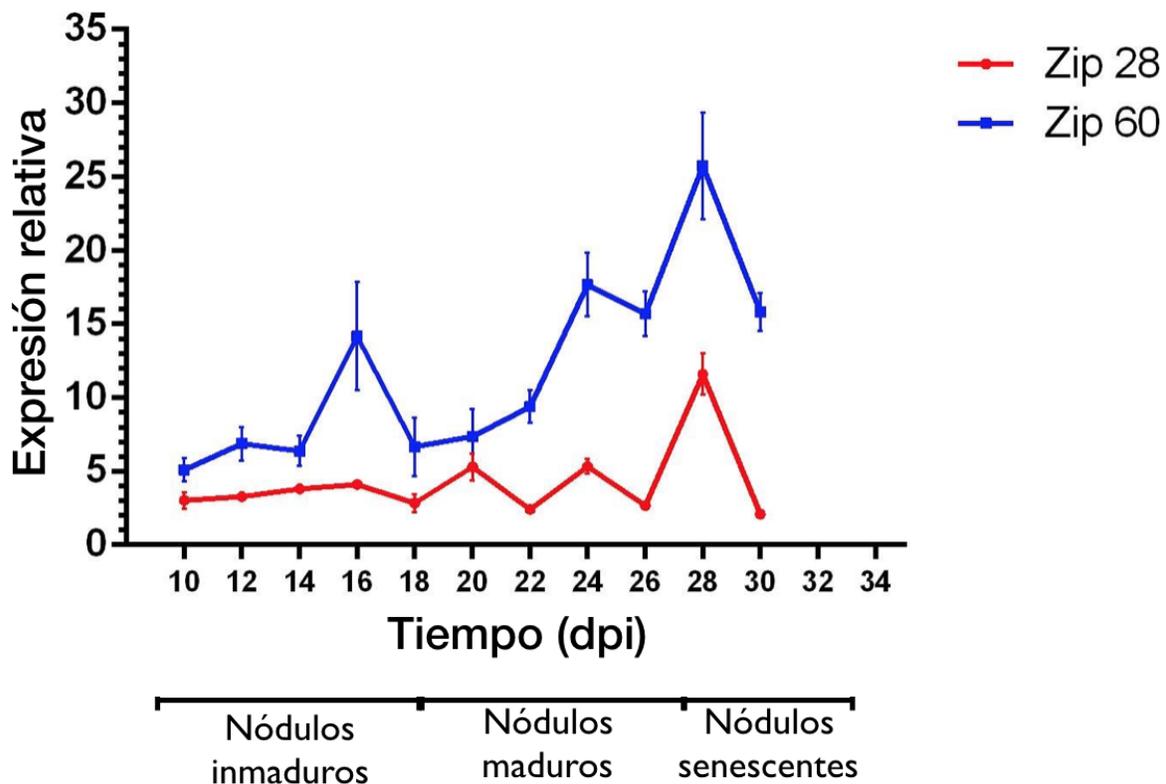
A partir de la amplificación empleando PCR semicuantitativa del mensajero de *PvZIP60* de la cinética de etapas avanzadas de la nodulación, observamos tanto el mensajero no procesado como el procesado. La banda del mensajero procesado presenta mayor intensidad en todas las etapas, lo cual sugiere que IRE1 está activa procesando el mensajero de *PvZIP60* y, por lo tanto, que la UPR está prendida.



**1.7 Procesamiento de *PvbZIP60* en cinética de nodulación de plantas de frijol inoculadas con *R. tropici* colectadas de 14 a 30 dpi**

Amplificación de la secuencia *PvbZIP60* a partir de cDNA de la cinética de nodulación de frijol negro jamapa, inoculado con *R. tropici* cada tercer día a partir de los 14 hasta los 30 dpi.

Para complementar el resultado observado, realizamos una PCR cuantitativa para evaluar la expresión de *PvZIP60* y *PvZIP28*, ya que en reportes de UPR en plantas se ha reportado un incremento en la expresión de ambos mensajeros. En la figura 1.8 observamos que existe un incremento considerable en la expresión relativa de *PvZIP60*, presentando dos picos a 16 y 28 días post inoculación. En esta PCR cuantitativa no fue posible detectar el procesamiento, solo el mensajero total que corresponde a la suma de procesado y no procesado. De manera interesante, los picos corresponden a la intensidad que observamos en el gel. Acorde a la Fig. 1.7, a 16 dpi tenemos un incremento de casi 15 veces, que corresponde tanto a mensajero procesado, como no procesado, mientras que a 28 dpi es 25 veces mayor, prácticamente 100% procesado. Recordando las etapas importantes de la nodulación, a 16 dpi comienza la etapa activa de la fijación de nitrógeno, mientras que a los 28 dpi el nódulo está en su período de senescencia ya avanzada.

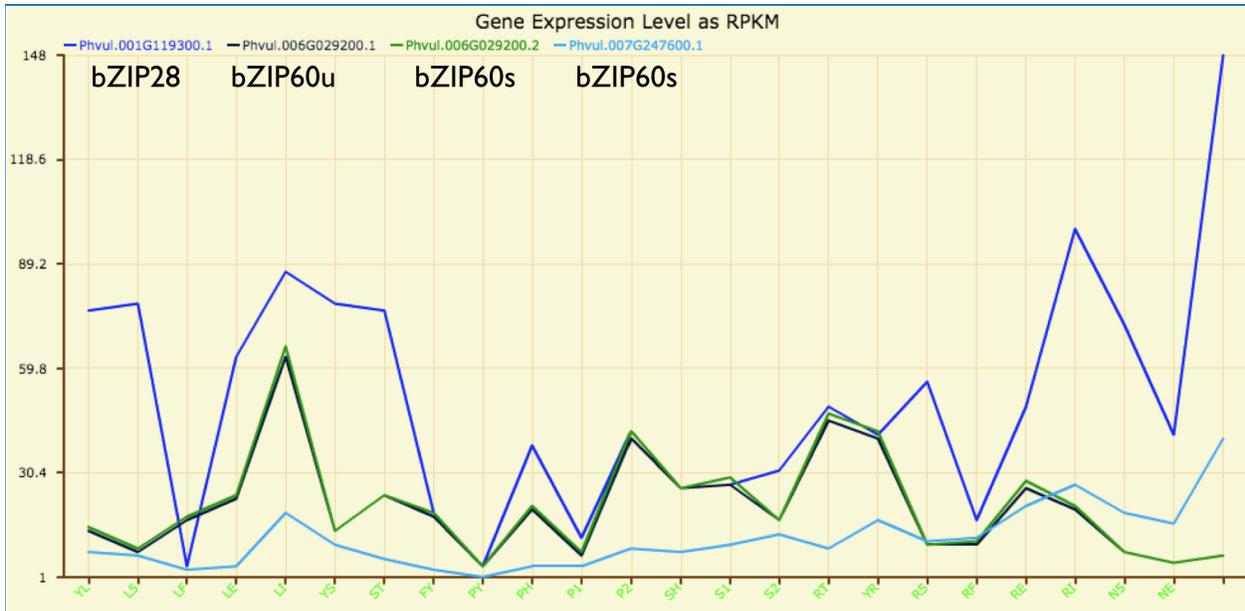


### 1.8 Expresión relativa de los genes *PvbZIP28* y *PvZIP60* a lo largo del desarrollo del nódulo.

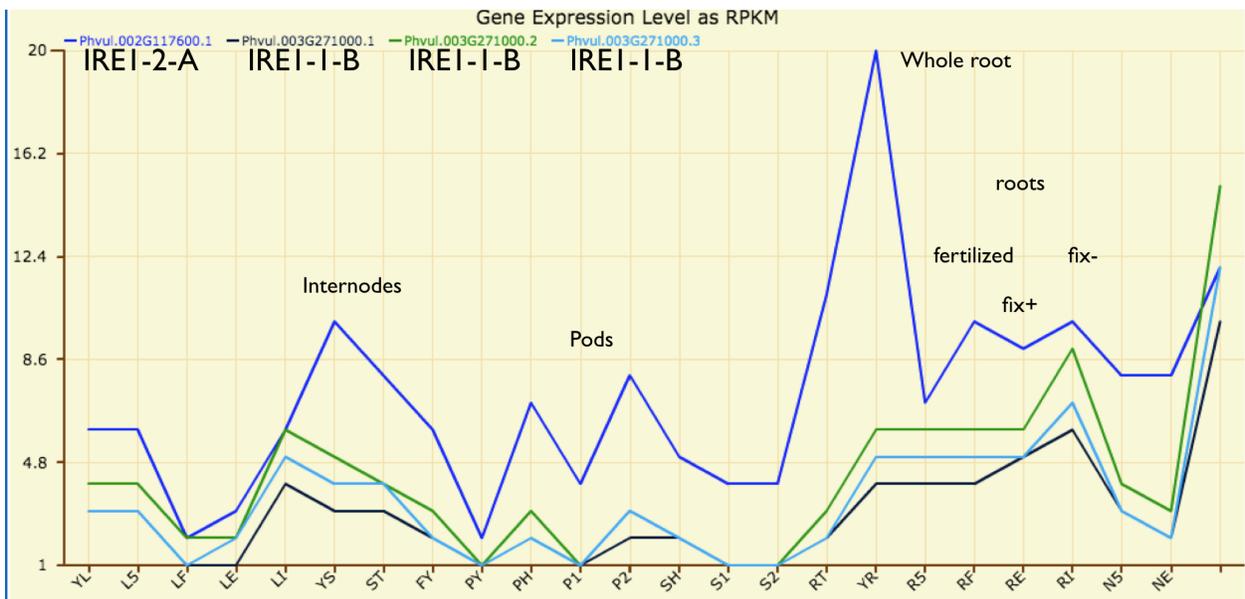
En esta gráfica observamos la expresión relativa de los mensajeros de *PvbZIP28* (azul) y *PvbZIP60* (rojo) evaluada a lo largo de la cinética de tiempos largos mediante la PCR cuantitativa. Los nódulos fueron colectados cada tercer día, de los 10 a 30 dpi. Las etapas del desarrollo del nódulo, se indican acorde a los días post inoculación: 1-18 nódulos inmaduros, 19 a 26 nódulos maduros, 27-30 nódulos senescentes.

Por otra parte, en la expresión del mensajero *PvbZIP28*, que corresponde a un factor transcripcional que activa a *Hsp70*, se observa un incremento menor a 5 veces la expresión respecto al control (raíces no inoculadas). Sin embargo, presenta un incremento considerable en la expresión a 28 dpi, al igual que *PvbZIP60*. Esto sugiere que durante la etapa de senescencia, la respuesta incrementa su actividad. Ante esta expresión nos surge la pregunta ¿De qué forma participa la UPR durante la senescencia? Sabemos que la UPR trata de reestablecer la homeostásis del RE incrementando el plegamiento y degradación, y que, cuando no lo logra, desencadena

muerte celular. ¿De qué forma podría estar involucrada en las señales de senescencia del nódulo?



1.9 Expresión relativa de los genes *PvbZIP28* y *PvZIP60* (procesado y no procesado) reportadas en diversas condiciones de *Transcriptoma RNA-seq A Common Bean Gene Expression Atlas* <http://plantgrn.noble.org/PvGEA/index.jsp>



1.10 Expresión relativa de los genes *PvIRE1-2-A*, *PvIRE1-1-B* en las isoformas disponibles (procesado y no procesado) reportadas en el *Bean Gene Expression Atlas Transcriptome RNA-seq A Common Bean Gene Expression Atlas* <http://plantgrn.noble.org/PvGEA/index.jsp>

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

### Conservación de los mecanismos de la UPR en *P. vulgaris*

La conservación de la UPR ha sido confirmada como mecanismo para contender con el estrés de retículo endoplásmico en plantas, ante estrés biótico y abiótico, también durante la señalización en etapas de desarrollo, como lo resumen en su revisión Manghwar y Li (2022). Con los resultados presentados en este proyecto, aportamos información respecto a la actividad de UPR en una condición más: la interacción simbiótica entre *P. vulgaris* y *R. tropici*, particularmente en la etapa fijadora de nitrógeno del nódulo.

En este trabajo confirmamos que en el genoma de la leguminosa *P. vulgaris* están presentes los principales genes marcadores de la UPR, ortólogos a los reportados para *A. thaliana* y *G. max*: bZIP28, bZIP60 e IRE1-a y b. Al igual que en *A. thaliana*, la expresión a nivel de transcrito de bZIP28 y bZIP60 nos permite detectar la actividad de esta respuesta. IRE1 no lo consideramos como indicador a nivel de transcrito, ya que son su dimerización y fosforilación, y no necesariamente un cambio en su expresión, lo que da indicios de su actividad. El anticuerpo empleado en mamíferos para detectar la fosforilación de la serina de IRE1 no fue de utilidad en plantas ya que no mantiene su especificidad, por lo que es importante buscar anticuerpos específicos.

### Actividad de UPR en la etapa activa del desarrollo del nódulo de frijol

En el retículo endoplásmico ocurre la síntesis de lípidos y proteínas. En el escenario de una célula infectada del nódulo, en la que fue necesario sintetizar membranas peribacteroidales –*de novo* o quizá a partir de procesos de reciclaje de membranas como la autofagia–, es remarcable que se observe una gran cantidad de retículo endoplásmico entre todas sus membranas. El alto número de membranas sugiere también que mantener la homeostasis de este organelo es de gran relevancia, y por lo

tanto está muy regulada. Sabemos que la UPR es la principal encargada de regular y aliviar el estrés de este organelo.

Los resultados obtenidos, muestran que el incremento de expresión del mensajero y el procesamiento de PvZIP60 ocurre en el desarrollo de los nódulos de frijol, durante las etapas de maduración, actividad de fijación de nitrógeno y senescencia. Los niveles de expresión observados sugieren que la actividad es variable y va en aumento hasta la etapa de senescencia. Dada la función reportada de los ortólogos de bZIP60 en maíz y arabidopsis (Nagashima *et al*, 2011, Li *et al* 2012), mayor expresión de este mensajero implica que se requiere incrementar la actividad de plegamiento y degradación, ya que es un factor transcripcional de genes asociados a estos procesos. Sabemos que la comunicación entre el citoplasma de la célula y el interior de los simbiosomas es muy activa durante este proceso, y no es difícil imaginar en este panorama un incremento en la síntesis y plegamiento de péptidos, recordando de las imágenes de microscopía que tuvimos como antecedente, la cantidad de retículo endoplásmico que observábamos entre simbiosomas.

El incremento en la expresión de *PvbZIP28*, involucrada en el plegamiento como activador de *Hsp70/BiP*, acompaña a lo largo de todas las etapas el procesamiento en *PvZIP60*, siendo considerable el incremento que tienen a los 28 dpi, en donde la senescencia está en etapa avanzada. Ante esta observación, se abren nuevas preguntas. ¿Cómo se relaciona la actividad de UPR con los mecanismos que desencadenan la senescencia del nódulo? ¿Alguna de las vías que desencadena esta respuesta dispara la muerte celular que lleva a la senescencia?

## PERSPECTIVAS

### Relación en plantas entre UPR y autofagia

A partir de estos resultados, propongo una nueva hipótesis: la UPR es una respuesta activa en la etapa activa de fijación de nitrógeno del nódulo, dada la gran actividad de síntesis y plegamiento entre el retículo endoplásmico y el simbiosoma en células infectadas, que al no lograr recuperar la homeostasis, tras su incremento de actividad durante la etapa de fijación del nitrógeno, desencadena señales de muerte que participan en el proceso de senescencia del nódulo simbiótico.

Una vez identificada la etapa activa de fijación de nitrógeno en el nódulo como un punto importante de actividad de UPR y el posterior decaimiento de señal a la par con la senescencia del nódulo, continuaría este proyecto hacia un seguimiento *in vivo* empleando técnicas de expresión con marcadores fluorescentes y microscopía confocal de las proteínas involucradas en este proceso. Los reportes en plantas han analizado la actividad de UPR principalmente a través de la expresión a nivel mensajero, sin embargo, bajo el escenario del nódulo y su sistema endomembranal, me parece que es muy relevante ubicar en qué zonas de una célula infectada se está presentando este mecanismo, puntualmente a los 18, 22, 24 y 28 dpi. En este tiempo se publicaron diferentes trabajos donde identifican la expresión y relevancia en el desarrollo del nódulo de genes asociados con la regulación de plegamiento de proteínas y autofagia en etapas de fijación y senescencia del nódulo, a través de la expresión de marcadores de autofagia (p.ej. ATG8, PI3K, Beclin-1) y estudios de genómica funcional. El incremento en la acumulación del mensajero de estos genes comienza entre los 18 a 22 dpi y aumenta al día 30, datos que coinciden con los días en que reportamos el procesamiento de *PvbZIP60* y su posterior decaimiento. Una colocalización de marcadores de ambos procesos podría sugerirnos si son procesos acoplados en alguna región particular de las células infectadas y darnos nuevas perspectivas del desarrollo y senescencia del nódulo.

## Phaseolus vulgaris como modelo de estudio de UPR

Con base en los antecedentes mencionados en pocas plantas modelo como *A. thaliana* y *Z. mays*, considero que es de gran importancia extender el estudio de este mecanismo a otras especies, en donde se tenga la oportunidad de analizar la respuesta para estudiar otros mecanismos. Por tanto, propongo a la leguminosa, *P. vulgaris*, el frijol común, como un modelo de estudio para la UPR. Este ofrece ventajas para la realización de estudios de genómica funcional gracias al sistema de transformación en raíz mediada por *A. rhizogenes* (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007), así como la posibilidad de analizar diferentes tipos de estrés que la inducen, particularmente la respuesta a infección por bacterias.

## **II. Transcriptómica, Identificación génica y análisis de genómica funcional de nódulos fijadores de nitrógeno de *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus acutifolius* (Tepari bean) y *Vigna unguiculata* (cowpea) en cultivos resistentes a calor**

Este trabajo formó parte del Proyecto de Investigación Coordinada (Research Coordinated Project) “Climate proofing of food crops: genetic improvement for adaptation to high temperatures in drought prone areas and beyond”, financiado por la Agencia Internacional Atómica de Energía (por sus siglas en inglés, IAEA), bajo el contrato No. 16601. El grupo se enfocó a analizar los efectos del estrés por calor desde diversos enfoques en cultivos de arroz y frijol. El resultado fue un número especial de la revista *Australian Journal of Crop Science* titulado “CROP ADAPTATION TO CLIMATE CHANGE: High-Temperature Stress in Drought-Prone Areas” ([Special Issue 2021 | 15\(09\):2021 | 10.21475/ajcs.21.15.09.sp](https://www.publishing.csiro.au/ajcs/Special-Issue-2021-15(09):2021-10.21475/ajcs.21.15.09.sp)), en donde se publica parte del análisis presentado en esta tesis, en el artículo “Identification of small open reading frames (sORFs) associated with heat tolerance in nitrogen-fixing root nodules of *Phaseolus vulgaris* wild-type and cv BAT93”, de Zayas Del-Moral *et al.* 2021 .

### **Antecedentes**

Durante la última década, el gran reto en el estudio de las interacciones planta-microbio – (incluida la fijación de nitrógeno) –, ha sido dar un paso adelante para lograr avances en investigación aplicada. Para lograr estos objetivos, es necesario considerar las

condiciones actuales del crecimiento de las plantas en el campo, las cuales presentan escenarios de estrés por deficiencia de nutrientes, acidez del suelo, sequía y altas temperaturas, entre otros. Desde hace dos décadas las altas temperaturas y la deficiencia de humedad han sido consideradas causas mayores que afectan de manera importante todas las etapas de la simbiosis, limitando el crecimiento y sobrevivencia de las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (rhizobia) en los suelos, así como de las plantas. Las condiciones climáticas extremas pueden contribuir a efectos adversos en rhizobia, incluyendo delecciones y rearrreglos del material genómico, que alteran la diversidad genética. En este estudio realizamos análisis de genómica comparativa entre los transcriptomas de los nódulos de la raíz de un cultivar sensible a calor como lo es *Phaseolus vulgaris* L., genotipo BAT93, bajo condiciones de estrés por calor que afectaron negativamente su capacidad de fijar nitrógeno durante la interacción *P. vulgaris* – rhizobia. En este trabajo presentamos los resultados de expresión diferencial de los transcriptomas de nódulos fijadores de nitrógeno en su etapa activa en respuesta a estrés por calor.

Actualmente, las tecnologías de secuenciación de nueva generación ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)) ofrecen nuevas y rápidas maneras para caracterizar genomas y perfiles de ARN mensajero (ARNm), pequeños ARNs, factores de transcripción, estructura de la cromatina, patrones de metilación del DNA, microbiología y metagenómica, siendo éstas herramientas poderosas para determinar los genes que codifican—enzimas responsables de la biosíntesis de metabolitos secundarios, entre otras rutas fundamentales. En conjunto, toda esta información conforma una base cada vez más completa para los análisis de biología molecular y genómica funcional para plantas no modelo, como es el caso de frijol.

La tecnología de RNA-Seq mide la abundancia de transcritos generando lecturas de secuencias y conteos de frecuencia entre diferentes condiciones biológicas. Durante los últimos años se han desarrollado nuevos métodos para validar los resultados bajo

un mejor análisis estadístico (Chung *et al.* 2013). Actualmente los transcriptomas de diversos tejidos, etapas de desarrollo y condiciones de estrés de *P. vulgaris* están disponibles en bases de datos públicas (Severin *et al.*, 2010; O'Rourke *et al.*, 2013, O'Rourke *et al.*, 2014). Estos resultados están disponibles en el Atlas de Expresión Génica del frijol común (<http://plantgrn.noble.org/PvGEA/>) y han sido de gran utilidad como referencia para este proyecto.

### **Simbiosis en otras especies del género *Phaseolus***

Dentro del género *Phaseolus*, *P. vulgaris* ha sido la especie más utilizada para estudiar la nodulación con *Rhizobium*. Sin embargo, el género *Phaseolus* comprende muy diversas especies, de las cuales se han estudiado muy poco sus bacterias simbiotes. México en particular, es un lugar privilegiado al tener en su territorio la mayoría de las aproximadamente 70-80 especies conocidas del género *Phaseolus*, las cuales habitan en diversos ambientes ecológicos. Además, es parte de la región Mesoamericana caracterizada como centro de domesticación de las cinco especies que consumimos—el frijol común (*P. vulgaris* L.), el frijol lima (*P. lunatus* L.), el ayocote (*P. coccineus* L.), el tepari (*P. acutifolius* A. Gray) y el acalete (*P. dumosus* Macfady). (Rendón-Anaya, *et al* 2017).

## **Objetivos de la investigación y productos anticipados**

### **Objetivo general**

Identificar genes y procesos involucrados en respuesta a altas temperaturas en nódulos simbióticos de genotipos tolerantes a calor de frijol común, frijol tepari y frijol chino (en inglés conocido como “cowpea”).

## Objetivos específicos:

- Aislar el ARNm de los nódulos de la raíz bajo condiciones control y de estrés por calor de un genotipo de frijol común sensible a calor y genotipos tolerantes a calor de frijol común, tepary bean y cowpea, inoculados con cepas de rhizobia y bradyrhizobia tolerantes a calor.
- Analizar la fijación de nitrógeno de genotipos sensibles y tolerantes bajo condiciones control y de estrés por calor.
- Construir librerías de cDNA para cada genotipo, bajo condiciones control y bajo estrés por calor, con la finalidad de secuenciar sus transcriptomas empleando tecnologías de nueva generación.
- Realizar el análisis de la genómica comparativa entre los transcriptomas del genotipo sensible BAT93 y los genotipos tolerantes a calor previamente mencionados.
- Enfocarnos en los genes que resulten inducidos o reprimidos en los genotipos, particularmente en proteínas relacionadas con estrés (heat shock proteins, chaperonas, etc.) las cuales estén asociadas con el citoplasma y las membranas peribacteroidales (PBM) de las células infectadas del nódulo ya que se sabe que estos genes participan en la termo tolerancia en plantas.
- Realizar análisis de genómica funcional (utilizando silenciamiento mediado por ARN de interferencia y sobre expresión) en plantas compuesta de frijol para algunos de los genes expresados diferencialmente en condiciones de calor en los diferentes genotipos.

## Plan de trabajo:

1. Selección de los genotipos tolerantes de *P. vulgaris*, *P. acutifolius* y *Vinga unguiculata*.

2. Selección de las bacterias simbiotes de nuestros genotipos seleccionados.
3. Cultivo de los genotipos sensibles y tolerantes, inoculación, recolección de nódulos de 20 días post inoculación (dpi) bajo condiciones control y de estrés por calor.
4. Medición de fijación de nitrógeno bajo condiciones control y de estrés por calor a los 20 dpi.
5. Extracción de ARN total de los nódulos de los cuatro genotipos
6. Construcción de librerías para Illumina
7. Secuenciación de ARN
8. Análisis bioinformático
9. Genómica funcional

## Materiales y métodos

### Cultivares

*P. vulgaris* (BAT93 /genotipo sensible y genotipo silvestre tolerante a calor)

*P. acutifolius* (genotipo silvestre tolerante a calor)

*V. unguiculata* (IPA 206, FB1363, v14 Yori Cahui Black Eyed Pea)

### Sustrato

Vermiculita (No. 3)

### Riego

Solución B&D sin nitrógeno (Broughton y Dilworth 1971)

0.5 ml/L de cada solución: A [2M CaCl<sub>2</sub>], B [1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH7.0], C [20mM Fe-citrato; este debe mantenerse aislado de la luz], y D [0.5M MgSO<sub>4</sub>, 0.5M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2mM MnSO<sub>4</sub>, 4mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1mM ZnSO<sub>4</sub>, 4mM CuSO<sub>4</sub>, 0.2mM CoSO<sub>4</sub>, 0.2mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>].

## Cepas bacterianas

*Rhizobium tropici* CIAT899+GFP para *P. vulgaris*

*Rhizobium leucaenae* CHO2 y *Bradyrhizobium* sp. cepa CCGE-LA001 para *P. acutifolius* y *V. unguiculata*.

## Condiciones de la cámara de crecimiento

Las condiciones se estandarizaron con el resto de los grupos participantes en el 1er. Research Coordinated Meeting.

Condiciones control: 28°C/18°C día/noche (14h/10h)

Condiciones de estrés por calor: 37°C/27°C día/noche (14h/10h) aplicado durante 6 hrs

## Selección de genotipos tolerantes a estrés por calor

Con la finalidad de seleccionar las plantas tolerantes a calor utilizamos tres genotipos silvestres de *P. vulgaris* recomendados por el Dr. Jorge Acosta del INIFAP. Incubamos de 5 plantas de cada genotipo y las sometimos a las condiciones de estrés [37°C/27°C día/noche (14h/10h)] y posteriormente las regresamos a las condiciones control para posteriormente evaluar la viabilidad de la planta y la producción de semillas.

Los tres genotipos seleccionados (*P. vulgaris*, *P. acutifolius* y *V. unguiculata*) fueron propagados para preparar un banco de semillas que permita a futuro realizar los análisis de genómica funcional.

## Crecimiento de las plantas

Los genotipos seleccionados por su tolerancia a calor (1 *P. vulgaris* silvestre, 1 *P. acutifolius* silvestre, 1 *V. unguiculata* domesticado), y el BAT93 sensible a calor fueron germinados e inoculados con sus respectivas cepas bacterianas bajo condiciones control. Las semillas maduras fueron germinadas a 25°C en la oscuridad, en charolas con toallas de papel estéril durante 48 h, e inoculadas acorde a la metodología de Ramírez *et al.*, 2005; Estrada-Navarrete *et al.*, 2007; González de Mejía *et al.*, 2003 y

Verdoy *et al.*, 2004. Las plantas inoculadas crecieron bajo condiciones de humedad, luz y temperatura controladas durante los 20 días post inoculación (dpi) a un régimen de 28°C/18°C (día/noche), 65% humedad relativa, y un fotoperíodo de 14 h en una cámara de crecimiento y riego con solución nutritiva B&D sin nitrógeno (30 ml por planta de 0 a 10 dpi, 50 ml por planta de 10 a 20 dpi). Tras este período, las plantas fueron transferidas a 37°C/27°C día/noche, 65% humedad relativa, 180-300  $\mu$ mol fotón  $m^{-2}s^{-2}$  en una cámara de crecimiento por 6 h. Todas las plantas fueron irrigadas la noche previa al estrés por calor con B&D estéril sin nitrógeno. Los nódulos de 5 plantas de cada genotipo fueron congelados en nitrógeno líquido inmediatamente después de su recolección y almacenados a -80°C. Este experimento se repitió por triplicado para cada condición y genotipo.

Estas condiciones se replicaron para realizar el ensayo de reducción de acetileno (acetylene reduction assay; ARA) de acuerdo a lo descrito por Ramírez *et al.*, (1999) para evaluar la actividad de la nitrogenasa en condiciones control y en condiciones de estrés por calor (Verdoy *et al.*, 2004). Las raíces noduladas de plantas de 20 dpi fueron incubadas por una hora en gas acetileno y la producción de etileno fue determinada en un cromatógrafo de gases (modelo Varian 3300). La actividad específica fue expresada en unidades de  $\mu mol^{-1} C_2H_2 h^{-1} g^{-1}$  nódulo DW (peso seco).

## Extracción de ARN

Los nódulos congelados fueron molidos e inmediatamente procesados para la extracción del ARN total a partir de los repositorios de las tres réplicas biológicas para cada genotipo y tratamiento (24 librerías) utilizando el kit de extracción ZYMO RESEARCH RNA “ZR Plant RNA MiniPrep” Cat. No. R2024, como indica el protocolo ([www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/160/r2024i.pdf](http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/160/r2024i.pdf)). La construcción de las librerías fue realizada por la Unidad de Secuenciación Masiva del Instituto de Biotecnología (UUSM) de la UNAM, la integridad del RNA fue confirmada empleando la

tecnología 2100 Bionalayzer (Agilent Technologies, Inc.) con un RIN ( RNA integrity number) de 7.0.

## Secuenciación de transcriptomas (RNA-seq)

La secuenciación de las 24 librerías de templados de cDNA de tres réplicas biológicas de cada gentotipo, control y en condiciones de calor se realizó a través de la UUSM, en la empresa Macrogen Inc. (Korea; [www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)), empleando la tecnología Illumina Hiseq2000, cada carril contiene 4 muestras con 100 pb con extremos pareados (Pair End; PE), obteniendo datos crudos ([www.illumina.com/systems/hiseq\\_2000\\_1000.ilmn](http://www.illumina.com/systems/hiseq_2000_1000.ilmn)).

## Análisis de transcriptomas

Para estimar la abundancia de transcritos en cada condición se realizó un análisis de calidad como primer paso, empleando el software FASTQC ([www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/)). Las lecturas obtenidas se alinearon contra el genoma de *P. vulgaris* BAT93 y G19833 (disponibles en las bases de datos PhytozomeV11 [[www.phytozome.net](http://www.phytozome.net)] y CoGe [<https://genomevolution.org/CoGe/SearchResults.pl?s=20365>] bajo el identificador de Genoma 20365) y *Vigna radiata* (NCBI Vradiata\_ver6 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=vigna%20radiata> GCA\_000741045.2). Se realizó un ensamblaje *de novo* para los genomas no anotados de *P. acutifolus* y *V. unguiculata* para reducir la pérdida de información no incluida en genomas o transcriptomas previamente de especies cercanas (genes no expresados o variantes de splicing). El alineamiento con los genomas de referencia se realizó empleando el software SMALT (<http://www.sanger.ac.uk/science/tools/smalt-0>).

La expresión diferencial fue estimada empleando las paqueterías DESeq (Anders y Huber, 2010), NOIseq y edgeR (Bioconductor V3.3, R V 3.3) (Robinson 2010) las

cuales ofrecen pruebas estadísticas exactas (<http://bioconductor.org/packages/2.11/bioc/vignettes/DESeq/inst/doc/DESeq.pdf>).

Los resultados validados estadísticamente fueron confirmados por PCR cuantitativas.

### **Identificación de sORFs en *P. vulgaris* BAT93 y genotipo G19833**

Se realizó una búsqueda de potenciales marcos de lectura pequeños (sORFs, por sus siglas en inglés; péptidos de 30 a 150 aa de longitud) a partir de CoGE y *The Novo Genome Assembly and Annotation Team* (COGE database [<https://genomevolution.org/coge/>] y [<https://denovo.cnag.cat/bean>], ID de genoma 20365), mientras que los sORFs para *P. vulgaris* G19833 fueron colectados de Phytozome (Phytozome versión 11 [[www.phytozome.net](http://www.phytozome.net)]; *P. vulgaris* v1.0). En ambos casos los sORFs sin metioninas iniciales fueron descartados para reducir la posibilidad de transcritos truncos.

### **Expresión génica y análisis basado en motivos de los sORFs *P. vulgaris***

Estimamos la abundancia de transcritos para cada condición experimental, las lecturas de 100 pb

#### **RT-PCR cuantitativa**

Los oligonucleótidos específicos fueron diseñados para los genes candidatos a marcadores de estrés por calor.

#### **Inmunolocalización**

Se prepararon cortes semifinos (10  $\mu$ m) de acuerdo a la metodología reportada por Estrada-Navarrete *et al.*, 2006. Los portaobjetos fueron lavados en TBST (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tritón X-100) tres veces durante 10 min, y posteriormente bloqueada con leche en polvo al 5% durante 1 h, incubada a 50°C. Como paso siguiente se incubaron con el primer anticuerpo [Anti-Heat Shock Protein 70 Monoclonal Antibody; MA3-008; Thermo Scientific] leche en polvo al 5% en TBST

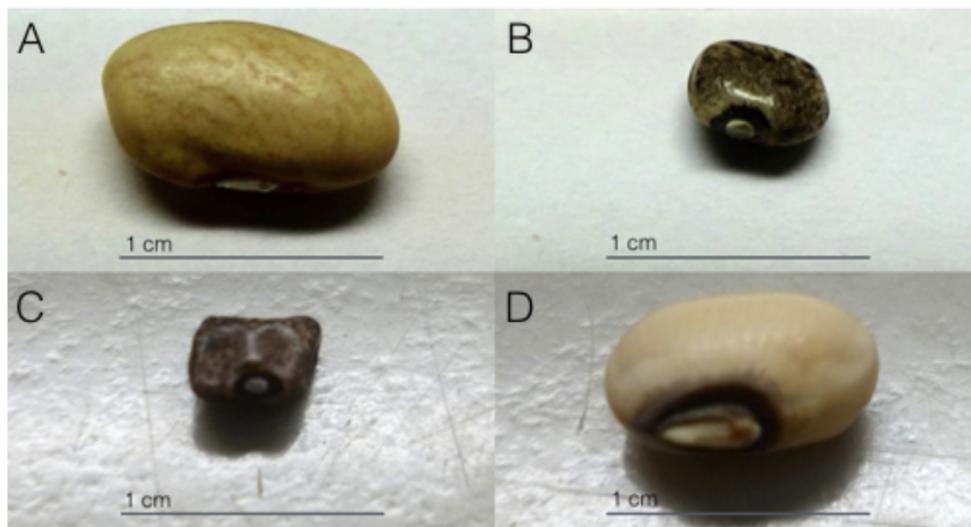
(1:100) durante 12 h, a 5°C. Se lavaron tres veces con TBST durante 30 min cada vez y posteriormente se incubaron con el segundo anticuerpo [Alexa Fluor 633 cabra anti-ratón IgG; A-21126; Invitrogen] diluido en TBST (1:100) durante 4 h a 4°C en una cámara húmeda, en condiciones de oscuridad. Finalmente se lavaron tres veces con TBST durante 30 min utos cada vez y los tejidos fueron cubiertos con Cityfluor.

Las imágenes fueron analizadas con el Microscopio de epi-fluorescencia Axioscop (Zeiss), en la Unidad de Microscopía Avanzada del IBT, UNAM.

## RESULTADOS

### Selección de genotipos tolerantes y sus correspondientes bacterias simbióticas

Los genotipos tolerantes a calor (Tabla 1) fueron analizados tras someterlos a las condiciones de estrés por calor previamente descritas y comparados con el cultivar mesoamericano BAT93 sensible a calor (Fig.1A y Tabla 1, celdas en color verde). Con base en las observaciones cualitativas de recuperación de turgencia tras el tratamiento con calor (Fig. 2) seleccionamos: un *P. vulgaris* silvestre proveniente de Chiapas, Mexico (Pv7) (Fig. 1B); un *P. acutifolius* de Morelos, México (Pac6) (Fig. 1C); y el bien caracterizado *V. unguiculata* IPA 206 (Vung9) (Aguila, De, Martín, Morales, & Arredondo, 2014) (Fig. 1D) (Tabla 1, celdas en color azul).



**Fig. 1. Genotipo sensible y genotipos tolerantes seleccionados.** Los genotipos (A) *P. vulgaris* BAT93 cultivar domesticado, (B) *P. vulgaris* genotipo silvestre Pv7, (C) *P. acutifolius* genotipo silvestre Pv6 y (D) el cultivar *V. unguiculata* IPA206 Vung9 fueron seleccionados por su mejor recuperación y rendimiento tras el estrés por calor previamente establecidos.

Tabla 1 – Genotipos analizados de *P. vulgaris*, *P. acutifolius* y *V. unguiculata*

ID semilla	Género y especie	Silvestre/Domesticado	Información
BAT93	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Domesticado	Tolerante a calor
Pac1	<i>Phaseolus acutifolius</i>	Domesticado	Heat tolerant  Loc. Buenos Aires  Mazatlán, Chiapas, México  INIFAP
Pv2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Silvestre	Tolerante a calor  Loc. Chilpancingo Highway  Tixtla, Guerrero, México  INIFAP
Pv3	SER 118 – <i>Phaseolus vulgaris</i>	Domesticado	Tolerante a calor  Frijol rojo introducido, CIAT 2009  INIFAP
Pv4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Silvestre	Tolerante a calor  Loc. Rio Verde, Jaleaca de Catalan, Guerrero, Mexico

			INIFAP
Pv5	SER 18 - <i>Phaseolus vulgaris</i>	Domesticado	Tolerante a calor,  Frijol rojo introducido, CIAT 2009  INIFAP
Pac6	<i>Phaseolus acutifolius</i>	Silvestre	Tolerante a calor  Balneario Ticomán, Tlaltizapán, Morelos  INIFAP
Pv7	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Silvestre	Tolerante a calor  Chitama, Venustiano Carranza, Chiapas, México  INIFAP
Vung8	<i>Vigna unguiculata</i> – FB1363	Domesticado	F. Basurto, Los Mochis, Sinaloa, Mexico 1992  Provisto por el Dr. Alfonso Delgado, Instituto de Biología, UNAM
Vung9	<i>Vigna unguiculata</i> – IPA 206	Domesticado	Instituto Pernambucano de Brasil (IPA)

Vung10

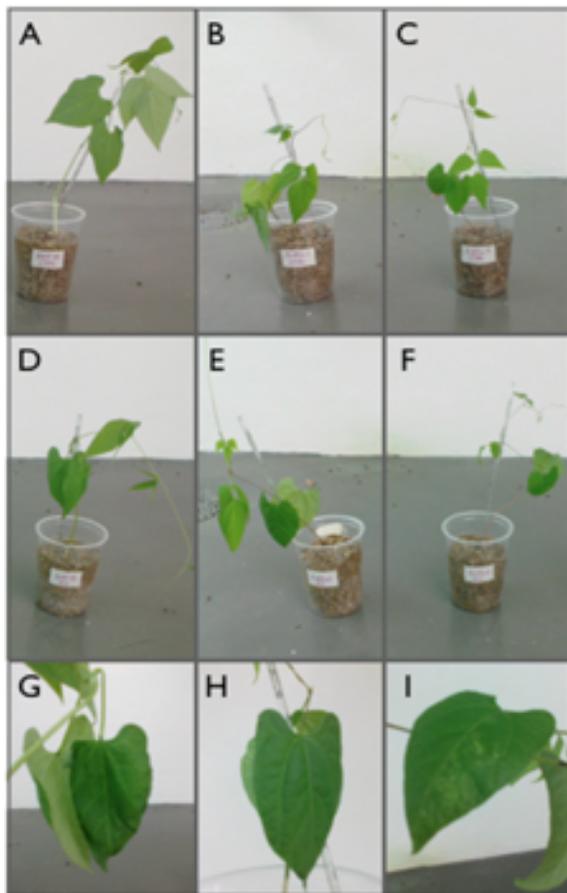
*Vigna unguiculata* – Domesticado

Tucson, AZ

V14 Yori Cahui Black

Eyed Pea

Provisto por el Dr.  
Alfonso Delgado,  
Instituto de Biología,  
UNAM



**Fig. 2. El cultivar sensible *P. vulgaris* (BAT93) y los genotipos tolerantes (Pv7 y Pv4) bajo condiciones control y de estrés por calor. (A) BAT93, (B) Pv7, y (C) Pv4 bajo condiciones control [28°C/18°C día/noche (14h/10h)]; (D), (G) BAT93, (E),(H) Pv7, y (F),(G) Pv4 bajo condiciones de estrés por calor [37°C/27°C day/night (14h/10h)] durante 6 h.**

*P. vulgaris* BAT93 y el genotipo tolerantes a calor seleccionado (Pv7) fueron inoculados con *R. tropici* CIAT899 + GFP (expresa constitutivamente la fusión con la proteína verde fluorescente para monitorear la infección a través de análisis de microscopía). Esta bacteria es un simbiote bien caracterizado de *P. vulgaris* (Martínez-Romero *et al.*,

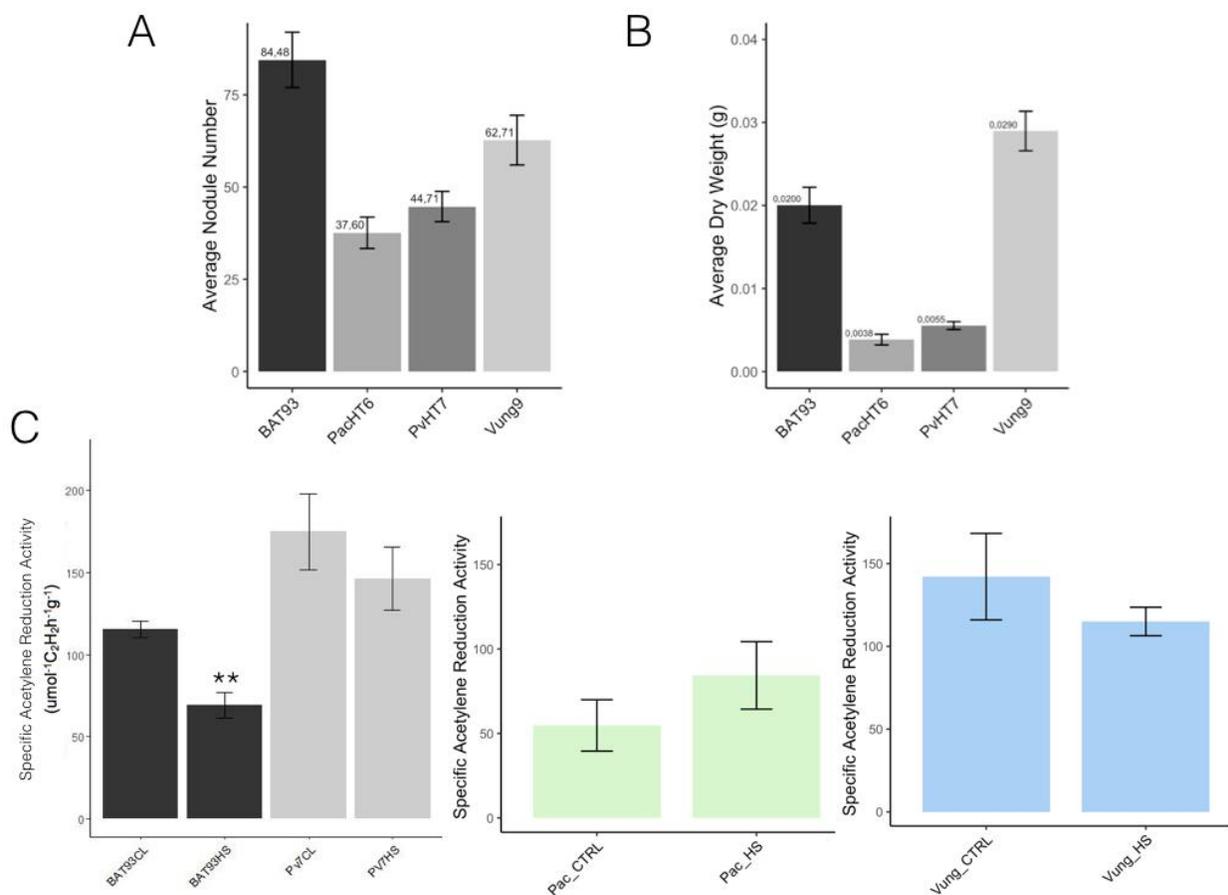
1991). *P. acutifolius* y *V. unguiculata* IPA206 fueron inoculados con *Rhizobium leucaenae* CHO2 (provistas por el Dr. Pablo Vinuesa, CCG, UNAM), las cuales generan interacciones simbióticas con algunos cultivares de *V. unguiculata* en Ocuituco, Morelos, México; empleamos también la recién caracterizada bacteria *Bradyrhizobium* sp. CCGE-LA001 (Servín-Garcidueñas *et al.*, 2014, Servín-Garcidueñas *et al.*, 2016). El genotipo seleccionado por su tolerancia a calor de *P. acutifolius* y *V. unguiculata* IPA206, no establecieron una asociación simbiótica con *R. leucaenae*, sin embargo, fueron eficientemente noduladas con *Bradyrhizobium* sp. cepa CCG-LA001.

## Efectos del estrés por calor sobre los niveles de fijación de nitrógeno

Los genotipos de frijol sensible y tolerante presentan diferencias morfológicas: forma de las hojas; grosor de hojas, raíz y tallo; longitud del tallo, tamaño de la semilla y vaina; cantidad de semilla por vaina; cantidad, tamaño y distribución de los nódulos a lo largo de la raíz principal y su ubicación con respecto a las raíces laterales. Estableciendo las variables iniciales, presentamos en este reporte las diferencias remarcables entre los nódulos control y aquellos de plantas sometidas a estrés por calor para cada genotipo respecto a los niveles de fijación de nitrógeno.

Consistentemente con las diferencias morfológicas enlistadas, el número de nódulos y el peso seco promedio fue muy variable entre los cuatro genotipos. El frijol BAT93 inoculado con *R. tropici* CIAT899 + GFP presentó el mayor número de nódulos con un promedio de 84.48 nódulos por planta, distribuidos principalmente en la región de la corona la cual representa el doble de los nódulos que se desarrollaron en el *P. vulgaris* silvestre Pv7 inoculados con la misma bacteria (Fig. 3A). *V. unguiculata* IPA206 mostró una distribución de los nódulos a todo lo largo de la raíz principal, con un promedio de 62.71 nódulos por planta, cantidad menor a los de *P. vulgaris* BAT93, pero más grandes de acuerdo a su peso seco promedio (Fig. 3B).

La actividad de nitrogenasa fue medida a través de un ensayo específico de reducción de acetileno (ARA; Acetylene Reduction Assay). Los resultados fueron variables entre los cuatro genotipos, lo cual indica que las variaciones morfológicas y de distribución que observamos entre los nódulos de *P. vulgaris*, *P. acutifolius* y *V. unguiculata* podrían representar un factor importante a considerar ante el estrés por calor y el rendimiento del proceso. La temperatura de la vermiculita presenta una ligera variación dependiendo de la profundidad de la raíz bajo condiciones de humedad controlada. La actividad de nitrogenasa en *P. vulgaris* BAT93 se redujo significativamente tras el tratamiento con calor 6 h 37°C. La actividad entre los nódulos en condiciones control y en condiciones de estrés para *P. vulgaris* Pv7, *P. acutifolius* Pv6 y *V. unguiculata* IPA206 no fueron significativamente diferentes. Basándonos en estos resultados, los genotipos tolerantes a calor no presentan efectos significativamente distintos en la actividad de fijación de nitrógeno tras el estrés por calor.



**Fig. 3.** Características cuantitativas de los nódulos y actividad de la nitrogenasa en *P. vulgaris*, BAT93 y Pv7, *P. acutifolius* Pv6 y *V. unguiculata* IPA206. (A) Promedio de número de nódulos por planta; (B) peso seco promedio (g); (C) actividad de nitrogenasa de cada genotipo en condiciones control (CTRL) y tratamiento con calor (HS) (6 h 37°C) en nódulos de *P. vulgaris* BAT93 y Pv7, *P. acutifolius* Pv6 y *V. unguiculata* IPA206 Vung9. Cada barra representa la media SE para n=5. Las diferencias significativas (P) están representadas por dobles asteriscos (\*\*).

### Análisis de transcriptomas de nódulos bajo condiciones de estrés por calor

En este proyecto analizamos los transcriptomas de cuatro genotipos previamente descritos correspondientes a *P. vulgaris* BAT93 y Pv7, *P. acutifolius* Pv6 y *V. unguiculata* IPA206 Vung9 bajo condiciones control y estrés por calor. La calidad de las

lecturas de Illumina fue analizada para descartar secuencias sobrerrepresentadas o artificios, y contaminación por adaptadores. Todas las muestras produjeron más de 8 millones de lecturas de buena calidad. Las lecturas fueron alineadas a sus correspondientes genomas de referencia como se describe en la Metodología. Las tablas 2 y 3 muestran los porcentajes de alineamientos para las lecturas de cada genotipo. Las lecturas pareadas mapearon entre 79-90%, el resto de las lecturas podrían corresponder a nuevos genes o *splicing* alternativo el cual debe ser caracterizado con un análisis más detallado.

**Tabla 2.** Lecturas mapeadas con su correspondiente genoma de referencia

Sample	Genotype	Condition	Reads mapped	Mapped reads (%)
FS1	<i>P. vulgaris</i> BAT93	Control	8648408	99.72%
FS2	<i>P. vulgaris</i> BAT93	Control	11314224	99.46%
FS3	<i>P. vulgaris</i> BAT93	Control	11787784	99.70%
FS4	<i>P. vulgaris</i> BAT93	Heat shock	13346240	99.61%
FS5	<i>P. vulgaris</i> BAT93	Heat shock	13861393	99.44%
FS6	<i>P. vulgaris</i> BAT93	Heat shock	14999443	99.69%
FS7	<i>P. vulgaris</i> PvHT7	Control	8866657	99.18%
FS8	<i>P. vulgaris</i> PvHT7	Control	15435515	99.54%
FS9	<i>P. vulgaris</i> PvHT7	Control	15291789	99.48%

<b>FS10</b>	<i>P. vulgaris</i> PvHT7	Heat shock	11327968	99.59%
<b>FS11</b>	<i>P. vulgaris</i> PvHT7	Heat shock	14833537	99.58%
<b>FS12</b>	<i>P. vulgaris</i> PvHT7	Heat shock	13392299	99.60%
<b>FS13</b>	<i>P. acutifolius</i> Pv6	Control	13196749	99.22%
<b>FS14</b>	<i>P. acutifolius</i> Pv6	Control	12796890	99.09%
<b>FS15</b>	<i>P. acutifolius</i> Pv6	Control	14466521	99.50%
<b>FS16</b>	<i>P. acutifolius</i> Pv6	Heat shock	13273413	99.00%
<b>FS17</b>	<i>P. acutifolius</i> Pv6	Heat shock	13834598	99.25%
<b>FS18</b>	<i>P. acutifolius</i> Pv6	Heat shock	12442997	98.98%
<b>FS19</b>	<i>V. unguiculata</i> IPA206	Control	16148826	98.44%
<b>FS20</b>	<i>V. unguiculata</i> IPA206	Control	15108963	98.40%
<b>FS21</b>	<i>V. unguiculata</i> IPA206	Control	9339791	98.34%
<b>FS22</b>	<i>V. unguiculata</i> IPA206	Heat shock	12968704	98.42%
<b>FS23</b>	<i>V. unguiculata</i> IPA206	Heat shock	14585157	97.92%

**FS24** *V. unguiculata* Heat shock 17367684 98.17%  
IPA206

---

**Tabla 3.** Porcentaje de lecturas pareadas mapeadas contra genoma de referencia

Sample	Organism	Condition	Pair-ended percentage
<b>FS1</b>	BAT93	Control	92.93%
<b>FS2</b>	BAT93 CTRL	Control	82.89%
<b>FS3</b>	BAT93 CTRL	Control	88.98%
<b>FS4</b>	BAT93 HS	Heat shock	87.18%
<b>FS5</b>	BAT93 HS	Heat shock	85.84%
<b>FS6</b>	BAT93 HS	Heat shock	88.77%
<b>FS7</b>	PvHT7 CTRL	Control	86.53%
<b>FS8</b>	PvHT7 CTRL	Control	90.02%
<b>FS9</b>	PvHT7 CTRL	Control	89.60%
<b>FS10</b>	PvHT7 HS	Heat shock	89.50%
<b>FS11</b>	PvHT7 HS	Heat shock	89.00%
<b>FS12</b>	PvHT7 HS	Heat shock	88.56%

<b>FS13</b>	<i>P. acutifolius</i> CTRL	Control	88.57%
<b>FS14</b>	<i>P. acutifolius</i> CTRL	Control	88.21%
<b>FS15</b>	<i>P. acutifolius</i> CTRL	Control	88.12%
<b>FS16</b>	<i>P. acutifolius</i> HS	Heat shock	88.83%
<b>FS17</b>	<i>P. acutifolius</i> HS	Heat shock	85.83%
<b>FS18</b>	<i>P. acutifolius</i> HS	Heat shock	83.78%
<b>FS19</b>	<i>V. unguiculata</i> CTRL	Control	81.92%
<b>FS20</b>	<i>V. unguiculata</i> CTRL	Control	82.85%
<b>FS21</b>	<i>V. unguiculata</i> CTRL	Control	79.70%
<b>FS22</b>	<i>V. unguiculata</i> HS	Heat shock	84.22%
<b>FS23</b>	<i>V. unguiculata</i> HS	Heat shock	80.56%
<b>FS24</b>	<i>V. unguiculata</i> HS	Heat shock	81.65%

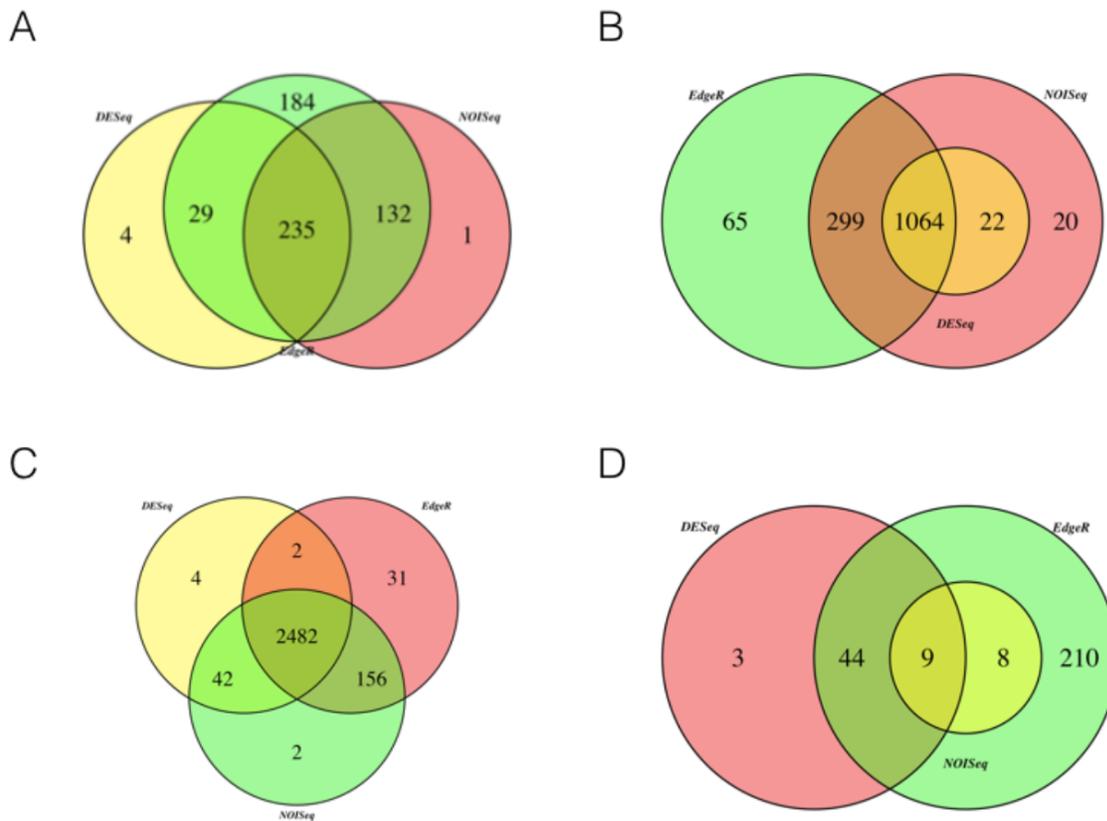
## Genes diferencialmente regulados en nódulos de 20 dpi bajo condiciones de estrés por calor

En la siguiente tabla presentamos el análisis de genes diferencialmente expresados mediante los tres métodos estadísticos empleados. (Fig. 4; Tabla 4) A partir de estos

resultados y su asociación de GO se identificaron vías o candidatos con potencial para continuar con análisis de genómica funcional que den continuidad a este proyecto.

**Tabla 4.** Número de genes diferencialmente expresados en nódulos de 20 dpi comparando entre condición Control y Estrés por calor para cada genotipo. El análisis de expresión diferencial fue realizado por tres métodos: DESeq2 ( $P\text{-adj}<0.05$ ), EdgeR ( $FDR <0.05$ ) y NOISeq ( $P>0.95$ ). (DEG – differential expressed gene)

<b>Genotipo</b>	<b>DESeq</b>	<b>EdgeR</b>	<b>NOISeq</b>	<b>Intersección</b>
<b>BAT93 Total DEG</b>	268	580	368	235
Sobre-regulados	74	203	109	72
Des-regulados	194	377	259	163
<b>Pv7 Total DEG</b>	1086	1428	1405	1064
Sobre-regulados	791	1004	947	790
Des-regulados	295	424	458	274
<b>Pac6 Total DEG</b>	2530	2671	2682	2482
Sobre-regulados	1174	1211	1255	1128
Des-regulados	1356	1460	1427	1354
<b>Vung-IPA206 Total DEG</b>	56	271	17	9
Sobre-regulados	20	129	5	2
Des-regulados	36	142	12	7



**Fig 4. Genes expresados diferencialmente obtenidos con los tres métodos estadísticos: DESeq, EdgeR and NOISeq.** Los diagramas de Venn muestran el número de genes que resultan de los análisis de expresión diferencial comparando la condición Control con la de Estrés por Calor realizada por los tres métodos descritos y la intersección entre ellos. Los genes comunes entre los tres métodos fueron empleados para realizar el análisis de GO. (A) *P. vulgaris* BAT93; (B) *P. vulgaris* Pv7; (C) *P. acutifolius* Pv6; y (D) *V. unguiculata* IPA206 Vung9.

### Identificación y análisis de expresión diferencial de sORFs bajo condiciones de estrés por calor en *P. vulgaris*

Para concluir este proyecto, nos enfocamos en identificar bioinformáticamente los potenciales pequeños marcos abiertos de lectura (small open reading frames; sORFs) presentes en nuestro transcriptoma, datos que fueron enviados para su publicación en 2017 y publicados en el número especial mencionado al inicio de este capítulo en 2021,

con el título “Identification of small open reading frames associated with heat tolerance in *Phaseolus vulgaris* root nodules” (Zayas-Del Moral *et al.* 2020), mismo que encontrarán anexo y en el vínculo siguiente: Pages 28-37 | [Full Text PDF](#) | DOI: 10.21475/ajcs.21.15.09.sp-3.

Los sORFs son secuencias que codifican para péptidos menores a 100 aminoácidos, reportados hasta la fecha en organismos como algas, arroz y Arabidopsis. Estos micropéptidos pueden estar involucrados en procesos como el crecimiento de la planta, cerrado de estomas, ciclos circadianos, desarrollo, crecimiento de tubo polínico, respuestas abióticas, por mencionar algunos procesos (Feng *et al.* 2023). En frijol se identificaron potenciales sORFS (Guillén *et al.* 2013) que pueden estar asociados al proceso de fijación de nitrógeno.

Estimamos la proporción de sORFs predichos en los genotipos secuenciados de *P. vulgaris* (BAT93 y G19833), y los comparamos con los reportados en las leguminosas *Glycine max*, *Lotus japonicum* y *Medicago truncatula* respecto al total de marcos abiertos de lectura (ORFs) reportados para cada genoma (Tabla 5). Entre *P. vulgaris* BAT93 y G19833 la proporción varía de 0.11 a 0.14 en donde esta variación mínima podemos asumir que se debe a los diferentes sistemas de anotación de sus genomas, y está en un rango similar al de otras leguminosas.

En los transcriptomas identificamos 235 ORFs diferencialmente expresados en *P. vulgaris* BAT93 ante las condiciones de estrés por calor, de los cuales 16 fueron identificados como potenciales sORFs. Por su longitud, en el momento que realizamos

el análisis, estos sORFs no arrojaron resultados en el análisis de ontología génica (GO: gene ontology), por lo que buscamos identificar dominios funcionales empleando MEME Suite y BLASTP, los resultados se resumen en la Tabla 6 para los identificados en nódulos de 20 dpi de BAT93 y en la Tabla 7 para los identificados en nódulos de 20 dpi de *P. vulgaris* 7.

**Tabla 5.** Comparación del total de marcos abiertos de lectura (ORFs) y pequeños marcos abiertos de lectura (sORFs) en *P. vulgaris* cv. BAT93 y G19833, *Glycine max*, *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula*.

	<i>Phaseolus vulgaris</i> BAT93	<i>Phaseolus vulgaris</i> G19833	<i>Glycine max</i>	<i>Lotus japonicus</i>	<i>Medicago truncatula</i>
ORFs	64692	31638	88647	10979	62319
sORFs	7414	4560	14979	2195	18688
sORFs/ORFs ratio	0.11	0.14	0.16	0.19	0.29

**Tabla 6.** Lista de sORFs diferencialmente expresados en nódulos de 20 dpi de *P. vulgaris* cv. BAT93 ante tratamiento de estrés por calor.

<b>ID</b>	<b>Size</b>	<b>Associated protein</b>	<b>MOTIF MEME</b>	<b>BLASTP (Superfamilies)</b>	<b>Sequences producing significant alignments</b>	<b>Associated processes</b>
<b>PHASIBEAM10B03811</b> <b>8(T1)</b>	103	N/A	N/A	No Putative Conserved Domains	Spidroin-1-like [Glycine max]	
<b>PHASIBEAM10B04510</b> <b>6(T1)</b>	103	N/A	N/A	H4 superfamily	Histone H3.2 [Cajanus cajan]	
<b>PHASIBEAM10F00183</b> <b>0(T1)</b>	103	N/A	N/A	No Putative Conserved Domain	Glutamine dumper 5-like [Cicer arietinum] transmembrane protein [Medicago truncatula]	
<b>PHASIBEAM10F00290</b> <b>1(T1)</b>	116	N/A	N/A	No Putative Conserved Domain	uncharacterized genes	
<b>PHASIBEAM10F00336</b> <b>8(T1)</b>	123	N/A	N/A	AAI_LTSS superfamily	Lipid transfer protein DIR1 [Vigna angularis,	

						Medicago truncatula]
<b>PHASIBEAM10F00427</b>	140	N/A	N/A	No	Putative	Lysine-rich
<b>4(T1)</b>				Conserved		arabinogalactan
				Domain		protein 19-like [Vigna angularis] transmembrane protein, putative [Medicago truncatula]
<b>PHASIBEAM10F00622</b>	145	N/A	N/A	HMG-box		High mobility
<b>5(T1)</b>				superfamily		group B protein 7-like [Glycine soja] PREDICTED [Vigna radiata]/ HMGB-UBF_H MG-box, class II and III members of the HMG-box superfamily of DNA-binding proteins

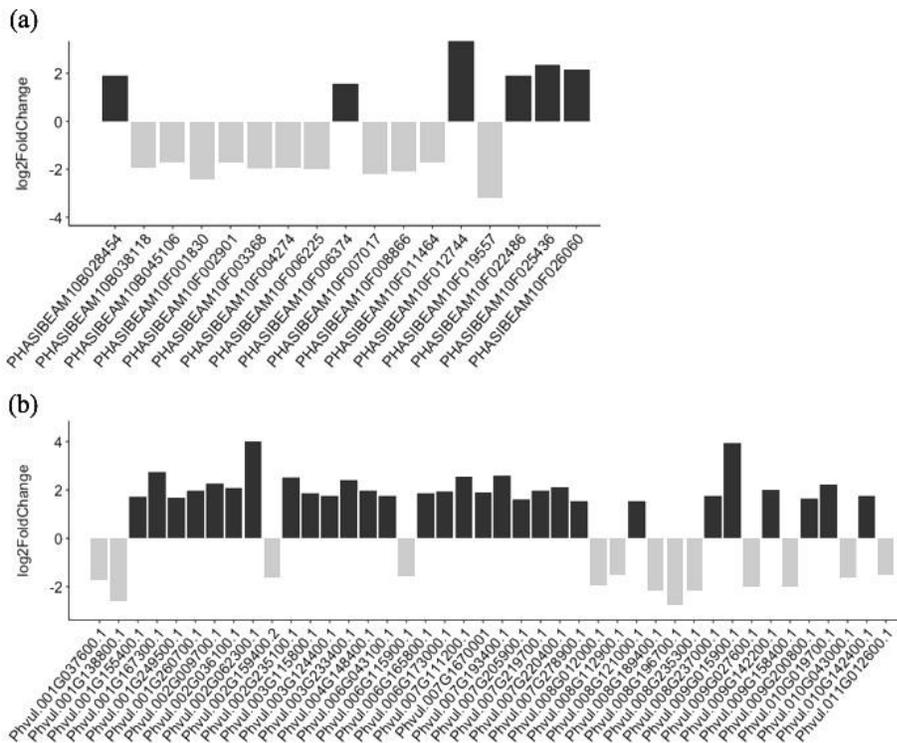
<b>PHASIBEAM10F00637</b> <b>4(T1)</b>	81	N/A	N/A	RRM_SF superfamily	Serine/arginine-ri ch SC35-like splicing factor SCL33 isoform X1 [Vigna radiata]	Hormonal control (Cruz et al., 2014, Suzuki et al., 2016)
<b>PHASIBEAM10F00701</b> <b>7(T1)</b>	137	Histone H2B.6	N/A	H2B superfamily	probable histone H2B.3 [Vigna radiata]	DNA package (Iliakis et al., 2008; Kim et al. 2015; Kantidze et al., 2016)
<b>PHASIBEAM10F00886</b> <b>6(T3)</b>	130	Thymidine kinase a	N/A	TK superfamily	Thymidine kinase-like [Vigna radiata]	Nucleotide synthesis (Wang & Liu, 2006; Garton et al., 2007); nucleotide salvage pathway (Moffat et al. 2002)

<b>PHASIBEAM10F01146</b>	130	Histone	N/A	H4 superfamily	Histone	H3.2	DNA
<b>4(T1)</b>		H3.2			[Cajanus cajan]		package
					histone	H3	(Iliakis et al.,
					[Triticum		2008; Kim et
					aestivus]	core	al. 2015,
					histone		Kantidze et
					H2A/H2B/H3/H		al., 2016)
					4		
<b>PHASIBEAM10F01274</b>	75(T	N/A	Motif B	COX7a_Cyt_c_	Cytochrome-c		Stress
<b>4(T1)(T2)</b>	1)			Oxidase_VIIa	oxidases,		response
	67(T			superfamily	electron carriers		(Gong et al.
	2)				[Theobroma		1998, Huang
					cacao]		et al. 2016))
<b>PHASIBEAM10F01955</b>	88(T	N/A	Motif	SANT_Superfam	PREDICTED:		
<b>7(T1)(T2)</b>	1)		C/A	ily/	protein		
	93(T			Myb_DNA-Bindi	RADIALIS-like		
	2)			ng	3 [Vigna radiata]		
					MYB		
					transcription		
					factor MYB142		
					[Glycine max]		
<b>PHASIBEAM10F02248</b>	74	N/A	N/A	No	Putative	Transmembrane	
<b>6(T1)</b>				Conserved		protein, putative	
				Domain		[Medicago	
						truncatula]	

<b>PHASIBEAM10F02543</b>	<sup>72</sup>	N/A	N/A	No	Putative	Hypotetical	
<b>6(T1)</b>				Conserved		protein	
				Domain		LR48_Vigan08g	
						167400	[Vigna angularis]
<b>PHASIBEAM10F02606</b>	<sup>144</sup>	N/A	N/A	Alpha-crystallin-		PREDICTED:	(Vierling et
<b>0(T1)</b>				Hsps_p23-like		15.7 kDa heat	al. 1997)
				superfamily/IbpA		shock protein,	
						peroxisomal	
						[Vigna	
						angularis][Vigna	
						radiata]	

Asimismo, en la Figura 5 mostramos los niveles de expresión diferencial (en términos del logaritmo base 2 de la razón de cambio) para los sORFs identificados tanto en nódulos de 20 dpi de *P. vulgaris* BAT93 como en nódulos de 20 dpi de *P. vulgaris* 7 (*genotipo silvestre tolerante*) respecto a la expresión en los nódulos de 20 dpi control de cada genotipo. De los 17 identificados en BAT93, 6 muestran un incremento en la expresión y 11 una disminución. Si bien no presentaron identidad con alguna función reportada previamente, los dominios en dos de ellos se asocian a un factor de splicing (PHASIBEAM10F006374) y a un dominio de citocromo-c oxidasa (PHASIBEAM10F012744). De los 42 identificados en *P. vulgaris* 7, 29 incrementan su expresión, mientras que 13 la disminuyen. De los que disminuyeron su expresión,

identificamos asociación funcional con proteínas relacionadas a estrés (Phvul.008G112900.1, Phvul.008G189400.1, Phvul.009G027600.1.), factores de crecimiento (Phvul.003G233400.1) (Yang et al., 2001), citocromo b5 (Phvul.006G115900.1) y a proteínas de respuesta a ácido giberélico (Phvul.008G235300.1). De los sORFs que incrementaron su expresión identificamos dominios relacionados con calmodulina, dominios presentes en proteína que participan en la señalización de calcio (Phvul.001G155400.1, Phvul.001G260700.1, Phvul.003G115800.1, Phvul.007G111200.1, Phvul.007G278900.1), y en proteínas de respuesta a fitohormonas como etileno, auxina y giberelina (Phvul.007G193400.1, Phvul.007G219700.1, Phvul.009G015900.1, Phvul.010G019700.1).



términos del logaritmo base 2 de la magnitud de cambio. Los números de acceso están indicados en el eje X.

**Tabla 6.** Lista de sORFs diferencialmente expresados en nódulos de 20 dpi de *P. vulgaris* 7 ante tratamiento de estrés por calor.

<b>ID</b>	<b>Size</b>	<b>GO</b>	<b>MOTIF</b>	<b>BLASTP</b>	<b>Sequences</b>	<b>Associate</b>
			<b>MEME</b>	<b>(Superfamilies)</b>	<b>producing</b>	<b>d process</b>
					<b>significant</b>	
					<b>alignments</b>	
<b>Phvul.010G019</b>	<sup>112</sup>	Uncharacterized	N/A	4F5	Gibberellin	Hormonal
<b>700.1</b>		protein family SERF			regulated protein [Cynara cardunculus var. Scolymus]	control
<b>Phvul.010G142</b>	<sup>114</sup>	N/A	N/A	No	Putative	uncharacterized
<b>400.1</b>				Conserved Domain	genes	
<b>Phvul.010G043</b>	<sup>97</sup>	Domain	of	N/A	zf-FLZ	uncharacterized
<b>000.1</b>		unknown function (DUF581)		superfamily	genes	

<b>Phvul.003G124</b> <b>400.1</b>	<sup>74</sup> N/A	N/A	No Conserved Domain	Putative	uncharacterized genes	
<b>Phvul.003G233</b> <b>400.1</b>	<sup>75</sup> phytosulfokine 4 precursor	N/A	PSK superfamily		phytosulfokines -like [Glycine max]	Growth
<b>Phvul.003G115</b> <b>800.1</b>	<sup>121</sup> Ca <sup>2+</sup> -binding protein 1	Motif F/A	Efh (EF-hand7)	superfamily	hypersensitivye reaction associated Ca <sup>2+</sup> -binding protein [Phaseolus vulgaris] calmodulin-like [Vigna angularis]	Calcium signaling (Liu et al., 2003; Al-Quara an et al., 2010)
<b>Phvul.009G200</b> <b>800.1</b>	<sup>141</sup> N/A	N/A	G_glu_transpept superfamily		transmembrane protein, putative [Medicago truncatula]	

<b>Phvul.009G158</b>	<sup>58</sup>	N/A	N/A	No	Putative	aldo/keto	
<b>400.1</b>				Conserved		reductase	
				Domain		[Desulfitobacterium metallireducens]	
<b>Phvul.009G015</b>	<sup>101</sup>	SAUR-like	N/A	Auxin_inducible		auxin-induced	Hormonal
<b>900.1</b>		auxin-responsive protein family		superfamily		protein ARG7	control
						[Cajanus cajan]	
						Predicted:	
						auxin-induced	
						protein 15A	
						[Vigna angularis]	
<b>Phvul.009G142</b>	<sup>115</sup>	N/A	N/A	No	Putative	uncharacterized	
<b>200.1</b>				Conserved		genes	
				Domain			
<b>Phvul.009G027</b>	<sup>150</sup>	Heavy metal	N/A	HMA_superfamily		Predicted:	Stress
<b>600.1</b>		transport/detoxification		y		heavy	response
		superfamily				metal-associated	
		protein				isoprenylated	
						plant protein 22	

						[Vigna angularis]
<b>Phvul.011G012</b> <b>600.1</b>	<sup>86</sup> Domain unknown function, DUF642	of	N/A	PLN03089/hypote tical	uncharacterized genes	
<b>Phvul.008G196</b> <b>700.1</b>	<sup>44</sup> N/A		N/A	No Conserved Domain	Putative uncharacterized genes	
<b>Phvul.008G121</b> <b>000.1</b>	<sup>101</sup> N/A		N/A	No Conserved Domain	Putative uncharacterized genes	
<b>Phvul.008G235</b> <b>300.1</b>	<sup>97</sup> Gibberellin-reg ulated protein	family	N/A	GASA superfamily	gibberellic acid -stimulated protein	Hormonal control 1 [Glycine soja]
<b>Phvul.008G112</b> <b>900.1</b>	<sup>101</sup> Bifunctional inhibitor/lipid-tr ansfer protein/seed storage albumin		N/A	AAI_LTSS superfamily	predicted: putative lipid-transfer protein	Stress response DIR1 [Vigna angularis]

					superfamily		
					protein		
<b>Phvul.008G189</b>	<sup>134</sup>	Heavy metal	N/A	HMA_superfamil	Predicted:	Stress	
<b>400.1</b>		transport/detoxi		y	copper transport	response	
		fication			protein		
		superfamily			ATX1-like		
		protein			[Glycine max]		
<b>Phvul.008G012</b>	<sup>137</sup>	Calcium-bindin	N/A	EFh	calcium-binding		
<b>000.1</b>		g EF-hand		superfamily/EF-ha	EF-hand protein		
		family protein		nd7	[Medicago		
					truncatula]		
<b>Phvul.008G237</b>	<sup>144</sup>	HSP20-like	N/A	alpha-crystallin-H	Predicted: 15.7		
<b>000.1</b>		chaperones		sps_p23-like	kDa heat shock		
		superfamily		superfamily	protein,		
		protein			peroxisomal		
					[Vigna		
					angularis]		
<b>Phvul.004G148</b>	<sup>71</sup>	N/A	N/A	No	Putative	uncharacterized	
<b>400.1</b>				Conserved		genes	
				Domain			

<b>Phvul.007G220</b> <b>400.1</b>	<sup>54</sup> N/A	N/A	No Conserved Domain	Putative	uncharacterized genes	
<b>Phvul.007G205</b> <b>900.1</b>	<sup>62</sup> Low	N/A	No Conserved Domain	Putative	Predicted: hydrophobic protein RCI2B [Vigna radiata]/Stress-in duced hydrophobic peptide [Theobroma cacao]	
<b>Phvul.007G111</b> <b>200.1</b>	<sup>118</sup> 11	calmodulin-like Motif D/F	EFh superfamily/EF-ha nd7		Predicted: calmodulin-like protein 11 [Vigna radiata]	Calcium signaling (Liu et al., 2003; Al-Quara an et al., 2010)
<b>Phvul.007G193</b> <b>400.1</b>	<sup>147</sup>	Integrase-type DNA-binding	N/A	AP2 superfamily	Ethylene-respon sive transcription	Hormonal control

		superfamily				factor ERF098
		protein				[Glycine soja]
<b>Phvul.007G167</b>	<sup>131</sup>	N/A	N/A	No	Putative	uncharacterized
<b>000.1</b>				Conserved		genes
				Domain		
<b>Phvul.007G278</b>	<sup>150</sup>	calmodulin-like	Motif	EFh superfamily	Predicted:	Calcium
<b>900.1</b>		11	D/F/G		calmodulin-like	signaling
					protein 8 [Vigna	(Liu et
					radiata var.	al., 2003;
					radiata]	Al-Quara
						an et al.,
						2010)
<b>Phvul.007G219</b>	<sup>96</sup>	SAUR-like	N/A	Auxin_inducible	Predicted:	
<b>700.1</b>		auxin-responsiv		superfamily	auxin-induced	
		e protein family			protein	
					X15-like	
					[Glycine max]	
<b>Phvul.001G037</b>	<sup>119</sup>	Domain	of	N/A	DUF3511	uncharacterized
<b>600.1</b>		unknown			superfamily	genes
		function				
		(DUF3511)				

<b>Phvul.001G138</b> <sup>67</sup>	N/A	N/A	No	Putative	uncharacterized	
<b>800.1</b>			Conserved		genes	
			Domain			
<b>Phvul.001G167</b> <sup>127</sup>	RmlC-like	N/A	Cupin_3/Cupin_li		RmlC-like	
<b>300.1</b>	cupins		ke superfamily		cupins	
	superfamily				superfamily	
	protein				protein	
<b>Phvul.001G155</b> <sup>148</sup>	calmodulin-like	Motif	EFh superfamily		Predicted:	Calcium
<b>400.1</b>	11	D/F/G			calmodulin-3-li	signaling
					ke [Vigna	(Liu et
					radiata	var. al., 2003;
					radiata]	Al-Quara
						an et al.,
						2010)
<b>Phvul.001G249</b> <sup>67</sup>	N/A	N/A	No	Putative	uncharacterized	
<b>500.1</b>			Conserved		genes	
			Domain			
<b>Phvul.001G260</b> <sup>84</sup>	N/A	N/A	No	Putative	uncharacteriz	Cell
<b>700.1</b>			Conserved		ed genes/	proliferati
			Domain		F-box	on
					domain,	
					cyclin-like	
					protein	

						[Cynara carduncul us var. scolymus]
<b>Phvul.006G173</b> <b>000.1</b>	<sup>93</sup> N/A	N/A	No Conserved Domain	Putative	uncharacterized genes	
<b>Phvul.006G165</b> <b>800.1</b>	<sup>127</sup> jasmonate-zim- domain protein 8	N/A	tify_superfamily / CCT_2 superfamily	Predicted:	protein TIFY 5A-like [Vigna radiata var. radiata]	
<b>Phvul.006G043</b> <b>100.1</b>	<sup>94</sup> N/A	N/A	No Conserved Domain	Putative	uncharacterized genes	
<b>Phvul.006G115</b> <b>900.1</b>	<sup>143</sup> cytochrome B5 isoform E	N/A	Cyt-b5 superfamily		cytochrome b5-like [Vigna angularis]	
<b>Phvul.002G009</b> <b>700.1</b>	<sup>132</sup> VQ motif-containin g protein	N/A	VQ superfamily	Predicted:	VQ-motif containing protein 29-like	

						[Vigna angularis[Vigna radiata]
<b>Phvul.002G062</b>	<sup>56</sup>	N/A	N/A	DUF4534		uncharacterized
<b>300.1</b>				superfamily		genes
<b>Phvul.002G235</b>	<sup>73</sup>	N/A	N/A	DUF761		uncharacterized
<b>100.1</b>				superfamily		genes
<b>Phvul.002G036</b>	<sup>113</sup>	cytochrome c-2	N/A	Cytochrom_C		Cytochrome c
<b>100.1</b>				superfamily		[Cajanus cajan][Medicag o truncatula]
<b>Phvul.002G159</b>	<sup>99</sup>	SPIRAL1-like2	Motif E	No	Putative	Predicted:
<b>400.1</b>				Conserved		protein
				Domain		SPIRAL-like 5
						[Vigna angularis]
<b>Phvul.002G159</b>	<sup>99</sup>	SPIRAL1-like2	Motif E	No	Putative	Predicted:
<b>400.2</b>				Conserved		protein
				Domain		SPIRAL-like 5
						[Vigna angularis]

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

*P. vulgaris* genotipo silvestre, *P. acutifolius* genotipo silvestre y *V. unguiculata* IPA206, mejores fijadores de nitrógeno ante estrés por calor

*P. vulgaris* silvestre mostró ser más tolerante al estrés por calor al mantener la actividad de fijación de nitrógeno a pesar de la alta temperatura sostenida durante 6 h, mientras que el genotipo sensible BAT93 redujo su nivel de fijación de nitrógeno. En *P. acutifolius* y *V. unguiculata* la diferencia en actividad específica de reducción de acetileno no fue significativa, lo cual nos indica que también tienen un mejor desempeño en la fijación de nitrógeno en condiciones de estrés por calor, sin embargo consideramos que sería importante realizar más réplicas para corroborarlo. Es importante caracterizar las diferencias en el desarrollo de nódulos entre los genotipos empleados, ya que varían considerablemente el tamaño, la posición y distribución en la raíz de los nódulos entre los diferentes genotipos de *P. vulgaris*, *P. acutifolius* y *V. unguiculata*, así como las características de sus raíces y las diferentes especies de *Rhizobium* o *Bradirhizobium* que les nodulan. Tras este proceso experimental, observamos que hay pocas descripciones técnicas que resalten estas diferencias, y podría ser información importante para comprender tanto las condiciones de suelo y clima en las que pueden desarrollarse, fijar nitrógeno y producir semilla con un mejor rendimiento.

Un porcentaje de los genes diferencialmente expresados compartidos entre BAT93 genotipo sensible y *P. vulgaris* silvestre genotipo tolerante a calor están relacionados con los procesos de fijación de nitrógeno y estrés, por ejemplo la familia de chaperonas Hsp70, sus co-chaperonas y otras proteínas asociadas a plegamiento como calnexina, calreticulina y la proteína disulfuro isomerasa. Si bien han sido ampliamente estudiadas en diversas especies ante estrés por calor, es importante analizar la forma en que conectan diversas vías metabólicas en el desarrollo y actividad del nódulo –tales como las mencionadas en relación con la UPR en el primer capítulo de la tesis– de *P. vulgaris*

para entender el impacto que tiene en el rendimiento del proceso de fijación de nitrógeno. A partir de estos resultados, continuaremos el análisis de la clasificación ontológica de estos genes diferencialmente expresados (tanto los que incrementan como los que disminuyen su expresión) para identificar otras rutas metabólicas importantes en la respuesta a calor asociadas al nódulo y su proceso de fijación de nitrógeno. Los datos de los transcriptomas se encontrarán disponibles en los siguientes meses en la base de datos pública Gene Expression Omnibus (Edgar *et al.*, 2002) de NCBI, con lo cual contribuimos a la disponibilidad de información de la expresión de genes en *P. vulgaris*, particularmente en sus nódulos simbióticos, lo cual permite a la comunidad profundizar en su estudio bioinformático y experimental, así como mejorar la anotación de sus transcritos.

### Los sORFs diferencialmente expresados en respuesta a estrés por calor en los nódulos de *P. vulgaris* son candidatos potenciales para identificar su función a través de estudios de genómica funcional

Con respecto al análisis de expresión diferencial de los sORFs, los pequeños marcos de lectura han cobrado importancia en diversos procesos de las plantas (Feng *et al.* 2023) y con estos resultados aportamos información a estudios previos que nos muestran que en las interacciones leguminosa - rhizobia son relevantes (Guillen *et al.* 2013), así como en procesos de respuesta a estrés (Batut *et al.* 2011; Hanada *et al.* 2012; Marmioli and Maestri, 2014). De la publicación de nuestro artículo a la fecha, se han incrementado los sORFs reportados en las diversas bases de datos, siendo un campo con muchas áreas de oportunidad experimental y bioinformática para identificar posibles funciones y características de estos. En este trabajo, apoyados con la tecnología de RNA-seq aportamos información acerca de cambios relevantes en la expresión génica de potenciales péptidos pequeños que se expresan diferencialmente en los nódulos de los dos genotipos mencionados de *P. vulgaris*, nodulados por la

bacteria *R. tropici* CIAT899, una bacteria que también se ha reportado resistente a calor en condiciones de estrés prolongado (Martínez-Romero *et al.* 1991).

Posteriormente al envío a revisión del artículo publicado (Zayas-Del Moral *et al.*, 2021) se han presentado nuevas bases de datos y estrategias para la identificación de potenciales sORFs. Particularmente en plantas, existe la base de datos PsORF [<http://psorf.whu.edu.cn/>] y nuevas técnicas como Ribo-Seq, la secuenciación de sitios protegidos por el ribosoma, que dan indicios de zonas donde hay mayor traducción de mRNAs. Actualmente, con el avance de su estudio tanto en plantas como en animales y levaduras, existen nuevas clasificaciones de sORFs de acuerdo a su localización en el mRNA: uORF (upstream), dORF (downstream), lncRNA-sORFs (en long non coding RNAs), y sORFs intergénicos. El estudio de sus potenciales funciones ha cobrado interés, se propone que pueden participar como reguladores de la traducción de otros marcos de lectura o de la abundancia de miRNAs (revisado por Feng *et al.*, 2023). Esto ha llevado a nuevos panoramas de regulación traduccional, lo cual nos invita a retomar los potenciales sORFs identificados en este estudio para un análisis comparativo de acuerdo a las nuevas clasificaciones, y a realizar análisis de genómica funcional que nos permitan saber más sobre su papel tanto en la nodulación como en la respuesta a estrés por calor. La funcionalidad de estos péptidos pequeños es un campo aún muy poco explorado experimentalmente, por lo que es un área de oportunidad interesante para dar continuidad a este proyecto.

## PERSPECTIVAS

### Genómica funcional a partir de los genes diferencialmente expresados

A partir de los resultados de expresión diferencial obtenidos, queda abierta la posibilidad de continuar el análisis de los candidatos identificados a través de genómica funcional, tanto para identificar las principales vías metabólicas que inducen o reprimen

su respuesta, como para probar algunos candidatos clave en mantener el nivel de fijación de nitrógeno en los genotipos que no presentaron cambios a pesar del estrés por calor. Si bien en el planteamiento original del proyecto ante la IAEA, descrito en los objetivos de este capítulo de la tesis, se propuso que estos experimentos fueran parte del proyecto, el proceso de selección de genotipos de frijol, la identificación de bacterias simbiotes para cada genotipo con buena eficiencia en nodulación, así como las pruebas de estrés por calor que realizamos con los diferentes genotipos y especies tomaron una parte considerable del tiempo con el que contábamos para el proyecto, en adición al tiempo de espera de los resultados de secuenciación y su análisis. Se proyecta una siguiente publicación con un análisis bioinformático más amplio respecto a las funciones de los genes expresados diferencialmente.

### Análisis del rendimiento y calidad en la producción de semilla de los genotipos tolerantes

Por otra parte, en términos de conocer mejor el rendimiento a nivel de la producción de las semillas de un frijol que ha sido sometido a estrés por calor, sería importante repetir el experimento y dejar un mayor número de plantas en recuperación hasta la producción de semilla para validar la diferencia en dicha producción, posterior a un panorama de 6 horas de estrés por calor. BAT93 redujo considerablemente su producción, sin embargo es importante contar con más réplicas para todos los genotipos analizados para validar estas diferencias, e incluso, analizar la calidad y viabilidad de las semillas producidas.

## BIBLIOGRAFÍA

Aguila YF, De J, Martín CV, Morales SR, and Arredondo I (2014) Caracterización de tres nuevas variedades de *Vigna unguiculata* (“IPA 206” e “IPA 207” y “GUARIBA”) en Cuba (2014) 41(2):65-69

Alves MS, Reis PAB, Dadalto SP, Faria JAQA, Fontes EPB, and Fieto LG (2011) A novel transcription factor, ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15), connects endoplasmic reticulum stress with an osmotic stress-induced cell death signal. JBC. 286(22):20020-20030

Andrés JA, Rovera M, Guiñazú LB, Pastor NA y Rosas SB (2012) Interactions between legumes and rhizobia under stress conditions. Springer Bacteria in Agrobiolology: Stress Management. Springer. Capítulo 5: 77-94

Angelos E, Ruberti C, Kim SJ, and Brandizzi F (2017) Maintaining the Factory: the roles of the unfolded protein response in celular homeostasis in plants. The Plant Journal. 90:671-682

Appleby CA (1984) Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. Annual Review of Plant Physiology. 35:443-478

Appleby CA (1992) The origin and functions of haemoglobin in plants. Science progress. 76(3/4):365-398

Arraño-Salinas P, domínguez-Figueroa J, Herrera Vásquez A, Zavala D, Medina J, Vicente-Carbajosa J, Meneses C, Canessa P, Moreno AA and Blanco-Herrera F (2018) WRKY7, -11 and -17 transcription factors are modulators of the bZIP28 branch of the unfolded protein response during PAMP-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana*. Plant Science. 277:242-250

Auer, P.L., and Deorge R.W. Statistical Design and Analysis of RNA Sequencing Data. Genetics. 2010. 185:405-416

Bao Y, and Howell SH. (2017) The Unfolded Protein Response Supports Plant Development and Defense as well as Responses to Abiotic Stress. Frontiers in Plant Science. 8:Art.344

Baxter and Kirk. Base composition of DNA from chloroplasts and nuclei of *Phaseolus vulgaris*. 1969. Nature 222:272-273

Bennett MD and Leitch IJ Nuclear DNA amounts in angiosperms: progress, problems and prospects. 2005. *Annals of Botany*. 95:45-90

Bernales S, Papa FR, and Walter P. (2006). Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22: 487-508

Boston, R.S., Viitanen, P.V., Vierling, E. Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology*. 1996. 32: 191-222

Broughton and Dilworth. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. 1971. *Biochem J.* 125:1075-1080

Bullard, J.H., Purdom, E., Hansen, K.D., and Dudoit, S. (2010) Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. *BMC Bioinformatics*, 11:94

Catalano CM, Lane WS, Sherrier DJ. Biochemical characterization of symbiosome membrane proteins from *Medicago truncatula* root nodules. *Electrophoresis*. 2004. 25: 519-531

Cermola M, Fedorova E, Taté, R., Riccio, A., Favre, R., Patriarca, E.J. Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli*- *Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 2000. 13(7): 733-741

Chae HJ, Kim HR, Xu C, Bailly-Maitre B, Krajewska M, Krajewski S, Banares S, Cui J, Digicaylioglu M, Ke N, Kitada S, Monosov E, Thomas M, Kress CL, Babendure JR, Tsien RY, Lipton SA, and Reed JC (2004) BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. *Molecular Cell* 15:355-366

Chen Y and Brandizzi F (2012) AtIRE1A/AtIRE1B and AGB independently control two essential unfolded protein response pathways in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 69:266-277

Chung LM, Ferguson JP, Zheng W, Qian F, Bruno V, Montgomery RR, Zhao H (2013) Differential expression analysis for paired RNA-seq data. *BMC Bioinformatics*. 14:110

Clarke VC, Loughlin PC, Day DA, and Smit PMC (2014) Transport processes of the legume symbiosome membrane. *Front. In Plant Science*. 5(699)

Deng Y, Humbert S, Liu J-X, Srivastava R, Steven J, Rothstein SJ, and Howell SH (2011) Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the

unfolded protein response in Arabidopsis, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 108:7247-7252.

Dunn, MF (2014) Key roles of microsymbiont amino acid metabolism in rhizobia-legume interactions. Critical Reviews in Microbiology. 41(4): 411-451

Edgar R, Domrachev M, Lash AE (2002) Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. Nucleic Acids Res. 30: 207-210.

Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares JE, Díaz-Camino C, Santana O, Murillo E, Guillén G, Sánchez-Guevara N, Acosta J, Quinto C, Li D, Gresshoff PM, and Sanchez F (2006) Agrobacterium rhizogenes transformation of the Phaseolus spp.: a tool for functional genomics. Molecular Plant-Microbe Interactions. 19(12): 1385-1393

Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares JE, Guillén G., Díaz-Camino C, Campos F, Quinto C, Gresshoff PM, and Sanchez F (2007) Fast, efficient and reproducible genetic transformation of Phaseolus spp. by Agrobacterium rhizogenes. Nature protocols. 2: 1819-1824

Estrada-Navarrete G, Cruz-Mireles N, Lascano R, Alvarado-Affantranger X, Hernández-Barrera A, Barraza A, Olivares JE, Arthikala MK, Cárdenas L, Quinto C, and Sanchez F (2016) An autophagy related kinase is essential for the symbiotic relationship between *Phaseolus vulgaris* and both rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Cell. 28(9):2326-2341

Feng Y, Jiang M, Yu W, and Zhou J (2023) Identification of short open reading frames in plant genomes. Front. Plant Sci. 14:1094715.

Fernández-Bautista N, Fernandez-Calvino L, Muñoz A, and Castellano MM. (2017) HOP3, a member of the HOP family in Arabidopsis, interacts with BiP and plays a major role in the ER stress response. Plant, Cell and Environment. Doi: 10.1111/pce.12927

Fernandez-Luqueño F, Dendooven L, Munive A, Corlay-Chee L, Serrano-Covarrubias LM, Espinosa-Victoria D (2008) Micro-morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodules undergoing senescence. Acta Physiol. Planta. 30:545-552

Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin MH, Lin YH, Reid DE, and Gresshoff PM (2010) Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. Journal of Integrative Plant Biology. 52: 61-76

Glick, B.S. (1995) Can Hsp70 proteins act as force generating motors?. Cell. 80:11-14

González de Mejía E, Martínez-Resendiz V, Castaño-Tostado E, Loarca-Piña G (2003) Effect of drought on polyamine metabolism, yield, protein content and in vitro protein digestibility in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*) bean seeds. J. Sci. Food Agric. 83:1022-1030

Guillén G, Díaz-Camino C, Loyola-Torres CA, Aparicio-Fabre R, Hernández-López A, Díaz Sánchez M, and Sanchez F. (2013) Detailed analysis of putative genes encoding small proteins in legume genomes. Front. in Plant Sci. 4(208)

Hasler J, Cao SS and Kaufman RJ. (2012) IRE1, a double-edged sword in pre-miRNA slicing and cell death. Developmental Cell. 23:921-923

Hingorani KS, and Gierasch LM (2014) Comparing protein folding *in vitro* and *in vivo*: foldability meets the fitness challenge. 24:81-90

Hossain MA, Henríquez-Valencia C, Gómez-Páez M, Medina J, Orellana A, Vicente-Carbajosa J, and Zouhar J (2016) Identification of novel components of the unfolded protein response in Arabidopsis. Front. Plant Sci. 7:650

Howell SH (2017) When is the unfolded protein response not the unfolded protein response? Plant Science 260:139-143

Howell SH (2013) ER stress responses in plants. Annu. Rev. of Plant Biol. 64:477-499

Islas-Flores T, Guillén G, Alvarado-Affantranger X, Lara-Flores M, Sánchez F, y Villanueva MA (2011) PvRACK1 loss-of-function impairs cell expansion and morphogenesis in *Phaseolus vulgaris* L. root nodules. Mol Plant Microbe Int. 24:819-26

Iwata Y, Sakiyama M, Lee MH, and Koizumi N (2010) Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* to tunicamycin induced endoplasmic reticulum stress. Plant Biotechnology. 27:161-171

Iwata Y, and Koizumu N (2012) Plant transducers of the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Trends Plant Science. 17:720-727

Ju et al. (2005) The potato virus X TGBp2 movement protein associates with endoplasmic reticulum derived vesicles during virus infection. *Plant Physiology*. 138: 1877-1895

Khaminets, A. et al. (2015) Regulation of endoplasmic reticulum turnover by selective autophagy. *Nature*. 522: 354–358

Koizumi N, Martinez IM, Kimata Y, Kohno K, Sano H, and Chrispeels MJ. (2001) Molecular characterization of two *Arabidopsis* ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases. *Plant Physiology* 127: 949-962

Lee KP, Dey M, Deculai D, Cao C, Dever TE, and Scicheri F (2008) Structure of the dual enzyme Ire1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing. *Cell* 132(1):89-100

Li et al. (2008) The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death and Differentiation*. 15: 1460-1471

Li et al. (2010) Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering. *PNAS* 107(37):16113-16118

Li et al. (2012) ZmbZIP60 mRNA is spliced in maize in response to ER stress. *BMC Research Notes*. 5:144

Lin, B.-L., Wang, J.-S., Liu, H.-C., Chen, R.-W., Meyer, Y., Barakat, A., Delseny, M. (2001) Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress & Chaperones*. 6(3): 201-208

Lin et al. (2007) IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* 318: 944-949

Lisbona F, Rojas-Rivera D, Thielen P, Zamorano S, Todd D, Martinon F, Galvic A, Kress C, Lin JH, Walter P, Reed JC, Glimcher LH, and Hetz C. (2009) Bax inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1a. *Molecular Cell* 33:679-691

Liu JX, Srivastava R, Che P, and Howell SH. (2007) An endoplasmic reticulum stress response in *Arabidopsis* is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28. *Plant Cell* 19(12):4111-4119

Liu and Howell. (2010) bZIP28 and NF-Y transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 22:1-13

Manghwar H and Li J (2022) Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response signaling in plant. *International Journal of Molecular Sciences*. 23, 828

Martínez-Romero E, Segovia L, Martins Mercante F, Franco AA, Graham P, and Pardo MA. (1991) *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. Beans and *Leucaena* sp. Trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 41(3):417-426

Martínez and Chrispeels. (2003) Genomic analysis of the unfolded protein response in *Arabidopsis* shows its connection to important cellular processes. *Plant Cell* 15:561-576

McCarthy FM, Wang N, Magee GB, Nanduri B, Lawrence ML, Camon EB, ... Burgess SC (2006) *AgBase*: a functional genomics resource for agriculture. *BMC Genomics*. 7:229

Mishiba K et al. (2013) Defects in IRE1 enhance cell death and fail to degrade mRNAs encoding secretory pathway proteins in the *Arabidopsis* unfolded protein response. *PNAS*. 110(14):5713-5718

Mitou G, Budak H, and Gozuacik D (2009) Techniques to study autophagy in plants. *Int. Journal of Plant Genomics* 2009:ID 451357

Montiel J, Nava N, Cárdenas L, Sánchez-López R, Kumar Arthikala M, Santana O, Sanchez F y Quinto C (2012) A *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene is required for root infection by *Rhizobia*. *Plant Cell Physiology* 53:1751-1767

Moreno AA, and Orellana A (2011) The physiological role of the unfolded protein response in plants. *Biol. Res*. 44:75-80

Moreno AA, Mukhtar MS, Blanco F, Boatwright JL, Moreno I, Jordan MR, Chen Y, Brandizzi F, Dong X, Orellana A, and Pajeroska-Mukhtar KM. (2012) IRE1/bZIP-mediated unfolded protein response plays distinct roles in plant immunity and abiotic stress responses. *PLoS ONE*. 7(2):e31944

Morrison Baird L, Webster BD (1982) Morphogenesis of Effective and Ineffective Root Nodules in *Phaseolus vulgaris* L. *Botanical gazette*. 143(1): 41-51

Nagashima et al. (2011) *Arabidopsis* IRE1 catalyses unconventional splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor. *Nature Scientific Reports* 1:29

Noh et al. (2002) Characterization of two homologs of Ire1p, a kinase/endoribonuclease in yeast, in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Acta* 1575:130-134

Oikawa et al. (2007) Site-specific cleavage of CD59 mRNA by endoplasmic reticulum-localized ribonuclease, IRE1. *Biochem. and Biophys. Res. Com.* 36:122-127

Oshlack A, Robinson M, and Young M (2010) From RNA-seq reads to differential expression results. *Genome biology.* 11:220

O'Rourke JA, Yang SS, Miller SS, Bucciarelli B, Liu J, Rydeen A, Bozsoki Z, Uhde-Stone C, Tu ZJ, Allan D, Gronwald JW, Vance CP (2013) An RNA-Seq transcriptome analysis of orthophosphate-deficient white lupin reveals novel insights into phosphorus acclimation in plants. *Plant Physiol.* 161: 705-724.

O'Rourke JA, Iniguez LP, Fu F, Bucciarelli B, Miller SS, Jackson SA et al. (2014) An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. *BMC Genomics.* 15:866.

Panter S et al. (2000) Identification with proteomics of novel proteins associated with the peribacteroid membrane of soybean root nodules. *MPMI.* 13(3):325-333

Peláez P, Trejo MS, Iñiguez LP, Estrada-Navarrete G, Covarrubias AA, Reyes JL, and Sanchez F (2012) Identification and characterization of microRNAs in *Phaseolus vulgaris* by high-throughput sequencing. *BMC Genomics,* 13(1):1–18.

Perrine-Walker FM, Kouchi H and Ridge RW (2014) Endoplasmic reticulum-targeted GFP reveals ER remodeling in *Mesorhizobium*-treated *Lotus japonicus* root hairs during root hair curling and infection thread formation. *Protoplasma* 251(4):817-826

Philippot, L. and J. C. Germon. (2005). Contribution of bacteria to initial input and cycling of nitrogen in soils. pp. 159-176. In: F. Buscot and A. Varma (eds.). *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions.* Soil Biology. Springer-Verlag. Heidelberg, Germany

Pompa A, and Vitale A (2006) Retention of a bean phaseolin/maize alpha-zein fusion in the endoplasmic reticulum depends on disulfide bond formation. *The Plant Cell.* 18:2608-2621

Popp C, Ott T (2011) Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology.* 14(4):458-467

Prell J et al. (2009) Legumes regulate *Rhizobium* bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids. PNAS. 106(30):12477-12482. (auxotrofia)

Ramírez M, Graham M A, Blanco-López L, Silvente S, Medrano-Soto A, Blair MW, Hernández G., Vance CP, and Lara M. Sequencing and analysis of common bean ESTs: Building a foundation for functional genomics. Plant Physiol. 2005. 137:1211-1227

Rendón-Anaya M, Montero-Vargas JM, Saburido-Álvarez S, Vlasova A, Capella-Gutierrez S, Ordaz-Ortiz JJ, Aguilar OM, Vianello-Brondani RP, Santa M, Delaye L, Gabaldón T, Gepts P, Winkler R, Guigó R, Delgado-Salinas A, and Herrera-Estrella A. Genomic history of the origin and domestication of common bean unveils its closest sister species. Genome Biology (2017) 18:60 (DOMESTICACIÓN)

Rodríguez-López J, Hernández A, Estrada-Navarrete G, Sánchez F, and Díaz-Camino C (2019) The noncanonical heat shock protein *PvNod22* is essential for infection thread progression during rhizobial endosymbiosis in common bean. MPMI 32(8): 939-948

Ron D, and Walter P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Nature Review Molecular Cell Biology 8:519-529

Sabate R, de Groot NS, Ventura S (2010) Protein folding and aggregation in bacteria. Cellular and Molecular Life Sciences. 67:2695-2715

Servín-Garcidueñas LE, Rogel MA, Ormeño-Orillo E, Zayas-del Moral A, Sánchez F, Martínez-Romero E. (2016) Complete genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. Strain CCGE-LA001, isolated from field nodules of the enigmatic wild bean *Phaseolus microcarpus*. Genome Announcements ASM. 4(2) e00126-16

Servín-Garcidueñas LE, Zayas-del Moral A, Ormeño-Orrillo E, Rogel MA, Delgado-Salinas A, Sanchez F, Martinez-Romero E. Symbiont shift towards *Rhizobium* nodulation in a group of phylogenetically related *Phaseolus* species *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2014. 79, 1-11.

Schmutz J, McClean PE, Mamidi S, Wu GA, Cannon SB, Grimwood J, Jenkins J, Shu S, Song Q, Chavarro C, Torres-Torres M, Geffroy V, Mafi Moghaddam S, Gao D, Abernathy B, Barry K, Blair M, Brick MA, Jia G, Kelly JD, Kudrna D, Lee R, Richard MMS, Miklas PN, Osorno JM, Rodrigues J, Thareau V, Urea CA, Wang M, Yu Y, Zhang M, Wing RA, Cregan PB, Rokhsar DS, and Jackson SA. (2014) A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. Nature Genetics. 46(7):707-713

Simões-Araújo JL, Rodríguez RL, Gerhardt LB de A, Mondego JMC, Alves-Ferreira, M, Gouvêa Rumjanek N, and Margis-Pinheiro M. Identification of differentially expressed genes

by cDNA-AFLP technique during heat stress in cowpea nodules. FEBS letters. 2002. 515:44-50

Simões-Araújo JL, Gouvêa Rujanek N, and Margis-Pinheiro M. Small heat shock proteins genes are differentially expressed in distinct varieties of common bean. Braz. J. Plant Physiol. 2003. 15:33-41

Skot L (2003) Genetic modification applications | Nitrogen fixation. Encyclopedia of Applied Plant Sciences. 413-419

Sprent JI, Ardley J, and James EK (2017) Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. New Phytologist. 215:40-56

Srivastava R, Li Z, Russo G, Tang J, Bi R, Muppirala U, Chudalayandi S, Severin A, He M, Vaitkevicius SI, Lawrence-Dill CJ, Liu P, Stapleton Ann E, Bassham DC, Brandizzi F, Howell SH (2018) Response to persistent ER stress in plants: a multiphasic process that transitions cells from pro-survival activities to cell death. Plant Cell. 30:1220-1242

Stefano G, Renna L, and Brandizzi F (2014) The endoplasmic reticulum exerts control over organelle streaming during cell expansion. Journal of Cell Science. 127:947-953

Tateda C, Ozaki R, Onodera Y, Takahashi Y, Yamaguchi K, Berberich T, Koizumi N, Kusano T (2008) NtbZIP60, an endoplasmic reticulum-localized transcription factor, plays a role in the defense response against bacterial pathogens in *Nicotiana tabacum*. J Plant Res 121: 603-611

Upton JP, Wang L, Han D, Wang ES, Huskey NE, Lim L, Truitt M, McManus MT, Ruggero D, Goga A, Papa FR, and Oakes SA (2012) IRE1a cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. Science. 338(6108):818-22

Valente MA, Faria JA, Soares-Ramos JR, Reis PA, Pinheiro GL, Piovesan ND, Morais AT, Menezes CC, Cano MA, Fietto LG, Loureiro ME, Aragao FJ, Fontes EP. (2009) The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. Journal of Experimental Botany 60(2):553-546

Velazquez JM, Lindquist S. (1984) hsp70: nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. Cell. 36(3):655-62

Verdoy D, Lucas MM, Manrique E, Covarrubias AA, De Felipe MR and Pueyo JJ. Differential organ-specific response to salt stress and water deficit in nodulated bean (*Phaseolus vulgaris*). Plant, Cell and Environment. 2004. 27:757-767

Vitale A, Boston RS (2008) Endoplasmic reticulum quality control and the unfolded protein response: insights from plants. *Traffic* 9:1581-1588

Vlasova A, Capella-Gutierrez S, Rendón-Anaya M, Hernández-Oñate M, Mionoche AE, Erb I, Câmara F, Prieto-Barja P, Corvelo A, Sanseverino W, Westergaard G, Dohm JC, Pappas Jr GJ, Saburido-Alvarez S, Kedra D, Gonzalez I, Cozzuto L, Gómez-Garrido J, Aguilar-Morón M, Andre N, Aguilar OM, Garcia-Mas J, Zehnsdorf M, Vázquez MP, Deglado-Salinas A, Delaye L, Lowy E, Mentaberry A, Vianello-Brondani RP, García JL, Alioto T, Sánchez F, Himmelbauer H, Santalla M, Notredame C, Gabaldón T, Herrera-Estrella A and Guigo R. Genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. *Genome Biology*. 2016. 17:32

Williams et al. (2010) AtBAG7, an Arabidopsis Bcl-2-associated athanogene, resides in the endoplasmic reticulum and is involved in the unfolded protein response. *PNAS*. 107(13):6088-6093

Zayas-del Moral, A., Martínez-Reyes, D., Quinto, C., Sanchez, F., and Díaz-Camino, C. (2021). Identification of small open reading frames (sORFs) associated with heat tolerance in nitrogen-fixing root nodules of *Phaseolus vulgaris* wild-type and cv BAT93. CROP ADAPTATION TO CLIMATE CHANGE: High-Temperature Stress in Drought Prone Areas FAO/IAEA Co-ordinated Research Project on Climate Proofing Crops: Genetic Improvement for Adaptation to High Temperature in Drought-Prone Areas and, 28.

Zeng Y, Li B, Zhang W, and Jiang L (2019) ER-phagy and ER stress response (ERSR) in plants. *Front. Plant Sci.* 10:1192

Zhang SS, Yang H, Ding L, Song ZT, Ma H, Chang F, and Liu JX (2017) Tissue-specific transcriptomics reveals an important role of the unfolded protein response in maintaining fertility upon heat stress in Arabidopsis. *Plant Cell Advance*. Doi:10.1105/tpc.16.00916

Zhang X, Han L, Wang Q, Zhang C, Yu Y, Tian J and Kong Z. The host actin cytoskeleton channels rhizobia release and facilitates symbiosome accommodation during nodulation in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* (2018) 221(2):1049-1059

## Abreviaturas

BiP: Binding protein/Binding immunoglobulin protein

bZIP60: leucine zipper transcription factor 60

bZIP60s: leucine zipper transcription factor 60 spliced

bZIP60u: leucine zipper transcription factor 60 unspliced

CNX 1-like: calnexine 1-like

CRT: calreticulin

dpi: días post inoculación

ERAD: endoplasmic reticulum associated degradation

ERSE: endoplasmic reticulum stress elements

IRE1: Inositol requiring enzyme 1

RE : retículo endoplásmico

PDI: protein disulfide isomerase

RIDD: decaimiento de mRNA dependiente de IRE1

UPR: Unfolded Protein Response

UPRE: elementos de la respuesta a proteínas mal plegadas

## Anexos

Al final de esta tesis se encuentra anexo el artículo publicado:

Zayas-del Moral, A., Martínez-Reyes, D., Quinto, C., Sanchez, F., and Díaz-Camino, C. (2021). Identification of small open reading frames (sORFs) associated with heat tolerance in nitrogen-fixing root nodules of *Phaseolus vulgaris* wild-type and cv BAT93. CROP ADAPTATION TO CLIMATE CHANGE: High-Temperature Stress in Drought Prone Areas FAO/IAEA Co-ordinated Research Project on Climate Proofing Crops: Genetic Improvement for Adaptation to High Temperature in Drought-Prone Areas and, 28

### III. Divulgación y Docencia

Esta tesis estaría incompleta si dejara fuera dos actividades que considero fueron fundamentales en mi proceso de formación y que son parte de la labor científica: la divulgación y la docencia. Estas dos actividades son fundamentales en la labor y desarrollo de un científico. Particularmente en la época y país que vivimos, México, es básico fomentar el interés por la ciencia en la sociedad en general, en niños y jóvenes principalmente, si deseamos que la innovación, ciencia y tecnología evolucionen a los niveles deseables para un país en desarrollo. En este espacio comparto los principales productos.

#### A) Docencia

Al comenzar el Doctorado, mi gran interés por participar en actividades de comunicación de la ciencia me llevaron a participar como tallerista del 2011 a la fecha en el Programa Adopte Un Talento AC ([www.pauta.org.mx](http://www.pauta.org.mx)), el cual se enfoca en el desarrollo de aptitudes, actitudes y habilidades necesarias para desarrollar un proyecto científico —(y útiles en general para un pensamiento crítico en la vida) —. En este programa tuve la oportunidad de recibir una excelente capacitación por parte de un equipo de científicos y pedagogos para impartir talleres. Esta formación fue esencial para mi desarrollo en ciencias, un constante aprendizaje de técnicas y una nueva manera de ver mis proyectos de tesis, descubrí que no es lo mismo hacer ciencia, que participar en su enseñanza.

En este tiempo tuve la oportunidad de impartir talleres a estudiantes de primaria (1o. a 6o.) detectados con aptitudes sobresalientes por el Instituto de Educación Básica del Estado de Morelos (IEBEM) en Cuernavaca y Jonacatepec, a estudiantes de primaria y secundaria en Cuernavaca, Oacalco, Tepoztlán y Cuautla, a profesores de Secundarias Generales y Técnicas de todo el estado de Morelos, y participé también como mentora de proyectos de investigación de estudiantes de Secundaria y Bachillerato, esto último con apoyo del laboratorio del Dr. Federico Sánchez y la MIBB. Carmen Quinto.

Por otra parte, participé como docente durante dos años en la Normal Superior del Estado de Morelos, impartiendo las materias de Tecnología y didáctica de las matemáticas; Funciones y Plano Cartesiano, Los números y sus relaciones y Manejo y presentación de la información. El

acercamiento a quienes se están formando como docentes me hizo abrir los ojos a una realidad poco deseable: no hay canales suficientes para vincular la ciencia con quienes se encargan de su enseñanza. Sin duda debemos fomentar actividades para llegar a ellos.

Por último, y buscando estrategias para entender mejor cómo conectar a los docentes de educación básica, media y media superior, actualmente, imparto clases en secundaria y bachillerato, conociendo desde adentro los esquemas de enseñanza de la ciencia y el impacto en sus modificaciones de planes de estudio, poniendo en práctica lo aprendido con PAUTA, interactuando con otros profesores de ciencias, aprendiendo y transmitiendo todo lo aprendido en estos años.

Enlistar los talleres y clases que impartí se resume en poco espacio, pero sin duda con las enseñanzas que he obtenido de este proceso podría escribir otra tesis. La mayor lección: hablar de la ciencia en la que trabajas es una cosa, pero conocer el contexto de una persona y ayudar a que descubra por sí misma que la ciencia está ahí, y ayudar a que se apropie de ella es un reto enorme, impactante y muy necesario. Deseo seguir colaborando en programas que fomenten la enseñanza de las ciencias desde la identificación y atención de problemáticas regionales y la capacitación docente.

## **B) Más Ciencia Por México**

La innovación, ciencia y tecnología no son un actor protagónico en la vida y desarrollo de México, es fácil saberlo al ver casi cualquier indicador socioeconómico, al ver la vida cotidiana de la mayoría de los mexicanos. Al egresar de la carrera esta idea brincaba entre un grupo de jóvenes egresados de la Licenciatura en Ciencias Genómicas que comenzábamos nuestro camino en el ámbito científico, todos por empezar un posgrado. Quedarse estático al respecto no era una opción. En el 2011, gestionamos un proyecto de divulgación que fue aprobado y financiado por el IMJUVE para constituirnos legalmente y ahí nació Más Ciencia Por México AC ([www.masciencia.org](http://www.masciencia.org)), una organización civil dedicada al fomento de la innovación, ciencia y tecnología en la vida de la sociedad mexicana. Nos constituimos legalmente en el 2012, trámite en el cual realicé personalmente parte importante de la gestoría notarial, ante el SAT,

SEDESOL y su registro en RENIECYT, trámites que sólo me confirmaron la gran necesidad de proyectos para conectar la labor científica con la sociedad ya que me cuestionaban qué beneficios sociales podía tener nuestra actividad. A partir de entonces en Más Ciencia hemos realizado actividades de divulgación: conferencias, talleres, cápsulas y programas de radio y televisión por internet, intervención en la elaboración de leyes, artículos periodísticos, textos de divulgación, concursos y exposiciones de fotografía y videos científicos, reuniones de grupos de mexicanos en el extranjero para generar lazos y dar proyección a su trabajo en México, así como la colaboración con agrupaciones a nivel nacional como la Academia de Ciencias de Morelos y a nivel internacional como la World Association of Young Scientists, perteneciente a la UNESCO. En este proyecto, además de participar en las actividades mencionadas, firmé el acta constitutiva como miembro fundador y representante legal hasta el presente año, y fungí como presidente de Más Ciencia en el período 2012-2014. Actualmente continúo como miembro activo de la asociación.

Sin duda ha sido una experiencia de constante aprendizaje, en la cual he adquirido habilidades de gestión de fondos, edición de audio y video, vinculación con otras instituciones y sectores sociales, diseño de proyectos, entre muchas otras, las cuales deseo seguir ejercitando.

Les comparto un video, muy relacionado con mis proyectos de tesis, que realizamos para el evento del Festival del guaje en Oaxtepec, lugar donde radico: <https://youtu.be/bCKKbQiCvQQ>

### **C) Libro: Un Mundo de Bacterias**

Como parte del Taller de Redacción impartido por el escritor Francisco Rebolledo y organizado por la Unidad de Vinculación del Campus Morelos de la UNAM, generamos como producto el libro de divulgación *Un mundo de bacterias*, el cual fue aceptado como una de mis actividades durante el PDCB. Anexo el archivo PDF en versión electrónica.

### **D) Obra de teatro El Romance de una Bacteria Benéfica y Una Planta**

En el 2014 y 2016 el Instituto de Biotecnología, UNAM organizó el evento “Día de Puertas Abiertas” en el que se convocó a los laboratorios a presentar sus temas de investigación a través de actividades de divulgación adecuadas para público de diferentes edades. Incentivados por el gran entusiasmo del Dr. Federico Sánchez diseñamos una obra de teatro en dos partes para explicar la relevancia de la fijación biológica de nitrógeno a lo largo de la

evolución a través de un teatro guiñol y la segunda con una representación actoral para explicar la interacción simbiótica entre la planta de frijol y las bacterias fijadoras de nitrógeno. El resultado, además de convertirse en un espacio para reforzar los lazos grupales, se convirtió en una oportunidad para dar a conocer este proceso tan importante y tan poco conocido por la población. La obra de teatro tuvo 8 funciones en el 1er. Día de Puertas Abiertas, 3 funciones en el 2º. día de Puertas Abiertas, presentaciones durante la Jornada Estatal de Innovación Ciencia y Tecnología del Estado de Morelos en el 2014 (2) y 2016 (1), y una más en la Feria de Ciencia, Arte y Tecnología del Colegio Morelos de Cuernavaca en el 2016, llegando así a un estimado de 700 personas. Así mismo, la compartimos a través de Youtube en donde hasta el día de hoy cuenta con un total de 428 visitas al 14 de septiembre de 2023 (<https://www.youtube.com/watch?v=MnXjzvAKj-g&t=8s>).

Esta fue una colaboración del grupo del Dr. Federico Sánchez la cual nos unió y puso en práctica las ideas y habilidades de todos. Consideramos que este producto de divulgación es útil a futuro para grupos que trabajan con el mismo tema o divulgadores, es por ello que deseo dejar el guión que elaboramos para cerrar este capítulo.

## **El Romance de una Bacteria Benéfica y Una Planta**

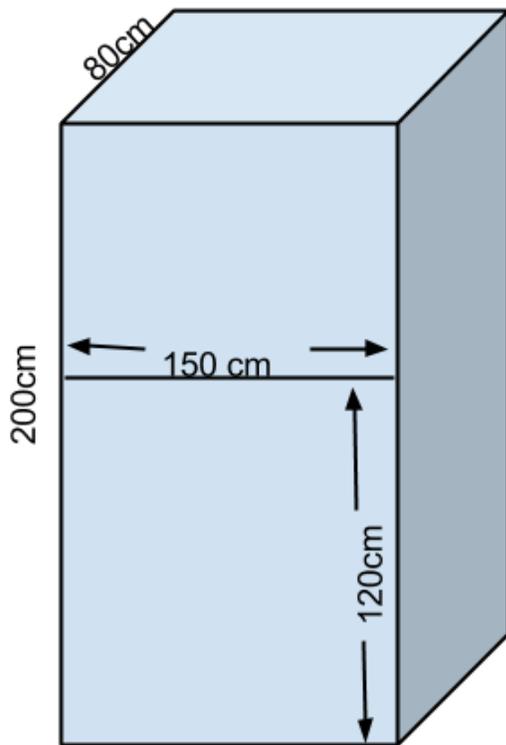
### **Participantes**

Federico Sánchez  
Claudia Díaz  
Georgina Estrada  
Juan Olivares  
Gabriel Guillén  
Claudia Dorantes  
Alejandrina Hernández  
Jonathan Rodríguez  
Alejandra Zayas  
Neftaly Cruz  
Lizeth Núñez  
Isabel Flores  
Ana Gómez  
Ezequiel López  
Octavio García  
Alexa García  
Montserrat Loredó  
Ciro Ramírez  
Damián Martínez

Ángel Zúñiga  
Doña Leo  
Don Raúl

### **Teatro Guiñol: Origen de la vida y origen de la fijación de N<sub>2</sub>**

1. Títere de Toño Lazcano, niño preguntón, bacteria
2. 4 personas tras el escenario para intercambiar los escenarios
3. Caja 2 m largo x 1.5m ancho (con boquete 1.5 x 80) x 2 m



Escenas:

1. Negro– explosión (Globo grande con papelitos dorados)-> planetas
2. Tierra – condiciones (mar, volcanes sopa primitiva))
4. Nitrógeno + hidrógeno = amonio(pizarrón)
5. fijación de nitrógeno – bacterias
6. *Rhizobium* – planta se reconocen, vive dentro de la planta y fija el N<sub>2</sub>, principio de la cadena trófica – Rey León.

### **El niño preguntón y la fijación del N<sub>2</sub>**

## 1. Fondo negro

**Fede:** ¡Bienvenidos al teatro de la Fijación Biológica del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Yo soy el Dr. Federico Sánchez y les contaré una historia fascinante que nos mantiene apasionados a muchos colegas en todo el mundo, y aquí también en el IBT. La vida en la Tierra existe gracias a dos procesos fundamentales: la Fotosíntesis y la Fijación Biológica del Nitrógeno. Éste es un proceso que comenzó en nuestro planeta hace millones de años y es por eso que he invitado a un amigo muuuuy especial, al que le encanta desentrañar cómo se generaron las primeras moléculas orgánicas en la tierra primigenia y particularmente de cómo pudo haberse originado la vida. Recibamos con un aplauso al Dr. Antonio Lazcano.

(Aplausos, entra Lazcano en nube de nitrógeno líquido)

(Entra niño preguntón)

**Niño preguntón:** ¡Ay noooo! ¡Es Toño Lazcano!!! ¡Soy su súper faaaaaan! Oiga Doc, y porque sale en Wikipedia?, ¡usted es bieeen chido!

**Fede:** A ver, a ver cálmate niño, y déjalo que nos explique algunas cosas muy importantes para que el público conozca nuestro trabajo.

**Toño:** Muchas gracias Federico. A ver amigos... ¿Ustedes saben cómo se originó la vida en nuestro planeta? (Pregunta al público) Qué bueno que dijeron que no, porque yo tampoco, y nadie lo sabe. Pues les platico: yo estudio el maravilloso tema de cómo surgieron las primeras moléculas que dieron lugar a que la vida ocurriera en este planeta. Para estudiarlo, hemos tenido que colaborar astrónomos, geólogos, paleontólogos, físicos, químicos y biólogos...

**Niño preguntón:** ¡Asuuu mecha! Entonces usted sabe ¿que fue primero? ¿el huevo o la gallina?

**Toño:** A ver niño, te explico todo desde el principio... (Escenografía Big Bang) Debemos entender que todo provino del origen del universo, cuando se formaron galaxias, las estrellas, los sistemas solares... La mayoría de los elementos de los cuales estamos hechos o que nos permiten vivir, son el famoso CHON el carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, entre muchos otros, y provinieron de las estrellas.

**Niño preguntón:** ¡Aaaaay!... ¿y entonces somos polvo de estrellas como dijo Carl Sagan? ¿Oiga doc y yo dónde tengo nitrógeno? Porque nomás no me lo veo.

**Toño:** En todos los seres que habitan este planeta, incluidos nosotros, el nitrógeno es usado para producir proteínas y ácidos nucleicos, que son los componentes esenciales de todas las células. Resulta indispensable el nitrógeno para vivir. Afortunadamente, es el elemento químico más abundante en la atmósfera.

**Niño preguntón:** Entonces doc, si el nitrógeno se encuentra en la atmósfera ¿significa que es un elemento gaseoso?

**Toño:** ¡Efectivamente! El nitrógeno molecular es un gas.

**Niño preguntón:** ¡Qué chiiiido! Entonces nomás si abro la boca y me trago el aire ya tengo nitrógeno en mi cuerpecito?

**Fede:** Noooo. Aunque el gas nitrógeno compone más del 70% de nuestra atmósfera, no puede ser asimilado por los seres vivos de esta forma.

**Niño preguntón:** A ver doc, barajémela más despacio! Entonces aunque hay un montón de nitrógeno en el aire, ¿así como está no nos sirve?

**Fede:** ¡Exacto! El nitrógeno debe ser “convertido” o fijado en moléculas que podamos asimilar como el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Y es aquí donde entran en acción los actores principales de nuestro trabajo, la fijación del nitrógeno, que ocurre entre las bacterias fijadoras del nitrógeno y las plantas leguminosas como son los garbanzos, las lentejas, los chícharos y los frijoles. (Algunos microorganismos pasan volando por atrás cargando su nitrógeno)

**Niño preguntón:** ¡A todas margaritas doc! ¿Y esto...? ¿Siempre ha sido así?

**Toño:** ¡No! Espérate, para entender esto viajemos 4,400 millones de años atrás, ¡Bienvenidos a...LA TIERRA PRIMITIVA! (cambio de fondo de guñol).

**Niño preguntón:** ¡Oorale Doc! ¡Es usted fascinante!... ¿apoco si muy chido?

**Toño:** Mmmm... mejor les platico: aquí, la atmósfera era muy diferente a la actual, no existía oxígeno libre para respirar. Se trataba de una atmósfera reductora donde el nitrógeno atmosférico pudo haberse “combinado”, a través de reacciones espontáneas con otras moléculas.

**Fede:** Y déjenme contarles que, estas fuentes de nitrógeno fijado por procesos químicos pudieron ser limitantes para que la vida evolucionara, y lo importante de esto es que se crearon nuevos mecanismos biológicos capaces de reducir el nitrógeno atmosférico.

**Niño preguntón:** ¡¡Caracoles!! ¡¡Recorcholis!! ¡¡Diantres!! No sabía que el nitrógeno fuera tan importante para la vida en nuestro planeta.

**Toño:** Y aún más sorprendente es que a lo largo de la evolución, surgió un mecanismo sumamente innovador para la fijación molecular del nitrógeno atmosférico, que ha sido, y es hoy día, sumamente exitoso. Este proceso es conocido como “la Fijación Simbiótica de Nitrógeno”.

**Niño preguntón:** ¿A poco la Fijación Simbiótica de Nitrógeno es más exitosa que usted Dr. Lazcano?

**Toño:** Por supuesto que sí, la Fijación Biológica de Nitrógeno, junto con la fotosíntesis, son las rutas metabólicas más importantes para el mantenimiento de la vida en la nuestro planeta. Es una maravilla de la evolución.

**Fede:** La Fijación Biológica del Nitrógeno es llevada a cabo sólo por ciertas bacterias y arqueas y, como característica común, dependen de una enzima denominada nitrogenasa, que se encarga de

convertir el nitrógeno ( $N_2$ ) que está en el aire en amonio ( $NH_4^+$ ), para que sirva como fuente de nitrógeno asimilable por los seres vivos.

**Toño:** Además, microorganismos como como las cianobacterias y bacterias del suelo pertenecientes a los géneros *Rhizobium* y *Frankia*, convierten el Nitrógeno Atmosférico en otras formas químicas asimilables por las plantas como los nitratos.

**Niño preguntón:** ¡Aaaay!... entonces ¿la Fijación Biológica de Nitrógeno ocurre de diferentes formas?

**Fede:** Efectivamente. Por ejemplo bacterias como *Rhizobium* pueden realizar la Fijación Biológica de Nitrógeno de manera independiente o estableciendo relaciones simbióticas con las plantas. Son estas formas simbióticas con las leguminosas las que estudiamos en mi laboratorio.

**Niño preguntón:** ¿Es en serio Dr. Federico? ¡Que impresionante! ¿Sabe que Dr. Lazcano?, ya no soy su fan, me gusta más esto de la Fijación Biológica de Nitrógeno.

**Toño:** Bueno pero el origen de la vida ¡también es muy interesante!

**Niño preguntón:** Está bien, seré fan de los dos. Pero oiga doc Lazcano, ¿apoco usted era muy cuatacho de la Lynn Margulis?

**Toño:** Claro, era una excelente persona y además, fue mi comadre.

**Fede:** ¡A qué niño tan preguntón me saliste!

**Niño preguntón:** ¿Y será que algún día también pueda dar conferencias tan bonitas como ustedes?.....

Para introducir la siguiente parte, se genera una nube de nitrógeno líquido o algún sonido de fondo.

El romance de una bacteria benéfica y una planta

Autores: Sánchez Lab

Personajes:

Narrador

Frijol – raíz

Rhizobium

**Acto 1:**

*Bichos vemos, relaciones no sabemos: rhizobium conquista a frijol.*

(Música Ciclo sin fin - Rey León)

Personajes:

Narrador  
Rhizobium

**Narrador:**

Ahora les contaremos una fascinante historia acerca del romance entre la raíz y una bacteria fijadora de nitrógeno. Como ya se habrán dado cuenta, en el mundo todo el tiempo los seres vivos nos relacionamos unos con otros. Particularmente con algunos de los que recibimos señales muy especiales que nos hacen sentir una fuerte atracción hacia ellos.

(Sale pareja caminando de la mano)

Por lo general atendemos las que suceden a nuestro alrededor, sobre la tierra, pero existen otras que suceden en las profundidades. (Canción Bajo del mar - La sirenita)

Bueno no... en realidad no, bajo el mar suceden muchas, pero en esta ocasión yo estaba pensando en el suelo, justo debajo de nuestros pies.

En esta ocasión, queremos contarles de una atracción muy particular. ¿Alguna vez han visto una raíz enamorada? ¿Se imaginan cómo sería una raíz enamorada?

Pues no precisamente se enamoran, pero resulta que las raíces también pueden ser muy atractivas. Esta es la historia de la raíz de frijol y su atracción por Rhizobium.

Un día, el gran frijol se puso muy triste ya que a su canasta de alimentos le hacía falta uno muy importante: el nitrógeno, y esto lo ponía muy, pero muy amarillo.

Su mensajero, quien habitaba en la raíz estaba muy preocupado, sabía que había mucho nitrógeno en la atmósfera, pero no podía dárselo de comer así al frijol porque sólo le gustaba en forma de amonio o amoniaco. De pronto recordó que había alguien que podía ayudarlo: la bacteria rhizobium. Ya que ellas saben cómo transformar el nitrógeno atmosférico. Así que se asomó a ver si veía alguna por ahí cerca pero había miles. Algunas amables, otras agresivas, otras muy lentas, otras muy rápidas, unas muy guapas y otras no tanto. ¿Cómo iba a reconocerla entre ellas? Entonces recordó que tenía la receta para producir flavonoides que son unas señales especiales por las que Rhizobium siente una gran atracción, aunque también lo son para algunas otras bacterias. Afortunadamente cada bacteria tiene una llave de entrada para la raíz y sólo rhizobium abre la raíz del gran frijol con unas llaves especiales: los factores Nod. (Frijol prueba las llaves)

Fue así, como después de un laaaargo rato, nuestra tan esperada y encantadora Rhizobium llegó. Rhizobium no puede resistirse a los atractivo flavonoides del frijol y decide corresponderle. Ahora que está tan enamorada ha decidido irse a vivir a la raíz del frijol.

**Acto 2**

Para lograrlo la pequeña Rhizobium debe usar su factor Nod para indicarle a frijol que ella es su verdadero amor. Al ser reconocida por frijol Rhizobium puede entrar pero tiene que seguir un largo camino llamado hilo de infección a través de los pelos radicales de la raíz. Mientras tanto,

frijol muy emocionado divide sus células para poder construir la casa donde Rhizobium se alojará: el nódulo.

Rhizobium finalmente llega al nódulo en donde frijol la apapachará dándole de comer azúcares. Como agradecimiento su pequeño amor transforma con su enzima llamada nitrogenasa el nitrógeno en amonio, molécula que le es de gran utilidad a frijol para sintetizar algunos de los compuestos que necesita para vivir y ser verde otra vez.

Y es así como esta relación amorosa entre una bacteria del suelo - Rhizobium - y una planta leguminosa - el frijol - nos enseña cómo dos organismos tan diferentes que pertenecen a reinos distintos de la naturaleza pueden asociarse para convivir y beneficiarse mutuamente.

## **Canción**

### **Mi Rhizobium fijador** (Ritmo: Payaso de Rodeo)

Creciendo por la tierra me encontré con él,  
era un bicho medio raro pero me cayó bien,  
le dije “ten mi flavonoide,  
dame un fáctor nod,  
¡vamos a asociarnos ya! ”

Me dijo con certeza que “no hay más emoción  
como dividir-tus células, formar nódulos,  
salvar la vida de un frijol pálido feo sin nitrógeno,  
seré Rhizobium fijador”.

Le dije ven, ven, ven, tú, mi Rhizobium ven,  
Ven inféctame y verás lo que vas a ayudar  
No ves que estoy amarillito y soy muy chiquitito -----  
ven, te necesito ya!

Pasaron 20 días, luego se marchó,  
dejándome un mensaje que recuerdo hoy  
“me dividí, te di nitrógeno-tu oxígeno y azúcares  
algún día volveré”

Y fue así como solito me quedé  
tristeando mucho sin mi amor aquel  
por quien viví, crecí y moriré  
espero volverte a ver.

# Australian Journal of Crop Science Southern Cross Publishing



# CROP ADAPTATION TO CLIMATE CHANGE

High-Temperature Stress in Drought-Prone Areas



Joint FAO/IAEA Centre  
Nuclear Techniques in Food and Agriculture

DOI: 10.21475/ajcs.21.15.09.sp

# Australian Journal of Crop Science Southern Cross Publishing

Volume 15 Number 8 Year 2021

**CROP ADAPTATION TO CLIMATE CHANGE:  
High-Temperature Stress in Drought Prone Areas**

**FAO/IAEA Co-ordinated Research Project on Climate  
Proofing Crops: Genetic Improvement for Adaptation  
to High Temperature in Drought-Prone Areas and  
Beyond**

Guest Editors: Fatma Sarsu, Brian Forster and Sobhana Sivasankar



**Joint FAO/IAEA Centre**  
Nuclear Techniques in Food and Agriculture

## Identification of small open reading frames (sORFs) associated with heat tolerance in nitrogen-fixing root nodules of *Phaseolus vulgaris* wild-type and cv BAT93

Alejandra Zayas-del Moral<sup>1</sup>, Damián Martínez-Reyes<sup>2</sup>, Carmen Quinto<sup>1</sup>, Federico Sanchez<sup>†</sup> and Claudia Díaz-Camino<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biología Molecular de Plantas Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México Av. Universidad 2001, CP 62210, Cuernavaca, Morelos, México

<sup>2</sup>Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México AP 565A Cuernavaca, Morelos, México

<sup>†</sup> In loving memory.

\*Corresponding author: [claudia@ibt.unam.mx](mailto:claudia@ibt.unam.mx)

### Abstract

Common bean is an important legume crop and a major source of protein for low-income groups around the world. Legumes have the ability to engage symbiotic interactions with nitrogen-fixing soil bacteria. In this study, next-generation sequencing technology was used to perform transcriptome analyses of a yet unexplored group of peptides encoded by small open reading frames (sORFs; < 150 codons) in nitrogen-fixing symbiotic nodules of two heat-tolerant genotypes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L): the cultivar BAT93 and a wild genotype (named *P. vulgaris* 7) from the south of Mexico. After heat stress, total RNA was isolated and used for transcriptome analysis. Sixty differentially expressed sORFs were identified between control and heat stress treatments. The expression profiles of these sORFs suggest that, regardless the evolutionary closeness between *P. vulgaris* BAT93 and *P. vulgaris* 7, each genotype has independently adapted their molecular signaling pathways to survive heat stress. The dataset developed may provide a useful resource for future genetic and genomic studies in these species.

**Keywords:** Heat stress, small open reading-frames, common bean, legume-rhizobia symbiosis, biological nitrogen-fixation, next-generation sequencing, transcriptome analysis.

**Abbreviations:** sORFs - short open reading frames, SPs - small proteins.

### Introduction

The world's human population is expected to reach 9.1 billion in 2050 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://www.fao.org/>). Over-population is associated with increasing global consumption of resources, food security and climate change. Recent climate models estimate that the global surface temperature is likely to rise by 4.8 °C in the worst-case scenario (IPCC, 2014). In semi-arid and tropical regions, which are among the most populated and underdeveloped, the increase in surface temperatures will severely affect crop production (IPCC, 2014). Legumes include important grain, pasture, and agroforestry species, and are second to cereal crops in agricultural importance based on area harvested and total production (<http://www.fao.org/>). Pulses (dry seeded legumes) are protein rich and affordable foods, and an important component in human sustenance, especially in the dietary pattern of low-income people in developing countries. In addition to their nutritional value, most legumes have symbiotic associations with nitrogen-fixing bacteria mainly belonging to the Rhizobiaceae family (rhizobia) (Dénarié et al., 1996). This remarkable biological interaction culminates with the formation of specialized root organs, the symbiotic nodules, where biological fixation of atmospheric nitrogen takes place. Nodulated legumes produce substantial amounts of organic nitrogen fertilizer and play a key role in sustainable agriculture in tropical and temperate climates (Peoples et al., 1995; Tate, 1995). Numerous studies have established that high temperatures (30°C to 40°C depending

on species) have negative impacts on Rhizobium soil survival, root bacterial attraction and infection, and also nodule development (Lebrazi & Fikri Benbrahim, 2014; Abd-Alla et al., 2014). Knowledge of nodule functioning after heat stress, such as those experienced by legume plants in the field during a day is limited.

Small proteins (SPs) have emerged as an important class of signaling molecules involved in nodulation (Batut et al., 2011), and also in growth, development, and in response to stress (Hanada et al., 2012; Marmioli & Maestri, 2014). SPs are encoded by short open reading frames (sORFs) and distinguished from other ORFs by their sizes (30-150 codons in length). Although many sORFs play important roles as regulators of diverse biological processes, this gene group usually escapes gene annotation because they are particularly difficult to predict by computational biology due to their small size. Thus, sORFs have been studied in only a few plant species and their biological importance is little understood. Here a comparative analysis was made of the expression of sORFs of the root-nodule transcriptome of two *P. vulgaris* genotypes under control and stress treatments (sudden and prolonged heat exposure). Computational strategies were deployed to identify sORFs that were up-regulated in active nitrogen-fixing nodules under heat stress. This information may be relevant in selecting new bean genotypes able to harbour active nitrogen-fixing nodules resilient to heat stress.

## Results

### Phenotypic and molecular responses to heat stress in *P. vulgaris* heat-stress resistant genotypes

To evaluate the ability of *P. vulgaris* cv. BAT93 and *P. vulgaris* 7 to adapt to sudden heat stress (without any priming, known as basal thermo-tolerance), the plants of each genotype were subjected to heat stress for 6 continuous hours. After stress, the aerial plant parts of *P. vulgaris* BAT93 and *P. vulgaris* 7 were photographed (Figure 1a and 1b). *P. vulgaris* BAT93 wilted (Figure 1a), and only a third of the plants subjected to heat were able to recover after one week in benign conditions. Recovered plants of BAT93 just produced one pod, in general with 1 seed (Table 1). In contrast *P. vulgaris* 7 showed no differences in foliar turgor nor seed production between control and stress treatments (Table 1). There were no differences in nodule size and number of nodules per root plant (Figure 1e), but the results show a significant and similar increase in chaperone transcript accumulation (Figure 1c), an indication that nodules of both genotypes responded to heat stress. Interestingly, the rate of nitrogen-fixation in nodules elicited by *R. tropici* CIAT899 in *P. vulgaris* BAT93 was severely reduced in heat-shock treated plants compared to control, but this effect was not observed in nodules of the wild *P. vulgaris* 7 (Figure 1 d). The data indicate that the basal thermo-tolerance of *P. vulgaris* 7 is higher than *P. vulgaris* BAT93, and that the biological nitrogen fixation process is not altered in *P. vulgaris* 7 by heat stress.

### Distribution of sORFs in *P. vulgaris* BAT93 and G19833 genotypes and in other model legumes

Some 64,692 and 31,638 ORFs from *P. vulgaris* genotypes Mesoamerican BAT93 and Andean G19833, respectively (Vlasova et al., 2016; Schmutz et al., 2014), 88,647 ORFs from *Glycine max* (Schmutz et al., 2010), 10,979 ORFs from *Lotus japonicus* (Sato et al., 2008) and 62,319 ORFs from *Medicago truncatula* (Young et al., 2011) were collected from Phytozome version 11 ([www.phytozome.net](http://www.phytozome.net); Goodstein et al., 2012) and from miyakogusa.jp version 3.0 for *L. japonicus* (<http://www.kazusa.or.jp/lotus>). The ratio of sORFs (30 to 150 amino acids length) versus the total number of ORFs reported for each genome version was calculated (Figure 2 and Table 2). Although the annotations of total ORFs have changed in recent years in all the genomes of listed legumes (Guillén et al., 2013), the highest frequency of sORFs was found in the best-studied genomes of leguminous plants, i.e. *M. truncatula* and *L. japonicus* (0.2 and 0.3, respectively), while the proportion of sORFs/ORFs annotated in the *P. vulgaris* genomes fluctuates between 0.11 to 0.14, a slight difference that may be due to annotation systems used in these genomes.

### Differential expression analysis of sORFs under heat-shock conditions in *P. vulgaris*

Out of 235 differentially expressed ORFs in *P. vulgaris* BAT93 under heat-stress (data not shown), 16 (6.8%) were sORFs. Most differentially expressed sORFs could not be assigned to any gene ontology (GO) category (Table 3 and 4), so these were analyzed by the MEME Suite (Figure S1), and also by BLASTP, which was found to be the most informative algorithm. In stressed root nodules of *P. vulgaris* BAT93, a histone and a thymidine kinase domain are present in three down-regulated sORFs (Figure 3 and Table 3). Five sORFs in *P. vulgaris* BAT93 nodules under heat-stress were up-regulated, and we identified known protein domains in two of them (Figure 3a and Table 3): a domain found in SL33 plant splicing factors (PHASIBEAM10F006374), and a cytochrome-c oxidase domain (PHASIBEAM10F012744). In *P. vulgaris* 7 significant

expression changes were detected in 1,064 ORFs, and 44 (4.1%) of them were identified as sORFs. A GO associated function could be annotated in 26 sORFs (Table 4), but in this case, neither the use of MEME (Figure S1), nor the BLASTP algorithm gave additional information over the putative biological function of some other sORFs of this group (Table 4). In heat-stressed nodules of *P. vulgaris* 7, 13 sORFs were down-regulated (Figure 3 b and Table 4). Most protein domains of these sORFs are yet unknown, or belong to proteins with no described biological function. However, some protein domains found in stress-related proteins were identified (Phvul.008G112900.1, Phvul.008G189400.1, Phvul.009G027600.1) in a growth factor (Phvul.003G233400.1) (Yang et al., 2001), cytochrome b5 (Phvul.006G115900.1) and in proteins responsive to gibberellic acid (Phvul.008G235300.1), respectively. Up-regulated sORFs in these root nodules included calmodulin-like domains present in proteins involved in the signaling of calcium (Phvul.001G155400.1, Phvul.001G260700.1, Phvul.003G115800.1, Phvul.007G111200.1, Phvul.007G278900.1), and in phyto-hormone responsive proteins, such as ethylene, auxin or gibberellin (Phvul.007G193400.1, Phvul.007G219700.1, Phvul.009G015900.1, Phvul.010G019700.1).

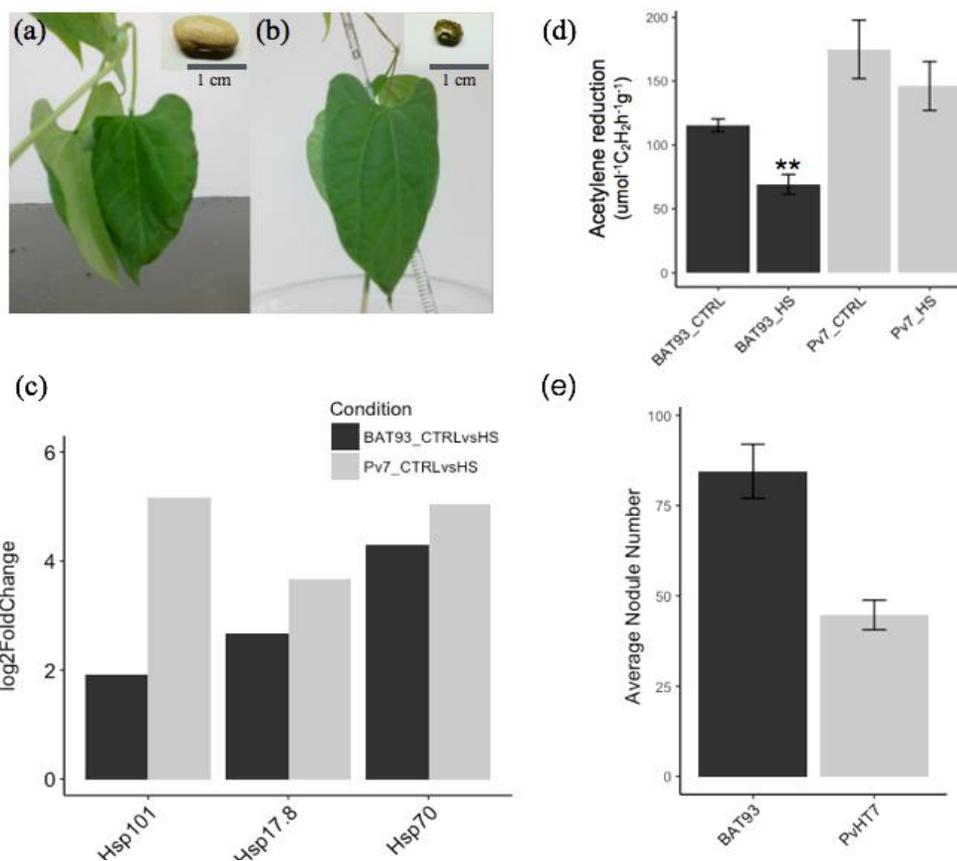
## Discussion

Small proteins encoded by small open reading frames (sORFs, 30 to 150 codons) have been shown to be relevant in legume-rhizobia interactions as well as in plant growth and development, and in response to stress (Batut et al., 2011; Hanada et al., 2012; Marmioli & Maestri, 2014). sORFs identification can be predicted by bioinformatics approaches, such as web-based tools [sORFfinder (Hanada et al., 2010), HAltORF (Vanderperre et al., 2012), or uPEPPERoni (Skarshewski et al., 2014)] by homology with other related-species, or by sequence analysis and clustering. Several molecular techniques are used to confirm sORFs gene expression, among these next-generation-sequencing technologies are reliable, e.g. RNA-seq. In this work, RNA-seq technology was used to gather relevant data on changes in gene expression of small proteins encoded by sORFs in root nodules of two *P. vulgaris* genotypes elicited by *R. tropici* CIAT899, a bacterium resistant to heat (Martínez-Romero et al. 1991), under prolonged heat stress conditions.

*P. vulgaris* BAT93, a representative cultivar of the Mesoamerican common bean gene pool, was bred for high productivity in tropical conditions at the Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia (Voysey, 1983, 2000). This breeding line has been well-studied, and its genome has been recently sequenced (Vlasova et al., 2016). Taken in consideration all these advantages, *P. vulgaris* BAT93 was chosen as the reference genotype to compare with *P. vulgaris* 7, which is a wild-type genotype collected from the south of México. Plant responses to heat stress in both common bean genotypes were confirmed by the strong induction of heat-shock proteins (HSPs) (Figure 1 c) (Wang et al., 2004; Aparicio et al., 2005; Larkindale et al., 2005; Kim et al., 2011). Interestingly, although the induction of HSPs was similar in both common bean genotypes (Figure 1c), deleterious phenotypic effects at the whole plant level were observed only in *P. vulgaris* BAT93 (Figure 1a compared to 1b and Table 1).

**Table 1.** Phenotypic responses to heat stress in *Phaseolus vulgaris* cv. BAT93 and in *P. vulgaris* 7 genotypes.

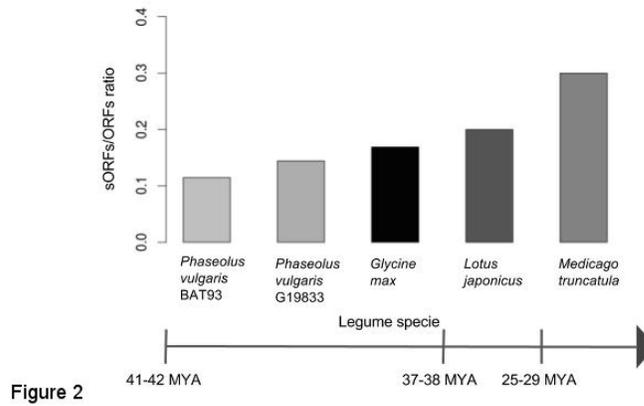
FEATURES	GENOTYPE			
	<i>P. vulgaris</i> BAT93		<i>P. vulgaris</i> 7	
	CTRL	HS	CTRL	HS
Survival after heat stress (6h 37°C, 3 plants per replicate, 3 technical replicates)	NA	1/3	NA	3/3
Average Pods per plant	3	0.33	>3	>3
Average Seeds per pod	5	1	4	4
Average seed weight (g)	0.186 g	0.168 g	0.046 g	0.058 g
Average nodule number per plant	84.48		44.71	
Average nodule dry weight per plant (g)	0.02		0.0055	



**Fig 1.** Heat-stress response in *P. vulgaris* cv. BAT93 and *P. vulgaris* 7 genotypes. (a) Foliar turgor changes observed in *P. vulgaris* BAT93 (a) and in *P. vulgaris* 7 plants (b) after the heat-shock treatment (37°C/6 h). Insets in (a) and (b) show seeds of the corresponding bean genotypes. Bar size, 1 cm. (c) Expression ratio of HSP101, HSP17.8 and HSP70 chaperones in root nodules of *P. vulgaris* BAT93 (in black) and *P. vulgaris* 7 (in grey), either in control conditions (CTRL) or subjected to heat stress (HS). The fold change in expression was obtained by DESeq of each heat-stress molecular marker from root nodules of control plants versus its expression in root nodules of heat-stressed plants. Values in both graphs represent the Log2 fold change of three biological replicates. (d) Effects of the thermal shock on the nitrogenase activity of *P. vulgaris* BAT93 or *P. vulgaris* 7 root nodules, either in control conditions or after the heat-shock treatment. \*\* P < 0.01, n=15. (e) Average nodule number of each genotype at 20 dpi. n=15

**Table 2.** Comparison of total number of open reading frames (ORFs) and small open reading frames (sORFs) in *Phaseolus vulgaris* cv. BAT93 and G19833, *Glycine max*, *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*.

	<i>Phaseolus vulgaris</i> BAT93	<i>Phaseolus vulgaris</i> G19833	<i>Glycine max</i>	<i>Lotus japonicus</i>	<i>Medicago truncatula</i>
ORFs	64692	31638	88647	10979	62319
sORFs	7414	4560	14979	2195	18688
sORFs/ORFs ratio	0.11	0.14	0.16	0.19	0.29

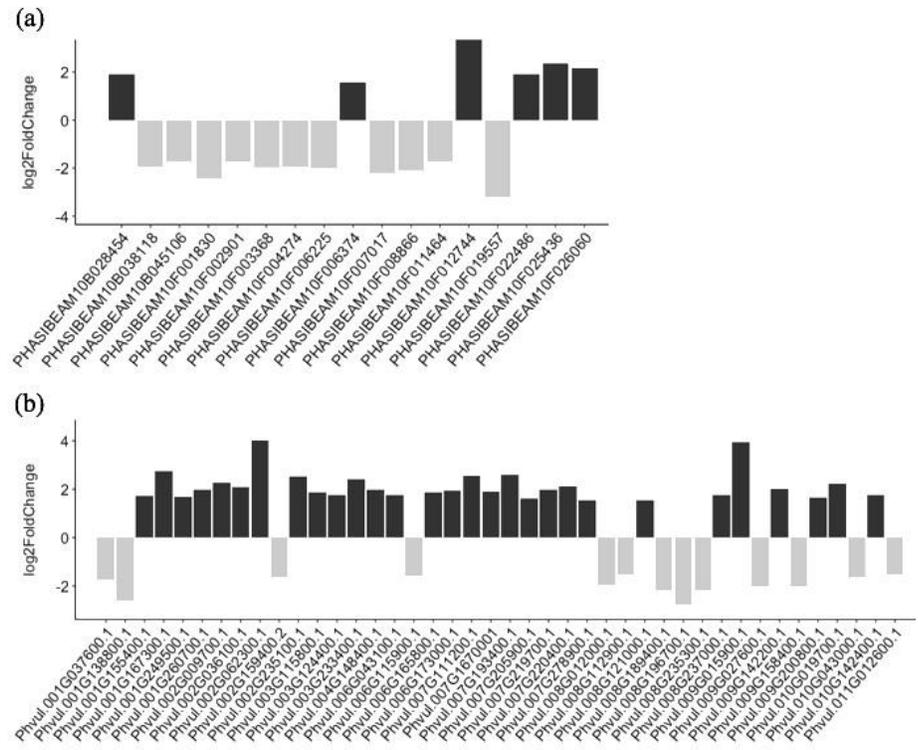


**Figure 2.** Proportion of sORFs detected in legume plant genomes. *P. vulgaris* G19833, *G. max*, *L. japonicus* and *M. truncatula* protein sizes in Phytozome version 1.11, and *P. vulgaris* BAT93 in *The Novo Genome Assembly and Annotation Team*. Arrow represents timeline evolution of these plant legumes based on archaeological and molecular data (Choi et al., 2004). Intersections indicate the time of divergence between clades. MYA, *million years ago*.

**Table 3.** List of differentially expressed sORFs in *P. vulgaris* cv. BAT93 after heat-stress.

ID	Size	Associated protein	MOTIF MEME	BLASTP (Superfamilies)	Sequences producing significant alignments	Associated processes
PHASIBEAM10B038118 (T1)	103	N/A	N/A	No Putative Conserved Domains	Spidroin-1-like [Glycine max]	
PHASIBEAM10B045106 (T1)	103	N/A	N/A	H4 superfamily	Histone H3.2 [Cajanus cajan]	
PHASIBEAM10F001830 (T1)	103	N/A	N/A	No Putative Conserved Domain	Glutamine dumper 5-like [Cicer arietinum] transmembrane protein [Medicago truncatula]	
PHASIBEAM10F002901 (T1)	116	N/A	N/A	No Putative Conserved Domain	uncharacterized genes	
PHASIBEAM10F003368 (T1)	123	N/A	N/A	AAI_LTSS superfamily	Lipid transfer protein DIR1 [Vigna angularis, Medicago truncatula]	
PHASIBEAM10F004274 (T1)	140	N/A	N/A	No Putative Conserved Domain	Lysine-rich arabinogalactan protein 19-like [Vigna angularis] transmembrane protein, putative [Medicago truncatula]	
PHASIBEAM10F006225 (T1)	145	N/A	N/A	HMG-box superfamily	High mobility group B protein 7-like [Glycine soja] PREDICTED [Vigna radiata]/ HMGB-UBF_HMG-box, class II and III members of the HMG-box superfamily of DNA-binding proteins	
PHASIBEAM10F006374 (T1)	81	N/A	N/A	RRM_SF superfamily	Serine/arginine-rich SC35-like splicing factor SCL33 isoform X1 [Vigna radiata]	Hormonal control (Cruz et al., 2014, Suzuki et al., 2016)
PHASIBEAM10F007017 (T1)	137	Histone H2B.6	N/A	H2B superfamily	probable histone H2B.3 [Vigna radiata]	DNA package (Iliakis et al., 2008; Kim et al. 2015; Kantidze et al., 2016)

PHASIBEAM10F008866 (T3)	130	Thymidine kinase a	N/A	TK superfamily	Thymidine kinase-like [Vigna radiata]	Nucleotide synthesis (Wang & Liu, 2006; Garton et al., 2007); nucleotide salvage pathway (Moffat et al. 2002)
PHASIBEAM10F011464 (T1)	130	Histone H3.2	N/A	H4 superfamily	Histone H3.2 [Cajanus cajan] histone H3 [Triticum aestivus] core histone H2A/H2B/H3/H4	DNA package (Iliakis et al., 2008; Kim et al. 2015, Kantidze et al., 2016)
PHASIBEAM10F012744 (T1)(T2)	75(T1) 67(T2)	N/A	Motif B	COX7a_Cyt_c_Oxidase_VIIa superfamily	Cytochrome-c oxidases, electron carriers [Theobroma cacao]	Stress response (Gong et al. 1998, Huang et al. 2016))
PHASIBEAM10F019557 (T1)(T2)	88(T1) 93(T2)	N/A	Motif C/A	SANT_Superfamily/Myb_DNA-Binding	PREDICTED: protein RADIALIS-like 3 [Vigna radiata] MYB transcription factor MYB142 [Glycine max]	
PHASIBEAM10F022486 (T1)	74	N/A	N/A	No Conserved Domain	Putative Transmembrane protein, putative [Medicago truncatula]	
PHASIBEAM10F025436 (T1)	72	N/A	N/A	No Conserved Domain	Putative Hypothetical protein LR48_Vigan08g167400 [Vigna angularis]	
PHASIBEAM10F026060 (T1)	144	N/A	N/A	Alpha-crystallin-HSPs_p23-like superfamily/IbpA	PREDICTED: 15.7 kDa heat shock protein, peroxisomal [Vigna angularis][Vigna radiata]	(Vierling et al. 1997)



**Figure 3**

**Fig 3.** sORFs differentially expressed in (a) *P. vulgaris* BAT93 and (b) *P. vulgaris* 7. Gene expression values between control or heat-stressed 20 dpi nodules are expressed as the Log2 of the fold change. Accession numbers are indicated on the X axis.

**Table 4.** List of differentially expressed sORFs in *P. vulgaris* 7 after heat-stress.

ID	Size	GO	MOTIF MEME	BLASTP (Superfamilies)	Sequences producing significant alignments	Associated process	
Phvul.010G019700.1	112	Uncharacterised protein family SERF	N/A	4F5	Gibberellin regulated protein [Cynara cardunculus var. Scolymus]	Hormonal control	
Phvul.010G142400.1	114	N/A	N/A	No Putative Conserved Domain	uncharacterized genes		
Phvul.010G043000.1	97	Domain of unknown function (DUF581)	N/A	zf-FLZ superfamily	uncharacterized genes		
Phvul.003G124400.1	74	N/A	N/A	No Putative Conserved Domain	uncharacterized genes		
Phvul.003G233400.1	75	phytosulfokine precursor	4	N/A	PSK superfamily	phytosulfokines-like [Glycine max]	Growth
Phvul.003G115800.1	121	Ca2+-binding protein 1		Motif F/A	Efh superfamily (EF-hand7)	hypersensitivity reaction associated Ca2+-binding protein [Phaseolus vulgaris] calmodulin-like [Vigna angularis]	Calcium signaling (Liu et al., 2003; Al-Quaraan et al., 2010)
Phvul.009G200800.1	141	N/A	N/A	N/A	G_glu_transpept superfamily	transmembrane protein, putative [Medicago truncatula]	
Phvul.009G158400.1	58	N/A	N/A	N/A	No Putative Conserved Domain	aldo/keto reductase [Desulfitobacterium metallireducens]	
Phvul.009G015900.1	101	SAUR-like responsive family	auxin-protein	N/A	Auxin_inducible superfamily	auxin-induced protein ARG7 [Cajanus cajan] Predicted: auxin-induced protein 15A [Vigna angularis]	Hormonal control
Phvul.009G142200.1	115	N/A	N/A	N/A	No Putative Conserved Domain	uncharacterized genes	
Phvul.009G027600.1	150	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein		N/A	HMA_superfamily	Predicted: heavy metal-associated isoprenylated plant protein 22 [Vigna angularis]	Stress response
Phvul.011G012600.1	86	Domain of unknown function, DUF642		N/A	PLN03089/hypothetical	uncharacterized genes	
Phvul.008G196700.1	44	N/A	N/A	N/A	No Putative Conserved Domain	uncharacterized genes	
Phvul.008G121000.1	101	N/A	N/A	N/A	No Putative Conserved Domain	uncharacterized genes	
Phvul.008G235300.1	97	Gibberellin-regulated family protein		N/A	GASA superfamily	gibberellic acid - stimulated protein 1 [Glycine soja]	Hormonal control
Phvul.008G112900.1	101	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein		N/A	AAI_LTSS superfamily	predicted: putative lipid-transfer protein DIR1 [Vigna angularis]	Stress response
Phvul.008G189400.1	134	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein		N/A	HMA_superfamily	Predicted: copper transport protein ATX1-like [Glycine max]	Stress response
Phvul.008G012000.1	137	Calcium-binding EF-hand family protein		N/A	EFh superfamily/EF-hand7	calcium-binding EF-hand protein [Medicago truncatula]	
Phvul.008G237000.1	144	HSP20-like chaperones superfamily protein		N/A	alpha-crystallin-HSPs_p23-like superfamily	Predicted: 15.7 kDa heat shock protein, peroxisomal [Vigna angularis]	
Phvul.004G148400.1	71	N/A	N/A	N/A	No Putative Conserved Domain	uncharacterized genes	

Phvu.007G220400.1	54	N/A	N/A	No Putative Conserved Domain	uncharacterized genes	
Phvu.007G205900.1	62	Low temperature and salt responsive protein family	N/A	No Putative Conserved Domain	Predicted: hydrophobic protein RCI2B [Vigna radiata]/Stress-induced hydrophobic peptide [Theobroma cacao]	
Phvu.007G111200.1	118	calmodulin-like 11	Motif D/F	EFh superfamily/EF-hand7	Predicted: calmodulin-like protein 11 [Vigna radiata]	Calcium signaling (Liu et al., 2003; Al-Quaraan et al., 2010)
Phvu.007G193400.1	147	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	N/A	AP2 superfamily	Ethylene-responsive transcription factor ERF098 [Glycine soja]	Hormonal control
Phvu.007G167000.1	131	N/A	N/A	No Putative Conserved Domain	uncharacterized genes	
Phvu.007G278900.1	150	calmodulin-like 11	Motif D/F/G	EFh superfamily	Predicted: calmodulin-like protein 8 [Vigna radiata var. radiata]	Calcium signaling (Liu et al., 2003; Al-Quaraan et al., 2010)
Phvu.007G219700.1	96	SAUR-like auxin-responsive protein family	N/A	Auxin_inducible superfamily	Predicted: auxin-induced protein X15-like [Glycine max]	
Phvu.001G037600.1	119	Domain of unknown function (DUF3511)	N/A	DUF3511 superfamily	uncharacterized genes	
Phvu.001G138800.1	67	N/A	N/A	No Putative Conserved Domain	uncharacterized genes	
Phvu.001G167300.1	127	RmlC-like cupins superfamily protein	N/A	Cupin_3/Cupin_like superfamily	RmlC-like cupins superfamily protein	
Phvu.001G155400.1	148	calmodulin-like 11	Motif D/F/G	EFh superfamily	Predicted: calmodulin-3-like [Vigna radiata var. radiata]	Calcium signaling (Liu et al., 2003; Al-Quaraan et al., 2010)
Phvu.001G249500.1	67	N/A	N/A	No Putative Conserved Domain	uncharacterized genes	
Phvu.001G260700.1	84	N/A	N/A	No Putative Conserved Domain	uncharacterized genes/ F-box domain, cyclin-like protein [Cynara cardunculus var. scolymus]	Cell proliferation
Phvu.006G173000.1	93	N/A	N/A	No Putative Conserved Domain	uncharacterized genes	
Phvu.006G165800.1	127	jasmonate-zim-domain protein 8	N/A	tify_superfamily / CCT_2 superfamily	Predicted: protein TIFY 5A-like [Vigna radiata var. radiata]	
Phvu.006G043100.1	94	N/A	N/A	No Putative Conserved Domain	uncharacterized genes	
Phvu.006G115900.1	143	cytochrome isoform E	B5	N/A	Cyt-b5 superfamily	cytochrome b5-like [Vigna angularis]
Phvu.002G062300.1	56	N/A	N/A	DUF4534 superfamily	uncharacterized genes	
Phvu.002G235100.1	73	N/A	N/A	DUF761 superfamily	uncharacterized genes	
Phvu.002G036100.1	113	cytochrome c-2	N/A	Cytochrom_C superfamily	Cytochrome c [Cajanus cajan][Medicago truncatula]	

Phvul.002G159400.1	99	SPIRAL1-like2	Motif E	No Putative Domain	Conserved	Predicted: protein SPIRAL-like 5 [Vigna angularis]
Phvul.002G159400.2	99	SPIRAL1-like2	Motif E	No Putative Domain	Conserved	Predicted: protein SPIRAL-like 5 [Vigna angularis]

The observed differences were accompanied by lower nitrogen-fixation levels (Figure 1d), supporting the hypothesis that reduced metabolic activity caused by heat stress reduces nitrogen fixation rates. Interestingly, compared to *P. vulgaris* BAT93, the average nodule number per root in plants of *P. vulgaris* 7 was considerably lower (Figure 1e), although the level of nitrogen-fixation was higher (Figure 1d). This finding suggest that, compared to *P. vulgaris* BAT93, *P. vulgaris* 7 root nodules are not only more resistant to heat stress but more efficient in fixing nitrogen.

To reveal the presence and quantity of any RNA in a biological sample by RNA-seq, statistical estimation of data is required. Three statistical methods were used to validate changes in gene expression, and only sORFs with a significant differential expression were considered. Compared to unstressed symbiotic nodules (control), 15 sORFs were differentially expressed in *P. vulgaris* BAT93 root nodules, whereas 44 sORFs were identified in *P. vulgaris* 7. Contrary to *P. vulgaris* 7, in *P. vulgaris* BAT93 most sORFs were down-regulated, with only a few being up-regulated (Figure 3 and Table 3). RNA-seq data on heat stressed nodules from both common bean genotypes suggest the involvement of phytohormones and antioxidant systems in the signaling for thermo-tolerance acquisition (Suzuki et al., 2016). However, the most remarkable difference at the molecular level observed among heat-stressed nodules of these genotypes was the notable abundance of sORFs transcripts related to calcium signaling in *P. vulgaris* 7 (Table 4). This finding suggests that, regardless of the evolutionary closeness of the domesticated *P. vulgaris* BAT93 and the wild *P. vulgaris* 7, each genotype has independently adapted their molecular responses to preserve the biological nitrogen fixation process under heat stress (Figure 3, and Tables 3 and 4). This ability becomes highly relevant in nitrogen deprived soils, such as those of tropical and temperate regions. In this sense, *P. vulgaris* 7 as well as other *P. vulgaris* wild relatives of Mexico are important reservoirs of genetic variation that could be sourced for crop improvement.

To our knowledge, this is the first report of a set of sORFs being associated with heat stress. Taking into consideration the highest resistance to heat stress shown by *P. vulgaris* 7

(Figure 1), induced sORFs under heat should be subject of further functional genomics studies. Although these studies are necessary to prove the biological function of each of these sORFs, the described procedure opens new possibilities to detect potentially relevant genes involved in heat stress response.

## Materials and Methods

### Plant growth and heat-stress treatments

Dry, mature seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. BAT93 and a *Phaseolus vulgaris* wild heat-tolerant genotype (named *P. vulgaris* 7) were surface sterilized as previously described (Estrada-Navarrete et al., 2007). Sterilized seeds were transferred to sterile trays containing wet paper towels. Trays were covered with foil and incubated at 28°C for 2 days (Estrada-Navarrete et al., 2007). Two-day-old common bean sprouts were inoculated with *Rhizobium tropici* CIAT899 (Martínez-Romero et al., 1991) and grown at 28°C/18°C day/night temperature, 65% relative humidity, 180-300  $\mu$ -1mol photon m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> and 14 h

photoperiod for 20 days in a growth chamber. Common bean plants were watered every third day with N-free sterile B&D nutrient solution (Broughton & Dilworth 1971). After this period, plants were subjected to a sudden heat-stress (37°C), sustained for 6 h. Twenty days post-inoculation (dpi), root-nodules from 5 plants of each genotype were harvested, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C.

Nitrogenase activity was evaluated from 20 dpi inoculated roots (following methods of Ramírez et al., 1999; Verdoy et al., 2004) under control and heat stress conditions in both bean genotypes. Nodulated roots were incubated in acetylene gas for 1 h and ethylene production was determined by gas chromatography (Varian model 3300). Specific activity was expressed as  $\mu$ mol<sup>-1</sup>C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>h<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> nodule dry weight.

### Bacterial strain and culture

The *Rhizobium tropici* CIAT899 strain was selected as it has known resistance to heat (37°C; Martínez-Romero et al., 1991). Two-day-old bean sprouts were inoculated with *R. tropici* CIAT899 according to Ramírez et al. (2005) with some minor modifications. Briefly, *R. tropici* CIAT899 was grown in peptone yeast liquid medium [0.5% bacto-peptone (w/v), 0.3% yeast extract (w/v), 7 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O] supplemented with 20 g/mL nalidixic acid at 30 °C to a cell density of 5 to 8 × 10<sup>8</sup> mL<sup>-1</sup>. 1 mL was applied to the root.

### RNA extraction, cDNA libraries preparation and sequencing using Illumina HiSeq2000

Twenty dpi symbiotic nodules were isolated, frozen in liquid nitrogen and ground to a fine powder with a mortar and pestle. The sample was immediately processed for total RNA isolation using the extraction kit ZR Plant RNA MiniPrep (Zymo Research, USA) according to manufacturer's instructions. Total RNA in each sample was more than 5  $\mu$ g. RNA integrity was confirmed using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc.) with a minimum RNA integrity number (RIN) value of 7.0. cDNA library templates from 3 biological replicates of each genotype, and from both control and heat-stress conditions (24 cDNA libraries in total), were prepared using a Truseq™ RNA Sample Prep Kit (Illumina) according to the manufacturer's recommendations at the University Unit for Massive Sequencing (UUSM) from the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). These libraries were sent to Macrogen Inc. (Korea; www.macrogen.com) for sequencing by Illumina HiSeq2000 (http://www.illumina.com).

### Strategy for large-scale discovery of putative sORFs in *P. vulgaris* BAT93 and G19833 genotypes

sORFs (30 to 150 aa in length) of *P. vulgaris* BAT93 were gathered from CoGe and *The Novo Genome Assembly and Annotation Team* (CoGe database [https://genomevolution.org/CoGe/] and [http://denovo.cnag.cat/genomes/bean/], genome ID 20365) while the sORFs from *P. vulgaris* G19833 were collected from Phytozome (Phytozome version 11 database [www.phytozome.net]; *P. vulgaris* v1.0), respectively. In both cases, all sORFs with no initial methionine were discarded to avoid truncated transcripts.

### Gene expression and motif-based analysis of *P. vulgaris* sORFs

In order to estimate transcript abundance for each experimental condition tested, raw sequence data from Illumina HiSeq2000 were analyzed using FASTQC software ([www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/)). The short sequence reads obtained (of around 100 bp in length) were aligned to the reference genome; *P. vulgaris* BAT93 (CoGe database [<https://genomevolution.org/CoGe/>], genome ID 20365) or *P. vulgaris* G19833 (*P. vulgaris* v1.0; Phytozome version 11 database [[www.phytozome.net/](http://www.phytozome.net/)]) to uncover their identity. The SMALT software (<http://www.sanger.ac.uk/science/tools/smlt-0>) was used to this purpose. Finally, differential expression was estimated with DESeq, an R/Bioconductor package performing a pairwise differential expression analysis (Anders & Huber, 2010, Bioconductor V3.3, R V 3.3, <http://bioconductor.org/packages/2.11/bioc/>, Robinson 2010). Only *P. vulgaris* sORFs validated by this method with a 2-fold change and a *P*-value < 0.05 between control and the heat stress condition of each common bean genotype were considered for study. Selected *P. vulgaris* sORFs were classified according to the GO annotation (<http://www.agbase.msstate.edu/cgi-bin/tools/GOanna.cgi>, McCarthy et al., 2006), and further analyzed by the MEME Suite (<http://meme-suite.org/tools/meme>, Bailey et al., 2009), and by the BLASTP algorithm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Altschul et al., 1990).

### Acknowledgments

We acknowledge Alfonso Leija (CCG, UNAM) for technical support with the acetylene reduction analysis. We are very grateful to Jorge Acosta, INIFAP - CE Bajío and Alfonso Delgado, Instituto de Biología, UNAM for supplying *Phaseolus vulgaris* seeds. We are thankful to the University Unit for Massive Sequencing (UUSM) from the National University of Mexico (UNAM) for Illumina sample sequencing and data analysis.

This work was funded by FAO/IAEA CRP 23029 Research Contract 16601, PAPIIT IN206415 and IN206815 from Universidad Nacional Autónoma de México and CONACYT No. 177744 and 177207. Eunice Alejandra Zayas-Del Moral is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (UNAM) and received fellowship No. 317533 from CONACYT.

### References

Abd-Alla MH, Issa AA, Ohyama T (2014) Impact of harsh environmental conditions on nodule formation and dinitrogen fixation of legumes. *Advances in biology and ecology of nitrogen fixation*. ISBN 978-953-51-1216-7, P.978-953.

Al-Quraan NA, Locy RD, Singh NK (2010) Expression of calmodulin genes in wild type and calmodulin mutants of *Arabidopsis thaliana* under heat stress. *Plant Physiol Biochem*. 48 (8): 697-702.

Altschul, SF, Gish W, Miller W, Myers EW, and Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215: 403-410.

Anders S, and Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*. 11: R106.

Aparicio F, Thomas CL, Lederer C, Niu Y, Wang D, and Maule AJ (2005) Virus induction of Heat Shock Protein 70 reflects a general response to protein accumulation in the plant cytosol. *Plant Physiol*. 138: 529-536.

Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, and Noble WS (2009) MEME SUITE:

tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res*. 37 (Web Server Issue): W202-W208.

Batut J, Mergaert P, and Masson-Boivin C (2011) Peptide signalling in the rhizobium-legume symbiosis. *Curr Opin Microbiol*. 14(2): 181-187.

Broughton WJ, and Dilworth MJ (1971) Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J*. 125: 1075-1080.

Denarić J, Debellé F, and Promé JC. (1996) Rhizobium lipochitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem*. 65: 503-35.

Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares JE, Guillén G, Díaz-Camino C, Campos F, Quinto C, Gresshoff PM, and Sanchez F (2007) Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus spp.* by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Prot*. 2: 1819-1824.

Garton S, Knight H, Warren GJ, Knight MR, and Thorlby GJ (2007) Crinkled leaves 8-a mutation in the large subunit of ribonucleotide reductase—leads to defects in leaf development and chloroplast division in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 50: 118–127.

Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., et al. (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res*. 40: D1178-D1186.

Guillén, G., Díaz-Camino, C., Loyola-Torres, C.A., Aparicio-Fabre, R., Hernández-López, A., Díaz-Sánchez, M., and Sanchez, F. (2013) Detailed analysis of putative genes encoding small proteins in legume genomes. *Front. Plant Sci*. 4: 208.

Hanada, K., Akiyama, K., Sakurai, T., Toyoda, T., Shinozaki, K., and Shiu, S.H. (2010) sORF finder: a program package to identify small open reading frames with high coding potential. *Bioinformatics*. 26(3): 399-400.

Hanada, K., Higuchi-Takeuchi, M., Okamoto, M., Yoshizumi, T., Shimizu, M., Nakaminami, K., Ohashi, C., Iida, K., Tanaka, M., Horii, Y., et al. (2012) Small open reading frames associated with morphogenesis are hidden in plant genomes. *Proc Acad Nat Sci*. 110(6): 2395-2400.

Huang YC, Niu CY, Yang CR, Jinn TL (2016) The heat-stress factor HSFA6b connects ABA signaling and ABA-mediated heat responses. *Plant Physiology Preview*. 172(2):1182-1199

Iliakis G, Wu W, and Wang M (2008) DNA double strand break repair inhibition as a cause of heat radiosensitization: re-evaluation considering backup pathways of NHEJ. *Int J Hyperthermia*. 24 (1): 17-29.

IPCC (2014) *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Field CB, Barros VR, Dokken DJ, Mach KJ, Mastrandrea MD, Bilir TE, Chatterjee M, Ebi KL, Estrada YO, Genova RC, Girma B, Kissel ES, Levy AN, MacCracken S, Mastrandrea PR, and White LL (Eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, p. 1132.

Kantidze OL, Velichko AK, Luzhin AV, and Razin SV (2016) Heat stress-induced DNA damage. *Acta Naturae*. 8(2):75-78.

Kim DH, Xu ZY, Na YJ, Yoo YJ, Lee J, Sohn EJ, and Hwang I (2011) Small heat shock protein HSP17.8 functions as an AKR2A cofactor in the targeting of chloroplast outer membrane proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 157(1): 132-146.

Kim JM, Sasaki T, Ueda M, Sako K, and Seki M (2015) Chromatin changes in response to drought, salinity, heat, and cold stresses in plants. *Front Plant Sci*. 6: 114.

# UN MUNDO DE BACTERIAS



Instituto de Biotecnología  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO







# **Un mundo de bacterias**

*Un mundo de bacterias*  
D.R. © 2014 Los autores.

D.R. Para esta edición © 2014 Universidad Nacional Autónoma de México  
Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, 04510, México, D.F.

Primera edición 2014  
ISBN: 978-607-02-5179-5

Este libro es el resultado de un proyecto realizado en el Taller de Redacción de la UNAM, Campus Morelos, conducido por Francisco Rebolledo, con el apoyo de la Unidad de Difusión y Extensión de la Coordinación de Servicios Administrativos del Campus Morelos.

La impresión del libro se realizó con el apoyo de la Asociación Más Ciencia por México, A.C.

Compilación, corrección de estilo y cuidado de la obra: Francisco Rebolledo, Yoloxóchitl Sánchez y Alejandra Zayas.

Diseño y tipografía: Efraím Blanco

UNAM Campus Morelos  
Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos  
<http://www.morelos.unam.mx>

Todos los derechos reservados, incluida la reproducción en cualquier forma.  
*All rights reserved, including the right to reproduce this book, or portions thereof, in any form.*  
Impreso y hecho en México  
*Printed and made in Mexico*



Instituto de Biotecnología  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



**UNAM**  
CAMPUS MORELOS

## **Un mundo de bacterias**

Universidad Nacional Autónoma de México Campus Morelos

## **DIRECTORIO**

Dr. José Narro Robles  
Rector

Dr. Eduardo Bárzana García  
Secretario General

Dr. Carlos Arámburo de la Hoz  
Coordinador de la Investigación Científica

Lic. Luis Raúl González Pérez  
Abogado General

Consejo de Dirección UNAM Campus Morelos

Presidente

Dr. Iván Ortega Blake *Director del Instituto de Ciencias Físicas*

Consejeros

Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich *Director del Instituto de Biotecnología*

Dra. Margarita Velázquez Gutiérrez *Directora del Centro Regional de Investigaciones Multidisciplinarias*

Dr. Antonio del Río Portilla *Director del Instituto de Energías Renovables*

Dr. David Romero Camarena *Director del Centro de Ciencias Genómicas*

Dr. David Romero Vargas *Jefe de la Unidad Cuernavaca del Instituto de Matemáticas*

Secretario Técnico

Dr. Jesús Arnoldo Bautista Corral *Coordinador de Servicios Administrativos del Campus Morelos*

## *Presentación*

Este libro es fruto del trabajo de más de 20 investigadores y estudiantes del Instituto de Biotecnología, el Centro de Ciencias Genómicas del Campus Morelos de la UNAM, del Centro en Investigación en Biotecnología y de la Facultad de Biología de la UAEM. En nuestras comunidades estamos convencidos de que los avances de la ciencia deben llevarse a la sociedad, no sólo en forma de técnicas, máquinas o productos, sino también como tarea informativa y cultural, de tal suerte que podamos también contribuir a la construcción de una sociedad culta desde el punto de vista científico. Es por esta razón que el Instituto de Biotecnología apoya con entusiasmo la edición de este ejercicio de divulgación científica.

Se presenta en este volumen, de manera clara y sencilla, una mirada de tópicos referentes al fascinante mundo de las bacterias, que van desde su descripción biológica hasta las insospechadas aplicaciones en la medicina, la industria de los alimentos y la de los plásticos que se han logrado a partir de estos diminutos seres.

Sin duda, el lector se sorprenderá cuando descubra que estos microbios, maravillosamente adaptados, que viven lo mismo en nuestro propio cuerpo que en la regiones más alejadas y hostiles del planeta, han estado aquí desde hace tres mil millones de años y que seguramente serán los últimos en desaparecer del planeta.

**Octavio Tonatiuh Ramírez-Reivich**  
**Director**  
**Instituto de Biotecnología, UNAM**



## Nota del compilador

Amable lector:

Este año se cumplirán siete desde que me invitaron a impartir un taller de redacción en el Campus Morelos de la UNAM. A lo largo de este lapso, han pasado por el taller un buen número de estudiantes e investigadores de prácticamente todas las instituciones que integran el Campus, así como de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Puedo afirmar con satisfacción que este trabajo ha rendido sabrosos frutos, pues han surgido de él, amén de una infinidad de textos de narrativa y divulgación, tres magníficos libros: *Una ventana al quehacer científico. 25 años del Instituto de Biotecnología de la UNAM* (2008); *Ciencia y ficción* (2009), y *Energías Renovables. 25 años de la UNAM en Temixco* (2010).

Ahora tienes en las manos un cuarto fruto, que nació de las inquietudes y cuestionamientos que nos provocaron a varios integrantes del taller el misterioso y fascinante mundo de las bacterias. El entusiasmo y la entrega de dos asiduas asistentes al taller, Alejandra Zayas y Yoloxóchitl Sánchez, logró que estas inquietudes y cuestionamientos fueran cabalmente respondidos, pues además de sus propios escritos, lograron involucrar a más de 20 investigadores y estudiantes del Campus que aportaron interesantísimos artículos sobre el tema.

Disfrutas pues, de este mundo microscópico que, literalmente, se encuentra en todos los rincones de nuestro planeta, incluido nuestro propio organismo.

**Francisco Rebolledo**  
**Invierno 2013-2014**

## Contenido

### ¿Qué son las bacterias?

13. *Huellas* / Eunice Alejandra Zayas Del Moral
14. *El mundo de las bacterias* / Eunice Alejandra Zayas Del Moral
16. *Las bacterias: unos diminutos y complejos seres primitivos* / Lucía Perezgasga Ciscomani y Rodrigo Fernández Mas
19. *Y sin embargo... ¿se mueven?* / Yoloxóchitl Sánchez Guevara
21. *Lo pequeño es lo grande, o cómo las bacterias conquistaron el mundo y lo hicieron habitable para nosotros* / Ana Gutiérrez-Preciado, Gabriela Olmedo Alvarez y Valeria Souza Saldivar
27. *Si de transferir se trata...* / Yoloxóchitl Sánchez Guevara

### Usos y costumbres de las bacterias

31. *Dulces de Tierra* / Rocío Mejía Ornelas
33. *Las súperbacterias* / Agustín López-Munguía
37. *¿A qué huele la tierra mojada?* / Eunice Alejandra Zayas Del Moral
38. *Y la protagonista de este film es... ¿una bacteria?* / Eunice Alejandra Zayas Del Moral
40. *Bacterias constructoras* / Eunice Alejandra Zayas Del Moral
42. *Las Bacterias y la Atmósfera* / Ximena Bonilla

### De bacterias y plantas

47. *Las bacterias del suelo y su enorme contribución al bienestar de las plantas: una historia de ayuda mutua* / Luis Cárdenas Torres
54. *Agrobacterium tumefaciens y el hombre araña* / Alfonso Sierra Sarabia

### Las bacterias y el hombre

59. *Antivida... antibacterias... antibióticos* / Yoloxochitl Sánchez Guevara
61. *¡No soy yo, son mis bacterias!* / Eunice Alejandra Zayas Del Moral
62. *El Ying y el Yang de Clostridium botulinum* / Verónica Loyo Celis

63. *El lado bueno de una bacteria llamada Escherichia coli* / José Luis Puente García
65. *La Sociomicrobiología o de la convivencia entre bacterias y seres humanos* / Agustín López Munguía
69. *Bacterias: ¿amigas o enemigas?* / Ramón Batista García y Jorge Luis Folch Mallol
73. *Una noche en brazos de venus y toda una vida de mercurio* / Alicia Cañas Linares
76. *Las bacterias y el desarrollo del cerebro* / Edmundo Calva Mercado
79. *En la mira* / Rocío Mejía Ornelas

### Bacterias y biotecnología

85. *Microbios, fermentaciones y biotecnología* / Enrique Galindo Fenantes
87. *Geles, espesantes y una bacteria fascinante* / Tania Castillo-Marengo y Carlos Peña Malacara
91. *El pulque, una bebida histórica con importantes implicaciones biotecnológicas* / Adelfo Escalante Lozada, Martha Giles-Gómez y Guillermo Gosset Lagarda
96. *Bacterias que limpian sustancias contaminantes* / Lucía Perezgasga Ciscomani y Rodrigo Fernández Mas
99. *Ejemplo de una dulce y exitosa recombinación* / Yoloxóchitl Sánchez Guevara
103. *Taq polimerasa: la copidadora de ADN* / Cynthia Gemalit Martínez Centeno
105. *La contaminación por plásticos: bacterias al rescate* / Cinthia Ernestina Núñez López y Daniel Germán Segura González
109. *Inventando nuevas bacterias con Biología Sintética* / José Antonio Alonso Pavón

## ¿Qué son las bacterias?



*Microbacterium* sp. Imagen: Luis Servín  
(Ver imagen a color en páginas centrales)

*Sabías que...*

*Los fósiles más antiguos son de estromatolitos, que son colonias de bacterias que forman rocas sedimentarias. Estos tienen 3,500 millones de años y se han localizado en el oeste de Australia y en África*

*Cuando una bacteria se desplaza puede alcanzar una velocidad 200 y 1,000 revoluciones por minuto (rpm) e incluso 12 mm por minuto*

*En Cuatro Ciénegas, Coahuila, México, existe un linaje de bacterias (*Bacillus coahuilensis*) que ahorra fósforo de las membranas celulares y lo sustituye por azufre*

*Algunas bacterias del género *Geobacter* se comunican con otras bacterias y con su mundo exterior mediante nanocables que les permite intercambiar señales.*



## Huellas

*Eunice Alejandra Zayas Del Moral*

Y pasaron muchos años antes de notarlo. Ahí había estado todo este tiempo, incluso mucho antes de que cualquiera pudiera percibirlo. Nadie sabe con certeza cómo comenzó, pero probablemente fue resultado de uno que otro evento azaroso ocurrido en el espacio y tiempo, los cuales nadie ha aprovechado mejor que la naturaleza. Así se hizo presente, siendo un punto invisible –en comparación del todo que lo rodeaba–.

En medio de una gran mezcla de átomos un tanto ordenados, el pequeño ente encontró lo necesario para permanecer, y no sólo eso, también para multiplicarse. ¿Dónde ocurrió? A nadie le consta, pudo ser aquí, o en cualquier otro punto del espacio donde los elementos necesarios se encontraron. Pero es un hecho que su aparición marcó el inicio de lo que hasta ahora llamamos “vida”.

Y como ya lo dije antes, pasaron años, muchos años antes de notarlo. Porque no existía nada ni nadie que pudiera verlo y contarnos la historia de cómo ocurrió. Mientras tanto, el pequeño y minúsculo grupo dejó de ser pequeño ya que siguió multiplicándose. Al mismo tiempo, el entorno que lo rodeaba también cambió: la luz, el clima, el orden (o desorden), entre muchas otras cosas. Ante los cambios, los integrantes del grupo sufrieron también pequeños cambios, que poco a poco los hicieron diferentes, dando lugar a nuevos grupos con integrantes de características distintas, los cuales hoy en día en conjunto conocemos como “microorganismos”.

Pero no fue hasta que pasaron miles de millones de años, y miles de millones de pequeños cambios que dieron lugar a organismos vivos más complejos (al menos en

estructura), que alguien pudo percatarse de su existencia. Primero se descubrió su presencia gracias a sustancias producidas por ellos, ya que, a los ojos del ser humano, seguían siendo en su mayoría invisibles, y posteriormente, con herramientas más elaboradas, se logró observar y analizar su forma, su tamaño y muchas otras características.

Hasta ahora, sigue siendo un misterio el origen de estos ancestrales seres vivos. Existen hipótesis y teorías que intentan explicarlo, pero aún no tenemos las pruebas suficientes para afirmarlo. Además, en los miles de millones de años que hay entre su aparición, y el año en que vivimos, quedan aún muchos huecos por completar acerca de la diversidad de microorganismos que existen y de todas las interesantes características con las que nos pueden maravillar. Lo único que podemos afirmar es que están presentes en prácticamente cualquier lugar, y, aunque a simple vista no los veamos, el mundo, nuestro mundo, tiene su huella.

# El Mundo de las Bacterias

*Eunice Alejandra Zayas Del Moral*

¡Hey! ¡tú!, humano. Sí, tú, el que está leyendo. Voltea hacia la ventana más cercana y dime ¿qué hay ahí? ¿Luz? ¿Movimiento? ¿Algo poco común? Me parece que te estás quedando corto con tus respuestas. ¿Qué más hay ahí? ¿Nada más? Creo que te estás perdiendo de toda la acción. En frente de ti hay miles, ¿qué digo miles?, ¡millones de organismos vivos! Que tus ojos no los vean, no quieren decir que no estén ahí, y si supieras todo lo que están haciendo mientras estás aquí tan tranquilo leyendo... ni te imaginas. Es hora de que te enteres de la gran cantidad de vida que hay a tu alrededor (y también en lo más profundo de tu ser), y hasta lo pensarás la próxima vez que digas que te sientes solo.

Te preguntarás quiénes son esos tantos millones de organismos que te digo que están ahí. La respuesta es simple: la mayoría son BACTERIAS. ¿No te parece emocionante? Pues no, probablemente no, porque por años la gente ha subestimado el papel de estos microbios. Sin embargo, gracias al avance de la tecnología y a los muchos años de estudio de algunas personas que se percataron de su existencia, ahora podemos contarte que a las bacterias les debemos: olores, colores, formaciones rocosas, medicinas, comidas, bebidas, salud, estados de ánimo, y, en una de éstas, hasta la vida.

Para que nos creas, hemos reunido a un grupo de científicos mexicanos cuya profesión e investigación existe gracias a lo maravilloso que es conocer el papel de las bacterias en la vida cotidiana. Ellos te contarán cómo la comprensión de estos microbios es muy importante para

entender el pasado, presente y futuro de nosotros y del planeta Tierra. Bienvenido a este fascinante mundo compartido: el mundo de las bacterias.

## Los habitantes

En primer lugar, te presentamos a nuestras protagonistas: las bacterias. Éstas son organismos unicelulares, es decir, conformados por una sola célula de tamaño muy pequeño (varían de 20 nm a 1 mm de diámetro, dependiendo de la especie y forma), las cuales pueden ser observadas de manera individual con ayuda de un microscopio. Sus restos fósiles más antiguos datan de aproximadamente 3500 millones de años, época en la que la tierra estaba cubierta de océanos a muy altas temperaturas, por lo que se consideran uno de los organismos vivos más antiguos.

Si bien no son los únicos microbios, hay características que los hacen distintos con respecto a otros microorganismos como hongos, arqueas y virus. De entrada, su ADN (*ácido desoxiribonucleico*), el material genético donde está codificado el instructivo de su estructura y funcionamiento, no se encuentra en un núcleo delimitado por membrana, sino en una estructura conocida como *nucleoide*, que está empacado en un cromosoma de forma circular ubicado en el citoplasma, acompañado por otros pequeños fragmentos independientes de ADN conocidos como *plásmidos*.

La estructura de la célula de una bacteria se completa con otros componentes esenciales además del nucleoide, como los ribosomas, la membrana citoplasmática y la pared celular, por mencionar algunos de los más importantes. Estos componentes tienen una organización arquitectónica dividida en tres regiones: la región citoplasmática que contiene el nucleoide y los ribosomas como

componentes principales; la envoltura celular, formada por la cápsula, la pared celular y membrana citoplasmática, y por último, la superficie celular, donde encontramos algunos apéndices los cuales están involucrados en la formación de estructuras relacionadas con la movilidad de la bacteria y la transferencia de ADN entre ellas, llamados *flagelos* y *pilis* respectivamente, de las cuales hablaremos más adelante.

Las bacterias conforman uno de los grupos de los seres vivos dentro de la clasificación de los Tres Dominios propuesta por Carl Woese: *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*. Así como existe esta clasificación, también se ha podido clasificar a las bacterias de otras maneras muy diversas. Una de ellas es por su aspecto: las hay de forma redonda (*cocos*), de bastón (*bacilos*) y de espiral (*espirilos* y *espiroquetas*). Otras clasificaciones están dadas de acuerdo al lugar y condiciones en las que viven (requerimientos de oxígeno, temperatura, pH, forma de nutrición) y por cómo se asocian entre ellas y con otros microorganismos, entre muchas otras características.

¿En dónde podemos encontrarlas? Dada la diversidad de bacterias que existe, podemos encontrarlas en todos lados, hasta en los lugares más recónditos del planeta: en océanos, montañas, rocas congeladas, aguas sulfurosas, ductos de petróleo, en la salsa de los tacos, en el tracto digestivo y hasta en las nubes. Sin embargo, cultivarlas en un laboratorio no siempre es sencillo, ya que cada especie requiere condiciones muy específicas para poder desarrollarse, lo cual vuelve a las bacterias todo un reto para los científicos.

¿Te quedaste picado? Ahora que ya sabes un poco más acerca de las bacterias, comencemos el tour.

## Las bacterias: unos diminutos y complejos seres primitivos

*Lucía Perezgasga Ciscomani y Rodrigo Fernández Mas*

Seguramente en alguna ocasión has tenido una infección y te han dado antibióticos para combatir a esas lamentosas bacterias que te provocan malestares como fiebres, dolor de oído, diarrea, etc. Y aunque te hagan sentir tan mal, gracias a los más de 2,000 tipos diferentes de bacterias que tenemos en los intestinos, somos capaces de digerir la leche, de producir vitamina K (necesaria para el proceso de coagulación de la sangre), algunas vitaminas del complejo B, ácido fólico y vitamina C.

Las bacterias son unos pequeños organismos que miden unas 10 micras (una micra es la millonésima parte de un metro), tienen ADN y ARN como material genético, al igual que nuestras células (pero su ADN es circular, el nuestro es lineal, y no está envuelto por una membrana, de ahí que también se les conozca como Procariotes, que quiere decir antes del núcleo) y fueron los primeros seres vivos en aparecer en la Tierra.

Para los científicos que estudian los procesos que dieron origen a la vida, es relativamente sencillo explicar cómo se originaron las moléculas necesarias para la misma: los ácidos nucleicos que almacenan la información genética (ADN y ARN), las proteínas que son las responsables de muchos de los procesos celulares, los lípidos que forman parte de las membranas y los carbohidratos que proveen una gran parte de la fuente de energía necesaria para los distintos procesos celulares. Sin embargo, saber cuándo se originó un organismo, puede ser bastante más complicado, a no ser que tengamos fósiles para evidenciarlo. Las rocas sedimentarias (son un tipo de rocas donde se suelen en-

contrar fósiles) más antiguas se encuentran en Groenlandia y tienen unos 3,800 millones de años. Los fósiles más antiguos son de estromatolitos (colonias de bacterias que forman rocas sedimentarias) que tienen 3,500 millones de años y se han localizado en el oeste de Australia y en África. La naturaleza de los fósiles y la composición química de las rocas en donde se encontraron, indican que éstas primeras células utilizaban reacciones químicas sencillas para producir energía para su metabolismo y crecimiento. Entonces, el origen de la vida tuvo que haber sucedido antes de 3,500 millones de años, pero ¿qué tanto?, todavía no lo sabemos.



Estromatolitos en Cuatrociénegas, Coahuila, Méx.  
(tomada por el Inst. de Ecología, UNAM)  
(Ver imagen a color en páginas centrales)

Lo que sí sabemos es que todos provenimos de un único ancestro “LCA” (por sus siglas en inglés “Last Common Ancestor”, o en español, último antepasado común), que guardaba su información genética en una molécula como

el ADN, en unidades llamadas genes. Los genes codifican para las proteínas (o sea, un gen produce una proteína particular). Algunas de las proteínas llevan a cabo funciones catalíticas (enzimas), es decir, ayudan a que algunas funciones celulares se lleven a cabo, como la síntesis del ADN. Entonces, si el ADN es necesario para hacer las proteínas y éstas son necesarias para sintetizar al ADN, ¿qué fue primero?

Para que se pueda producir una proteína, primero el gen se copia a ARN que es utilizado por los ribosomas (son complejos muy grandes formados por ARN y proteínas), para sintetizar las proteínas. Se sabe que en los ribosomas, el ARN es el que tiene la función catalítica, ya que si se le quitan todas las proteínas, sigue habiendo síntesis proteica. Así que el ARN puede servir para guardar información, como el ADN, y también como molécula catalítica, como las proteínas. De esta manera, se puede explicar el problema del huevo y la gallina: el ARN puede cumplir ambas funciones. Sin embargo, dada su baja eficiencia para guardar información y como molécula catalítica, el ARN fue sustituido eventualmente por el ADN y las proteínas, respectivamente.

Como dijimos anteriormente, la Tierra se originó hace unos 4,500 millones de años. Su atmósfera estaba formada principalmente por vapor de agua, bióxido de carbono, nitrógeno e hidrógeno. La temperatura de su superficie era muy alta debida al propio proceso de acreción (crecimiento del planeta por adición de cuerpos más pequeños) y por el bombardeo constante de cometas, meteoritos y erupciones volcánicas, que favorecieron el aumento de la temperatura y seguramente, la síntesis de muchos compuestos orgánicos necesarios para la vida. Muchos de estos compuestos también se formaron en el interior de cometas y meteoritos y pudieron así enriquecer la poza de com-

puestos orgánicos presentes en la Tierra, la llamada “sopa primitiva” de Oparin. Es posible entonces, que la vida se haya originado varias veces y que el bombardeo de cometas y meteoritos la hayan aniquilado (como sucedió con la extinción de los dinosaurios debido a la caída de un meteorito en lo que hoy es Yucatán) y aunque este bombardeo no ha cesado, disminuyó considerablemente cuando la Tierra comenzó a enfriarse hace unos 4,200 millones de años, con lo que se evitó la destrucción de los compuestos orgánicos ya sintetizados.



Origen de las moléculas de la vida. (Imagen tomada de la NASA) *(Ver imagen a color en páginas centrales)*

Tal vez, los primeros seres vivos hayan sido parecidos a las bacterias metanógenas, que utilizan el hidrógeno como fuente de energía y el bióxido de carbono como fuente de carbono para producir metano. La fotosíntesis (metabolismo que utiliza la luz como fuente de energía) se desarrolló en las bacterias hace unos 3,200 millones de años. El primer tipo de fotosíntesis fue anoxigénica, o sea,

no produce oxígeno. La fotosíntesis oxigénica surgió en un tipo de bacterias llamadas cianobacterias y fueron el único tipo de organismos fotosintéticos durante muchos millones de años antes de la aparición de las plantas verdes. Conforme apareció el oxígeno libre en la atmósfera terrestre, aparecieron otro tipo de bacterias que lo utilizaron para respirar y generar energía a partir del mismo.

Como vemos, las bacterias no solamente fueron las primeras en originarse sobre la Tierra, si no que también contribuyeron al cambio de la naturaleza química de la atmósfera terrestre, lo que permitió el surgimiento de otros tipos de bacterias y metabolismos. Además, a través del establecimiento de diferentes tipos de simbiosis (asociación de dos o más individuos de diferentes especies, en la que todos salen beneficiados), contribuyeron al origen de las células eucariontes hace aproximadamente 1,500 ó 2,000 millones de años. Los eucariontes son los organismos cuyo material genético está encerrado por una membrana (núcleo). Las plantas, hongos, animales -y entre ellos, los humanos- y organismos unicelulares como las amibas, son todos eucariontes. Según la teoría endosimbiótica propuesta por Lynn Margulis en 1967, una bacteria termófila que utilizaba el calor y el azufre como fuente de energía, se unió a una bacteria nadadora parecida a una espiroqueta (es una bacteria parecida a una lombriz), para dar origen al llamado flagelo de las células eucariontes (esta es la parte menos sólida de la teoría de Margulis). Posteriormente, la bacteria termófila enguyó a una bacteria que era capaz de utilizar el oxígeno como fuente de energía, dando origen a las mitocondrias, que son los organelos que usan nuestras células para respirar. Las mitocondrias, al igual que los cloroplastos que usan las plantas para producir la fotosíntesis, tienen en su interior ADN y ARN que usan para sintetizar algunas de las proteínas necesarias para sus distintas

funciones (esta es una evidencia que demuestra su origen bacteriano). Se cree que cuando se originó la mitocondria, la membrana de la bacteria termófila se invaginó como una manera de proteger su material genético, formándose así la membrana nuclear. Como todas las plantas tienen mitocondrias, la adquisición de los plástidos fue el último evento endosimbiótico entre una bacteria tipo cianobacteria, que realiza fotosíntesis oxigénica y la bacteria que ya había adquirido al antecesor de la mitocondria.

Así que la próxima vez que tengas una infección bacteriana, piensa que aunque te sientas como que te pasó un tren encima, fue gracias a las bacterias que se diversificó la vida en la Tierra.

Para saber más:

- Antonio Lazcano-Araujo. *El Origen de la Vida*.
- Varios autores. *El Origen del Universo y de la Vida*.
- Carl Sagan. *Cosmos*

## Y sin embargo... ¿se mueven?

*Yoloxóchitl Sánchez Guevara*

Yo me muevo, tú te mueves más rápido, ella se mueve hacia arriba, él se mueve retorciéndose, nosotros nos movemos en sentido contrario, ustedes se mueven rítmicamente y ellos... pues finalmente también se mueven, pero... ¿todos los seres vivos se mueven? entonces, ahora que ya que conocemos más a las bacterias, ¿crees que éstas también se mueven? Pues sí, y además lo hacen de una manera peculiar.

El término *motilidad* se utiliza en biología para expresar la habilidad de moverse espontánea e independientemente. Y aunque fue apenas hace unas pocas décadas que, nosotros, los humanos, pudimos ver las células bacterianas individuales, en ese momento se sabía poco sobre cómo lograban moverse o desplazarse para llegar a tantos lugares como, por ejemplo, a un manantial en ebullición o a las raíces de esa planta que a veces parece triste; siempre en búsqueda de condiciones favorables.

Pero después de muchos estudios y avances en la ciencia, ahora sabemos que estos microorganismos tienen muchas cualidades, entre ellas, la capacidad de moverse y de desplazarse. Y aun cuando no todas lo hacen, las que sí lo logran, se desplazan por contracciones, por movimientos vibratorios, movimientos de torsión, o en el mejor de los casos, usando su *flagelo*, que es una estructura semejante a una cuerda ondulante o a un gran látigo, que lo usan como si fuera una cola, cola de aproximadamente 20 nanómetros (nm) de ancho y entre 15 a 20 micras ( $\mu$ ) de largo.

¿Alguna vez has visto una imagen de flagelos de los espermatozoides? Pues sí, es algo parecido. Imagina un largo apéndice helicoidal que gira en ambos sentidos, gracias a un motor rotatorio; y para que el motor funcio-

ne, como todos los motores que seguro conoces, requiere de energía. Las bacterias resolvieron esta necesidad generando un gradiente de *protones* (iones de hidrógeno) a través de una capa formada por lípidos llamada *membrana* y el cual resulta del metabolismo de cada bacteria.

Pero si consideramos todas las especies de bacterias, existen las que tienen más de un flagelo y entonces se propuso una clasificación. Las especies que tienen un solo flagelo son *monótricas*; si son bacterias con un flagelo de cada extremo serán *lofótricas*. Para aquellas que reúnen varios flagelos en un solo extremo se usa el término *anfítricas*, pero también existen las que tienen flagelos distribuidos por toda la célula: las *perítricas*. Como en muchos ejemplos de la naturaleza, ¡siempre hay variedad!

En cuanto a su forma, los flagelos son estructuras únicas constituidos por un filamento, un gancho que dirige al flagelo y un cuerpo basal. Aproximadamente 20 proteínas estructurales y otras 30 de regulación y coordinación, permiten que todo “marche viento en popa” y las bacterias se desplacen impulsadas como hélices, con velocidades entre 200 y 1,000 revoluciones por minuto (rpm) e incluso, como en el caso de *Vibrio cholerae*, velocidades de desplazamiento hasta de 12 mm por minuto.

Si me da hambre corro a la cocina, si me da frío voy en búsqueda de un suéter, pero ¿cómo saben las bacterias que pasa en el exterior y que las hace decidir bacterias hacia donde ir? Pues para ello se han descrito fenómenos que inician con transducción de señales, algo así como el juego de “pasa la voz”.

En bacterias, todos estos gradientes químicos son detectados a través de diferentes receptores insertados en las membranas (transmembranales), que son proteínas que aceptan grupos metilo ( $\text{CH}_3$ -). Esos receptores unen moléculas atrayentes o repelentes que de ma-

nera directa o indirecta se relacionan con proteínas en el espacio *periplasmático* (el espacio entre la pared celular y la membrana). Luego, las señales son transmitidas hacia el citosol, es decir al interior de la bacteria donde se activarán proteínas llamadas *Che*. Estas últimas son las encargadas de cambiar las frecuencias de giro y/o avance.

La regulación de los flagelos y de los receptores depende de muchas proteínas como *Che* (W, A, B, Y y R) y *FliM*, de sus estados de fosforilación en ciertos residuos, de varias reacciones de mutilación, la agrupación de varios receptores y su interacción mutua. Todo ello ocurre en lo que los microbiólogos llamarían *Sistemas de dos componentes* y es una de las formas más comunes de cómo las bacterias “hablan entre sí” para regular vías de señalización que serán sus pistas para avanzar o retroceder, girar contra de las manecillas del reloj o en sentido contrario.

Otra proteína estructural considerada como esencial para que el flagelo funcione, es la *flagelina*, que la encontrarás en la porción más distal del flagelo. Por cada vuelta helicoidal del flagelo hay una o varias flagelinas de diferentes pesos moleculares.

Las bacterias, entonces, pueden ir en línea recta, derechitas, derechitas o moverse más libremente de forma aleatoria, tridimensionalmente y al azar. ¿Y cómo saben hacia dónde ir? ¡Ah! pues las bacterias responden a diferentes estímulos que les permiten decidir si continúan su camino o toman un rumbo diferente. Estos movimientos dirigidos se llaman *taxias* (que son movimientos en respuesta a atracciones o repulsares provocados por factores ambientales). Además las taxias pueden ser negativas o positivas, dependiendo de la naturaleza del estímulo: atrayente o repelente, respectivamente. Y dependiendo del estímulo tendremos una respuesta, por ejemplo, hablamos de *quimiotaxis*, cuando el estímulo es

por una concentración de sustancias químicas, *la fototaxis* cuando responden a gradientes de luz para obtener energía, en caso de las bacterias autótrofas o *magnetotaxis* si responden a un campo magnético, las bacterias con esta propiedad contienen hierro en forma de óxido de hierro ferromagnético o magnetita. Cuando la bacteria se dirige hacia un lugar donde la concentración de oxígeno es la adecuada para su organismo hablamos de *aerotaxis*.

Como ejemplo, recientemente, se observó una bacteria del suelo, *Bacillus subtilis* en un medio en que no hay muchos cambios y la bacteria recibe pocas señales extracelulares. A pesar de ello, la bacteria cambia de un estado móvil (cuando la célula nada) a uno sésil que permite a las bacterias formar cadenas. ¿Cómo decide su estado la bacteria?

Un grupo de investigadores han descrito que el control molecular de este cambio de estado se debe a la interacción de tres proteínas. Específicamente, la proteína *SinR* que reprime un gen que codifica a otra proteína, *SlrR*. En cambio, *SlrR* se une y regula a *SinR*, algo así como una doble regulación. Pero como en varias historias, en esta regulación hay un dominante: si es *SinR* la que gana, la célula es mótil; pero si pierde, la célula ya no se mueve, se vuelve sésil. Hay una tercera proteína, *SinI* que puede unirse e inactivar a *SinR*. El resultado: la célula no se mueve.

Puede parecer complicado, pero esto es sólo un ejemplo de una manera de entender cómo las bacterias toman decisiones: ver como se mueve su mundo alrededor o participar en ello.

Y sí, las bacterias entonces también se mueven, se desplazan; girando, rotando o con diferentes formas, siempre en busca de un estado de homeostasis, o lo que llamaríamos comúnmente: un estado de plena felicidad.

## **Lo pequeño es lo grande, o cómo las bacterias conquistaron el mundo y lo hicieron habitable para nosotros**

*Ana Gutiérrez-Preciado, Gabriela Olmedo Álvarez  
y Valeria Souza Saldívar*

### **Las bacterias constituyen la reserva de nutrientes más grande del planeta**

Se dice que contar las estrellas del universo es como contar los granos de arena en una playa. Se estima que en una galaxia existen del orden de  $10^{11}$  o  $10^{12}$  estrellas, y probablemente existan el mismo número de galaxias. Por un cálculo simple, podemos estimar que debe haber entre  $10^{22}$  a  $10^{24}$  estrellas en el universo. Bueno, pues eso es nada comparado con la población de microorganismos en nuestro planeta. Se calcula que el número total de células de microorganismos es más o menos  $6 \times 10^{30}$  (o lo que es igual a 6 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 bacterias). Pero no siempre fue así, en el origen de la vida hace cerca de 4,000 millones de años probablemente había muy poquitas, poco a poco fueron evolucionando y tomando posesión de las rocas, el mar y la atmósfera y al apoderarse de sus nuevos “hogares” fueron aprendiendo a comer y a reciclar los elementos que nos dan la vida, principalmente el carbono (C), el nitrógeno (N) y el fósforo (P), haciendo de este planeta un planeta azul lleno de vida. En la actualidad son tan importantes para el mantenimiento de la vida, que el Carbono que está contenido en los microorganismos (350-550 x  $10^{15}$  gramos) es equivalente a todo aquel contenido en el resto de los seres vivos. Si lo medimos en gramos de Nitrógeno o de Fósforo, hay 10 veces más de estos nutrientes

en las bacterias que en las plantas, por lo que los microorganismos representan la reserva de nutrientes más grande de la vida en el planeta. Con tal cantidad de bacterias en nuestra Tierra, ¡necesitamos muchísimos microbiólogos para entenderlas!

### **Las bacterias tienen mas funciones y aplicaciones que todos los demás seres vivos**

En la microbiología, existen muchos campos de estudio. Hay científicos que se interesan por usar a las bacterias para la producción de alimentos, bebidas alcohólicas, medicamentos, etc. Hay otros que se interesan en usar a las bacterias para solucionar problemas, como la biorremediación (ver capítulo tal). Pero también existen ecólogos de bacterias, aquellos que se interesan por saber qué bacterias viven en qué ambiente y como hacen para adaptarse en los miles de ambientes distintos que hay en el planeta, es decir, se interesan por entender su biodiversidad. Las plantas y los animales son muy diferentes a simple vista; por ejemplo, una simple hoja puede tener muchas formas distintas, pero esencialmente tiene la misma función. En cambio las bacterias son, aparentemente, muy parecidas pues prácticamente sólo las encontramos en forma de bastón (bacilos) o redondas (cocos), pero son increíblemente distintas en sus funciones. ¿Por qué? Para contestar este tipo de preguntas necesitaríamos irnos al principio de la historia, al mundo primitivo llamado Precámbrico donde las bacterias eran las reinas. Eso en principio sería imposible ya que no hay máquinas del tiempo, ¿o sí?

## ¿Por qué Cuatrociénegas funciona como una máquina del tiempo?

En México tenemos una gran biodiversidad, es decir, las diferentes formas de vida que podemos encontrar (¡y catalogar!), y un número impresionante de ecosistemas contrastantes. Uno de los ecosistemas de enorme interés es el que existe en el valle de Cuatrociénegas, un sitio único e irrepetible ubicado en el estado de Coahuila. El valle de Cuatrociénegas está rodeado por montañas y, a pesar de ser un desierto, alberga arroyos, manantiales y pozas donde habitan un sinfín de especies endémicas. Aunque cuesta trabajo pensarlo, este lugar en medio del noroeste mexicano alguna vez estuvo cubierto por el mar. El estudio de las rocas de este oasis revela que en algún momento entró el mar, cuando se rompió Pangea, hace 220 millones de años. Sin embargo, a pesar de que el mar se retiró hace 35 millones de años, conserva muchas de las bacterias marinas que se han ido adaptando a los cambios del Valle. La composición de este espacio único, que contiene mar en el desierto rodeado de montañas, hace de Cuatrociénegas un sitio único tanto a nivel microscópico (diversidad microbiana), como macroscópico (plantas y animales endémicos). Se puede comparar a las Islas Galápagos, famosas por los estudios que hizo Charles Darwin y la descripción de numerosas especies endémicas.

Las bacterias de Cuatrociénegas, con linajes ancestrales, habitan todo el valle. En cada rincón de Cuatrociénegas, existe un microecosistema que contiene una gran diversidad de bacterias, y entre todas realizan todas las funciones metabólicas necesarias para mantener viva a su comunidad. Por ejemplo, en el agua, las bacterias se organizan en los diferentes niveles de profundidad, pues hay unas que prefieren estar más cerca del sol y del oxí-

geno, mientras otras disfrutan más de la sombra y de lo que les cae de aquellas que viven arriba. En los sedimentos de algunas pozas de agua existen estructuras “rocosas”, llamadas estromatolitos, que se forman gracias a la mezcla de carbonatos del agua y el metabolismo de comunidades de microorganismos. Es cierto que esta descripción suena muy similar a un arrecife de coral; también es cierto que, en general, ambos están hechos de carbonatos de calcio. Sin embargo, hay una diferencia primordial entre ambos. Los microorganismos que habitan los corales son organismos más complejos, clasificados como eucariotes microscópicos de la clase *Anthozoa*, mientras que los que habitan los estromatolitos son bacterias muy diversas, que en su mayoría hacen su propia azúcar a partir del sol y de elementos inorgánicos (muy diversos autótrofos anóxicos y los primeros organismos fotosintéticos aerobios, las cianobacterias). Las cianobacterias son también habitantes estrella de Cuatrociénegas, ocupando las capas superiores de las columnas de agua y viven en la azotea de estos tan mencionados tapetes microbianos. Las cianobacterias son fascinantes y son las responsables de que este planeta esté lleno de oxígeno y es gracias a ellas que estamos aquí.



Fig. 1 Tapete microbiano. (Imagen: Ana Gutiérrez)  
(Ver imagen a color en páginas centrales)

Los tapetes microbianos se observan en el sedimento de las pozas como distintas capas de suelo que se diferencian claramente por poseer diferentes colores. Es posible extraer un fragmento de sedimento, como quien corta una rebanada de pastel, y observar esta estratificación. Estas capas son una especie de “condominios” habitados por microorganismos multicolores (Fig. 1).

Una de sus principales características es que son fotosintéticos, con lo cual aprovechan la energía solar para sintetizar su alimento. Antes de que existiesen los organismos multicelulares, es decir, en el precámbrico, los tapetes microbianos fotosintéticos cubrían, literalmente, la Tierra, así como ahora cubren el valle de Cuatrociénegas. Estos ecosistemas, son de apenas unos cuantos centímetros de espesor, pero a pesar de esto contienen un rango enorme de pequeños microambientes, los cuales se ven determinados por los gradientes de luz, oxígeno y otros nutrientes que se forman a medida que se penetra en la profundidad del sedimento. Los microorganismos de los tapetes, principalmente bacterias y arqueas, no pueden moverse de arriba abajo en las diferentes capas (los de la capa morada no pueden vivir en la capa verde y *viceversa*) tienen un modo de vida especializado para vivir en distintas condiciones de oxígeno y de luz. Por ejemplo, aquellos que no tienen la capacidad de utilizar oxígeno, necesitan diferentes elementos para poder respirar, como azufre y hierro. A la forma en que se desenvuelven con diferentes elementos para crecer y reproducirse le llamamos metabolismo. Por tanto, estas diferenciaciones de capas, les permiten convivir y no competir, estableciendo distintos nichos en cada capa. El oxígeno no es el único factor que dicta los límites entre cada nicho, otros son la luz y la descomposición de materia orgánica que cae sobre el suelo. La luz también

es filtrada, de modo que los que viven en medio, reciben “un tipo de luz” distinta que las cianobacterias de la azotea.

### **Las bacterias en los tapetes aprovechan la luz y se la reparten**

Las cianobacterias y las plantas no son los únicos organismos que fotosintetizan. De hecho, ellos ni siquiera inventaron esa forma de comer. Todos sabemos ahora que las plantas pueden fotosintetizar gracias a que tienen un organelo dentro de cada una de sus células llamado cloroplasto. Sabemos también que el cloroplasto es producto de una endosimbiosis con una cianobacteria. También sabemos que el cloroplasto contiene clorofila, un pigmento que funciona como antena molecular y le permite tomar la energía de la luz y convertirla en comida (es metabolismo y se llama ciclo de Calvin). Las plantas (y las cianobacterias) son verdes gracias a la clorofila, que absorbe la luz que llega en longitud de onda de 680 nm, es decir, sólo aprovechan la luz roja, la demás la rebotan. Regresando a nuestro tapete microbiano, podemos observar que la capa superior es verde, pues son cianobacterias que están hasta arriba, absorbiendo luz con sus antenas moleculares, la clorofila. En nuestro tapete de la figura 1, la capa que sucede a la verde es morada y esto se debe a que las bacterias fotosintéticas que la habitan tienen un tipo de clorofila distinto. Una sutil diferencia en su estructura le permite a la clorofila absorber la luz en una longitud de onda distinta, y esto le permite a este tipo de bacterias púrpuras no competir con las cianobacterias por la luz. Es decir, absorben la luz que las cianobacterias “desperdician”. Esto mismo sucede con las capas inferiores a medida que se desciende en profundidad. Hoy en día conocemos 8 tipos de clorofilas distintas. El mayor componente de un tapete microbiano son las bacterias ver-

des no sulfurosas, que es la capa verde que se observa en medio. No son cianobacterias, su clorofila absorbe la luz de 740 nm, por eso también las vemos verdes.

### **La competencia entre las bacterias también explica la diversidad**

Explicamos ya que cada capa de sedimento tiene bacterias diferentes porque tiene niveles de oxígeno y de otros elementos diferentes, y usan distintos tipos de luz. Esto explica ya parte de la diversidad. Ahora, las bacterias que ocupan una misma capa, tampoco son iguales; de hecho, mientras más diferentes son es más fácil que convivan. Sin embargo, no todo es color bello púrpura en estos tapetes. Estos microorganismos están sujetos a una competencia constante por los recursos y por el nicho particular, por lo que las interacciones bióticas probablemente causaron extinción o diversificación de los competidores antiguos menos afortunados que se veían desplazados de sus territorios. Hay pleitos feroces entre bacterias que tienen un metabolismo parecido, pues pelean por los mismos alimentos. De hecho, muchas de las bacterias sintetizan sustancias que matan a sus competidores. Estas sustancias son nada menos que los antibióticos, que hemos aprendido a aprovechar para hacer medicamentos que combaten las infecciones bacterianas. Una estrategia de convivencia pacífica es la repartición de los diferentes alimentos. Esto es otra manera en que explicamos la diversidad de bacterias en los tapetes microbianos.

Por último, ¿quién produce la comida en los tapetes? De algún lado tiene que salir la comida (energía) para las bacterias de todas las capas. Ya vimos que a lo largo de las capas superiores, hay muchas bacterias fotosintéticas que están produciendo azúcar a partir de la energía del sol y de  $\text{CO}_2$ . También viven de todo lo que cae en el suelo y se

descompone. Gracias al estudio de los tapetes de Cuatrociénegas, hemos aprendido que los virus matan a los microorganismos más abundantes, manteniendo cierta distribución equitativa, y que el fósforo de las bacterias eliminadas es aprovechado por los microorganismos carroñeros, por lo que los virus forman parte importante del sistema al contribuir a reciclar los elementos que forman la vida. Esta dinámica, que observamos en Cuatrociénegas, es una regla de vida en nuestros océanos y tapetes microbianos, como probablemente lo fue también en el Precámbrico. Lo que las capas superiores producen, es aprovechado (o fermentado) por las capas inferiores, que a su vez producen nuevos desechos que van aprovechando otras bacterias, que a su vez desechan parte de los alimentos que procesan... lo que es seguro ¡es que nada se desperdicia! Lo que una capa deshecha, la de abajo lo aprovecha. La basura de la capa superior es la comida de la capa inferior. La concentración del oxígeno decrece de abajo hacia arriba, pero la del azufre incrementa. La competencia probablemente es más dura en la parte central del tapete, mientras que la parte superior rica en oxígeno y sol permite sólo la existencia de los que toleran estas condiciones. En las capas más profundas, el estilo de vida es muy diferente. No llega nada de oxígeno, y éste es el principal componente para poder mover los electrones y así generar ATP. En estas capas los organismos viven en el límite, por lo que necesitan asociarse entre ellos para poder hacer ATP entre todos. Un grupo particular de microorganismos, las llamadas arqueas metanógenas, se asocian con unas bacterias sintróficas, compartiendo todos los desechos de los demás que viven en capas superiores. Fermentando la basura de los demás y transfiriéndose el hidrógeno generado es como pueden sobrevivir y hacer ATP para todos aquellos habitantes de esta desafortunada capa. Como comparten todo, sus membranas están pegadi-

tas unas con otras, para que los pocos nutrientes que tienen puedan ser compartidos y no se difundan. De hecho, se cree que en estas condiciones, de una intimidad absoluta, se originó un nuevo tipo de interacción: la endosimbiosis, donde unieron sus membranas, coexistiendo en una célula más grande y compleja. Este tipo de asociaciones dio lugar a las células eucariontes y es el origen del núcleo.

### **Bacterias únicas de Cuatrociénegas y sus trucos**

Gracias a los tapetes microbianos, podemos entender la diversidad microbiana. En ecología, hay otro concepto clave, el endemismo. Una especie endémica es aquella que se encuentra solamente en un lugar del planeta, como por ejemplo la tortuga de las Islas Galápagos, en Ecuador. En cambio, una especie cosmopolita es aquella que encontramos en muchos lugares, como por ejemplo, los humanos. En las primeras épocas de la Ecología Microbiana, se pensaba que las bacterias eran especies cosmopolitas y que todas estaban en todas partes. Esto se dio muchos años por hecho, ya que son pequeñas, se reproducen en tiempos muy cortos, alcanzan altas densidades poblacionales (o sea, ¡son muchas!) y se pueden dispersar fácilmente (algunas forman esporas, otras pueden viajar en tu zapato). Ahora hay evidencia para argumentar que no todo está en todas partes, y prueba de ello es que en Cuatrociénegas existen muchas bacterias endémicas.

Para entenderlas, debemos recordar el contexto donde viven. Cuatrociénegas es un ambiente único, muy limitado en nutrientes y en general, las bacterias han tenido que adaptarse a una vida más dura que en otros lugares del planeta. Al tener que competir y pelear por su alimento, cada linaje bacteriano que ahí sobrevive llegó a solucionar el problema con métodos distintos y fascinantes. Por ejem-

plo, algunas bacterias degradan los compuestos menos comestibles, que como nadie más quiere, éstas aprovechan. Otro linaje, el de una bacteria que hemos bautizado como *Bacillus coahuilensis*, decidió ahorrar en el fósforo de las membranas celulares, sustituyéndolo por un elemento más común: azufre, cambiando así la estructura de su membrana celular. Esta bacteria, lejana al linaje de las cianobacterias, decidió robarles algunos de sus genes para poder hacer un tipo de pigmento que le sirve para aprovechar la luz (otra antena molecular). Algunas otras bacterias desarrollaron hábitos caníbales, mientras que otras se volvieron carroñeras. Estas presiones selectivas, únicas de este ambiente, llevaron a los linajes por un camino evolutivo único, generando un gran número de bacterias endémicas.

### **La biodiversidad microbiana de Cuatrociénegas, una mina de recursos que peligra por el mal manejo del agua**

Para resumir, la diversidad microbiana que encontramos en Cuatrociénegas es inigualable. Tenemos en nuestras manos una gran riqueza metabólica, y estudiándola podemos entregarle a los biotecnólogos muchísima materia prima para sus investigaciones. Las bacterias que se comen todo, pueden ser pieza clave en la limpieza de ecosistemas contaminados (biorremediación), aquellas que compiten con todas las otras bacterias que se encuentren pueden ser importantísimas para descubrir nuevos antibióticos, y las otras que inventan nuevas formas de hacer energía, pueden ayudar a hacer biocombustibles. Pero para poder explotar estos recursos genéticos primero hay que conservar al acuífero. El problema es que el acuífero profundo que alimenta las pozas y por lo tanto que le da vida a las comunidades microbianas, está muy amenazado por el mal uso

del agua en el desierto. Desde hace 70 años los ejidatarios en Cuatrociénegas han hecho canales para sacar el agua de los manantiales e irrigar sus parcelas, no solo dentro del valle sino 80 km hacia la ciudad de Monclova. El asunto es que esa agua es esencial para mantener el humedal y que entonces regrese el agua por infiltración a las profundidades, donde se enriquece con azufre (recuerda que el azufre es parte importantísima del metabolismo del tapete microbiano) ya que hay una bolsa de magma que esta a varios kilómetros de profundidad bajo la Sierra de San Marcos. Como en los géiseres, el agua rica en azufre sube por la presión que genera el calor del magma, pero como es tan profunda la bolsa de magma no llega hirviendo sino que forma las pozas con manantiales que están a 32°C. Por otra parte, no sólo los canales de los ejidatarios están evitando que se recargue el acuífero sino que los grandes agricultores también sacan el agua profunda con pozos para irrigar grandes extensiones de cultivos de alfalfa, ¡el cultivo más “sediento” y por tanto la peor elección de cultivo en un desierto!. Sería una pena que esta máquina del tiempo extraordinaria, que sobrevivió a todas las grandes extinciones se muera en solo unos años porque nosotros, los mexicanos, no sabemos respetar el desierto y cuidar cada gota de agua como lo que es, el elemento más sagrado; el que define la vida en este planeta.

## Si de transferir se trata...

*Yoloxóchitl Sánchez Guevara*

Si observas bien, alrededor de una bacteria existen miles de hilos pilosos, es decir, hilos en forma de pelos. Y si creemos que están allí por algo, podríamos recordar que sirven para conectarse con otras bacterias o con su medio externo y de esa manera mandar mensajes y/o señales.

Sin embargo, cuando un científico del Pacific Northwest National Laboratory, Yuri Gorby, observó por primera vez bacterias que hacían brotar estos diminutos cables de su membrana celular y al mismo tiempo transformaban metales tóxicos, surgieron las primeras teorías que proponían que estas modificaciones anatómicas deberán estar relacionadas con alguna otra función, más allá de establecer una “mera red de amistad bacteriana”.

Estas extensiones de membrana, conocidas como nanocables son aproximadamente de 10 nanómetros de diámetro y pueden agruparse hasta llegar a formar grupos o manojos de hasta 150 nanómetros de ancho.

Ahora se sabe, que estas diminutas estructuras periféricas, también sirven para conducir electricidad. Y mientras más hilos haya, mayor conductividad.

Particularmente, se sabe que *Geobacter* es capaz de producir magnetita, de biodegradar compuestos contaminantes, de habitar en ambientes con uranio y de producir electricidad. *Geobacter* transfiere electrones gracias a que posee una red de citocromos C con grupos hemo distribuidos alrededor de sus membranas: interna, del periplasma y de la externa, y que transfiere sus electrones al hierro, por ejemplo, que es el aceptor final.

El género *Geobacter* ha sido una de las mejores candidatas para estudiar en laboratorios, los procesos de

transferencia de electrones a nuevos dispositivos: las celdas microbianas productoras de electricidad.

Hasta ahora se conocen otras bacterias que pueden ceder electrones, pero aún se conocen todos los mecanismos que les confiere esta “brillante” habilidad: *Rhodospirillum rubrum*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium butyricum* y *Enterococcus gallinarum*.

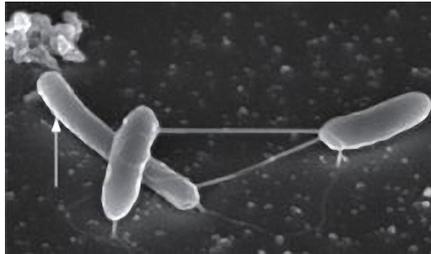
¿Pero que tan abundantes son estas bacterias? Muchas de ellas las puedes encontrar en el subsuelo y de manera natural han utilizado óxidos de hierro para aceptar electrones y con ello oxidar materia orgánica.

Es gracias a este nuevo campo en la producción de electricidad natural y a los mecanismos de comunicación entre microorganismos y su medio en que han existido desde siempre, que ahora podemos entender y pensar en nuevas formas de iluminarnos.

Entender cómo las bacterias pueden convertir energía química en energía eléctrica, será de gran importancia en el campo de la microbiología ambiental, área de la ciencia que propone nuevas formas de energía verde. Éste es un ejemplo más de cómo, en la naturaleza, uno de los grupos más antiguos como las bacterias pueden ser microorganismos con sistemas muy organizados incluso al momento de compartir interesantes formas de energía.

Para saber más:

Yuri A. Gorby *et al.* **Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms** PNAS 2006 103 (30) 11358-11363; published ahead of print July 18, 2006,doi:10.1073/pnas.0604517103



Ejemplo de bacterias del género geobacter unidas por hilos pilosos  
Imagen tomada de: Gorby et al. PNAS 2006.

## Usos y costumbres de las bacterias



*E. coli* DH5 $\alpha$  + *E. coli* PFAJ + *Chromobacterium violaceum* + *Methylobacterium oryzae* en PYCa Imagen: Francisco Ipinza  
(Ver imagen a color en páginas centrales)

*Sabías que...*

*Pyrococcus furiosus* es una bacteria que puede crecer a 105 oC y de la cual se han purificado más de 30 enzimas que trabajan entre 90 y 100°C.

*Streptomyces coelicolor* es una de las bacteria que provocan el olor a tierra mojada al liberar un compuesto aromático llamado geosmina.

*Vibrio harveyi* produce compuestos bioluminiscentes que dan origen a grandes manchas en el mar llamadas “océanos lechosos”.

Las cianobacterias pueden producir minerales y construir grandes estructuras semejantes a grandes rocas.

El 20% de todos los sólidos encontrados en muestras de aire del Golfo de México y del Caribe son bacterias.



## Dulces de Tierra

Rocío Mejía Ornelas

Había un camello que nació de una duna del desierto, y fue la blanca señora que habita las lejanías, esa luna ociosa, quien le pintó el pelaje. Los otros camellos no lo querían por parecerles que ocultaba, bajo su níveo cuerpo, alguna extraña intención. El camello albino, al sentirse solo, lloraba por las noches mientras los demás dormían. *Lawsha 'alla 'h*, decía el camélido entre gemidos, *lawsha 'alla 'h*. Tal vez por eso sus lágrimas nunca cayeron al rostro del desierto. Todas se iban al manto negro donde la luna vivía sola también. Y así el firmamento se tiñó de pálidos resplandores que ahora conoces como estrellas, pero que no son más que las lágrimas de un solitario soñador.

Eleuterio le ha contado ya cinco veces la historia a Ramiro, su nieto de cinco años, que el médico dice no tardará mucho en morir. Es el cuento favorito del niño y también de su abuelo. Eleuterio recuerda, dejando que la tristeza deshoje su corazón marchito, al árabe que le contó esa y más historias, además de enseñarle a elaborar dulces en una tienda de productos libaneses en el centro de la Ciudad de México.

Eleuterio llegó a la tienda del árabe siendo un jovencito de apenas once años. Había dejado su pueblo de Chamilpa atrás. Nada quedaba ahí para él. Sus padres murieron en la Revolución. La capital del país le parecía la última esperanza para no morir igual que ellos. Llegó descalzo y pidiendo trabajo de lavaplatos. Hubo algo que conmovió al árabe, tal vez mirar sus propias pérdidas, sus añoranzas, en los ojos desgastados de aquel muchacho.

A pesar de haber llevado una buena vida en la capital, la nostalgia por su pueblo lo hizo volver siendo adulto. “Te entiendo, Eleuterio, uno debe regresar a su tierra a

morir y convertirse en flor”, fue lo último que dijo el árabe antes de darle un fraternal abrazo. Eleuterio, desde entonces, es el dulcero del pueblo y vive con su nieto en una modesta casa de adobe que siempre huele a leña y azúcar.

Eleuterio nunca ha sabido quiénes son los padres de Ramiro. A la criatura, con apenas unas semanas de vida, se la endilgaron en la puerta de su casa. Eleuterio supuso que Dios, en su infinito e incomprensible humor, como nunca le dio mujer que lo quisiera y, por ende, descendencia alguna, le entregaba el nieto que pudo haber tenido si la suerte no fuera tan elitista o Él, todo omnipotente, menos descuidado con sus hijos más precarios.

– ¿Me voy a ir como las lágrimas del camello albino, abuelito? –Eleuterio está reviviendo las brasas en la cocina; finge no escuchar al niño postrado en el camastro, quien no deja de toser y arder en fiebre. Coloca leños nuevos y sale a fumar un cigarrillo al patio. Escucha con desesperación los quejos de su niño escapando por la ventana; ese canto de gorrión herido es un festín a los oídos de la muerte y Eleuterio lo sabe bien. Por eso aspira despacio el humo que le ayuda a tranquilizar su alma. Se ha terminado el dinero para mandar traer nuevamente al médico, que ya da por desahuciado a Ramiro. Además, no quiere fiarle al pobre dulcero ningún medicamento, por considerarlo una deuda innecesaria “De todos modos se te va a morir, Eleuterio, figúrate si no sería yo un desgraciado en aceptar fiarte a sabiendas que tendrás que gastar en la caja y el entierro”.

El niño llama al abuelo entre quejidos. Le pide un dulce con sabor a tierra.

–Cuando ponías los leños en la cocina, abuelito, el camello blanco entró por la ventana y nos fuimos juntos a dar un paseo por el desierto. Llegamos a un río y la luna se estaba bañando. Es una señora muy guapa, abuelito, y me regaló bolitas de dulces que sabían a tierra. Cuando me

los comí, dejé de toser. Hazme unos, abuelito, ya no quiero estar enfermo.

Eleuterio trata de explicarle que no sabe hacer dulces de tierra, pero el niño está pálido y sus ojos hundidos solo anuncian lo peor, así que el abuelo asiente con la cabeza y busca cumplir su deseo, por si éste fuera el último.

Eleuterio se interna en el campo con rumbo a un ojo de agua adonde suelen ir a nadar. Es de madrugada y la oscuridad se cierne por encima de él. Pero el aroma a humedad lo guía como si fuera un animal sediento. Cuando llega al lugar, toma un poco de tierra fresca y regresa a casa. En la cocina coloca el montículo terroso sobre un plato y lo amasa con piloncillo molido. Mientras moldea con sus palmas las pequeñas bolas, el abuelo solloza. Como el camello albino, Eleuterio impregna en cada dulce la palabra *lawsha 'alla 'h*, que el árabe tuvo a bien decirle que significa “si Dios quisiera”.

El niño tiene mejor semblante. En la mañana le ha dicho a su abuelo si puede prepararle una sopa de hongos. Eleuterio sonrió después de semanas de tener un rostro afligido y la cocinó inmediatamente. Ramiro, por tres días seguidos, sólo quiso probar dulces de tierra los cuales, sin saberlo, guardaban millones de bacterias *Streptomyces coelicolor*, nobles procariontas quienes se distinguen por su ingenio para elaborar antibióticos. Eleuterio no sabe ni siquiera qué es una bacteria, pero algo le dice que en esos dulces trozos de tierra se oculta, a pesar de su incomprensible humor, la bondad de Dios en pedacitos.



W  
O  
2015

## Las Superbacterias

Agustín López Munguía

### Los antiguos cazadores de microbios

En 1926, Paul de Kruif escribió uno de los *best sellers* mundiales de la divulgación de la ciencia: *Los cazadores de microbios*. Se trata de un libro fascinante que describe vida y obra de un grupo de hombres del siglo XIX, que sentaron las bases para conocer y comprender el mundo de los entes vivientes más pequeños de la Tierra y de nuestra relación con ellos. El libro se inicia con la vida de Antonio Van Leeuwenhoek, quien, después de descubrir el microscopio, reportó el primer “avistamiento” de entes desconocidos, abriendo a los seres humanos las puertas de un mundo que, sin saberlo, desde los orígenes de la humanidad “nos vigilaba.” Me refiero, claro, al mundo microbiano. El libro incluye a Louis Pasteur, quien muestra el papel de los microorganismos (las levaduras) en la elaboración de cerveza y vino y deja en claro la existencia de ese mundo hasta entonces desconocido, que si bien no “nos vigila” en el sentido estricto del término, sí juega un papel fundamental en la vida cotidiana del planeta, incluida desde luego la nuestra. Pasteur en aquel entonces dejó claro que las bacterias echaban a perder el trabajo de las levaduras y podría decirse que sus trabajos sientan las bases de la microbiología, de la cual surgen las primeras aplicaciones de la Biotecnología industrial. En el texto de Kruif se incluye también la biografía de Roberto Koch, quien demostró que la convivencia con las bacterias no siempre es pacífica, habiendo habitantes de ese mundo con capacidad para acabar con la vida de los seres humanos. A partir de entonces se inicia una etapa de convivencia con las bacterias, aprovechando a las benéficas y manteniendo alejadas a las indeseables, apli-

cándoles por ejemplo agua y jabón o una muerte con calor (pasteurización) o atacándolas con vacunas y antibióticos. Muchos años más tarde, en la segunda mitad del siglo XX, se consolidó la Biotecnología Industrial, que consiste en darle a las bacterias benéficas espacio en grandes fermentadores para cumplir con la tarea de aportar bienes y servicios a la humanidad. Ellas, encantadas, pues para lograrlo, no requieren de otro esfuerzo que el de reproducirse y con ello producir sustancias de importancia para la sociedad.

Hoy en día, tenemos plena conciencia de que la supervivencia del planeta depende de la armonía entre todas las especies vivas, siendo una de ellas las bacterias. Gran parte de los ciclos que permiten la vida en el planeta, como el ciclo del carbono, del nitrógeno o del agua, por ejemplo, dependen del metabolismo de estos pequeños organismos; sin las bacterias, el reciclado de la materia orgánica no sería posible; es decir, no habría recursos renovables. Por lo mismo, es clave el papel que juegan como aliadas de los seres humanos para enfrentar los retos del siglo XXI. Estos retos se refieren a resolver el problema de la contaminación, del abasto de alimentos, del desarrollo de nuevos y mejores medicamentos, del suministro de agua y particularmente de revertir el desequilibrio ecológico, el cual ha alcanzado dimensiones nunca antes vistas, y se refieren también a la imperiosa necesidad de transformar la industria petroquímica por una bio-industria sustentada en recursos renovables.

Es por ello que con todo este conocimiento se ha generado un nuevo equipo, un ejército diría yo, de “Cazadores Modernos de Microbios”. Estos nuevos buscadores, salen ahora a la caza con dos estrategias: unos buscan dentro de las bacterias, para entender los mecanismos de funcionamiento y diseñar así bacterias modificadas que hagan su trabajo de manera más eficiente o incluso, nuevas tareas. Otros, como los cazadores de Kruif siguen buscando en el

planeta, pero gracias a nuevas herramientas, se dan ahora a la caza por ejemplo de bacterias muy primitivas, de esas que están aquí desde hace casi cuatro millones de años, y que por lo mismo cuentan con propiedades fuera de lo común. Se trata de *superbacterias*, dado que para poder sobrevivir en las condiciones en las que se encontraba la Tierra en aquel entonces requerían de capacidades extraordinarias considerando el calor y la falta de nutrimentos que había. Otros cazadores se han dado cuenta que los métodos de la microbiología de Pasteur y de Koch, no permiten “cazar” a todos, pues hay bacterias (y otros microorganismos) que son “incultivables”.

La capacidad de resistencia de las bacterias deriva en parte de su sencillez. Podría aplicarse aquello de que “bienaventurados los sencillos porque ellos poseerán la Tierra”. Como sea, la célula bacteriana, conocida como célula *procariote* viaja ligera, ya que no posee demasiados componentes en su interior, y su material genético no se encuentra confinado dentro de un núcleo. Al paso de millones de años de evolución, apareció la célula *eucariote*, una forma más refinada y compleja con varios organelos y con el material genético organizado en cromosomas dentro de un núcleo (levaduras, hongos, protozoarios, ...) que más tarde evolucionaron en el planeta, hasta llegar incluso al que escribe y al que o a la que lee. Pero si las bacterias son resistentes, a las *superbacterias* las distinguimos por capacidades extraordinarias que les permiten sobrevivir en condiciones fuera de lo común, tales como las que se vivieron hace cientos de miles de años en el planeta, o las que aún existen en determinadas regiones del mismo. Y es que, mientras que los seres humanos estamos limitados a ciertas condiciones ambientales para poder vivir, tales como la disponibilidad de oxígeno, presión atmosférica, disponibilidad de alimentos y agua, ausencia de gases o ambientes

tóxicos, etc. (algunos incluso ya no sobrevivimos sin aire acondicionado), ciertas bacterias pueden sobrevivir fácilmente en “ambientes extremos”. A ellas podríamos dedicarles todo un libro, pero no sería justo para el resto de las bacterias que también tienen lo suyo.

### Vida en condiciones extremas

Existe una clasificación tradicional de los microorganismos basada en su temperatura idónea para crecer: se distingue así a los que gustan de bajas temperaturas (*psicrófilos*), a los tibios (*mesófilos*) y a los que prefieren el calor (*termófilos*). Sin embargo, ha sido necesario agregar una nueva clasificación para incorporar a un grupo importante de *procariotes* que pueden vivir por arriba de los 100°C: los *hipertermófilos*. Cabe señalar que ningún organismo multicelular (animal o planta) tolera una exposición por tiempos largos a temperaturas superiores a los 50 °C, ni se ha encontrado algún hongo o levadura, que tolere temperaturas más arriba de los 60°C.

Los cazadores modernos de microbios han hecho concreto el término metafórico De Kruif, para realizar expediciones a la caza de microbios en condiciones inhóspitas. Grupos de científicos de un gran número de países parten con destinos múltiples en búsqueda de organismos creciendo a temperaturas extremas y con nuevas características fisiológicas: las aguas termales del Parque Nacional de *Yellowstone*, los sedimentos geotérmicos y las aguas hirvientes de la isla Vulcano en Italia; los famosos *geysers* en Islandia; las chimeneas de corrientes hidrotérmicas en la profundidad de los océanos, de las cuales surgen fluidos supercalentados alcanzando temperaturas hasta de 350 °C con alto contenido de minerales. Desde todos puntos de vista es de sumo interés el conocer cómo es una bacteria

que puede vivir a más de 100 °C, cómo es la estructura de las células, y en particular de sus proteínas. Una de las principales limitantes de las proteínas en general, pero de las enzimas en particular (los catalizadores biológicos), es su baja estabilidad a la temperatura, ya que se destruyen con el calor, cambian su estructura y pierden su función. En este marco, la posibilidad de trabajar a altas temperaturas con proteínas estables es muy atractivo para la industria.

Además, todo es más rápido con el calor (desde el punto de vista molecular y por lo tanto de la velocidad de reacción). Uno de los primeros extremófilos aislados fue *Thermus aquaticus*, una bacteria encontrada en 1968 por Thomas Brock de la Universidad de Wisconsin en Yellowstone, y actualmente la fuente para producir una enzima muy útil en el análisis del material genético: la ADN polimerasa. La lista actual de *hipertermófilos* es muy larga, pero destaca *Pyrococcus furiosus* que crece a 105 °C y del cual se han purificado más de 30 enzimas que trabajan entre 90 y 100 °C.

Otro extremófilo es *Metallospharea sedula* que crece en medios muy ácidos y a 80 °C, y que además para hacerse de energía no requiere de azúcar o de un chocolate, sino que oxida fierro y azufre, dejando como residuo de su alimentación.... óxido de fierro.

Hay un dicho muy corriente que se usa para destacar a un grupo muy diestro en alguna actividad dentro de una determinada población y que dice: “entre ellos, el más chimuelo masca tuercas”. Aquí el dicho se aplica como anillo al dedo. Pero la marca sin duda pertenece a *Pyrolobus fumarii*, quizá salida de los mismísimos infiernos, ya que puede crecer a 113 °C, y logra sobrevivir a las condiciones usuales de esterilización. Pero, cosas de la vida celular: a 90 °C no crece, le da frío.

## Historia de una lata contaminada

Si *Pyrolobus fumarii* o algún otro termófilo fuese un organismo común en nuestro *habitat*, no sería remoto que contaminase con frecuencia nuestros alimentos pasteurizados o esterilizados. Afortunadamente, por extremoso, es lejano. Sin embargo, fue en un alimento esterilizado de donde Arthur Anderson, de la estación experimental agrícola de Oregon en Corvallis, logró cazar a otro microbio con más de dos millones de años de vida en el planeta: *Deinococcus radiodurans*, superbacteria que debe su popularidad a una capacidad fuera de lo común para resistir la radiación ionizante empleada en la esterilización de alimentos. Para récord de Guinness, esta célula puede soportar hasta 3 millones de Rads, donde un Rad equivale a depositar un centésimo de Joule de energía mediante radiación ionizante en un kilogramo de tejido. Baste señalar que de las terribles experiencias de las víctimas de Hiroshima y Nagasaki se sabe que una persona expuesta a una radiación de 500 a 1000 Rads, moriría en un par de semanas. El secreto de esta bacteria estriba en la extraordinaria capacidad que tiene para reparar el ADN roto como consecuencia del bombardeo de electrones expelidos del agua por la radiación gama. En el tiempo que una bacteria normal como *E. coli* repara 2 o 3 fragmentos rotos en su cromosoma, *D. radiodurans* repara 500. Esto lo hace no sólo gracias a la extraordinaria capacidad de la enzima que utiliza para la reparación, sino al hecho de tener entre 4 y 10 copias de su cromosoma, a diferencia de la mayoría de las bacterias que sólo cuenta con una. Siempre se ha especulado que de darse una guerra atómica, solo las cucarachas sobrevivirían a la radiación. Ahora sabemos que no estarían solas, ya que *D. radiodurans* las acompañarían. Pero si tal guerra no ha tenido aún lugar, ¿qué hizo a esta bacteria rosada

con olor a col podrida evolucionar para hacerse resistente? Al tratar de contestar esta pregunta, investigadores de la Universidad Estatal de Louisiana, encabezados por John Battista encontraron que la capacidad de resistir la radiación, está asociada a la capacidad para resistir condiciones de extrema sequía, ya que ésta provoca daños similares a los de la radiación. ¿Y esas condiciones extremas las encontró la bacteria en una etapa muy antigua de su vida en la Tierra? ó ¿quizá en un viaje interplanetario?, aunque no resiste más de 45 °C, por lo que habría tenido que usar para el viaje, como los humanos, una nave espacial. Al menos no hay evidencias para descartar esa posibilidad sobre el origen de las primeras formas de vida en el planeta, que dicho sea de paso, ha sido propuesta por científicos de la talla de Watson, el descubridor de la doble hélice.

El conocimiento genético y fisiológico de *D.radiodurans* y de otras superbacterias permite por un lado, avanzar en el conocimiento sobre la estructura y el origen de las primeras formas de vida en el planeta, y al mismo tiempo se suma a las herramientas biotecnológicas de las que dispone el hombre para resolver problemas graves como lo es el de la contaminación ambiental. En conclusión, adaptando a las bacterias un bello proverbio indio: *“pequeños seres, en pequeños lugares, han hecho -y siguen haciendo- pequeñas cosas que transforman al mundo”*.

## ¿A qué huele la tierra mojada?

*Eunice Alejandra Zayas Del Moral*

¿Alguna vez te has preguntado a qué se debe que cuando llueve “huele a tierra mojada”? Resulta que este característico olor se lo debemos a algunos microorganismos como *Streptomyces coelicolor*, una bacteria del grupo de los actinomicetos cuya genética se estudia ampliamente, ya que tiene un metabolismo secundario complejo y es utilizado en la producción de antibióticos muy comunes como la estreptomicina y el ácido clavulánico.

Ésta bacteria la podemos encontrar creciendo en el suelo, en donde hay vegetación descompuesta. Durante la época de sequía, estos actinomicetos producen esporas que son liberadas posteriormente con la humedad. Cuando la lluvia cae, el vapor de agua que se forma levanta la tierra que se respira como finas partículas que contienen a la bacteria, la cual produce un compuesto aromático llamado *geosmina* (palabra griega que significa “aroma de tierra”).

Este compuesto fue detectado hace algunos años, gracias a la secuenciación del genoma de *S. coelicolor*, cuando al identificar y mutar el gen *cyc2*, que codifica para la germacradienol/geosmín sintasa, se dieron cuenta de que se perdía el olor.

Lo interesante es que este olor no solamente lo percibimos nosotros en la tierra mojada, en el agua o en el vino, también es de vital importancia para los camellos, ya que es gracias al olor de la *geosmina* que pueden localizar agua a muchos kilómetros de distancia. Incluso, estudios recientes han detectado la presencia de este compuesto en cactus y algunas flores del Amazonas, ya que atrae a los insectos en busca de agua y permite la polinización.

En biotecnología, el estudio de la *geosmina* está resultando importante para eliminar su olor de este com-

puesto en la producción de vino y mejorar así su calidad.

Este es sólo un ejemplo de lo interesantes que pueden ser los resultados arrojados por los estudios genómicos y biotecnológicos, pero aún hay mucho por descubrir.

## Y la protagonista de este *film* es... ¿una bacteria?

Eunice Alejandra Zayas Del Moral

Cuando escuchas la palabra *film* ¿qué te imaginas? Probablemente lo primero que piensas es en una película, quizá una de acción, o de comedia, quizás una *hollywoodense*, o una de terror. Los *films*, o películas, se originaron cuando alguien logró plasmar una secuencia de imágenes fotográficas tomadas por una cámara, y reproducirlas en un proyector cinematográfico. A partir del comienzo de este arte se pudo dar mayor difusión al trabajo de actores y actrices, muchos de ellos grandes protagonistas. Pero en esta ocasión quiero platicarte de otro tipo de *films*, unos que en ocasiones necesitan una pantalla más particular para ser vistos, ya que las protagonistas son un poco divas y no siempre se dejan ver fácilmente: los *biofilms*.

¿Qué es un *biofilm*? Un *biofilm* es una asociación de microorganismos (de igual o diferente especie) que puede ser encontrada en un sin fin de lugares. Ser miembro de uno de estos grupos de organismos unicelulares no es una cosa trivial, ya que las bacterias que lo conforman sufren cambios importantes en su estructura y metabolismo para poder pasar de su vida en solitario a formar parte de esta comunidad. Para esto, el grupo de microorganismos se organiza con el fin de comunicarse a través de canales que se encuentran entre ellas, los cuales se forman alrededor de las células, en una *matriz extracelular* formada por *exopolisacáridos*, o sea, están rodeadas por azúcares producidos por las mismas bacterias y enviados al exterior para formar dicha envoltura. A través de estos canales, las bacterias comparten agua, enzimas y nutrientes, formando realmente toda una interesante sociedad cooperativa, en donde la comunicación está mediada por compuestos

químicos muy particulares que científicamente se conocen como *quorum sensing*. Estas señales son las que se encargan de regular la expresión de genes que les permiten vivir en su comunidad.

¿Dónde y cómo podemos ver estos *biofilms*? Están presentes en muchos lugares, algunos tan comunes como tus dientes, en el agua, en la capa superficial de la salsa de los tacos, o incluso, las más impresionantes, a través de imágenes satelitales emitiendo bioluminiscencia en el mar. A continuación te platicaremos un poco más de un caso particular.

### ***Vibrio harveyi* y el mar lechoso**

Imagina que eres el encargado de analizar las fotografías tomadas desde uno de los satélites que siguen su órbita alrededor de la Tierra. ¿Qué observas? Es un paisaje nocturno: luces, muchas luces, cúmulos salpicados por los distintos continentes, una vista muy impresionante, muestra de cómo la población ha logrado conectar redes enormes no sólo de electricidad, sino también de comunicación a pesar de las distancias. Continúas observando las imágenes, y de repente, en la oscuridad del océano, te encuentras con una mancha luminosa y enorme, que, por la distancia a la que se encuentra el satélite, debe abarcar varios kilómetros para poder ser vista desde esa altura. ¿Qué es eso?

Éste fue el caso de una imagen tomada por un satélite hace algunos años al noreste del Océano Índico: la imagen mostraba una mancha luminosa con un área de aproximadamente 15,400 km<sup>2</sup> de área. A este fenómeno le llamaron “océanos lechosos”, dada la apariencia que muestran, e incluso, también ha sido reportado por marineros que lo han observado durante sus travesías nocturnas desde hace cientos de años.

Para estudiar el fenómeno fue necesario que intervinieran biólogos marinos y microbiólogos para poder entenderlo, llegando a la conclusión de que este fenómeno es producido por colonias de bacterias asociadas a microalgas en la superficie de las aguas. El personaje principal es una bacteria *Gram negativa* (cuya característica es que poseen una membrana externa de lipopolisacáridos y una membrana citoplasmática interna) conocida como *Vibrio harveyi*, la cual tiene la habilidad de emitir bioluminiscencia cuando se encuentra formando poblaciones grandes, es decir, cuando hay presencia de las señales de *quorum sensing* previamente mencionadas. Este fenómeno tiene implicaciones muy importantes a nivel ecológico, ya que al formar parte de poblaciones tan grandes pueden llegar a ser virulentas al producir algunas señales de defensa dañinas para algunos animales marinos.

Para saber más:

[www.biofilmsonline.com](http://www.biofilmsonline.com)

<http://biolum.eemb.ucsb.edu/organism/milkysea.html>

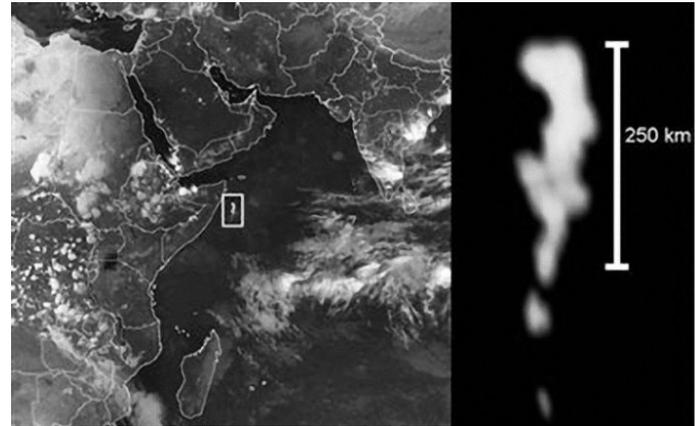


Imagen de satélite donde se observa un biofilm de *Vibrio harveyi*

(Imagen: Steven D. Miller)

(Ver imagen a color en páginas centrales)

## Bacterias constructoras

Eunice Alejandra Zayas Del Moral



Laguna de Alchichica (Imagen: Carlos Lázaro)  
(Ver imagen a color en páginas centrales)

Las cianobacterias son un grupo diverso de bacterias, capaces de llevar a cabo el proceso de fotosíntesis. Estos microorganismos están presentes en la tierra, el mar y otros lugares húmedos, y son importantes ya que algunos miembros de esta familia son los responsables del 25% de la fotosíntesis que ocurre en el planeta.

Además, estas bacterias son de gran importancia en estudios evolutivos, ya que, de acuerdo a la *teoría endosimbiótica* propuesta por Lynn Margulis, se sugiere que son las que dieron origen a los cloroplastos, al internalizarse en otra célula procariota. Por otra parte, se han encontrado restos fósiles muy antiguos, los cuales nos han dado pistas de la antigüedad de sus orígenes. Sin embargo, en esta ocasión te vamos a contar de otro dato interesante acerca de ellas, de lo cual pocos han platicado: su papel como constructoras.

¿Alguna vez has considerado que las bacterias pueden construir y modificar parte del paisaje? Si te dijéramos que son capaces de construir montañas, ¿lo creerías? Existe un proceso conocido como *biomineralización*. La *biomineralización* es la producción de minerales mediada por organismos vivos. No todos son capaces de efectuar este

proceso, sin embargo podemos encontrar algunas especies que lo hacen a lo largo de todos los reinos. Los minerales producidos más comúnmente por organismos vivos son silicatos, carbonatos y fosfatos de calcio.



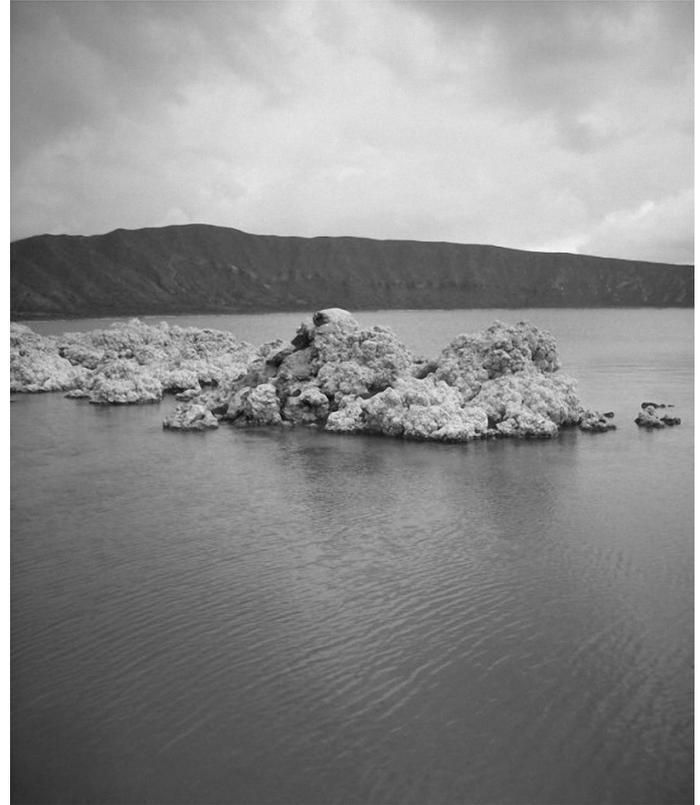
Laguna de Alchichica (Imagen: Carlos Lázaro)  
(Ver imagen a color en páginas centrales)

Investigaciones recientes han encontrado que uno de los grupos capaces de producir carbonatos de calcio son las cianobacterias, y ¿adivina dónde las descubrieron? En México. Existe una laguna en el estado de Puebla conocida con el nombre de Alchichica. Esta laguna tiene formaciones blancas muy características por todo el borde, las cuales son producto de acumulaciones amorfas de carbonato de calcio, magnesio, estroncio y bario de aproximadamente 270 nanómetros de diámetro en promedio, cuyo mecanismo de formación no había sido reportado hasta hace muy poco tiempo.

Este grupo de bacterias se agrupo dentro del orden de las *Gloeobacterales*, y han abierto una nueva puerta al

estudio de los microorganismos que participan en los procesos de biomineralización. Su estudio es de gran relevancia, ya que productos como éstos pueden ser empleados en biomedicina y biomecánica.

La próxima vez que veas un paisaje mineral interesante, piensa que parte de él puede haber provenído de constructores microscópicos que viven en los alrededores.



Laguna de Alchichica (Imagen: Miguel Ángel Rojas)  
*(Ver imagen a color en páginas centrales)*

# Las bacterias y la atmósfera

Ximena Bonilla

Las bacterias son las reinas de la Tierra. Se encuentran prácticamente en todas las superficies y lugares que te puedas imaginar. ¿Quién hubiera pensado que serían también las reinas del cielo?

Pues sí, muchísimas bacterias están suspendidas en el aire, como pasajeras de moléculas de polvo o de otras partículas que se encuentran en la atmósfera o bien, suspendidas por sí mismas. Pero, ¿Qué tantas bacterias hay en el aire a altas altitudes? Son sólo unas cuantas que flotan por ahí esperando caer de nuevo a la superficie terrestre o hay en realidad muchas?

Para responder a estas y otras preguntas, La NASA<sup>1</sup> recolectó en el 2010 muestras de aire a altitudes de entre 8 y 15 Km sobre la superficie del Golfo de México y el Caribe con el objetivo de estudiar la cantidad de bacterias que flotan en la atmósfera, pues el rol que estos microorganismos juegan en la formación de nubes y tormentas podría ser de gran importancia.

Se tomaron muestras antes, durante y después del paso de los huracanes Earl y Karl, y las partículas encontradas se analizaron mediante técnicas moleculares en el laboratorio.

Los resultados de este estudio fueron recientemente publicados en revistas científicas y fue sorprendente encontrar que el 20% de todos los sólidos encontrados en las muestras de aire, eran bacterias.

En total, 314 tipos distintos de bacterias<sup>2</sup> fue-

<sup>1</sup> National Aeronautics and Space Administration. La NASA es la rama del gobierno estadounidense encargada del programa de exploración espacial y de investigación en esta área.

<sup>2</sup> Deleon-Rodriguez N, Lathem TL, Rodriguez-R LM, Barazesh JM, Anderson BE, Beyersdorf AJ, Ziemba LD, Bergin M, Nenes A, Konstantinidis KT.

ron encontradas en las muestras. Podrás pensar que, por ejemplo, los huracanes contienen gotas de agua levantadas del océano y que por lo tanto, el número de bacterias encontradas durante el paso de los huracanes fue mayor que el de antes y después de su paso.

Pues es verdad que las muestras de aire tomadas durante los huracanes contenían un porcentaje relativamente mayor de bacterias marinas que el recolectado antes o después de éstos, pero el número neto de bacterias no fue muy distinto al encontrado antes o después del paso del huracán. De manera increíble, en las muestras de aire de huracán también se encontraron bacterias que se originaron en muchísimos otros hábitats, como selvas o desiertos.

Además, fue igualmente interesante encontrar en las muestras de huracanes bacterias del mismo género de algunos patógenos como *E. coli* o *S. aureus*, que se asocian a enfermedades en humanos. Al analizar estos hallazgos, a los expertos les parece que esto también tiene sentido porque ambos huracanes pasaron sobre zonas altamente pobladas de la Tierra y no es de sorprenderse que, dentro del polvo que se llevaron consigo, había bacterias patógenas.

Gracias a los servicios de meteorología y de monitoreo del clima, fue posible seguir la ruta de las corrientes de aire antes, durante y después de los huracanes. Esto permitió confirmar el origen de los microorganismos identificados en el estudio, corroborando así que bacterias australianas viajaban sobre el golfo de México al igual que bacterias mexicanas y egipcias.

Los microbios de la atmósfera, ¿se encuentran flotando en cantidades suficientemente importantes para afectar el medio ambiente?

Microbiome of the upper troposphere: Species composition and prevalence, effects of tropical storms, and atmospheric implications. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Feb 12;110(7):2575-80. doi: 10.1073/pnas.1212089110. PubMed PMID: 23359712.

Pues fíjate que sí. Las bacterias de la atmósfera participan en la formación de cristales de hielo y favorecen la condensación de la humedad para generar nubes.

El proceso por medio del cual participan en estos fenómenos se llama nucleación y sucede cuando gotas pequeñas de líquido se adhieren alrededor de una partícula que actúa como “núcleo” para después formar, dependiendo de la temperatura y de otras condiciones atmosféricas, gotas de lluvia, granizo o nieve. Estas partículas pueden ser de orígenes muy variados, siendo las más comunes las del polvo y las de arenas finas.

De hecho, uno de los núcleos más eficientes que existen, capaz de formar cristales de hielo a temperaturas consideradas altas para este fenómeno, es una bacteria llamada *Pseudomonas syringae*<sup>3</sup>. Se cree que esta bacteria es tan efectiva para la formación de cristales gracias a proteínas de su membrana celular que son ideales para atraer agua, lo cual facilita la formación de gotas alrededor de este microorganismo.

En las partes más altas de la atmósfera, donde el polvo es raro, las bacterias podrían ser los principales catalizadores de la nucleación para la formación de nubes, lluvia, nieve y hielo y, por lo tanto, la cantidad y tipo de bacterias que se encuentren suspendidas en la atmósfera sobre un determinado lugar o en un determinado periodo del año, podría influenciar de manera importante el clima de esa región de nuestro planeta.

La rama de la microbiología que estudia este tipo de fenómenos se llama aerobiología, y su principal objetivo era, hasta hace muy poco tiempo, explorar la diversidad, abun-

dancia y transporte de microorganismos en la atmósfera.

Gracias a investigaciones recientes, como las que hemos mencionado en párrafos anteriores, el enfoque de la aerobiología ha cambiado en los últimos años. Ahora, el transporte de bacterias por el aire se ve como un fenómeno activo, con consecuencias interesantes para el clima y otros procesos atmosféricos e incluso para las mismas bacterias, pues su viaje por la atmósfera podría estar relacionado con su multiplicación y ciclo de vida.

El reto que esta área de la ciencia tiene ahora, es la colaboración con otras ramas como la física, la meteorología, la agronomía e incluso la exploración espacial y atmosférica, para mejorar el conocimiento que tenemos sobre las bacterias y sus propiedades no sólo biológicas, sino físico-químicas.

Tal vez en un futuro, mediante el adecuado manejo de las bacterias que flotan en la atmósfera, podremos hacer llover o nevar cuando queramos, sin necesidad de ofrecer sacrificios a Tláloc.

---

<sup>3</sup> Bauer, H., H. Giebl, R. Hitznerberger, A. Kasper-Giebl, G. Reischl, F. Zibuschka, and H. Puxbaum, Airborne bacteria as cloud condensation nuclei, *J. Geophys. Res.*, 108(D21), 4658, doi:10.1029/2003JD003545, 2003.



## De bacterias y plantas



*Bacillus thuringiensis*. Imagen: Leivi Clara Portugal  
(Ver imagen a color en páginas centrales)

*Sabías que...*

*Las plantas leguminosas pueden comunicarse a nivel molecular con las bacterias del suelo de la familia Rhizobia .*

*La bacteria Rhizobium radiobacter, es capaz de infectar plantas, produce tumores que liberan opinas. Estas sustancias les sirven de alimento a las bacterias.*



## **Las bacterias del suelo y su enorme contribución al bienestar de las plantas: una historia de ayuda mutua**

*Luis Cárdenas Torres*

Las bacterias del suelo constituyen una enorme comunidad de la cual sabemos poco, pero reconocemos que representan una contribución ambiental muy importante. Antes de entrar en detalle, debemos entender dos cosas: las plantas no son sólo lo que vemos a simple vista, es decir, la parte aérea, sino que también están compuestas por otra parte que es mucho más grande y muy importante, me refiero a la raíz. Una planta lleva un estilo de vida sésil, esto es no se mueve del lugar donde germinó y se arraigó, a menos que alguien llegue y la trasplante. Por lo tanto, la planta tiene que adaptarse a un área limitada de suelo donde habrá de echar sus raíces y obtener los nutrientes que la harán crecer. Sin embargo, obtener nutrientes del suelo no es una tarea fácil, y es ahí donde entran en escena nuestras amigas las bacterias. La presencia de las bacterias en el suelo es algo tan importante que hoy día no podríamos entender la vida sobre el planeta sin esta relación entre las plantas y los microorganismos del suelo. Existen bacterias que promueven o estimulan el crecimiento y desarrollo de las plantas, y esto constituye un enorme campo de estudio. Es una área tan importante que mantiene ocupados a microbiólogos, agrónomos, biólogos, ecólogos, botánicos, taxónomos y biotecnólogos. Esto sin duda radica en la capacidad que tienen las bacterias del suelo para asociarse con las plantas en la zona de la rizosfera (zona de la raíz); la región bajo el suelo que comprende la parte de la raíz de la planta que está en contacto directo con el suelo y que tiene la capacidad de cambiar las condiciones para favorecer la forma-

ción de una microbiota adecuada para su desarrollo. Sin embargo, la vida para las bacterias bajo estas condiciones no es del todo fácil y deben contar con todo un arsenal molecular para contender con las reglas del juego, incluyendo su relación con otras bacterias que son patógenos de las raíces de las plantas y esto vamos a abordarlo más adelante.

### **De qué le sirven las bacterias a una planta, y cómo dos o tres son mejor que uno**

Durante las últimas décadas, la agricultura extensiva se ha basado en la utilización de cantidades industriales de fertilizantes y pesticidas. Este hecho es un cambio notable que surgió como el resultado de la necesidad de alimentar a 7 mil millones de personas, y se cree que para el 2020 serán 8 mil millones. Sin embargo, el uso intensivo de los agroquímicos también nos ha traído algunas desventajas, como la resistencia de los patógenos a los químicos utilizados, y la contaminación del ambiente. De tal manera que hoy día tenemos muchas plagas o enfermedades en las plantas ante las cuales los agentes químicos son pobremente efectivos. No obstante, está emergiendo el control biológico o método agrícola de control (contra insectos, ácaros, malezas, enfermedades de las plantas, etc.) que usa depredadores, parásitos, herbívoros u otros medios naturales, como los microorganismos, para combatirlos. Este método se usa no como una solución única sino que puede complementar en gran medida las prácticas de cultivo actuales para reducir el uso de químicos en la agricultura y tener un manejo agrícola más amigable con el ambiente. De esta manera los microorganismos, lejos de ocasionarnos problemas, nos ayudan a generar estrategias de alianza para combatir a otros microorganismos no deseables o patógenos. Por otro lado, también contamos con los microorganismos que

proporcionan a la planta muchos de los nutrientes y minerales que requieren obtener del suelo para un desarrollo óptimo, esto incluye a las bacterias que fijan nitrógeno, fósforo, hierro, etc., en una forma asimilable para la planta.

Hoy sabemos que la cantidad de desechos que hemos generado afecta la calidad del suelo y rebasa en gran medida la capacidad de las plantas y los microorganismos para recuperar áreas contaminadas con diferentes agentes tóxicos, como metales pesados, hidrocarburos, compuestos radiactivos, etc. Sin embargo, estamos a tiempo para poder generar nuevos enfoques que nos permitan revertir este pronóstico catastrófico. Esto requiere de áreas de interés actual como la fito-remediación (uso de las plantas para recuperar suelos o mantos de agua contaminados); es decir, tanto las plantas como las bacterias en la zona de la rizósfera ofrecen un enorme potencial para poder concentrar o almacenar, incluso biodegradar muchos de los contaminantes. Es claro que las plantas sin las bacterias tendrían menores posibilidades de crecer y desarrollarse en ambientes poco favorables.

### **Bacterias promotoras del crecimiento de las plantas**

Existen bacterias que mantienen una relación muy exitosa con las plantas y que sin mayor problema las estimulan para que aumenten el tamaño de su raíz. Este aumento resulta de gran importancia para la planta, ya que le permite tener una mayor superficie de absorción de nutrientes. Tales bacterias se conocen como bacterias promotoras del crecimiento radicular. Sin embargo, la vida en la rizósfera no es tan fácil y este nicho tiene que ser compartido entre bacterias, hongos, actinomicetos, protozoarios y algas. Las bacterias son sin duda las más abundantes y pueden contarse entre  $10^8$  o  $10^9$  células por cada gramo de suelo, sin duda alguna, una

inmensidad de bacterias y de las cuales solamente hemos podido cultivar muy pocas especies. El tipo de bacterias que podemos encontrar en los diferentes suelos está determinado por varios factores como la temperatura, el tipo de plantas que crecen o el tipo de suelo; algunos suelos son ricos en sales, otros en hierro, algunos otros son muy secos y otros muy húmedos. Si tuviéramos que estudiar la abundancia de bacterias en una zona árida, sin duda alguna, la mayor concentración se encontraría en la rizósfera de las pocas plantas que ahí proliferan. Esto se debe a que, en la zona de la raíz, las plantas secretan una gran cantidad de azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y otros exudados que pueden ser utilizados por las bacterias como fuente de nutrientes. Por último, independientemente del número de bacterias, éstas pueden tener un impacto sobre la raíz de tres maneras: pueden ser dañinas, benéficas o indiferentes.

El efecto benéfico de las bacterias estimuladoras del crecimiento radicular depende de su habilidad para asociarse con la raíz, ayudar a la planta a sobrevivir y mantener un estado de desarrollo sano, inclusive en condiciones desfavorables como la sequía, salinidad o falta de nutrientes. Por ejemplo, estas bacterias pueden facilitar la sobrevivencia al proporcionar a la planta nitrógeno fijado, es decir asimilable, o bien fósforo, que también resulta indispensable para su desarrollo.

Durante los últimos 35 años, se ha intensificado el estudio de una bacteria de vida libre: *Azospirillum*. La interacción que establece *Azospirillum* con las plantas es sin duda uno de los mayores logros de la agricultura sustentable. Se propone que la bacteria puede mejorar el crecimiento de las plantas por la secreción de una o múltiples fitohormonas (moléculas que promueven o inhiben el crecimiento de la planta), por la fijación del nitrógeno, por el aumento en la actividad de membranas, por la toma y

movilización de agua y minerales, o inclusive por la disminución del estrés ambiental. También resulta de gran interés que *Azospirillum* puede controlar la proliferación de bacterias nocivas para la planta (fitopatógenos). El efecto benéfico de la bacteria sobre las plantas puede ser acumulativo, pues un suministro extra de nitrógeno fijado por la misma bacteria y proporcionado a la planta, garantiza un crecimiento sano y vigoroso que se resume en plantas con un mejor estado de desarrollo, mejores hojas o frutos y por lo tanto mejor rendimiento agrícola.

### **Cómo las bacterias estimulan el crecimiento de la raíz de una planta**

Existen varias formas de estimular el crecimiento de una raíz, pero veamos en detalle cómo se logra. El nitrógeno es sin duda uno de los elementos más importantes para el desarrollo de las plantas, y su ausencia limita de manera muy drástica el crecimiento. Consideremos que todas las células necesitan proteínas. Un ejemplo son las enzimas, que son proteínas con una actividad particular dentro de la célula y, mientras nosotros leemos este párrafo, en nuestro cuerpo se llevan a cabo cientos de reacciones químicas ejecutadas por enzimas que nos permiten ver, pensar, mover los ojos y las manos. En una planta sucede lo mismo, la mayoría de las funciones celulares dependen de las enzimas. Por ejemplo, aunque que no sea visible a simple vista, las plantas orientan sus hojas con respecto al sol, hacen crecer sus raíces hacia las fuentes más seguras de agua, abren y cierran sus estomas (células diferenciadas en la superficie de las hojas que permiten el intercambio de gases como oxígeno y  $\text{CO}_2$  en las plantas) para evitar la pérdida de vapor de agua de manera innecesaria durante el día, y además tienen que realizar muchas divisiones celulares para hacer

crecer los órganos y tejidos. Pues bien, las enzimas que ayudan en estas tareas, están constituidas por aminoácidos y el nitrógeno es un elemento estructural indispensable para el funcionamiento de éstos: en ausencia de nitrógeno las plantas se desarrollarían de manera raquítica.

Afortunadamente en la naturaleza existen bacterias de la familia *Rhizobia* que se asocian a la raíz de las plantas leguminosas y que tienen la capacidad de asimilar el nitrógeno atmosférico que transforman en amonio, el cual puede ser asimilado por la planta y transformado en aminoácidos, proteínas y bases nitrogenadas. Estos últimos son elementos estructurales del ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico), los complejos macromoleculares en los cuales se almacena la información genética. De esta manera, podemos entender la contribución colosal que puede tener un microorganismo al bienestar de una planta y cómo la bacteria también se puede beneficiar al obtener fuentes de carbono, como azúcares, que le permiten crecer de una mejor manera en el suelo. Las bacterias de la familia *Rhizobia* pueden fijar el nitrógeno atmosférico porque tienen una enzima que se le denomina nitrogenasa. Esta enzima es capaz de tomar el nitrógeno atmosférico y fijarlo en amonio, un proceso que el hombre sólo puede hacer a nivel industrial en altas temperaturas y quemando grandes cantidades de petróleo, un producto que es no renovable. Durante muchos años ha existido un enorme interés por aumentar la actividad de la enzima nitrogenasa de las bacterias, o incluso, aislar todos los genes que codifican para todas las proteínas involucradas en la fijación de nitrógeno e introducirlas en las plantas no leguminosas como el maíz, trigo o arroz para que puedan ahora fijar su nitrógeno de manera independiente. Sin embargo, esta idea sigue siendo un sueño a largo plazo, pero bien vale la pena dedicarle mayores esfuerzos.

Existen otras formas directas con las cuales los microorganismos promueven el desarrollo en las plantas, por ejemplo la absorción del fósforo, que es importante para el crecimiento y mantenimiento de las funciones celulares. Por ejemplo, el ATP, la moneda de cambio energético de la célula, está constituido por fosfato. Existen bacterias que ayudan a solubilizar el fosfato presente en el suelo para que las raíces lo tomen más fácilmente, no obstante, los resultados en campo no han sido tan espectaculares y sólo se vuelven significativos cuando se mezclan con bacterias que fijan nitrógeno. Esto nos hace pensar que aún hay muchas cosas que aprender, y que dos microorganismos promotores del desarrollo pueden actuar de manera sinérgica y ser mejor que uno.

Por otro lado, el hierro es un elemento importante para el crecimiento de las plantas. Este elemento ayuda a las plantas a mantener un color, tamaño y vigor. Cuando las plantas sufren la deficiencia de hierro, las hojas se tornan amarillentas, blancas o rojizas y las hojas nuevas que emergen son muy pequeñas. Hay que recordar que la ferredoxina, un componente clave de la fotosíntesis de las plantas, también requiere de hierro para su funcionamiento correcto. Por otro lado, el hierro también resulta indispensable para el desarrollo de todo microorganismo, incluyendo los presentes en la zona de la rizósfera, de tal modo que las bacterias se han valido de la secreción de moléculas de bajo peso molecular que se denominan sideróforos. Estos sideróforos capturan al hierro y lo transportan al interior de la bacteria a través de receptores que se encuentran en su membrana y que unen con gran afinidad el complejo hierro-sideróforo. La ventaja de los sideróforos es que pueden servir también como donadores de hierro a las plantas y promover su crecimiento y buen desarrollo. De hecho, la alta competitividad que se da entre las bacterias del suelo

estriba en la capacidad de utilizar los mejores mecanismos que les permitan competir por la fuente de hierro. Existen alrededor de 500 diferentes sideróforos, y la versatilidad para utilizarlos define la comunidad bacteriana que tiene mejores posibilidades de instalarse en la zona radicular.

Las plantas necesitan de las fitohormonas así como también nosotros necesitamos hormonas para poder crecer, desarrollarnos y realizar muchas de las funciones de nuestras células. Las células de la planta necesitan saber cuándo alargarse, dividirse, o responder ante un estímulo. Por ejemplo, *Azotobacter* y *Rhizobium* tienen la capacidad de producir citocininas y giberelinas, dos fitohormonas vegetales que pueden actuar como promotoras del crecimiento de la planta. Sin embargo, existen bacterias patógenas que también las producen, pero en mayor concentración e inducen una respuesta opuesta, que se resume en una inhibición del crecimiento. Esto nos demuestra que los niveles producidos resultan muy importantes para desencadenar un efecto positivo o negativo en el desarrollo de la planta.

Por otro lado, las bacterias también tienen la capacidad de producir ácido indolacético, una molécula que actúa igual que la fitohormona auxina. Esta fitohormona afecta de manera notable la división celular, la elongación y la diferenciación. Además, también está relacionada con la germinación de la semilla, desarrollo de la raíz, la regulación de la respuesta a la luz y gravedad, así como con procesos de fotosíntesis. Sin duda alguna, el ácido indolacético producido por las bacterias tiene un efecto promotor del desarrollo de la planta a las concentraciones adecuadas.

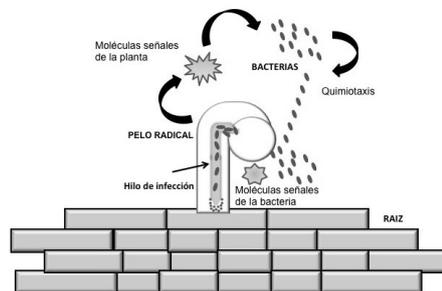
Finalmente, las bacterias del suelo también tienen la capacidad de regular los niveles de etileno (otra fitohormona) en la planta, que es una molécula simple con actividad biológica fácilmente observable. Esta hormona afecta el crecimiento de las plantas, la maduración de los frutos, la

floración, la germinación, la caída de las hojas, la síntesis de otras hormonas e inhibe la interacción de la raíz con bacterias del suelo que fijan nitrógeno, como *Rhizobium*. Las bacterias han adquirido la capacidad de expresar un gen que codifica para una proteína y que se denomina 1-amino-ciclopropano-i-carboxilato (mejor conocido como ACC) deaminasa. En resumen, la ACC deaminasa toma el etileno y lo degrada, esto resulta en la capacidad para disminuir los niveles de etileno en las plantas y evitar así el efecto inhibitorio que éste pueda ejercer sobre el desarrollo de la raíz o incluso favorecer los procesos de nodulación por *rhizobium*.

En los párrafos anteriores se mencionó que muchas de las bacterias benéficas son muy eficientes para controlar la proliferación de microorganismos patógenos, incluyendo los hongos ¿cómo lo hacen? Se sabe que muchas bacterias son buenas para producir toda una serie de antibióticos, y de esta manera pueden limitar el crecimiento de patógenos. Sin embargo, también pueden producir una gran cantidad de enzimas como las quitinasas, celulasas, y glucanasas que pueden afectar la pared celular tanto de las bacterias como de los hongos. También producen otras enzimas como proteasas y lipasas que afectan la pared celular de bacterias patógenas. Esto, a corto plazo, constituye una gran herramienta por el potencial para complementar la agricultura intensiva. Además, existe otro gran potencial de las bacterias para utilizarlas en la agricultura sustentable y consiste en la propiedad intrínseca de muchas de ellas para estimular los mecanismos de defensa de la planta sin llegar a dañarla; esto se conoce como resistencia sistémica inducida: de alguna manera la información se queda en la memoria de la planta desde la semilla, lo que permite en un futuro inducir una respuesta efectiva e inmediata ante un patógeno real, esto es el equivalente a la inmunización que las personas adquieren durante la niñez y que las mantie-

nen protegidas mucho tiempo después ante la respuesta a un virus o bacteria.

El suelo que rodea esta zona constituye un terreno altamente disputado por los microorganismos que ahí habitan valiéndose de mecanismos moleculares que le permiten inhibir el desarrollo de los patógenos, o assimilar los nutrientes del suelo de una manera más eficiente. Todo esto sin olvidar la relación estrecha que tienen las bacterias promotoras del crecimiento para preservar el bienestar de la planta huésped, quien proporciona los nutrientes necesarios para facilitar la vida en el suelo. Si consideramos los millones de microorganismos que habitan en un gramo de suelo, seguramente reconsideraremos el valor que tiene este pedazo de tierra desde el punto de vista de microbiología de suelos y lo mucho que aún tenemos que aprender de esto.

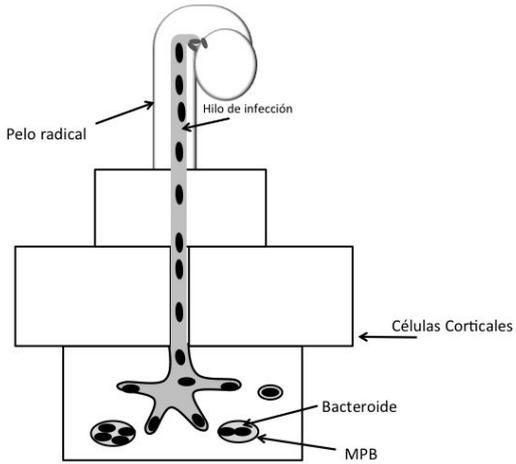


### Las plantas leguminosas pueden comunicarse a nivel molecular con las bacterias del suelo de la familia *Rhizobia*

Las bacterias del suelo han evolucionado de manera conjunta con sus plantas huéspedes al grado de que los sistemas de comunicación se han hecho cada vez más sofisticados. Por ejemplo, una de las asociaciones mutualistas (en las

cuales cada participante se ve beneficiado) muy importantes es la que se da durante la simbiosis que se establece entre una leguminosa y una bacteria del género *Rhizobium*. Esta relación llega a ser altamente específica, de tal manera que una especie de *Rhizobium* puede interactuar con una especie de una leguminosa huésped. Para iniciar este diálogo o comunicación entre la bacteria y el huésped, la planta secreta moléculas que le permiten atraer a las bacterias a la zona de la rizósfera, este proceso se llama quimiotaxis. Cuando la bacteria llega a la rizósfera, empieza a proliferar y produce moléculas señales para comunicarle a la planta que ya está ahí. Cuando este intercambio de señales entre la planta y la bacteria se establece, la planta permite que la bacteria pueda ingresar a las células de la planta, generando un nicho adecuado. Este nicho está formado por una estructura que se conoce como nódulo dentro del cual se encuentran células especializadas donde las bacterias viven en forma de simbiosomas, pequeñas agrupaciones de bacterias rodeadas por una membrana común. Dentro de estos simbiosomas la bacteria puede instalarse y adquirir la capacidad de un simbiote, es decir un microorganismo capaz de expresar toda una serie de genes que codifican proteínas que le permiten a la bacteria fijar el nitrógeno atmosférico que será utilizado por la planta. La planta a su vez, recompensará a la bacteria proporcionándole una fuente de alimento para su crecimiento. Sin duda alguna para la bacteria resulta de gran ayuda tener una fuente segura de nutrientes y para la planta una fuente segura de nitrógeno fijado. Este tipo de asociación tiene una gran relevancia actual, sin embargo, es un conocimiento que nuestros mismos ancestros agricultores lo supieron explotar desde hace mucho tiempo. Así lo demuestra el hecho de que nuestros antepasados fueron verdaderos maestros de la rotación de los cultivos. Esto consistía en sembrar

durante una temporada plantas leguminosas como el frijol u otras leguminosas (una planta que puede enriquecer el suelo con nitrógeno) y posteriormente un cultivo como el maíz (un gran consumidor de nitrógeno). Esto permitía restablecer las condiciones óptimas del suelo, algo que sin duda alguna se convirtió en una regla. Hoy día, muchos de estos principios básicos se han perdido y los monocultivos tienden a empobrecer en gran medida los suelos, por lo que es importante retomar mucho de lo que ya sabíamos y de lo que se sabe hoy día sobre como los microorganismos del suelo pueden ayudar a mejorar nuestros cultivos. Actualmente existen varias compañías que se dedican a fabricar bioinoculantes o biofertilizantes que no son otra cosa que cultivos de bacterias benéficas, de una o varias especies que se sabe que mejoran la productividad de las cosechas. Debido a que su base son microorganismos vivos estos se denominan bioinoculantes y la industria del cultivo de la soya, por ejemplo, está ampliamente beneficiada por el desarrollo de estas biotecnologías. En México también contamos con pioneros en esta área y el Dr. Jesús Caballero, investigador del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México fue un promotor importante en el desarrollo de esta tecnología en México. Sin duda alguna, ésta constituye un área de la que muy pronto habremos de impulsar más para un mejor uso integral de nuestros suelos agrícolas.



Imágenes proporcionadas por el autor.



Nódulos simbióticos en raíces de *P. vulgaris* (frijol) Imagen:  
Neftaly Cruz  
(Ver imagen a color en páginas centrales)

## *Agrobacterium tumefaciens* y el hombre araña

Alfonso Sierra Sarabia

La bacteria *A. tumefaciens*, recientemente cambiada de nombre y apellido a *Rhizobium radiobacter*, es un organismo habitante del suelo. La bacteria es capaz de infectar plantas y alterar la producción de nuevas células en el tejido infectado para finalmente formar un tumor en la planta.

El tumor secreta unos complejos químicos denominados *opinas* que sirven de alimento para la bacteria. Éste organismo se ha vuelto un protagonista en el trabajo de la biología experimental debido a algunas características que se describen más adelante.

Pero antes quiero preguntarte algo; ¿viste la película “El hombre araña”?, o ¿has leído la historieta? Bien, si lo has hecho, recordarás que las habilidades del joven Parker fueron obtenidas en un laboratorio después de ser mordido en la mano por una araña mutante.

La mutación es una alteración del código genético de un organismo, y puede ocurrir por diversos motivos. Yo hablaré de un tipo de mutación en la cual ocurre la inserción de fragmentos de ADN (ácido desoxirribonucleico), de un organismo donador a un organismo receptor. El receptor será llamado entonces, *organismo transgénico* o también organismo genéticamente modificado (OGM).

Un OGM, en el caso de ser un animal, no tendrá dos cabezas, ni cuatro brazos; si es una planta, tampoco se levantará del suelo, ni cobrará venganza por la deforestación, no. Un organismo genéticamente modificado, adquiere características del organismo donador, por lo cual es diferente de un organismo que no lo está. En el caso de las

plantas, algunos OGM pueden obtener mayor resistencia a temperaturas gélidas, a temperaturas altas o a períodos de sequía, por lo anterior podríamos llamarla una súper-planta.

Vamos entendiendo por qué Peter Parker poseía el famoso “sentido arácnido” y escalaba paredes.

Bien, *A. tumefaciens* posee una capacidad similar, sólo que la bacteria no muerde. Estudios realizados han permitido a los científicos descubrir que la transferencia de los genes ocurre a través de un canal o túnel de proteínas entre la pared celular y la membrana. El canal forma un puente entre la bacteria y la célula vegetal, a través del cual viajan los genes de la bacteria que formarán parte del ADN de la planta. Los genes viajan muy bien empaquetados y protegidos, envueltos por otras proteínas que evitan que sean degradados o atacados dentro de la célula vegetal.

Un hecho importante que atrajo la atención de los científicos para utilizar la bacteria en la biología experimental es que una vez que los genes forman parte del ADN de la planta, la actividad de éstos comienza a alterar el funcionamiento de las células vegetales, a pesar de la ausencia de *A. tumefaciens*.

Imagina que la célula es una fábrica que acelera su producción, al perder el control en la división celular y producir muchas descendientes. Las células abundantes recién formadas inician la producción de las *opinas*, que serán aprovechadas por la bacteria como fuente de carbono para alimentarse.

Este organismo es muy envidioso, ya que exclusivamente la bacteria que infecta una célula o un grupo de células puede aprovechar las *opinas* producidas por la célula vegetal, por lo cual este proceso es altamente específico.

Las características mencionadas hacen de esta bacteria una herramienta formidable en el campo de la biotec-

nología, la cual se enfoca en resolver las necesidades del hombre.

El ser humano ha progresado junto con la biotecnología desde que comenzó a fermentar granos para producir las primeras bebidas alcohólicas, las cuales eran utilizadas en ceremonias a sus dioses. La biotecnología estuvo presente desde el primer pan que fue horneado en hornos de piedra.

Actualmente, además de la alimentación, la biotecnología resuelve otras necesidades del hombre, por ejemplo en el campo de la medicina se desarrollan antivenenos que responden mejor a la toxicidad de alacranes y serpientes. Dentro del aspecto ecológico se trabaja con algunos organismos modelo que tienen la capacidad para remover del suelo y agua contaminantes como los metales pesados y otros químicos nocivos, producto de la actividad de fábricas y minas. También la biotecnología está en vías de resolver problemas causados por la sobre población y la carga excesiva que provoca en el ambiente.

Dentro del rubro agroalimentario, *A. tumefaciens* está siendo estudiada con el fin de aprovechar su capacidad para transferir genes que expresan características deseables de un organismo en particular a una especie de interés agrícola. Por ejemplo, el maíz, arroz, avena, frijol y soya entre otros.

Por ello se espera que nuestra bacteria permita mejorar la alimentación y por consecuencia la calidad de vida de los habitantes de los países más pobres (vanidosamente llamados en vías de desarrollo), a través de la mejora de cultivos que son base de la alimentación de muchos pueblos.

La próxima vez que te sientes a la mesa a comer pan o la próxima ocasión que recibas una inyección puedes estar totalmente seguro que a través del esfuerzo de mu-

chos científicos y la nobleza de *A. tumefaciens*, la biotecnología se desarrolla para mejorar tu vida.

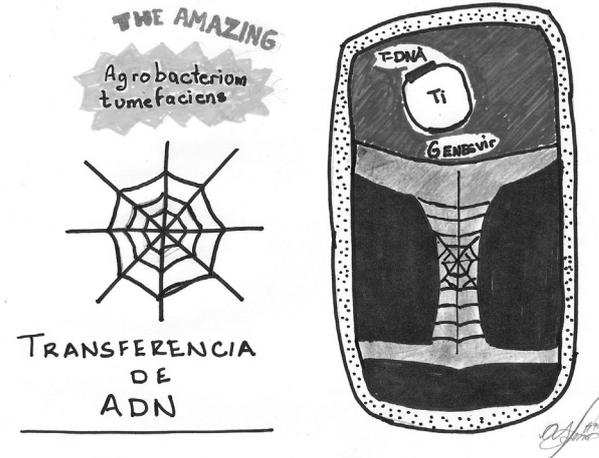


Imagen proporcionada por el autor  
(Ver imagen a color en páginas centrales)



*Microbacterium* sp. Imagen: Luis Servín



Estromatolitos en Cuatrociénegas, Coahuila, Méx.  
(tomada por el Inst. de Ecología, UNAM)



Origen de las moléculas de la vida.  
Imagen tomada de la NASA



Tapete microbiano. (Imagen: Ana Gutiérrez)



*E. coli* DH5 $\alpha$  + *E. coli* PFAJ + *Chromobacterium violaceum*  
+ *Methylobacterium oryzae* en PYCa  
Imagen: Francisco Ipinza

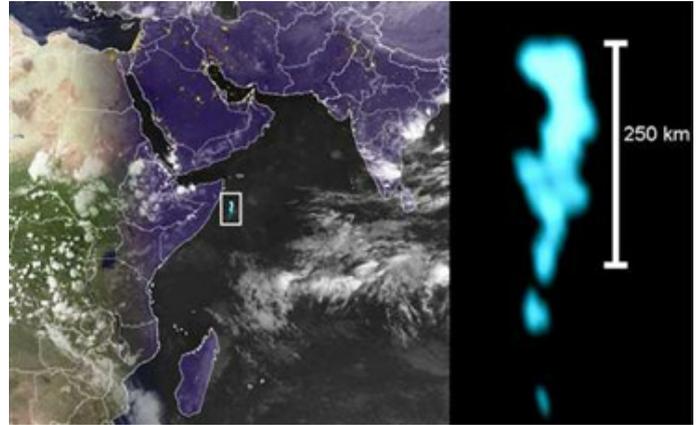


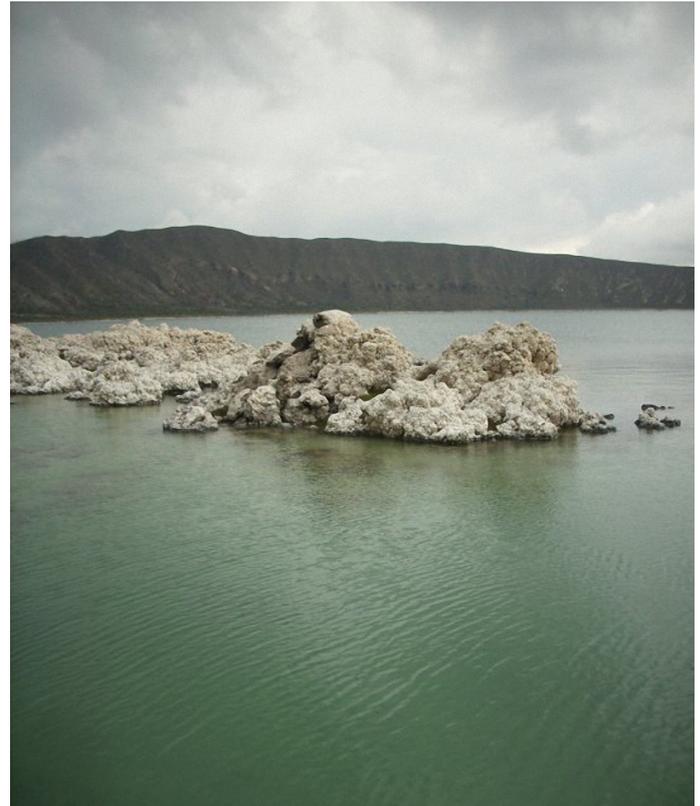
Imagen de satélite donde se observa un biofilm de *Vibrio harveyi*  
Imagen: Steven D. Miller



Laguna de Alchichica (Imagen: Carlos Lázaro)



Laguna de Alchichica (Imagen: Carlos Lázaro)



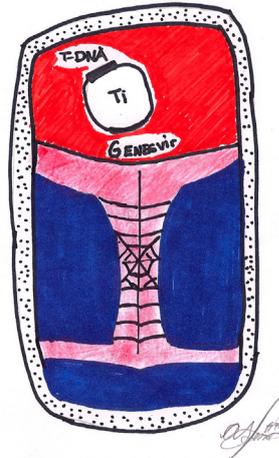
Laguna de Alchichica (Imagen: Miguel Ángel Rojas)

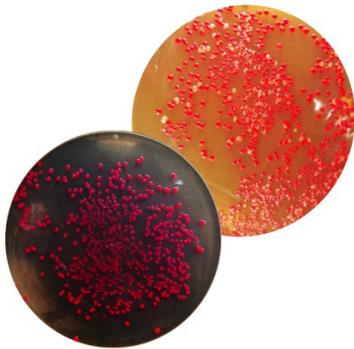


*Bacillus thuringiensis*. Imagen: Leivi Clara Portugal

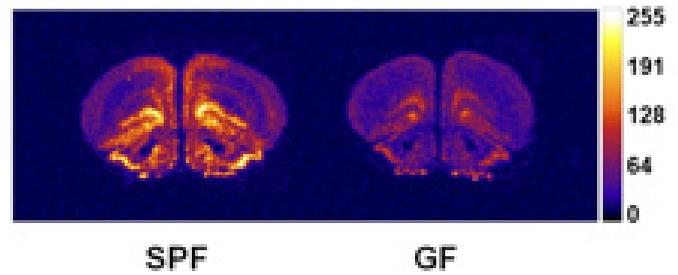


Nódulos simbióticos en raíces de *P. vulgaris* (frijol)  
Imagen: Neftaly Cruz

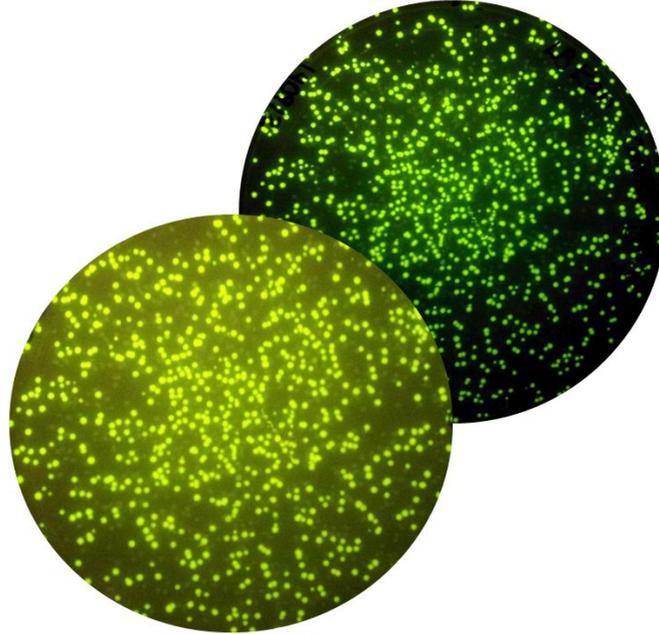




Bacterias *E. coli* que expresan proteínas fluorescentes  
Imagen: Carmen Santana Calvo



Cortes transversales de cerebros de ratones jóvenes nacidos de madres SPF o GF.



Bacterias *E. coli* que expresan proteínas fluorescentes  
Imagen: Yoloxochitl Sánchez Guevara

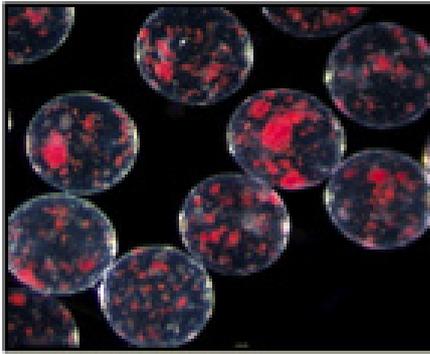


Figura 1. Células de hígado (hepatocitos) inmovilizadas en geles de alginato

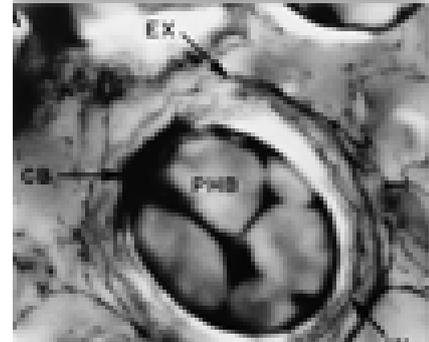


Figura 3. Microfotografía de un quiste de *Azotobacter vinelandii*

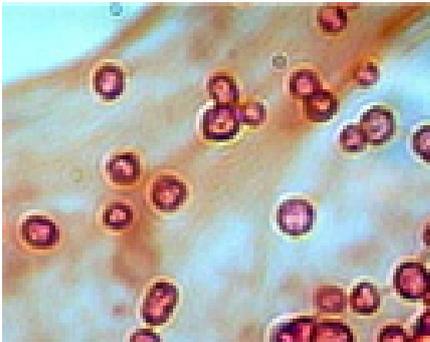


Figura 2. Matriz de anato en bacterias de *Azotobacter vinelandii*

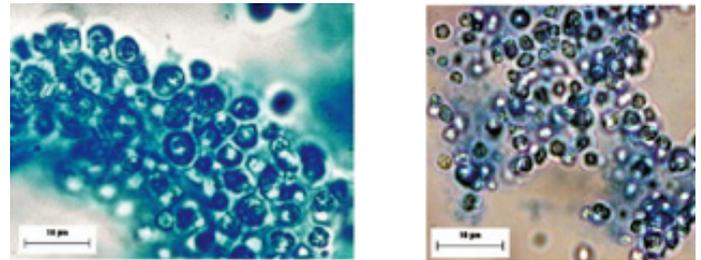
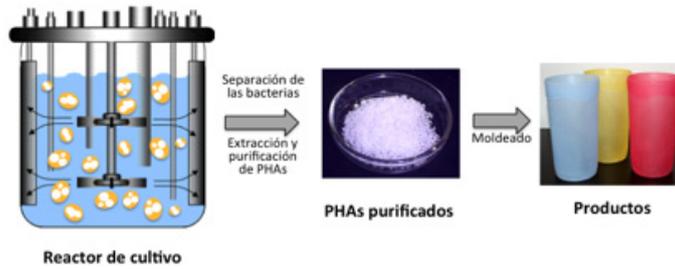


Figura 4. Agregados formados por *Azotobacter vinelandii*



Esquema de la producción de bioplásticos usando a la bacteria *Azotobacter vinelandii*.



Imagen: Yoloxochitl Sánchez Guevara



## Las bacterias y el hombre



Bacterias *E. coli* que expresan proteínas fluorescentes  
Imagen: Carmen Santana Calvo  
(Ver imagen a color en páginas centrales)

*Sabías que...*

*En la actualidad existen más de 10,000 diferentes tipos de antibióticos.*

*El olor desagradable del sudor es producido cuando éste entra en contacto con bacterias que producen desechos de ácidos grasos y amonio.*

*Se han usado toxinas bacterianas como armas biológicas. Un ejemplo es el ántrax o las toxinas botulínicas.*

*Escherichia coli es la bacteria que más se utiliza en estudios de laboratorio. Fue aislada de heces fecales de humanos sanos.*

*El ser humano tiene de 105 a 108 bacterias por gramo de ileum; de 108 a 1011 por gramo de colon y de 10,000 a 100,000 por gramo de duodeno. Sólo existen 10,000 por gramo en un estómago sano.*

*Según las estadísticas, Pseudomonas es el género de bacterias más encontrado en los grandes hospitales.*

*El agente causal de sífilis es la bacteria Treponema pallidum.*

*Se ha propuesto que el microbioma intestinal podría modular señales al cerebro a través del nervio vago, unos de los nervios que inerva el sistema gastrointestinal*



## Antivida... antibacterias...antibióticos

*Yolóxochitl Sánchez Guevara*

Así como existen los antiácidos, los anticipados, los antigripales, los anticongelantes, los anticuados, los anticuerpos, los antirrábicos y los antioxidantes, pues también existen los antibióticos.

¿Puedes imaginar que alguna vez existió un médico británico llamado Alejandro Fleming, quien, trabajando en el laboratorio, por error descubrió que unos hongos secretaban una sustancia que inhibía el crecimiento de un cultivo de bacterias? Fue gracias a su curiosidad que logró hacer uno de los descubrimientos más importantes en la medicina moderna: el primer antibiótico que se extrae del hongo del género *Penicillium*.

Y si crees que no los conoces, tan sólo basta pensar en la penicilina, que seguramente has visto en el botiquín casero, en la vitrina de alguna farmacia o en alguna granja donde engordan vacas o cultivan vegetales.

Estos compuestos “antivida” son sustancias químicas que pueden ser producidas por un ser vivo o crearse de manera sintética. Es en 1942 cuando se utiliza por primera vez el término *antibiótico*, nombrado por el ucraniano Selman Waksman quien en 1952, junto con Alejandro Fleming, ganarían el Premio Nobel en Fisiología y Medicina. La penicilina en producciones de gran escala fue gracias a los trabajos del australiano Howard W. Florey y del alemán Ernst B. Chain.

Los antibióticos pueden considerarse como el gran descubrimiento de la medicina Occidental y la historia cuenta que en China, por ejemplo, se han administrado desde hace muchos siglos. Su uso en otras partes del mundo, data de finales del siglo XIX, cuando se usaron de manera más metódica en diversas enfermedades.

Ahora se sabe que existen varias clases de antibiótico, por ejemplo, si consideramos la relación entre su actividad y la concentración, podemos tener grupos como las *quinolonas*, los *betalactámicos*, las *sulfamidas* y los *aminoglucósidos*. Pero si nos referimos a su estructura química, habrá otro tipo de clasificación que integran al menos veinte más, como las *cefalosporinas* y las *tetraciclinas*, por mencionar sólo un par.

Los antibióticos tienen diferentes mecanismos de acción dependiendo de los organelos celulares que alcancen. Por ejemplo, para las bacterias con pared celular, los antibióticos bloquean la síntesis, exportación, organización o formación de esta estructura. Actúan específicamente sobre los enlaces de *peptidoglicanos*. La célula sufre un cambio de presión osmótica, aumentando la presión interna sobre la membrana, liberando el contenido celular y provocando que la célula muera.

Otros antibióticos cambian la permeabilidad de la membrana celular, principalmente inhibiendo la síntesis de sus constituyentes.

Otro tipo de antibióticos producen moléculas destructivas (los radicales hidroxilos) y dañan al ADN de las bacterias, por una serie de eventos celulares. Los hidroxilos producen daños principalmente en las guaninas, que es una de las cuatro bases de nucleótidos de ADN. Cuando la guanina dañada se inserta en la molécula de la herencia, las células la identifican, tratan de corregir el error, pero lo único que hacen es acelerar su destrucción.

Otro organelo que puede verse afectado son los ribosomas, encargados de sintetizar las proteínas, por lo que al no tener las suficientes proteínas, las bacterias simplemente no se forman o sufren alteraciones que no les permiten seguir como patógenas.

Los antibióticos pueden considerarse como un gran avance en la medicina moderna; sin embargo, es momento de recordar aquella famosa frase de nuestras abuelas: “todo en exceso es malo” y aunque seguramente ellas no llevaron cursos avanzados de microbiología, sin querer, se estaban refiriendo a la resistencia de las bacterias ante los antibióticos.

Actualmente, por el uso indiscriminado de los antibióticos y la capacidad de las bacterias de volverse resistentes, podríamos enfrentarnos nuevamente a enfermedades infecciosas que en el pasado dieron mucha lata a la humanidad, tales como: la neumonía, la tuberculosis, la meningitis, la fiebre tifoidea y la disentería, por mencionar algunas, o simplemente, destruir la flora bacteriana normal, que sin ser patógena, nos ayuda, por ejemplo a digerir alimentos.

La resistencia a antibióticos puede ser por inactivación o modificación en la estructura química del antibiótico, porque cambie su sitio al cuál va dirigido, porque se diluya o disminuya la cantidad del antibiótico o porque se altere la ruta metabólica que deba ser inhibida.

El uso de los antibióticos debe ser bajo observación y prescripción de un buen médico con buenos conocimientos de microbiología y un buen sentido común para saber que antes de recetar un antibiótico es necesario conocer el peso, edad, alergias e historial médico del paciente, entre otras cosas. Además, la dosificación y la duración del tratamiento deben estar bien establecidas dependiendo las condiciones generales del paciente o gravedad del caso. Y recuerda, ¡tampoco se trata de deshacerte de toda tu microbiota del intestino!

Pero aún sin estar enfermos, podemos recurrir, como método de prevención, a los antibióticos naturales que encontramos en la cocina o incluso en el jardín, como

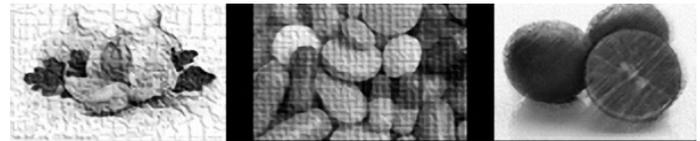
la viscosa miel, los olorosos ajos, las cebollas que nos causan torbellinos de lágrimas, el jugoso limón, el astringente tomillo y muchos otros productos vegetales que estimulan mecanismos naturales e incrementan las defensas de nuestro cuerpo, pero que hasta ahora no pueden sustituir del todo a los antibióticos que con tanta paciencia, la ciencia nos ha brindado.

Hoy en día, nuestra llamada esperanza de vida ha aumentado, y en mucho se debe a que las infecciones ya no son una causa primordial de muerte, gracias a que existen los tratamientos con antibióticos.

Entonces, algunas veces el efecto “antivida” puede ser sinónimo de buena salud.

Para aprender más:

- [http://www.comoves.unam.mx/assets/revisita/158/aquiestamos\\_158.pdf](http://www.comoves.unam.mx/assets/revisita/158/aquiestamos_158.pdf)
- <http://www.comoves.unam.mx/numeros/articulo/172/virus-contra-bacterias-renovada-esperanza-para-tratar-infecciones>
- <http://www.comoves.unam.mx/numeros/articulo/106/la-vida-interior>
- Proteínas antibióticas en secreciones de anfibios y en venenos de abejas, arañas y alacranes. Alexis J. Rodríguez Solís, Elba C. Villegas Villareal y Corzo Burguete Gerardo A. La Unión de Morelos, Lunes 9 de diciembre de 2013. Pág. 39



## ¡No soy yo, son mis bacterias!

*Eunice Alejandra Zayas del Moral*

Imagina que te vas a acampar al bosque. Es verano, el clima es cálido; recientemente terminó la temporada de lluvias, por lo que hay humedad en el ambiente. Tras varias horas de caminar por el monte, disfrutando el paisaje y el silencio, te estiras un poco y te sientas a descansar; entonces tu compañero de viaje te dice: “¡Pero qué mal olemos!” Es probable que, en lo que encuentras el río o regadera más próximos, inmediatamente saques tu desodorante en aerosol y te des una fumigada con él. Sin embargo, el sudor de tu cuerpo sigue ahí, y sólo has utilizado la forma comercial de ocultarlo, pero ¿qué causa ese olor tan característico?

Resulta que el sudor que producen las glándulas de nuestro cuerpo, por sí solo, es totalmente inofensivo, estéril e inodoro; si lo piensas bien, no siempre el olor es tan penetrante. El asunto está en que, de manera natural, nosotros tenemos un gran número de pasajeros a bordo en nuestro cuerpo: las bacterias. Se sabe que hay alrededor de 10 bacterias por cada célula epitelial, por lo que somos el medio de cultivo en donde ellas crecen. Desde el momento en que el sudor es excretado, estos microorganismos comienzan a degradarlo, generando desechos, como ácidos grasos y amonio, que son los principales causantes de estos desagradables olores.

Existen diferencias químicas en cada persona, así como diversidad en las bacterias que viajan como pasajeros de cada uno, por lo que el aroma varía entre nosotros. Muchos estudios han sido dirigidos a cómo las bacterias degradan las secreciones del cuerpo, ya que, como podrás imaginar, al año la gente gasta miles de pesos en desodorantes, y la industria está muy interesada en buscar cómo hacer estos productos más eficientes.

¿Por qué deberíamos preocuparnos por esto? Actualmente están en el mercado los llamados anti transpirantes, que a la larga tapan los poros y evitan que el cuerpo secrete toxinas que necesita eliminar. Esto es peligroso para nuestro cuerpo ya que vamos acumulando desechos que no deberían permanecer en nosotros. ¿Qué hacer ante esto? Primero que nada, mantener la higiene personal, ya que cada que nos bañamos, evitamos que la población de bacterias se incremente. Por otra parte, a veces, más que un desodorante, necesitamos algo que controle la cantidad de bacterias que hay sobre nuestro cuerpo, por ejemplo, algo que cambie la acidez del ambiente en el que viven, a lo cual son sensibles la mayoría de estos microbios. Uno de ellos por ejemplo es el vinagre, el cual varios recomiendan para controlar tanto hongos como bacterias en la piel, una limpieza con un paño empapado en éste, pueden ser suficientes para controlar el exceso de bacterias, y por tanto, los malos olores. Así que, la próxima vez que notes que creas que tienes bacterias de más sobre ti, y que la gente empiece a notarlo, antes que el desodorante, podrías probar otras opciones. Con suerte y te salga más barato y efectivo el remedio.

## El ying y el yang de *Clostridium botulinum*

Verónica Loyo Celis

La palabra bacteria suele en la mayoría de los casos remitirnos de forma inmediata a enfermedades o vincularla con aspectos negativos, en términos generales este es el estereotipo en el que la sociedad contemporánea agrupa a estos organismos.

Cuando vencemos la primera barrera del estereotipo e indagamos un poco más en el tema nos topamos con un grupo de seres vivos tan amplio que constituye un reino. En este reino densamente poblado encontramos una gran variedad de formas de vida algunas de ellas son pilar fundamental del medio ambiente, otras son herramienta clave en cuestiones biotecnológicas y algunas tienen propiedades sorprendentes que son fuente de inspiración para artistas, ingenieros y científicos.

Ante esta gama de organismos viene a mi mente *Clostridium botulinum*, procarionte involucrado en eventos benéficos y perjudiciales desde el punto de vista antropocéntrico, motivo por el cual titulé este escrito: El ying y el yang de *Clostridium botulinum*, como una forma simbólica de exaltar fuerzas antagónicas.

En este sentido el “ying” lo constituye el uso de toxinas bacterianas (A, B y E) como armas biológicas ya que en recientes años se han filtrado altas dosis de estas toxinas en comida y agua contaminada produciéndose muerte inminente de individuos a causa de botulismo, padecimiento cuyo reporte inicial se remonta a mediados del siglo IX. Mientras que el “yang” lo representa el uso de la toxina A en el tratamiento de blefarospasmo, espasmo hemifacial, torticolis espasmódica, corrección de estrabismo, así como en tratamientos estéticos, ya que actualmente

se ha extendido el uso de Botox para disminuir arrugas y líneas de expresión. Sin embargo, la mayoría de los tratamientos aquí mencionados se aplican sin ensayos farmacológicos previos.

Una vez mencionados (aunque de forma burda) los efectos de esta bacteria no me queda más que concluir que el efecto dual de *Clostridium botulinum* lo concede el uso dado por el ser humano, por lo que es importante reflexionar acerca de la manipulación biológica y efectuar la investigación y práctica científica de forma responsable y ética.



## El lado bueno de una bacteria llamada *Escherichia coli*

José Luis Puente García

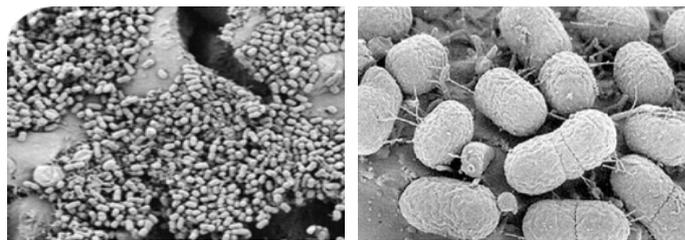
En septiembre del año 2006, la Secretaría de Salud y la Secretaría de Agricultura ordenaron el retiro de los supermercados de espinacas pre-empacadas y listas para consumo provenientes de los Estados Unidos y recomendó evitar su consumo sin que estuvieran bien cocinadas. Esta decisión fue preventiva y debida a que en el mismo mes alrededor de 20 estados de la unión americana reportaron brotes de una infección causada por una bacteria denominada *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7 o EHEC por sus iniciales en inglés, cuyo origen fue rastreado y asociado al consumo de espinacas. Noticias como ésta, resaltan la importancia de la bacteria *E. coli* como agente causante de enfermedad en el humano y, por tanto, genera preocupación entre la población cada vez que se hace mención de la presencia de esta bacteria en reservorios de agua, alimentos o en los análisis clínicos de un individuo. Sin embargo ¿qué es *E. coli*? A diferencia de lo que mucha gente piensa o asocia con esta bacteria, *E. coli* cuenta con, además de su lado malo, su lado bueno. *E. coli* es un microorganismo aerobio y anaerobio facultativo (esto es, que puede crecer en presencia o ausencia de oxígeno) que habita el intestino grueso o colon de los humanos, y otros mamíferos, formando parte importante de la flora intestinal. Esta bacteria coloniza el tracto gastrointestinal de los recién nacidos a las pocas horas de su nacimiento, momento a partir del cual, junto con otras bacterias como *lactobacilos* y *enterococos*, se convierte en la bacteria más abundante del intestino de un recién nacido. Durante la vida adulta su abundancia se reduce a sólo el 0.1% del total de las muchas bacterias que

residen en el intestino y que incluyen diversas especies; sin embargo, esta asociación comensal se mantiene por el resto de nuestras vidas. Es por esta razón que con cada evacuación de heces fecales arrojamamos al desagüe miles de millones de bacterias de diferentes especies, siendo *E. coli* una de ellas, de ahí que sea considerada como un marcador de contaminación fecal cuando se analizan en el laboratorio muestras de agua, alimentos, aire, etc. Así mismo, no es de extrañarse que un análisis rutinario de laboratorio de una muestra de nuestras heces dé como resultado el aislamiento de *E. coli*, aun cuando no estemos enfermos. Más aún, *E. coli* es normalmente un microorganismo benéfico para el hombre, ya que como parte de la flora intestinal participa activamente en el procesamiento de los alimentos que consumimos al degradar, por ejemplo, a las proteínas en sus componentes básicos, los aminoácidos, los cuales después de ser absorbidos en el intestino grueso, son utilizados por nuestras células para sintetizar sus propias proteínas. También resulta fundamental por su capacidad de producir algunos compuestos básicos, como las vitaminas K y B12, que son esenciales para que las células de nuestro organismo lleven a cabo funciones vitales, pero que éstas no pueden producir. Así mismo, actúan en nuestro favor eliminando algunos compuestos de deshecho y evitando que bacterias causantes de alguna enfermedad colonicen con facilidad nuestro intestino. La estrecha relación existente entre *E. coli* y el hombre, llevó en 1885 al pediatra y bacteriólogo alemán Theodor Escherich (1857-1911) a aislarla de heces fecales de individuos sanos, nombrándola *Bacterium coli* (*coli* es latín que refiere que su hábitat es el intestino grueso o colon), la cual en 1919 fue renombrada en honor de su descubridor como *Escherichia coli*. En 1922 diferentes aislamientos de *E. coli* son obtenidos a partir de heces de individuos sanos o enfermos en la Universidad

de Stanford en California, EU, los cuales son almacenados. A partir de 1940 uno de estos aislados etiquetado como K12 es azarosamente recuperado y utilizado para estudios de metabolismo nitrogenado y, posteriormente, en 1944 para estudios pioneros de la biosíntesis de triptofano (un aminoácido que forma parte de las proteínas), que en parte empezaron a mostrar el potencial que esta bacteria tenía como un modelo para el estudio de diferentes fenómenos biológicos, permitiendo también el desarrollo de la genética bacteriana. A partir de estos eventos y debido a su carácter inofensivo para el hombre y el ambiente, así como a su fácil y rápido crecimiento en condiciones de laboratorio (puede duplicarse cada 20 minutos), *E. coli* K12 se convirtió en el “caballo de batalla” y “conejillo de Indias” de diversos laboratorios que vieron en esta bacteria un modelo idóneo para llevar a cabo diferentes estudios que a la postre dieron origen a una revolución en campos como la Genética, la Fisiología y la Bioquímica, y más adelante al surgimiento de la Biología Molecular y la Biotecnología. Son muchas las contribuciones que se han hecho desde que *E. coli* fue utilizada por primera vez en el laboratorio, aquí algunos ejemplos. La transferencia de material genético (DNA, Ácido desoxirribonucleico) de una célula bacteriana a otra (proceso conocido como conjugación) fue descrita por primera vez en *E. coli*. Esto reveló uno de los mecanismos que permiten a las bacterias intercambiar información genética y generar diversidad, sin reproducirse sexualmente, así como contar con una estrategia mediante la cual se empezó a localizar la posición de genes en un genoma bacteriano. Otros estudios aportaron los primeros conocimientos sobre los mecanismos que controlan la expresión genética en bacterias. Es también en *E. coli* donde se descubren las enzimas de restricción y se construye el primer vector de clonación para la generación de moléculas

de DNA recombinante, pasos esenciales en el desarrollo de la Ingeniería Genética. Así, en el campo biotecnológico, el amplio conocimiento que se ha ido acumulando sobre *E. coli* y su “domesticación” a favor de la ciencia, han permitido su uso como una fábrica microscópica viviente de proteínas de interés para el ser humano, siendo uno de los primeros y más revolucionarios ejemplos la producción de insulina humana en bacterias para su uso en pacientes diabéticos. Es también *E. coli* uno de los primeros organismos cuyo genoma fue completamente secuenciado, iniciando una nueva era en el estudio de este microorganismo para el cual se contaba ya con más de 50 años de estudio. A pesar de que varias enfermedades diarreicas están asociadas a la presencia de algunas variedades patógenas (no benéficas) de *E. coli*, de las cuales platicaremos en otra ocasión, su nombre no debe siempre asociarse a su lado oscuro, sino a los aspectos positivos con los cuales contribuye, como un eterno acompañante intestinal, a nuestro diario bienestar, así como al enorme legado que su uso como modelo de estudio ha dejado al conocimiento científico y al desarrollo de la biotecnología.

*Este artículo apareció el lunes 08 de Octubre del 2007 en el periódico La Unión de Morelos en colaboración con la Academia de Ciencias de Morelos.*



# La Sociomicrobiología o de la convivencia entre bacterias y seres humanos

Agustín López Munguía

Hay una serie de conocimientos que nos son transmitidos desde pequeños y que son básicos para la subsistencia. Se trata de “instrucciones” cual mandamientos (¡no matarás! o ¿no mentirás!) que por su carga moral (o autoritaria) se clavan en nuestro inconsciente y nos permiten caminar por la vida con un poco de menos riesgo. ¡Niño: no juegues con fuego!; ¡Niño: siéntate derecho!; ¡Niño: acábate la sopa!; ¡Niño: no molestes a tu hermana! Este texto se basa en mi opinión de que habría que agregar un nuevo mensaje básico en la educación de la niñez: ¡Niño: cuida tus bacterias!

Hace la friolera ya pronto de 40 años, trabajando en un proyecto que acabaría haciéndome doctor, empecé a entender los fundamentos de un par de esas “instrucciones” que me llegaron por la vía materna: ¡Niño: ya no comas tantos dulces! ¡Niño: lávate los dientes! Y es que en efecto, trabajé con una bacteria láctica que lleva por primer nombre *Leuconostoc*. La verdad es que cuando me la presentó el Dr. Pierre Monsan, mi director de tesis, y la vi extendida en un tubito de ensaye, muchas cosas me vinieron a la mente, desde lo casi bíblico de su nombre (no sé si algún personaje del Antiguo Testamento se llame *Leuconostoc*, pero al menos así suena), hasta un desesperado intento por que entre ambos se generara empatía, dado que de ella dependía mi futuro académico. Después de colocarla a unos confortables 4 C, quise saber todo lo que había al respecto de este *Leuconostoc*, que por apellido llevaba el *mesenteroides*. Tardé meses en hacer lo que un estudiante de

doctorado logra hoy en instantes tecleando *Leuconostoc* en Google. Lo acabo de hacer por curiosidad y surgen más de 700,000 hits. Aquel día mi vida quedó ligada a esta bendita bacteria (por lo bíblico y por lo que le debo), y fue en esa revisión que supe que *Leuconostoc* hacía lo mismo que otra bacteria láctica cuyo habitat natural es nuestra boca: *Streptococcus mutans*. Ambas bacterias son capaces de tomar nuestro endulzante por excelencia, es decir la sacarosa, y a partir de este azúcar simple, mediante una enzima del tipo *glucosiltransferasa*, construir largas cadenas de moléculas de glucosa, agregándolas una por una. Miles de moléculas en una cadena hacen un polímero, y en el caso de *S. mutans* ese polímero, por sus propiedades, se pega a los dientes y constituye la base sobre la que se genera la placa dental y eventualmente la caries. No comer azúcar o lavándose bien los dientes, disminuye radicalmente el riesgo de caries, y de tanto sufrimiento. Trabajé tres años en saber cómo hacía su enzima *Leuconostoc mesenteroides*, y cómo trabajaba ésta para fabricar el polímero; rescato de aquel entonces la idea de que algunas bacterias, que son parte natural de nuestra microbiota bucal ( $10^8$  bacterias/cm<sup>2</sup>), mal alimentadas, pueden hacernos daño.

Varios años después, en el mismo laboratorio pero ya en estancia sabática, me volví a encontrar con *Leuconostoc*. Se trataba de otra cepa, cuya enzima, aunque de la misma familia, podía sintetizar un azúcar complejo. Bueno, ni tanto. Encontré que bajo ciertas condiciones, la enzima no hacía las cadenas, sino que transfería sobre la molécula de sacarosa, dos glucosas en posiciones poco usuales en la naturaleza, de ahí lo complejo. Trabajé un año definiendo condiciones en las que este azúcar complejo se pudiera producir de forma óptima. Más tarde supe, para mi sorpresa, que este azúcar llegó a ser la base de cosméticos “bio” que aplicados en la piel, permitían que sólo aquellas bacterias

benéficas se desarrollaran, dando a la piel las propiedades que todos los comerciales adjudican a las cremas. Había aquí sin embargo un fundamento bacteriano: la microbiota de la piel es alimentada de forma específica, evitando que proliferen bacterias nocivas que además generan mal olor. Claro, otra opción es bañarse: ¡Niño: báñate!

Hace ya un par de años, publiqué un trabajo titulado “Dulce Fibra” en la revista *¿Cómo ves?*, trabajo que fue reproducido en el periódico *La Unión de Morelos* el 17 de enero del 2011. Creo que la esencia atrás de ese artículo es ese mensaje que debemos difundir como básico en nuestra educación: “¡Niño: cuida tu microbiota!” En ese texto, junto con otro titulado “Vida Interior” también publicado en la revista *¿Comoves?*, me refiero a la importancia vital que juegan las  $10^5$ - $10^8$  bacterias que tenemos por gramo de íleon, las  $10^8$ - $10^{11}$  que encontramos por gramo de colon, o las entre 10,000 y 100,000 que hay por gramo de duodeno, siempre muchas más que las escasas 10,000 por gramo que hay en el estómago. Se trata de cuidar nuestras bacterias con base en lo que comemos, pero a partir de un mensaje que nos alerte sobre la importancia de que tengamos una relación amigable con ellas. Ésa es la esencia también de otro mensaje publicado en la revista *Hypathia* del 28 de febrero de 2012, en el que me preguntaba: entre las bacterias de nuestra microbiota y nosotros: ¿quién es quién? Igual podría preguntar si ¿existe el libre albedrío?, pero no tanto por todo aquello que sabemos que influye en nuestro comportamiento y que va desde la genética hasta los apapachos que no recibimos o que recibimos en exceso de nuestros padres. No. Tampoco con base en eso de que somos lo que comemos, o lo que comieron nuestros padres, o lo que comieron nuestros antepasados. En esta ocasión, la pregunta pretende incluir qué tanto de lo que somos depende de las bacterias que pueblan nuestros intestinos. Y es que ahora

resulta que si analizamos a la *microbiota*, y su efecto en el eje sistema digestivo-sistema endócrino-sistema nervioso, ahora también a ellas podemos echarle la culpa de buena parte de lo que nos sucede, de nuestro humor o de nuestras enfermedades. Ya Elie Metchnikoff, Premio Nobel en 1908 por sus descubrimientos sobre células del sistema inmunológico humano que “se comen” a los microorganismos nocivos (los fagocitos), en la última etapa de su vida académica, se obsesionó con la lucha contra la vejez y la muerte, y empezó a consumir grandes cantidades de yogurt, asegurando que los *Lactobacilos bulgaricus* eran responsables de la longevidad de los habitantes de varios pueblos de Bulgaria. No andaba tan equivocado. Hoy, con las maravillosas herramientas de la genómica y la bioinformática, sabemos que en nuestro organismo son más ellas que nuestras células. Así de sencillo. Vamos por la vida acompañados por toda una población de bacterias, nuestra *microbiota* (término que ha sustituido al obsoleto *microflora*) que, bien cuidadas, velan por nuestra seguridad. Por ejemplo, más que la guardia presidencial, son las bacterias las que cuidan a Enrique Peña Nieto (EPN), ya que 9 de cada 10 de las células que mueve son de bacterias y sólo una es de EPN. Todas ellas se distribuyen por su cuerpo, desde la boca hasta los intestinos. Ahí hospeda aproximadamente a más de 500 diferentes especies de bacterias, las cuales son tan abundantes que aportan 100 veces más genes que la suma de los genes del padre Peña y la madre Nieto, o sea 100 veces más que todos los genes que hay en su genoma. Vaya revés para su ego cuando se entere, ¿no? Pero no creo que sea asunto de seguridad nacional el saber que ni EPN, ni el lector, ni quien escribe es enteramente quien piensa, sino una amalgama de atributos humanos y atributos bacterianos: ¿cuestión de seguridad nacional? No, es cuestión de salud.

No va a faltar quien incluso especule que aparecimos en el planeta para que todos estos microorganismos pudieran tener donde estar. Apoderarse de Palacio Nacional, sí, pero también en la Casa Blanca y en la Rosada; del Poli, la UPE-Mor, la UNAM o la UAEM; del Tec de Monterrey o del Tec de Massachussets; de Ciudad del Cabo o de Ciudad Neza. O sea: en todo intestino humano, aunque eso sí, poblaciones diferentes dependiendo de la región, la edad, la alimentación, la historia individual..., y de una manera u otra, el trato que “consciente o inconscientemente” han recibido. Después de leer este texto, ya no podrás dejar de sentir culpa -o al menos cierta preocupación- al consumir antibióticos, ya que no hay semana que al revisar la literatura científica no surjan nuevas evidencias sobre la importancia de esta *microbiota* en la salud. Incluso, sobre la importancia de ser “inoculados” con la *microbiota* materna durante el nacimiento, y las posibles consecuencias de nacer mediante un parto aséptico por cesárea. Y es que existen evidencias epidemiológicas que muestran un mayor número de casos de asma y otras alergias en niños nacidos por cesárea, que en niños nacidos por parto normal. La *microbiota* adquirida temprano en la vida puede impactar el desarrollo cerebral y en el comportamiento subsecuente, tal como la actividad física y la ansiedad. De hecho, ya era sabido que una infección microbiana temprana puede desencadenar un desorden en el desarrollo neuronal que resulte en problemas en el desarrollo emocional.

Y es que hoy sabemos de manera contundente que una sana *microbiota* es esencial para evitar infecciones intestinales, para neutralizar el efecto de agentes mutagénicos cancerígenos, para tener un sistema inmunológico eficiente, para tratar problemas de constipación y curar diarreas, para la asimilación de minerales, calcio y magnesio en particular, y muchas otras funciones. Pero también

una *microbiota* sana está asociada con niveles bajos de colesterol y menor incidencia de cáncer de colon y de vejiga. Está demostrada que la presencia de microorganismos en nuestros intestinos activa la expresión de un cierto número de genes en estos órganos y silencia otros, como si hubiera una conversación molecular entre ellos estableciendo una respuesta que nos beneficia, genera una sensación de bienestar general y disminuye el estrés.

Más aun, estamos aprendiendo cómo es que nuestra *microbiota* influye en la cantidad de energía que extraemos de los alimentos: la gente obesa tiene una *microbiota* particular y se ha demostrado, por ejemplo, que tanto ratones como seres humanos obesos tienen un menor número de bacterias del tipo *Bacteroidetes* que su contraparte con peso normal. Se ha demostrado que una bacteria abundante en el intestino, *Faecalibacterium prausnitzii* tiene propiedades anti-inflamatorias y protege contra la enfermedad de Crohn, mientras que *Bacteroides fragilis* es frecuente en ratones sin colitis y es capaz de curar la diarrea crónica.

El impacto de una sana *microbiota* va más allá de la salud, ya que impacta también el humor. Claro, ¿quién puede estar contento con colitis e inflamación?

Es por esto que ha surgido una nueva disciplina: la Sociomicrobiología. La propuesta es de Peter Greensberg de la Universidad de Washington, quien propone a esta disciplina como un campo emergente, cuyo objetivo es determinar cómo haremos los humanos en lo sucesivo para mantener una relación amistosa con nuestra *microbiota*. Empezando por reconocer, ante tan abrumadora evidencia, que no hay prácticamente ninguna faceta de la biología humana que no esté influenciada -de una forma u otra- por la actividad de la *microbiota*.

Con toda esta evidencia, más la que se acumule, es fundamental reflexionar sobre lo que podemos hacer

desde la alimentación por favorecer una sana coexistencia con ellas, las bacterias. Es ahí donde el artículo de marras incide. Se trata de un énfasis en la importancia de la fibra en la alimentación, y dentro de esta, de la fibra que es soluble. Muy particularmente el artículo describe a la *inulina*, una molécula compleja cuya base estructural es la fructosa, y que se desdobra –ya en la industria, ya en el proceso de digestión- en azúcares complejos, como los que nutren a las bacterias de la piel, los llamados “fructooligosacáridos” o FOS. A diferencia de la *inulina*, que llega a tener más de 30 moléculas de fructosa en su estructura, los FOS se componen de 2, 3 o 4 moléculas de fructosa, siempre con una molécula de glucosa en un extremo. Estos últimos son el alimento favorito de la *microbiota*. Los agaves, endémicos de Mesoamérica, son una riquísima fuente de *inulina*, como lo es también la raíz de chicorea, el ajo, el plátano y la cebolla. En general los vegetales son fuente de *inulina*, por lo que debemos seguir apoyando la vieja recomendación de “come frutas y verduras”. En una revisión reciente sobre este tema, una nutrióloga me corrigió: “come verduras y frutas”, ya que las primeras son más importantes. Y sí, tomen yogurt y lácteos fermentados; beban pulque y pozol. Sin duda alguna, la relación de los seres humanos con las bacterias ha venido a dar un gran impulso a estas maravillosas plantas, los agaves, así como a los productos fermentados de maíz, de los cuales México posee una extraordinaria riqueza.

## Bacterias: ¿amigas o enemigas?

Ramón Batista García y Jorge Luis Folch Mallol

Si preguntamos por las bacterias en la plaza más famosa de México o del mundo, las respuestas pueden ser insospechadas. Seguramente la mayoría coincide en que son *criaturas* bien malas. El sarcasmo de *criaturas* no vale, quienes las queremos nos oponemos a eso... Pocos responderán que son organismos diminutos que apenas miden pocas micras, se componen de una sola célula. Estamos hablando de micras, de la millonésima parte de un metro. Menos aún, dirán que sus células difieren de las nuestras y que por ejemplo en 20 minutos se logran dividir. Sin embargo, casi todos gritarán y defenderán por sus experiencias, los elementos que las hacen los peores seres vivos del planeta. Dirán de la tuberculosis, la sífilis, el tétanos, el ántrax, la peste y de otras muchísimas enfermedades que le han hecho la peor de las campañas comerciales. ¡Pobres bacterias, las pondrán como las malas de esta historia!

Así las cosas, si continuamos preguntando por el mito de las bacterias y lo que sabemos de ellas, seguro encontraremos personas que, aunque pocas, las defiendan. Entonces nos contarán que hacen el yogurt, que gracias a ellas tenemos nitrógeno en las moléculas orgánicas (como las proteínas), que con trabajo infatigable producen vitamina K en nuestro intestino, que fabrican oxígeno, que ayudan a las plantas (que luego comemos) a crecer sanas y saludables, y que se usan para limpiar playas contaminadas con petróleo u otros desechos que con absoluta negligencia producimos en nuestra cotidianidad.

Realmente las bacterias pueden ser así de malas o así de buenas. Las bacterias son los organismos más diversos que existen. Su diversidad es tal que podemos en-

contrarlas colonizando desde los glaciares, los estratos más profundos del suelo, las aguas termales y ácidas, el rumen de una vaca, nuestra piel, el aire que respiramos, las nubes, o cualquier sitio que nos podamos imaginar por muy difícil que se imponga la vida. Su tamaño es la clave de su éxito. Algunas soportan la sauna que nosotros no soportamos, 120 grados de temperatura. Otras viven sin una molécula de oxígeno, como las que habitan el interior de una lata de conserva en descomposición del supermercado. Pero su resistencia es sorprendente, algunas son hasta autosuficientes, fabrican su alimento a partir de sol, dióxido de carbono y agua. Imaginen esto para nosotros... Soportan además soluciones ácidas como nuestros jugos gástricos o el zumo de un limón. Son así, sorprendentes, fascinantes, interesantes.

Pero ciertamente las tildan de malas, de peligrosas, de asesinas. Nadie habla en las calles de sus bondades y de cuánto dependemos de ellas cada día de nuestras vidas. Esa es nuestra intención: acercarle a esta paradójica, pero necesaria convivencia. Comenzaremos por lo que nadie dijo en las plazas de nuestras amigas las bacterias. Definitivamente, créannos, ellas son más buenas que malas. Luego entenderán por qué...

Solo conocemos el 1.5% de las bacterias que nos acompañan en nuestras vidas. Algunos estudios dicen que 1.7 Kg de nuestro peso son microorganismos y mayormente bacterias, de manera que siempre tenemos una sobrestimación de nuestros pesos corporales. De todas las bacterias que se conocen, menos del 1% causan enfermedades a las plantas, los animales o al hombre. Muchas de ellas se muestran solidarias con nosotros y resuelven serios problemas para la sociedad contemporánea. Si hablamos de bacterias solidarias, amables o amistosas hay que proclamar sin duda a *Escherichia coli*. Esta es la *vedette* de to-

das las bacterias, las más conocida y querida por muchos científicos. Sólo pensemos que esta bacteria garantiza la producción de insulina para todos los diabéticos del mundo. Ella es la que salva sus vidas. Esta bacteria no necesita producir insulina, y no la sabe fabricar. La insulina es una hormona que produce nuestro páncreas para facilitar la incorporación de glucosa a nuestras células y es de vital importancia porque ayuda a mantener los niveles correctos de azúcar en nuestra sangre. Las personas que no producen esta hormona de origen proteico padecen de *Diabetes mellitus*, una enfermedad crónica que puede poner en riesgo nuestras vidas. Pero, ¿cómo suministrar insulina a las miles de personas que diariamente la necesitan? Nadie será capaz de donar su páncreas o una parte de él para extraer insulina y compartirla con los demás, y si hubiese alguien con la bondad de hacerlo entonces morirá en el intento. Esta razón absolutiza nuestra afirmación. Así fue como algunos científicos convencieron a *Escherichia coli* mediante técnicas bioquímicas y biotecnológicas para que produjera insulina. Se obtuvieron bacterias transgénicas que producen en grandes cantidades la necesaria hormona (el cuento de los transgénicos vendrá pronto). De manera que esta bacteria salva la vida de muchos que están condenados a depender de su existencia y solidaridad con la raza humana. Entonces a *Escherichia coli* podemos considerarla nuestra amiga.

Pero todas las monedas tienen dos caras. Veamos ahora la otra. Generalmente la infección en los riñones es ocasionada por la presencia de esta bacteria. Cuando el número de ellas crece sin control en nuestros riñones, colonizan este órgano y causan terribles dolores, fiebres y si están a gusto pueden decidir acompañarlos por siempre con graves consecuencias en el funcionamiento renal. Entonces esta bacteria también nos puede perjudicar.

Ahora les contaremos que esta bacteria vive sin afectarnos en nuestros intestinos. Miles de ellas siempre están ahí y si las mantenemos controladas ni nos enteramos de su presencia. Y no vive sola, tiene como vecinas a cientos de bacterias diferentes.

Examinar estos ejemplos y elementos que compartimos ayudarán a comprender que las bacterias no siempre son buenas o malas, sino que pueden tener un poco de ambas cosas. Lo cierto es que comparten con nosotros todos los espacios y que resulta aberrante intentar por un segundo apartarnos de ellas. Tendríamos que vivir en una burbuja y de ahí no salir jamás, aunque quedarán todas las que viven en nuestra piel y en nuestro interior.

Cuando nos encontremos de paseo en la plaza de la cual partimos y pregunten por las bacterias, ya sabemos decir algo más. Podemos decir que son organismos microscópicos, formados por una célula, de inmensa diversidad, que siempre están con nosotros, y que pueden ser perjudiciales o beneficiosas. Que hacen el yogurt del desayuno o ayudan a tener en nuestras farmacias medicinas. Son así de versátiles como los artistas que pintan, cantan y bailan.

Cuidemos las bacterias y defendamos los estudios que con ellas nos entretienen y ayudan a salvar la humanidad. Las bacterias son omnipresentes, con una importancia médica y económica incuestionable y con impacto ecológico relevante. Entonces reflexione a su consideración *Escherichia coli*: ¿amiga o enemiga?

Si continuamos hablando de bacterias, podemos revisar algunos otros aspectos que sin equivocarnos serán argumentos que hablen a su favor y en su contra. Hagamos honor a otra de las grandes: *Pseudomonas aeruginosa*.

Si revisamos la biotecnología contemporánea y sus aplicaciones, no podremos describir su historia sin las bacterias. Algunas, como las especies del género *Pseudomo-*

nas, producen hormonas que facilitan el crecimiento vegetal. Las hormonas vegetales o fitohormonas son moléculas producidas por las plantas y algunos microorganismos que son muy utilizadas en la agricultura para aumentar el rendimiento de muchas cosechas. Estas bacterias se hacen crecer en un fermentador bajo condiciones controladas de aireación, agitación y nutrientes, para optimizar el rendimiento de producción de estas moléculas. Literalmente, les damos de comer y las obligamos a producir lo que queremos.

En la agricultura, las bacterias también son muy usadas en el control biológico. Muchas bacterias producen metabolitos con diferentes características que inhiben o impiden el crecimiento de otras bacterias o de hongos que atacan a las plantas y disminuyen los rendimientos de cualquier cosecha. En este sentido, se destacan también las especies del género *Pseudomonas*, y otras como: *Serratia*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, entre otras.

Hemos mencionado a *Pseudomonas* como una bacteria benéfica para el hombre. Sin embargo, no siempre sucede así. Si revisamos las estadísticas de cualquier hospital, seguramente *Pseudomonas* será de los aislados microbianos que con mayor frecuencia se obtienen de muestras clínicas. Estas bacterias, en particular *Pseudomonas aeruginosa*, pueden ser un patógeno con numerosos atributos de patogenicidad. Infecciones óticas, vaginales y en quemaduras, conjuntivitis y septicemias son de las enfermedades más comunes causadas por esta bacteria. En ocasiones son muy resistentes a los antibióticos, lo que enloquece a los médicos por no saber qué antibiótico aplicar.

Así están las dos caras de una misma moneda. *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria del suelo y el agua que puede resultar bien benéfica para las plantas o bien perjudicial a la salud del hombre. Sin duda, en muchas ocasio-

nes hemos compartido espacio con ella, ¿pero cómo saber cuándo es patógena y cuándo no? Esa es la pregunta para la lotería nacional.

Si de enfermedades hablamos, tenemos que considerar a las drogas microbianas o antibióticos. Los antibióticos son compuestos químicos de naturaleza muy heterogénea que se utilizan en el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por diversos agentes etiológicos. Entre los microorganismos, las bacterias son el grupo microbiano que causa un mayor número de enfermedades. De este modo, se hace necesaria la búsqueda de nuevos antibióticos para combatir enfermedades. Pero, ¿de dónde salen los antibióticos? Pueden sintetizarse químicamente, aunque los más demandados son los naturales que los producen los propios microorganismos, hongos y bacterias. Las bacterias producen muchas sustancias con función antibiótica. Así, las mismas que nos enferman nos curan. Ahí está la negación de la negación, es el equilibrio de la vida entre lo beneficioso y lo perjudicial. Los asiáticos y sus magníficas teorías pudieran explicarlo muy bien.

Otras de las bacterias muy famosas son las especies del género *Bacillus*. Estas son bacterias resistentes. Las hay pequeñas o más grandes, alargadas y delgadas o cortas y gruesas. Todas se parecen en algo: cuando las condiciones de su vida se hacen desfavorables, su célula se convierte en una estructura que se llama *espora* o *endospora bacteriana*. Es una estructura fuerte, resistente al calor y a la falta de agua y puede persistir por cientos de años. Una vez que sus condiciones de vida se hacen felices, entonces de esta estructura vuelve a surgir la célula de la bacteria. Es de las cosas que hacen a estas criaturas interesantes y desafían la adversidad. Son bacterias principalmente del suelo y también, como en todos los cuentos, habrá buenas y malas. *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*, son casi primas herma-

nas. Se parecen mucho y comparten muchas similitudes en sus funciones y en su manera de vivir. Pero hay una diferencia muy marcada, ésta es la diferencia entre la vida y la muerte. El ántrax es una enfermedad respiratoria de difícil tratamiento y en muchas ocasiones mortal, ocasionada por *Bacillus anthracis*. Cuando las esporas de esta bacteria son inhaladas y llegan a nuestros alveolos pulmonares, sus células producen numerosas toxinas que en poco tiempo pueden terminar con nuestras vidas. Es un cuadro clínico complicado, de pronóstico reservado y de lucha contra el tiempo. Demanda potentes antibióticos y un seguimiento médico personalizado, además su contagio es un serio problema.

Sin embargo, su prima *Bacillus cereus*, ha resultado una bacteria de la cual el hombre se ha auxiliado para producir un grupo enorme de sustancias de interés farmacológico e industrial. De ella se han obtenidos antibióticos, plásticos biodegradables, polímeros, bioplaguicidas, enzimas, entre otros muchos compuestos de utilidad. Las dos primas van de la mano muchas veces, una haciendo gala de su beneficencia y la otra llevándose las páginas de los diarios con cada víctima.

Bacterias, bichos, microbios, así muchos las bautizan. Llamémoslas bacterias, así suena mejor. Ya sabemos de sus travesuras y de sus aspectos positivos. Son como nosotros con virtudes y defectos; no las estereotipemos como malas, no lo merecen. A partir de este momento, espere-mos que nuestra visión de las bacterias cambie y si nos preguntan en cualquier plaza de México o el mundo por ellas, sabremos narrar un cuento que sea de terror pero también de felicidad.

Estemos conscientes que nos podemos cuidar de ellas, hacerles más difícil la tarea de enfermarnos, pero

nunca podremos apartarlas de nuestras vidas, eso sería un imposible, o tendríamos que vivir en una burbuja.

Conocerlas, aunque sea por curiosidad, siempre resulta prudente. Por eso, cuando llegues a casa después de leer esta crónica, háblale a tus padres, hermanos y amigos, que las bacterias son así de increíbles: nos enferman, nos curan, nos brindan beneficios, nos hacen vivir y nos hacen morir.

Entonces... ¿Bacterias: Amigas o enemigas?, saque cada cual su propia conclusión...

## Una noche en brazos de venus y toda una vida de mercurio

*Alicia Cañas Linares*

Durante muchos años se pensó que las enfermedades eran provocadas por dioses malos que castigaban a la humanidad ante sus pecados, y para curar dichas afecciones la única opción eran las plegarias.

En esta ocasión hablaremos de las enfermedades venéreas, enfermedades que han afectado a todos los estratos socioeconómicos, ya que desde la antigüedad fueron protagonistas de episodios vergonzosos en la trayectoria de hombres eminentes y distinguidos de la sociedad.

En el transcurso de la historia, las enfermedades venéreas han reducido la población más que las armas; cifras que llegaron no sólo a nivel de epidemia, sino inclusive a pandemia, tal es el caso de la gonorrea, la sífilis y el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Nos enfocaremos en la sífilis, padecimiento que se transmite casi siempre por contacto sexual, con excepción de la sífilis congénita que se desconocía en la antigüedad y que ahora sabemos que es transmitida de madre a hijo.

En principio la palabra sífilis proviene del nombre 'Syphilo', poema que escribió el médico y filósofo Girolamo Fracastoro (1478-1553) en el que el dios Apolo castiga al pastor Syphilus con una nueva, terrible y desconocida enfermedad por haber blasfemado en contra el dios Sol.

Los síntomas que manifestaban era lesiones en la boca, pene, vagina o región perianal, donde había flujo, por ello se pensaba que era como la segunda fase de la gonorrea y poco a poco las lesiones se extendían en casi todo el cuerpo del paciente. Los médicos confundían la enfermedad porque algunos síntomas eran propios de otros padecimientos; más tarde se percataron de que se trataba de una

nueva enfermedad, de la cual no tenían idea de cómo combatirla, sólo sabían que estaba relacionada con las relaciones sexuales; por ello empezaron a utilizar mercurio, pues se pensaba que podría desintoxicar el cuerpo y así lograr que la enfermedad saliera del cuerpo del paciente. Este elemento químico era conocido por su poder para curar enfermedades de la piel, prevenir el reumatismo, la disentería y los cólicos e inclusive para el mal de ojo y curiosamente también era usado como afrodisiaco.

En el caso de la sífilis, la técnica que utilizaban consistía en colocar al paciente en una especie de cajón cubriendo la totalidad del cuerpo, a excepción de la cabeza que permanecía al aire; en el interior se esparcía mercurio y así con el calor del encierro y la plata líquida la enfermedad era remediada. De ahí surgió la famosa frase "Una noche en los brazos de Venus toda una vida de mercurio".

Se tenía la idea de que el mercurio era demasiado pesado y agresivo, por ello se empezó a diluir; Aristóteles, por ejemplo, recomendaba diluirlo con saliva, médicos de otras épocas lo diluían con leche o vino.

Teofrasto Paracelso, alquimista, médico y astrólogo suizo (1493-1541), fue de los primeros en afirmar que el mercurio causaba más males que las enfermedades que curaba. Sin embargo, lo recomendaba ingerido pues suponía que al ser tragado el cuerpo podía expulsarlo a través de la orina, heces o sudor. Otros mercurialistas lo recomendaban en presentación de ungüento e inhalado, pero como era de esperar, el mercurio sólo terminaba agravando la enfermedad, vulnerabilizando al paciente del cual era fiel compañero hasta la muerte.

¿Qué es entonces lo que causaba este raro padecimiento de la sífilis? ¿Era acaso castigo de los dioses como por tanto tiempo se había pensado?, incluso la Iglesia se negaba a que los infectados fueran tratados medicamente,

pues consideraban que merecían la enfermedad por llevar una vida inmoral dando gozo a sus pasiones.

No fue hasta el siglo XIX en que los avances en los campos de la biología y la medicina causaron gran revuelo, pues fue el punto de partida de grandes adelantos en la patología. Se logró el entendimiento del mecanismo de las enfermedades con la teoría de los gérmenes, propuesta por Louis Pasteur en 1859, en que se explicaba que los procesos infecciosos eran producto de bacterias.

En 1905 Shaudin y Hoffmann, originarios de Berlín, Alemania, descubrieron que el agente causal de la entonces invencible sífilis, era la bacteria *Treponema pallidum* y por asombroso que parezca, un año más tarde Wassermann ideó la forma para diagnosticar dicha espiroqueta. Detectarla fue un punto substancial para curar la letal sífilis y representó la pieza clave en el desarrollo de un medicamento correctivo para la tan temida y escalofriante enfermedad. El brillante médico alemán, considerado padre de la quimioterapia, Paul Ehrlich (1854-1915), junto con su asistente japonés, Sahachiro Hata (1873-1938), tras haber probado 605 compuestos, lograron sintetizar una sustancia con propiedades espirilicidas (es decir, que destruye espirilos o espiroquetas) y que únicamente atacaba a la bacteria y no al huésped que la contenía. El compuesto resultante (el número 606) es un derivado del arsénico al cual nombraron *arsénico que salva* o *Salvarsán*. Finalmente, en abril de 1910 fueron distribuidas gratuitamente un aproximado de 65,000 dosis en los principales hospitales europeos.

El fármaco de Ehrlich curó algunos casos de sífilis; sin embargo, en otros casos los pacientes perecieron debido a que el medicamento no fue bien administrado o se empleó en casos terminales. Esto último llevó a la cárcel injustamente al propio Ehrlich. Quiso reivindicarse y cuatro años más tarde mejoró el producto llamándolo *Neosalvarsán*, más fácil de disolver y usar, y más eficaz.

Había importantes problemas acerca de las infecciones porque limitaban gran parte de trabajo de los médicos; un niño, por ejemplo, con una pequeña herida era candidato a una septicemia; un alto porcentaje de mujeres moría en la asistencia al parto. Se prefería realizar una amputación que arriesgarse a que una infección provocara la muerte.

En 1928, con las cajas petri en su mesa de trabajo, Alexander Fleming notó que en una de ellas, donde realizaba cultivos de la bacteria *Stafilococcus aureus*, crecía un hongo denominado *Penicillium notatum* que impedía el desarrollo de sus microorganismos de estudio. Fue entonces que después de aquella observación y meticulosos experimentos, Fleming aisló el hongo elaborando así, un nuevo antibiótico: “la penicilina”.

La penicilina resultó ser un milagro de la ciencia: era una droga eficaz para curar a la gente de la mayoría de las infecciones; salvó miles de vidas, y fue usada con verdadero éxito para curar la sífilis....

### ***La bacteria culpable: ¿quién es *Treponema pallidum*?***

Con la forma de una serpiente útil para su desplazamiento, prolongaciones en los extremos que le sirven para fijarse al huésped y con una longitud 10,000 veces menor a la de una de tus pestañas, encontramos a *T. pallidum*, quien, entre otras características, tiene una cubierta protectora llamada cápsula compuesta de un polisacárido que la protege de la toxicidad del oxígeno y de los anticuerpos que nuestro cuerpo produce. Igualmente posee una mucopolisacárida, que es una enzima que favorece el intercambio celular.

*T. pallidum* se ha preservado en la naturaleza, gracias a que cada treinta y tres horas una espiroqueta da origen a otras dos. A esta estrategia de reproducción

se le conoce como *fisión binaria*. Un dato curioso es que *T.pallidum*, es de las pocas bacterias que no se ha logrado cultivar *in vitro*, lo cual ha dificultado su estudio.

Esta bacteria resulta ser sensible a temperaturas por encima de 45°C, temperatura a lo que nosotros no podemos exponernos para eliminarlas, por lo que se han buscado otras alternativas para erradicarla.

## Patogenia y sífilis

El periodo de incubación de la enfermedad es en promedio de 3 semanas, tiempo en el cual las espiroquetas actúan silenciosamente en el organismo. De acuerdo a la evolución clínica, la sífilis del adulto se divide en: temprana, secundaria, latente y tardía.

En la sífilis temprana, la bacteria provoca la aparición de lesiones iniciales de chancro indoloras, que rápidamente se convierten en una llaga circular u ovalada con bordes rojizos. Aunque el paciente no reciba tratamiento, el chancro desaparece dejando únicamente la cicatriz.

En la fase tardía, los síntomas suelen ser variados y la enfermedad suele ser confundida con otras de síntomas similares. Cuando la bacteria alcanza su estado latentes, no hay síntomas ni signos de la enfermedad, únicamente se conoce el diagnóstico mediante estudios de laboratorio. Sólo el 25% de los pacientes con sífilis latente pueden desarrollar sífilis tardía.

Actualmente se busca encontrar pruebas más sensibles para la detección temprana de la enfermedad. En lo que respecta al tratamiento es inyectada una dosis única de penicilina benzatínica y en caso de alergia a la penicilina, se utiliza eritromicina y tetraciclina.

A falta de una vacuna eficaz, el control de la sífilis dependerá de su diagnóstico, tratamiento y la educación sexual

que se tenga; aunque curiosamente en los años 80's y 90's se ha reducido la enfermedad por el uso generalizado del preservativo ante el temor a contagiarse de VIH y otras enfermedades causadas por bacterias.

## Las bacterias y el desarrollo del cerebro

Edmundo Calva Mercado

El *microbioma* humano está constituido por los microorganismos o microbios que se asocian normalmente al cuerpo humano. La gran mayoría de estos microorganismos son bacterias. El *microbioma* es indispensable para nuestra vida como la conocemos; de hecho, la gran mayoría de estas bacterias residen en nuestro intestino y muchos estudios apuntan a que influyen en nuestros procesos digestivos. Se ha visto, recientemente, que individuos que pasaron de un sobrepeso a un peso normal sufrieron un cambio radical en la constitución de especies bacteriana en su intestino. Esto es, no es difícil concebir que las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en las bacterias nos ayudan a digerir diferentes alimentos. Por ello, también se trabaja en discernir cómo la constitución de la población bacteriana en nuestro intestino varía con base en el tipo de alimentación, lo cual es influido fuertemente por la cultura. Es de resaltar, además, que se postula que tenemos asociadas al cuerpo humano diez veces más células de microorganismos que células humanas; lo que nos hace cuestionarnos si somos más bacteria que humano. Este número de células bacterianas se estima que pesa hasta dos kilogramos. Pues aunque son muy numerosas son mucho más pequeñas que una célula humana.

Recientemente se publicó un artículo (referencia 1) en donde los datos apoyan la hipótesis de que la presencia de *microbioma intestinal* influye significativamente en el desarrollo del cerebro, en un modelo de ratón. Para ello se utilizaron dos variedades de ratones hembras: una carecía de *microbios intestinales* (GF del inglés “*germ-free*”) y la otra tenía su *microbioma intestinal normal*, pero carecía

de bacterias patógenas, esto es, de las que causan enfermedades (SPF del inglés, “*specific-pathogen free*”). Resultó que la progenie de los ratones GF tenían niveles más elevados de síntesis y degradación de compuestos involucrados en la transmisión de señales nerviosas (neurotransmisores), como son la *norepinefrina*, la *dopamina* y la *serotonina*, en una región que se encuentra en la subcorteza de la parte anterior del cerebro que se denomina cuerpo estriado. La serotonina, por ejemplo, está involucrada en regular muchas funciones, como son las receptoras que incluyen el miedo y la ansiedad.

Por otro lado, la progenie de los ratones SPF expresaban mejor algunos genes que determinan la habilidad de generar sinapsis – o conexiones entre las neuronas, o células del sistema nervioso- que la progenie de los ratones GF. En otras palabras, la evidencia apunta a que el *microbioma intestinal* influye para que el cerebro se desarrolle de manera diferente en los ratones SPF en comparación con los ratones GF. En la Figura 1 observamos unas áreas iluminadas en el cerebro de un ratón proveniente de una madre GF. Esta luz es generada a través de un método que nos permite observar la actividad genética, en este caso de un gen (NGFI-A) que determina el desarrollo del cerebro. Esto es, la actividad cerebral está estimulada en el ratón cuya madre tenía bacterias intestinales. De manera muy importante, los autores reportan que los ratones provenientes de madres GF mostraban menos ansiedad y un aumento en la actividad motriz; lo que también refleja diferencias en la síntesis y degradación de los neurotransmisores.

Los autores proponen que el *microbioma intestinal* podría modular señales al cerebro a través del nervio vago, unos de los nervios que inerva el sistema gastrointestinal, entre otros. También proponen la modulación de

los niveles de los transmisores nerviosos en el intestino, a través de reacciones bioquímicas mediadas por las bacterias. En otro estudio, referido por los autores de este artículo, se observó que la adición de un *microbioma intestinal* a ratones GF resultó en la elevación de los niveles de serotonina en la sangre; serotonina que podría provenir del propio intestino.

Finalmente, los autores del artículo postulan que la exposición a los microorganismos del *microbioma intestinal* de la madre, durante el nacimiento, podría influir en el desarrollo cerebral. Esto es, que no sólo son nuestros genes humanos los que determinan la composición de nuestro cerebro, sin que también nuestros genes bacterianos. En este sentido, vale la pena comentar sobre un concepto moderno de gran relevancia. Se propone que nuestras características como seres humanos no sólo están dadas por los genes que heredamos de nuestro padre y de nuestra madre (*genoma humano*), a través de lo que llamamos transferencia vertical, sino también por los genes que aportan nuestra población microbiana. Esta población la adquirimos a partir del nacimiento y proviene del medio ambiente, por lo que se conoce como transmisión horizontal. Esto es, el *genoma humano*, o lo que tradicionalmente considerábamos el conjunto de genes que determinan nuestras características, es más bien un *metagenoma humano*, que abarca también los genomas de los microorganismos que tenemos asociados, como se ilustra en la Figura 2. En este concepto, nuestra dieta tendría una influencia en la composición *microbiana* de nuestro *microbioma*, el cual interactúa con nuestro genoma humano en un proceso recíproco, a través de compuestos químicos relevantes, producidos tanto en los microorganismos como en las células humanas y determinados por la información en los respectivos genes.

Finalmente, no se puede descartar que los pacientes que toman antibióticos para infecciones intestinales puedan, por tanto, sufrir un cambio en su *microbioma intestinal* que los lleve a alteraciones mentales. El aumento del autismo- un trastorno en el desarrollo que conlleva a problemas de comunicación y socialización- y la ansiedad en el mundo más desarrollado podría ser consecuencia, asimismo, de un escaso contacto con los microbios. Y podríamos añadir: ¿si realmente las bacterias hacen algo por nuestros cerebros, qué hace nuestro sistema nervioso por las bacterias? Mucho trabajo se requiere para elucidar estos fenómenos.

#### Bibliografía:

1. "Normal gut microbiota modulates brain development and behavior" por R Díaz-Heijtz, S. Wang, F. Anuar, Y. Qian, B. Bjorkhol, A. Samuelsson, M.L. Hibberd, H. Forssberg y S. Pettersson. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 108: 3047-3052, 15 de febrero, 2011.

*Si quieres leer más de este tema, te recomendamos consultar: Hot topics in gut microbiota, United European Gastroenterology Journal 2013 1: 311. Joël Doré, Magnus Simrén, Lisa Buttle and Francisco Guarner. (La version en línea de este artículo la puedes encontrar en: <http://ueg.sagepub.com/content/1/5/311>)*

*Este artículo apareció el lunes 01 de Agosto del 2011 en el periódico La Unión de Morelos en colaboración con la Academia de Ciencias de Morelos.*

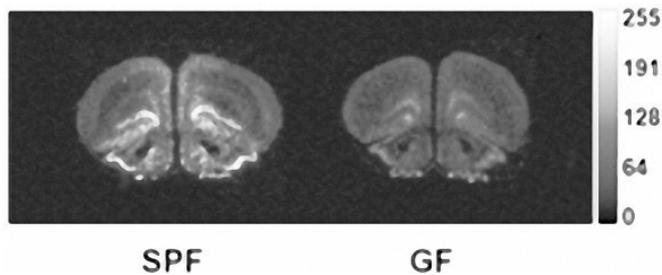


Figura 1. Cortes transversales de cerebros de ratones jóvenes nacidos de madres SPF o GF. La mayor actividad de un gen relacionado al desarrollo de cerebro. Figura tomada de la referencia citada  
(Ver imagen a color en páginas centrales)

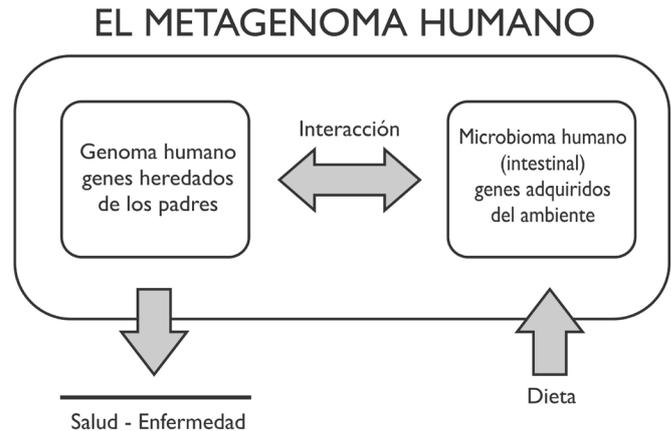


Figura 2. El metagenoma humano está constituido por el genoma convencional, los genes que se heredan del padre y de la madre, y por los genes de los microorganismos que cohabitan con los humanos o microbioma humano; la mayoría de dichos microorganismos son bacterias y se encuentran en el intestino. Estos dos mundos genéticos interactúan el uno con el otro a través de compuestos bioquímicos. La constitución del microbioma humano está influida por la dieta, y el resultado de la interacción resulta en la salud o enfermedad.

## En la mira

Rocío Mejía Ornelas

### I

El búfalo ha perdido su tono castaño. En cada resoplido adquiere una renovada juventud. La muerte siempre sosiega a la vejez. Los primeros bostezos del sol danzan en la distancia y lamen el rojo pelaje de la bestia. El rojo de la venganza.

### II

La discusión se estaba poniendo acalorada en el intestino delgado. Y eso, por decirlo de algún modo, no le convenía a la horda de bacterias Gram negativas alojadas en el órgano, susceptibles a un cambio elevado de temperatura. Las bacterias pertenecientes al biotipo Clásico movían sus flagelos furiosos, anhelando romperles la pared celular a los del biotipo El Tor.

“Perro Rabioso”, líder del biotipo El Tor, insultaba al líder del biotipo contrario, llamado en los peores tugurios de las alcantarillas como “Muerte Blanca”.

Perro Rabioso deseaba dirigir a todos los agremiados de su biotipo hacía la cacería más grande conocida hasta ahora por las bacterias. “Lo virus quedarán como unos estúpidos después de ésto”, decía Perro Rabioso mientras los flagelos de millones de fanáticos se movían de excitación. A una célula calciforme de la pared del intestino delgado, le pareció gracioso soltar el comentario a Perro Rabioso que no eran más que “unas procariotas insulsas que pretendían conquistar un organismo perfecto y maravilloso, cuando ni siquiera tenían el núcleo definido”. Las bacterias odian que les recuerden el detalle de su “núcleo indefinido”. La célula calciforme fue llamada a la orden de “intoxíquenla” por parte de Muerte Blanca.

Posterior a dos horas de polémica entre los líderes de los biotipos, decidieron dar inicio a la cacería. Exterminada la presa, harían un análisis de qué biotipo había generado la mayor cantidad de toxinas para saber quién era el ganador. Lo importante era hacerlo en el menor tiempo posible. En tres horas como máximo.

### III

Los susurros de la tierra se confunden con los nostálgicos pensamientos de los liberianos. El señor Calleja regresa después de varios minutos de haber desaparecido entre la vegetación. Tiene la cara descompuesta y, a pesar de las altas temperaturas, tiene escalofríos. El extranjero, agobiado por el dolor abdominal, no descubre la tristeza silenciosa emanada por aquellos nativos famélicos, nacidos en una tierra a no tantos kilómetros de ahí, que se les antoja todo, menos suya. Los liberianos, por su parte, no detectan que el mexicano esta pálido. Lo que sí perciben con molestia es el olor fétido que le acompaña; parece traer en las entrañas un océano putrefacto.

Partieron a las cuatro de la tarde de la aldea Djouroutou rumbo al Parque Nacional Tai, en Costa de Marfil. Matar no es suficiente cuando está permitido, dijo el Señor Calleja a los hambrientos liberianos, así que el parque satisfacía esa necesidad de quitar vida para sentirse vivo; necesidad heredada de su abuelo y que había aprendido a disfrutar desde los siete años, cuando mató a palos al perro de su hermana.

Ahora, a sus setenta años, el señor Calleja tiene la ansiedad de un íncubo que se sabe en decadencia y ansía violar a la naturaleza en donde más le punce.

Los liberianos parecen trozos de cielo nocturno que albergan en sus sonrisas una constelación de estrellas moribundas. Están silenciosos, saben que el búfalo no tar-

dará en llegar a beber agua al pantano. Es un macho impo-  
nente y peligrosamente resentido; un solitario expulsado  
hace poco de la manada. Los ojos negros del animal ahora  
se asemejan a la tristeza de los liberianos.

El señor Calleja se para por quinceava vez a evac-  
uar. Cada vez se le nota más cansado y apático. Su cuerpo  
tiene la apariencia de estarse convirtiendo en un despojo de  
carne seca. Los liberianos se preocupan, si se les muere el  
mexicanito se meterán en problemas. Los nativos le dicen  
al extranjero que mañana pueden volver a intentarlo, que  
es mejor irse a ver un médico. El señor Calleja, abrumado  
y delirante, tiene problemas para hablar en inglés y grita a  
los liberianos una combinación de insultos en español. Los  
liberianos se encojen de hombros, recogen sus cosas y se  
marchan. Si se muere el mexicanito, la selva se encargará  
de devorarlo y no dejar rastro.

El señor Calleja tiene la visión borrosa pero, echa-  
do entre la hierba apuntando con su rifle hacia el pantano,  
observa cuando el animal se acerca en forma de fantasma  
circunspecto.

#### IV

La cacería estuvo muy pareja. Sin embargo, los miembros  
del biotipo Clásico lograron generar la mayor cantidad de  
toxina termolábil para sorpresa y frustración del biotipo El  
Tor. El charco de la última mierda de la presa es un recinto  
de gritos y flagelos agitados. Se dice que hubo fraude y un  
mal conteo. Muerte Blanca le espeta a Perro Rabioso que  
nadie la llama mentirosa. El calor de la madrugada seca  
la acuosidad de las heces y los miembros de ambos bio-  
tipos mueren, más que por la temperatura, por la cólera  
surgida en último momento que propició un regadero de  
citoplasma.

#### V

El búfalo refresca su hocico en el pantano, espejo de un  
cielo distante e indiferente. Escucha unos lamentos. Hay  
un animal muriendo a pocos metros. No se inmuta. Todos  
mueren. Él lo hará cuando la soledad se le haga insoport-  
able.

El búfalo seguiría bebiendo tranquilamente, pero  
escucha algo que reconocería en cualquier territorio: el  
maldito sonido de un rifle cortando cartucho.

A pesar de la penumbra, la mirada del Señor Calle-  
ja se deposita por instinto con los del animal. Hay un in-  
tercambio de rabia entre ambos. El cazador da uno de sus  
últimos respiros para levantarse. El corazón parece que le  
corre dentro del pecho. Al búfalo le hierve la sangre, mas  
tiene duda de si eso que está postrado frente a él es un ser  
vivo; parece más un cadáver endemoniado.

El señor Calleja siente que ese último disparo al-  
berga toda su ira y, cuando sea expulsada de la boca de su  
amada, podrá obtener la paz que nunca ha tenido.

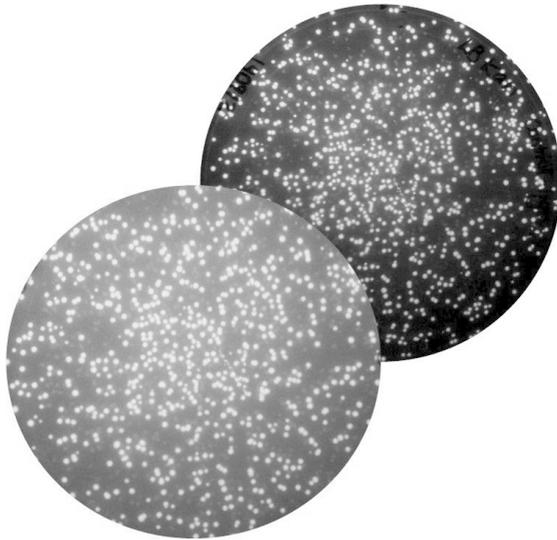
Y lo hubiera logrado si tan sólo no hubiera bebido  
ese *demitasse dekar* antes de partir a la cacería, ofrecido  
por una mulata, a la cual pagó menos de lo acordado por  
tener sexo que, para colmo, duró muy poco. La bebida fue  
preparada con agua del escusado, donde reinaba Perro Ra-  
bioso. A Muerte Blanca lo adquirió al introducir su lengua  
en las prominentes nalgas de la joven. El Señor Calleja, sin  
saberlo, metía dentro de sí a dos feroces cazadores.

Cuando el extranjero quiere jalar del gatillo, su  
corazón hace un alto a tanta estupidez. Lo último que ve el  
Señor Calleja antes de desplomarse, es la sombra enarde-  
cida del animal a punto de cornearlo.





## Bacterias y biotecnología



Bacterias *E. coli* que expresan proteínas fluorescentes  
Imagen: Yoloxochitl Sánchez Guevara  
(Ver imagen a color en páginas centrales)

*Sabías que...*

*Bajo condiciones ambientales favorables, las bacterias se reproducen muy rápidamente: la población puede duplicarse ¡cada 20 minutos!*

*En la naturaleza, el alginato, sustancia que se ha utilizado en la producción de alimentos, lo producen algas conocidas como “algas cafés o pardas” así como la bacteria *Azotobacter vinelandii*.*

*Para la producción de la bebida conocida como aguamiel se ocupan bacterias como *Leuconostoc kimchii*, *L. citreum* y *Lactobacillus acidophilus*.*

**Ralstonia metallidurans* y *Deinococcus radiodurans* son conocidas como bacterias muy resistentes ya que pueden tolerar niveles muy altos de metales tóxicos y de radioactividad respectivamente.*

*En 1979 se producen en bacterias, las hormonas humanas somatostatina e insulina.*

*México es el primer país de Latinoamérica en que se produjo insulina humana recombinante a partir de la asociación de las dos cadenas que forman esta hormona.*

**Thermus aquaticus* es una bacteria que se descubrió en una de las fuentes termales del Parque Nacional de Yellowstone en Estados Unidos. A partir de proteínas que produce esta bacteria se puede amplificar en el laboratorio el material genético de otros organismos.*

**Bacillus megaterium* y *Azotobacter vinelandii* son ejemplos de bacterias que pueden producir bioplásticos.*



# Microbios, fermentaciones y biotecnología

*Enrique Galindo Fentanes*

Los microbios o “microorganismos” sin duda han sido los protagonistas más importantes (aunque probablemente anónimos) de la biotecnología. Puede decirse que la biotecnología se inició con el cultivo controlado de microorganismos. Leeuwenhoek (en Holanda) fue el primero que los vio, aunque fueron Pasteur (en Francia) y Koch (en Alemania) quienes por primera vez demostraron que los microorganismos eran responsables de actividades biológicas específicas, tales como la fermentación alcohólica y el agente causal de algunas enfermedades.

Los microorganismos más utilizados en biotecnología son las bacterias, las levaduras y los hongos. Las bacterias son los más sencillos de ellos, miden menos de una micra (que es una milésima parte de un milímetro) y se reproducen por bipartición (esto es, una bacteria genera dos de ellas, sin saber cuál es la progenitora). Bajo condiciones ambientales favorables, las bacterias se reproducen muy rápidamente: la población puede duplicarse ¡cada 20 minutos! Las bacterias (y particularmente una de ellas, *Escherichia coli*, que vive regularmente en el intestino humano) se encuentran entre los seres vivos cuyo material genético se conoce en su totalidad y en donde se han desarrollado ampliamente las técnicas de ingeniería genética. Existen muchos procesos biotecnológicos que usan el cultivo de bacterias. En algunos casos, las bacterias mismas constituyen el producto. Ejemplos de ello lo son las bacterias lácticas que se usan como probióticos (esto es, estimuladores de crecimiento y/o aprovechamiento de alimentos en animales). En varios casos, las bacterias se usan para producir sustancias que constituyen el producto biotecnológico. Un ejemplo es el caso de algunas gomas que se

usan como texturizantes en la industria alimentaria. Otro ejemplo lo constituyen los aminoácidos, usados en alimentación animal y como componente de los caldos de pollo industrializados. Las bacterias que han sido transformadas por ingeniería genética se usan para producir, por ejemplo, insulina humana y las enzimas que se usan en los detergentes biológicos. Las levaduras son microorganismos más complejos y más grandes que las bacterias (miden alrededor de 10 micras) y se reproducen por gemación, esto es, puede distinguirse a las progenitoras.

Las levaduras son los microorganismos que la humanidad ha usado desde tiempos inmemoriales (aún antes de saber que eran levaduras) para producir cerveza, vino y pan. Las levaduras (principalmente la levadura de pan, *Saccharomyces cerevisiae*) actualmente también se usan como “maquinarias” para producir sustancias por ingeniería genética. Por ejemplo, la vacuna recombinante contra la hepatitis B se produce usando esta levadura.

Los hongos son microorganismos aún más complejos que las bacterias y levaduras. Son organismos pluricelulares que crecen en largos segmentos (llamados “hifas”) y que tienen ramificaciones. Estas estructuras pueden llegar a medir del orden de milímetros. Los hongos tienen muy amplias capacidades biosintéticas y se usan para producir la mayor parte de los antibióticos que se generan por fermentación (como la penicilina), así como enzimas, vitaminas, aromas, etc.

Además de las bacterias, las levaduras y los hongos, existen otras entidades biológicas que, sin ser microorganismos, se cultivan por técnicas de fermentación. Entre ellos se incluyen a las células vegetales y animales, tejidos como raíces o piel, e incluso nemátodos. Con estos sistemas biológicos, los problemas de cultivo son más críticos, ya que requieren condiciones muy especiales para su desarrollo.

El concepto “fermentación” fue acuñado por Pasteur para describir el desarrollo y actividad de microorganismos bajo condiciones anaerobias (i.e. en ausencia de oxígeno, como es el caso de la producción de alcohol). Sin embargo, actualmente “fermentación” tiene un significado más amplio y se refiere a las técnicas de cultivo de microorganismos (o células u organismos en suspensión) bajo condiciones controladas. En consecuencia, un “fermentador” es un recipiente en donde se promueve el crecimiento de células u organismos con el fin de producir un producto específico, el cual puede ser el microorganismo, célula u organismo per se, o bien alguna sustancia producida por ellos.

El fermentador tiene los objetivos fundamentales de mantener la esterilidad (que permita el cultivo exclusivo de la especie biológica de interés) y el de proporcionar las condiciones ambientales (i.e. temperatura, nutrientes, etc.) óptimas para el objetivo en particular del proceso. Existen algunos aspectos que son importantes para lograr fermentaciones exitosas a nivel industrial. Uno de ellos que resulta crítico es lo que se llama el “escalamiento” del proceso. Escalar un proceso consiste fundamentalmente en reproducir (y en ocasiones mejorar) lo que se logró en el nivel de investigación (generalmente en matraces o fermentadores de laboratorio) en fermentadores de nivel industrial, los cuales tienen volúmenes de entre los cientos y los miles de metros cúbicos. Con el escalamiento también se pretende que el producto se pueda producir de la forma más barata posible. Gracias a estas técnicas es que contamos, por ejemplo, con antibióticos (como la penicilina) de muy bajo precio.

El proceso biotecnológico no culmina con la fermentación. Una vez producida la sustancia u organismo de interés, es necesario -en mayor o menor medida- separar, extraer, concentrar y purificar el producto en cuestión

del “caldo” de fermentación. Estas operaciones pueden ser incluso más complejas (y más costosas) que las de fermentación. Esta es una de las razones por las que algunos productos biotecnológicos (principalmente en el ramo farmacéutico) son de muy alto valor agregado.

Libros recomendados:

“Los cazadores de microbios”. Paul de Kruif, Ediciones Leyenda, México (1999).

“La biotecnología”, Agustín López-Munguía, Colección Tercer Milenio, CONACULTA, México (2000).

“El Secreto de la Vida”, Joseph Levine & David Suzuki, Dirección General de Divulgación de la Ciencia, UNAM; Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C., México (2000)

*Este artículo apareció el lunes 09 de Julio del 2007 en el periódico La Unión de Morelos en colaboración con la Academia de Ciencias de Morelos.*

## Geles, espesantes y una bacteria fascinante

Tania Castillo-Marengo y Carlos Peña Malacara

Todos hemos visto alguna vez los geles, desde la gelatina comestible y los geles para el cabello, hasta algunos medicamentos en forma de gel. Sin embargo, las aplicaciones de los geles van más allá de estos usos cotidianos y cada día están adquiriendo mayor importancia en el área de la medicina y la biomedicina. Su importancia se debe a que pueden emplearse como soportes para atrapar ó “inmovilizar”, ya sea fármacos (medicinas) o incluso células de diferentes órganos, como el páncreas y el hígado (Figura 1). En el caso de los fármacos, se ha propuesto como una alternativa en el tratamiento de enfermedades como el cáncer, en donde mediante este tipo de geles se pueden incorporar los fármacos en regiones localizadas del organismo que permitan su liberación controlada sin que se dañen o afecten otros órganos. En el caso de la inmovilización de células, los geles se han propuesto como un sistema de “fabricación y liberación” de compuestos o sustancias que solo algunas células pueden producir, por ejemplo la insulina (la cual se produce en células de páncreas), para el tratamiento de enfermedades como la diabetes; pero también se ha propuesto el uso de estos geles como soporte de células en procesos de trasplantes de algunos órganos.

No obstante, los geles que pueden ser empleados para estos propósitos necesitan cubrir algunas características mínimas entre las que se encuentran: ser hidrofílicos (solubles en agua), inertes (esto es que no generen alguna reacción, con la sustancia o las células que se quieren inmovilizar). Además, es necesario que no sean tóxicos y que sean “biocompatibles”, esto es que los órganos en los que pretenden ser empleados no los rechacen. Aún cuando existen diversos compuestos de origen natural con la

capacidad de formar geles con alguna o varias de estas características existe un compuesto que cubre todas estas propiedades: el ALGINATO. El alginato es un polisacárido (polímero cuya unidad fundamental son azúcares o carbohidratos), el cual se conforma por unidades de los ácidos manurónico y gulurónico (los cuales en su estructura presentan algunas semejanzas con la glucosa o la fructuosa, ambos componentes del azúcar común).

Es importante hacer énfasis en que la composición química del alginato es muy importante para que pueda tener la capacidad de formar geles y entre las características químicas que nos interesan se encuentra el tamaño de las moléculas de alginato (peso molecular), así como la proporción de los azúcares básicos, los ácidos manurónico y gulurónico, de los cuales depende la suavidad o rigidez de los geles de alginato.

En la naturaleza, el alginato es producido por algunas especies de algas conocidas como “algas café o pardas” y bacterias como *Azotobacter vinelandii*. En el caso de los alginatos que se obtienen de algas, estos pueden presentar una composición variable, debido a que la producción de este polímero, se ve afectada por las condiciones ambientales en las cuales se encuentren los organismos productores. En los ecosistemas marinos estas variables no se pueden controlar, además de que en estos es común la presencia de contaminantes, como metales pesados que pueden afectar la composición de los alginatos, lo cual no es deseable para su uso en el área médica.

En cuanto *A. vinelandii* (Figura 2), se trata de una bacteria inofensiva para el hombre, que se desarrolla en el suelo, para ser más precisos en la hojarasca. Esta bacteria de vida libre (que no parasita a otros organismos), además de producir el alginato también es capaz de producir otro polímero de interés industrial, el poli-β-hidroxibutirato

(PHB). Cabe mencionar que el alginato es excretado al exterior de las células en tanto que el PHB se almacena intracelularmente. Otra característica importante de *A. vinelandii*, es su capacidad de asimilar e incorporar el nitrógeno atmosférico a su metabolismo, algo que muy pocos organismos saben hacer, convirtiéndolo en moléculas nitrogenadas que las plantas necesitan para crecer, por lo que también se le utiliza como biofertilizante. Finalmente, *A. vinelandii* también se caracteriza por su capacidad de diferenciarse (cambiar de forma) en estructuras resistentes a la desecación llamadas “quistes”, cuando las condiciones ambientales no son favorables. En la Figura 3 se muestra la microfotografía de un quiste de *A. vinelandii*, en donde se distinguen dos capas que lo rodean (denominadas intina y exina) de las cuales el alginato forma parte y en el interior se observan los gránulos de PHB.

La producción del alginato a partir de células de *Azotobacter* se realiza en cultivos líquidos llamados “fermentaciones sumergidas”, esto es, en un medio líquido (agua que contiene los nutrientes que las bacterias requieran para mantenerse, multiplicarse y producir alginato), en el que están suspendidas las bacterias y al que se le inyecta aire filtrado en recipientes llamados fermentadores o biorreactores. Una de las ventajas de usar este tipo de recipientes es la posibilidad de manipular y controlar las variables que influyen en el crecimiento de la bacteria, así como en la producción y en la composición del alginato, como son la temperatura, la acidez del medio (pH), la agitación (mezclado), así como la aireación o suministro de oxígeno.

Dependiendo de las condiciones de cultivo, esta bacteria puede presentar cambios importantes en su morfología (lo cual se denomina pleomorfismo). La morfología de *A. vinelandii* puede variar desde bacilos (forma alargada) hasta células en forma de cocos (esféricas), y su tamaño

también puede variar alcanzando hasta 5.0 micrómetros (un micrómetro es la milésima parte de un milímetro) de diámetro. Otra particularidad que se puede observar en las células de *A. vinelandii* durante su cultivo en biorreactor es que puede crecer en forma planctónica (bacterias nadando libremente), o bien puede agruparse en cadenas o incluso formar agregados irregulares (sin una forma definida y de tamaño variable; Figura 4).

Hace ya algunos años en nuestro laboratorio observamos que, el suministro de aire y el mezclado afectaban notablemente la producción y composición química del alginato así como la morfología de *A. vinelandii*. A partir de esos estudios se ha podido determinar que cuando se realizan cultivos en condiciones donde existe una limitación de oxígeno (cuando el oxígeno que se suministra no es suficiente para cubrir todos los requerimientos nutricionales de la bacteria), se favorece la producción de alginato de elevado peso molecular. Pero además la bacteria tiende a acumular el PHB, como material de reserva, el cual puede representar hasta el 50 % de su peso. En este caso, en el cultivo predominan células esféricas de gran tamaño con diámetros entre 2.0 y 5.0 micrómetros. En contraste, cuando los cultivos de *A. vinelandii* se desarrollan en condiciones de mayor aireación (sin limitación de oxígeno) las células son pequeñas con un diámetro promedio alrededor de 1.0 micrómetro (no acumulan PHB). Sin embargo, en estas condiciones de cultivo la producción y el peso molecular del alginato disminuyen. Además, se ha observado que cuando el suministro de oxígeno es bajo y el mezclado es deficiente, generalmente por una baja agitación, se favorece la formación de agregados celulares con un tamaño que puede alcanzar más de 100 micrómetros.

Dado que el tamaño del agregado está estrechamente relacionado con la presencia del polisacárido alginato, originalmente propusimos que el alto peso molecular

de este polímero, obtenido bajo condiciones de baja aireación y mezclado, favorecía la formación de agregados. Sin embargo, en estudios posteriores en nuestro laboratorio se ha demostrado que el alginato no es esencial para la formación de los agregados de *A. vinelandii*. Al parecer existen otros componentes, probablemente proteínas extracelulares y otros polisacáridos, involucrados en el proceso de agregación.

Actualmente sabemos que en cultivos en donde se generan agregados celulares de más de 100 micrómetros se presentan gradientes de oxígeno que afectan la velocidad a la cual la bacteria sintetiza el alginato, provocando con esto una disminución en la productividad del proceso. En contraste, en esa misma condición el polímero que sintetiza *A. vinelandii* es de mayor peso molecular (tamaño), por arriba del que comúnmente tienen los alginatos comerciales actuales, provenientes de algas marinas. Estos productos bacterianos de gran tamaño exhiben una capacidad viscosificante y gelificante superior a la que se puede obtener con los alginatos de algas, de tal manera que las cantidades que se requieren para alcanzar cierto nivel viscosificante en alimentos o productos farmacéuticos, sería menor que cuando se usa el alginato comercial convencional.

A partir del conocimiento generado de los cultivos de *A. vinelandii* en fermentadores, ha sido posible plantear estrategias para la producción de alginatos con características químicas específicas. Además, se debe mencionar que las variaciones morfológicas que se presentan bajo las diferentes condiciones de cultivo se deben a cambios en el metabolismo de *A. vinelandii* que como ya describimos impactan en la producción del alginato. El conocimiento de estos cambios metabólicos, han dado origen al diseño de estrategias de ingeniería genética, para la creación de cepas mejoradas de esta bacteria, para la obtención de al-

ginatos con características químicas definidas. En síntesis se puede afirmar que el conocimiento generado sobre el comportamiento de una bacteria como *A. vinelandii* en cultivos líquidos abre nuevas posibilidades para diseñar procesos para la síntesis de alginatos hechos a la medida, y por lo tanto de alta calidad y valor agregado.

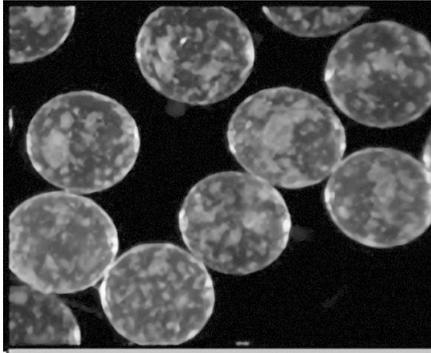


Figura 1. Células de hígado (hepatocitos) inmovilizadas en geles de alginato  
(Ver imagen a color en páginas centrales)

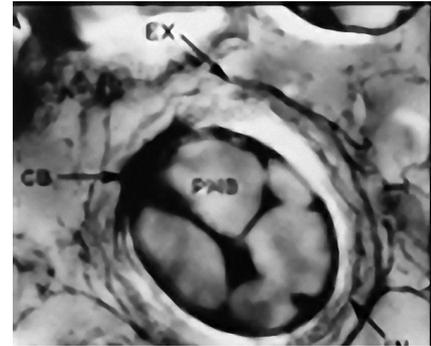


Figura 3. Microfotografía de un quiste de *Azotobacter vinelandii*  
(Ver imagen a color en páginas centrales)

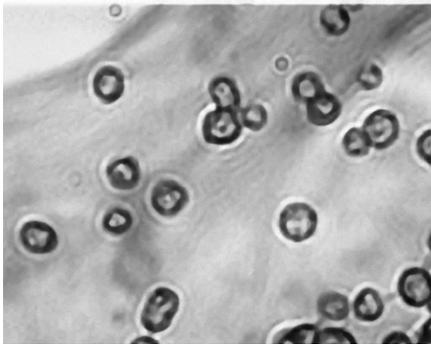


Figura 2. Matriz de anato en bacterias de *Azotobacter vinelandii*  
(Ver imagen a color en páginas centrales)

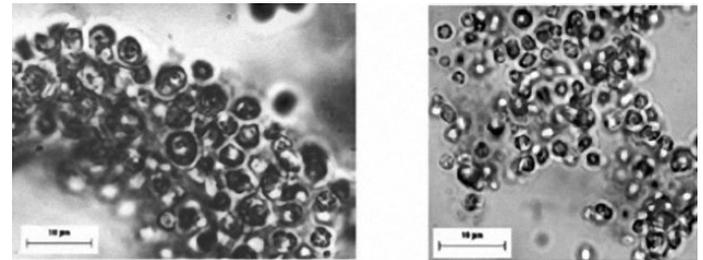


Figura 4. Agregados formados por *Azotobacter vinelandii*  
(Ver imagen a color en páginas centrales)

## El pulque, una bebida histórica con importantes implicaciones biotecnológicas

José Adelfo Escalante Lozada, Martha Giles-Gómez y Guillermo Gosset Lagarda

El uso de microorganismos tales como las bacterias ácido lácticas y algunas levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, ha sido una práctica común para la conservación de diferentes alimentos y bebidas tales como carne, leche, jugos, vegetales, masas o la savia de diferentes plantas, a través de procesos de fermentación. Durante éstos, la materia prima o sustrato de la fermentación es transformada por la actividad metabólica de diferentes microorganismos naturalmente asociados a ella o bien adicionados en la forma de iniciadores, confiriéndole características sensoriales (consistencia, olor, sabor, etc.) completamente distintas a las del sustrato original y que de forma práctica, permiten la conservación del producto modificado durante tiempos más largos. De este modo, la fermentación de la leche para la obtención de leches fermentadas tales como el yogurt; la fermentación del cuajo (fracción de proteínas de la leche) para la obtención de quesos madurados; de vegetales para dar lugar a productos como el chucrut alemán o el kimchii coreano; o la fermentación de granos como la cebada para dar lugar a la cerveza, son ejemplos de procesos de fermentación de bebidas y de alimentos elaborados desde hace siglos.

En la historia de la humanidad, no existe una referencia exacta que permita ubicar el origen del uso sistemático de la fermentación para la producción de este tipo de productos, pero se supone que debieron de iniciar cuando el hombre se volvió sedentario y comenzó a producir y almacenar diferentes productos como la leche,

vegetales y carne fresca. En un principio, la fermentación de un producto como la leche fresca, pudo haberse considerado como una contaminación que cambiaba de forma radical sus propiedades, siendo común, muy seguramente, que se desechara el producto modificado. Sin embargo, la curiosidad humana ha sido el motor de una gran cantidad de descubrimientos e invenciones que han modificado de forma importante nuestro modo de vida, de tal modo, que alguien decidió probar esta leche “contaminada” y consideró que tenía características sensoriales, que si bien eran distintas a la de la leche fresca, no fueron desagradables para el gusto. Al tratar de reproducir este proceso ya sea agregando una porción del producto fermentado al sustrato fresco (inoculación) o manteniéndolo en las mismas condiciones ambientales (p.e. uso de la misma vasija o recipiente, mismo procedimiento de almacenamiento, etc.), se puede suponer que se dio origen a la producción sistemática de una gran diversidad de productos fermentados en diferentes lugares del mundo.

Esta actividad se realizó de manera empírica desde sus orígenes, hasta que a partir de la segunda mitad del siglo XIX y de forma importante durante la primera mitad del siglo XX, se comenzaron a aislar, purificar e identificar aquellos microorganismos presentes en el producto fermentado final, lo que permitió, aunado al desarrollo de recipientes (fermentadores), poder realizar la fermentación bajo condiciones óptimas (condiciones asépticas, sustratos específicos, temperatura óptima), surgiendo así procesos industriales de producción de diversos productos fermentados dentro de los que destacaron la cerveza o el yogurt. Sin embargo, a pesar de que en la actualidad hay una gran cantidad de productos fermentados que se obtienen a través de procesos industrializados, existe una gran diversidad de procesos de fermentación tradicionales que no han

variado de forma importante su proceso de elaboración a través de los siglos.

En este contexto, en México existen diversos productos fermentados tradicionales dentro de los que destaca el pulque, una bebida fermentada alcohólica no destilada que se produce por la fermentación de la savia o *aguamiel* extraído de diversas especies de magueyes pulqueros. El aguamiel fresco es colectado de plantas seleccionadas a las que, una vez alcanzada la edad adulta se perfora una cavidad desde la parte superior del corazón o piña de la planta antes de que nazca el quiote (tallo comestible de la flor del maguey) y con esto favorecer un periodo más largo de producción de aguamiel. El proceso de fermentación tradicional del pulque ha permanecido prácticamente sin cambios. El proceso inicia con la colecta diaria del aguamiel y su inmediata transferencia a un contenedor, tradicionalmente una bolsa de piel de cerdo o de cabra llamada cuero o bien contenedores de madera conocidos como castañas o recientemente en recipientes plásticos en los que el aguamiel es transportado a contenedores (fermentador) hechos de diferentes materiales como piel, madera plástico o fibra de vidrio, y se ubican en espacios cerrados llamados tinacales. El proceso de fermentación inicia con la preparación de una “semilla”, la cual es una porción de pulque previamente fermentado y preparada de diversas formas que se distribuye en los recipientes donde se realizará la fermentación. El aguamiel recién colectado es depositado en estos recipientes con la semilla, iniciando así la fermentación hasta que después de algunas horas la bebida desarrolla cierto nivel de viscosidad y producción de alcohol. Estos criterios se han utilizado de forma tradicional para determinar la duración de la fermentación. El producto final está listo para su consumo y es una bebida viscosa, efervescente y con un grado alcohólico de 4 hasta 7 °G. L. (por lo gene-

ral las cervezas tienen un contenido alcohólico de entre 3 y 6 °G. L.). Dependiendo del gusto, el pulque se consume directamente como suave, fuerte o maduro dependiendo del tiempo de fermentación; o bien con la adición de jugos o mezclado con frutas, vegetales o algunos cereales, denominándosele como pulques curados (Escalante et al., 2012). Es importante resaltar que aunque se menciona que el pulque está listo para su consumo, en sentido estricto la fermentación no se detiene al no aplicar ningún tratamiento que detenga el crecimiento microbiano, de tal forma que un pulque suave se convierte en fuerte y maduro, si no es consumido después de un cierto tiempo de fermentación. La producción del pulque es un proceso de fermentación tradicional que se desarrolla a temperatura ambiente en condiciones no asépticas. En él participan diversos grupos de bacterias y levaduras que se encuentran naturalmente asociados al maguey, al aguamiel y que son incorporados durante los procesos de recolección, transporte y manipulación, y así como aquellos que son incorporados al ser mezclado el aguamiel con la semilla. Esta diversidad de microorganismos desarrolla durante la producción del pulque tres tipos de fermentación que definen las características finales del producto. La fermentación alcohólica, es un proceso en el que participan principalmente levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y bacterias como *Zymomonas mobilis*, siendo ambos microorganismos capaces de fermentar los azúcares presentes en el aguamiel hasta etanol; fermentación ácida, realizada principalmente por bacterias ácido lácticas y ácido acéticas, las cuales a través de sus respectivos metabolismos son capaces de fermentar los azúcares presentes en el aguamiel hasta ácido láctico y ácido acético, respectivamente; y una fermentación viscosa, en la cual, se sintetizan gomas o polisacáridos producidos por bacterias lácticas del género *Leuconostoc* a partir de la

sacarosa presente en el aguamiel. La producción de estos polisacáridos le confiere al pulque su consistencia viscosa característica. El carácter efervescente de la bebida se debe a la producción de dióxido de carbono, un gas subproducto del metabolismo alcohólico y fermentativo de diversos microorganismos (Escalante et al., 2012).

Los primeros estudios sobre la microbiología del pulque realizados por Alfredo Sánchez-Marroquín entre 1946-1957, permitieron identificar y proponer a las bacterias identificadas como *Lactobacillus* sp. *Leuconostoc mesenteroides*, *Zymomonas mobilis* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como los microorganismos esenciales en la fermentación. A partir de cultivos puros de estos microorganismos, Sánchez-Marroquín preparó una mezcla para inocular aguamiel esterilizado y desarrollar así una fermentación, resultando en un producto final con las mismas características que el pulque de la más alta calidad obtenido de una fermentación tradicional en cuanto a contenido de alcohol, viscosidad y acidez (Sánchez-Marroquín and Hope, 1953; Sánchez-Marroquín et al., 1957). Aunque estos resultados sugieren el importante papel de estos microorganismos durante la fermentación, estudios recientes han demostrado la presencia de una diversidad microbiana muy compleja conformada por bacterias y levaduras (Escalante et al., 2004; 2008; Lappe-Oliveras et al., 2008). El análisis de la diversidad bacteriana presente en muestras de pulque colectadas del Estado de México, Morelos y del estado de Hidalgo, mostraron la presencia de grupos bacterianos que solo estaban presentes en cada una de las muestras analizadas, mientras que por otro lado, se detectaron grupos bacterianos presentes en las tres muestras. De los microorganismos encontrados (algunos de ellos por primera vez en el aguamiel y en el pulque), se destacó la presencia de una bacteria ácido láctica relacionada

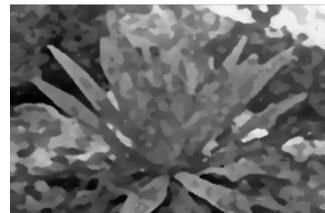
con *Lactobacillus acidophilus*, el cual fue el microorganismo más abundante en las tres muestras, mientras las bacterias *L. mesenteroides* y *Z. mobilis*, previamente reportadas como microorganismos esenciales para la fermentación, solo fueron detectadas en una baja proporción en las tres muestras (Escalante et al., 2004).

El análisis de la diversidad bacteriana presente en el aguamiel y durante una fermentación de 6 horas, permitió identificar a diferentes especies de bacterias ácido lácticas en el aguamiel y en diferentes etapas de la fermentación, destacándose *Leuconostoc kimchii*, *L. citreum* y *Lactobacillus acidophilus* (Escalante et al., 2008). El estudio detallado de las capacidades metabólicas de algunos de estos microorganismos permitirá incrementar el conocimiento que se tiene sobre el papel de cada grupo microbiano de importancia durante el proceso de fermentación del pulque.

La gran diversidad de bacterias ácido lácticas detectadas en el aguamiel y durante la fermentación, aunadas a la presencia de compuestos de tipo prebiótico (sustancias que favorecen el crecimiento de microorganismos benéficos en el intestino), tales como la inulina en el aguamiel y durante las primeras etapas de fermentación, han tenido como consecuencia que desde hace algunos años, varios grupos de investigación se hayan enfocado nuevamente al estudio de la microbiología del pulque. Como resultado de estos trabajos se han aislado y caracterizado especies de bacterias y levaduras que producen enzimas de interés industrial tales como la dextranasa, que es producida por *L. mesenteroides* y que es responsable de la síntesis del polisacárido extracelular conocido como dextrana, el cual tiene importantes aplicaciones industriales (Chellapandian et al., 1999) y la enzima inulinasa producida por una levadura del género *Kluyveromyces*, enzima utilizada para la degradación de la inulina (Cruz-Guerrero et al., 2006). Re-

cientemente se han aislado e identificado diversas especies de bacteria lácticas resistentes condiciones de crecimiento que simulan su paso por el estómago cuando el pulque es consumido y que son capaces también de inhibir el crecimiento de algunas bacterias patógenas. Los resultados obtenidos sugieren la capacidad de estas bacterias de tener un posible efecto probiótico (bacterias lácticas benéficas del intestino). Estos resultados, permiten comenzar a establecer las bases científicas de la farmacopea popular existente en torno al consumo del pulque, en la que se le asocia a su consumo directo y administrado en preparaciones, diversos efectos benéficos hacia la salud (Escalante et al., 2012).

En la actualidad el pulque tradicional es una bebida que se produce en un bajo nivel de producción en regiones rurales principalmente y para su elaboración se continúan utilizando técnicas de producción que han variado muy poco respecto al proceso tradicional utilizado desde hace cientos de años. Aunque el nivel de producción dista mucho de alcanzar el que se tenía al inicio del siglo XX y que era estimada en 500 millones de litros anuales (Escalante et al., 2012), se han desarrollado de forma exitosa diversos esfuerzos para industrializar el proceso de fermentación, dando como resultado la producción de pulque enlatado o embotellado, principalmente para el mercado internacional. De igual forma, el resurgimiento del gusto por el consumo del pulque tradicional como una bebida gourmet con características gastronómicas y nutricionales atractivas para el consumidor, ha hecho que esta bebida tenga un resurgimiento entre consumidores de las grandes ciudades.



#### Referencias:

1. Adelfo Escalante, Martha Giles-Gómez, Guadalupe Esquivel Flores, Violeta Matus Acuña, Rubén Moreno Terrazas, Agustín López-Munguía, Patricia Lappe-Oliveras. Pulque fermentation (2012). In: Y. H. Hui, Ase Slovejg Hansen, E. Ozgul Evranuz, Fidel Toldra, Leo M. L. Nollet, Weibiao Zhou (Eds) Handbook of plant-based fermented food and beverage technology. Vol II. Chapter 43. CRC Press, FL. pp: 691-706. ISBN 9781466561458.
2. Alma E. Cruz-Guerrero, José Luis Olvera, Mariano García-Garibay and Lorena Gómez-Ruiz. 2006. Inulinase-hyperproducing strains of *Kluyveromyces* sp. isolated from aguamiel (Agave sap) and pulque. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22: 115–117.
3. Chellapandian M, Larios C, Sánchez-González M, López-Munguía A. 1988. Production and prop-

- erties of a dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from 'pulque,' a traditional Aztec alcoholic beverage. *J Ind Microbiol Biotechnol*21:51–6.
4. Escalante A, Giles-Gómez M, Hernández G, Córdova-Aguilar MS, López-Munguía A, Gosset G, Bolívar F. 2008. Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *Int J. Food Microbiol*124:126–34.
  5. Escalante A, Rodríguez ME, Martínez A, López-Munguía A, Bolívar F, Gosset G. 2004. Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Lett*235:273–9.
  6. Lappe-Oliveras P, Moreno-Terrazas R, Arrizon-Gaviño J, Herrera-Suárez T, García-Mendoza A, Gschaedler-Mathis A. 2008. Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic non distilled and distilled Agavebeverages. *FEMS Yeast Res*8:1037–52.
  7. Sánchez-Marroquín A, Hope PH. 1953. Agave juice. Fermentation and chemical composition of some species. *Agric Food Chem*1:246–9.
  8. Sánchez-Marroquín A, Terán J, Piso J. 1957. Estudios sobre la microbiología del pulque. XVIII. *Rev Soc Quim Mex*1:167–74.

## Bacterias que limpian sustancias contaminantes

*Lucía Perezgasga Ciscomani y Rodrigo Fernández Mas*

¿Alguna vez has visto un derrame de petróleo o escuchado de gente intoxicada por cromo o plomo? Nuestro planeta es como un gran ser vivo que si no lo cuidamos, puede “enfermarse” debido a distintos tipos de contaminación, o por la sobre explotación que hace el hombre de los recursos naturales. Pero, ¿qué es la contaminación? La contaminación es la incorporación al ambiente de sustancias tóxicas, que pueden perjudicar a todos los seres vivos y puede ser en el agua, aire, suelos, atmosférica o acústica. Este es un problema que se agrava conforme aumenta la población en el planeta. Y, ¿cuáles son esos contaminantes que nos preocupan tanto? Pues son los plaguicidas que se usan para mantener los cultivos y el ganado libres de insectos, gusanos, etc., los plásticos, los colorantes que se utilizan en la industria textil y que al ser desechados a los mantos acuíferos, dañan a muchas especies de peces que luego son consumidos por los humanos, los metales pesados como el cromo, plomo, hierro y uranio y los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs).

En la actualidad, todavía se utilizan algunos métodos físicos (puede ser la incineración) y químicos (como la óxido-reducción de los contaminantes o la extracción con disolventes) para remediar sitios contaminados, sin embargo, estos métodos pueden provocar más problemas. También se pueden agregar algunas sustancias químicas y agua que ayuden a degradar el compuesto en cuestión para que posteriormente pueda ser aprovechado por algunos microorganismos presentes en el sitio. El uso de agentes biológicos (pueden ser microorganismos como las bacte-

rias, hongos, plantas o enzimas) para degradar contaminantes presentes en aire, agua y suelos hacia formas menos tóxicas, es lo que se conoce como *biorremediación*.

Afortunadamente, como ya dijimos, las bacterias han desarrollado la capacidad para degradar distintos compuestos contaminantes. Cuando nuestro planeta era joven, las bacterias fueron las primeras en aparecer y como las condiciones de la Tierra eran tan diversas, las bacterias “aprendieron” a vivir en diferentes ambientes y a alimentarse de fuentes orgánicas muy distintas, lo que las llevó a desarrollar muchos tipos de metabolismos (suma de reacciones químicas para producir energía y su uso para sintetizar los componentes celulares). Las bacterias presentan las mismas formas de producción de energía que los eucariontes (organismos cuyas células tienen un núcleo): fermentación a partir de alcohol (como en las levaduras), fermentación a partir de ácido láctico (como en los músculos), respiración aeróbica (a partir de oxígeno) y fotosíntesis oxigénica, además de otros tipos de metabolismos que son casi exclusivos de ellas. Presentan tipos especiales de fermentación, respiración anaeróbica, litotrofia (uso de sustancias inorgánicas como fuente de energía), fotoheterotrofia (uso de compuestos orgánicos como fuentes de carbono durante la fotosíntesis bacteriana), fotosíntesis anoxigénica (no se produce oxígeno), metanogénesis (uso de hidrógeno como fuente de energía para producir metano) y otras formas de fijar el bióxido de carbono, que sólo se conocen en las bacterias.

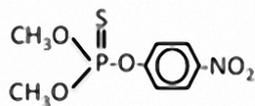
Las bacterias pueden vivir en troneras submarinas a temperaturas por arriba del punto de ebullición del agua, o a temperaturas bajo cero, como en los grandes glaciares. Pueden crecer en condiciones ácidas o alcalinas, en altas concentraciones de sal (como en el Mar Muerto), en presencia de metales pesados, solventes orgánicos y substan-

cias tóxicas. Pueden sobrevivir en minas de uranio con altos niveles de radioactividad.

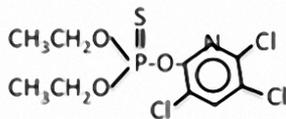
Por ejemplo, las bacterias del género *Thiobacillus* crecen en pantanos, aguas residuales, minas ácidas, aguas salobres y lodos. Obtienen su energía a partir de la oxidación de diferentes compuestos azufrados como el azufre elemental, sulfuros y tiosulfatos, convirtiéndolos en sulfatos no tóxicos que pueden ser utilizados por otros organismos.

*Ralstonia metallidurans* y *Deinococcus radiodurans* pueden tolerar niveles muy altos de metales tóxicos y radioactividad respectivamente. Es por ello que estos dos organismos, además de bacterias del género *Geobacter* y *Desulfobacter*, se han utilizado para limpiar sitios contaminados con metales como el hierro, cobre, plata y uranio.

Un ejemplo de bacterias que pueden ser útiles para limpiar sitios contaminados con plaguicidas son *Pseudomonas* y *Flavobacterium*, entre otras. Estos dos géneros de bacterias producen una enzima que puede degradar plaguicidas organofosforados, que son muy utilizados en la actualidad, son neurotóxicos y representan un grave problema de salud a nivel mundial.



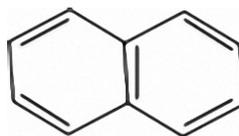
Paratión metílico



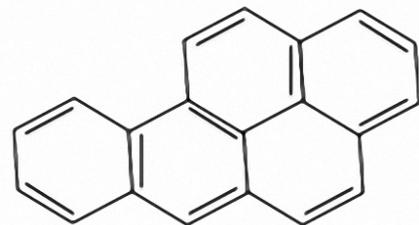
Clorpirifos

Fig. 1. Dos ejemplos de plaguicidas organofosforados.

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos son el producto de una combustión incompleta de compuestos orgánicos provenientes de incendios forestales, erupciones volcánicas y en mayor grado, por las actividades humanas (la actividad industrial, el transporte y la quema de plásticos). Estos contaminantes, que son muy tóxicos y cancerígenos, se encuentran en el aire, suelo y sedimentos.



Naftaleno



Benzo (a) pireno

Fig. 2. Hidrocarburos policíclicos aromáticos.

La biodegradación del naftaleno es la mejor estudiada porque es el hidrocarburo más simple y más soluble. Bacterias del género *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Aeromonas*, *Rhodococcus* y *Bacillus* pueden degradar este compuesto y algunos de estos géneros también pueden degradar al benzo (a) pireno (Fig. 2), que es un hidrocarburo más difícil de descomponer.

En cuanto a la biorremediación de los plásticos, que dijimos que eran otro de los contaminantes importantes, éstos pueden ser degradados por bacterias como *Bacillus*, *Penicillium*, *Acidovarax*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Rhizopus* y *Pseudomonas*.

Los colorantes que se usan en la industria textil, son frecuentemente desechados a los cuerpos de agua provocando cáncer, hemorragias, ulceraciones en la piel y daño a los riñones, hígado, sistema reproductivo y el sistema nervioso central. En un estudio realizado en la India, donde la industria textil es sumamente importante, encontraron que bacterias de los géneros *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Staphylococcus* fueron capaces de degradar 3 tipos de colorantes a diferentes concentraciones.

Las bacterias no son los únicos organismos capaces de degradar sustancias contaminantes, pero con estos pocos ejemplos, te puedes dar cuenta que dada la enorme diversidad de ambientes en los que habitan y de metabolismos que poseen, es muy posible que existan bacterias que degraden cada uno de los compuestos que ha generado el hombre y que ponen en peligro a nuestro planeta. ¡Y eso que sólo se ha identificado menos del 1% de las bacterias presentes en la naturaleza!

## Ejemplo de una dulce y exitosa recombinación

*Yoloxóchitl Sánchez Guevara*

Muy probablemente, a partir de unos años para acá, has leído o escuchado que los *Organismos Genéticamente Modificados* (OGMs) podrían ser la solución a muchos de nuestros problemas. Este tipo de organismos existen gracias a los avances en la ciencia, particularmente a la *Ingeniería Genética*, o por decirlo más fácil, a la posibilidad de modificar algunos genes. De manera más simple, podremos resumirlo así: el ADN (ácido desoxirribonucleico) de los organismos, es como un libro dividido en capítulos, que guardan información (la información hereditaria) y que se encargan de sintetizar proteínas. Cada capítulo o segmento se conoce como un gen, es decir, un fragmento de ADN que tiene la información para producir diferentes proteínas dependiendo de las necesidades de cada organismo.

Pues gracias a la pericia de muchos científicos, fascinados por aprender más acerca del ADN, ahora es posible extraer esta molécula de las células, dividirla en fragmentos (o capítulos) utilizando enzimas (proteínas que funcionan como tijeras químicas) e insertar trozos en segmentos de ADN de otros organismos, por ejemplo, hacer combinaciones de ADN de humano y bacterias y sintetizar nuevas proteínas. Es decir, algo así como hacer un nuevo libro (ADN) con capítulos combinados (de humanos y bacterias) y tener nuevas historias (nuevas proteínas).

Pero ¿por que decíamos al inicio que esto nos serviría para resolver algunos de nuestros problemas? Pues porque gracias a la producción de OGMs tenemos, por ejemplo, cultivos de importancia económica que son resistentes a ciertos insectos, como por ejemplo, el caso del

algodón mexicano, cultivos con mayor tolerancia a herbicidas o incluso a condiciones ambientales no favorables y como olvidar a esos enormes jitomates rojos que tienen maduración más lenta. También podemos mencionar a las bacterias capaces de degradar petróleo, a las que producen quimosina, una proteína que se utiliza como sustituto del cuajo en la producción industrial de los quesos.

Y por supuesto, no podemos dejar de mencionar otro derivado de la tecnología del *ADN recombinante* y que es considerado el primer producto comercializado para la salud humana: la insulina.

Entre los humanos, un impedimento para contar con una vida normal, larga y feliz, puede ser el tener una enfermedad. Y si nos centramos en los millones de mexicanos que poblamos el globo, deberíamos referirnos a un mal muy actual y preocupante: la diabetes *mellitus*, padecimiento del cual seguramente has escuchado y que junto con la obesidad y la hipertensión (trastornos relacionados con el síndrome metabólico), se han convertido en un mal que además de provocar distintos daños a la salud, han quitado el sueño a médicos, epidemiólogos, enfermeras, nutriólogos y a muchos encargados de mantener saludables a los humanos.

Cuando el médico nos diagnostica diabetes *mellitus*, quiere decir que nuestro cuerpo presenta un trastorno en el metabolismo debido a que la insulina, ya no funciona bien, no se secreta adecuadamente o ninguna de las dos cosas.

Era el año 1869, cuando un estudiante alemán, Paul Lagerhans, encontró un grupo de células en el páncreas que bautizó como “islas o islotes de Lagerhans”. Posteriormente, el científico Laguesse estudio más estas células en las que se producía un precursor inactivo (proinsulina), el cual pasa al *aparato de Golgi* (un organelo celular), don-

de se modifica, eliminando una parte y uniendo a dos fragmentos restantes mediante puentes de disulfuro entre cisteínas, para formar una proteína de dos cadenas (la cadena A y la cadena B) de 21 y 30 *aminoácidos* respectivamente y que entonces se llama insulina (cuyo nombre deriva de la palabra *insel* que en alemán significa islote o isla).

Aislada por primera vez en 1921 a partir de páncreas de animales, se inició el estudio de la hormona y ahora se sabe que cuando falla, ocurren defectos en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, lo cual, a largo plazo provoca daños, por ejemplo, en la retina, los riñones, las neuronas y nos hace propensos a sufrir daños cardiovasculares.

Y justamente es esta hormona, la insulina, la que permite a las células de nuestro cuerpo, utilizar la glucosa (un carbohidrato o azúcar) cuando necesitamos llevar a cabo procesos de síntesis en que se requiere energía (por ejemplo movernos) y a la vez, mantiene bajas las concentraciones de glucosa en la sangre. En el músculo y en otros tejidos (excepto en el cerebro), la insulina produce un transporte rápido de glucosa y aminoácidos al interior de las células. En el hígado, esta hormona promueve la captación y almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno, inhibe la producción de glucosa (conocido como gluconeogénesis) y promueve la conversión del exceso de glucosa en grasa.

Algunos pacientes que no pueden producir insulina, necesitan inyecciones periódicas de esta hormona, y fue en 1922 cuando por primera vez se suministró insulina a un paciente con diabetes. Sin embargo, hasta antes de los años 80s, sólo se obtenía del páncreas de vacas y cerdos (insulina bovina e insulina porcina) y para obtener las escalas industriales que eran necesarias, se sacrificaban miles de vacas obteniendo un muy bajo rendimiento. Además,

otra limitante de usar insulina animal, eran las impurezas durante su obtención y que provocaban reacciones alérgicas.

Tiempo después, en 1955, Sanger descifra la composición de la insulina y con ello permite entender como funciona en el organismo, las interacciones que tiene y las diferencias entre las insulinas aisladas de diferentes organismos. Actualmente se sabe que, de forma estructural, la insulina porcina difiere de la insulina humana en un aminoácido (una alanina en la posición 30 de la cadena B) y la insulina bovina es diferente de la humana en tres posiciones (B30, A8 y A10); diferencias suficientes para producir por ejemplo, erupciones cutáneas en los pacientes alérgicos.

En 1963 Meinhofer y su grupo de trabajo, sintetizó insulina *in vitro* (es decir de manera experimental en un laboratorio) pero la producción no lograba ser suficiente para la demanda de la población: ¡para la síntesis, se requería al menos de 200 reacciones separadas!

En este sentido, cuando en 1978, se logró crear la *insulina recombinante*, se garantiza el suministro necesario de insulina a nivel mundial, pero sobre todo esa insulina que se produce dentro de bacterias, tiene la ventaja de ser idéntica a la insulina humana y eliminar los problemas de alergias y los de de otra índole, causados cuando los pacientes se suministraban insulina animal. La insulina recombinante, administrada por vía subcutánea se absorbe más rápidamente y actúa en menor período de tiempo. El uso de tecnologías recombinantes abrió un gran campo para la biología. Fue el comienzo de una nueva era en la ciencia.

Pero ¿Cómo se produce la insulina recombinante? En términos simples, para la creación de una proteína recombinante, se deben localizar el o los genes de interés

y conocer bien sus funciones (en este caso el gen que produce la insulina), obtenerlo de una célula de un organismo donador (en este caso el humano), amplificarlo mediante una reacción en cadena con una enzima llamada polimerasa (reacción de PCR), guardarlo (clonarlo) en un vector plasmídico bacteriano (que es un fragmento de ADN de una bacteria) para producir el ADN recombinante (unión de ADN proveniente de dos organismos diferentes) e introducirlo el ADN mediante alguna técnica de ingeniería genética (en este caso transformación) en un donador (en este caso, una bacteria) que se encargará de “adoptar al nuevo gen” y producir masivamente la proteína (expresar la proteína) de interés (en este caso insulina) que será conocida como la proteína recombinante.

Para producir estas proteínas recombinantes, normalmente se expresan en bacterias como *Escherichia coli*, mejor conocida como *E. coli*, ya que son fáciles de mantener, crecen rápido y ya se conoce su genoma (es decir, todos los genes).

En estas bacterias que son usadas como pequeñas fábricas, las dos cadenas de la insulina se producen de manera independiente. Posteriormente se lleva a cabo un proceso de purificación, plegamiento y unión *in vitro* de las cadenas, mediante la oxidación de las cisteínas para formar los puentes de disulfuro y la proteína activa.

Pero no todo esta resuelto aun, y los científicos deben trabajar para resolver un problema que normalmente se presenta en la producción de bacterias. En estos organismos no existe la glicosilación proteica, es decir, cuando a las proteínas se les “agregan” algunos carbohidratos que les permite tener una función más estable y específica, por lo que entonces, algunas de las proteínas producidas, al no estar completas, perderán su función.

Es importante mencionar que para la producción de insulina recombinante se han probado otro tipo de or-

ganismos además de las bacterias, resultando estas últimas las más idóneas. Por ejemplo, en levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae* que poseen células eucarióticas y por lo tanto son más similares a las células humanas que las bacterias, son fáciles de manipular genéticamente pero el proceso de glicosilación proteica es muy diferente al proceso en humanos, por lo que las proteínas recombinantes son más tóxicas que benéficas. Otro tipo de células muy parecidas a las de humano son las células de insecto que se cultivan fácilmente *in vitro* pero el proceso es caro. Si se usan los insectos completos infectados con un tipo de virus modificados, se presenta el mismo problema de glicosilación como en el caso de las levaduras.

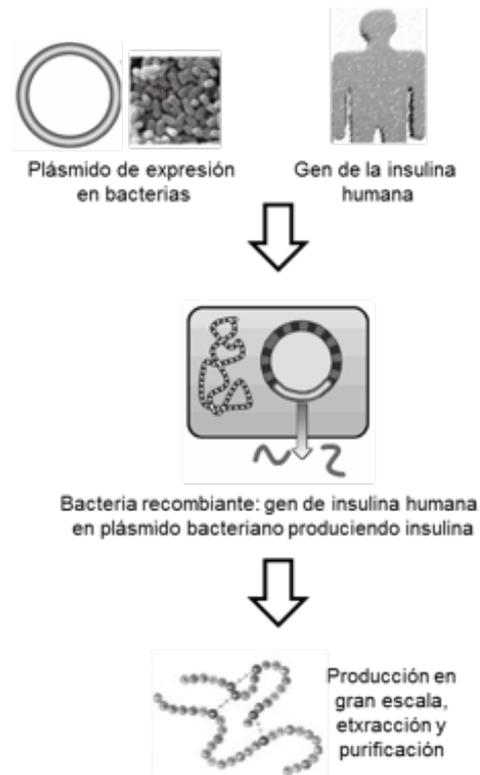
Si consideramos trabajar con células de mamífero, encontramos la ventaja de que el procesamiento de las proteínas recombinantes producidas es similar, por lo que a pesar de pequeños cambios en los patrones de glicosilación, la función de las proteínas se conserva. Sin embargo, el crecimiento de este tipo de células es más lento y los cultivos son más susceptibles a contaminación. Entonces podemos decir que el uso de bacterias para producción de proteínas recombinantes es una buena selección.

Hoy en día, prácticamente todos los diabéticos son tratados con algún tipo de insulina recombinante producida en bacterias desarrollada por equipos de científicos de varias empresas o universidades, que han logrado desarrollar diferentes análogos para cada necesidad (de efecto retardado, más potente, etc). Así, la próxima vez que escuches que alguien menciona a la *Humulina*, sabrás que es el nombre comercial de una insulina recombinante y no la confundirás con un guiso árabe o el nombre de alguna prima que no conocías.

Y es gracias a la posibilidad de conocer a las bacterias, modificarlas y aprovecharlas que se puede dar so-

lución a un problema tan cotidiano. Pero la historia apenas empieza: existen otros proyectos para producción de proinsulina por ejemplo en la leche de bovinos, en yogurt producido por otros microorganismos, en algunas plantas oleaginosas, en papas o incluso en el brócoli, donde el gen de la insulina humana se transfiere usando *Agrobacterium rhizogenes*. Al utilizar alimentos que normalmente el hombre ingiere, se evitan los procesos de purificación y sobre todo, las dolorosas inyecciones. ¿Será posible en un futuro pensar en que comeremos bacterias? Pero hasta el momento, es *E. coli* la bacteria líder en producción de insulina.

Ahora, si, ¿te das cuenta de lo maravilloso que es conocer a las bacterias, aprender de ellas y aprovechar sus bondades?; todo lo antes descrito es sólo un ejemplo entre miles más.



## Taq polimerasa: la copiadora de ADN

Cynthia Gemalit Martínez Centeno

Hemos hablado ya de que las bacterias son organismos cosmopolitas, es decir pueden habitar cualquier lugar que se te ocurra como: tu *sandwich*, tu intestino, la raíz de algunas plantas; pero ¿te imaginas bacterias viviendo en medio de una roca o sobre un glaciar? Pues sí, existen y se conocen como bacterias extremófilas. Estos microorganismos son capaces de resistir condiciones de vida que para cualquier otro organismo vivo resultarían letales. Dentro de este grande grupo encontramos bacterias que pueden vivir en condiciones : muy ácidas o muy básicas, también existen aquellas que viven sometidas a una alta presión atmosférica como las que habitan los fondos marinos, hay también las que resisten altas concentraciones de sales en su hábitat, altas concentraciones de metales, escasez de agua y temperaturas muy bajas, sólo por mencionar algunas; pero las que a mí más me gustan son las bacterias conocidas como termófilas que pueden habitar lugares con temperaturas superiores a los 45°C. ¿Alguna vez te has quemado con agua caliente? Pues algunas de nuestras amiguitas las bacterias termófilas pueden crecer cómodamente a esa temperatura, es más, algunas necesitan de dicha temperatura para poder funcionar correctamente.

En el año 1969, un científico llamado Thomas Brock descubrió en una de las fuentes termales del Parque Nacional de Yellowstone en Estados Unidos a una bacteria a la que llamó *Thermus aquaticus*, la cual de manera indirecta años más tarde le permitiría ganar a otro científico, Kary Mullis, el premio Nobel de química por desarrollar la técnica

usada en biología molecular conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, para los cuates.

Las bacterias extremófilas a través de la evolución han tenido que desarrollar mecanismos que les permitan sobrevivir a condiciones bajo las que tú y yo moriríamos sin lugar a dudas. Y precisamente fue una de estas modificaciones lo que le permitió a Mullis ganar el premio Nobel en 1993. La PCR es una reacción mediante la cual un segmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) puede copiarse hasta obtener millones y millones de copias, la “copiadora”, es una enzima llamada polimerasa de ADN, el hecho de tener tantas copias ofrece una serie de ventajas porque permite a los científicos hacer diagnósticos que de alguna otra manera serían muy tardados. La polimerasa de ADN se encuentra de manera natural dentro de los núcleos de nuestras células, y es la encargada de replicar el material genético cada vez que alguna de las células va a dividirse para dar lugar a células nuevas, y como la temperatura de nuestro cuerpo es de alrededor de los treinta y siete grados centígrados, es a esta temperatura a la que la polimerasa de ADN trabaja de manera óptima, sin embargo, las bacterias termófilas, como en el caso de *T. aquaticus*, han desarrollado polimerasas que son capaces de trabajar a temperaturas por arriba de los setenta grados centígrados e incluso mantenerse como si nada a los noventa grados centígrados; esto es importante porque para copiar al ADN primero debemos de separar las dos hebras que lo componen y esto se logra a temperaturas muy altas a las que otras polimerasas perderían su estructura y por lo tanto su función.

Y este es sólo un ejemplo de una forma de “manipular” el ADN, por ejemplo de bacterias para conocer de ellas lo más íntimo: su material genético.



## La contaminación por plásticos: bacterias al rescate

Cinthia Ernestina Núñez López y Daniel Genaro Segura González

Todos sabemos lo maravillosos que son los plásticos. Sólo hay que mirar alrededor un momento para apreciar la enorme variedad de productos que usamos que están fabricados con plásticos: bolsas, envases y utensilios de lo más diverso. La vida moderna no sería la misma sin estos materiales. Los plásticos, que generalmente se obtienen del petróleo, son fáciles de moldear, impermeables, ligeros, aislantes y muy, muy resistentes a diversos compuestos químicos, a la corrosión y a la intemperie. Además, son materiales muy baratos. Sin embargo, esas mismas características que los hacen tan útiles, están generando un problema en el ambiente: los plásticos, por ser baratos, son desechables, y por su resistencia no se destruyen fácilmente. De esta manera, en diversos ambientes naturales como ríos, lagos y océanos, y en los depósitos de basura en todo el mundo se están acumulando millones de toneladas de plásticos. Las alternativas como la reutilización y el reciclaje de los materiales, son costosas y sólo se aplican para una pequeña fracción de los plásticos producidos.

Una posible solución para el problema de contaminación, la constituye la producción de plásticos que sean degradables. Esto es, materiales que después de ser usados se descomponen rápidamente en el ambiente, sin producir compuestos dañinos. Desde hace ya algunos años existen plásticos que se degradan más fácilmente en el ambiente, por ejemplo, en presencia de la luz (fotodegradables), o aquellos que espontáneamente reaccionan y se oxidan (oxodegradables), desapareciendo de nuestra vista; sin embargo, en muchas ocasiones estos plásticos al descompo-

nerse forman partículas más pequeñas que no se degradan por completo.

¿Y qué tienen que ver las bacterias con el problema de los plásticos? Afortunadamente, sí tienen una relación muy interesante. En los años 1920s un investigador francés llamado Maurice Lemoigne hizo un descubrimiento muy importante cuando estudiaba una bacteria llamada *Bacillus megaterium*. Encontró que esta bacteria producía y acumulaba en su interior una sustancia que le servía como material de reserva, algo semejante a las grasas que acumulamos los humanos y muchos animales, o a los aceites que acumulan las plantas. Se dio cuenta de que se trataba de un polímero (algo semejante a lo que conocemos como poliéster) y que se podía extraer de las bacterias y se podía moldear para hacer películas o capas. Este material se llama *polihidroxibutirato* (PHB).

Los descubrimientos de Lemoigne fueron ignorados por la mayoría de los científicos durante décadas, hasta que a finales de los 1950s y principios de los 1960s otros investigadores redescubrieron esta sustancia y comenzaron a investigar cómo la producen las bacterias. Encontraron que otras bacterias producen también unos polímeros de la misma familia del PHB llamados *polihidroxialcanoatos* (PHAs).

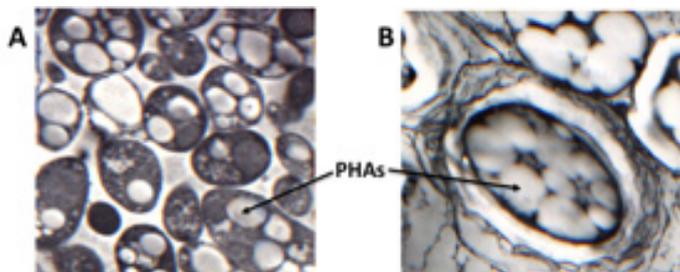
Lo que resulta más importante de esta historia del PHB y los PHAs en relación con los plásticos y la contaminación ambiental, es que estos polímeros naturales se pueden moldear para darles la forma deseada y tienen propiedades semejantes a las de muchos plásticos obtenidos del petróleo. Es decir, son plásticos producidos por bacterias. ¿Y cuál es la novedad? Estos plásticos son naturales, se obtienen a partir de recursos renovables (recursos naturales que pueden ser regenerados o producidos nuevamente), a diferencia de los obtenidos del petróleo, que algún día se

acabará, y lo más interesante es que son completamente biodegradables (se pueden descomponer con cierta rapidez por organismos vivos) en tiempos cortos. Podemos fabricar, por ejemplo, botellas de PHAs para envasar jugo, y si alguna persona descuidada tira ese envase en un lago, la botella se desintegrará por completo en cuestión de semanas y sin producir compuestos nocivos durante su degradación. Esto ocurre porque ya existen en la naturaleza microorganismos que son capaces de “alimentarse” de estos polímeros naturales, cosa que no sucede con los plásticos sintéticos derivados del petróleo. Así como *Bacillus megaterium* puede producir PHB y lo almacena en su interior como reserva de nutrientes, cuando se acaba el “alimento” en su ambiente, degrada y utiliza dicha reserva. Muchas otras bacterias y muchos hongos, aunque no produzcan PHAs, también tienen la capacidad de alimentarse degradando el PHB o los PHAs que otros microorganismos producen. Afortunadamente, estos microorganismos degradadores son muy abundantes en el ambiente. Por ejemplo, algunos investigadores han determinado que puede haber hasta medio millón de bacterias comedoras de PHAs en un gramo de tierra de jardín y se han encontrado degradadores en casi todos lados (suelo, composta, lagos, ambientes marinos, lodos de plantas de tratamiento de aguas, etc.). Así, estos plásticos biodegradables PHAs pueden ser tratados como desechos orgánicos y se descomponen en una composta o en el ambiente de manera natural.

Los PHAs se producen industrialmente desde 1982, cuando la compañía ICI (Imperial Chemical Industries) comenzó a usar bacterias para hacer plásticos biodegradables. ¿Por qué entonces no usamos estos bioplásticos? El principal problema radica en que son más costosos que los derivados del petróleo. El que estos materiales sean más caros dificulta su utilización, porque esto repercute en el

costo final que paga el consumidor que, en general, tiene recursos económicos limitados. Tampoco existe mucha conciencia de que existen alternativas, ni de que al escoger los plásticos más baratos derivados del petróleo, le pasamos el costo al medio ambiente. Estas son las principales razones por las que esta industria aún no compite efectivamente con la de los plásticos contaminantes. Sin embargo, muchos investigadores en el mundo están buscando hacerlos más económicos.

*Bacillus megaterium* no es la única bacteria productora de bioplásticos. Se han descubierto más de 300 especies de bacterias capaces de producirlos. Algunas son mejores que otras para hacer PHB o PHAs, otras producen PHAs muy diferentes y especiales, pero en cantidades pequeñas. Una bacteria que acumula grandes cantidades de PHAs se llama *Azotobacter vinelandii* (Figura 1A).



**Figura 1.** Células de la bacteria *Azotobacter vinelandii* (A) y quistes de la misma bacteria (B) vistas por un microscopio electrónico, en donde podemos observar los gránulos del bioplástico PHB que se forman en su interior (esferas blancas).

Este microorganismo vive normalmente en el suelo, donde hace cosas muy interesantes además de producir PHAs. Una característica especial de *Azotobacter* es que puede convertir el gas nitrógeno, que está presente en el aire que respiramos, en amonio. Este compuesto lo utiliza para poder nutrirse, pero ese amonio no sólo sirve para la bacteria, las plantas también lo necesitan para crecer. En otras palabras, *Azotobacter* convierte el aire en fertilizante que le sirve a las plantas. Por esta razón en algunos países como Rusia y la India, la bacteria *Azotobacter* se vende viva como un bio-fertilizante natural que no es contaminante como los fertilizantes químicos.

*Azotobacter* hace otras cosas interesantes. Como vive en el suelo y allí sucede que las condiciones a veces son adversas (como cuando el suelo se seca), en su evolución adquirió una estrategia para sobrevivir: cambia sus características y se transforma en quistes, una especie de células “dormidas” o metabólicamente inactivas que pueden resistir la falta de agua y otros tipos de “estrés”. La estructura de un quiste de *Azotobacter* se ilustra en la Figura 1B. Podemos observar que este quiste está compuesto de un cuerpo central el cual contiene gránulos o bolitas blancas. Estos gránulos son de PHB. El cuerpo central del quiste está rodeado por dos cubiertas protectoras que en la Figura 1B se ven como olanes y que están compuestas principalmente de otro polímero interesante: el polisacárido (un polímero hecho de azúcares) llamado alginato, del cual se habla en otro capítulo de este libro. Cuando estos quistes vuelven a estar en un ambiente favorable para su crecimiento (vuelve a haber agua en el suelo y hay nutrientes derivados de la materia orgánica en descomposición), “despiertan” e inician un proceso que se llama “germinación”. La cubierta de alginato se rompe y libera al cuerpo central, el cual se divide y produce dos células hijas llamadas “vegetativas”. Estas

células crecerán y se multiplicarán usando los nutrientes que las rodean. En condiciones de crecimiento óptimas, el promedio de vida de las células vegetativas de *Azotobacter* es de 5 días. En contraste, los quistes logran sobrevivir hasta por 30 años sin agua ni nutrientes. Esta capacidad de enquistarse y sobrevivir por largos periodos sin agua, se ha aprovechado para la aplicación de *Azotobacter* como bio-fertilizante, pues la bacteria puede mantenerse viva mucho tiempo después de ser envasada en espera de ser aplicada en los campos de cultivo.

Pero volvamos a la Figura 1b del quiste de *Azotobacter*. Es fácil notar que los gránulos blancos de PHB casi llenan la totalidad del cuerpo central. Este polímero puede llegar a ser tan abundante en esta bacteria que puede alcanzar el 80% de su peso seco. En el quiste, el PHB funciona como una reserva de nutrientes y energía, y al parecer este almacén mantiene el metabolismo de la célula durante el tiempo que dure enquistada. Es algo parecido a la grasa que acumulan los animales que van a hibernar, como los osos, que en la primavera y verano engordan mucho para resistir dormidos en el invierno usando su grasa almacenada.

Para la producción de plásticos biodegradables podemos aprovechar la gran capacidad que tiene *Azotobacter* para producir y almacenar en su interior el PHB. Sin embargo, en ésta como en las otras bacterias, este material de reserva sólo se produce y acumula bajo ciertas condiciones. La bacteria no lo hace todo el tiempo. Afortunadamente, nuestras investigaciones nos han permitido conocer muchos detalles de los procesos bioquímicos que permiten la producción de estos bioplásticos y de los mecanismos genéticos que controlan su producción en *Azotobacter*. Este conocimiento, junto con las herramientas de la ingeniería genética, nos ha permitido modificar el metabolismo y los

sistemas de control de *Azotobacter* y hemos logrado tener bacterias que producen aún más bioplástico y que pueden hacer otros PHAs diferentes para tener materiales con distintas características. De esta forma podemos tener *Azotobacters* “obesos” de tantos PHAs que acumulan.

Para producir plásticos biodegradables y contribuir a la solución de los problemas de contaminación de los que hemos hablado, se cultiva a nuestras bacterias *Azotobacter* en un caldo nutritivo dentro de reactores o tanques agitados (Figura 2), donde podemos tener una gran cantidad de bacterias en engorda, de una forma semejante a la producción de vino o cerveza, sólo que en este caso no nos interesa el líquido resultante, sino los microorganismos que allí crecieron. Cuando estas bacterias se han multiplicado y han producido los PHAs, se separan del líquido, y usando solventes se extrae el bioplástico, que ya se puede usar para moldearlo y generar utensilios de plástico. Es de esta forma que un antiguo descubrimiento, que en ese momento parecía poco relevante, y una bacteria a la que sabemos cómo engordar, ofrecen hoy una alternativa para resolver el problema de contaminación por plástico.



Figura 2. Esquema de la producción de bioplásticos usando a la bacteria *Azotobacter vinelandii*.  
(Ver imagen a color en páginas centrales)

## Inventando nuevas bacterias con Biología Sintética

José Antonio Alonso Pavón

Seguramente has visto algún video de un automóvil al cual le han cambiado los amortiguadores para hacer distintas acrobacias como simular que está rebotando, los famosos *lowriders*. Una de las maneras más sencillas de lograrlo podría ser ir a un taller y pedir que te cambien la suspensión que el coche trae de fábrica por una suspensión hidráulica. En pocas palabras, estarías cambiando una parte por otra. Este ejemplo nos sirve para poner en contexto uno de los usos de la tecnología del ADN recombinante: si necesitas que una bacteria realice una función de manera distinta, sólo necesitas insertarle un gen o fragmento de ADN de otra bacteria que realice esa misma función de manera más eficiente. Otra cosa que podrías querer hacer con tu coche es darle una gran potencia para poder acelerar mucho más en una carrera. Para ello, una de las opciones que existen es colocarle al motor de tu automóvil un sistema de óxido nítrico que te permita tener ese gran impulso. Esta idea, como seguramente ya imaginas, también se ha hecho en bacterias: cuando queremos que una bacteria haga una función para la cual no tiene los genes necesarios, se los podemos insertar con ADN recombinante.

Pero, ¿Qué tal si quisieras hacer un coche que pudiera nadar? Si te dispusieras a realizar esta tarea, es muy probable que encuentres muchas dificultades encontrando las partes que necesitas de un barco o un submarino para después incorporarlas a un automóvil, además de tener que modificar esas partes para hacerlas compatibles. Si todo fuera tan sencillo como cambiar partes de una máquina a otra, quizá ahora tendríamos más de estos vehículos anfibios y no sólo los prototipos que escuetamente han logrado

ver la luz. En este sentido, para crear un coche que pueda andar lo más efectivo será diseñarlo desde cero, claro, tomando como base los principios de las máquinas que ya existen pero sólo como referencia. Aunque no es la intención de este texto analizar la posibilidad de un auto nadador, nos sirve de base para comprender la complejidad de lo que quisiera hablarte: la Biología Sintética. El avance del estudio de la genómica, es decir, la totalidad de la información genética que se hereda de un organismo a su progenie, así como la manera en la cual los genes, el metabolismo, y los factores ambientales se integran dentro de la célula para dar origen a una respuesta, ha hecho posible que actualmente se puedan tomar secciones completas de un genoma relacionadas con alguna función más compleja para modificarlas y afinarlas con el objetivo de crear una función completamente nueva. Así, lo que antes era conocido como ingeniería genética que usaba una técnica de copiado y pegado de una bacteria a otra, se ha convertido en la disciplina que hoy se conoce como Biología Sintética, la cual surge de esta idea de no sólo transferir elementos como se hace con ADN recombinante, sino además diseñar, probar, modificar, sintonizar y construir desde cero elementos para sistemas novedosos que permita la creación de nuevas funciones.

¿Alguna vez te hubieras imaginado que un cultivo de bacterias pudiera servir para tomar fotografías? Una de las aplicaciones más emblemáticas de la Biología Sintética ha sido la creación de una cepa de bacterias *E. coli* que puedan servir como película fotográfica. ¿Cómo se logró esta innovadora creación? Pues bien, podemos ir analizando paso a paso el diseño que los investigadores de la Universidad de Austin, Texas, hicieron de este sistema. Primero, se necesitaba un pigmento que le diera color a la fotografía. Este pigmento fue un carbohidrato llamado

S-gal, que al ser metabolizado por la bacteria, deja un residuo de color negro. Si bien las imágenes serían de un solo color, era un buen inicio. Una vez resuelto el asunto de con qué se “imprimiría” la fotografía, se tenía que diseñar con estrategias de ingeniería la manera con la cual la película de bacterias iba a percibir la luz selectivamente. ¿Por qué es necesario esto? Porque si no hay una detección selectiva, toda la “película” se podría velar y sólo nos quedaría una mancha negra. El problema es que no existe un gen, proteína o compuesto en ninguna bacteria u otro organismo que cumpla esta función de detección selectiva, así que había que inventarlo. La idea fue simple. Se sabe que existen proteínas en ciertas cianobacterias que contienen sistemas que reaccionan a la luz para poder efectuar el proceso de fotosíntesis. Entonces, transfiriendo este sistema a *E. coli* se pudo comenzar a conectar los puntos y seleccionar en dónde se tiene que colorear la película y en dónde no. La forma en la cual se logró esto fue haciendo que el sistema que detecta la luz desactivara la proteína que metaboliza el carbohidrato S-gal (en lugar de participar en la fotosíntesis), de tal forma que en aquellas bacterias donde llegara la luz, no se produjera el pigmento negro. Esto significaba que en aquellas zonas en dónde la luz no pudiera registrarse, el sistema que detecta la luz no podría desactivar la producción del gen que metaboliza el S-gal, y esa zona oscura tendría un color negro. Tras construir este sistema, lo único que faltaba era probarlo. Para ello, se crearon varias plantillas con distintos dibujos, y se colocaron en una cámara por la cual pasaría la luz roja. En las zonas de la plantilla donde pasaba la luz, la película bacteriana mantuvo el color claro del medio de cultivo.

Como te pudiste haber dado cuenta, uno de los retos de la Biología de Sistemas es la creación de sistemas que puedan percibir algo y dar una respuesta. Esto requiere

la construcción de sensores que puedan integrar una o varias condiciones y codificar hacia una respuesta determinada (como “imprimir” o no un color de acuerdo a si hay luz o no). Estos sensores se construyen con “bio-partes” específicas, las cuales se busca sean estandarizadas para que cualquier investigador pueda adaptarlas a sus propios diseños. Como si se trataran de bloques del popular juego de Lego, que sirven para construir cosas, cada una de estas bio-partes se pueden utilizar dentro de un sistema cuyo diseño logre funciones antes inimaginables.

¿Qué más se está intentando hacer con esta forma de crear bacterias? Se ha comenzado a trabajar en bacterias que tengan un sensor para detectar contaminantes en el medio y emitir una señal, como arsénico en agua, logrando niveles de detección mejores que los métodos tradicionales. Muchas otras bacterias no sólo detectan los contaminantes, sino que los procesan y eliminan del medio, una acción que se conoce como “biorremediación”. Otra área promisoría de gran potencial médico es el desarrollo de bacterias con un sensor que les permita detectar células cancerígenas, diferenciándolas de las células sanas del cuerpo, para posteriormente eliminarlas. Si esta área de investigación prospera, sería un avance revolucionario para la Medicina.

El desarrollo de fármacos con nuevas propiedades, generación de biocombustibles, creación de biomateriales, y nuevas tecnologías en biomateriales se puede agregar a la lista de promesas de la Biología Sintética. Sin embargo, aún hay que esperar un poco. Realizar este tipo de modificaciones requiera una planeación cuidadosa y responsable, para evitar sorpresas desagradables. Más allá de las regulaciones sobre Organismos Genéticamente Modificados que existen en México y el mundo, los científicos que realizan Biología Sintética tratan de predecir el comportamiento de sus crea-

ciones mediante modelos matemáticos y computacionales. No podemos aplicar algo sobre lo cual no tengamos una idea lo más completa posible, y para ello las predicciones con métodos analíticos nos sirven para minimizar los riesgos. Junto con un desarrollo de prácticas responsable, la Biología Sintética será un área que nos traerá sorpresas en el futuro.

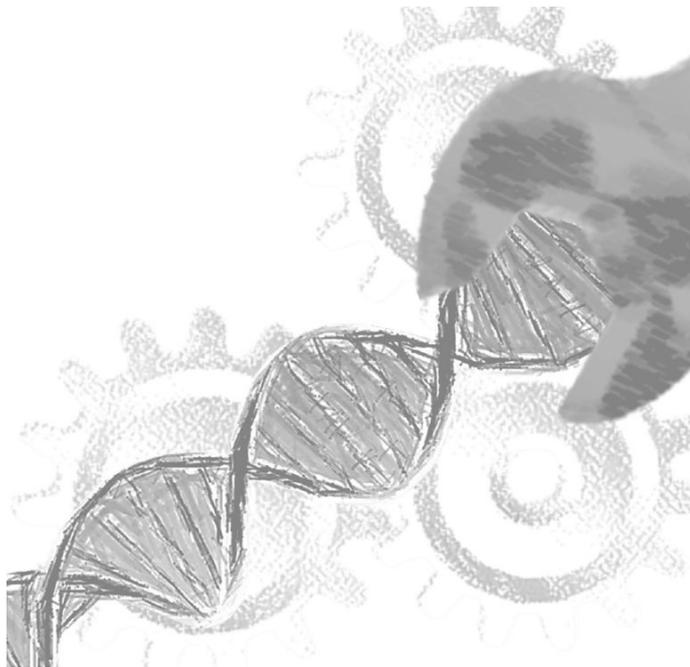


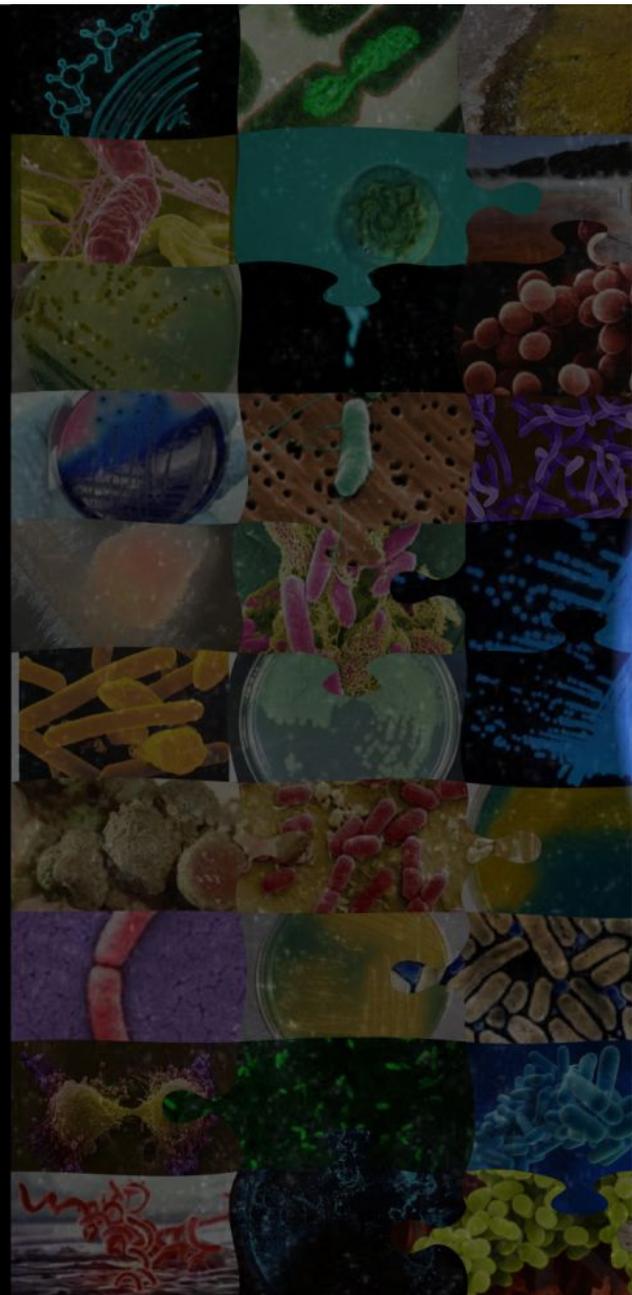


Imagen: Yoloxochitl Sánchez Guevara  
(Ver imagen a color en páginas centrales)

*Un mundo de bacterias*  
Se terminó de imprimir en mayo de 2014  
en los talleres de Mujica Impresor  
en la Ciudad de México.  
El tiraje fue de 1000 ejemplares  
más sobrantes para reposición.

“Y pasaron muchos años antes de notarlo. Ahí había estado todo este tiempo, incluso mucho antes de que cualquiera pudiera percibirlo. Nadie sabe con certeza cómo comenzó, pero probablemente fue resultado de uno que otro evento azaroso ocurrido en el espacio y tiempo, los cuales nadie ha aprovechado mejor que la naturaleza. Así se hizo presente, siendo un punto invisible—en comparación del todo que lo rodeaba—.

En medio de una gran mezcla de átomos un tanto ordenados, el pequeño ente encontró lo necesario para permanecer, y no sólo eso, también para multiplicarse. ¿Dónde ocurrió? A nadie le consta, pudo ser aquí, o en cualquier otro punto del espacio donde los elementos necesarios se encontraron. Pero es un hecho que su aparición marcó el inicio de lo que hasta ahora llamamos *vida*.”



Instituto de Biotecnología  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



UNAM  
CAMPUS MORELOS

