



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
Laboratorio de Interacción Bacteria-Planta

Maestría en Ciencias (Microbiología)

**“Estudio fenotípico del locus AZOBR_100206::GusA-Sp^R de *Azospirillum
brasilense* Sp245”**

Tesis presentada para obtener el título de:
Maestro en ciencias (Microbiología)

Presenta:
Daniel Sierra Cacho

Asesora de tesis:
D. C. Beatriz Eugenia Baca

Co-asesor de tesis:
D.C. Alberto Ramírez Mata

Julio, 2017



BUAP

Puebla, Pue. a 4 de julio 2017.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**


Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría del alumno **Daniel Sierra Cacho**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:


“Estudio fenotípico del locus AZOBR_100206::GusAsp^R de *Azospirillum brasilense*”

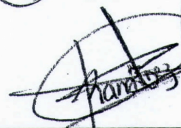
A nuestro juicio, el alumno **Daniel Sierra Cacho** puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.


Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”


D.C. Luis Javier Martínez Morales


D.C. Lucía Soto Urzúa


D.C. Alberto Ramírez Mata


D.C. Sandra Raquel Reyes Carmona

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiología@correo.buap.mx

Índice

Índice de figuras	5
Abreviaturas	7
1. Resumen	8
2. Introducción	
2.1. Rizósfera	10
2.1.1. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) ...	11
2.1.2. <i>Azospirillum brasilense</i>	14
2.2 Señalización en bacterias	
2.2.1. Ácido di-(3'-5')-guanósín monofosfato (di-GMPc)	15
2.2.2. Diguanilatos ciclasa y fosfodiesterasas	16
2.2.3. Efectores del di-GMPc	20
2.2.4. Biopelícula	22
3. Antecedentes directos	27
4. Justificación	28
5. Objetivos	
5.1. Objetivo general	29
5.2. Objetivos específicos	29
6. Materiales y métodos	
6.1. Material biológico	30
6.2. Vectores	30
6.3. Iniciadores	31
6.4. Condiciones de cultivo	31
6.5. Extracción y manipulación de ADN	31
6.6. Diseño de iniciadores	32
6.7. Amplificación del gen <i>dgcC</i> mediante PCR	33
6.8. Clonación de <i>dgcC</i> en vector pGEM-T-Easy	33
6.9. Clonación de <i>dgcC</i> en vector pJB3Tc20	33
6.10. Modificación del plásmido pJB3Tc20- <i>dgcC</i>	34
6.11. Determinación de formación de biopelícula	34
6.12. Determinación de unión de exopolisacáridos (EPS) a Rojo Congo ..	36
6.13. Determinación de formación de biopelícula empleando microscopía confocal	36
6.14. Visualización de EPS en biopelícula empleando calcofluor	37
6.15. Visualización de ADN extracelular (ADNe) en biopelícula empleando yoduro de propidio	37
7. Resultados	
7.1. Análisis <i>in silico</i>	
7.1.1. Contexto genético del gen 6449870 (<i>dgcC</i>)	39

7.1.2. Análisis de la región intergénica río arriba del gen <i>dgcC</i> para la localización del probable promotor del gen	39
7.2. Amplificación del <i>dgcC</i> mediante PCR en gradiente	41
7.3. Amplificación de <i>dgcC</i> mediante PCR para secuenciación	42
7.4. Secuenciación de la clonación de <i>dgcC</i> en pGEM-T-Easy	43
7.5. Clonación de <i>pdgcC</i> en plásmido pJB3Tc20 mediante el método “shotgun”	44
7.6. Selección de clonas de <i>E. coli</i> S17.1 pJB3Tc20- <i>pdgcC</i> mediante PCR en colonia	45
7.7. Modificación de la construcción pJB3Tc20- <i>pdgcC</i>	49
7.8. Análisis de fenotipos	
7.8.1. Determinación de la formación de biopelícula	54
7.8.2. Determinación de producción de exopolisacáridos empleando Rojo Congo (RC)	55
7.8.3. Estandarización de formación de biopelícula empleando las cepas etiquetadas con la proteína verde fluorescente, calcofluor y microscopía confocal	55
7.8.4. Formación de biopelícula empleando las cepas etiquetadas con la proteína verde fluorescente, calcofluor y microscopía confocal	57
7.8.5. Visualización de ADN extracelular (ADNe) en biopelícula empleando yoduro de propidio	58
8. Discusión	62
9. Conclusiones	66
10. Perspectivas	66
11. Referencias bibliográficas	67
12. Anexo	
12.1. Formulación de medios de cultivo	72

Índice de figuras

Fig. 1. División de la rizósfera	10
Fig. 2. Esquema de las funciones e impacto de los microorganismos en sus huéspedes	13
Fig. 3. Síntesis, degradación y fenotipos regulados por el di-GMPc	16
Fig. 4. Regulación efectuada por el di-GMPc	18
Fig. 5. Modelo de señalización del di-GMPc en <i>V. cholerae</i>	21
Fig. 6. Etapas en la formación de biopelículas bacterianas	24
Fig. 7. La compleja estructura de las biopelículas bacterianas	25
Fig. 8. Fenotipos evaluados en las cepas <i>A. brasilense</i> Sp245 y <i>A. brasilense</i> 102-C	27
Fig. 9. Contexto genético del gen <i>dgcC</i>	39
Fig. 10. Región intergénica de los genes 6449870 (<i>dgcC</i>) y 6449871 (RPPK) ...	40
Fig. 11. Electroforetograma de la amplificación del gen <i>dgcC</i>	41
Fig. 12. Electroforetograma de la amplificación del gen <i>dgcC</i> empleando Platinum <i>Taq</i> de alta fidelidad	42
Fig. 13. Secuenciación del fragmento <i>pdgcC</i>	43
Fig. 14. Electroforetograma de la digestión de pGEM- <i>pdgcC</i> para clonación “shotgun”	44
Fig. 15. PCR en colonia para selección de clones de <i>E. coli</i> S17.1 pJB3Tc20- <i>pdgcC</i>	45
Fig. 16. Electroforetograma del patrón de restricción de las clonas 8 y 16 de <i>E. coli</i> S17.1 pJB3Tc20- <i>pdgcC</i>	46
Fig. 17. PCR de transconjugantes entre <i>E. coli</i> S17.1 pJB3Tc20- <i>pdgcC</i> y <i>A. brasilense</i> 102-C	47
Fig. 18. Digestión de clonas “S” y 25	48
Fig. 19. Digestión de clona A2 y A40	49

Fig. 20. Modificación del plásmido pJB3Tc20- <i>pdgcC</i>	50
Fig. 21. Las direcciones del casete de Km en la construcción pJB3Tc20/Km- <i>pdgcC</i>	51
Fig. 22. Selección de clonas <i>E. coli</i> DH5 α con la construcción pJB3Tc20/Km- <i>pdgcC</i>	52
Fig. 23. PCR para amplificar el fragmento <i>pdgcC</i> -Km	53
Fig. 24. Ensayo de formación de las cepas silvestre y construidas en este trabajo	54
Fig. 25. Ensayo de producción EPS de las cepas silvestre y construidas en este trabajo	55
Fig. 26. Estandarización de formación de biopelícula de las cepas silvestre y construidas en este trabajo, empleando calcofluor y microscopía confocal	56
Fig. 27. Formación de biopelícula y visualización de exopolisacáridos empleando las cepas etiquetadas con la proteína verde fluorescente, calcofluor y microscopía confocal	58
Fig. 28. Visualización de ADNe en biopelícula empleando yoduro de propidio	61

Abreviaturas

CV	Cristal violeta
DGC	Diguanilato ciclasa
DgcC	Diguanilato ciclasa C
di-GMPc	Ácido di-(3'-5') guanosín monofosfato
DNAe	Ácido desoxirribonucleico extracelular
EPS	Exopolisacáridos
PDE	Fosfodiesterasa
PGPR	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal
pGpG	5' fosfoguanilil-(3'-5') guanosina
Tc	Tetraciclina
Amp	Ampicilina
Sm	Estreptomina
Km	Kanamicina
Gm	Gentamicina
SPE	Sustancias poliméricas extracelulares
GTP	Guanosin tri fosfato
GMP	Guanosin mono-fosfato
pGpGp	Guanosin di fosfato lineal
NO	Óxido nítrico
MotA	Proteína del motor flagelo
MotB	Proteína del motor flagelo
FliG	Proteína del motor flagelo
FleQ	Regulador global de la transcripción de los genes del flagelo
VpsT	Regulador de la transcripción de los genes de la biosíntesis de los EPS de <i>Vibrio cholerae</i>
VpsR	Regulador de la transcripción de los genes de la biosíntesis de los EPS de <i>Vibrio cholerae</i>
PilZ	Proteínas cuyo dominio une al di-GMP en el dominio PilZ
PAS	Dominios de proteínas sensores que unen luz, oxígeno, sustancias redox
GAF	Dominios de proteínas sensores que unen nucleótidos i.e. GMPc
HAMP	Dominios de proteínas implicados en quimiotaxis
CHASE	Dominio de proteínas extracelular sensor en quimiotaxis
CACHE	Dominio de proteínas extracelular sensor en quimiotaxis y Ca ⁺⁺
LOV	Dominio de proteínas extracelular sensor de luz, osmolaridad y voltaje

Resumen

El género *Azospirillum* pertenece a un grupo de bacterias Gram-negativas que poseen la capacidad de fijar nitrógeno y utilizar amonio, nitratos, nitritos o aminoácidos como fuentes de nitrógeno y carbono, son altamente móviles (debido a que cuentan con un flagelo polar) y en condiciones ambientales desfavorables pueden adoptar una forma quística la cual estará cubierta por una capa de polisacáridos.

Los *Azospirilla* se encuentran íntimamente ligados a la rizósfera, promoviendo el desarrollo vegetal, por tal razón es denominada como una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal o PGPR (del inglés Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Esta acción benéfica puede ser originada por distintos mecanismos entre los que se encuentran la eliminación de organismos patógenos presentes en las raíces de las plantas, la fijación de nitrógeno atmosférico, solubilización de fósforo y otros minerales o por la producción de fitohormonas.

Para establecer una asociación bacteria-planta exitosa, el microorganismo desarrolla biopelículas, cuya formación es regulada por el di-GMPc. Esta molécula, la cual es denominada como un segundo mensajero, participa en una amplia variedad de procesos celulares, mediante regulación a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional.

Para la síntesis del di-GMPc es necesaria la presencia de dos moléculas de GTP; esta reacción es mediada por proteínas con dominios GGDEF, denominados por su secuencia altamente conservada de aminoácidos, GG(D/E)E, los cuales poseen actividad diguanilato ciclasa (DGC); mientras que la degradación del di-GMPc es llevada a cabo por proteínas con dominios EAL o HD-GYP con actividad fosfodiesterasa (PDE).

Empleando análisis bioinformático se conoció la secuencia genómica codificante para la proteína diguanilato ciclasa C (DgcC), se realizó la mutación del gen *dgcC* mediante la inserción de un casete de resistencia a estreptomina (Sm); la cepa mutante obtenida se denominó *A. brasilense* 102-C. Al analizar los fenotipos de la cepa 102-C, ésta poseía un retraso en el crecimiento, además una disminución en la formación de biopelícula así como también un decremento en la movilidad con respecto a la cepa *A. brasilense* Sp245. Para corroborar que la DgcC se encuentra involucrada en estos fenotipos, se procedió a realizar una complementación génica en trans. Al analizar la cepa complementada resultante, *A. brasilense* AK19 (*pdgcC*), ésta no presentó una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a formación de biopelícula y producción de EPS con respecto a la cepa mutante *A. brasilense* 102-C; pudiendo concluir que no existe una complementación ya que no se restauró el fenotipo de la cepa silvestre.

Por otra parte, evaluamos la formación de película. Ésta es una estructura que se encuentra presente en la interfase agua-aire y se ha demostrado, en el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, que presenta una composición distinta a aquella observada en la biopelícula. Por otra parte, se ha descrito en *Azospirillum*

brasiliense, que las bacterias presentes en esta estructura poseen la capacidad de fijar nitrógeno.

Con los datos obtenidos en este trabajo sugerimos que el gen *dgcC* se encuentra involucrado en la formación de película. Por otra parte, es posible que la inserción del casete de Sm pudo originar una mutación polar, afectando al gen río abajo a *dgcC*, probable responsable de la falta de complementación. Estudios futuros responderán a esta pregunta.

2. Introducción

2.1. Rizósfera

El término rizósfera fue acuñado en 1904 por el fisiólogo vegetal Lorenz Hiltner. Esta definición, proveniente del vocablo griego “rhiza”, que significa raíz, abarca tanto a las raíces de las plantas, como al suelo que las rodea (Nihorimbere *et al.*, 2011; McNear, 2013). La rizósfera es un ambiente muy dinámico, debido a que sus condiciones se encuentran altamente influenciadas por la secreción de exudados radiculares provenientes de las plantas, acumulación de minerales, temperatura, oxígeno, pH, disponibilidad de agua y la presencia de una amplia variedad de organismos (Lynch *et al.*, 2012).

En la década pasada, el término rizósfera fue objeto de modificaciones, dividiendo a ésta en tres zonas de acuerdo con la proximidad y el grado de influencia que poseen las raíces sobre ellas. El nuevo término agrupa a la endorizósfera, el rizoplano y la ectorizósfera; estas zonas se ejemplifican en la Figura 1.

La endorizósfera es la sección interna de la rizósfera o en otras palabras, el córtex y endodermis vegetal; en esta zona suelen encontrarse microorganismos endófitos que habitan el espacio apoplástico. Por otra parte, el rizoplano, o sección media de la rizósfera, es el área que incluye la parte externa de las raíces así como el suelo que se encuentra adherido a ellas. Finalmente, la ectorizósfera o sección distal de la rizósfera, es aquella que se encuentra en la periferia del rizoplano (McNear, 2013; Mwajita *et al.*, 2013; Hunter *et al.*, 2014).

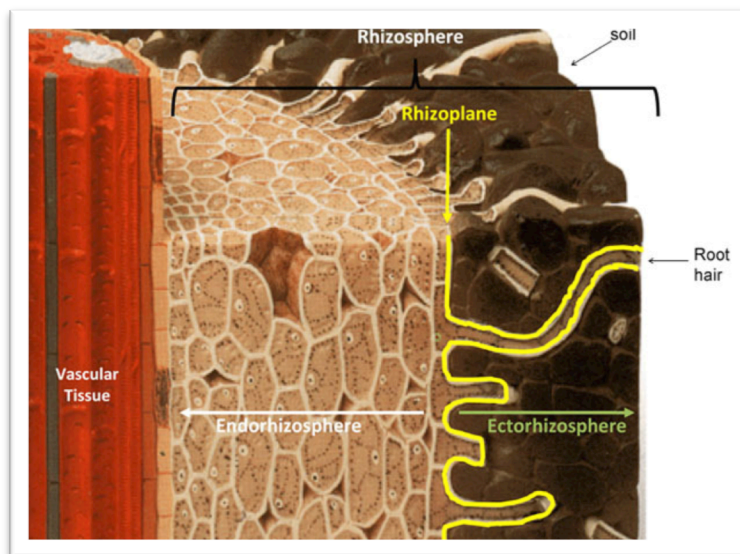


Fig. 1. División de la rizósfera. Representación de un corte transversal de la rizósfera, en donde se observan las tres zonas constituyentes de ésta: endorizósfera, rizoplano y ectorizósfera. Tomado de McNear (2013).

En la rizósfera se ha demostrado la interacción de distintos grupos de organismos, entre los que destacan bacterias, hongos, nemátodos, protozoarios, algas y microartrópodos (Raaijmakers *et al.*, 2009). La presencia y subsistencia de estos microorganismos se encuentra influenciada por los exudados radiculares, los cuales son compuestos de bajo y alto peso molecular como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, metabolitos secundarios, etcétera. La composición de estos exudados radiculares se encuentra regulada por el tipo, edad y estado nutricional de la planta, condiciones ambientales (temperatura, pH, disponibilidad de agua) y por la misma presencia y variedad de microorganismos en la rizósfera (Nannipieri *et al.*, 2007; McNear, 2013).

Debido a que la presencia de organismos en la rizósfera puede alterar el desarrollo y la composición de los exudados radiculares de las plantas (Cavaglieri *et al.*, 2009), así como de una manera similar los exudados secretados por las plantas pueden modificar la población bacteriana presente en la rizósfera, es importante hacer énfasis en la manera en que esta interacción bacteria-planta ocurre, así como también los efectos benéficos o malignos que pudiesen tener estos microorganismos sobre las plantas.

2.1.1. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

La rizósfera, al ser una zona rica en nutrientes necesarios para el desarrollo y subsistencia de distintos microorganismos aportados principalmente por la secreción de exudados radiculares por parte de las plantas, es un ambiente altamente competitivo (Matilla *et al.*, 2007).

La composición de estos exudados radiculares puede variar dependiendo las condiciones fisiológicas de la planta. Entre las funciones descritas realizadas por los exudados no sólo se encuentra el proporcionar una fuente de carbono, nitrógeno o nutrientes necesarios para el desarrollo microbiano, también se ha demostrado que estos alteran las condiciones de la rizósfera para impedir la propagación de microorganismos patógenos, inducir una respuesta inmune en plantas adyacentes, la eliminación de otras plantas que compiten por los nutrientes del suelo, o propiciar la migración bacteriana, o quimiotaxis, hacia las raíces de las plantas, etcétera (Dakora *et al.*, 2012; Bais *et al.*, 2006).

Algunos componentes descritos en ciertos exudados radiculares de distintas especies vegetales se describen en la tabla 1.

Uno de los efectos positivos que presentan los exudados radiculares es la quimiotaxis bacteriana hacia las raíces de las plantas. Entre los compuestos presentes en los exudados se encuentran moléculas que funcionan como señales para ciertos géneros o especies bacterianas. Una vez que la molécula señal es secretada al medio, ésta puede difundirse y ser captada por un organismo procarionte, el cual presenta afinidad hacia esa molécula y favorezca su migración hacia la raíz de la planta. Se ha demostrado que la secreción de flavonoides llevada a cabo por las raíces de la soya, propicia la atracción de *Bradyrhizobium*

japonicum, un microorganismo mutualista, así como también de *Phytophthora sojae*, un organismo patógeno causante de una enfermedad denominada como “podredumbre” (Bais *et al.*, 2006).

Aminoácidos	Ácidos orgánicos	Azúcares	Vitaminas	Nucleósidos	Enzimas
Asparagina	Acético	Glucosa	Biotina	Adenina	Amilasa
Aspartato	Cítrico	Fructosa	Niacina	Guanina	Proteasa
Cisteína	Málico	Galactosa	Tiamina	Uridina	Fosfatasa
Glutamato	Fórmico	Maltosa	Riboflavina	Citidina	ácida
Glicina	Pirúvico	Ribosa			Fosfatasa
Leucina	Succínico	Arabinosa			alcalina
Isoleucina	Acético	Xilosa			
Ornitina	Oxálico	Ramnosa			
Homoserina	Butírico				
Fenilalanina					
Tripfófano					
Valina					

Tabla 1. Identificación de compuestos en exudados radiculares. Encontrados en diferentes especies vegetales. Modificado de Dakora *et al.* (2002).

El término Rizobacteria Promotora del Crecimiento Vegetal fue introducido en primera ocasión en 1978 por Kloepper y Schroth para describir aquellas bacterias que tras ser inoculadas a semillas, podían colonizar exitosamente las raíces, favoreciendo el crecimiento de las plantas (Kloepper *et al.*, 1991, McNear 2013).

Las PGPR propician el crecimiento de distintas especies vegetales de manera directa o indirecta. El mecanismo indirecto se refiere a la eliminación de microorganismos patógenos o productores de enfermedades vegetales. Por el contrario, entre los mecanismos directos para la promoción del crecimiento vegetal se encuentran la solubilización de nutrientes como el fósforo, fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas, disminución del efecto tóxico causado por la presencia de metales pesados en el medio, etcétera (Whipps, 2001, Gottel *et al.*, 2011). Estos mecanismos se esquematizan en la Fig. 2.

La relación bacteria-planta debe ser estrecha y prolongada para la interacción mutualista, una vez que el microorganismo realiza el primer contacto con la raíz, y si las condiciones favorecen el desarrollo de éste, la bacteria tiende a anclarse a la raíz para posteriormente formar una estructura denominada biopelícula, la cual le brinda protección y asegura la interacción exitosa y benéfica para la planta (O’Toole *et al.*, 2000; Ramye *et al.*, 2004).

Entre los ejemplos de PGPR se encuentran especies de los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Serratia*, *Rhizobium* y *Bradirhizobium* (Saharan *et al.*, 2011).

Cada género presenta determinados mecanismos de acción benéfica. En el caso específico de *Bacillus subtilis* 6051, éste posee la capacidad de colonizar las raíces de *Arabidosis thaliana*, protegiéndola contra la bacteria patógena *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. A su vez, *Rhizobium* y *B. japonicum* forman nódulos, lo cual favorece la acción de sus nitrogenasas, enzimas encargadas de la fijación de nitrógeno (Lugtenberg *et al.*, 2009).

Por otra parte, *Azospirillum brasilense*, un microorganismo capaz de fijar nitrógeno, promueve el crecimiento de las plantas principalmente por su habilidad de producir una fitohormona, el ácido indol-3-acético, la cual modifica la arquitectura de las raíces, favoreciendo el incremento y densidad de raíces laterales y pelos radiculares, lo que propicia la captación de nutrientes y agua, conllevando a un incremento considerable en la masa vegetal y producción de granos (Danhorn & Fuqua, 2007; Bashan & de-Bashan, 2010).

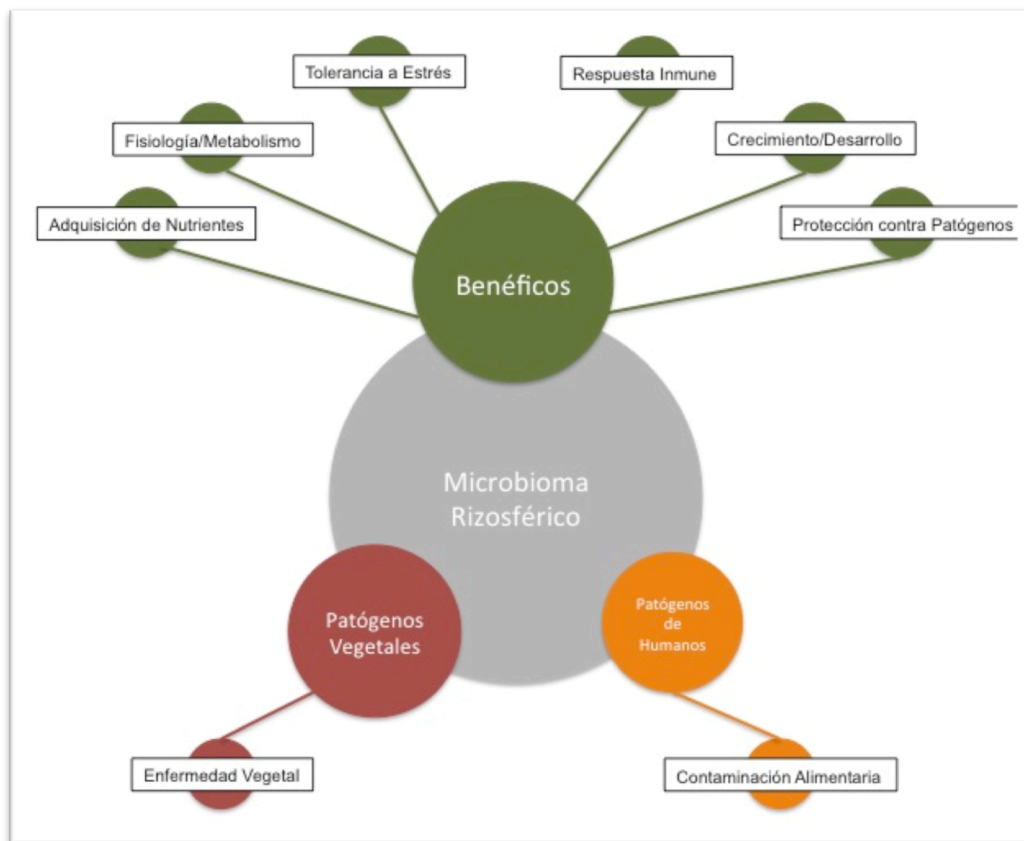


Fig. 2. Esquema de las funciones e impacto de los microorganismos en sus huéspedes. Adaptado de Mendes *et al.*, 2013.

Por tal razón, estudiar a las especies bacterianas que se encuentran en asociación con las plantas es relevante, debido a que estos microorganismos desempeñan actividades benéficas para las plantas, favoreciendo el desarrollo de éstas, además de ser una alternativa hacia la consolidación de la agricultura sostenible.

2.1.2. *Azospirillum brasilense*

La primera descripción de bacterias del género *Azospirillum* fueron realizadas por Beijerinck en 1925; sin embargo, fue hasta 1973 que Peña-Cabriales y Döbereiner analizaron y reclasificaron a la bacteria por su asociación y potencial de favorecer el crecimiento de las plantas (Citado en Baldani *et al.*, 1987).

El género *Azospirillum* agrupa a rizobacterias Gram negativas de vida libre. Los microorganismos pertenecientes a este género poseen un metabolismo versátil, pudiendo asimilar distintas fuentes de carbono y nitrógeno (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

A. brasilense, una de las especies más ampliamente estudiadas del género *Azospirillum*, es una alfa-proteobacteria móvil, capaz de reducir el nitrógeno atmosférico diazótrofo, por lo cual su metabolismo oxidativo es óptimo bajo condiciones microaerófilas, con la capacidad de colonizar raíces de distintos cereales y otras plantas de interés agronómico (Bible *et al.*, 2008; Bible *et al.*, 2012).

Esta bacteria cuenta con un flagelo polar, el cual propicia el desplazamiento de la bacteria en medio líquido; por otra parte, el microorganismo posee la capacidad de producir flagelos laterales, los cuales permiten el movimiento de *Azospirillum* en superficies sólidas (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). En condiciones de alta aireación, *A. brasilense* tiende a formar agregados celulares, los cuales presentan una unión muy estable. Estas estructuras están formadas por la unión célula-célula, las cuales se encuentran embebidas en una matriz de EPS, formada principalmente por arabinosa (Edwards *et al.*, 2011). Cuando la bacteria se encuentra en ambientes desfavorables para su desarrollo, como desecación o ausencia de nutrientes, sufre cambios morfológicos, entre los que destacan una transición de su forma vibroide a una ovalada, denominada quiste. Esta se encuentra recubierta por EPS y presenta una acumulación citoplasmática de gránulos de PHB (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

Bajo ciertas condiciones ambientales, *Azospirillum* puede influenciar de manera positiva el desarrollo y crecimiento de distintas especies vegetales; este fenómeno ha sido atribuido a diferentes mecanismos, entre los que destacan la fijación de nitrógeno y producción de fitohormonas (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000), entre las que destacan el ácido indol-3-acético, giberelinas, ácido abscísico y citocininas (Reis *et al.*, 2011). Ha sido documentada ampliamente en *A. brasilense* la síntesis de ácido indol-3-acético a partir de triptófano (Jijón-Moreno *et al.* 2015).

Para que *Azospirillum* realice su efecto positivo sobre las plantas, en primera instancia debe movilizarse hacia las raíces de éstas. La bacteria detecta en el ambiente distintos compuestos presentes en los exudados radiculares hacia los cuales presenta quimiotaxis positiva. Una vez que *Azospirillum* se moviliza a las raíces, el microorganismo coloniza la planta en dos etapas: la primera de ellas es mediada por el flagelo, pudiendo ser una unión débil y reversible en caso de que las condiciones ambientales no sean idóneas para el desarrollo bacteriano;

mientras que la segunda etapa ocurre tras 16-18 horas del primer contacto, produciendo una unión más fuerte e irreversible mediada por el flagelo, adhesinas y EPS (Reis *et al.*, 2011).

2.2. Señalización en bacterias

Debido a la alta competencia que existe en la rizósfera, resulta vital que los microorganismos respondan de manera rápida y eficiente a los cambios físicos y químicos que ocurren en este ambiente; por lo cual es indispensable el monitoreo constante de parámetros ambientales e intracelulares para su adaptación y supervivencia (Pesavento *et al.*, 2010).

Los mecanismos mediante los cuales la bacteria percibe y responde a las condiciones ambientales e intracelulares son amplios y complejos. Estos mecanismos tienden a incluir acciones coordinadas y consecutivas, entre las que destacan la captación y transmisión de la señal o primer mensajero, la transducción de la señal de manera intracelular, la amplificación de dicha señal y finalmente la respuesta a esta señal (Ramírez-Mata *et al.*, 2014).

La detección de señales ambientales, o el primer mensajero, es llevada a cabo por receptores presentes en la superficie celular. Una vez que ocurre la unión señal/receptor, éste modifica su conformación, lo que conlleva a una activación de proteínas adyacentes a ésta para finalmente propiciar producción de los segundos mensajeros. Estos son moléculas pequeñas las cuales tienen la capacidad de interactuar con otras proteínas blanco o efectoras, las que a su vez modifican el metabolismo celular en respuesta al primer mensajero (Newton *et al.*, 2016).

A la actualidad, se ha descrito una plétora de nucleótidos que participan en la transmisión de señales y, por consiguiente, la regulación de diversos procesos fisiológicos bacterianos. Entre ellos se encuentra el ácido di-(3'-5')-guanosín monofosfato o di-GMPc (Newton *et al.*, 2016; Jenal, 2013).

2.1.2. Ácido di-(3'-5')-guanosín monofosfato (di-GMPc)

En 1987 el di-GMPc fue reportado como un activador alostérico de la celulosa sintasa en *Gluconacetobacter xylinus* por Moshe Benziman y colaboradores. Tras varios fracasos en la producción de celulosa *in vitro*, decidieron añadir GTP a la reacción, obteniendo resultados similares a aquellos observados *in vivo*. Por tal razón llegaron a la conclusión de que el GTP era un sustrato para enzimas diguanilato ciclasa (DGC) las cuales eran las encargadas de producir el di-GMPc, molécula que interactuaba con la celulosa sintasa (Camilli *et al.*, 2006; Pesavento *et al.*, 2010; Krasteva *et al.*, 2012; Waters, 2012; Hengge *et al.*, 2016)

Este segundo mensajero es sintetizado a partir de dos moléculas de GTP por la acción de enzimas DGC, las cuales poseen un dominio GGDEF. Por el contrario,

su degradación es efectuada por fosfodiesterasas (PDEs) que cuentan con un dominio EAL, convirtiendo al di-GMPc en una molécula lineal, pGpG. Se ha descrito la actividad de un tipo distinto de PDE, las cuales presentan un dominio HD-GYP el cual hidroliza a éste segundo mensajero, en primera instancia en pGpG, para posteriormente producir dos moléculas de GMP (Shanahan *et al.*, 2012).

En años recientes, el di-GMPc ha cobrado gran importancia debido a los múltiples procesos celulares en los que interviene, además de los crecientes reportes y descripciones de DGC y PDE presentes en diversos genomas bacterianos (Fig. 3).

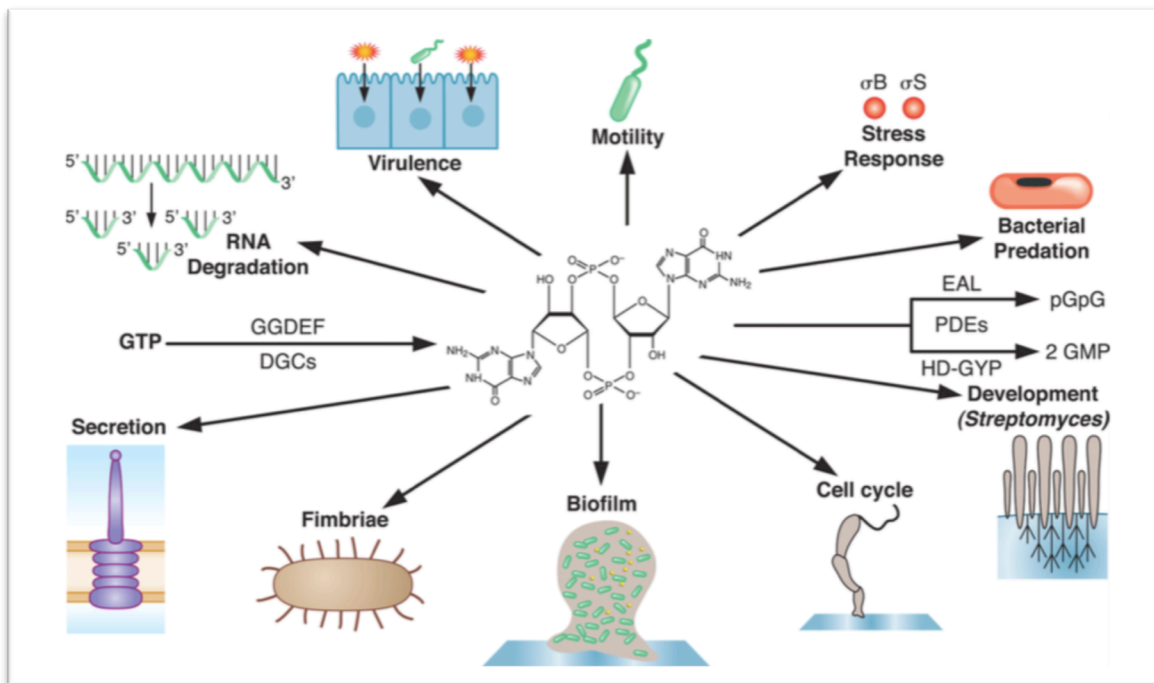


Fig 3. Síntesis, degradación y fenotipos regulados por el di-GMPc. El di-GMPc es producido por enzimas con actividad DGC, las cuales poseen un motivo conservado GGDEF, a partir de dos moléculas de GTP. Por el contrario, su degradación es efectuada por PDEs las cuales pueden presentar un motivo EAL degradando al segundo mensajero en molécula lineal de pGpG o un motivo HD-GYP, dando como resultado la formación de dos moléculas de GMP. El di-GMP se encuentra involucrado en el cambio de estado de vida bacteriano (móvil-biopelícula), la virulencia, ciclo celular, respuesta a distintos tipos de estrés y otros. Tomado de Waters (2012).

2.2.2. Diguanylatos ciclasa y fosfodiesterasas

Estas proteínas con dominios GGDEF, EAL o HD-GYP, se encuentran presentes en genomas bacterianos y ausentes en eucariotes y arqueas, por lo cual se

sugiere que el di-GMPc es un mensajero universal de bacterias (Camilli *et al.*, 2006; Shanahan *et al.*, 2012).

Cada genoma bacteriano puede codificar para un amplio o reducido número de DGCs y PDEs, el cual será dependiente del ambiente que habite la bacteria y las actividades realizadas por el microorganismo (Cooley *et al.*, 2016).

Por ejemplo, *V. cholerae* presenta en su genoma 31 proteínas con actividad DGC, 21 proteínas PDE (12 con motivo EAL y 9 restantes con motivo HD-GYP) y 10 proteínas híbridas, como se muestra en la Fig. 4 (Waters, 2012; Conner *et al.*, 2017).

En cuanto a estructura, las DGC poseen un dominio conservado, conocido como GGDEF, los cuales cuentan con alrededor de 170 aminoácidos y son denominados así debido a sus aminoácidos (Gly-Gly-Asp/Glu-Glu-Phe) altamente conservados, en el sitio activo de la proteína o sitio A. Los primeros dos aminoácidos (Gly) del motivo GGDEF son los encargados de unir al GTP; el tercer aminoácido (Asp/Glu) es indispensable para la catálisis, mientras que el cuarto aminoácido (Glu) está involucrado en la coordinación de los iones metálicos necesarios para la catálisis. Algunas DGC poseen un motivo GGEEF, el cual se ha demostrado ser funcional (Povolotsky *et al.*, 2012; Römling *et al.*, 2013).

La mayoría de las DGC pueden ser inhibidas alostéricamente mediante la unión del di-GMPc a un sitio denominado como inhibitorio o sitio I, el cual posee una secuencia conservada RXXD y se encuentra aproximadamente 5 aminoácidos río arriba al sitio activo (Pesavento *et al.*, 2010).

Para ser catalíticamente activas, las DGC deben actuar en forma dimérica. Se han descrito dos mecanismos que pueden afectar la dimerización y por consiguiente, la catálisis de las DGCs. El primero de ellos está sujeto a modificaciones conformacionales de la proteína debido a cambios en los dominios accesorios o sensores presentes en la misma. Se ha descrito que en las proteínas WspR y PleD que la fosforilación es fundamental para la activación de estas DGCs. En el caso de PleD, DGC necesaria para la diferenciación celular de *Caulobacter crescentus*, fue demostrado mediante cristalografía, que la proteína actúa en forma de dímero catalizando la formación de di-GMPc a partir de dos moléculas de GTP; además, que es necesaria la fosforilación de PleD para adoptar su forma dimérica (Aldridge *et al.*, 2003; Camilli *et al.*, 2006).

El segundo mecanismo refiere a una inhibición por retroalimentación llevada a cabo por la unión del di-GMPc al sitio RXXD o inhibitorio (Pesavento *et al.*, 2010; Römling *et al.*, 2013).

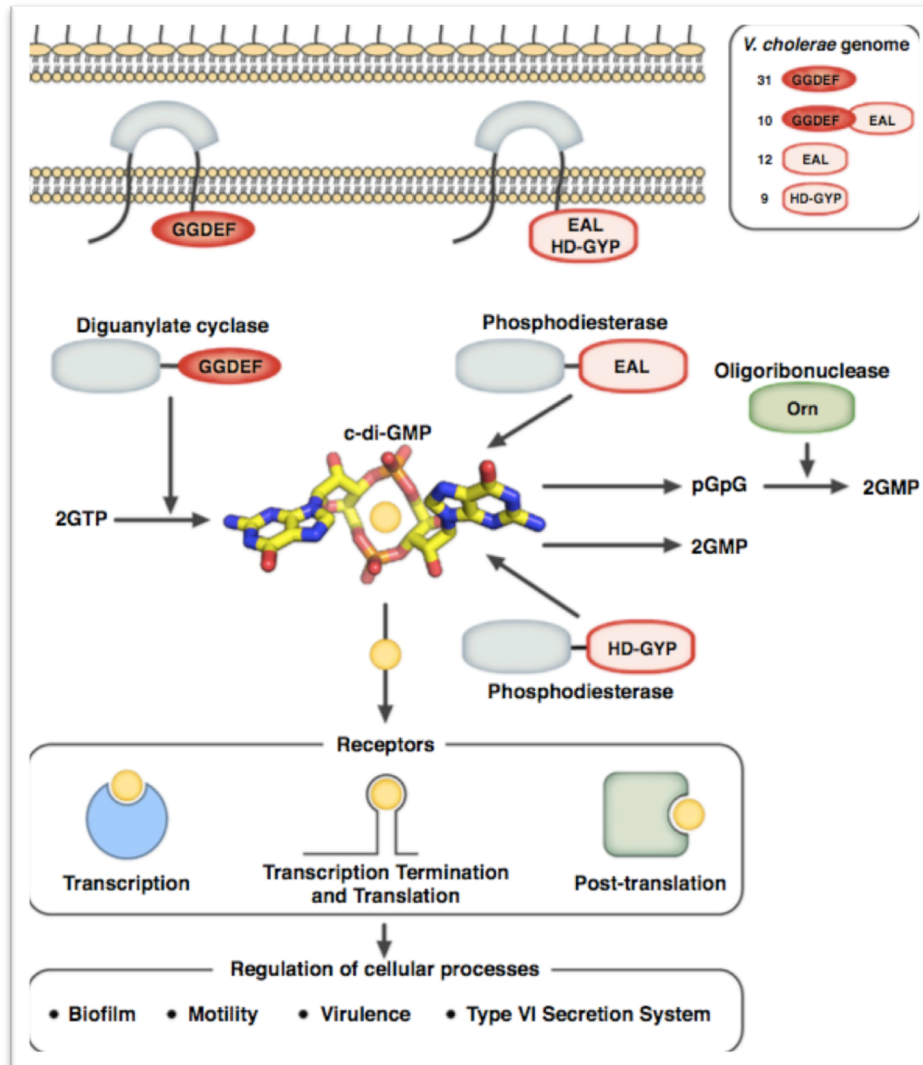


Fig.4. Regulación efectuada por el di-GMPc

El microorganismo patógeno *V. cholerae* contiene en su genoma 62 proteínas involucradas en el metabolismo del di-GMPc. De éstas, 31 corresponden a DGCs, 21 a proteínas con actividad PDE (12 con dominio EAL y 9 con dominio HD-GYP), mientras que las 10 restantes son proteínas híbridas. Se ha descrito que estas proteínas (DGC/PDE) poseen dominios de señalización en su estructura, los cuales presentan la capacidad de monitorear el medio en el que se desarrolla el microorganismo y con base en estas condiciones, producir una respuesta, activando o inactivando a las enzimas anteriormente descritas. El di-GMPc producido puede interactuar con distintos efectores o blancos, actuando a nivel transcripcional, traduccional o post-traduccional, para finalmente regular algunos procesos celulares como la movilidad, formación de biopelícula o virulencia bacteriana. Tomado de Conner *et al.*, 2017

Por otro lado, las fosfodiesterasas (PDE) pueden ser clasificadas en dos, aquellas que poseen un dominio EAL o HD-GYP. Las primeras poseen alrededor de 250 aminoácidos y un motivo conservado EAL (Glu-Ala-Leu) y degradan al di-GMPc en pGpG. Necesitan de Mg^{2+} o Mn^{2+} para ser catalíticamente activas, mientras que su

actividad es inhibida por Ca^{2+} o Zn^{2+} . La dimerización de las proteínas con dominio EAL no parece ser necesaria para la degradación del di-GMPc, por lo que pueden actuar en forma monomérica, dimérica u oligomérica. Por otro lado, las PDE con motivo HD-GYP degrada al di-GMPc en dos moléculas de GMP (Pesavento *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2017), (Figura 3).

En años recientes, se ha demostrado que distintas condiciones ambientales como la concentración de oxígeno, óxido nítrico, presencia de aminoácidos, electrones, fotones u otros más, pueden estar involucrados en la regulación de estas enzimas (Camilli *et al.*, 2006).

Varios investigadores (revisado en Römling *et al.*, 2013,1a) han demostrado que las DGC o PDE pueden contener dominios accesorios o dominios sensores en su extremo N-terminal, los cuales generalmente se encuentran integrados en la membrana citoplasmática y contienen regiones transmembrana orientados hacia el periplasma y, como su nombre lo indica, están encargados de detectar las condiciones físicas o químicas en las que se encuentra el microorganismo, transmitiendo la información del exterior celular hasta el citoplasma, regulando la actividad de las enzimas anteriormente mencionadas. Han sido descritos algunos dominios con capacidad de señalización, entre ellos se encuentran los dominios HAMP, PAS, GAF, CHASE, MASE, BLUF, LOV y otros (Camilli *et al.*, 2006; Hengge *et al.*, 2016).

Es frecuente la combinación de motivos GGDEF y EAL en una misma proteína, las cuales son denominadas híbridas. Existen distintos reportes demostrando que las proteínas presentan tres mecanismos de acción: algunos investigadores refieren que sólo uno de estos dominios presenta actividad; otras investigaciones han reportado que uno de estos dominios se encuentra degenerado y por consiguiente, carente de actividad enzimática, sin embargo, es capaz de interactuar con el di-GMPc o GTP regulando la concentración intracelular del di-GMPc. Un ejemplo, es una proteína híbrida de *C. crescentus*, la cual cuenta con un motivo GGDEF catalíticamente inactivo, pero conserva la capacidad de unir GTP y desempeñar una regulación alostérica sobre el dominio PDE que es encuentra río abajo de éste. Otros investigadores han demostrado que ambos dominios son catalíticamente funcionales y que la actividad efectuada depende de las condiciones presentes en el medio en el que se desarrolla la bacteria (Pesavento *et al.*, 2010; Jenal *et al.*, 2013).

La importancia de las DGC o PDE así como de su actividad, se resume en los siguientes ejemplos. La bacteria *V. cholerae* necesita niveles intracelulares bajos de di-GMPc para la activación de genes involucrados en la síntesis de toxinas y la represión de genes encargados en la producción de biopelícula; mientras que bajo condiciones de vida libre requiere la represión de la movilidad y producción de biopelícula, ilustrado en la Fig. 5 (Conner *et al.*, 2017). Otro ejemplo similar es el de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, donde niveles bajos de di-GMPc son necesarios para la expresión de genes de virulencia necesarios para permitir el desarrollo del patógeno en las células del huésped (Camilli *et al.*, 2006; Conner *et al.*, 2017). Por otra parte, *P. aeruginosa* presenta una hiper-producción de biopelícula (lo que supone una alta concentración intracelular del di-GMPc), la

infección causada por este microorganismo es persistente y resistente a los antibióticos (Waters, 2012).

2.2.3. Efectores del di-GMPc

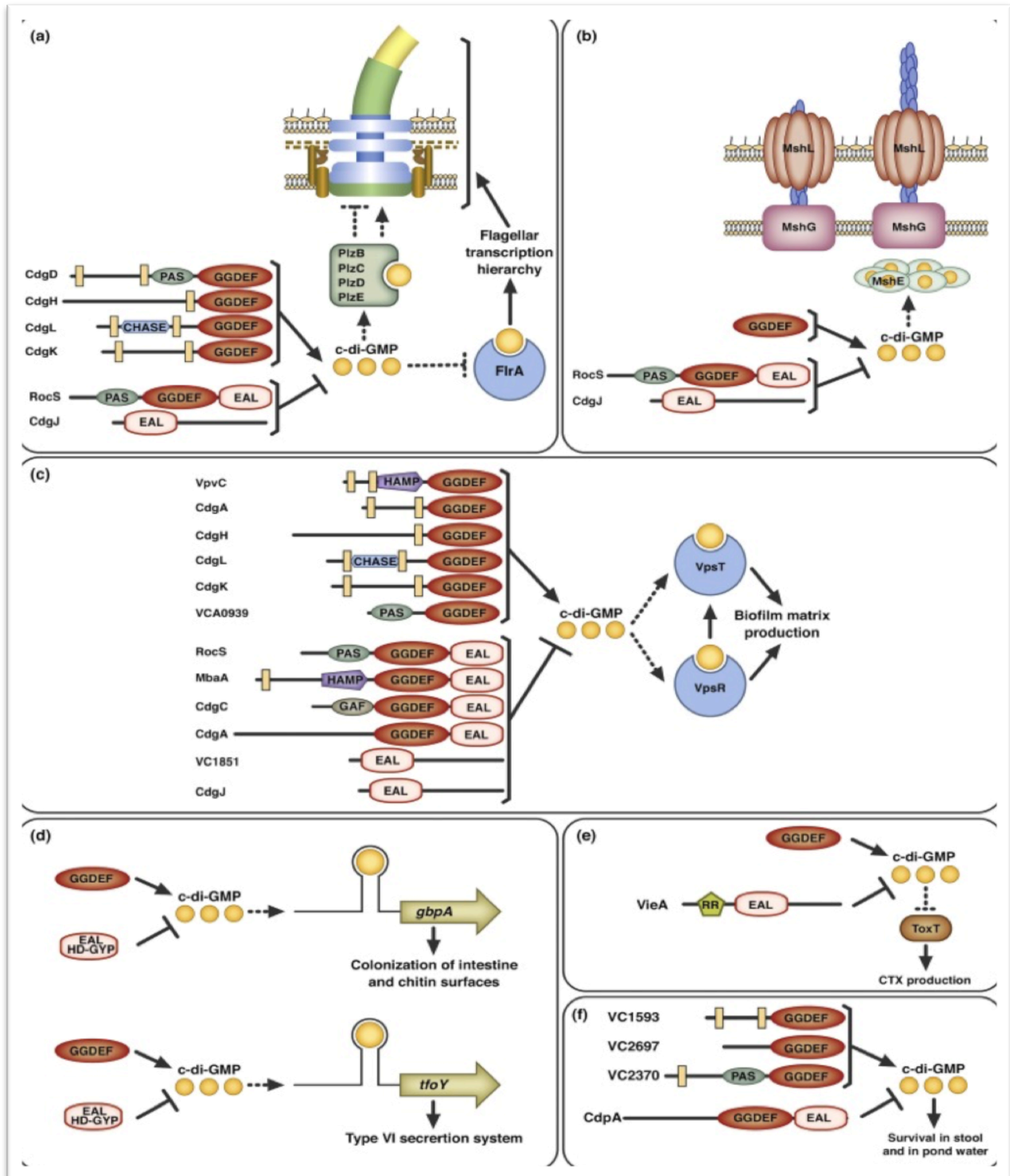
Se han realizado diversos estudios debido a lo relevante de las funciones celulares en las que se encuentra implicado el di-GMPc, particularmente en los estudios realizados en bacterias patógenas para el hombre, animales y plantas. Lo que apunta a la participación de una gran variedad de efectores o moléculas blanco con las que el di-GMPc puede interactuar, para asegurar las respuestas fisiológicas de la bacteria (Cooley *et al.*, 2016).

Uno de los efectores son las proteínas con dominio PilZ (Waters, 2012). En 2010, Paul *et al* (2010) analizaron la proteína YcgR presente en *E. coli* y *Salmonella*, posee la capacidad de formar un complejo con el di-GMPc mediante su dominio PilZ. Mediante distintos experimentos demostraron que el complejo YcgR/di-GMPc funciona deteniendo el motor del flagelo, específicamente al unirse a la proteína FliG, el complejo MotA/MotB/FligG-di-GMPc inhibe la rotación del flagelo o modifica su velocidad (Mc Carter & Gomelsky, 2015).

Por otra parte, el di-GMPc posee la capacidad de interactuar con factores transcripcionales. Uno de los más estudiados es FleQ, un regulador transcripcional presente en *P. aeruginosa*. El complejo FleQ/di-GMPc activa la expresión de genes relacionados con la formación de biopelícula mientras que reprime la expresión de los genes flagelares (Hengge *et al.*, 2016). En *V. cholerae*, VspT y VspR son dos reguladores transcripcionales activados por el di-GMPc, intervienen en la activación de la síntesis de los EPS, los mismos que participan en la formación de la biopelícula (Conner *et al.*, 2017). El di-GMPc también puede regular la expresión génica mediante su interacción con riboswitches. Estos son secuencias no codificantes de ARN, las cuales adquieren distintas estructuras terciarias que se unen a secuencias codificantes alterando su expresión. Ejemplos de estos son presentados en la Fig. 5 (Waters, 2012; Conner *et al.*, 2017).

El di-GMPc también puede presentar afinidad hacia DGC o PDE degeneradas y carentes de actividad. En estos casos, el di-GMPc se une al sitio inhibitorio de la proteína o al motivo GGDEF degenerado, modificando su estructura y favoreciendo la interacción del complejo con otras moléculas. Algunos ejemplos son CdgG de *V. cholerae* o PopA de *C. crescentus*. En el caso de PopA, la cual se encuentra involucrada en el ciclo celular, la unión de ésta con el di-GMPc, favorece la progresión del ciclo (Shanahan *et al.*, 2012; Ozaki *et al.*, 2014)

El di-GMPc puede efectuar su acción de dos maneras posibles: en la primera, los niveles celulares del segundo mensajero se modifican en el citoplasma, interactuando con distintas proteínas involucradas en una amplia variedad de procesos celulares; mientras que en el segundo mecanismo, en el que refiere la presencia de microdominios o compartimentalización del di-GMPc, la



concentración de la molécula varía en sitios localizados para modular la actividad de proteínas ancladas a la membrana o cercanas a ésta (Camilli *et al.*, 2006).

Fig 5. Modelo de señalización del di-GMPc en *V. cholerae*

a) Se ha descrito un grupo de proteínas DGC y PDE involucradas en el movimiento flagelar de *V. cholerae*. Sintetizado el di-GMPc, éste se une a proteínas con dominio PilZ, para formar un complejo que interacciona con el rotor flagelar, alterando las rotaciones del mismo. Por otra parte, este segundo mensajero puede inhibir la transcripción de los genes flagelares mediante su interacción con el regulador transcripcional FlrA. b) La unión del di-GMPc con la ATPasa MshE, promueve la polimerización de las subunidades MshA, necesarias para la formación del pili MshA, el cual es necesario para la adhesión de la bacteria a superficies. c) Diversas proteínas DGC y PDE involucradas en la producción de biopelícula. El di-GMPc producto de la acción de estas enzimas, interacciona con los factores transcripcionales VpsR y VpsT. VpsR activa de manera directa la transcripción de genes relacionados con la formación de la matriz (EPS y proteínas estructurales) de la biopelícula; mientras que la ausencia de VpsT disminuye la transcripción de los genes anteriormente mencionados. d) Los riboswitches también se han clasificado como efectores del di-GMPc. En *V. cholerae*, los riboswitches Vc1 y Vc2 se encuentran involucrados en la adhesión y producción del sistema de secreción tipo VI. e) La virulencia también es un proceso regulado por este segundo mensajero. La fosforilación de la PDE VieA es llevada a cabo por la cinasa histidinica (VieS) lo que conlleva a una disminución intracelular del di-GMPc y por consiguiente, en la reducción del regulador de virulencia ToxT, el cual es el encargado de transcribir los genes para la producción de la toxina colérica. f) Finalmente, se ha demostrado que la activación de distintas DGC y PDE son importantes para propiciar la diseminación de la bacteria. Al realizar una delección triple (VC1593, VC2697, VC2370) disminuyeron la supervivencia bacteriana en heces y agua estancada. Tomado de Conner *et al.*, 2017.

2.2.4. Biopelícula

Uno de los fenotipos relacionado al di-GMPc más ampliamente estudiado es la transición del estado móvil al sedentario. De manera general, el segundo mensajero reprime la expresión de genes que sintetizan el flagelo, o la función de este organelo (Fig. 5); mientras que favorece la expresión adhesinas o componentes que conforman la matriz extracelular de las biopelículas (Hengge *et al.*, 2016).

Las biopelículas constituyen comunidades de microorganismos asociados, los cuales están embebidos en una matriz altamente hidratada compuesta por una mezcla de macromoléculas (Whitchurch *et al.*, 2002; Vlamakis *et al.*, 2013). La matriz contiene agua en un 97%, las bacterias representan entre 2-5%, mientras que las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) y iones ocupan el 3-6%. Las SPE corresponden entre el 50-90% de la materia orgánica presente en la biopelícula, y está compuesta principalmente por EPS, proteínas, ADNe y ARN. La matriz lleva a cabo diversas funciones que van desde proteger a la comunidad bacteriana contra la desecación, antibióticos, radiación ultravioleta, cationes metálicos o la adhesión a superficies e inclusive servir como fuente de nutrientes cuando la disponibilidad de estos se encuentra reducida en el ambiente (Vilain *et al.*, 2009; Flemming & Wingender, 2010; Martínez & Vadyvaloo, 2014).

Además de estos componentes, en la matriz de la biopelícula también se pueden encontrar enzimas encargadas de degradar proteínas, ADNe o EPS con el fin de emplearlos cuando la concentración de nutrientes comienza a decrecer (Flemming *et al.*, 2010).

Por otro lado, los EPS presentes en la biopelícula pueden formar complejos con lípidos, lectinas, proteínas y enzimas, confiriéndole mayor rigidez a ésta; además, estos varían de acuerdo con la especie bacteriana, las condiciones de crecimiento a las que fueron expuestos los microorganismos, así como también la edad de la biopelícula (Vilain *et al.*, 2009; Whiteley *et al.*, 2015). Un claro ejemplo en la

variación de EPS se observa en *P. aeruginosa*, bacteria que produce distintos tipos de EPS, entre los que destacan el alginato, Pel y Psl. El alginato se encuentra compuesto por ácido gulurónico y manurónico. Por otra parte, Psl está conformado por residuos de manosa, ramnosa, glucosa y galactosa; éste contribuye a la adherencia celular primaria y a la maduración de la biopelícula. Finalmente, Pel es un polisacárido constituido por glucosa y se encuentra inmiscuido en la interacción célula-célula (Whiteley *et al.*, 2015).

Como se mencionó anteriormente, una de las moléculas que componen a las SPE, es el ADN. Se ha demostrado que *P. aeruginosa* produce grandes cantidades de ADN extracelular (ADNe), por la actividad de una endonuclease y probable lisis celular, durante la síntesis de alginato, el cual es fundamental para las fases iniciales en la formación de biopelícula (Böckelmann *et al.*, 2006).

La formación de biopelícula se ha descrito como un proceso compuesto por cinco pasos (Figura 6), I) En la primera de ellas comprende una adhesión inicial y reversible de las células a superficies bióticas o abióticas; II) posteriormente, la unión de las células se torna irreversible y es mediada por adhesinas y distintas estructuras bacterianas (flagelo, fimbrias, pilis), estabilizando la matriz de la biopelícula; III) el desarrollo temprano de la biopelícula, etapa en la que las bacterias se multiplican y conforman capas de microorganismos; IV) la maduración de la biopelícula, proceso en el que se forman microcolonias y se producen sustancias poliméricas extracelulares (SPE), las cuales les confieren múltiples beneficios a la comunidad. La microcolonia es considerada como la unidad estructural básica de la biopelícula, en esta estructura, las células se encuentran íntimamente relacionadas, por lo cual se favorece el intercambio de genes, formación de gradientes de nutrientes y otros aspectos. Esta formación de gradientes propicia la generación de subpoblaciones. Dicho término refiere a la presencia de células que poseen el mismo fondo genético, sin embargo, éstas presentan una expresión génica diferencial. Conforme las condiciones ambientales cambian, es posible que las células modifiquen su expresión génica (Lawrence *et al.*, 2004; Vlamakis *et al.*, 2013). En las biopelículas maduras se han descrito la presencia estructuras tridimensionales denominadas de tipo “hongo” o “pilar” (Davies *et al.*, 1998); V) la dispersión de la biopelícula, que ocurre cuando las condiciones del medio ya no son favorables para la comunidad y las bacterias comienzan a desprenderse de estas estructuras con la finalidad de colonizar otras zonas (Flemming *et al.*, 2010; Qaisar *et al.*, 2013; Schuster *et al.*, 2014).

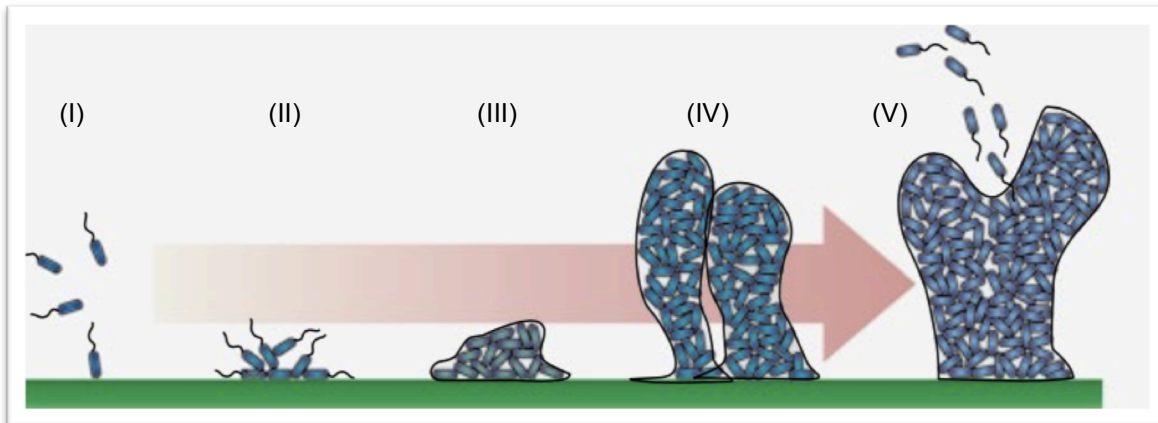


Fig 6. Etapas en la formación de las biopelículas bacterianas.

I) Las bacterias detectan una superficie y señales, comienza una adhesión débil y reversible a superficies bióticas o abióticas. II) Si las condiciones resultan favorables para el desarrollo de la comunidad, esta unión se torna fuerte e irreversible a través de adhesinas y distintas estructuras celulares. III) Los microorganismos comienzan a multiplicar, formando microcolonias. IV) Tras múltiples rondas de división, estas microcolonias dan paso a la formación de estructuras tridimensionales, las cuales son denominadas como de “hongo” o “pilar”. V) Cuando las condiciones no son adecuadas para la comunidad bacteriana, los microorganismos comienzan a liberarse para migrar a otras zonas con mejores condiciones. Tomado de Salcedo *et al*, 2015

La dispersión de la biopelícula es precedida por la muerte y lisis celular en el centro de las estructuras tridimensionales de la biopelícula madura (Fig. 7). Se han descrito una serie de factores que propician la dispersión de estas comunidades bacterianas. En *P. aeruginosa* la poca disponibilidad de nutrientes conlleva a un desprendimiento de las células que conformaban la biopelícula; otras causas de dispersión pueden ser la limitación de oxígeno o hipoxia en la biopelícula, la activación de enzimas PDE conllevando a una disminución intracelular del di-GMPc y por consiguiente, favoreciendo la transcripción de genes relacionados con la movilidad. Finalmente, el NO ha demostrado ser capaz de dispersar biopelículas conformadas por *P. aeruginosa*, *E. coli*, *V. cholerae*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *N. gonorrhoeae* y otras especies más (McDougald *et al.*, 2011).

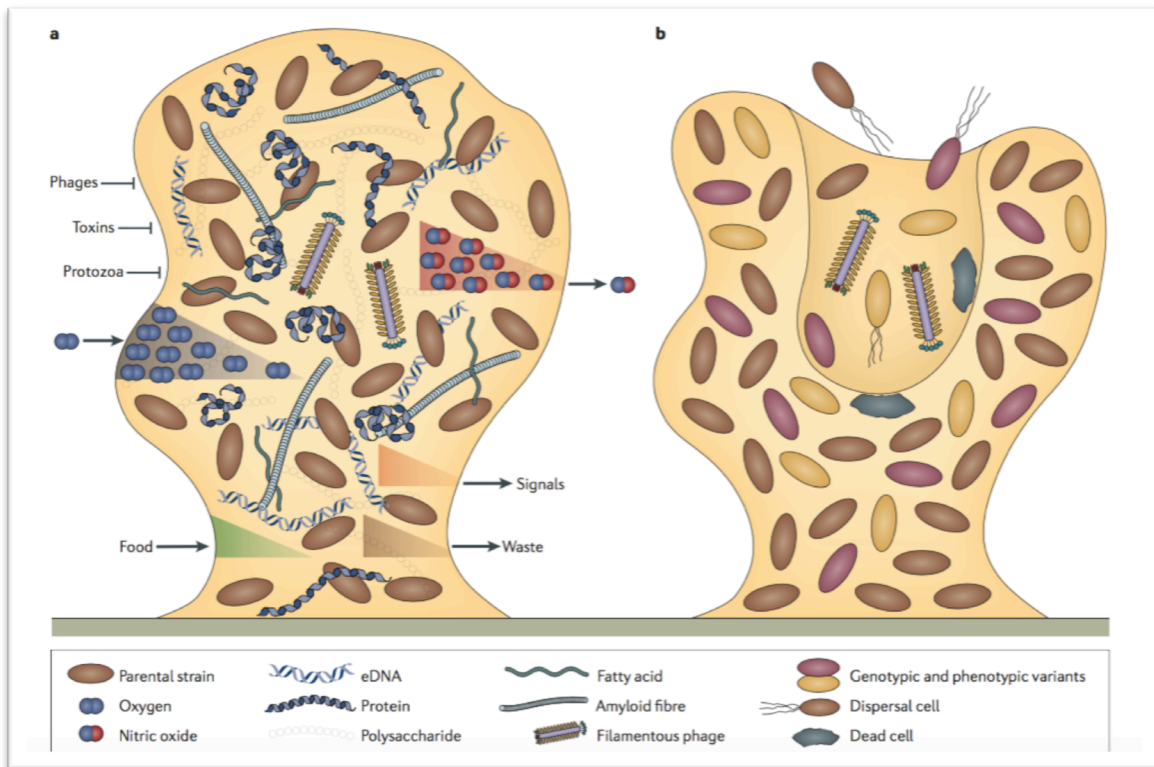


Fig 7. La compleja estructura de las biopelículas bacterianas.

a) Las microcolonias son las unidades básicas en la formación de biopelículas. Éstas se encuentran compuestas por sustancias poliméricas extracelulares (SPE) como ADNe, proteínas, polisacáridos, ácidos grasos, enzimas e inclusive bacteriófagos. Estas SPE le confieren resistencia contra condiciones adversas a las células. b) La etapa de dispersión de la biopelícula se encuentra regulada por la muerte y lisis de células que conformaban el núcleo de las microcolonias; esto conlleva a la migración celular y a una alta expresión génica diferencial. Tomado de McDougald (2011).

La formación de la biopelícula, así como la arquitectura de ésta, depende de distintos factores, entre los que destacan la concentración de nutrientes, la presencia de otros microorganismos, la movilidad y comunicación celular que presenten los mismos, así como también las características de la superficie sobre la cual se construirá esta estructura (Wagner *et al.*, 2009; Flemming *et al.*, 2010).

Debido a la importancia de las biopelículas en aspectos clínicos, agronómicos o biotecnológicos, se han implementado distintas técnicas para analizar la regulación bioquímica y genética de las bacterias presentes en estas estructuras, así como también la estructura y complejidad de las biopelículas.

El empleo de la microscopía electrónica permitió visualizar la presencia de EPS en la biopelícula, los cuales se observan como finas hebras que recubren y unen a las bacterias formando una estructura tridimensional; sin embargo, la preparación de las muestras para ser analizadas mediante esta microscopía tiende a ser

destruccion, por lo que restringe la visualización tridimensional de éstas (Lawrence *et al.*, 2007).

La reciente introducción y aplicación de la microscopía confocal ha permitido la visualización de biopelículas sin la alteración estructural de éstas. Este microscopio secciona al objeto en estudio, obteniendo varios cortes o imágenes en dos dimensiones, a partir de los cuales se realiza una reconstrucción tridimensional de la biopelícula; para la obtención de mejores resultados, es recomendable teñir la muestra a observar con fluorocromos que cuenten con afinidad hacia compuestos específicos presentes en la estructura (Lawrence *et al.*, 2007; Neu *et al.*, 2014).

El empleo de la microscopía confocal, así como el uso de distintos colorantes o lectinas, ha permitido estudiar a las biopelículas sin alterar su estructura. Recientemente la implementación de la microscopía Raman ha hecho posible la identificación de una gran variedad de componentes presentes en estas comunidades bacterianas (Wagner *et al.*, 2009).

3. Antecedentes directos

En 2013, mediante análisis bioinformático, Fernández-Domínguez localizó un gen codificante para una probable diguanilato ciclasa, a la cual denominó DgcC. Empleando recombinación homóloga, realizó una mutación por inserción del gen *dgcC* con el gen glucuronidasa y un casete de resistencia a Sm.

En 2015, Romero-Pérez analiza los fenotipos de la cepa mutante del gen *dgcC* (denominada como *A. brasilense* 102-C). Los resultados arrojan que esta cepa presenta un retraso en el crecimiento, una disminución en la formación de biopelícula, así como también un decremento en la movilidad bacteriana con respecto a la cepa silvestre (Fig. 8). Romero-Pérez concluye que esta proteína no presenta un comportamiento canónico, debido a que una mutación en una diguanilato ciclasa, enzima encargada de la síntesis del di-GMPc, resultaría en una disminución de los niveles intracelulares de este segundo mensajero y, por consiguiente, un aumento en la movilidad de la bacteria.

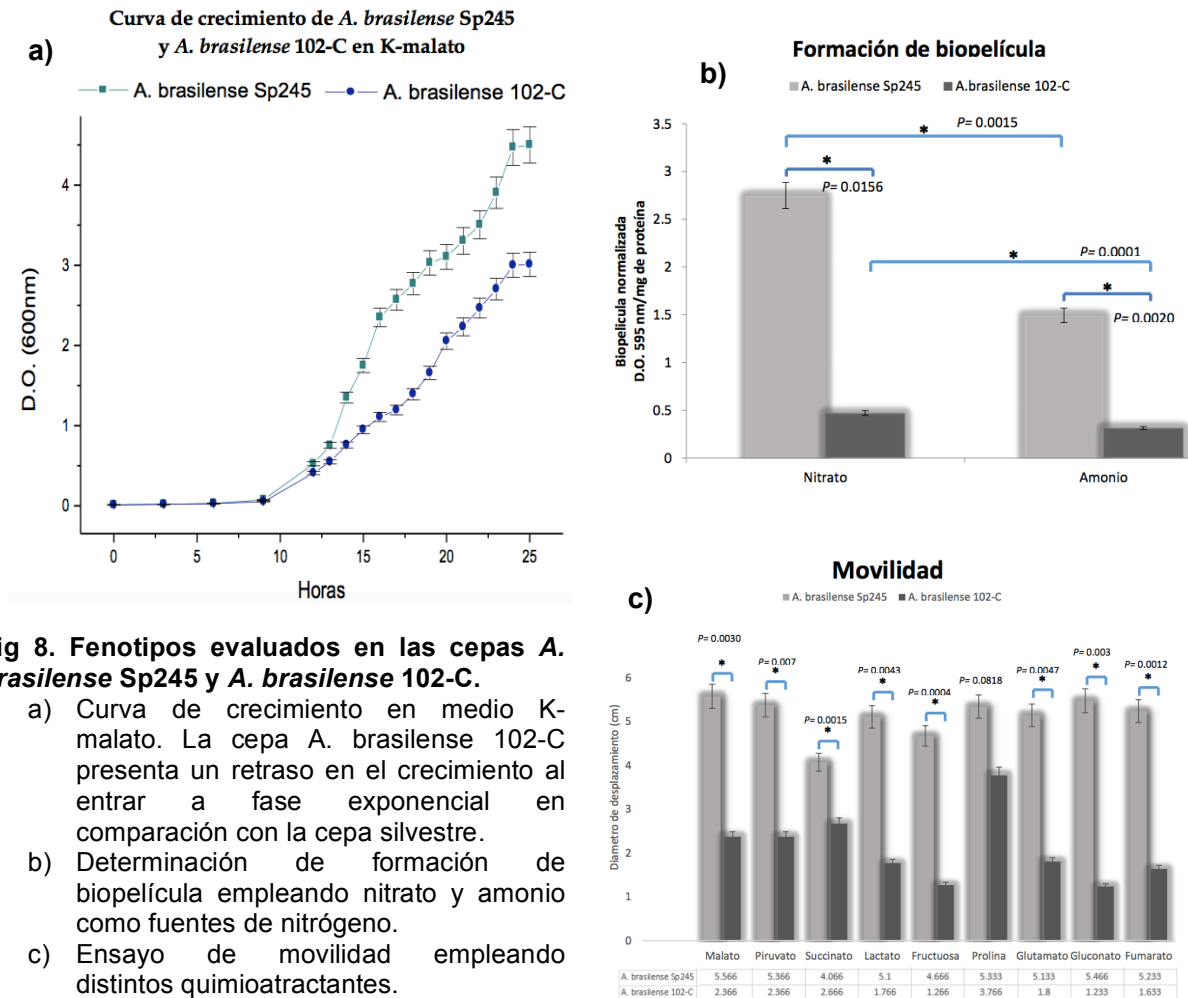


Fig 8. Fenotipos evaluados en las cepas *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 102-C.

- Curva de crecimiento en medio K-malato. La cepa *A. brasilense* 102-C presenta un retraso en el crecimiento al entrar a fase exponencial en comparación con la cepa silvestre.
- Determinación de formación de biopelícula empleando nitrato y amonio como fuentes de nitrógeno.
- Ensayo de movilidad empleando distintos quimioattractantes.

Tomado de Romero-Pérez (2015).

4. Justificación

En la actualidad, y como consecuencia del incremento de la población, la demanda de alimento ha aumentado considerablemente. La búsqueda de métodos de producción más eficientes y amigables con el ambiente es una prioridad para el ser humano.

Por tal razón se ha recurrido a las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). Estos microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en la rizósfera, pudiendo habitar ambientes que poseen climas subtropicales a templados. Por medio de la excreción de fitohormonas, fijación del nitrógeno o inhibiendo el crecimiento de organismos patógenos en las plantas, estos microorganismos promueven el crecimiento de las plantas.

Una de las PGPR mayormente estudiada es *Azospirillum brasilense*. Este microorganismo ha demostrado su potencial aplicación como inoculante y promotor del desarrollo en cultivos agrícolas mexicanos.

Debido a esto es de vital importancia la elucidación y conocimiento de los mecanismos por los cuales estas bacterias interactúan con las plantas. Para poder entender estos mecanismos, es necesario comprender la función del di-GMPc, el cual interviene en un amplio número de actividades bacterianas, como la movilidad, formación de biopelícula, cambio de estilo de vida de la bacteria, colonización de raíces de plantas, etcétera.

En este trabajo se pretende evaluar la función del gen AZOBR_100206 (*dgcC*), el cual posee un dominio GGDEF, fundamental para la formación de una molécula de di-GMPc a partir de dos moléculas de GTP.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

- Determinar el fenotipo de la cepa mutante y complementada de *A. brasilense* 102-C (AZOBR_100206::*GusA-Sm^R*).

5.2. Objetivos particulares

- Construcción del plásmido pJB3Tc20-*cdgC* (AZOBR_100206).
- Analizar el fenotipo de la cepa mutante y complementada en vida libre.
- Determinación de biopelícula empleando cristal violeta (CV).
- Determinación de unión de EPS a Rojo Congo.
- Formación de biopelícula empleando la eGFP.
- Visualización de EPS empleando microscopía confocal.
- Visualización de ADN extracelular (ADNe) empleando microscopía confocal.

6. Materiales y Métodos

6.1. Material biológico

<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>fhA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>) U169 <i>phoA</i> <i>glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA</i> <i>recA1 thi-1 hsdR17</i>	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> S17.1	<i>pro, thi hsd, recA</i> , integración cromosómica de RP4-2 Tc::Mu- Km Tn7	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>A. brasilense</i> Sp245	Cepa silvestre	Baldani <i>et al.</i> , 1987
<i>A. brasilense</i> 102-C	Derivada de la cepa Sp245 <i>dgcC::uidA/aad</i>	Fernández, 2013
<i>A. brasilense</i> AK-19	<i>A. brasilense</i> 102-C (pJB3Tc20-Km/ <i>dgcC</i>)	Este trabajo
<i>A. brasilense</i> AK-16	<i>A. brasilense</i> Sp245 (pJB3- Km/ <i>dgcC</i>)	Este trabajo
<i>A. brasilense</i> Sp245-GFP	Cepa silvestre (pMP2444)	Este trabajo
<i>A. brasilense</i> 102C-GFP	<i>dgcC::uidA/aad</i> (pMP2444)	Este trabajo
<i>A. brasilense</i> AK-33	<i>A. brasilense</i> AK-19 (pMP2444)	Este trabajo
<i>A. brasilense</i> AK-52	<i>A. brasilense</i> AK-16 (pMP2444)	Este trabajo

6.2. Vectores

pGEM-T-Easy	<i>F1 ori, ori, Amp^R, lacZα</i> , Promoter:T7, <i>lac</i> , SP6	Promega
pJB3Tc20	Derivado de pJB3. Amp ^R , Tc ^R	Blatny <i>et al.</i> , 1997
pJB3Tc20/<i>lac</i>(-)	Derivado de pJB3Tc20. Carente de promotor <i>lac</i> . Amp ^R	Este trabajo
pJB3Tc20-Km	Derivado de pJB3Tc20/ <i>lac</i> (-) Amp ^R , Km ^R (5'→3')	Este trabajo
pJB3Tc20- Km/<i>dgcC</i>	Derivado de pJB3Tc20-Km con la clonación de <i>dgcC</i> con el promotor nativo del gen	Este trabajo
pMP2444	eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein). Gm ^R	Clontech

6.3. Iniciadores

Iniciadores gen <i>dgcC</i>			
Iniciador Delantero (Pr100206-F-KpnI)	Longitud	Tm	% GC
5' – TTGGTACCGCTGTCCCCTCTCGCGTT – 3'	18 nucleótidos	60 °C	67 %
Iniciador Reverso (DgcC-R-EcoRI)	Longitud	Tm	% GC
5' – TTGAATTCCTAAGGGGAGGGGACCACGC – 3'	20 nucleótidos	62 °C	70 %
Iniciadores casete Km			
Iniciador Delantero (Km-F)	Longitud	Tm	% GC
5' – GCATCGCCTTCTATCGCCTTC – 3'	21 nucleótidos	59 °C	57 %
Iniciador Reverso (Km-R)	Longitud	Tm	% GC
5' – CAGTGACAACGTCGAGCACAGC – 3'	22 nucleótidos	62 °C	59 %

6.4. Condiciones de cultivo

Las cepas de *E. coli* DH5 α y S17.1 fueron cultivadas en medio Luria Bertani (LB*) modificado en agitación a 37 °C por tiempos variables de acuerdo a las necesidades del ensayo. Por otra parte, las cepas de *A. brasilense* fueron cultivadas en medio K-malato, LB*, Rojo Congo o Nfb (Ver anexo), dependiendo el propósito del experimento, a 30 °C en agitación o condiciones estáticas.

Los antibióticos empleados en este trabajo fueron Sm [550 μ g/ml], Tc [10 μ g/ml], Amp [50 μ g/ml], Km [50 μ g/ml] y Gm [30 μ g/ml].

6.5. Extracción y manipulación de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó mediante el método de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (Sambrook, 2001). Por otra parte, la extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo mediante lisis alcalina empleando SDS y NaOH, (Sambrook, 2001).

Para la transformación celular se emplearon cepas de *E. coli* DH5 α y *E. coli* S17.1 quimiocompetentes tratadas con CaCl₂ [100 mM].

La conjugación se efectuó empleando a *E. coli* S17.1 como la cepa donadora y *A. brasilense* Sp245 o *A. brasilense* 102-C como cepas receptoras. Para el ensayo, la cepa donadora fue sembrada en medio LB modificado (LB*) e incubada durante a 37 °C a 150 rpm durante 7-8 h, tiempo necesario para que el cultivo alcance una DO_{600nm} de 1; mientras que la cepa receptora fue sembrada en medio LB* e incubada a 30 °C durante 7-8 h, lapso de tiempo en el que el cultivo alcanza una DO_{600nm} de 0.5-0.6.

Posteriormente, se recuperó el paquete celular, tanto de la cepa donadora como receptora, centrifugando 1 ml de cada cultivo a 7500 rpm durante 3 min. Las células recolectadas fueron lavadas en 2 ocasiones con medio LB*. Los paquetes

fueron resuspendidos en 20 µl del mismo medio. Estos paquetes fueron mezclados y transferidos a una caja Petri con medio LB* libre de antibiótico. Tras 24 h de incubación a 30 °C, se recuperaron las células para posteriormente ser sembradas en cajas Petri con medio mínimo malato adicionado con el antibiótico correspondiente para la selección de las posibles transconjugantes. Después de 24-48 h de incubación, se seleccionaron distintas clonas, a las cuales se les realizó extracción plasmídica, digestión con enzimas de restricción o PCR para la selección de las transconjugantes de interés.

Para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplearon las indicaciones proporcionadas por el proveedor (Invitrogen), utilizando temperaturas de alineamiento y extensión de acuerdo a la siguiente tabla.

Fragmento a amplificar	Temperatura de alineamiento	Tiempo de alineamiento	Temperatura de extensión	Tiempo de extensión
<i>dgcC</i>	62° C	30 seg	72 °C	70 seg
<i>dgcC-Km^R</i>	62° C	30 seg	72 °C	120 seg

Las enzimas de restricción y ligación fueron empleadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Fermentas, Thermo Scientific).

6.6. Diseño de iniciadores

Empleando las bases de datos GeneBank y Microbial Signal Transduction Database 2.2 (MiST 2.2) se obtuvo la secuencia del gen *dgcC* (según la notación de *A. brasilense* Sp245). El diseño de oligonucleótidos se realizó en el programa Snap Gene Viewer 3.1.2. Debido a que la complementación genética se realizaría empleando el promotor nativo del gen *dgcC*, se decidieron diseñar iniciadores que amplificaran la región intergénica río arriba del gen (204 pb) y el marco de lectura abierto correspondiente del gen, esperando un amplificado de 1089 pb.

Iniciador Delantero (Pr100206-F-KpnI)	Longitud	T _m	% GC
5' – TTGGTACCGCTGTCCCCTCTCGCGTT – 3'	18 nucleótidos	60 °C	67%
Iniciador Reverso (DgcC-R-EcoRI)	Longitud	T _m	% GC
5' – TTGAATTCCTAAGGGGAGGGGACCACGC – 3'	20 nucleótidos	62 °C	70%

Para facilitar la clonación del amplificado en el plásmido correspondiente, se decidió agregar secuencias de reconocimiento por enzimas de restricción; al oligonucleótido delantero se añadió una secuencia de reconocimiento para la enzima *KpnI*, mientras que al oligonucleótido reverso se añadió la secuencia correspondiente para la enzima *EcoRI*.

6.7. Amplificación del gen *dgcC* mediante PCR

Para obtener las condiciones óptimas de amplificación del gen *dgcC* se realizó la PCR en gradiente, empleando los siguientes elementos: ADN [5-10ng], dNTP's [0.25 mM], oligonucleótido delantero [0.5µM], oligonucleótido reverso [0.5 µM], MgCl₂ [1.25 mM], *Taq* Pol Recombinante o *Taq* Pol Platinum 1-2 U, solución tampón de la polimerasa [1X] y DMSO 1 µl.

Las condiciones implementadas para la amplificación por PCR fueron las siguientes: se inició con un ciclo de desnaturalización a 95 °C por cinco min. Posteriormente un ciclo de desnaturalización a 95 °C por 30 seg, un ciclo de alineamiento (con temperaturas de 60 o 62° C) durante 30 seg y un ciclo de extensión a 72 °C por 70 seg. Estos tres pasos se repitieron durante 30 ciclos. A continuación, un ciclo de extensión final a 72 °C y con duración de siete min. Finalmente, las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta su procesamiento.

6.8. Clonación de *dgcC* en vector pGEM-T-Easy

Determinadas las condiciones óptimas para la PCR, se realizó una amplificación empleando *Taq* Pol Platinum, este amplificado se clonó en el plásmido pGEM-T-Easy empleando las enzimas de restricción *KpnI* y *EcoRI* (Thermo-Fisher), así como también la ligasa T4 (Invitrogen); esto con la finalidad de mantener el gen y su posterior secuenciación, la cual se realizó en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México.

6.9. Clonación de *dgcC* en pJB3Tc20

El plásmido PJB3Tc20 es de bajo número de copias, de amplio rango de hospedero, contiene casete de resistencia a Tc y Amp como marcadores de selección, además de que se ha probado que se mantiene de manera estable en *Azospirillum*.

La clonación de *dgcC* en el plásmido pJB3Tc20 se realizó mediante el método "shotgun", por lo cual ambos plásmidos (pGEM-T-Easy y pJB3Tc20) fueron digeridos con las enzimas *KpnI* y *EcoRI* con la finalidad de liberar el fragmento correspondiente al gen y su promotor, con lo cual se generaron extremos cohesivos en pJB3Tc20 complementarios a los extremos del fragmento liberado.

El producto obtenido fue transformado en *E. coli* DH5α y las transformantes fueron seleccionadas en primera instancia por la resistencia a Tc y contra-selección a la Amp, posteriormente se realizó PCR y digestión con enzimas de restricción, corroborando la clonación del gen en estudio.

6.10. Modificación del plásmido pJB3Tc20-*dgcC*

Debido a que el plásmido pJB3Tc20 contiene un promotor tipo *lac*, el cual ha demostrado ser un promotor constitutivo en *A. brasilense* Sp245, se optó por eliminarlo del plásmido, así la expresión de *dgcC* sería dirigida por el promotor nativo.

La eliminación del promotor *lac* se realizó por digestión con la enzima *SaI*, cuyas secuencias de reconocimiento flanquean al promotor; en esta digestión se elimina el gen *tetR* y 257 pb del gen *tetA*, implicados en la resistencia a Tc, por tal motivo se clonó el casete de resistencia a Km, proveniente del plásmido pJMS-KM, mediante digestión con la enzima *SmaI*. El casete se clonó en el plásmido pJB3Tc20//*lac*(-) empleando la enzima de restricción *EcoRV*, de tal manera que el casete de Km se clonó en dirección 3' → 5' o 5' → 3'. Para los experimentos posteriores se empleó el plásmido que poseía el casete de Km en dirección 5' → 3', al cual se denominó pJB3Tc20-Km.

La dirección del casete se definió por medio de digestiones empleando las enzimas *BamHI* y *PstI*. El tamaño esperado para la dirección 3' → 5' corresponde a 999 pb, mientras que para la dirección 5' → 3' a 743 pb.

Para el mantenimiento de la construcción anterior, ésta se transformó en células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α . Las transformantes con la construcción fueron seleccionadas sembrándolas en medio LB* con el antibiótico correspondiente para posteriormente ser corroboradas mediante PCR.

Seleccionadas las clonas, se extrajo el plásmido recombinante de éstas y se procedió a transformar en *E. coli* S17.1; una vez seleccionadas las clonas transformantes se procedió a su identificación de acuerdo a lo descrito en el párrafo anterior y finalmente se llevó a cabo la conjugación entre *E. coli* S17.1 y *A. brasilense* Sp245 o *A. brasilense* 102-C de acuerdo con las condiciones anteriormente descritas.

Para la selección de las transconjugantes, se realizó extracción plasmídica y PCR empleando el oligonucleótido reverso para amplificar el gen *dgcC* y el oligonucleótido reverso del casete de Km, esperando un amplificado de 1923 pb. La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por cinco min. Posteriormente, un paso de desnaturalización a 95 °C por 30 seg, un paso de alineamiento a 62° C durante 30 seg y un paso de extensión a 72 °C por 120 seg. Estos tres pasos se repitieron durante 30 ciclos. A continuación, un ciclo de extensión final a 72 °C con duración de 7 min. Finalmente, las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta su procesamiento.

6.11. Determinación de formación de biopelícula

La determinación de formación de biopelícula se realizó de acuerdo a lo descrito por Arruebarrena *et al.*, 2012. Se tomaron 2-3 colonias de *A. brasilense* Sp245 previamente crecidas por 3-4 días en medio Rojo Congo y se inocularon a un

matraz con 15 ml de medio LB modificado. Se incubó a 30 °C, con agitación a 120 rpm por 14-16 h, hasta obtener la DO_{600nm} entre 1.1-1.4. Se centrifugó 1 ml del mismo a 5000 rpm durante cinco min.

El sobrenadante se descartó y el paquete celular se resuspendió en un tampón de fosfatos pH 7.0 [66 mM] hasta obtener una DO_{600nm} de 2. Para obtener el volumen de tampón a utilizar se emplea la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de tampón necesario (ml)} = \frac{DO_{600nm} \text{ cultivo}}{2}$$

De la suspensión, se realizó una dilución 1:100 con medio Nfb y se sembró en placas de 24 pozos, adicionando 2 ml de cultivo por pozo. La placa se incubó en una cámara húmeda y condiciones estáticas a 30 °C por 3 días. Se requiere que la determinación de la concentración del colorante cristal violeta (CV) que se adhiere a la biopelícula sea normalizada; por lo cual se sugiere trabajar con 9 pozos a los que se añaden CV y 9 pozos que se emplean para cuantificar las proteínas presentes en el cultivo.

Posterior al tiempo de incubación se adicionaron 0.5 ml de CV [0.5%]. La placa se dejó reposar durante 30 min. Se decantó la placa para eliminar el exceso de CV y se realizaron dos lavados con agua destilada. Estos lavados deben realizarse de manera delicada para evitar el desprendimiento de la biopelícula adherida en el fondo del pozo. La placa se colocó de manera invertida para eliminar el exceso de agua y se adicionaron 2 ml de ácido acético [33%] a cada pozo para recuperar el CV adherido a la biopelícula. Se dejó en reposo durante 30 min y posteriormente se homogeneizó con una pipeta. El CV solubilizado en el ácido acético se recuperó, y procedió a realizar la dilución correspondiente de la cual se agregaron 0.2 ml por pozo a una placa de 96 pozos. Finalmente se midió en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 590_{nm}.

Determinación de proteínas totales, se recolectó el contenido de cada pozo centrifugando a 10000 rpm por 3 min. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de agua destilada. Posteriormente se procedió a sonicar la muestra empleando una amplitud de 60 Hertz con 4 pulsos con una duración de 6 segundos cada pulso. La muestra se sometió a ebullición durante 10 min. Concluida ésta, se tomaron 20 µl de la muestra y se transfirieron a otro tubo, al cual se adicionaron 180 µl de agua destilada y 200 µl de NaOH [1 N]. La muestra se volvió a someter a ebullición durante 5 min y posteriormente se le agregaron 400 µl de HCl [0.5 N].

Finalmente se cuantificó la concentración de proteínas empleando el reactivo de Bradford (Bio-Rad); para esto se adicionaron 150 µl de este reactivo y 150 µl de la dilución del extracto y se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Para determinar la concentración de proteínas en la muestra, la lectura obtenida se extrapoló con los datos previamente adquiridos de una curva patrón empleando albúmina. Cuando la cepa en estudio forma agregados, la producción

de biopelícula debe ser normalizada con la concentración de proteínas (mg de proteína/ml de cultivo)

6.12. Determinación de unión de EPS a Rojo Congo

Las cepas a evaluar, provenientes de un cultivo en medio Rojo Congo, fueron sembradas en medio LB modificado a 30 °C durante 14-16 h, tiempo aproximado en el que el cultivo alcanza una DO_{600nm} entre 1.1-1.4. Se centrifugó 1 ml del mismo a 5000 rpm por 5 min.

Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en tampón de fosfatos pH 7.0 [66 mM] para obtener una DO_{600nm} de 2. De esta suspensión, se realizó una dilución 1:100 empleando medio Nfb y se sembró en pozos con 2 ml del mismo medio.

Se emplearon condiciones estáticas y una cámara húmeda para la incubación a 30 °C durante 3 días. Transcurrido este tiempo, se recolectaron las células por centrifugación a 10000 rpm durante 3 min. Se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado con 1 ml de medio Nfb.

Posteriormente, se resuspendió el paquete celular con 1 ml de Nfb al que previamente se adicionó colorante RC a [40 µg/ml]. Se incubó durante 2 h a 30° C y con una agitación de 150 rpm. Las células y EPS unidos a RC se recolectaron mediante centrifugación a 13000 rpm por 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se leyó a una longitud de onda de 490_{nm}. En esta fracción se encuentra el colorante que no se unió a los EPS.

Se analizó la cantidad de RC que se adhirió a los EPS a partir de una curva estándar que previamente se realizó partiendo de [0 µg/ml] hasta [40 µg/ml] de RC. Se extrapola la lectura obtenida del sobrenadante a los datos de la curva para conocer la cantidad de colorante libre. Finalmente, se restó el dato obtenido con la curva a los 40 µg/ml de RC que se añadieron a cada muestra. Es importante recalcar que, de la misma manera que para la formación de biopelícula, la producción de EPS debe ser normalizada con la concentración de proteínas presente en el cultivo.

6.13. Determinación de formación de biopelícula empleando microscopía confocal

Con la finalidad de evaluar la estructura tridimensional de la biopelícula, se procedió a marcar las cepas *A. brasilense* Sp245, *A. brasilense* 102-C y *A. brasilense* 102-C(*pdgcC*) con la proteína eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein), codificada en el plásmido pMP2444, de amplio rango de hospedero estable en *A. brasilense*, el cual posee un casete de resistencia a Gm como marcador de selección.

Se realizó una conjugación biparental entre la cepa *E. coli* S17.1 (pMP2444) donadora y *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 102-C como cepas receptoras de

acuerdo a la metodología descrita anteriormente. Las transconjugantes fueron seleccionadas por la resistencia a Gm y posteriormente se verificó por la característica de fluorescencia verde mediante microscopía de fluorescencia. Las longitudes de onda para la excitación y emisión de la eGFP fueron de 488 y 508 nm, respectivamente.

Obtenidas las clonas deseadas *A. brasilense* Sp245-GFP, *A. brasilense* AK-33 y *A. brasilense* AK-52, se procedió a realizar la técnica de biopelícula, anteriormente descrita, con algunas modificaciones.

Una vez que se recuperaron los paquetes celulares y estos fueron resuspendidos en tampón de fosfatos pH 7.0 [66 mM] para obtener una DO_{600nm} de 2, se realizó una dilución 1:100 empleando medio Nfb y añadiendo Gm. De esta dilución, se añadieron 3 ml a dispositivos denominados Fluorodish (World Precision Instruments), los cuales facilitan la observación al microscopio de la biopelícula sin alteraciones en su estructura. Las Fluorodish fueron incubadas durante 3 días a 30° C en condiciones estáticas. Los dispositivos se retiraron de incubación y fueron visualizados en un microscopio confocal Nikon Plus2. Los datos obtenidos fueron analizados en el software NIS Elements Advanced Research.

6.14. Visualización de EPS en biopelícula empleando calcofluor

La presencia de EPS en la biopelícula se visualizó empleando calcofluor (18909, Sigma-Aldrich), un fluoróforo con afinidad hacia los polisacáridos que presentan enlaces β -1,3 y/o β -1,4 (Salcedo *et al.*, 2015).

Para este fin, se emplearon concentraciones de calcofluor de 0.001%, 0.05% y 0.1%. Finalmente se seleccionó la concentración de 0.05% y se prosiguió con la técnica mencionada en el apartado anterior con algunas variaciones respecto a la adición del calcofluor. Una de estas variaciones consistió en añadir 25 μ l de calcofluor [0.05%] a los 3 ml de cultivo para posteriormente incubar en condiciones estáticas durante 3 días a 30 °C; mientras que en la segunda alternativa se añadió el cultivo al Fluorodish y tras el tiempo de incubación se reemplazó 1 ml de cultivo con 1 ml de tampón de fosfatos pH 7.0 [66 mM] al cual se le agregaron 25 μ l de calcofluor [0.05%].

Finalmente, la presencia de EPS se observó al microscopio confocal empleando una longitud de onda de excitación y emisión de 380_{nm} y 475_{nm}, respectivamente.

6.15. Visualización de ADN extracelular (ADNe) en biopelícula empleando yoduro de propidio

Para visualizar la presencia de ADNe, se empleó yoduro de propidio (25535-16-4, Sigma-Aldrich), un agente intercalante del ADN, el cual no es permeable en células vivas, por lo que se emplea para detectar células muertas en una población, así como la presencia de ADN liberado al medio.

Para este propósito, se empleó una metodología similar a la empleada para evaluar la presencia de EPS en la biopelícula, anteriormente descrita, con dos

modificaciones. En una de ellas, se añadieron 3 ml de cultivo y yoduro de propidio a una concentración final de 1 o 5 μM (Ramírez-Mata *et al.*, 2016) a la Fluorodish para posteriormente someterla a incubación durante 3 días a 30 °C en condiciones estáticas y finalmente ser observada en el microscopio confocal. Por otra parte, se procedió a incubar el cultivo presente en la Fluorodish con las condiciones anteriormente mencionadas y tras el tiempo de incubación, se reemplazó 1 ml de cultivo con 1 ml de tampón de fosfatos pH 7.0 [66 mM] al cual se le agregaron yoduro de propidio para tener una concentración final de 1 o 5 μM .

La presencia de ADNe fue visualizada empleando una longitud de onda de excitación y emisión de 535 y 617 nm, respectivamente.

7. Resultados

7.1. Análisis in silico

7.1.1. Contexto genético del gen 6449870 (*dgcC*)

El gen AZOBR_100206 (6449870 o *dgcC*) que se encuentra en el cromosoma de *A. brasilense* Sp245, posee una longitud de 885 pb que codifican para una probable diguanilato ciclasa de 294 aminoácidos. Esta proteína cuenta con un dominio REC (aminoácidos 1-114) y un dominio GGDEF (aminoácidos 120-240), tal y como se muestra en la Fig. 9.

Río arriba del gen se encuentra una región intergénica de 204 pb. Río abajo del mismo se encuentra un gen que codifica para una proteína hipotética que presenta un dominio Nudix; entre ambos genes existe una distancia intergénica de 68 pb, lo que podría implicar que estos forman parte de un operón.

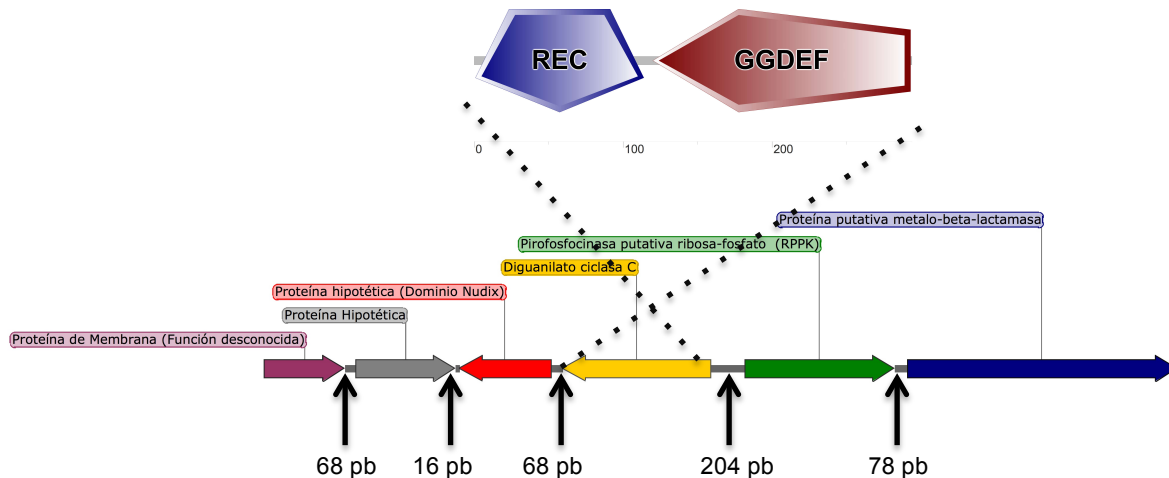


Fig. 9. Contexto genético del gen *dgcC*.

El gen *dgcC* codifica para una presunta diguanilato ciclasa denominada como DgcC, la cual presenta un dominio REC y un dominio GGDEF. Este gen se encuentra flanqueado por un gen que codifica a una proteína hipotética con dominio Nudix y otro que codifica para una probable pirohidrolasa. Se indica los tamaños de las regiones intergénicas en pb. El diagrama presentado se realizó empleado los programas bioinformáticos SMART y Snappgene.

7.1.2. Análisis de la región intergénica río arriba al gen *dgcC* para la localización del probable promotor del gen

La búsqueda del probable promotor del gen *dgcC*, se realizó por medio del análisis de la región intergénica río arriba al gen en estudio. La región intergénica posee una longitud de 204 pb.

Se emplearon los programas bioinformáticos PePPER (de Jong, Molecular Genetics, University of Groningen), BPROM (Solovyev & Salamov, 2011), Virtual Footprint (Münch et al., 2005) y Promoter-Hunter (Klucar et al., 2010). Los resultados se presentan en la Fig. 10.

```

1      GCTGTCCCCT CTCGCGTTGC GCGCCCGGAC ATGGGCGCCC CGTTCGGCCC      50
51     GTACTATGCC GCAAGGGCCG CAGCGGGGCG ACCACGACCT TAGGCGCAAC      100
101    GTTACCGTGA AGGGATAGGA CGGCAGGGAC GGACGCCTGA AAATGATGCC      150
151    GCGGCGGTCT TCCACTCATT GACCGCAGAC ACAGGTATGA GGCAGTTTCC      200
201    CGCCATGCGC GTGCTCATCG CCGACGACGA
  
```

Zona promotora	Score	Rango	Programa empleado
CTCATTGACCGCAGACACAGGTATGA	6.57	3 - 8	Footprint
TGAAAATGATGC	7.72	3 - 8	Footprint
TT GACCGCAGACACAGGTATGAGGCAGTTT	4.4	0 - 5	Genome 2D
Caja -35 (CTCATT) Caja -10 (TATGAG)	2.13	0 - 3	Promoter Hunter

Fig 10. Región intergénica de los genes 6449870 (*dgcC*) y 6449871(RPPK)

Probables secuencias promotoras identificadas por los programas Virtual Footprint 3.0, Promoter Hunter y G2D Genome. En la tabla inmediata, se anota el score de las probables secuencias promotoras, así como el rango de su valor y el programa empleado para su localización. En letras coloreadas de naranja se pone de manifiesto el inicio del ORF correspondiente al gen 6449870 (*dgcC*).

7.2. Amplificación de *dgcC* mediante PCR en gradiente

La amplificación del gen *dgcC* se realizó mediante PCR, de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos, en gradiente para determinar las mejores condiciones de amplificación y empleando los oligonucleótidos específicos para amplificar el ORF y región intergénica río arriba donde se encuentra el probable promotor del gen antes mencionado. Se obtuvo un amplificado de 1099 pb como se muestra en la Fig. 11.

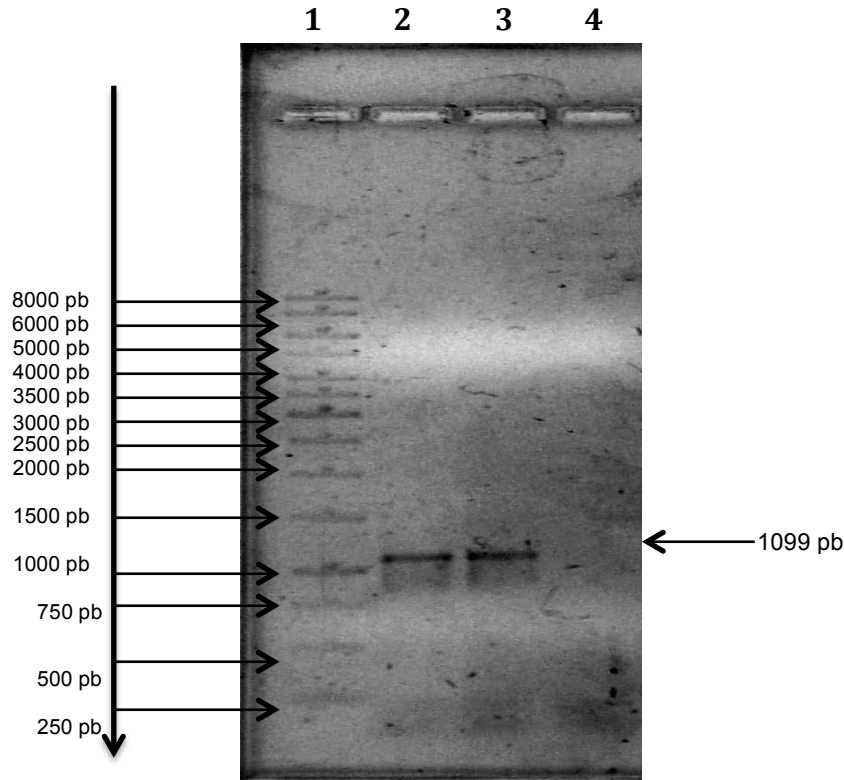


Fig. 11. Electroforetograma de la amplificación del gen *dgcC*.

PCR en gradiente empleando los oligonucleótidos Pr100206-F-KpnI y DgcC-R-EcoRI. El amplificado, con un tamaño de 1099 pb, corresponde a la región codificante del gen *dgcC* así como a la región intergénica río arriba del mismo. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Amplificación empleando T_m de 60 °C. Carril 3: Amplificación empleando T_m de 62 °C Carril 4: Control negativo.

7.3. Amplificación de *dgcC* mediante PCR para secuenciación

Establecidas las condiciones para la amplificación del gen y su probable promotor, se procedió a realizar una PCR empleando la enzima *Taq* Platinum. Este amplificado se emplearía para las posteriores construcciones.

En la figura 12 se muestra el resultado de la amplificación con la enzima de alta fidelidad.

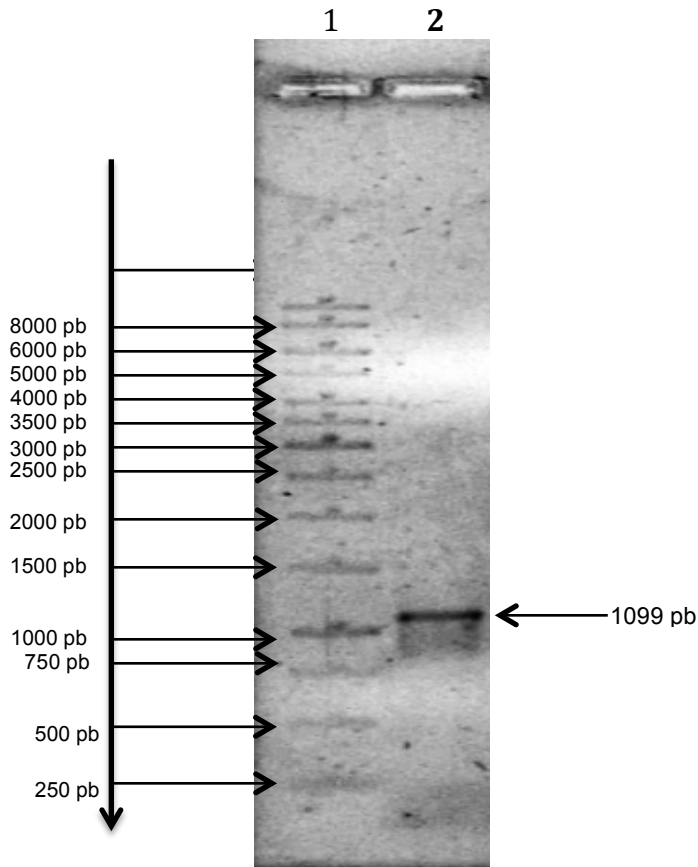


Fig. 12. Electroforetograma de la amplificación del gen *dgcC* empleando *Taq* Platinum.

Se realizó PCR empleando la T_m de 62 °C y la enzima de alta fidelidad *Taq* Platinum. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Amplificado de 1099 pb correspondiente a *pdgcC*.

7.4. Secuenciación de la clonación de *dgcC* en pGEM-T-Easy

Para corroborar que el amplificado correspondiente a la región *pdgcC* no sufrió modificaciones, ésta se clonó en el vector de mantenimiento pGEM-T-Easy. La construcción se envió a secuenciar como se indicó en el apartado de materiales y métodos. El resultado de la secuenciación se muestra en la Fig. 13.

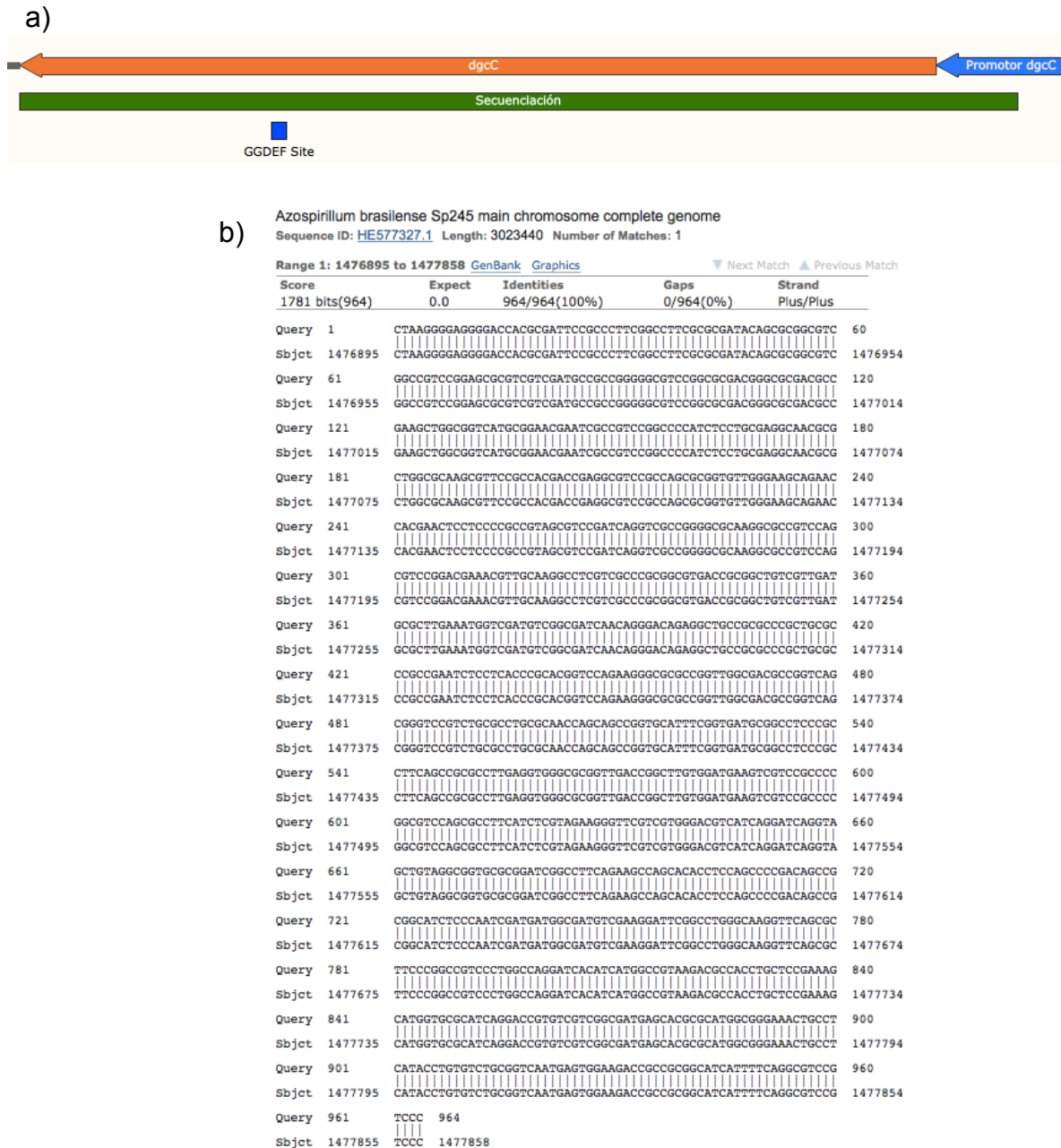


Fig. 13. Secuenciación del fragmento *pdgcC*.

- a) La secuenciación cubrió 964 pb, las cuales representan un 89% del fragmento.
- b) El resultado de ésta arrojó una identidad del 100% con respecto a la secuencia presente en la base de datos del NCBI.

7.5. Clonación de *pdgcC* en plásmido pJB3Tc20 mediante el método “shotgun”

Posterior a la clonación de *pdgcC* en el vector pGEM-T-Easy y con resultados adecuados en la secuenciación del inserto (mostrados en la Fig. 13), se procedió a realizar la clonación del mismo en el vector pJB3Tc20 empleando la técnica conocida como “shotgun”. En la figura 14 se muestra la digestión doble del vector linearizado y la digestión de la construcción pJB3Tc20-*pdgcC*.

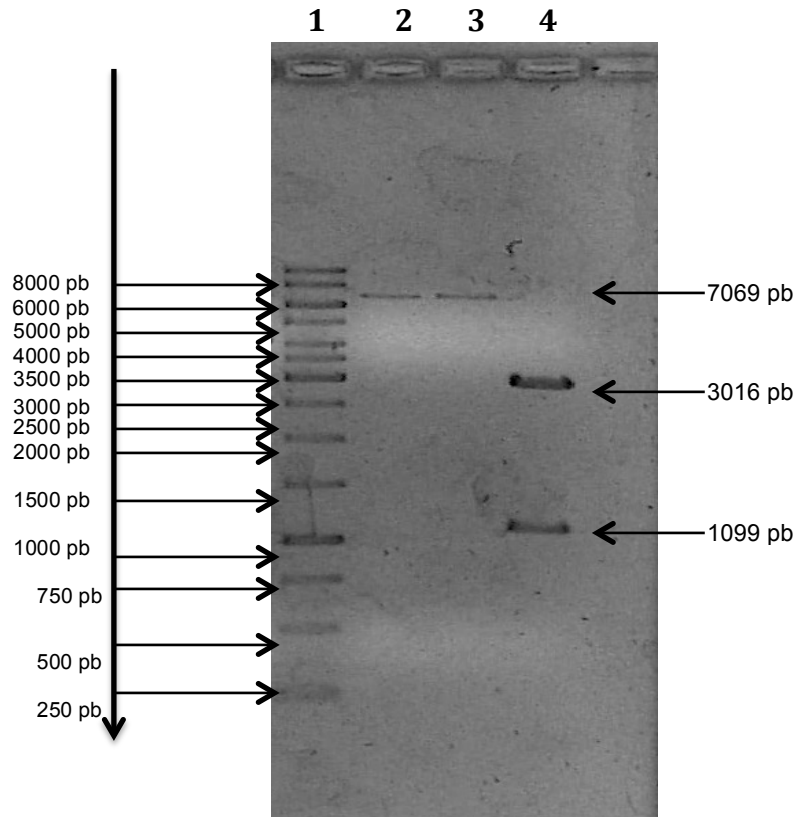


Fig. 14. Electroforetograma de la digestión de pGEM-*pdgcC* y pJB3Tc20 para clonación “shotgun”.

Los fragmentos de tamaños de 3016 pb y 1099 pb corresponden al vector pGEM-T-Easy y al inserto clonado, respectivamente. Se realizaron cortes sucesivos para corroborar la digestión del vector pJB3Tc20, Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Vector pJB3Tc20 digerido con *KpnI* cuyo tamaño corresponde a 7069. Carril 3: Vector pJB3Tc20 digerido con *EcoRI*. Carril 4: Vector pGEM-*dgcC* digerido con *KpnI* y *EcoRI*.

7.6. Selección de clones de *E. coli* S17.1 pJB3Tc20-*pdgcC* mediante PCR en colonia.

A las clonas que arrojaron un análisis positivo en cuanto a presencia del plásmido pJB3Tc20-*pdgcC*, amplificación del gen y un patrón de restricción acorde a lo esperado, se les practicó extracción del plásmido para transformar a *E. coli* S17.1 y posteriormente llevar a cabo la conjugación con las cepas de *A. brasilense*. Posterior a la transformación en la cepa de *E. coli* S17.1, algunas transformantes fueron seleccionadas y clasificadas en grupos a los que se les realizó PCR en colonia, los resultados se presentan en la Fig. 15.

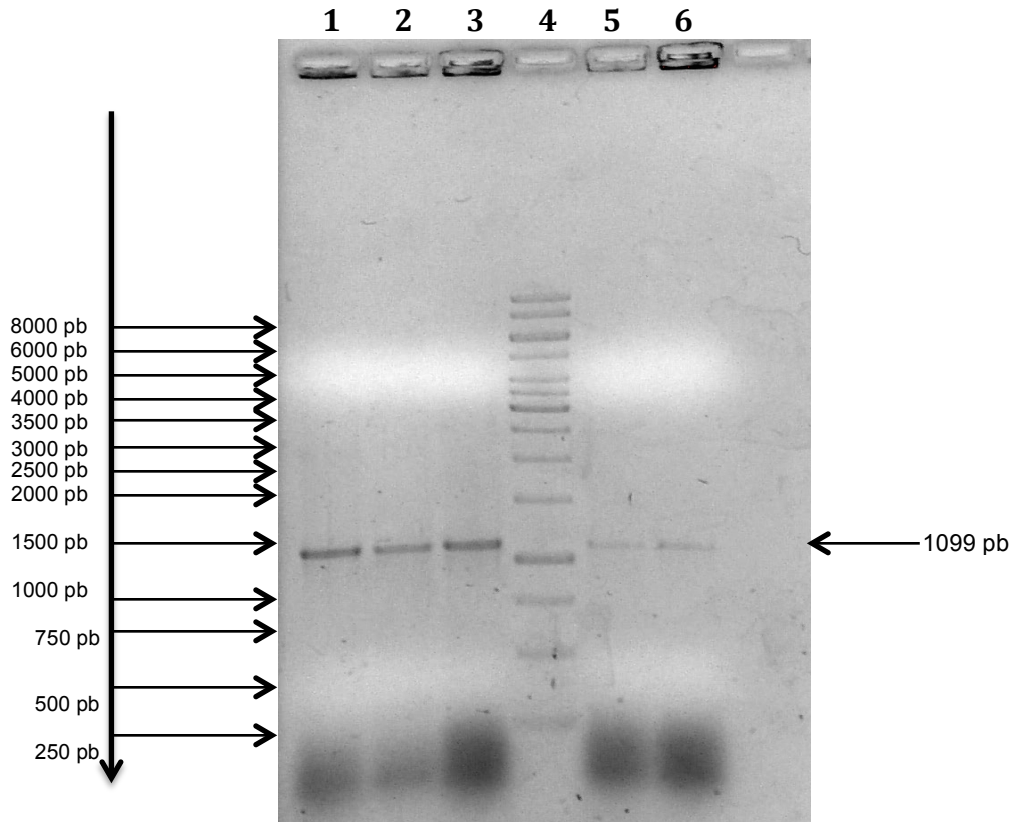


Fig. 15. PCR en colonia para selección de clones de *E. coli* S17.1 pJB3Tc20-*pdgcC*
Análisis de las transformantes *E. coli* S17.1 pJB3Tc20-*pdgcC*, grupos con cinco clonas cada uno. Datos del PCR en colonia que indican que contienen el inserto de interés de tamaño de 1099 pb. Carril 1: Grupo 1. Carril 2: Grupo 2. Carril 3: Grupo 3. Carril 4: Marcador de peso molecular. Carril 5: Grupo 4. Carril 6: Grupo 5.

Posterior a la PCR en colonia, se seleccionaron aleatoriamente 2 clonas, a las cuales se les realizó extracción plasmídica y digestión con enzimas de restricción. Las clonas seleccionadas e identificadas como clona 8 y 16 fueron sometidas a digestión con las enzimas anteriormente descritas. El resultado de esta restricción se presenta en la Fig. 16.

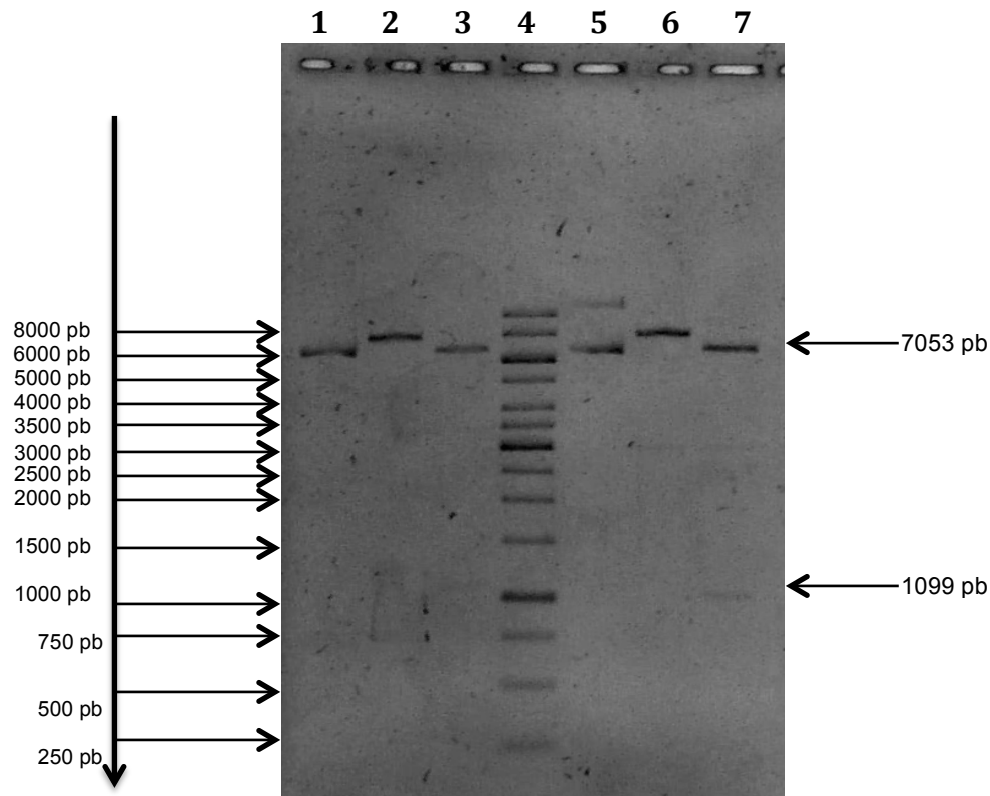


Fig. 16. Electroforetograma del patrón de restricción de las clonas 8 y 16 de *E. coli* S17.1 pJB3Tc20-*pdgcC*.

Se seleccionaron dos clonas 8 y 16 para ser sometidas a digestión. Carril 1: Clona 8 sin digerir. Carril 2: Clona 8 digerida con *EcoRI*. Carril 3: Clona 8 digerida con *EcoRI* y *KpnI*. Carril 4: Marcador de peso molecular. Carril 5: Clona 16 sin digerir. Carril 6: Clona 16 digerida con *EcoRI*. Carril 7: Clona 16 digerida con *EcoRI* y *KpnI*. El fragmento de 7053 pb corresponde al esqueleto del vector pJB3Tc20, mientras que aquel con tamaño de 1099 pb pertenece a la fracción *pdgcC*.

A partir de los resultados obtenidos por PCR y restricción del DNA plasmídico se seleccionó la clona 8 de *E. coli* S17.1 (pJB3Tc20-*pdgcC*) para llevar a cabo la conjugación con *A. brasilense* 102-C. Una vez realizado el experimento, se seleccionaron distintas clonas a las que se les practicó PCR en colonia (resultado no mostrado). Posterior a este primer escrutinio, se seleccionaron tres clonas de manera aleatoria a las que se les realizó PCR. Estas clonas fueron denominadas como “Q”, “R” y “S” y el resultado de la PCR se indica en la Fig. 17.

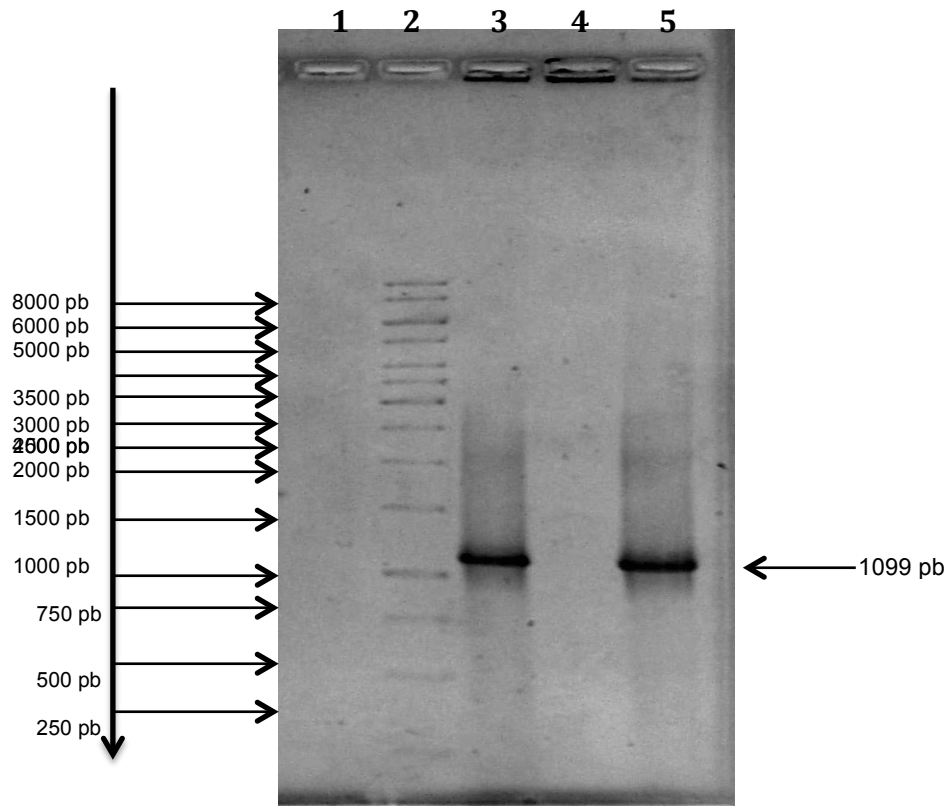


Fig. 17. PCR de transconjugantes entre *E. coli* S17.1 pJB3Tc20-*pdgC* y *A. brasilense* 102-C.

De las clonas seleccionadas anteriormente para extracción plasmídica, se escogieron la 8 y 16 para ser sometidas a digestión. Carril 1: Control negativo. Carril 2: Marcador de peso molecular. Carril 3: Clona "Q". Carril 4: Clona "R". Carril 5: Clona "S".

Para corroborar y seleccionar a la transconjugante que se emplearía en los experimentos siguientes, se procedieron a realizar digestiones empleando ADN plasmídico de la clona denominada "S", así como también a la clona 25, la cual corresponde a *A. brasilense* 102-C con el vector vacío (control); los resultados se muestran en la Fig. 18.

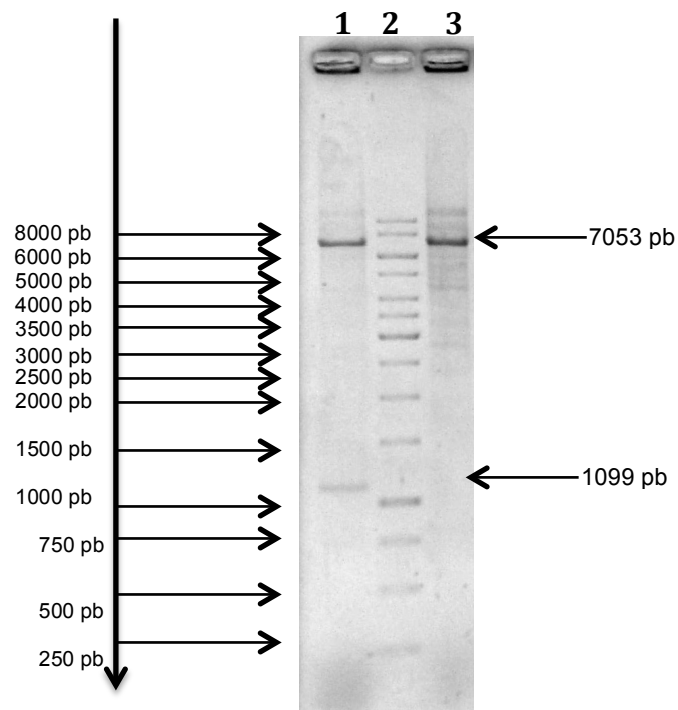


Fig. 18. Digestión de clonas S y 25.

Digestión con las enzimas *KpnI* y *EcoRI* a las clonas "S" y 25. Carril 1: Clona "S" (*A. brasilense* 102-C (pJB3Tc20-*pdgcC*)). Carril 2: Marcador de peso molecular. Carril 3: Clona 25 (*A. brasilense* 102-C (pJB3Tc20)).

Finalmente, y con la intención de sobreexpresar al gen *dgcC*, se realizó una conjugación entre *A. brasilense* Sp245 y la clona 8 de *E. coli* S17.1 (pJB3Tc20-*pdgcC*). Se obtuvieron las clonas A2 y A40. En la figura 19 se presenta el dato obtenido.

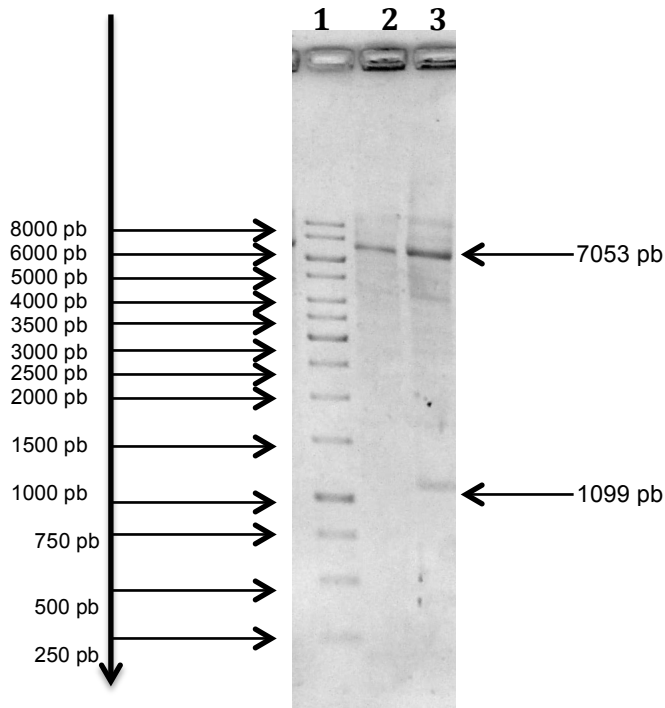


Fig. 19. Digestión de clona A2 y A40.

Con las enzimas *KpnI* y *EcoRI* se realiza análisis de restricción a las clonas "S" y 25.

Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Clona A2 (*A. brasilense* Sp245 + pJB3Tc20).

Carril 3: Clona A40 (*A. brasilense* Sp245 + pJB3Tc20-*pdgcC*).

7.7. Modificación de la construcción pJB3Tc20-*pdgcC*

Para eliminar posibles interferencias en la transcripción del gen *dgcC*, se procedió a eliminar el promotor *lac* del plásmido pJB3Tc20 mediante la restricción con la enzima *SalI*. Debido a que el marcador de selección Tc se eliminó, se procedió a clonar el casete de resistencia a Km (proveniente del plásmido pJMS-Km) en el sitio *EcoRV*. En la Fig. 20 se visualiza el procedimiento seguido y las construcciones intermedias obtenidas.

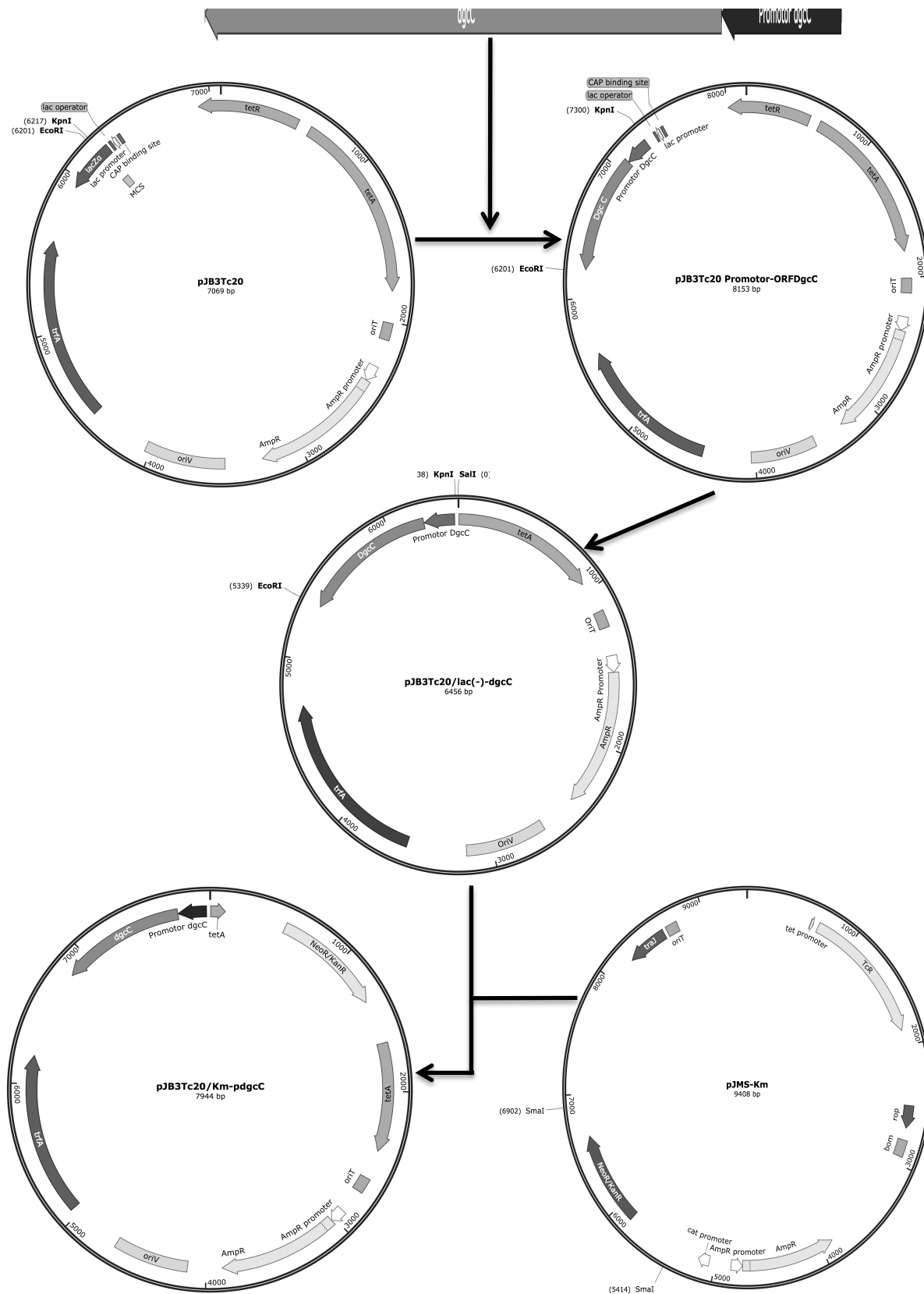


Fig. 20. Modificación del plásmido pJB3Tc20-pdgcC

Partiendo de la construcción pJB3Tc20-dgcC, se procedió a eliminar el promotor *lac* del plásmido empleando la enzima de restricción *SalI*; sin embargo, este corte eliminó de manera total el gen *tetR* y aproximadamente 257 pb correspondientes al gen *tetA*, por lo que el marcador de selección a tetraciclina se anuló. Se decidió clonar el casete de resistencia a Km (proveniente del vector pJMS-Km) a la construcción empleando el sitio de corte *EcoRV*, obteniendo la construcción pJB3Tc20/Km-pdgcC.

Obtenida la construcción pJB3Tc20/Km-*pdgcC*, se procedió a realizar la transformación en *E. coli* DH5 α . Las transformantes se seleccionaron mediante PCR en colonia (resultado no mostrado). Debido a que al realizar el corte con la enzima *EcoRV* se producen fragmentos romos, el casete de Km pudo haber sido insertado en dirección 5'→3' o dirección 3'→5'. En la Fig. 21 se visualizan las posibles direcciones que pudo haber adquirido este casete.

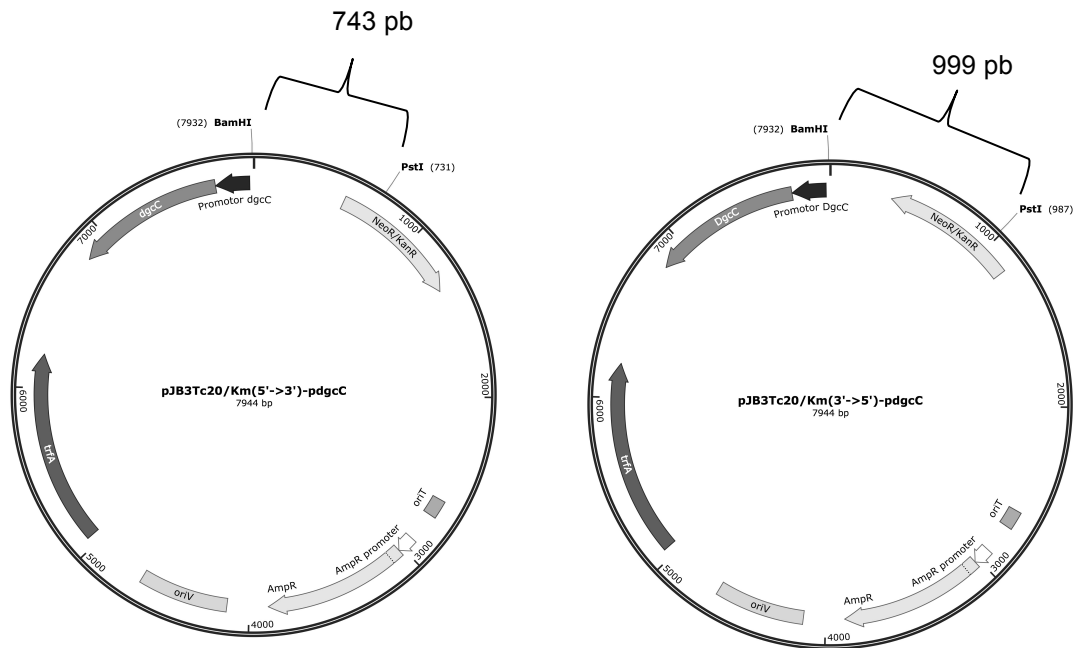


Fig. 21. Posibles direcciones del casete de Km en la construcción pJB3Tc20/Km-*pdgcC*

Debido al corte romo efectuado por la enzima *EcoRV*, se usaron las enzimas *BamHI* y *PstI* para la selección del casete de Km en dirección deseada. Si el casete de Km se encontraba en dirección 5'→3', el corte con *BamHI* y *PstI* arrojaría un fragmento de 743 pb; si por el contrario, el casete se encontraba en dirección 3'→5', el corte con las enzimas arrojaría un fragmento de 999 pb.

Las transformantes fueron sometidas a digestiones empleando las enzimas *PstI* y *BamHI*, para escoger aquellas que poseyeran el casete de Km en dirección 5'→3'; los resultados se presentan en la Fig. 22.

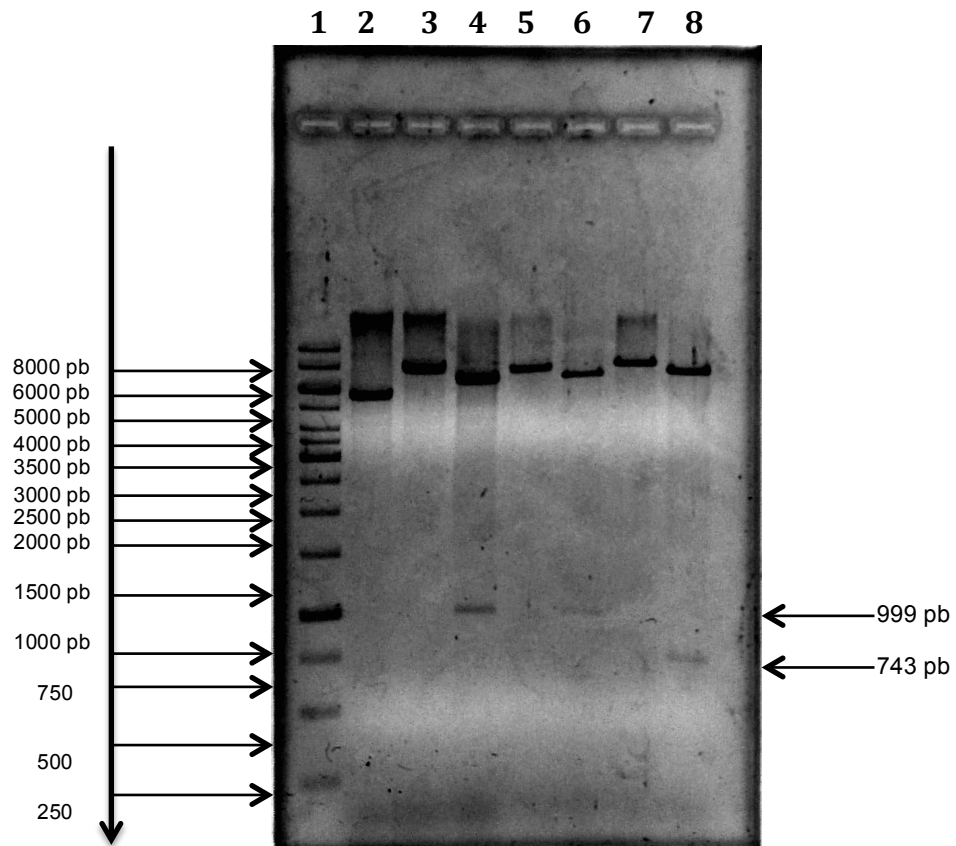


Fig. 22. Selección de clones *E. coli* DH5 α con la construcción pJB3Tc20/Km-pdgcC
 Las transformantes de *E. coli* DH5 α con la construcción pJB3Tc20/Km-pdgcC, fueron sometidas a PCR en colonia (resultados no mostrados). Se seleccionaron dos clones que presentaron amplificado, a las cuales se les realizó extracción plasmídica y restricción con las enzimas *Bam*HI y *Pst*I. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Clona EK1 digerida con *Bam*HI. Carril 3: Clona EK14 digerida con *Bam*HI. Carril 4: Clona EK14 digerida con *Bam*HI y *Pst*I. Carril 5: Clona EK28 digerida con *Bam*HI. Carril 6: Clona EK28 digerida con *Bam*HI y *Pst*I. Carril 7: Clona EK47 digerida con *Bam*HI. Carril 8: Clona EK47 digerida con *Bam*HI y *Pst*I.

Se seleccionó la clona EK47 para realizarle extracción plasmídica y con éste, transformar a *E. coli* S17.1 Las transformantes fueron sometidas a PCR y digestión con enzimas (resultados no mostrados). Corroborada la clona, se procedió a realizar la conjugación con *A. brasilense* Sp245, *A. brasilense* 102-C y las respectivas cepas etiquetadas con la proteína verde fluorescente: *A. brasilense* Sp245 (pMP2444) y *A. brasilense* 102-C (pMP2444). Las transconjugantes fueron sometidas a PCR empleando los oligonucleótidos reversos para el fragmento *pdgcC* y el casete de Km, esperando un amplificado de 1923 pb. Los resultados se muestran en la Fig. 23.

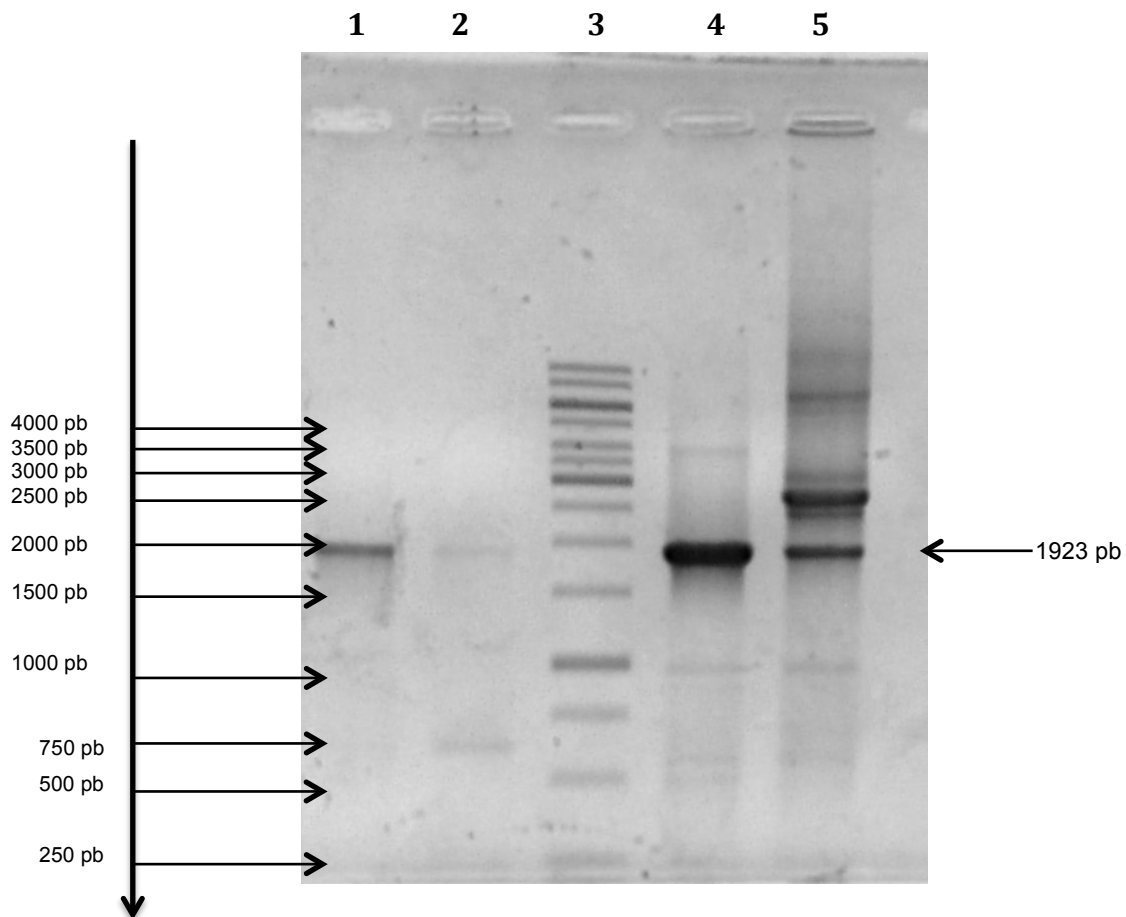


Fig. 23. PCR para amplificar el fragmento *pdgcC*-Km

Posterior a la conjugación entre *E. coli* S17.1 y las distintas cepas de *A. brasilense*, las transconjugantes fueron seleccionadas mediante PCR empleando los oligonucleótidos reversos para *pdgcC* y el casete de Km, esperando un amplificado de 1923 pb. Carril 1: Clona AK-16. Carril 2: Clona AK-19. Carril 3: Marcador de peso molecular. Carril 4: Clona AK-52. Carril 5: Clona AK-33.

7.8. Análisis de fenotipos

7.8.1. Determinación de formación de biopelícula

Obtenidas las cepas a evaluar, el primer ensayo que se realizó fue la formación de biopelícula empleando la técnica descrita en materiales y métodos. Los resultados se presentan en la Fig. 24.

Como se ilustra en la gráfica, la cepa mutante presenta alrededor de un 40% de disminución de biopelícula con respecto a la cepa silvestre. Por otra parte, la cepa complementada no presenta una diferencia estadísticamente significativa cuando es comparada con la cepa mutante. Contrario a lo esperado, la cepa AK-16 (sobre expresión de la proteína DgcC) presentó una disminución en la capacidad de formación de biopelícula con respecto a la cepa silvestre.

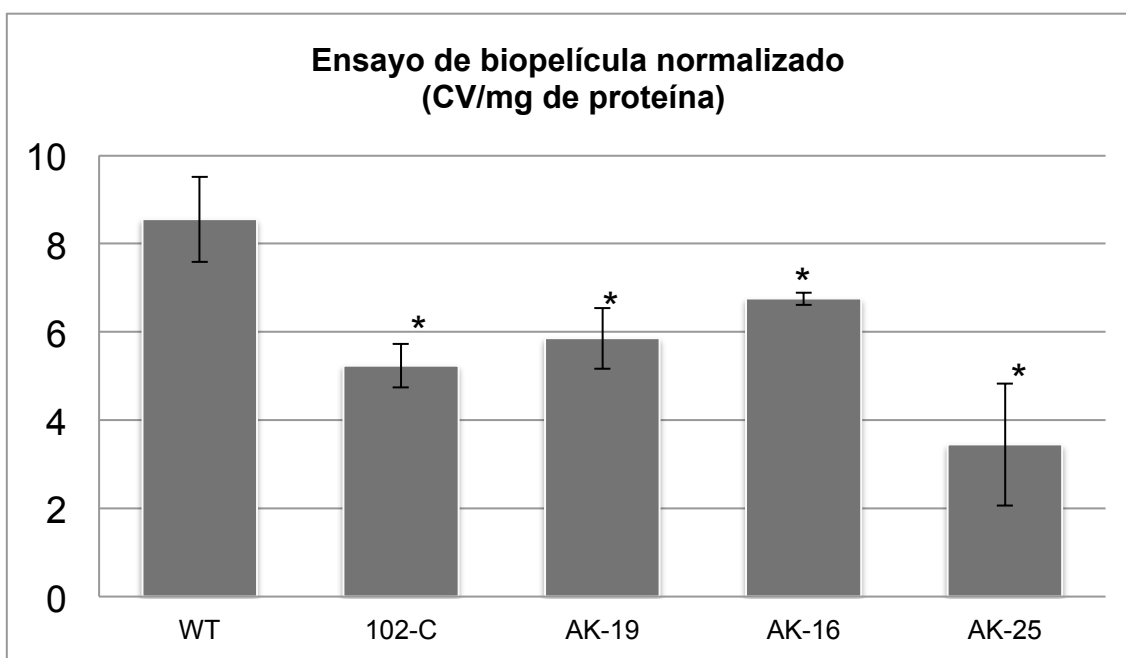


Fig. 24. Ensayo de formación de biopelícula.

Los ensayos de formación de biopelícula fueron llevados a cabo de acuerdo con la técnica descrita en el apartado de materiales y métodos. Las placas fueron incubadas a 30 °C en condiciones estáticas durante 3 días. Los resultados mostrados fueron producto de 3 experimentos independientes. La normalización de la biopelícula se efectuó cuantificando la concentración de proteínas presente en la muestra.*= Presenta diferencia estadística significativa con respecto a la cepa silvestre. WT: *A. brasilense* Sp245; 102-C: *A. brasilense* *dgcC::GusA-Sm^R*; AK-19: *A. brasilense* 102-C (pJB3Tc20/Km-*pdgcC*); AK-16: *A. brasilense* (pJB3Tc20/Km-*pdgcC*); AK-25: *A. brasilense* 102-C (pJB3Tc20/Km).

7.8.2. Determinación de producción de EPS empleando Rojo Congo (RC)

Posteriormente, se analizó si la producción de EPS se encontraba alterada en las cepas obtenidas, para lo cual se empleó el colorante RC, empleado para identificar bacterias del género *Azospirillum* debido a la afinidad que presenta hacia los EPS producidos por éstas. La técnica empleada se encuentra descrita en la sección de Materiales y métodos.

De acuerdo con los resultados (mostrados en la Fig. 25), las cepas evaluadas no mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre ellas.

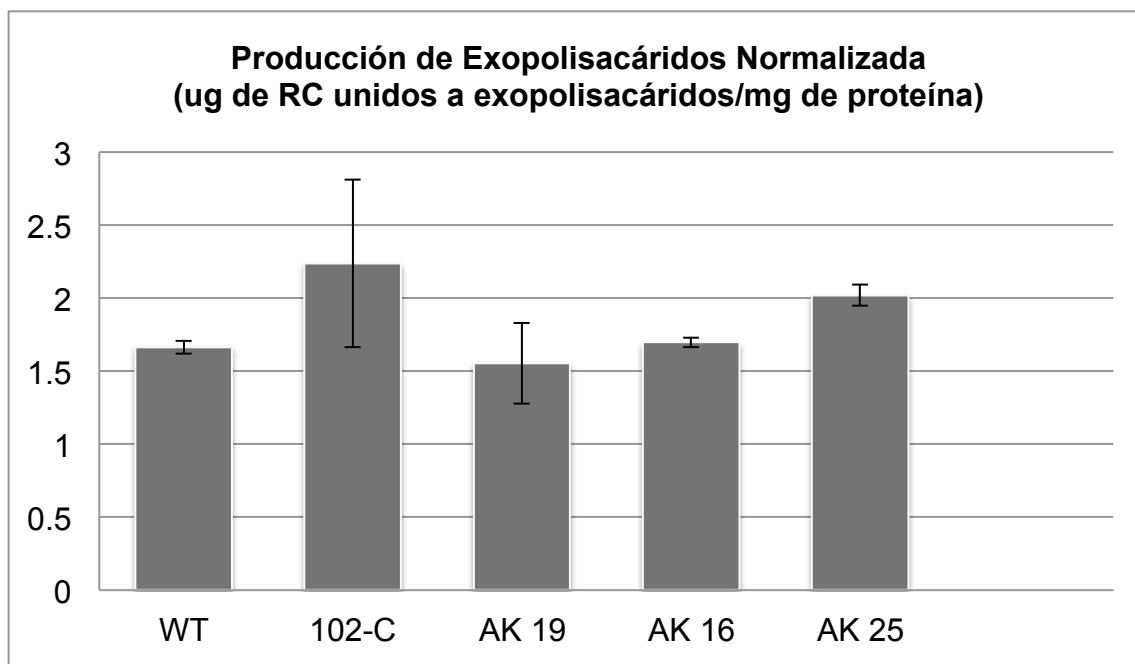


Fig. 25. Ensayo de producción de EPS

Al igual que en el ensayo de producción de biopelícula, los datos obtenidos fueron normalizados determinando la concentración de proteínas mediante el método de Bradford.

Los resultados fueron producto de 3 experimentos independientes. WT: *A. brasilense* Sp245; 102-C: *A. brasilense* *dgcC::GusA-Sm^R*; AK-19: *A. brasilense* 102-C (*pJB3Tc20/Km-pdgcC*); AK-16: *A. brasilense* (*pJB3Tc20/Km-pdgcC*); AK-25: *A. brasilense* 102-C (*pJB3Tc20/Km*).

7.8.3. Estandarización de formación de biopelícula empleando las cepas etiquetadas con la proteína verde fluorescente, calcofluor y microscopía confocal

Con la finalidad de evaluar la presencia de EPS en la biopelícula, se empleó calcofluor, un fluoróforo con afinidad hacia los compuestos que presentan enlaces β -1,3 y/o β -1,4 de acuerdo con la técnica descrita en el apartado anterior.

Se emplearon concentraciones de 0.001%, 0.05% y 0.1% de calcofluor. Para experimentos posteriores se empleó la concentración de 0.05%, debido a que el

calcofluor 0.001% no era suficiente para la tinción de los EPS y la concentración 0.1% favorecía a una alteración estructural de la biopelícula. De igual manera, el calcofluor permitió observar las diferencias morfológicas de los microorganismos embebidos en la biopelícula. Los resultados se presentan en la Fig. 26.

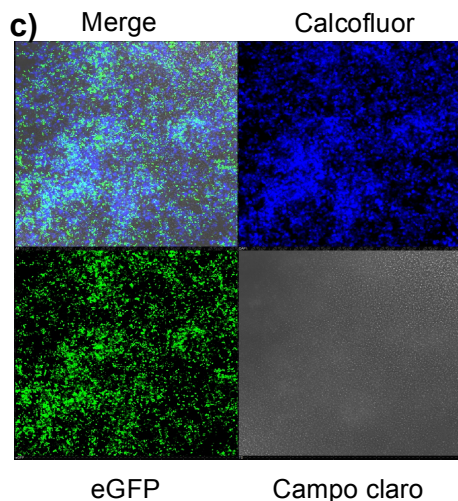
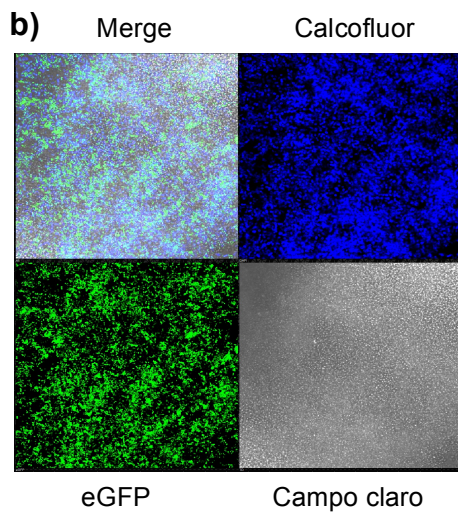
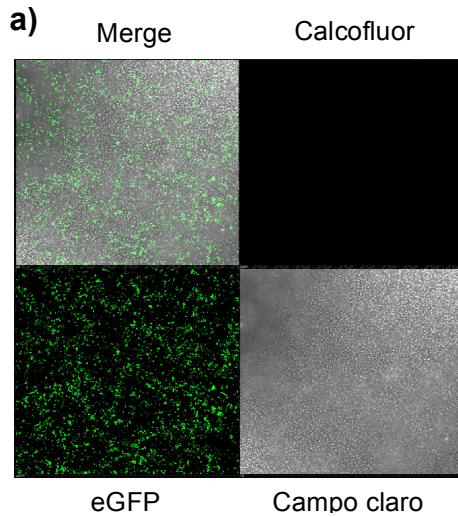
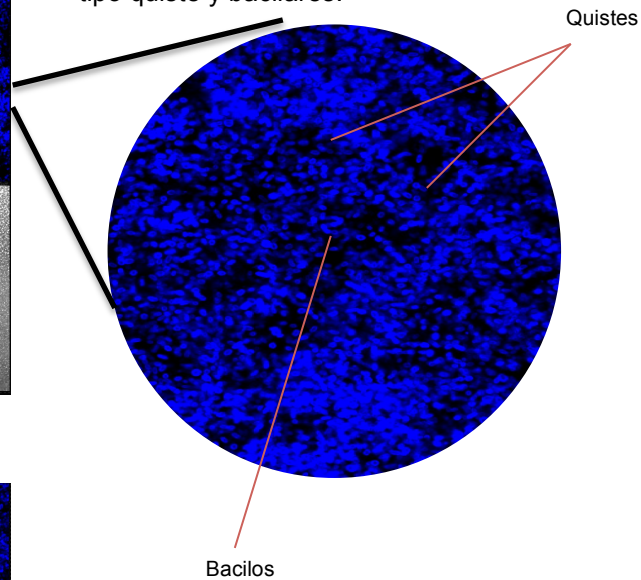


Fig. 26. Estandarización de formación de biopelícula empleando calcofluor y microscopía confocal

Para la estandarización de esta técnica se empleó la cepa *A. brasilense* Sp245 (pMP2444). La visualización de la biopelícula se realizó empleando un objetivo 60X. Los resultados presentados corresponden a un tiempo de incubación de 3 días con las condiciones descritas anteriormente.

- a) Biopelícula añadiendo calcofluor al 0.001%.
- b) Biopelícula añadiendo calcofluor al 0.05%.
- c) Biopelícula añadiendo calcofluor al 0.1%

Por otra parte, el empleo de calcofluor permitió visualizar la presencia de estructuras morfológicas tipo quiste y bacilares.



7.8.4. Formación de biopelícula y visualización de EPS empleando las cepas etiquetadas con la proteína verde fluorescente, calcofluor y microscopía confocal.

De acuerdo con los resultados del experimento anterior, se decidió emplear calcofluor al 0.05% (Fig. 27).

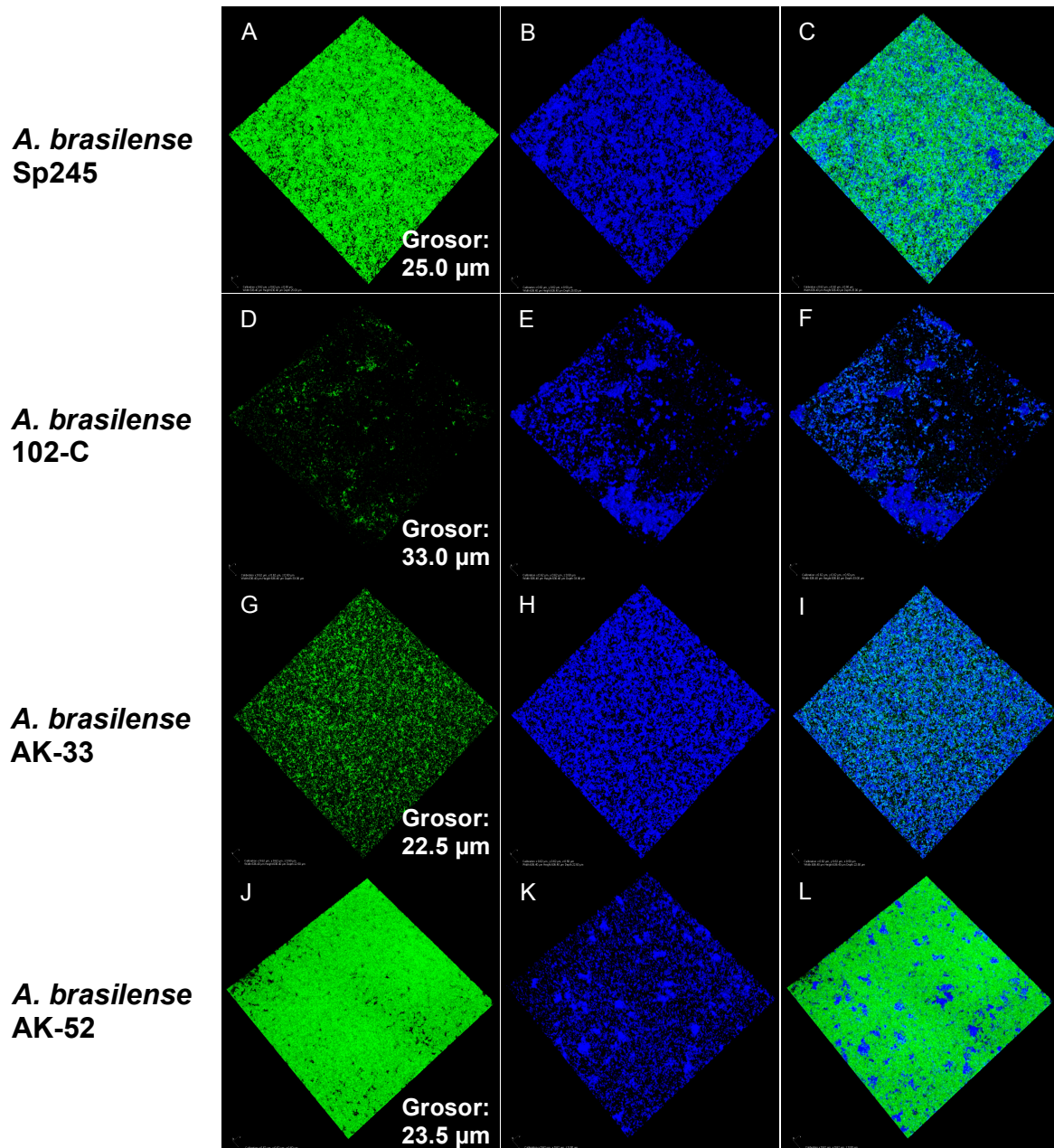


Fig. 27. Biopelícula empleando calcofluor después de 3 días de incubación.
 En la leyenda se describe el grosor o altura de la biopelícula. Las imágenes fueron obtenidas empleando un microscopio confocal Nikon C2+ y un objetivo 20X. *A. brasilense* 102-C: *dgcC::GusA-SmR* (pMP2444); *A. brasilense* AK-33: *A. brasilense* 102-C(pJB3Tc20/Km-*pdgcC*+pMP2444); *A. brasilense* AK-52: *A. brasilense* WT (pJB3Tc20/Km-*pdgcC*+pMP2444).

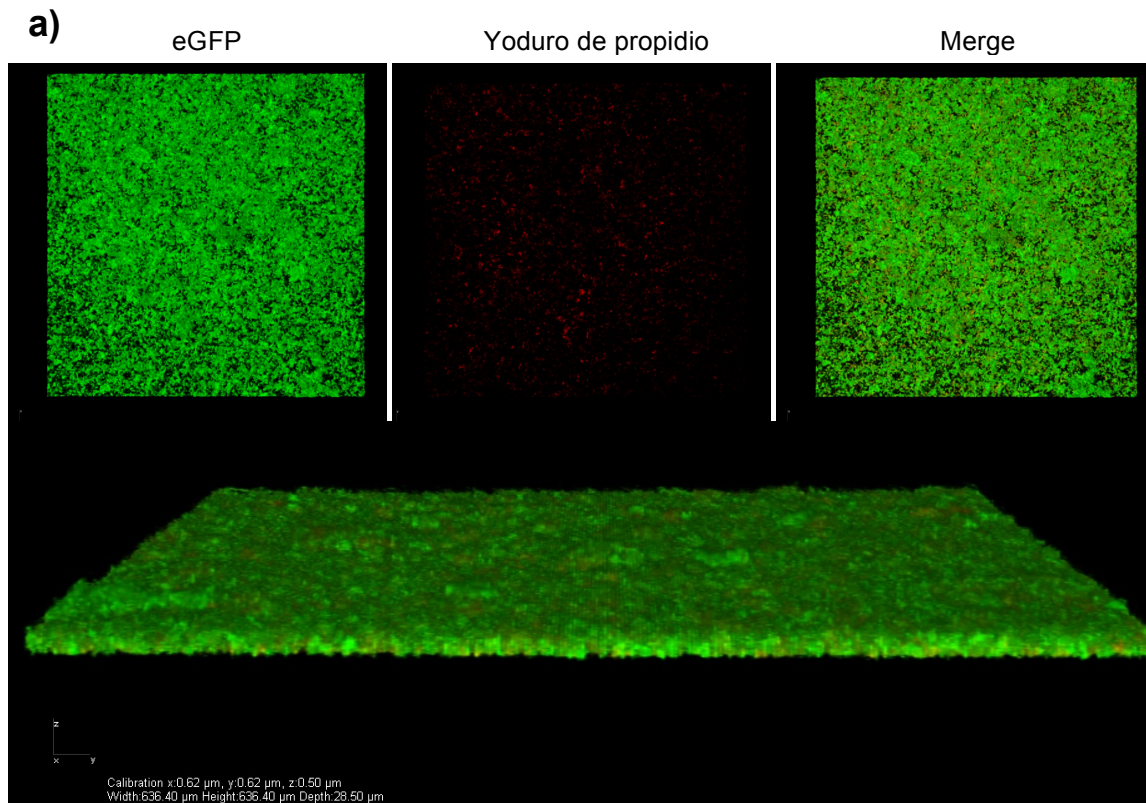
7.8.5. Visualización de ADN extracelular (ADNe) en biopelícula empleando yoduro de propidio

Con la finalidad de evaluar si la mutación del gen *dgcC* o la sobre expresión del mismo representaba una alteración en cuanto a la presencia de ADNe, se empleó

yoduro de propidio [$1\mu\text{M}$] tal como se indica en el apartado de Materiales y métodos.

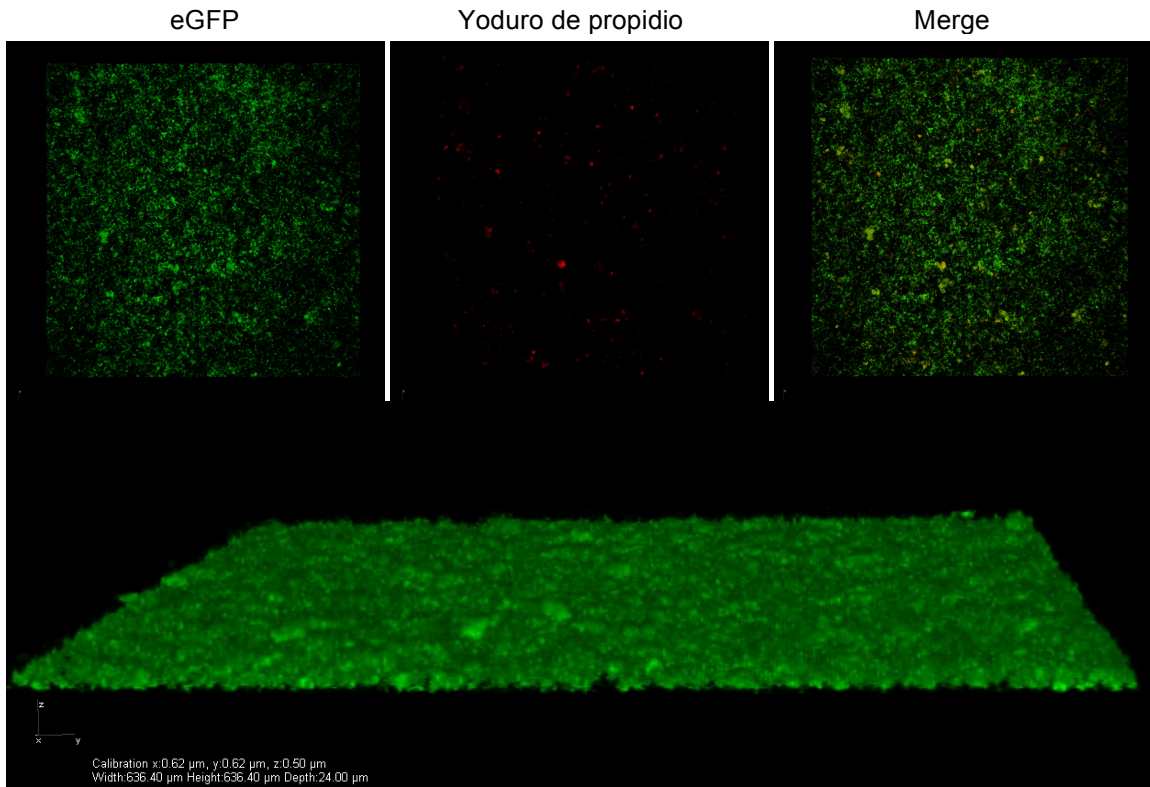
De acuerdo con los resultados anteriores, la cepa *A. brasilense* 102-C presentó una pobre producción de biopelícula, además que ésta poseía un patrón estructural irregular.

Por otra parte, conveniente notar que en la cepa sobre expresada (*A. brasilense* AK-52) se observaron cúmulos de ADN que pudiesen deberse a microcolonias no viables (Fig. 28).

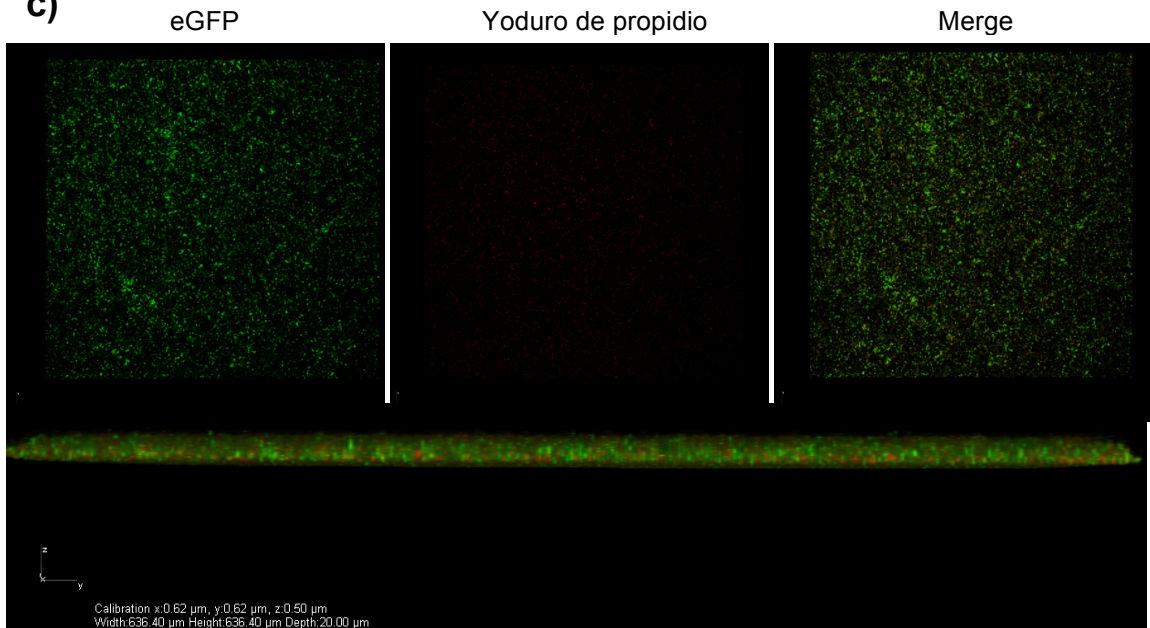


Continuación siguiente página

b)



c)



Continuación siguiente página

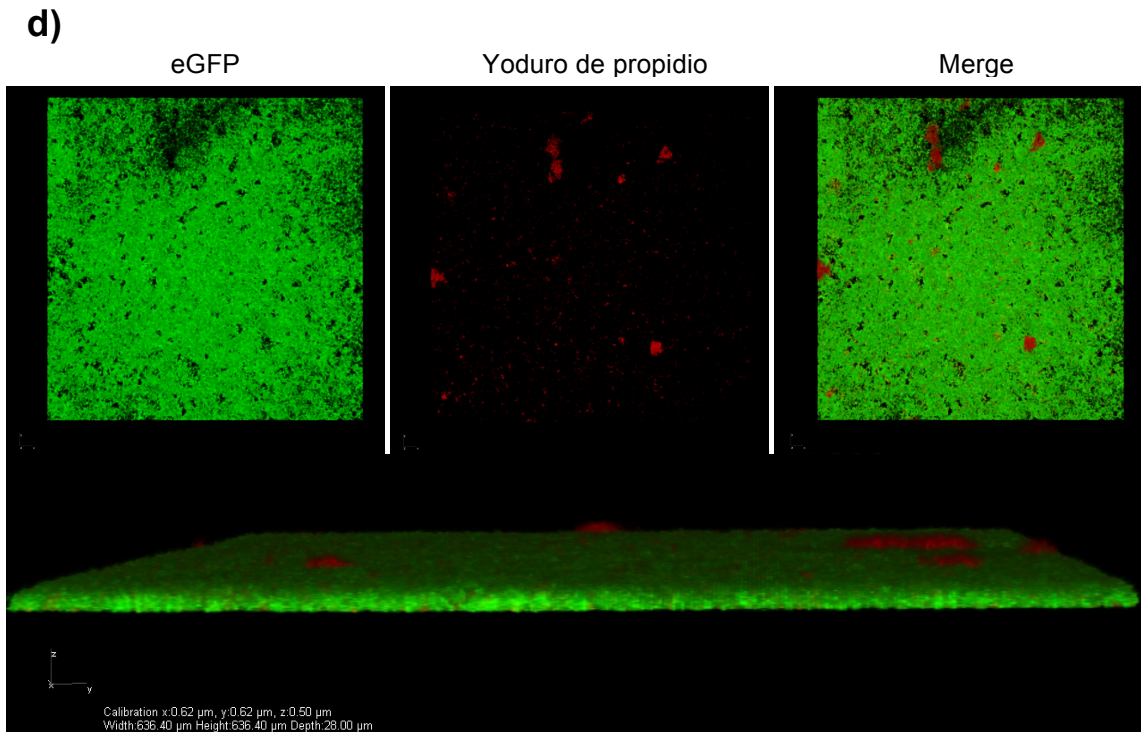


Fig. 28. Visualización de ADN en biopelícula empleando yoduro de propidio

Para la visualización del ADN se empleó yoduro de propidio como se describe en el apartado de Materiales y métodos. Se presentan imágenes correspondientes a la fluorescencia verde (eGFP), roja (yoduro de propidio) y un merge o superposición de éstas. De igual manera, se adjunta una vista lateral de la biopelícula. Las imágenes presentadas fueron representativas de 3 experimentos independientes. En cada experimento se analizaron al menos 3 campos. a) *A. brasilense* Sp245 (pMP2444), b) *A. brasilense* 102-C (pMP2444), c) *A. brasilense* AK-33, d) *A. brasilense* AK-52.

8. Discusión

En este trabajo se construyó un plásmido que porta el gen silvestre *dgcC* para realizar la complementación genética de la mutante *A. brasilense* 102-C (Fernández-Domínguez, 2013), la cual presentó un retraso en el crecimiento, disminución en formación de biopelícula y movilidad de acuerdo con lo reportado por Romero-Pérez (2015).

Este gen (*dgcC*) se encuentra constituido por 885 pb, las cuales codifican para una proteína con una longitud de 294 aminoácidos. Ésta presenta un dominio REC en el extremo N-terminal y un dominio GGDEF en su extremo C-terminal. Este dominio es característico de proteínas con actividad diguanilato ciclasa (Römling *et al.*, 2013,2a).

Las diguanilatos ciclasas, encargadas de sintetizar al di-GMPc, presentan un dominio denominado como GG(D/E)EF, denominado así por la alta conservación de los aminoácidos presentes en su sitio catalítico (Gly-Gly-Asp/Glu-Glu-Phe). Además de éste, también es importante el sitio inhibitorio, representado por una secuencia RXXD (Povolotsky *et al.*, 2012; Römling *et al.*, 2013,2a).

Al alinear la secuencia de aminoácidos de la proteína DgcC con las proteínas PleD de *Caulobacter crescentus* (Aldridge *et al.*, 2003) y WspR de *Pseudomonas aeruginosa* (Malone *et al.*, 2007), ambas DGC ampliamente estudiadas, arrojó que el motivo GGDEF el sitio inhibitorio se encuentran completamente conservados, así como el dominio REC, por lo que, se infiere que la proteína funcionaría como DGC.

Este segundo mensajero, se encuentra involucrado en múltiples funciones dentro de la célula, entre las que destacan el cambio de estilo de vida, virulencia, producción de EPS y otros (Waters *et al.*, 2012; Cooley *et al.*, 2016).

Por consiguiente, la mutación en genes que codifican para enzimas con actividad DGC generan una disminución en los niveles intracelulares de esta molécula, lo que tiene como consecuencia una disminución en la formación de biopelícula, aumento en la movilidad celular y alteraciones en su virulencia (Newell *et al.*, 2011; Banhart *et al.*, 2014; Chaudhuri *et al.*, 2014; Castro *et al.*, 2015).

Sin embargo, la mutación del gen *dgcC* originó una disminución en la formación de biopelícula, resultado esperado de acuerdo con la literatura; al contrario de lo esperado la bacteria presentó una disminución en la movilidad, resultado inesperado a lo presupuesto, debido a que la mutación en una DGC propicia una disminución en los niveles intracelulares del di-GMPc que favorece el aumento en la movilidad celular. Además, esta mutación provocó un retraso en el crecimiento de la cepa *A. brasilense* 102-C. Por tal razón, Romero-Pérez (2015) concluyó que este gen es funcional, pero presentaba un comportamiento no canónico con respecto a lo descrito en la literatura. Por tal razón se decidió realizar una complementación genética empleando el vector pJB3Tc20 y confirmar la actividad del gen anteriormente mencionado.

Para la selección de un vector empleado en *Azospirillum brasilense*, deben considerarse distintos aspectos, entre los que destacan la aplicación a lo que se destinará el vector y el método de transformación empleado. En *Azospirillum* se han descrito vectores estables, de amplio rango de hospedero y suicidas.

Los vectores suicidas se emplean en la generación de mutantes mediante recombinación homóloga, mutación por transposición o intercambios cromosomales, mientras que los vectores estables permiten realizar ensayos de complementación génica, bancas genómicas, analizar la expresión de genes o inclusive como portadores de genes reporteros para estudiar el comportamiento bacteriano (Pereg *et al.*, 2015).

En el trabajo realizado se empleó el plásmido pJB3Tc20 para la complementación genética. Éste, presenta el replicón RK2, el cual ha sido demostrado ser estable en 29 especies de bacterias Gram-negativas (Blatny *et al.*, 1997). Dicho plásmido posee, entre sus características importantes, el promotor *lac* y casetes de resistencia a Tc y Amp en su secuencia.

Al inicio de esta investigación, se decidió clonar el gen *dgcC* y su propio promotor río abajo del promotor *lac* y en el mismo sentido de transcripción; sin embargo, la cepa con esta construcción formaba agregados con mayor rapidez y frecuencia que las cepas mutante y silvestre (resultados no mostrados).

Trabajos recientes llevados a cabo por nuestro grupo, demostraron que el promotor *lac* en *A. brasilense* Sp245 presenta una expresión constitutiva; por tal razón se decidió modificar dicho vector, eliminando tal promotor de su secuencia, obteniendo un vector carente de promotor y con un casete de selección de resistencia a Amp. Debido a que *A. brasilense* el modelo de estudio es resistente natural a este antibiótico, se procedió clonar un casete de resistencia a Km en el plásmido. Esta construcción (pJB3Tc20/Km^R) podrá servir en un futuro para distintos experimentos de complementación génica, debido a su bajo número de copias, al marcador de selección clonado y a su estabilidad en *Azospirillum*.

Por otra parte, la eliminación del casete de resistencia a Tc del vector pJB3Tc20, podría proporcionar mejores resultados al analizar la formación de biopelícula en las cepas que posean este vector, debido a que se ha demostrado que factores como la superficie, la edad del cultivo, temperatura y presencia de ciertos antibióticos disminuyen la capacidad de las bacterias para formar biopelícula.

Se ha demostrado que las bacterias presentan una mejor adhesión a superficies hidrofóbicas, como el poliestireno o polivinilo, en comparación con superficies hidrofílicas como el vidrio.

De igual manera se demostró que la presencia de Tc en el medio tuvo como consecuencia una marcada disminución de la adhesión celular a la superficie en la que se encontraba (Dufrêne *et al.*, 1996)

La mutación del gen *dgcC* llevada a cabo por Fernández-Domínguez en el 2013 pudo haber originado una mutación polar. Esta mutación se realizó mediante la

inserción del gen reportero de la glucuronidasa y un casete de resistencia a Sm. Empleando el promotor del gen en evaluación, la expresión del reportero se visualizó en la fase estacionaria del cultivo bacteriano. Por tal razón, se concluyó que el promotor era funcional y, cuantificando la actividad enzimática del reportero, podríamos referir a que es un promotor fuerte. No obstante estudios más detallados deberán confirmar esta sugerencia.

Los datos obtenidos en relación a la complementación no fueron los esperados. En efecto al analizar la cepa complementada, ésta no presentó una diferencia significativa respecto a la mutante y, por consiguiente, tampoco presentó una restauración del fenotipo al ser comparada con la cepa silvestre. Este comportamiento pudiera explicarse por el contexto genético donde se realizó la complementación.

Por otra parte, el casete de resistencia a Sm fue insertado en dirección 5'→3', la cual es la dirección de la transcripción del gen *dgcC*. Esto pudo haber ocasionado una sobre expresión del gen río abajo al gen *dgcC*.

De igual manera el estudio realizado con el etiquetado de las cepas obtenidas permitió visualizar la estructura de la biopelícula, observando una alteración en las cepas mutante, complementada y sobre expresada en la producción de EPS, que sugiere la modificación de la estructura tridimensional de la biopelícula, apoyando los datos obtenidos en la cuantificación de la biopelícula Figuras 24, 25 y 27. Es tentador especular que la DgcC a través de la producción de di-GMPc podría participar en la regulación de la expresión de los genes que codifican para la producción de los EPS.

Si el gen 6449869 forma parte de un operón regido por el promotor del gen *dgcC* o si al realizar la mutación de éste se generó una mutación polar, la transcripción del gen codificante para la proteína con dominio Nudix pudo verse disminuida o inhibida.

El gen río abajo a *dgcC*, AZOBR_100205 o con número 6449869, se encuentra constituido por 552 pb. Este gen codifica para una proteína putativa, la cual presenta un dominio Nudix. La familia Nudix, constituye un grupo de enzimas de actividad hidrolasa presentes en organismos eucariotes, procariotes y arqueas. Éstas catalizan la degradación de nucleósidos difosfato unidos a un motivo (X) a nucleósidos monofosfato y fosfato unido a (X) (Ismail *et al.*, 2003). Presentan un motivo característico constituido por 23 residuos aminoacídicos, GX₅EX₇REUXEEXGU (donde U corresponde a un residuo hidrofóbico, mientras que X a cualquier aminoácido) denominado como caja Nudix (McLennan 2006; Rodionov *et al.*, 2008; Ogawa *et al.*, 2008). Entre los sustratos de estas enzimas se encuentran coenzimas, dNTPs, NTPs, NAD, NADP, NADH, ADP-ribosa y otros compuestos (Ooga 2009; Sang *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2016). Debido a la amplia variedad de sustratos que presentan estas enzimas, han sido denominadas como “housecleaning”, ya que presentan la capacidad de degradar moléculas que en

altas cantidades pudieran ser perjudiciales para el desarrollo del organismo, manteniendo así la homeostasis celular (Dong *et al.*, 2016).

Un estudio reciente, se identificó el gen *nudC* que codifica para una hidrolasa de la familia Nudix, presente en el patógeno de humanos *Pseudomonas aeruginosa* y su contraparte en el patógeno vegetal *P. syringae*. La mutación de este gen en *P. syringae* causó en ésta un retraso en el crecimiento, una baja producción de biopelícula así como también una disminución en la movilidad bacteriana. Por otra parte, la expresión y purificación de esta proteína demostró que presenta afinidad hacia el NADH (Modzelan *et al.*, 2014).

Los fenotipos observados en la cepa de *P. syringae* mutante de *nudC* son similares a los presentados por la cepa de *A. brasilense* 102-C (*dgcC::GusA-SmR*), por lo cual podríamos inferir que el gen 6449869 que codifica para una proteína con dominio Nudix y que se encuentra río abajo del gen *dgcC*, podría el causante de los fenotipos observados en la mutante anteriormente mencionada.

Tal como se describió anteriormente en *P. aeruginosa* y *P. syringae* (Modzelan *et al.*, 2014), esta hidrolasa pudiese estar implicada en la degradación de alguna molécula difosfatada implicada en la regulación bioquímica de la bacteria, razón por la cual las cepas mutantes y complementadas presentan comportamientos similares.

Por otra parte, se podría hipotetizar que la inserción del casete de Km provocó una sobre expresión del gen 6449869, el cual pudiera estar involucrado en la degradación del di-GMPc (Ver Fig. 9). De acuerdo con los resultados de la biopelícula, en las cepas mutante y complementada los niveles de este segundo mensajero pudieran estar disminuidos, observando el comportamiento descrito. Experimentos futuros deben ser enfocados en determinar si la disminución de la movilidad en la cepa complementada permanece o el comportamiento es parecido al presentado por la cepa silvestre.

Por otra parte, será necesario analizar si la expresión del gen 6449869 se encuentra alterada, dando la pauta para realizar una complementación dual.

Finalmente, sería relevante establecer la función efectuada por el gen 6449869 codificante para la hidrolasa Nudix. La función de éste tipo de enzimas ha sido descrita en modelos bacterianos como *E. coli*, *P. aeruginosa* o *Mycobacterium*, o en organismos eucariotes como *A. thaliana* (Muñoz *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2009; Moreland *et al.*, 2013; Modzelan *et al.*, 2014)

No existen reportes de éstas en *A. brasilense*, por lo cual sería necesario realizar la mutación del gen y/o expresión de la proteína y analizar los sustratos hacia los que presenta afinidad.

9. Conclusiones

- Los experimentos de formación de biopelícula y producción de EPS demostraron que no existe una restauración fenotípica en la cepa complementada con respecto a la cepa de *A. brasilense* Sp245.
- Se logró estandarizar una técnica para visualizar la presencia de EPS en biopelícula empleando calcofluor y microscopía confocal.
- De igual manera, se estableció un protocolo efectivo para visualizar la presencia de ADNe en las biopelículas empleando yoduro de propidio.

10. Perspectivas

- Con los resultados obtenidos, acompañados del análisis *in silico*, se podría hipotetizar que el gen río abajo a *dgcC*, denominado *nudD* y con número de acceso 6449869, se encuentra involucrado en los fenotipos observados.
- Este gen, *nudD*, codifica para una proteína que presenta un dominio Nudix, el cual se ha descrito que posee la capacidad de degradar nucleósidos di- y trifosfatos, por lo que podría estar involucrado en el metabolismo del di-GMPc.
- Analizar si los genes 6449869 (dominio Nudix) y 6449870 (*DgcC*) forman parte de un operón mediante una RT-PCR o Northern Blot.
- Evaluar si la mutación por inserción inhibió o alteró la tasa de transcripción del gen 6449869.
- Realizar una mutación por delección del gen 6449869 para posteriormente realizar la complementación del mismo.
- Con la finalidad de alterar en menor medida el contexto genético en el que se encuentra el gen *dgcC*, se podría efectuar una mutación por delección del mismo empleando un plásmido suicida. Posterior a la delección se podría realizar la complementación del mismo y analizar los fenotipos resultantes.
- Llevar a cabo una doble mutante de los genes anteriormente mencionados y realizar la respectiva complementación.
- Cuantificar los niveles intracelulares de las cepas mutante *dgcC*, complementada *dgcC* y demás cepas resultantes de las propuestas anteriores.

11. Referencias bibliográficas

1. Ahmad I, Cimdins A, Beske T, Römling U. 2017. Detailed analysis of c-di-GMP mediated regulation of *csgD* expression in *Salmonella typhimurium*. BMC Microbiol. 17(27): 1-12.
2. Aldridge P, Paul R, Goymer P, Rainey P, Jenal U. 2003. Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. Mol. Microbiol. 47(6): 1695-1708.
3. Arruebarrena A, Pereyra C, Moreno L, Xiqui M, Baca B, Pereyra M *et al.* 2012. Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol. Lett. 1-9.
4. Baldani V, Baldani J, Döbereiner J. 1987. Inoculation of field-growth wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. Biol. Fertil. Soils. 4: 37-40.
5. Bais H, Weir T, Perry L, Gilroy S, Vivanco J. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annu. Rev. Plant Biol. 57: 233-266.
6. Barnhart D, Su S, Farrand S. 2014. A signaling pathway involving the diguanylate cyclase CelR and the response regulator DivK controls cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 196: 1257-1274.
7. Bashan Y, de-Bashan LE. 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment. Adv Agron. 108: 77–136.
8. Bessman M, Frick D, O’Handley F. 1996. The MutT proteins or “Nudix” hydrolases family of versatile, widely distributed, “housecleaning” enzymes. J. Biol. Chem. 271: 25059-25062.
9. Bible A, Stephens B, Ortega D, Xie Z, Alexandre G. 2008. Function of a chemotaxis-like signal transduction pathway in modulating motility, cell clumping, and cell length in the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. 190: 6365-6375.
10. Bible A, Russel M, Alexandre G. 2012. The *Azospirillum brasilense* Che1 chemotaxis pathway controls swimming velocity, which affects transient cell-to-cell clumping. J. Bacteriol. 194(13): 3343-3355.
11. Blatny J, Brautaset T, Winther-Larsen H, Haugan K, Valla S. 1997. Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. Appl. Environ. Microbiol. 63(2): 370-379.
12. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
13. Camilli A, Bassler BL. 2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. Science 311:1113–1116. Castro M, Deane S, Ruiz L, Rawlings D, Guillani N. 2015. Diguanylate cyclase null mutants reveals that c-di-GMP pathway regulates the motility and adherence of extremophile bacterium *Acidithiobacillus caldus*. PLoS ONE. 10(2): 1-22.
14. Cavaglieri L, Orlando J, Etcheverry M. 2009. Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. Microbiol. Res. 164: 391-399.
15. Chaudhuri S, Pratap S, Paromov V, Li Z, Mantri C, Xie H. 2014. Identification of a diguanylate cyclase and its role in *Porphyromonas gingivalis* virulence. Inf. Immun. 82: 2728-2735.
16. Conner *et al.* 2017. The ins and outs of cyclic di-GMP signaling in *Vibrio cholera*. Curr Opin Microbiol. 36: 20-29.
17. Dakora F, Phillips D. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environment. Plant and Soil. 245: 35-47.
18. Danhorn T, Fuqua C. 2007. Biofilm formation by plant-associated bacteria. Annu. Rev. Biol. 61: 401-422.
19. De N, Pirruccello M, Krasteva P, Bae N, Raghavan R, Sondermann H. 2008. Phosphorylation-independent regulation of the diguanylate cyclase WspR. PLoS Biol. 6: 0601-0617.
20. Del Gallo M, Negi M, Neyra C. 1989. Calcofluor- and lectin-binding exocellular polysaccharides of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. J. Bacteriol. 171: 3504-3510.
21. Dong S, Wang Y. 2016. Nudix effectors: A common weapon in the arsenal of plant pathogens. PLoS Pathogens. 12(8): 35-43.

22. Dufrêne Y, Vermeiren H, Vanderleyden J, Rouxhet P. 1996. Direct evidence for the involvement of extracellular proteins in the adhesion of *Azospirillum brasilense*. *Microbiol.* 142: 855-865.
23. Edwards A, Siuti P, Bible A, Alexandre G, Retterer S, Doktycz M *et al.* 2011. Characterization of cell surface and extracellular matrix remodeling *Azospirillum brasilense* chemotaxis-like 1 signal transduction pathway mutants by atomic force microscopy. *FEMS Microbiol. Lett.* 314: 131-139.
24. Flemming HC, Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev.* 8: 623-633.
25. Fernández –Domínguez IJ. 2013. Identificación de genes que codifican proteínas con dominios GG[DE][EE]F, de *A. brasilense*. Tesis de Licenciatura BUAP.
26. Gottel N, Castro H, Kerley M, Yang Z, Pelletier D, Podar M *et al.* 2011. Distinct microbial communities within the endosphere and rhizosphere of *Populus deltoides* roots across contrasting soil types. *App. Environ. Microbiol.* 77: 5934-5944.
27. Grantcharova N, Peters V, Monteiro C, Zakikhany K, Römling U. 2010. Bi-stable expression of CsgD in biofilm development of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Bacteriol.* 192(2): 456-466.
28. Hengge R, Gründling A, Jenal U., Ryan R, and Fitnat Yildiz F. 2016. Bacterial signal transduction by cyclic di-GMP and other nucleotide second messengers. *J. Bacteriol.* 198: 15-26.
29. Hunter P, Teakle G, Bending G. 2014. Root traits and microbial community interactions in relation to phosphorous availability and acquisition, with particular reference to *Brassica*. *Front. Plant Sci.* 5: 1-18.
30. Ismail T, Hart A, McLennan A. 2003. Regulation of dinucleoside polyphosphate pools by YgdP and ApaH hydrolases is essential for the ability of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to invade cultured mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 278: 32602-32607.
31. Jenal U. 2013. Think globally, act locally: How bacteria integrate local decisions with their global cellular program. *EMBO J.* 32: 1972-1974.
32. Jijón-Moreno S, Marcos-Jiménez C, Pedraza R, Ramírez-Mata A, García I, Fernández-Scavino A *et al.* 2015. The *ipdC*, *hisC1* and *hisC2* genes involved in indole-3-acetic production used as alternative phylogenetic markers in *Azospirillum brasilense*. *Antonie van Leeuwenhoek.*
33. Kagami M, Amano Y, Ishii N. 2012. Community structure of planktonic fungi and the impact of parasitic chytrids on phytoplanktonic in lake Inba, Japan. *Microb. Ecol.* 63: 358-368.
34. Kloepper J, Zablutowicz R, Tipping E, Lifshitz R. (1991) Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. *PLSO.* 315-326.
35. Klucar L, Stano M, Hajduk M. 2010. phiSITE: Database of gene regulation in bacteriophages. *Nucleic Acids Res.* 38: D366-D370.
36. Krasteva P, Giglio K, Sondermann H. 2012. Sensing the messenger: The diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP. *Prot. Sci.* 21: 929-948.
37. Lawrence J, Swerhone G, Kuhlicke U, Neu T. 2007. In situ evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies. *Can. J. Microbiol.* 53: 450-458.
38. Lin J, Hu Y, Tian B, Hua Y. 2009. Evolution of double MutT/Nudix domain-containing proteins: similar domain architectures from independent gene duplication-fusion events. *J. Gen. Genom.* 36: 603-610.
39. Long P, Dunlap W, Battershill C, Jaspars M. 2005. Shotgun cloning and heterologous expression of the patellamide gene cluster as a strategy to achieving sustained metabolite production. *Chembiochem.* 6: 1760-1765.
40. Lugtenberg B, Kamilova F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Biol.* 63: 541-556.
41. Lynch J, de Leij F. 2012. Rhizosphere. eLS. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000403.pub2. John Wiley & Sons, Ltd.
42. McCarter LL, Gomelsky M. 2015. Fifty ways to inhibit motility via cyclic di-GMP: the emerging *Pseudomonas aeruginosa* swarming story. *J. Bacteriol.* 197: 406-409.
43. Malone JG, Williams R, Christen M, Jenal U, Spiers AJ, Rainey PB. 2007. The structure-function of WspR, a *Pseudomonas fluorescens* response regulator with a GGDEF output domain. *Microbiology.* 153: 980-994.

44. Martínez LC, Vadyvaloo V. 2014. Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4:38
45. Matilla M, Espinosa-Urgel M, Rodríguez-Herva J, Ramos J, Ramos-González M. 2007. Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Biology.* 8:R179.
46. McDougald D, Rice S, Barraud N, Steinberg P, Kjellberg S. 2012. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat. Rev.* 10: 39-50.
47. McLennan A. 2006. The nudix hydrolase superfamily. *Cell Mol. Life Sci.* 63: 123-143.
48. McNear D. 2013. The rhizosphere - Roots, soil and everything in between. *Nat. Educ. Know.* 4(3): 1.
49. Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM. 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 37: 634-663.
50. Modzelan M, Kujawa M, Glabski K, Jagura-Burdzy G, Kraszewska E. 2014. NudC nudix hydrolase from *Pseudomonas syringae*, but not its counterpart from *Pseudomonas aeruginosa*, is a novel regulator of intracellular redox balance required for growth, motility and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 93: 867-882.
51. Moreland N, Charlier C, Dingley A, Baker E, Lott S. 2009. Making sense of a missense mutation: characterization of MutT2, a nudix hydrolase from *Mycobacterium tuberculosis*, and the G58R mutant encoded in W-Beijing strains of *M. tuberculosis*. *Biochem.* 48: 699-708.
52. Muñoz F, Baroja-Fernández E, Morán-Zarzano M, Alonso-Casajús N, Pozueta-Romero J. 2006. Cloning, expression and characterization of a Nudix that catalyzes the hydrolytic breakdown of ADP-glucose linked to starch biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 47(7): 926-934.
53. Münch R, Hiller K, Grote A, Scheer M, Klein J, Schobert M *et al.* 2005. Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics.* 21: 4187-4189.
54. Mwajita MR, Murage H, Tani A, Kahangi E. 2013. Evaluation of rhizosphere, rhizoplane and phyllosphere bacteria and fungi from rice in Kenya for plant growth promoters. *SpringerPlus.* 2: 606-613.
55. Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini M, Landi L, Pietrameralla G, Renella G *et al.* 2007. Microbial diversity and microbial activity in the rhizosphere. *Ci Suelo.* 25(1): 89-97.
56. Newell P, Yoshioka S, Hvorecny K, Monds R, O'Toole G. 2011. Systematic analysis of diguanylate cyclases that promote biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *J. Bacteriol.* 193: 4685-4698.
57. Newton A, Bootman M, Scott J. 2016. Second messengers. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1-14.
58. Nihorimbere V, Ongena M, Smargiassi M, Thonart P. 2011. Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15: 327-337.
59. O'Toole G, Kaplan H, Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 49-79.
60. Ooga T, Ohashi Y, Kuramitsu S, Koyama Y, Tomita M, Soga T *et al.* 2009. Degradation of ppGpp by nudix pyrophosphatase modulates the transition of growth phase in the bacterium *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* 84: 15549-15556.
61. Ogawa T, Yoshimura K, Miyake H, Ishikawa K, Ito D, Tanabe N, Shigeoka S. 2008. Molecular characterization of organelle-type Nudix hydrolases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 148: 1412-1424.
62. Pereg L, McMillan M. 2015. Molecular tools to study in *Azospirillum* sp. and other related plant growth promoting rhizobacteria. En Cassán F, Okon Y, Creus C. *Handbook for Azospirillum* (pp 65-82).
63. Pesavento C, Hengge R. 2010. c-di-GMP signaling. *Bacter. Sign.* 377-394.
64. Povololotsky T, Hengge R. 2012. "Life-style" control networks in *Escherichia coli*: Signaling by the second Messenger c-di-GMP. *J. Biotechnol.* 160: 10-16.

65. Paul K, Nieto V, Carlquist WC, Blair DF, Harshey RM. 2010. The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a “backstop brake” mechanism. *Mol Cell*.38: 128–139.
66. Qaisar U, Luo L, Haley C, Brady S, Carty N, Colmer-Hamood J, Hamood A. 2013. The *pvc* operon regulates the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial chaperone/usher pathway (*Cup*) genes. *PLoS One*. 8(4): 1-13.
67. Raaijmakers JM, Paulitz T, Steinberg C, Alabouvette C, Moënné-Loccoz Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil*. 321: 341-361.
68. Ramey B, Koutsoudis M, von Bodman S, Fuqua C. 2004. Biofilm formation in plant-microbe associations. *Curr. Opin Microbiol*. 7: 602-609.
69. Ramírez-Mata A, Fernández-Domínguez IJ, Nuñez-Reza KJ, Xiqui-Vázquez ML, Baca BE. 2014. Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: quorum-sensing, di-GMPc y óxido nítrico. 46(3): 242-255.
70. Ramírez-Mata A, López-Lara LI, Xiqui-Vázquez ML, Jijón-Moreno S, Romero-Osorio A, Baca B. 2016. The cyclic-di-GMP-diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense*. *Research Microbiol*. 167: 190-201.
71. Reis V, dos Santos K, Pedraza R. 2011. What is expected from the genus *Azospirillum* as Plant Growth-Promoting Bacteria? *Bacteria in agrobiología: Plant growth responses*.
72. Rodionov D, De Ingeniis J, Mancini C, Cimadamore F, Zhang H, Osterman A *et al.*2008. Transcriptional regulation of NAD metabolism in bacteria: NrtR family of Nudix-related regulators. *Nucleic Acids Res*. 36: 2047-2059.
73. Romero Pérez A. 2015. Análisis fenotípico de las mutantes de genes que codifican para proteínas diguanilato ciclasas de *Azospirillum brasilense*. Tesis de Licenciatura BUAP.
74. Römling U. 2013, 1a. Bacterial communities as capitalist economies. *Nature*.
75. Römling U, Galperin M, Gomelsky M. 2013, 2a. Cyclic-di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 77(1): 1-52.
76. Saharan B, Nehra V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. *Life Sciences*.
77. Salcedo F, Pereyra C, Arruebarrena A, Lamtina L, Creus C. 2015. Methods for studying biofilms in *Azospirillum* and others PGPRs. En Cassán F, Okon Y, Creus C. *Handbook for Azospirillum* (pp 199-230).
78. Sambrook E, Fritsch F, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
79. Schuster JJ, Markx GH. 2014. Biofilm Architecture. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2014. 146: 77–96. DOI: 10.1007/10, 248 Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013.
80. Simon R, Priefer U, Pühler A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Biotechnology*. 1: 784-790.
81. Solovyev V, Salamov A. 2011. Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. *Metagenomics*. 61-78.
82. Stano M, Klucar L. 2011. phiGENOME: An integrative navigation throughout bacteriophage genomes. *Genomics*. 98(5): 376-380.
83. Steenhoudt O, Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev*. 24: 487-506.
84. Ulrich L, Zhulin I. 2010. The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucleic Acids Research*. 38: D401-D407.
85. Vilain S, Pretorius JM, Theron J & Brözel S. 2009. DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. *Appl Environ Microbiol* 75: 2861–2868.
86. Vlamakis H, Chai Y, Beaugard P, Losick R, Kolter R. 2013. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol*. 11: 157–168
87. Wagner M, Ivleva N, Haisch C, Niessner R, Horn H. 2009. Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): Investigations on EPS-matrix. *Water Research*. 64: 63-76.

88. Waters C. 2012. The meteoric rise of the signaling molecule cyclic di-GMP. *Microbe Wash DC*. 7: 353-359.
89. Whipps J. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52: 487-511.
90. Whitchurch C. B., Tolker-Nielsen T., Ragas P. C., Mattick J. S. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295 1487 10.1126/science.295.5559.1487
91. Whiteley C, Leed D. 2015. Bacterial diguanylate cyclases: Structure, function, and mechanism in exopolysaccharide development. *Biotechnol. Adv.* 33: 124-141.

12. Anexos

Medio LB Modificado

Componente	Volumen
	100 ml
Peptona de caseína	1.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
NaCl	0.5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.0367 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.0616 g
Agar bacteriológico	1.5 g
pH 7.0 con NaOH [1 N]	

Medio SOC

Componente	Volumen
	100 ml
Peptona de caseína	2.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
NaCl	0.058 g
KCl	0.0186 g
MgCl ₂	0.095 g
Glucosa	0.36 g
pH 7.0 con NaOH [1 N]	

Medio K-Malato

Componente	Volumen
	100 ml
KH ₂ PO ₄	0.087 g
K ₂ HPO ₄	0.167 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02 g
NaCl	0.01 g
Ácido málico	0.5 g
CaCl ₂ [2%]	0.1 ml
FeCl ₃ [1%]	0.1 ml
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O [0.2%]	0.1 ml
NH ₄ Cl [20%]	0.5 ml
Sol. Oligoelementos	0.1 ml
pH 6.8 con KOH [10%]	

Medio Rojo Congo

Componente	Volumen
	100 ml
K ₂ HPO ₄	0.05 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02 g
NaCl	0.01 g
Extracto de levadura	0.05 g
Ácido málico	0.5 g
FeCl ₃ [1%]	0.14 ml
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O [0.1%]	0.2 ml
Rojo Congo [0.25%]	1.5 ml
Agar bacteriológico	1.5 g
pH 6.8 con KOH [10%]	

Medio Nfb

Componente	Volumen
	100 ml
K ₂ HPO ₄ [10%]	0.5 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O [10%]	0.2 ml
NaCl [10%]	0.1 ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O [1%]	0.2 ml
Fe.EDTA [1.64%]	0.4 ml
KNO ₃	0.139 g
Ácido málico	0.37 g
Solución de micronutrientes	0.2 ml
pH 6.5 con KOH [10%]	