



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA



LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

EJE TERMINAL: MICROBIOLOGÍA

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS**

**ANÁLISIS FENOTÍPICO DE GENES QUE CODIFICAN PARA
PROTEÍNAS DIGUANILATO CICLASAS DE *Azospirillum*
brasilense.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN BIOMEDICINA

PRESENTA:

ARACELI ROMERO PÉREZ

ASESOR DE TESIS:

D.C. BEATRIZ EUGENIA BACA

“La ciencia es más que un simple conjunto de conocimientos: es una manera de pensar”

Carl Sagan

Agradecimientos

Al laboratorio de Interacción Bacteria-Planta del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por las facilidades brindadas para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Beatríz Eugenia Baca por su dirección para la realización de este trabajo, así como también sus enseñanzas, compromiso, regaños y paciencia en mi formación académica.

Al Dr. Alberto Ramírez Mata por el enriquecimiento con sus críticas y sugerencias a este trabajo.

A la química María Luisa Xiqui por su apoyo durante mi estancia, consejos y amistad brindada.

Al maestro Joaquín Aguilar Piedras por su apoyo, disposición, paciencia y comprensión.

A mi mamá María de los Ángeles por su comprensión, dedicación, regaños, y sobre todo su apoyo durante todo este tiempo y por ser uno de mis pilares durante toda mi vida.

A mis Abuelos: A mi abuelita Rosario que más que mi abuela, una segunda madre, por todo su cariño, cuidados, regaños, enseñanzas, esfuerzos y el gran apoyo durante toda mi vida y a mi abuelo José por sus enseñanzas y apoyo.

A Antonio de Jesús Salazar García, a ti por todo tu cariño, afecto, comprensión, apoyo, por todos los momentos que me has regalado y tus palabras de aliento que siempre tienes para mí.

A mis amigos con gran afecto y cariño: Sara, Angie, María Inés, Saret, Aldo, José, Baldu, Iván, Iziz, Ulises, Faby, Joss, Felipe, Angie Osorio e Ibelith por todas las palabras de apoyo, y por su amistad durante todo este tiempo.

A mis compañeros de laboratorio en general y a Lilia y Saúl por su disposición y paciencia a enseñarme durante mi estancia y también por su apoyo y hacer de mi estancia mas amena.

ÍNDICE

I. Introducción.....	1
I.1 Rizósfera.....	1
I.2 Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal.....	3
I.3 <i>Azospirillum</i>	6
I.3.1 Interacción <i>Azospirillum</i> -Planta.....	7
II. Antecedentes.....	10
II.1 Señalización celular bacteriana.....	10
II.2 Ácido di-(3'-5') guanosin monofosfato (di-GMPc).....	11
II.3 Efectores de di-GMPc.....	13
II.4 Diguanylato ciclasas.....	15
II.5 La señalización del di-GMPc regula la transición de un estado planctónico a un estado sésil.....	20
III. Antecedentes Directos.....	23
IV. Justificación.....	25
V. Objetivos.....	25
V.1 Objetivo general.....	25
V.1.1 Objetivos particulares.....	25
VI. Materiales y Métodos.....	26
VI.1 Material biológico.....	26
VI.2 Métodos.....	26
VI.2.1 Condiciones de cultivo.....	26
VI.2.2 Ensayo de Movilidad.....	27
VI.2.3 Determinación de biopelícula.....	27
VI.2.4 Determinación de unión de EPS a Rojo congo (RC).....	29
VI.2.5. Determinación de actividad de Aerotaxis.....	30
VI.2.6 Determinación de crecimiento.....	30

VI.3 Esquema de Trabajo.....	31
VII. Resultados.....	32
VII.1 Análisis in silico del gen <i>dgcB</i>	32
VII.2 Análisis de movilidad en <i>A. brasilense</i> Sp245 y <i>A. brasilense</i> 4189-B.....	33
VII.3 Análisis de formación de biopelícula.....	35
VII.4 Determinación de producción de exopolisacáridos (EPS).....	36
VII.5 Análisis de Aerotaxis.....	37
VII.6 Evaluación de crecimiento.....	38
VII.7 Análisis in silico del gen <i>dgcC</i>	39
VII.8 Determinación del dominio GGDEF conservado de DgcC.....	40
VII.9 Análisis de movilidad de <i>A. brasilense</i> Sp245 y <i>A. brasilense</i> 102-C.....	41
VII.10 Análisis de formación de biopelícula.....	43
VII.11 Análisis de Aerotaxis.....	45
VII.12 Evaluación de crecimiento.....	46
VIII. Discusión.....	47
IX. Conclusiones.....	54
X. Perspectivas.....	54
Referencias bibliográficas.....	55
Anexo.....	62
Preparación de medios de cultivo.....	62

Índice de figuras

Fig. 1. La Rizósfera

Fig. 2. Impacto de la fitoestimulación por PGPR en RSA, adquisición de nutrientes y funcionamiento de las raíces

Fig. 3. Micrografía electrónica de flagelo polar y laterales de *A. lipoferum*

Fig. 4. Proceso bifásico de unión de *A. brasilense* a la superficie de la planta hospedera

Fig. 5. Crecimiento en número de proteínas de transducción de señales codificantes en genomas bacterianos completos

Fig. 6. Estructura y funciones fisiológicas del di-GMPc

Fig. 7. Regulación celular del di-GMPc

Fig. 8. Número de proteínas GGDEF y EAL presentes en el genoma

Fig. 9. Organización modular de las DGcs y PDEs

Fig. 10. Concepto de Regulación del metabolismo del di-GMPc y señalización

Fig. 11. Mapa genético de las secuencias de DGC, ATT3, Cob3, HSasa

Fig. 12. Análisis *in silico* de la proteína DgcB putativa

Fig. 13. Movilidad en placa de *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 4189-B

Fig. 14. Tubos de aerotaxis en NH₄Cl de *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 4189-B

Fig. 15. Análisis *in silico* de la proteína DgcC putativa

Fig. 16. Esquema de los dominios conservados de la proteína DgcC putativa

Fig. 17. Secuencias de dominios GGDEF conservados

Fig. 18. Secuencia de los dominios conservados de Diguanilato ciclasas

Fig. 19. Movilidad en placa de *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 102-C

Fig. 20. Tubos de aerotaxis en NH₄Cl de *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 102-C

Fig. 21. Dominios de la proteína PdeB de *S. oneidensis* MR-1 y la proteína DgcC de *A. brasilense* Sp245.

Índice de tablas

Tabla 1. Mecanismo empleados por las PGPR para el crecimiento vegetal

Tabla 2. Número de copias de los dominios GGDEF y EAL en géneros bacterianos.



Abreviaturas

➔ DGC	Digunilato ciclasa
➔ DgcA	Diguanilato ciclasa A putativa
➔ DgcB	Diguanilato ciclasa B putativa
➔ DgcC	Diguanilato ciclasa C putativa
➔ Di-GMPc/di-GMPc	Ácido di-(3'-5') guanosin monofosfato
➔ EPS	Exopolisacáridos
➔ FBN	Fijación Biológica de Nitrógeno
➔ GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
➔ Gram (-)	Gram negativos
➔ <i>gusA</i> /GUS	β -glucoronidasa
➔ NO	Óxido nítrico
➔ PDE	Fosfodiesterasa
➔ PGPR	Rizobacteria promotora del crecimiento vegetal
➔ pGpG	Molécula lineal 5' fosfoguanilil-(3'-5') guanosina
➔ PHB	Poli- β -hidroxibutirato
➔ RR	Dominio regulador de respuesta.



Resumen

Las vías de transducción de señales frecuentemente utilizan pequeñas moléculas como segundos mensajeros para integrar, amplificar y transmitir la información a sensores intracelulares y efectores. Se han descrito importantes nucleótidos cíclicos los cuales regulan una variedad de funciones de importancia fisiológica.

En las redes de señalización bacteriana se encuentra el bis-(3'-5') guanosin monofosfato cíclico (di-GMPc), el cual en numerosos estudios se ha mostrado que es un regulador central de procesos importantes para la célula así como su adaptación y supervivencia en el entorno en el que se encuentra. La regulación de este nucleótido cíclico esta finamente controlado por dos enzimas: sintasas de di-GMPc y fosfodiesterasas las cuales controlan los niveles intracelulares del di-GMPc por acciones inversas.

En *A. brasilense* Sp245, se describió por análisis *in silico* de su genoma la presencia de genes que presuntivamente codifican para DGCs, esto nos ofrece una oportunidad para estudiar mecanismos de transducción de señales que regulen procesos vitales que participan en la interacción bacteria-planta, en nuestro modelo de estudio.

Para elucidar parcialmente la función de algunos de estos genes se generaron mutantes por inserción de los genes *dgcB* y *dgcC* que codifican para las proteínas DgcB y DgcC respetivamente, se analizó el fenotipo de la mutante del gen *dgcB*. Los resultados obtenidos mostraron la disminución de la movilidad natatoria, mientras que la formación de biopelícula presentó aumento del 121.45% en la cepa mutante *A. brasilense* 4189-B. Lo que nos indicó que el gen es funcional, y que sugieren que DgcB funciona como fosfodiesterasa bajo las condiciones estudiadas.

Los resultados obtenidos del fenotipo del gen *dgcC* apuntan a que esta proteína no tiene una función clásica de DGC como otras ya descritas debido a que hay una disminución en la movilidad del 59.9% con los compuestos evaluados, por otro lado se observó una disminución significativa del 55.18% en formación de biopelícula así como también deficiencia en el crecimiento celular, con lo obtenido la DgcC podría estar regulando la quimiotaxis, desarrollo celular y formación de biopelícula.

I. Introducción.

Las plantas desarrollan un papel clave en el ecosistema debido a que contribuyen, en instancia, a la estabilización de nichos ecológicos microbianos específicos que se encuentran en estos sistemas (Vacheron *et al.*, 2013). El desarrollo de las plantas es dependiente de la disponibilidad de nutrientes, agua y oxígeno del suelo, sin embargo, diversos estudios demuestran que la asociación planta-microorganismo es importante al desarrollo de la planta, esta interacción a su vez puede influir sobre el ambiente del suelo y su microbiota (Pate *et al.*, 2001).

Los microorganismos que se encuentran en el suelo y que han sido aislados de éste pueden tener tanto un efecto benéfico en las plantas como dañinos, dado a las asociaciones que establecen en el nicho en el que se encuentran.

Debido a que algunas bacterias se asocian con la planta, tienen diferentes efectos sobre la misma, ya que pueden actuar como: patógenos, mutualistas o comensales dependiendo del género y especie (Danhorn and Fuqua, 2007). Se ha reportado que hasta el 40% de carbono fijado del aire por las plantas es liberado en el suelo como exudados radiculares, incluyendo compuestos ricos en nitrógeno y fósforo, estos compuestos promueven el crecimiento y permanencia de bacterias en la rizósfera (Danhorn and Fuqua, 2007).

I.1 Rizósfera

La Rizósfera, es la zona estrecha del suelo que está en contacto y es influenciada por las raíces de las plantas, se caracteriza por ser una región que contiene una gran diversidad de nutrientes orgánicos como ácidos orgánicos, azúcares, fitosideróforos, vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos, esteroides, flavonoides y mucilago (Vacheron *et al.*, 2013; Philippot *et al.*, 2014; Dennis *et al.*, 2010), además de señales que atraen a poblaciones de microorganismos especialmente aquellos que puedan metabolizar los exudados radiculares que secreta la planta (Drogue *et al.*, 2013). Otra de las características principales de la rizósfera es la gran actividad microbiana que se encuentra en esta zona con respecto a otras áreas del suelo (Figura 1).

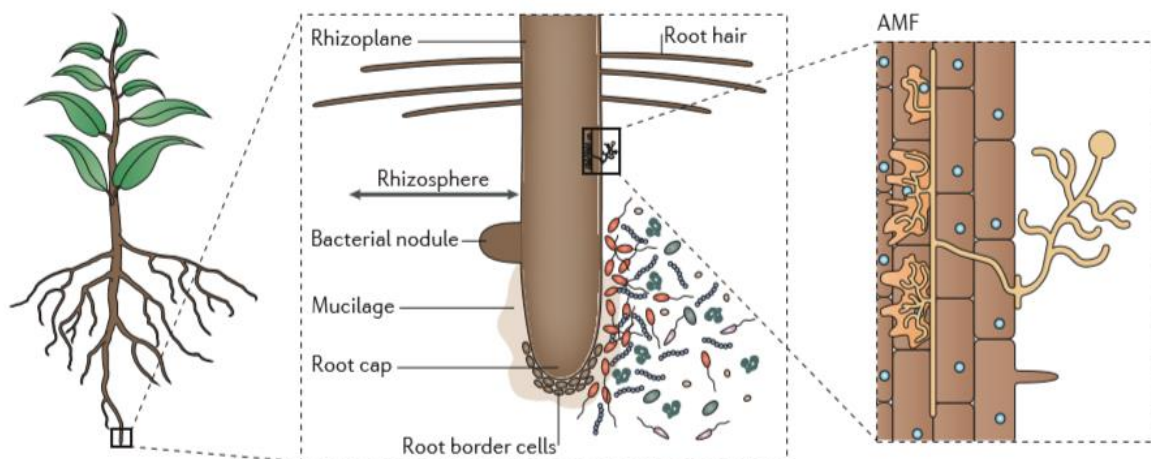


Figura 1|La rizósfera. La rizósfera es una zona estrecha del suelo (unos pocos milímetros de ancho) que rodea y es influenciada por las raíces de la plantas. El esquema muestra ilustraciones de la rizósfera, contiene bacterias saprofiticas y simbióticas y hongos incluyendo micorrizas arbusculares (Philippot *et al.*, 2014)

En la rizósfera se encuentra una comunidad rica en microorganismos, comprendiendo entre 10^{10} bacterias por miligramo de suelo (Roesch *et al.*, 2007), teniendo además una gran diversidad de taxas (Vacheron *et al.*, 2013). En la rizósfera hay una alta relación carbono/nitrógeno, caracterizada por un exceso de carbono de fácil acceso y disponibilidad de nitrógeno contribuyendo al mantenimiento del ecosistema (Kuzyakov, 2002). El ambiente que proporciona la rizósfera es microaerófilico favoreciendo la fijación biológica de nitrógeno (FBN); estos microambientes se encuentran principalmente localizados en la zona de las raíces laterales de la planta.

Se han descrito diversas taxas bacterianas que se encuentran en la rizósfera, las cuales afectan de manera positiva a la planta hospedera como: estimular el crecimiento y la salud de la planta, debido a la colonización y la relación que establece (Podile *et al.*, 2010). Estas bacterias pueden interactuar con amplio rango de plantas hospedero especialmente firmicutes y del filo de proteobacterias (Droge *et al.*, 2013).

Interacciones directas e indirectas entre hospederos y su microbioma asociado involucran cambios constitutivos e inducibles en el metabolismo secundario y estructuras morfológicas (Yao and Wu 2010).

La comunicación a través de moléculas de señalización como flavonoides es importante para la regulación de estas interacciones. Los microorganismos de la rizósfera son conocidos por sus interacciones mutualistas con las plantas que incluyen rizobias y hongos micorrízicos, facilitando la nutrición de la planta por medio de la adquisición de nitrógeno y fosfatos respectivamente, y el intercambio de carbono fijado fotosintéticamente. Las relaciones mutualistas que se forman entre planta-microorganismo corresponden a interacciones íntimas elaborando estructuras complejas como los nódulos durante la simbiosis entre *Rhizobium* y *Fabaceae*. Esta interacción involucra a bacterias que puedan colonizar la superficie del sistema radicular (algunas veces dentro de los tejidos de las raíces) y así estimular el crecimiento y la salud de la planta, estas bacterias son denominadas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (Yao and Wu 2010; Hassan and Mathesius 2012; Barea *et al.*, 2005), las cuales se han reportado los numerosos efectos que tienen en la planta, así siendo útiles en diversos ámbitos como la industria agronómica, así como también útiles para la realización de estudios de biorremediación.

I.2 Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

Diversos géneros bacterianos se han aislados de la rizósfera y que tienen efectos positivos sobre el crecimiento de la planta, estas bacterias se denominan “PGPR” (por sus siglas en inglés **P**lant **G**rowth **P**romoting **R**hizobacteria), Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Las PGPR pueden promover el crecimiento a través de la producción de fitohormonas o actividades enzimáticas, así como también favorecer la simbiosis del microorganismo. Otros pueden proteger a la planta por medio de la inhibición de fitoparásitos, basado en mecanismos de competencia o antagonismo o induciendo las defensas de la planta como la resistencia sistémica inducida o ISR (Lugtenberg and Kamilova, 2009; Bashan and Bashan, 2005) (Tabla 1). Algunas PGPR también tienen efecto en las plantas ante estrés abióticos incluyendo contaminación por metales pesados y/o contaminantes; ciertamente también se ha observado que desarrollan el incremento de la capacidad de las plantas de secuestrar metales pesados (Jing *et al.*, 2007).

Mecanismo	Efecto en el Crecimiento de la Planta	Ejemplo de Bacterias
Fijación de nitrógeno asociado a la raíz	Incremento en el contenido de nitrógeno y biomasa	<i>Azospirillum</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Herbaspirillum</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Cyanobacteria</i> ,
Producción de hormonas de la planta (auxinas, giberelinas, citocininas)	Estimular las ramificaciones de la raíz. Incrementa el número de brotes y biomasa de la raíz e induce el ciclo reproductivo	<i>Azospirillum</i>
Solubilización de Fosfatos Inhibición de la síntesis de etileno de la planta	Incrementa la biomasa y el contenido de P Incrementa el tamaño de la raíz	<i>Bacillus lichiniformis</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Pseudomonas putida</i> .
Oxidación de azufre	Incrementa la biomasa y el contenido de nutrientes foliares	Sin definición particular
Producción de moléculas señal y favorecedor de la extrusión con la absorción de protones	Cambios en el metabolismo de la planta relacionado con la absorción de minerales	<i>Azospirillum</i> <i>Achromobacter</i>
Incremento de la permeabilidad de la raíz	Incremento de la biomasa y consumo de nutrientes	<i>Azospirillum</i>
Favorecimiento del consumo de metales en general	Incremento de biomasa y consumo de nutrientes	<i>Azospirillum</i>
Incremento en la producción de nitrito	Incremento de la formación de raíces laterales	<i>Azospirillum</i>
Reducción de la toxicidad por metales pesados	Protección contra la toxicidad de níquel	<i>Kluyvera</i>
Incremento en la acumulación de nitrito	Incremento de la biomasa y consumo de nutrientes	<i>Azospirillum</i>
Incremento en los nódulos y tamaño en leguminosas	Incremento en biomasa, contenido de N y rendimiento reproductivo	<i>Azospirillum</i>
Incremento de los nódulos o tamaño en la raíz en el género Alnus	Incrementa la biomasa y el contenido de N	<i>Frankia</i>
Incrementa la frecuencia de infección por hongos endomicorrizicos	Incrementa la biomasa	<i>Pseudomonas</i>
Incrementa el número de la cofia de la raíz por endomicorrizicos	Incremento de la biomasa	<i>Pseudomonas</i>
Incremento temporal de la producción de “rain root” en cactus	Mejora la supervivencia de las semillas durante la sequia	<i>Azospirillum</i>
Incremento en la resistencia a condiciones adversas (sequía, salinidad, toxicidad del abono)	Mejora la supervivencia de la semilla e incrementa la biomasa	<i>Azospirillum</i>

Tabla 1| Mecanismos empleados por las PGPR para el crecimiento vegetal (Bashan & Bashan 2005).

Las PGPR incluyen bacterias de géneros muy diversos como: *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Azoarcus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, (Bashan *et al.*, 2004).

Las PGPR pueden también reducir el rango de crecimiento de raíces primarias (Dobbelaere *et al.*, 1999) e incrementar el número y longitud de las raíces laterales (Combes-Meyner *et al.*, 2011; Chaman *et al.*, 2013), y estimular la elongación de los pelos radiculares *in vitro*. Consecuentemente con la obtención de minerales y agua, y así, el crecimiento de la planta puede ser incrementado. Dentro de las diversas funciones de las PGPR también se ha descrito que pueden interferir con vías de coordinación del desarrollo de la planta y nutrición de la planta para elicitar ambos, incremento del rango de adquisición de nutrientes y promoción del crecimiento (Figura 2). Las PGPR además pueden directamente incrementar el suplemento de nutrientes y/o estimular los sistemas de transporte de iones en las raíces. Se considera que la solubilización de fosfatos es clave para el efecto de las PGPR en la nutrición de la planta (Richardson *et al.*, 2009; Ramaekers *et al.*, 2010)

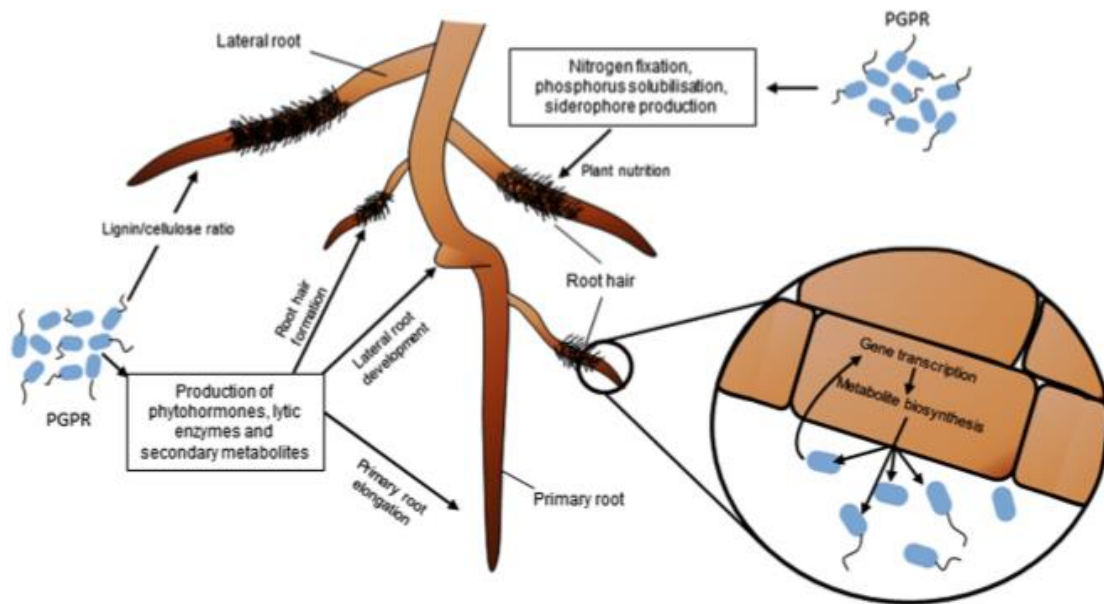


Figura 2| Impacto de la fitoestimulación por PGPR en RSA, adquisición de nutrientes y funcionamiento de las raíces. Las PGPR pueden modular el desarrollo y crecimiento a través de la producción de fitohormonas, metabolitos secundarios y enzimas. Los efectos más comunes observados son la reducción del rango de crecimiento de raíces primarias, y el incremento del número y longitud de raíces laterales y pelos radiculares. Las PGPR también influyen en la nutrición de la planta vía por la fijación de nitrógeno, solubilizando fosfatos o fósforo, o producción de sideróforos así modificando la fisiología de las raíces y cambios en la transcripción de genes y biosíntesis de metabolitos en las células de la planta. (Vacheron *et al.*, 2013).

I.3 *Azospirillum*

El género de *Azospirillum* pertenece a la subdivisión de las α -proteobacterias, es un microorganismo Gram (-), la identificación de este género se puede realizar por sus características como: forma vibroide, pleomorfismo, es fijador de nitrógeno en vida libre movilidad en espiral, algunas especies presentan este tipo de movilidad (*A. brasilense*, *A. lipoferum* y *A. irakense*) debido a la presencia de una flagelación mixta ya que posee un flagelo polar y varios flagelos laterales (Fibach *et al.*, 2011, Okon & Vanderleyden, 1997, Baldani *et al.*, 2005; Hall & Krieg, 1983).

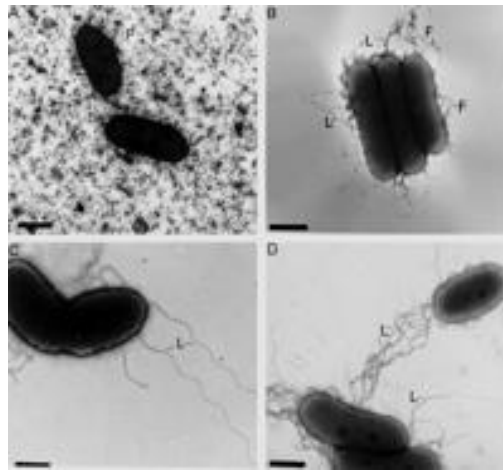


Figura 3 | Micrografía electrónica de flagelo polar y laterales de *Azospirillum lipoferum*. **Abreviaturas: F: flagelo polar y L: flagelo lateral** (Alexandre *et al.*, 1999)

Azospirillum ejerce efectos benéficos sobre el crecimiento de la planta y el rendimiento de muchos cultivos agrónomicamente importantes (Okon, 1985; Spaepen *et al.*, 2009). Cerca de 16 especies de *Azospirillum* han sido descritas, sin embargo, *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum* han sido estudiadas a mayor detalle (Baldani *et al.*, 2005). *Azospirillum* es capaz de fijar nitrógeno en asociación con las plantas, pero aparentemente la fijación de nitrógeno no juega un papel importante en la promoción del crecimiento de la planta en la mayoría de los sistemas evaluados (Spaepen *et al.*, 2009; Helman *et al.*, 2011). Dentro de otras propiedades que posee *Azospirillum* es la producción y secreción de reguladores de crecimiento para la planta (fitohormonas) como: auxinas, citocininas y giberelinas, así como óxido nítrico (NO).

Estas moléculas parecen ser señal y componentes de los efectos de promoción del crecimiento de la planta (Dobbelaere & Okon, 2007; Spaepen *et al.*, 2007; Bashan & de Bashan, 2010; Helman *et al.*, 2001).

El rasgo que distingue a esta especie de los otros es su capacidad de utilizar como fuente de carbono diversos azúcares y ácidos di y tricarbónicos. El crecimiento óptimo se produce a 30°C, y en valores de pH entre 6.0 y 7.0 (Hartmann & Zimmer 1994), debido a esta característica se considera un modelo interesante de estudio.

Una de las características fenotípicas más ampliamente usada como criterio para el reconocimiento del género *Azospirillum*, es el color rojo escarlata que toman las colonias al crecer en un medio adicionado con colorante rojo congo, sin embargo, en este medio pueden hallarse colonias mutantes de *Azospirillum* de color blanco debido a la incapacidad de producir polisacáridos.

En condiciones de desecación y limitación de nutrientes, *Azospirillum* puede adoptar formas celulares ovoides y de paredes gruesas similares a quistes denominados como formas C, este cambio morfológico conduce a la agregación celular y esto a su vez lleva al desarrollo de una cubierta externa de polisacáridos, además de la acumulación de abundantes gránulos de poli-β-hidroxibutirato (PHB), el cual en las células de *A. brasilense* contiene cantidades elevadas de este, hasta 50% del peso seco, se ha sugerido que el PHB desempeña su función al ser utilizado como almacén de carbono y energía (Kadouri *et al.*, 2002). Además de conferir una función fisiológica para resistir a la desecación, luz ultravioleta y el choque osmótico (Sadasivan & Neyra 1987).

I.3.1 Interacción *Azospirillum*-Planta

El género de *Azospirillum* promueve el crecimiento de la planta bajo una gran variedad de ambientes y condiciones del suelo, sin embargo, para que se de este proceso, es necesaria la asociación de *A. brasilense* con la planta, debido a la capacidad de *Azospirillum* de alcanzar poblaciones significativas en la superficie de las raíces del hospedero, se ha considerado importante para el efecto benéfico en el crecimiento de la planta y por lo cual no solo requiere que se establezca un contacto estrecho entre *Azospirillum*-planta (Doberei-

ner & Day 1976; Steenhoudt & Vanderleyden 2000), sino que, existen diversos factores que influyen, diversos estudios indican que la quimiotaxis a los exudados radiculares de la raíz de las plantas es uno de los factores principales que influyen en la llegada de microorganismos a la rizósfera.

En *A. brasilense*, se ha demostrado una fuerte actividad quimiotáctica hacia diversos aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos y compuestos aromáticos y exudados radiculares (Reinhold *et al.*, 1985; Zhulin *et al.*, 1996). Se considera que el flagelo polar glicosilado actúa directamente como un adhesina sobre la raíz (Croes *et al.*, 1993). La aerotaxis (movimiento celular activo a través de gradientes de oxígeno), de igual manera es relevante en la forma de vida de *Azospirillum*, debido a que es un microorganismo microaerófilo, prefiere zonas con baja concentración de oxígeno que son óptimas para su crecimiento, además de que la fijación de nitrógeno llevada a cabo por *Azospirillum* se da bajo estas condiciones y se pueda dar la expresión de actividad de nitrogenasa y debido a eso exhibe un fuerte comportamiento aerotáctico (Zhulin *et al.*, 1996; Zhulin & Armitage, 1993). Por lo tanto la respuesta quimio y aerotácticas son características que contribuyen al proceso de colonización (Zhulin *et al.*, 1996).

La colonización de *Azospirillum* hacia las plantas puede darse en la parte interna como externa de la raíz y es dependiente de diferentes factores químicos, fisiológicos, ambientales y nutricionales. En la parte externa de la raíz tienden a formar pequeñas agregados, que se encuentran embebidos en la capa mucilaginosa que cubre la superficie radicular. Por otra parte el proceso de colonización interna, *Azospirillum* puede invadir las raíces penetrando a través de los espacios intercelulares (Revisado en de Bashan *et al.*, 2007).

Se ha identificado que el proceso de adhesión de *Azospirillum* sobre las raíces de cereales ocurre en dos etapas independientes (Figura 4). La primera fase consiste en una adsorción rápida, débil y reversible, en el cual participa el flagelo polar, que funciona como una adhesina y una variedad de proteínas (Somers *et al.*, 2004). La segunda fase consiste de un anclaje lento y firme e irreversible que alcanza su máximo nivel 16 h después de la inoculación, el cual parece ser independiente de los exopolisacáridos (EPS) producidos por *Azospirillum* (Michiels *et al.*, 1989; Michiels *et al.*, 1991).

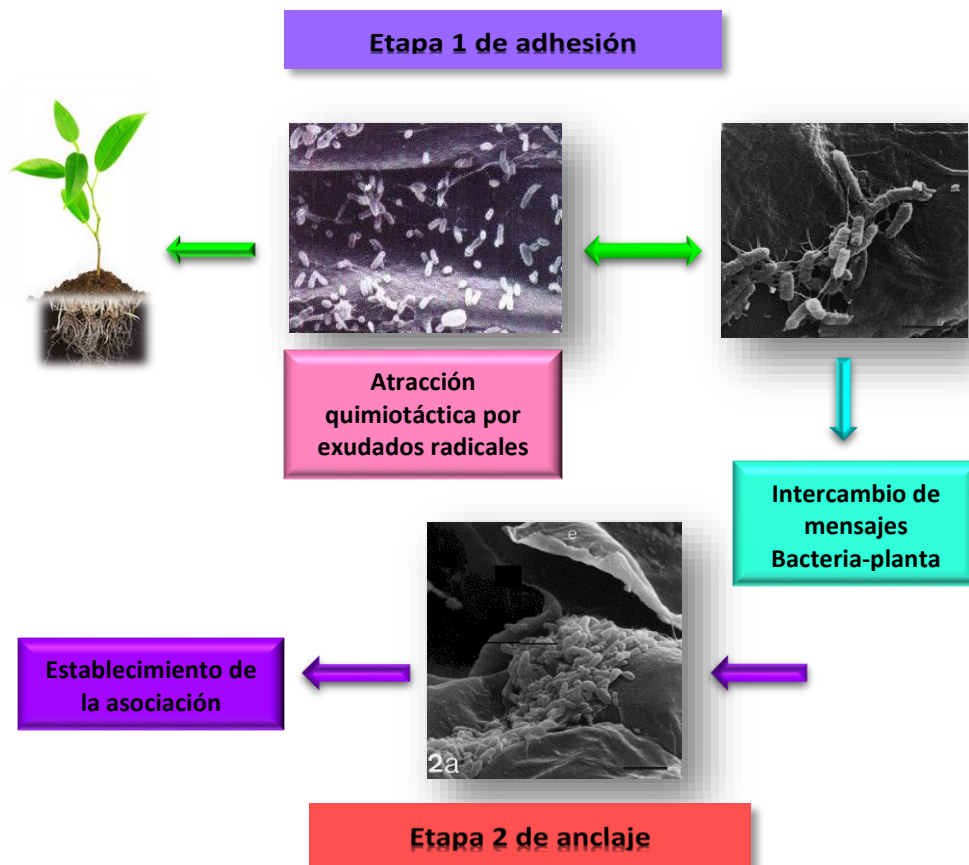


Figura 4| Proceso bifásico de unión de *A. brasilense* a la superficie de la planta hospedera. La etapa 1 representa la unión débil y reversible de la adsorción mediada por carbohidratos que se encuentran unidos al flagelo polar. La etapa 2 representa la adherencia firme e irreversible, en la que se propone a los EPS como componentes esenciales de la interacción (Steenhoudt & Vanderleyden, 2001).

La inoculación de diversas plantas con *Azospirillum* ha mostrado que los principales sitios de colonización son las áreas de elongación celular y los pelos radiculares. La inoculación de raíces de trigo con una cepa de *Azospirillum* que expresa constitutivamente el gen *gusA* mostró que en los primeros días de la asociación las células bacterianas colonizan específicamente los sitios de emergencia de las raíces laterales y las regiones de pelos radiculares, tanto de la raíz primaria como de las raíces secundarias y posteriormente a la superficie de la raíz (Vande Broek *et al.*, 1998). En plantas de trigo fue observado que la inoculación de *Azospirillum* induce cambios en la morfología de los pelos radiculares. Además, se observó que la inoculación con 1×10^5 - 1×10^6 células provoca la elongación y aumento de la superficie de la raíz (Kapulnik *et al.*, 1985).

II. Antecedentes

II.1 Señalización celular bacteriana

Para los organismos es necesario ajustar su metabolismo y comportamiento en respuesta a cambios en el medio ambiente. Para los microorganismos es indispensable el monitoreo constante de una variedad de parámetros ambientales e intracelulares, la cual es una condición necesaria para su supervivencia (Sondej *et al.*, 2002).

Los mecanismos por los cuales detecta estímulos tanto extra e intracelulares, son mecanismos reguladores complejos que incluyen la transmisión de la señal externa a través de la membrana citoplasmática, seguida por la transducción de señal intracelular, hacia enzimas metabólicas, así como también organelos como el flagelo (Galperin *et al.*, 2001).

Estos sistemas de transducción de señales son vías de procesamiento de información que reconoce una plétora de parámetros de diversa índole, amplificando y procesando la señal, y así desencadenando respuestas adaptativas en una célula, y las cuales han adquirido a través de la evolución y se basan en la coordinación de diversos componentes (Zhulin *et al.*, 2002). La complejidad de estos sistemas de señalización se correlaciona con el tamaño del genoma y el rango de cambios en el medio ambiente donde normalmente se encuentra (Figura 5) (Konstantinidis & Tiedje, 2004).

Se han realizado estudios bioinformáticos donde revela la presencia de numerosos sistemas de transducción de señales. Sin embargo, comparaciones en diversos genomas han revelado nuevas clases de moléculas de señalización con dominios GGDEF y EAL, involucradas en la regulación del di-GMPc, un segundo mensajero (Figura 5) (Jenal, 2004; Römling *et al.*, 2005). Debido a los datos genéticos y las consideraciones de las secuencias han determinado que la actividad de diguanilato ciclasas (sintasa de di-GMPc) y actividad de fosfodiesterasa (hidrolasa de di-GMPc) son pruebas bioquímicas directas que participan en la señalización del di-GMPc (Ryjenkov *et al.*, 2005; Bobrov *et al.*, 2005).

Los mecanismos de señalización bacteriana son extremadamente diversos, desde los más simples, como los sistemas de doble componente, hasta las cascadas de señalización multicomponentes, que regulan así una gran variedad de procesos fisiológicos importantes como la adquisición de nutrientes, metabolismo energético (Calva & Oropeza, 2006).

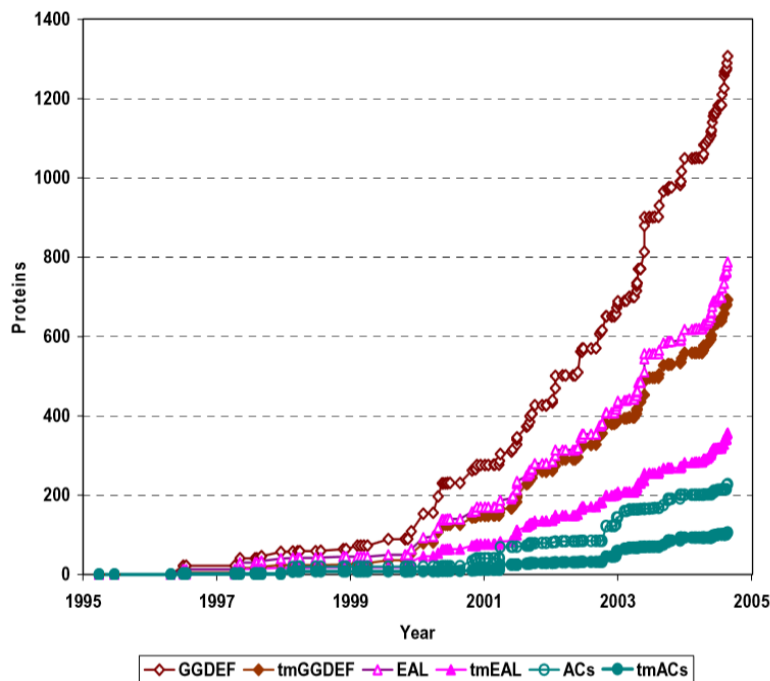


Figura 5| Crecimiento en número de proteínas de transducción de señal codificadas en genomas bacterianos completos. Diguanilato ciclasas (dominios GGDEF, diamantes), fosfodiesterasas específicas de di-GMPc (dominios EAL, triángulos), y adenilato ciclasas (círculos). Símbolos abiertos indican el número de proteínas con los dominios correspondientes, símbolos cerrados, el número de proteínas de unión a la membrana de cada tipo (Galperin, 2005).

Desde que los sistemas de transducción de señales han crecido en número y complejidad relacionado con el tamaño del genoma juegan un papel importante en el medio ambiente de la bacteria, y el cual se ha convertido en un análisis comparativo de sistemas que pueden proveer de información útil sobre el comportamiento bacteriano (Hellingwerf, 2005).

II.2 Ácido di-(3'-5') guanosin monofosfato (di-GMPc)

Las vías de transducción de señales frecuentemente utilizan pequeñas moléculas llamadas segundos mensajeros que integran, amplifican y transmiten información a sensores intracelulares y efectores (Pesavento & Hengge, 2009).

De entre los nucleótidos cíclicos más importantes como el adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y guanosin monofosfato cíclico (GMPc) que regulan una variedad de funciones desde el metabolismo de azúcares, conducción de canales iónicos tanto en procariotas como eucariotas. En contraste con los roles establecidos de mono-nucleótidos cíclicos y di-nucleótidos cíclicos ha ganado importancia como los principales moléculas de

señalización en procariotas. El segundo mensajero bacteriano bis-(3'-5') guanosin monofosfato cíclico (di-GMPc), es un dinucleótido cíclico intracelular que consiste de dos residuos de riboguanosina unidos por el enlace 3'-5' fosfodiéster que forman una estructura cíclica. Este actúa como un segundo mensajero global en bacterias; fue descrito por el grupo de investigación de Moshe Benziman, el cual fue identificado como un factor que activa de forma alostérica a la enzima celulosa sintasa, encargada de la producción de la celulosa en *Gluconacetobacter xylinus* (Amikam & Benziman, 1989; Ross *et al.*, 1987; revisado en Xiqui *et al.*, 2010).

Esta molécula se ha reconocido como un regulador clave de funciones celulares complejas como el control de la transición del estado planctónico a un estilo de vida sésil principalmente (Hengge, 2009) (Figura 6), pero también regula el comportamiento de agregación, adhesión, biosíntesis de adhesinas y EPS (estructuras que forman la matriz de la biopelícula), sin embargo, en bacterias Gram (+) no parecen usar esta molécula como un regulador de estos fenotipos (Ryan *et al.*, 2007; Karatan & Watnick, 2009).

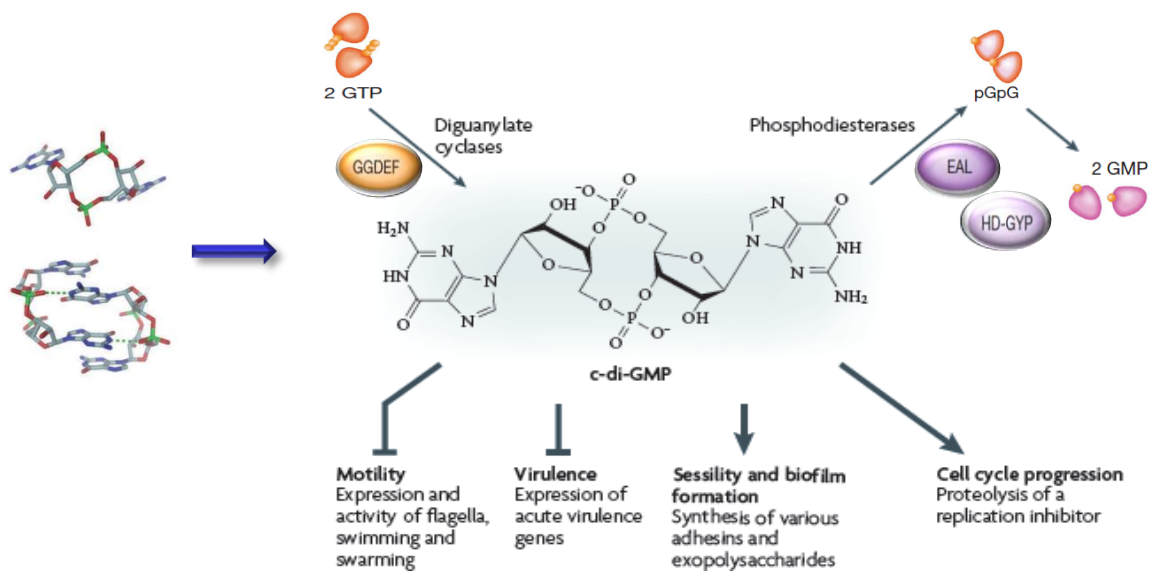


Figura 6| Estructura y funciones fisiológicas del di-GMPc. A nivel celular, el di-GMPc es controlado por diguanilato ciclasa que contienen dominios GGDEF y fosfodiesterasas específicas que contienen dominios EAL o HD-GYP. El di-GMPc puede reducir la motilidad por la desregulación de la expresión flagelar (*P. aeruginosa*). Bajos niveles de di-GMPc son requeridos para la expresión de factores de virulencia (*V. cholerae*). Altos niveles de di-GMPc estimula varias funciones asociadas con la formación de biopelícula. Como la formación de fimbrias y otras adhesinas y exopolisacáridos de matriz extracelular. En *Caulobacter crescentus* el di-GMPc es un regulador clave en la progresión del ciclo celular. pGpG 5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina (Hengge, 2009; Schirmer, 2009).

El di-GMPc es sintetizado por sintetasas de di-GMPc (DGCs) que contienen el dominio GGDEF, definido por los residuos de aminoácidos altamente conservados, y lo sintetiza a partir de dos moléculas de GTP (Paul *et al.*, 2004) mientras que las fosfodiesterasas contienen el dominio EAL o HD-GYP (Christen *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2006) el cual degrada y forma la molécula lineal pGpG o guanosina monofosfato (GMP) respectivamente (Figura 6). Diversas proteínas contienen ambos dominios GGDEF y EAL y pueden exhibir ambas actividades tanto DGC o PDE (Galperin *et al.*, 2001).

Análisis sistemáticos de DGCs y PDEs en *E.coli*, *Salmonella*, *V.cholerae*, y *P. fluorescens* han revelado que la motilidad, virulencia y formación de biopelícula son regulados por el di-GMPc (Boehm *et al.*, 2010). Así entender como múltiples vías de señalización del di-GMPc aisladas de cada una o integradas pueden llevar a una respuesta adecuada y específica, lo cual es importante para entender los cambios mediados por el di-GMPc en procesos importantes para la bacteria.

II.3 Efectores de di-GMPc

Dentro de la red de señalización del di-GMPc se encuentran mecanismos para generar una señal y responder a señales cambiantes. Así, existen enzimas involucradas en la síntesis y degradación del di-GMPc, sistemas efectores permiten a los microorganismos responder a niveles cambiantes de este segundo mensajero. Los receptores o efectores de di-GMPc, son proteínas de unión a este o RNA (Hengge, 2009).

El primer efector identificado que interactúa directamente con el di-GMPc, fue el dominio PilZ, que se encuentra en diversas proteínas de una amplia variedad de microorganismos, incluyendo Alg44, proteína de biosíntesis de alginato encontrada en *Pseudomonas aeruginosa*. Estudios funcionales posteriores confirmaron que el dominio PilZ de Alg44 se une a di-GMPc (Merighi *et al.*, 2007), diversas proteínas con otros dominios y motivos de unión a di-GMPc incluyendo dominios EAL como FimX de *P. aeruginosa* y LapD de *Pseudomonas fluorescens* (Navarro *et al.*, 2009; Newell *et al.*, 2009), y el motivo RXXD de PopA de *Caulobacter crescentus* y PelD de *P. aeruginosa* (Duerig *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2007), se ha encontrado que el di-GMPc es capaz de interactuar con factores de transcripción, como FleQ, VpsT, Clp, VpsR y MrkH, que regulan la expresión de flagelo,

síntesis de EPS, virulencia, y producción de fimbrias en *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *X. campestris* y *K. pneumoniae* (Shanahan & Strobel, 2012).

Además de las proteínas que unen di-GMPc, se han descrito riboswitch de clase I que poseen dominios GEMM (Sundarsan *et al.*, 2008) que forman parte del sistema de señalización dirigido por el di-GMPc. Los riboswitch son ARN pequeños, reguladores no codificantes que funcionan para la detección de metabolitos específicos (molécula ligando pequeñas), con alta afinidad y especificidad. Un ejemplo de riboswitch clase I es de *C. difficile*, llamado Cd1, que se encuentra río arriba de un operón que codifica proteínas necesarias para la biosíntesis del flagelo, cuando hay altos niveles del di-GMPc la transcripción del operón es finalizada (Shanahan & Strobel 2012).

Los efectores de unión a di-GMPc utilizan un rango de mecanismos para llevar las señales a procesos celulares y ejercer su efecto en síntesis de polisacáridos, motilidad, transcripción entre otros. Diversas enzimas que metabolizan el di-GMPc y efectores son simultáneamente expresados, estos grupos de enzimas impactan en diversos fenotipos, y así, las células bacterianas son capaces de coordinar acciones dentro de la red compleja de señalización mediada por el di-GMPc. Esta coordinación se logra probablemente a través de una regulación tanto espacial como temporal (Hengge, 2009).

Algunas diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas, y efectores pueden ser expresados solo bajo condiciones particulares de crecimiento y en respuesta a cambios en el medio ambiente. Por ejemplo *rapA*, que codifica para una fosfodiesterasa en *P. fluorescens*, y se transcribe en respuesta a bajos niveles de fosfato inorgánico (Pi) (Monds *et al.*, 2007). Los componentes de señalización del di-GMPc pueden asociarse con otros complejos multiproteicos o microcompartimentos dentro de la célula para influenciar la concentración local de di-GMPc (Hengge, 2009).

Adicionalmente DGCs y PDEs en la misma vía pueden interactuar uno con el otro (Andrade *et al.*, 2006), o establecer una comunicación directa entre una proteína efectora o blancos río abajo, muchos de estos ya sugeridos. Las diferentes maneras en las cuales las proteínas efectoras pueden unir di-GMPc e interactuar con DGCs y PDEs permiten a la bacteria tener mecanismos específicos para la regulación de varios procesos (Figura 7).

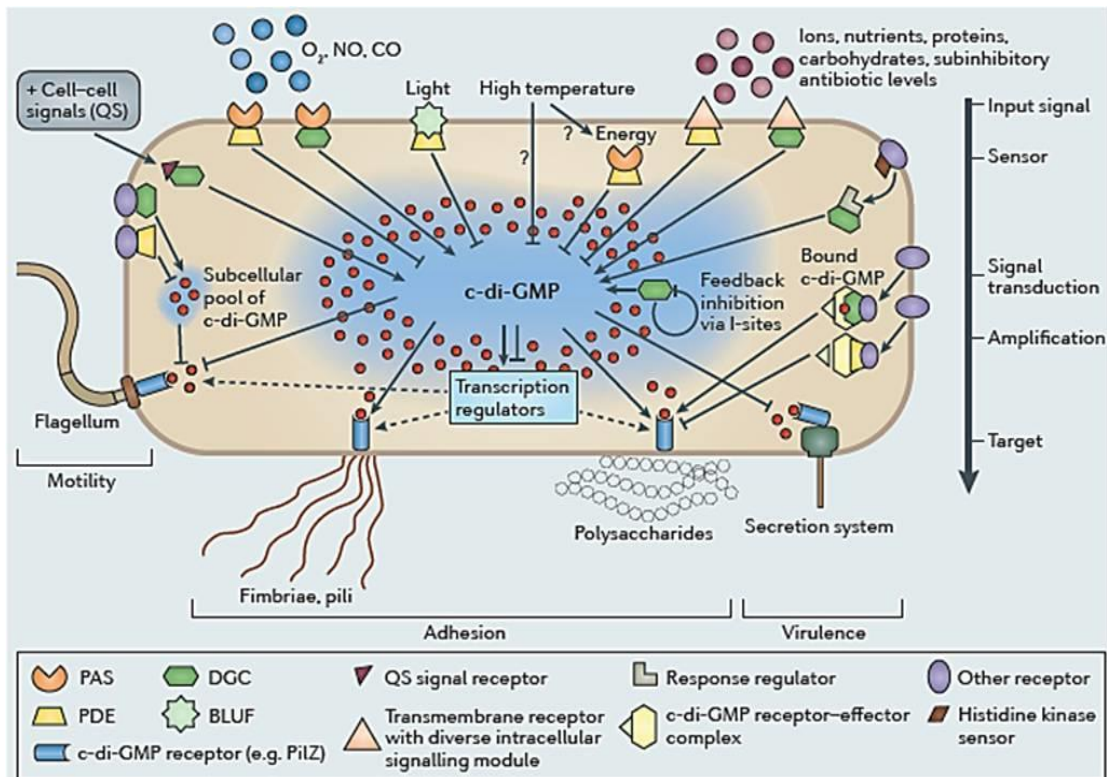


Figura 7| Regulación celular del di-GMPc. El di-GMPc regula a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional diversas funciones celulares, dentro de las cuales se encuentra: la movilidad, adhesión, formación de biopelícula y virulencia (McDouglad *et al.*, 2011)

II.4 Diguanylato ciclasas

Las sintasas de di-GMPc o DGCs sintetizan a partir de dos moléculas de GTP al segundo mensajero di-GMPc, las cuales poseen dominios GGDEF, que consta de 170 residuos de aminoácidos y son denominados así debido al patrón de secuencia conservado (**G**li-**G**li-**D**[Asp]-**E**[Glu]-**F**en), en donde se encuentra el sitio catalítico de la enzima (Stock, 2007). Para que estas enzimas tengan actividad catalítica necesitan tener conservados todos los aminoácidos, en la mayoría de los casos, debido a que, las primeras dos glicinas están involucradas en la unión a GTP, mientras que el cuarto residuo glutamato coordina iones metálicos. El tercer aminoácido del motivo (Asp/Glu) es indispensable para la catálisis y también juega un papel importante en la coordinación del metal (Römling, 2013).

Este dominio se caracterizó por primera vez en la proteína PleD de *C. crescentus*, un regulador de respuesta requerido para la transición de células móviles flageladas a células no

no móviles (Aldrige *et al.*, 1999). Debido a diversos estudios realizados en estas enzimas, se han ido incrementado el número de estas proteínas que están involucradas en la síntesis del di-GMP, por ejemplo, las proteínas que contienen estos dominios y que activan la síntesis de celulosa que es dependiente de di-GMPc (Ausmees *et al.*, 2001). La sobreexpresión de proteínas que contienen el dominio GGDEF como AdrA de *Salmonella entérica* serovar typhimurium, que se es requerida para la formación de biopelícula en condiciones de crecimiento en medio enriquecido, mientras que GcpA regula el mismo proceso en condiciones deficientes de nutrientes (Simm *et al.*, 2004; García *et al.*, 2004) y VCA0956 de *Vibrio cholerae* (Camilli & Tischler, 2006), resulta en el incremento de los niveles de di-GMPc, así concluyendo que estas enzimas tienen actividad de DGCs.

Estos dominios están representados en la mayoría de las secuencias de los genomas de diferentes géneros bacterianos. La presencia de dominios GGDEF en diferentes géneros representativos indica que a través de la evolución se han ido conservando (Galperin, 2004). Así la relación función-estructura de dominios GGDEF y proteínas que contienen a estos dominios pueden dar parámetros para el entendimiento de no solo la fisiología si no de procesos que a través de estas proteínas de señalización se pueden entender procesos metabólicos y de comportamiento en diferentes condiciones y así permitir la posibilidad de cambios para diferentes fines.

Para la regulación de los niveles intracelulares de di-GMPc, es necesario mantener la homeostasis de segundo mensajero, debido a que la sobreproducción podría ocasionar cambios en la transducción de señales, por tanto, sería perjudicial para la fisiología del microorganismo, debido a esto, la regulación de los niveles del di-GMPc son finamente controlados a niveles bioquímicos en lo referente a su síntesis y degradación por DGCs y PDEs.

La degradación (hidrólisis) del di-GMPc es catalizada por enzimas denominadas fosfodiesterasas que contienen dominios EAL (Glu-Ala-Leu) o HD-GYP (His-Asp-Gli-Tir-Pro) (Dow *et al.*, 2006). Las fosfodiesterasas que contienen el dominio EAL son altamente específicas para sus sustrato, mostrando una K_m baja en el nivel de sub- μ Molar y el cual requiere de iones divalentes como el Mg^{2+} o Mn^{2+} para su función (Rao *et al.*, 2008).

Los dominios EAL catalizan la apertura asimétrica del di-GMPc por la hidrólisis de un enlace éster, así formando un dinucleótido lineal 5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina (pGpG). Diversas estructuras cristalizadas de los dominios EAL han sido caracterizadas, como la estructura de BlrP1 de *Klebsiella pneumoniae* (Barends *et al.*, 2009) en la cual muestra que el aminoácido glutamato puede coordinar un segundo catión divalente (Mn^{2+}), así el mecanismo catalítico asistido por dos metales puede ser operativo en la mayoría de las fosfodiesterasas que contienen dominios EAL (Rao *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha reportado que la mutación en el aspartato de RocR de *P. aeruginosa* elimina 30 veces la actividad de la enzima. Así la relevancia fisiológica de un segundo sitio de unión a otro catión aún no ha sido elucidada.

Los dominios GGDEF, EAL y HD-GYP están ampliamente representados en proteínas de algunas bacterias; mientras que en otras están ausentes (Tabla 2), sin embargo se han identificado más 4,200 dominios GGDEF, 2,500 dominios EAL y 200 dominios HD-GYP en diferentes bacterias (Ryan *et al.*, 2006).

BACTERIA	GGDEF	EAL
<i>Aquifex aeolicus</i>	11	8
<i>Bacillus subtilis</i>	4	3
<i>Campylobacter jejuni</i>	2	0
<i>Caulobacter crescentus</i>	11	10
<i>Deinococcus radiodurans</i>	16	5
<i>Escherichia coli</i>	19	17
<i>Lactococcus lactis</i>	0	0
<i>Mesorhizobium loti</i>	32	18
<i>Mycobacterium leprae</i>	3	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33	21
<i>Thermotoga marítima</i>	11	0
<i>Vibrio cholerae</i>	41	22

Tabla 2|Número de copias de los dominios GGDEF y EAL en géneros bacterianos. Datos tomados de Galberin MY *et al.*. 2001

Estudios realizados por Seshasayee *et al.*, 2010 en genomas bacterianos en 5674 proteínas con dominios GGDEF, 1805 con dominio EAL y 3769 proteínas híbridas (GGDEF-EAL), fue notable que la mayoría de los organismos codifican más para enzimas que solo poseen dominios GGDEF que enzimas con dominios EAL (Figura 8) y la distribución filogenética de las proteínas con dominios GGDEF y EAL en procariotas es muy diverso encontrándose en proteobacterias, firmicutes y actinobacterias (Seshasayee *et al.*, 2010).

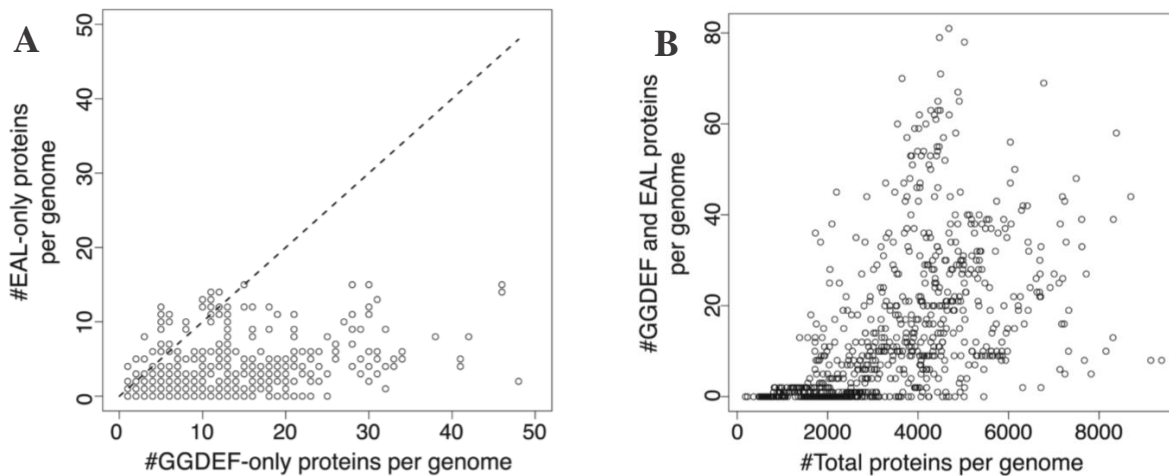


Figura 8| Número de proteínas GGDEF y EAL presentes en el genoma. (A) Plot del número de proteínas EAL versus el número de proteínas con dominio GGDEF codificadas en genomas bacterianos. (B) Plot del número de proteínas que contienen dominios GGDEF y EAL versus el número total de genes por genoma bacteriano.

Estudios previos han mostrado que el número de proteínas reguladoras, así como factores de transcripción, codificados en el genoma se correlaciona fuertemente con el tamaño del genoma. Sin embargo, el número de proteínas con dominio GGDEF y EAL no se correlaciona en gran medida con el tamaño del genoma, debido a que la mayoría de los genomas (64%) codifica para menos de aproximadamente 2000 genes en total que no contienen estas proteínas, mientras que los genomas más grandes (85%) codifican para al menos una. En contraste, el número de proteínas GGDEF y EAL no están relacionados con el número de genes totales debido a que el di-GMPc regula solo un limitado grupo de complejas redes, posiblemente accesorias, funciones como la activación de la movilidad o adhesión como ya se ha descrito. El número de genes involucrados en el recambio del di-GMPc probablemente depende del número de señales, en las cuales pueda responder (Seshasayee *et al.*, 2010).

Del mismo modo, las proteínas diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas específicas de di-GMPc están regularmente asociadas con dominios accesorios como REC, PAS, GAF, BLUF, NIT (Figura 9) y dominios de unión a ADN como los HTH, y por tanto, esta evidencia lleva a que estos dominios accesorios tienen una función reguladora (Schirmer & Jenal, 2009). Por ejemplo, en un estudio realizado mostró que el oxígeno regula positivamente la actividad de fosfodiesterasa de PdeA1 de *Gluconacetobacter xylinus* a través de un dominio PAS, que contiene un grupo hemo (Chang *et al.*, 2001).

Se propone que la unión al ligando crea un cambio conformacional que afecta la transmisión de la señal al dominio C-terminal. Esta diversidad de dominios de entrada probablemente refleja un rango amplio de señales del entorno que estimula la respuesta en la bacteria (Galperin *et al.*, 2004).

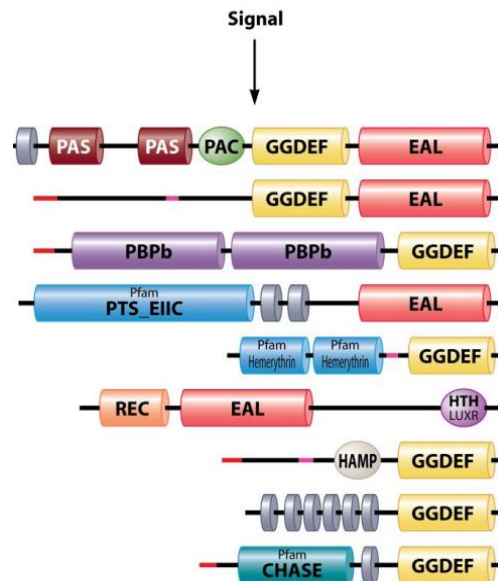


Figura 9| Organización modular de las DGCs y PDEs. Organización modular de diferentes dominios implicados en la detección de una amplia variedad de señales, unidos a dominios de las DGCs y PDEs (Galperin *et al.*, 2005).

Por tanto, pareciera que estos dominios posibilitan a la bacteria a detectar una variedad de estímulos ambientales mayor en bacterias de vida libre (Galperin *et al.*, 2004).

Los dominios GGDEF y EAL (activos o inactivos) se pueden encontrar en la misma cadena polipeptídica. Por ende, dado a su papel de segundo mensajero, que los niveles intracelulares de di-GMPc estén altamente regulados (Stock, 2007).

II.5 La señalización del di-GMPc regula la transición de un estado planctónico a un estado sésil

Dentro de los procesos que regula el di-GMPc, es la transición de estilo de vida planctónico a uno sésil o sedentario.

Las concentraciones intracelulares de di-GMPc pueden ser fácilmente moduladas por la expresión de las proteínas con dominios GGDEF y EAL. Así el control del nivel de concentración del di-GMPc puede establecerse una correlación entre los niveles del di-GMPc y el comportamiento bacteriano (Simm *et al.*, 2004). En *Salmonella enterica* typhimurium altas concentraciones de di-GMPc estimula la formación de biopelícula, la producción de componentes de adhesión a superficie, como la celulosa, “curli”, fimbrias, suprimiendo así la movilidad (Kader *et al.*, 2006; Simm *et al.*, 2004). En contraste bajas concentraciones de di-GMPc inhiben la formación de biopelícula y producción de componentes de adhesión a superficies, y estimula la movilidad swimming y swarming. Esta correlación entre altas concentraciones de di-GMPc y formación de biofilm y bajas concentraciones de di-GMPc y motilidad ha sido establecida por la expresión de proteínas con dominios GGDEF y EAL (Figura 10).

Este mecanismo de regulación de la transición de una etapa multicelular (biopelícula) a estado planctónico o viceversa, así se puede establecer que el di-GMPc regula dos estados fisiológicos diferentes. Sin embargo no todos estos procesos que se establecen en la biopelícula son totalmente regulados por el di-GMPc ya que la transición al estado de biopelícula requiere de interacciones célula-célula, diferenciación morfológica (Fraser, 1999)

Observaciones experimentales han determinado que el desarrollo sofisticado de la arquitectura de la biopelícula multicapa, se requiere de la regulación de la movilidad mediada por flagelo o pilis tipo IV lo cual es regulado a nivel celular. El concepto de regulación dentro de la señalización del di-GMPc puede ser sustancialmente diferente en células individuales así como las que se encuentran embebidas en una matriz extracelular. Así, la señalización del di-GMPc puede determinarse dependiendo de los parámetros ambientales en los que se encuentre la célula.

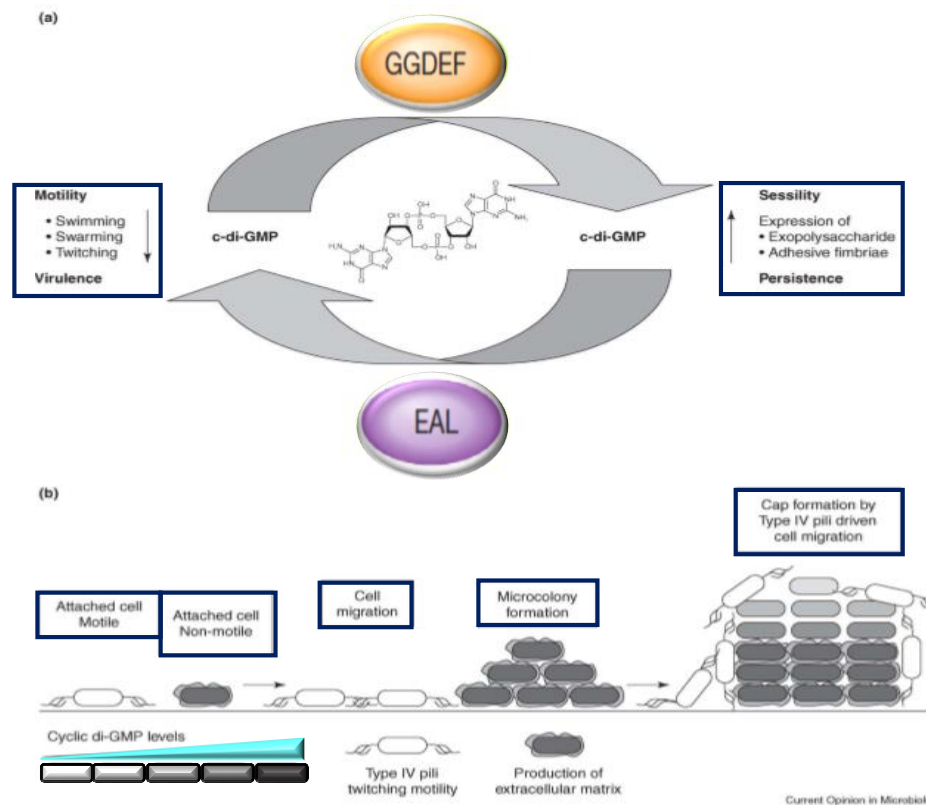


Figura 10| Concepto de regulación del metabolismo del di-GMPc y señalización. (A) Altos niveles de di-GMPc promueven el sedentarismo promovido por la producción de componentes de la matriz extracelular, como polisacáridos, fimbrias. El medio ambiente también puede promover los altos niveles de di-GMPc. Inversamente, bajos niveles de di-GMPc promueven la movilidad (Swimming, swarming, twitching) y virulencia. **(B)** regulación de la señalización del di-GMPc a nivel celular. Las células se adhieren a la superficie y puede mostrar varias concentraciones de di-GMPc dependiendo de si puede promover la movilidad o producción de matriz extracelular. La señalización del di-GMPc fue basada en las observaciones realizadas por Klausen *et al.*, quien describió los requerimientos de la movilidad individual de las células para el desarrollo de una arquitectura sofisticada en la biopelícula (Römling &Amikam, 2006).

Así mismo, en la red señalización del di-GMPc y la regulación del proceso de formación de biopelícula, existen dominios sensores asociados a los dominios GGDEF y EAL, sugiriendo así que las concentraciones de di-GMPc son controladas por un sistema de señalización multicomponente (Galperin *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2001).

Estudios recientes han demostrado que diversos géneros bacterianos emplean concentraciones no letales a niveles sub-micromolares de NO como agentes de señalización para controlar diversos procesos como la formación y dispersión de la biopelícula, movilidad, simbiosis y quorum sensing.

Interesantemente, el grupo de Kjelleberg ha mostrado que el NO medía la actividad de fosfodiesterasa para el proceso de dispersión de la biopelícula en *Pseudomonas aeruginosa* (Barraud *et al.*, 2009), mientras que un rol directo de la señalización de H-NOX/NO controla la formación de biopelícula en el patógeno oportunista *Legionella pneumophila* (Plate & Marletta, 2014).

Los dominios H-NOX (pos sus siglas en inglés heme-nitric oxide/ oxygen binding) forman parte de una familia de hemoproteínas sensoras de NO que unen este gas diatómico tanto afín como selectivamente (Boon *et al.*, 2005; Boon *et al.*, 2006).

Estas proteínas se encuentran asociadas a proteínas de señalización que por lo general se encuentran acopladas a operones H-NOX en conjunto con diguanilato ciclasas (DGCs) y fosfodiesterasas (PDEs), las cuales regulan los niveles de di-GMPc.

Estudios bioinformáticos han revelado que diversos efectores pueden estar asociados a H-NOX, incluyendo proteínas aceptoras de grupos metilo (MCPs), cinasas histidínicas y diguanilato ciclasas (Iyer *et al.*, 2003). Estudios bioquímicos indican que proteínas con dominios H-NOX unidos a NO es capaz de regular la actividad enzimática de los efectores asociados en diversas especies (Price *et al.*, 2007).

III. Antecedentes Directos

En el laboratorio Interacción Bacteria-Planta del ICUAP-CICM, se identificó a partir de una banca genómica de *A. brasilense* Sp7, una secuencia codificante de una DGC putativa (Xiqui *et al.*, 2008). El gen correspondiente a la secuencia codificante fue nombrado *dgcA* (diguamilato ciclasa A). Partiendo de estos datos Moreno en 2011 realizó un estudio sobre la participación de dicho gen en la formación de biopelícula en *A. brasilense* Sp245. Los datos obtenidos no fueron estadísticamente significativos, por lo que concluyó que otras DGCs y PDEs podrían estar implicadas en el proceso. Por tanto, se decidió analizar a las proteínas DGCs y PDEs podrían estar participando y regulando la poza intracelular de di-GMPc.

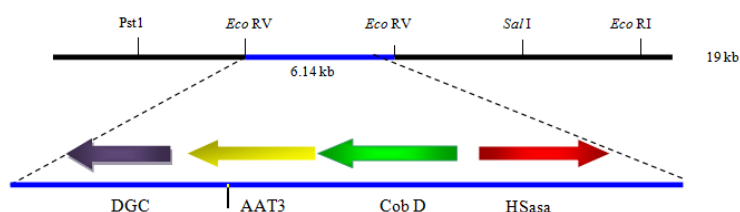


Figura 11| Mapa genético de las secuencias de DGC, AAT3, Cob D y HSasa. Se muestra el esquema del fragmento que contiene la secuencia de genes putativos para las enzimas: Homoespermidina sintasa (HSasa), Diguamilato ciclasa, Aromático aminotransferasa (AAT3), Proteína de síntesis de cobalamina (Cob D) (Xiqui *et al.*, 2008)

Así mismo se estudió la diguamilato ciclasa DgcA que afecta a la formación de biopelícula (59%) y la producción de exopolisacáridos EPS (29%) de manera parcial (Romero-Osorio, 2012). También se analizó el papel del NO producido de manera endógena en la formación de biopelícula, en las cepas de *A. brasilense* Sp245 y la mutante isogénica *napA::Tn5*; Faj164, desprovista de la actividad de la nitrato reductasa periplásmica (Nap), esta mutante solo genera 5% de NO, en comparación con la cepa silvestre, cuando crece en medios con nitrato (NO_3^-), o amonio (NH_4^+), como fuentes de nitrógeno. La producción de biopelícula se determinó por la técnica de cristal violeta y marcando a las células con la proteína verde fluorescente (GFP). En ambos métodos se observó que la mutante produce menos del 50% de biopelícula que la cepa silvestre. La adición de un donador de NO al medio de cultivo mostró que el NO incorporado de manera exógena modificó en la mutante la producción de biopelícula, en el cultivo creciendo en presencia de

NO_3^- , indicando que la actividad de Nap regula de manera positiva la formación de biopelícula en *A. brasilense* Sp245.

Los datos obtenidos indicaron que el NO funciona como una molécula señal en la primeras etapas de la formación de la biopelícula en *A. brasilense* Sp245 (Arreubarrena di Palma *et al.* 2013).

Para la continuación con el estudio de los mecanismos de señalización que conllevan a la formación de biopelícula y con los antecedentes descritos y el análisis bioinformático del genoma de *A. brasilense* Sp245 (Wisniewski-Dye *et al.*, 2011). Empleando las secuencias de ChsA y DgcA, el análisis arrojó que en el genoma de la cepa *A. brasilense* Sp245 existen 31 proteínas que ostentan estos dominios. Debido a esto, el trabajo continuará a analizar algunos ORFs que contengan el dominio GGDEF y su contexto genético, para realizar un estudio que permita elucidar la participación de estas proteínas putativas en la interacción de *Azospirillum*-planta.

IV. Justificación

El sistema de señalización celular en bacterias dependiente del di-GMPc ha tomado importancia debido a que es un regulador central de diversas funciones celulares. Debido a que *Azospirillum* es una bacteria PGPR (Rizobacteria Promotora del Crecimiento de la Planta), es importante estudiar los genes que codifican para las proteínas con actividad de Diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas, las cuales son enzimas reguladoras de las concentraciones intracelulares del di-GMPc, en la cual la regulación esta finamente controlada por las acciones inversas de estas proteínas.

Así mismo es importante el estudio del fenotipo dado por la regulación de los niveles de di-GMPc modulados por DGCs y PDEs a través de su activación por la detección de diversas señales ambientales, dado a que *Azospirillum* se encuentra en un ambiente altamente competitivo, es importante elucidar la participación de estas proteínas en los diferentes procesos los cuales son clave para la colonización de la planta.

V. Objetivos

V.1 Objetivo general

- Determinar el fenotipo dado por las diguanilato ciclasas C (DgcC) y B (DgcB) en *A. brasilense* Sp245, *A. brasilense* 4189-B y *A. brasilense* 102-C

V.1.1 Objetivos particulares

- Determinar el crecimiento en *A. brasilense* Sp245 y la mutantes *A. brasilense* Sp245-4189B y *A. brasilense* Sp245-102C
- Realizar pruebas de movilidad en distintos quimioatrayentes
- Efectuar ensayos de producción de biopelícula y producción exopolisacáridos
- Determinar la actividad de aerotaxis

VI. Material y Métodos

VI.1 Material biológico

Cepa	Descripción	Referencia
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	Cepa silvestre. Obtenida del laboratorio INTA Balcarce, Arg.	Baldani <i>et al.</i> , 1986
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245-4189B	Contiene el gen <i>dgcB::Tc^R</i>	Osorio, 2012
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245-102C	Contiene el gen <i>dgcC::gusA-Sm^R</i> (Dirección 5'-3').	Fernández, 2013

VI.2 Métodos

VI.2.1 Condiciones de cultivo

Las cepas *A. brasilense* Sp245 y la cepa mutante *A. brasilense* Sp245-102C generada se cultivaron en medio mínimo y selectivo: K-Malato, K-lactato y rojo Congo, se crecieron a 30°C.

Para ensayos de movilidad, se realizó en medio mínimo adicionando diferentes quimioatrayentes (Succinato, Lactato, Piruvato, Malato, Fructuosa, Prolina, Glutamato, Gluconato y Fumarato) a una concentración de 34 mM, y una concentración de agar de 0.2%, se incubaron a 30°C, se realizaron tres ensayos independientes para ambas cepas *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 102-C durante 48 h.

Para la determinación de biopelícula y exopolisacáridos, se utilizó medio NFb adicionado con 13.8 mM de NH₄Cl y 13.8 mM de KNO₃, como fuentes de nitrógeno, con una relación de carbono-nitrógeno igual a 2 (Arruebarrena, *et al.*, 2012).

Para los ensayos de aerotaxis se utilizó medio NFb con 13.8 mM de NH₄Cl y 13.8 mM de KNO₃, como fuentes de nitrógeno, con una relación carbono-nitrógeno igual a 2 (Arruebarrena, *et al.*, 2012).

Para la determinación del crecimiento, se utilizó medio mínimo K-Malato. En matraces Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de 50 ml, se inoculó con un pre-cultivo de las cepas a evaluar y se justo a una DO_{600nm} de 0.01. Se tomaron muestras de 0-12 hrs cada tres horas, a partir de las 13 h se midieron cada hora hasta las 24 hrs.

Antibiótico utilizado en este trabajo: Streptomicina (Sm) 50mg/ml.

VI.2.2 Ensayos de movilidad

Partiendo de un inóculo en medio D, a una DO_{600nm} de 0.96-1.1, se centrifuga 1 ml de cultivo a 6,000 rpm y se concentra 10 veces, se toman 5 µl y se colocan en la placa de medio mínimo (Base K) adicionada con diferentes quimioatrayentes ([34 mM]) en agar suave (0.2%), a las 48 h en ambas cepas *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 102-C, se determinó el diámetro de los anillos quimiotácticos generados, efectuando por triplicado e independientes los ensayos.

VI.2.3 Determinación de la producción de biopelícula

Partiendo de un cultivo en placa de RC, se inoculó 12 ml de medio LB*, con 1-3 colonias de *Azospirillum* previamente crecidas por 3 días a 30°C en medio RC. Los cultivos se llevaron a una DO_{590 nm} de 1.1-1.4, se centrifuga a 5000 rpm 1 ml del cultivo y se resuspenden con buffer de fosfato pH 7 (BF 66 mM) para obtener una DO de 2, el volumen de BF se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Vol. BF para re-suspender (ml)} = \text{DO cultivo} / \text{DO 2}$$

De esta suspensión que posee una DO= 2, realizar una dilución 1:100 con medio NFb (relación C/N=2). Sembrar en placas (cultivo celular SARSTEDT 24 pozos) con 2 ml de medio correspondiente, colocar la placa cuidadosamente en la incubadora en condiciones estáticas, en cámara húmeda, durante 5 días a 30°C.

Por cada cepa, realizar dos placas independientes con 3 réplicas por separado con 9 pseudoréplicas, ya que una de estas se utiliza para determinar biofilm por cristal violeta (CV) y otra para determinar crecimiento total por DO, una vez transcurridos los 5 días, a la placa para determinar la formación de biopelícula, agregar a cada pozo 0.5 ml de CV al 0.5% en cada pozo y dejar por 30 minutos a temperatura ambiente; se decantan las placa y realizar dos lavados cuidadosamente, dejar secar para eliminar el agua, para extraer el CV adherido a la biopelícula, agregar 2 ml de ácido acético al 33%, se resuspende suavemente hasta que se homogenice la biopelícula, posteriormente tomar 0.2 ml de cada pozo y colocar en una placa de Elisa, para medir al espectrofotómetro a una DO_{590nm} .

Conjuntamente, para la normalización de la producción de biopelícula, se realiza la determinación de proteínas totales por el método de Bradford.

Se homogeniza cuidadosamente cada pozo y se recolectan las células a 8000 rpm durante 3 minutos de ambas cepas silvestre y mutante; el paquete celular obtenido se lava con PBS (Buffer de fosfato salino pH 7) y se resuspende en 1ml del mismo, posteriormente se agrega 2 ml de NaOH 1N para 1 ml de cultivo, se calienta a ebullición durante 5 minutos, después de agrega 2 ml de HCl 0.5 N también para 1 ml de cultivo y se homogeniza bien la muestra, se tiene un volumen final de 4 ml que se recolectan a 10,000 rpm por 3 minutos.

Posteriormente, cada una de las muestras se sonicar a una amplitud de 60 Hertz a 5 pulsaciones durante 1 minuto (Si se requiere, prolongar el tiempo de sonicación a la misma amplitud y pulsaciones).

Ya sonicadas las muestras se toman 200 μ l de la solución ya sonicada (o la cantidad necesaria de la muestra), para cuantificar las proteínas se adicionan 200 μ l del reactivo de Bradford, para llevar a 1 ml de volumen final agregar el volumen restante de H₂O y cuantificar al espectrofotómetro a 595 nm.

VI.2.4 Determinación de unión de EPS a rojo Congo (RC)

La cuantificación de EPS se determina por la capacidad de unión del colorante aniónico rojo Congo a EPS ácidos, (Modificado de Spiers *et al.*, 2003). Se inoculan 12 ml de medio LB*, con 1-3 colonias de *Azospirillum* previamente crecidas por 3 días a 30°C en medio RC. Medir DO_{590nm}. Los cultivos deben tener una DO_{590nm} de 1-1 a 1.4. Centrifugar a 5000 rpm 1 ml de cultivo y resuspender con BF (66mM) para obtener una DO de 2.

De esa suspensión que posee una DO=2, realizar una dilución 1:100 con medio NFb (relación C/N=2), sembrar en tubos de 3 ml de medio correspondiente. Colocar los tubos a incubar en condiciones estáticas, en cámara húmeda, durante 3 días a 30°C. Transcurridos 3 días, recolectar las células y EPS por centrifugación a 10, 000 rpm por 3 minutos. Lavar el paquete celular con 1 ml de medio.

Resuspender el paquete lavado en 1 ml de medio NFb (adicionado con KNO₃ ó NH₄Cl a una concentración de 13.8 mM), adicionar una solución de RC a 40 µg/ml e incubar 2 h a 30°C con agitación a 200 rpm. Recolectar las células y los EPS por centrifugación a 13, 000 rpm por 5 minutos. Leer el sobrenadante a una DO_{490nm}. Para cuantificar los miligramos de RC unido a las células, se realizan lo siguiente:

Leer 1 ml con 40 µg/ml, a un DO_{490nm} conjuntamente con las muestras a evaluar. Teniendo la absorbancia determinada de los µg/ml de RC en el sobrenadante,

$$\begin{aligned} 40 \mu\text{g/ml} & \text{---} 1.3 \text{ DO}_{490\text{nm}} \\ X & \text{---} 0.7 \text{ DO}_{490\text{nm}} \\ X & = 21.53 \mu\text{g/ml en el sobrenadante} \end{aligned}$$

Con los µg/ml del sobrenadante se resta a lo de los 40 µg/ml que se colocaron a todos los tubos.

$$40 \mu\text{g/ml} - 21.53 \mu\text{g/ml} = 18.46 \mu\text{g/ml unidos a EPS}$$

Con este dato se relaciona con la cantidad de proteínas totales del cultivo.

VI.2.5 Determinación de actividad de aerotaxis

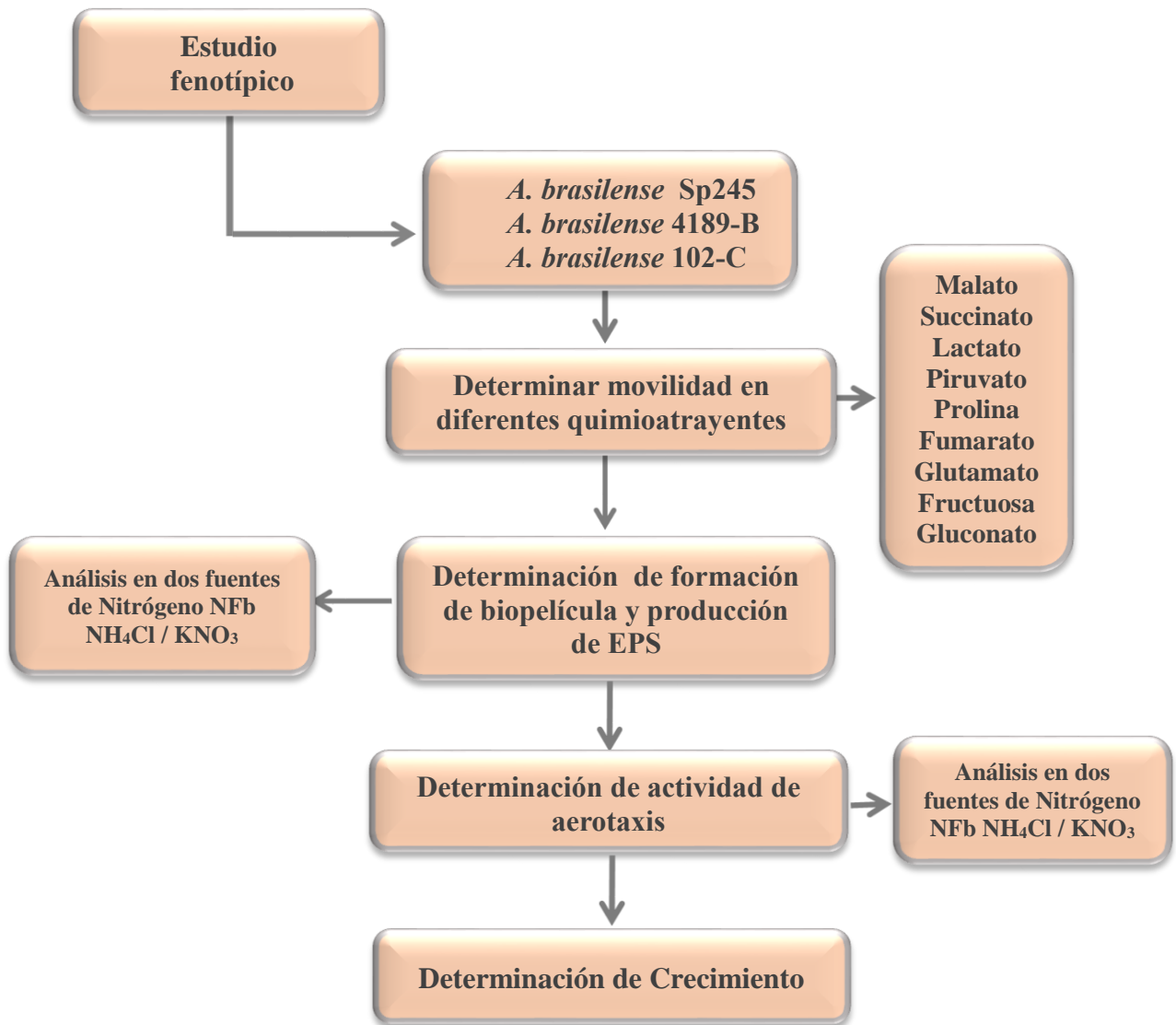
Partiendo de un inóculo en medio D, a una DO_{600nm} de 0.96-1.1, se centrifuga 1 ml de cultivo a 6000 rpm, se toman 10 μ l y se colocan en tubos de medio NFb con 13.8 mM de NH_4Cl y 13.8 mM de KNO_3 , como fuentes de nitrógeno, con una relación carbono-nitrógeno igual a 2, con agar suave (0.2%), se incuban a 30°C, en condiciones estáticas, a las 72 h se mide el desplazamiento de las cepas *A. brasilense* Sp245 y cepas mutantes, para obtener el desplazamiento se mide desde el menisco hacia abajo, en donde se encuentre la formación de la banda aerotáctica, se efectúan los ensayos por triplicado, independientes.

VI.2.6 Determinación de crecimiento

Se parte de un pre-cultivo en medio K-Malato con 5 ml de volumen con 1-3 colonias de una placa de RC previamente incubadas a 30°C por 48 h de las cepas *A. brasilense* Sp245 y las cepas mutantes.

Se inoculan matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de volumen con el pre-cultivo, con las cepas a evaluar, se ajusta cada uno a una DO_{600nm} de 0.01. Posteriormente se toman muestras de 0-12 h, con intervalo de tres horas, a partir de la 13h tomar muestra cada hora hasta las 24h. Las muestras fueron evaluadas por espectrofotometría y por número de colonias (UFC) en medio rojo congo.

VI.3 Esquema de Trabajo



VII. RESULTADOS

VII.1 Análisis *in silico* del gen *dgcB*

El CDD de NCBI y ScanProsite de ExPASy se analizó la secuencia aminoacídica de la proteína DgcB, se localizaron los dominios conservados de la proteína (Figura 12), el análisis indica que la proteína DgcB contiene el dominio MHYT, que consiste en seis segmentos transmembranales que están proyectados hacia la cara externa de la membrana citoplasmática, que se encuentra en los sensores de tipo cinasa histidínica, la función de este dominio aún no se ha elucidado, debido a su topología, indica que los residuos conservados podrían coordinar iones cobre sugiriendo un rol en el sensado de O₂, CO y NO, se encuentra también un dominio PAS-PAC, el cual es un dominio sensor que está relacionado con sistemas de transducción de señales, el cual detecta O₂, voltaje, potencial redox e hidrocarburos aromáticos, acoplados a estos dominios sensores se encuentran los dominios GGDEF y EAL que se encuentran conservados en diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas, lo cual probablemente se trate de una proteína bifuncional.

A.

MMRVYACITQQHDLWLVLLAGAVCGFGAWVSLNLARRAAA AVGRARRGWLAGAATATGGGVWATHFIA
MLAFQTS LPTGYDVGLTVLSSLIAIGGAAV GIRHAIGGGRLAAPLGGAIAGAAATAMHFTGMAALQV PANLH
YDPIYVAVALGLGVLLAGAGFTAALRIGSLKGLAAGAALLALGICGLHFTGMAGVTLIPDPLHDMSDQIMEPG
LLAVAI AVTATVVMALGLAGAIVDQRLAARTAEHAARL RASEERFRQLADATTEGIVHRDGVVLDVNRAMA
ELLGK PQAQFIGQSMLRFV VQNRSDIERKLAQPTSERVELDLLHDDGTLVMVEAHGQDITHEGRPARVVAV
RDIRERKRAEERIRHMAHHDLLTGLPNRSLFLDRLNGALASAGRARTGVAVLYLDLDRFKAVNDLLGHPAGD
RLLQEMARRM LEAVPSHDTVARLSGDEF AVLHRIAQPGEALALADRLVKALGAPAE LDGQRMVVGTSV GIA
LFPQDGSSAEALLQHADTALYRAKSEGRGTRFFFEAAMDERLQARRGLERDLRQALSDGALSVHYQPLEDCR
THRILGF EALVRWNHPERGMIPPSEFVPLAESGLVMQLGEFVLR TACRDARNWDPVKVAVNLSPIQFRHS
DLPATILGILEEGLPPHRLIEIVTEGVMIDDERALAAALTALKAAGVRIALDDFGTGYSSLSYLQKFTFDKLIKDR
SFVQLMAENRESLSIIRTILALAKSLDI AVTAEGVETEEQRTLLKNESC NQLQGYLIGRPVPACELARFYEPA

B.

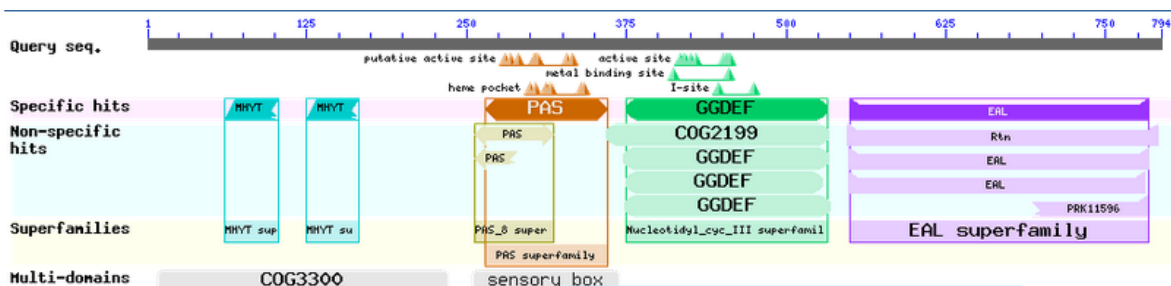


Figura 12|Análisis *in silico* de la proteína DgcB putativa. (A) Secuencia de aminoácidos de la DgcB putativa que está constituida por 794.a.a. (B) Estructura de los dominios conservados presentes en la proteína DgcB putativa (MHYT, PAS, GDEF y EAL).

VII.2 Análisis de movilidad en *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 4189-B

La movilidad en la cepa silvestre y la cepa mutante 4189-B se analizó en diferentes quimioattractantes como fuente de carbono con una concentración de 34 mM, el análisis de movilidad en medio con Prolina el halo de desplazamiento que presenta de la cepa silvestre y la cepa mutante *A. brasilense* 4189-B es de 8.13 cm y 3.4 cm respectivamente, teniendo así un 41.82% de disminución en la cepa mutante. En tanto, en malato el desplazamiento en la cepa silvestre es 5 cm y en la cepa mutante 2.7 cm, el porcentaje de disminución es del 54% con respecto a la cepa silvestre (Figura 13).

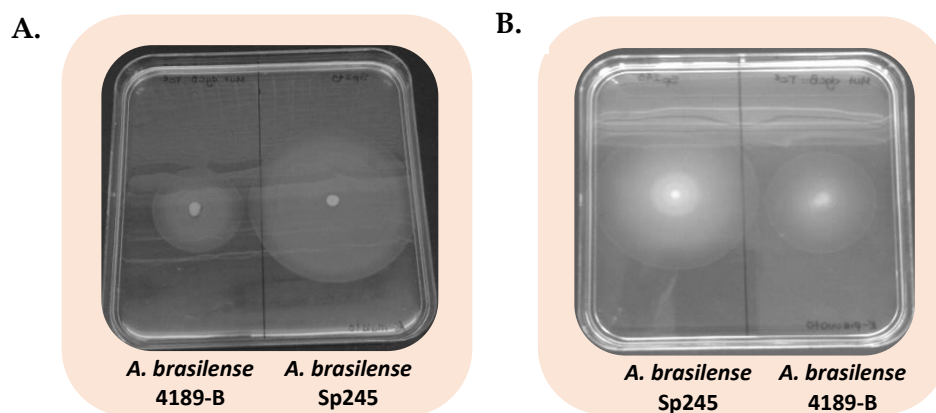
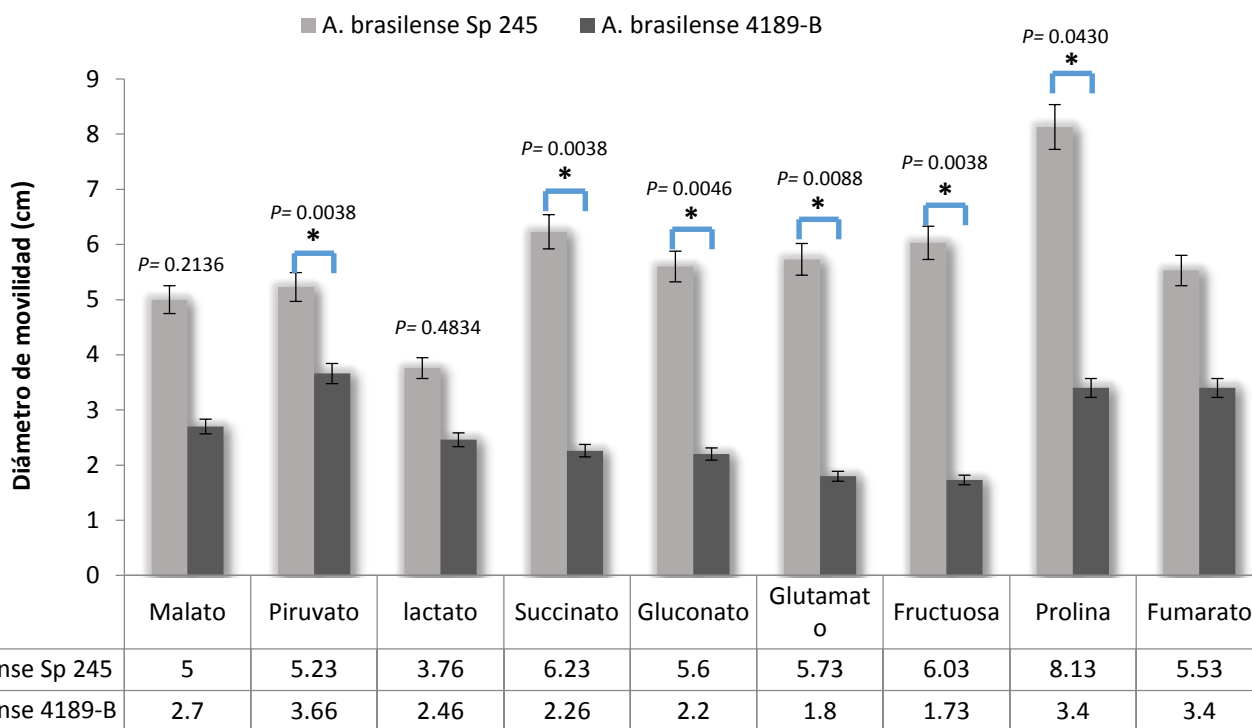


Figura 13| Movilidad en placa de *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 4189-B. Placas con agar semisólido 0.2%. **A)** Desplazamiento en malato a las 48 hrs de inoculación. **B)** Desplazamiento en piruvato a las 48 hrs de inoculación.

Se analizó la movilidad en otros quimioattractantes (concentración 34 mM), en el cual se observa que también se muestra una disminución de la movilidad en la cepa mutante *A. brasilense* 4189-B con respecto a la cepa silvestre, los resultados obtenidos se muestran en la gráfica 1, en donde se puede observar el decremento en los diferentes compuestos analizados, así observando que el fenotipo de la movilidad en la cepa *A. brasilense* 4189-B muestra diferencia significativa en comparación con la cepa silvestre, todos los datos son estadísticamente significativos excepto en malato y lactato.

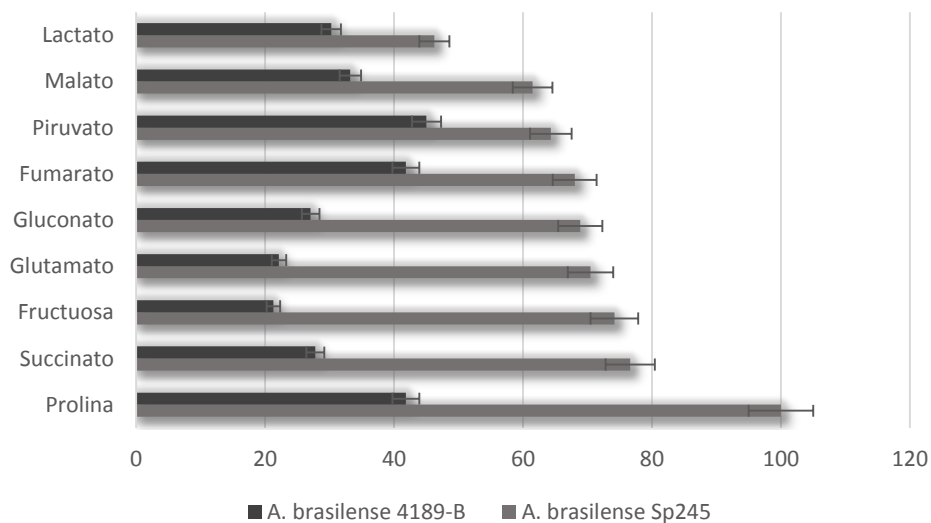
La diferencia de longitud de desplazamiento en cada uno de los quimioattractantes se muestra en la gráfica 2, el desplazamiento se muestra en porcentaje que es relativo a la cepa silvestre (se muestra como 100%), y la mutante con respecto a la cepa silvestre.

Movilidad



Gráfica 1| Movilidad en placa de *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 4189-B. Movilidad realizada con distintos quimioattractantes a 48 hrs. Las barras de error representan desviaciones estándar de datos de tres repeticiones independientes. El valor de P representado es significativamente estadístico, * Representa una diferencia estadística.

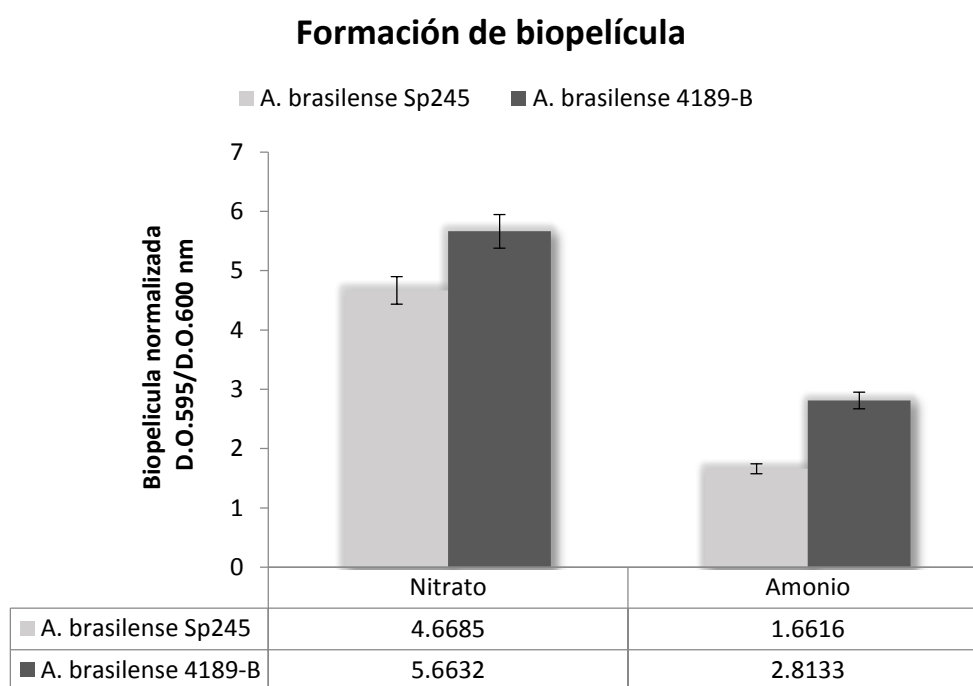
% del diámetro de desplazamiento



Gráfica 2| Porcentaje de movilidad en placa de *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 4189-B. El promedio del desplazamiento en placa es expresado en porcentaje relativo de la cepa silvestre (definido como el 100%) y la mutante con respecto a la cepa silvestre. Las barras de error representan desviaciones estándar de tres repeticiones independientes.

VII.3 Análisis de formación de biopelícula

El análisis de la capacidad de formación de biopelícula se evaluó en dos diferentes fuentes de nitrógeno, utilizando medio NFb suplementado con KNO_3 y NH_4Cl independientemente cada uno con una relación C/N=2, la formación de biopelícula se cuantificó por medio de CV. Los datos obtenidos en la cepa mutante *A. brasilense* 4189-B se muestran incrementados comparados con la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245, sin embargo en ambas fuentes de nitrógeno no existe diferencia estadísticamente significativa (Gráfica 3).



Gráfica 3| Formación de biopelícula en condiciones estáticas de crecimiento en *A. brasilense* Sp245 y la mutante *A. brasilense* 4189-B. *A. brasilense* Sp245 y la cepa mutante fueron cultivadas por 3 días en placas de poliestireno de 24 pozos en medio NFb suplementado con 13.8 mM de NH_4Cl y 13.8 mM de KNO_3 como fuente de nitrógeno, se cuantificó por cristal violeta. La biopelícula se normalizó con crecimiento celular. Los valores dados representan 3 ensayos independientes con cuatro replicas cada uno. Los datos no son estadísticamente significativos.

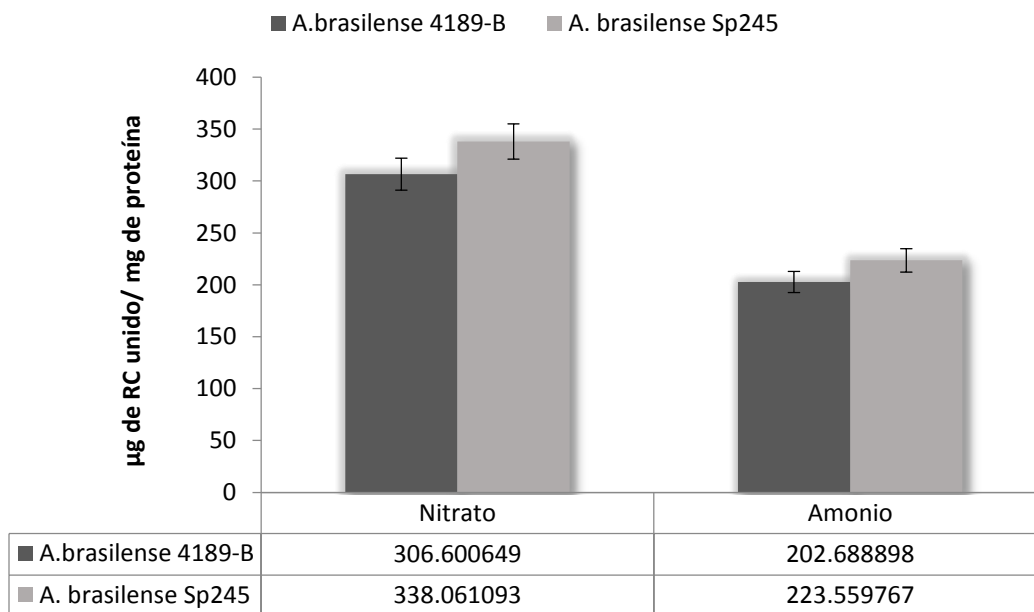
Se estimó la capacidad de formación de biopelícula a las 72 h donde el anclaje ya se muestra más fuerte. Las dos fuentes de nitrógeno fueron introducidas al medio para observar el fenotipo de biopelícula bajo estas condiciones. En la Grafica 3 podemos observar que la mayor producción es en nitrato con respecto a amonio. Debido a esto, la capacidad de formación de biopelícula se observa mejor en medio adicionado con NO_3 .

Las diferencias observadas en la mutante con respecto a la cepa silvestre no son tan marcadas, sin embargo, el aumento en la mutante 4189-B es de 121.45% relativo a la cepa silvestre en nitrato, en amonio aumenta un 60.08% con respecto a la cepa silvestre.

VII.4 Determinación de producción de exopolisacáridos (EPS)

La determinación de exopolisacáridos se analizó por medio de la unión al colorante aniónico Rojo Congo, se determinó a las 72 h en cultivos estáticos con dos diferentes fuentes de nitrógeno KNO_3 y NH_4Cl a una concentración de 13.8 mM.

Unión de RC a exopolisacáridos

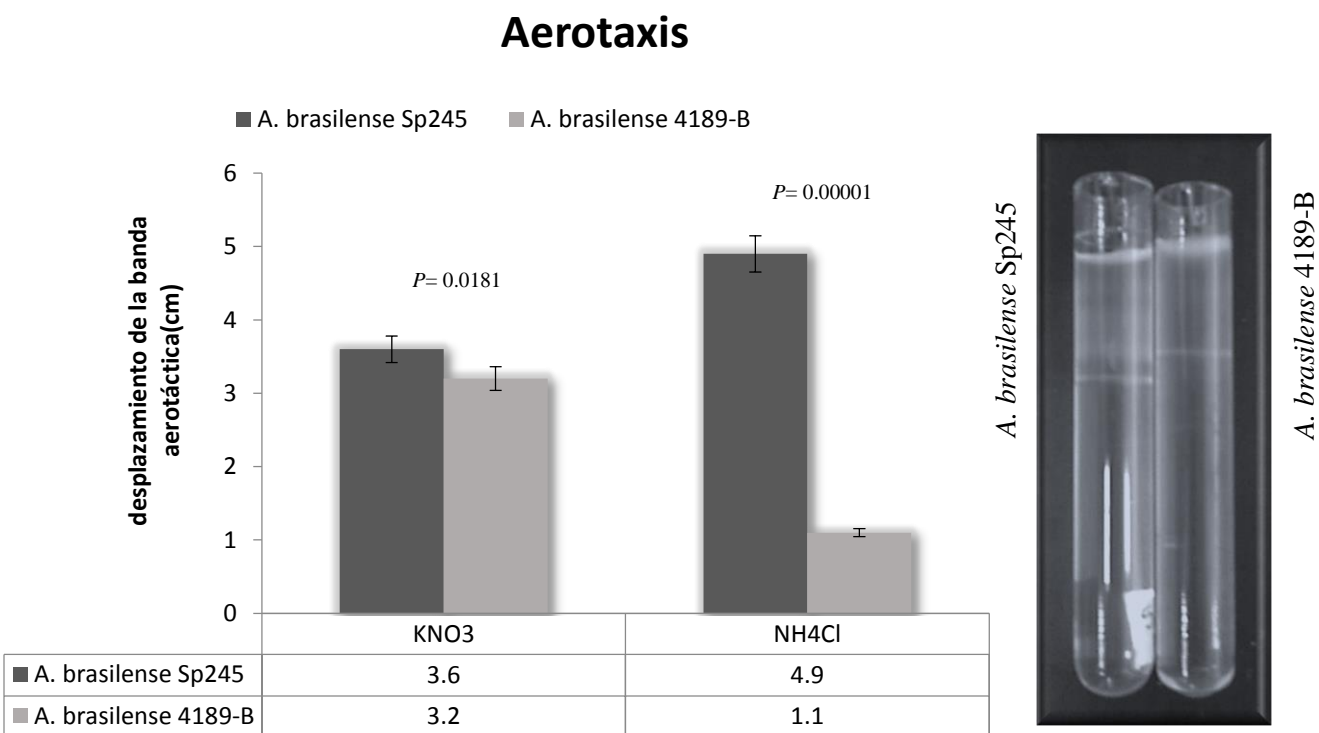


Gráfica 4| Producción de exopolisacáridos por unión a RC. La determinación se realizó en medio NFb KNO_3 y NH_4Cl , en condiciones de crecimiento estáticas de las cepas *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 4189-B. Las barras representan el promedio de tres ensayos independientes, con la desviación estándar correspondiente. Los datos presentados no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Debido a los resultados obtenidos en la formación de biopelícula, se determinó la producción de exopolisacáridos por unión a rojo congo, esto va unido debido a que los exopolisacáridos son un componente importante en la biopelícula, los datos obtenidos en ambas cepas no hay diferencias estadísticamente significativas.

VII.5 Análisis de Aerotaxis

Se estimó la actividad de aerotaxis con dos fuentes de nitrógeno en KNO_3 y NH_4Cl , la mutación de *A. brasilense* 4189-B una disminución en la longitud desplazada presentó diferencia estadística relevante en el desplazamiento de la banda aerotáctica en NH_4Cl , mientras que en KNO_3 no se observa una diferencia con respecto a la cepa *A. brasilense* Sp245 (Gráfica 5) (Figura 14).

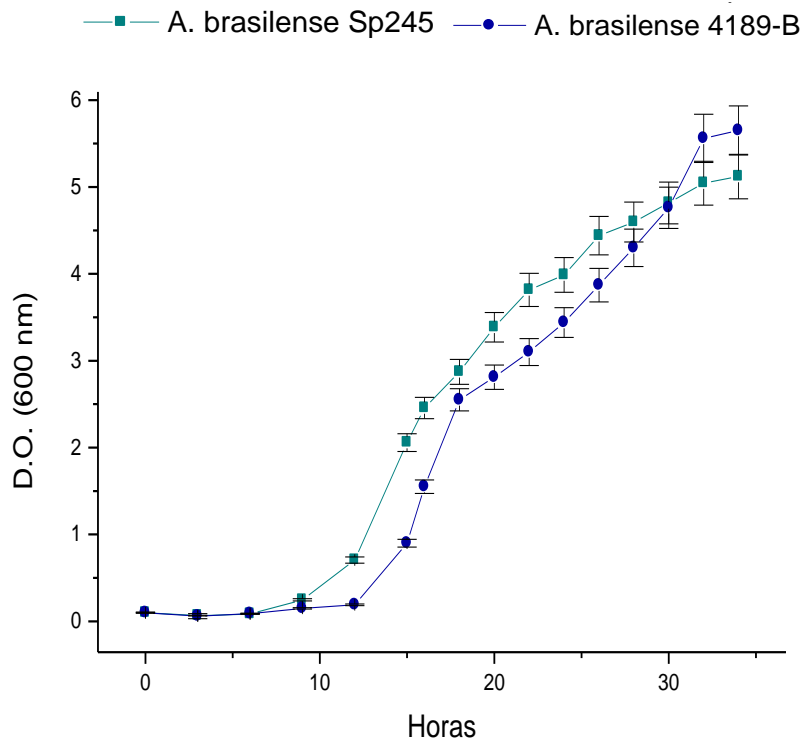


Gráfica 5| Aerotaxis de *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 4189-B. La determinación de aerotaxis se realizó en medio NFb suplementado con NH_4Cl y KNO_3 . Los ensayos se realizaron por triplicado independientes. **Fig. 14|** Tubos de aerotaxis en NH_4Cl como fuente de nitrógeno.

VII.6 Evaluación de crecimiento

La curva de crecimiento se realizó en medio enriquecido LB* (modificado) en ambas cepas, la mutación *A. brasilense* 4189-B no modificó el crecimiento con respecto a la cepa silvestre, ya que el tiempo de generación de la cepa mutante no presenta un retraso significativo (Gráfica 6).

Curva de crecimiento de *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 4189-B en LB*



Gráfica 6 | Curva de crecimiento *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 4189-B. Las lecturas se realizaron a D.O. 600 nm durante 34hrs. Las barras de error representan desviaciones estándar de datos de tres repeticiones independientes.

VII.7 Análisis *in silico* del gen *dgcC*

Se realizó el análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la proteína DgcC en CDD de NCBI y ScanProsite de ExPasy, el análisis indica que la proteína DgcC contiene un dominio REC, dominio receptor de señal, el cual recibe la señal a partir de un sistema de doble componente, contiene un sitio fosfoaceptor (residuo aspártico), el cual es fosforilado por una cinasa histidínica río arriba seguido a este mostró un motivo conservado GGEEF una variación del motivo GGDEF que caracteriza a las enzimas diguanilato ciclasas (Figura 15 y 16).

- A. **MRVLIADDTVLMRTMLSEQVASYGHDVILARDGREALNLAQAESFDIAIIDWEMPRLSGLEVCWLLKAD
PRTAYSYLILMTSHDEPFYEMKALDAGADDFIHKPVNRAHLKARLKAGGRITEMHRLVLAQAQTDPLTG
VANRRALLDRAGEEIRRAQRARQPLSLIADIDHFKRINDSRGHAAGDEALQRFVRTLDGALRPGDLIGRY
GGEEFVLLPNTALADASVVAERLRQRVASQEMGPDGDSFRMTASFGVAPVAPDAPGGIDDALRTADA
ALYRAKAEGRNRRVVPSP**
- B.

	Descripción	Start	End
Regulador de respuesta D	RR dominio receptor 4-aspartil fosfato posición 51	2	118
GGDEF	Dominio GGDEF	161	294

Figura 15| Análisis *in silico* de la DgcC putativa. (A) Secuencia de aminoácidos de la DgcC putativa que está constituida por 294 a.a. (B) Posiciones de los dominios REC y GGDEF de la DgcC putativa.

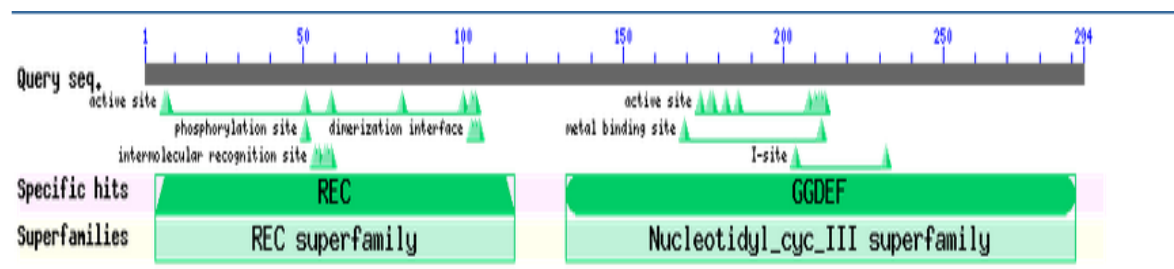


Figura 16| Esquema de los dominios conservados en la DgcC putativa. Obtenidos a partir del análisis en CDD de NCBI.

VII.8 Análisis del dominio GGDEF conservado de DgcC

En WebLogo Tool se analizó la secuencia de aminoácidos de la proteína DgcC alineada con la secuencia de aminoácidos de PleD de *C. crescentus* y WspR de *P. aeruginosa* que presentan la misma organización modular de dominios, el análisis indica que en las tres secuencias alineadas se encuentra conservado el dominio GGDEF característico de las diguanilato ciclasas (Figura 18, 19).



Figura 17 | Secuencias de dominios GGDEF conservados. A) Secuencia de aminoácidos PleD de *C. crescentus*. B) Secuencia de aminoácidos de *A. brasilense* Sp245. C) Secuencia de aminoácidos WspR de *P. aeruginosa*.

El sitio A corresponde al motivo GGDEF, el cual se encuentra conservado en *A. brasilense* en relación con PleD y WspR que ya han sido descritas. Así, las mayoría de las diguanilato ciclasas están sujetas a un mecanismo de inhibición alostérica, el cual involucra la unión del di-GMPc a un segundo sitio, denominado sitio I caracterizado por el motivo RXXD, el cual está separado del sitio A por un conector que comprende cinco aminoácidos, el cual también se encuentra conservado en *A. brasilense*.



Figura 18 | Secuencias de dominios conservados de Diguanilato ciclasas. Secuencias provenientes de *C. crescentus* (PleD), *P. aeruginosa* (WspR) y *A. brasilense* (DgcC). La altura de cada letra refleja la frecuencia relativa de los aminoácidos correspondientes en cada posición.

VII.9 Análisis de la movilidad en *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 102-C

El análisis de movilidad en medio K-malato con agar semisólido (Agar 0.2%) de *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 102-C, muestra un halo de movilidad de 5.56 cm y 2.36 cm respectivamente, con disminución de la movilidad del 57.5% en la cepa mutante *A. brasilense* 102-C. Mientras que en lactato el halo de movilidad presenta en la cepa silvestre 4.66 cm y en la cepa mutante 1.26 cm, teniendo un porcentaje de 59.92%, en medio con fructuosa el desplazamiento dado en la cepa *A. brasilense* Sp245 es de 4.66 cm y la mutante 1.26 cm con un porcentaje del 59.9% de disminución (Figura 20).

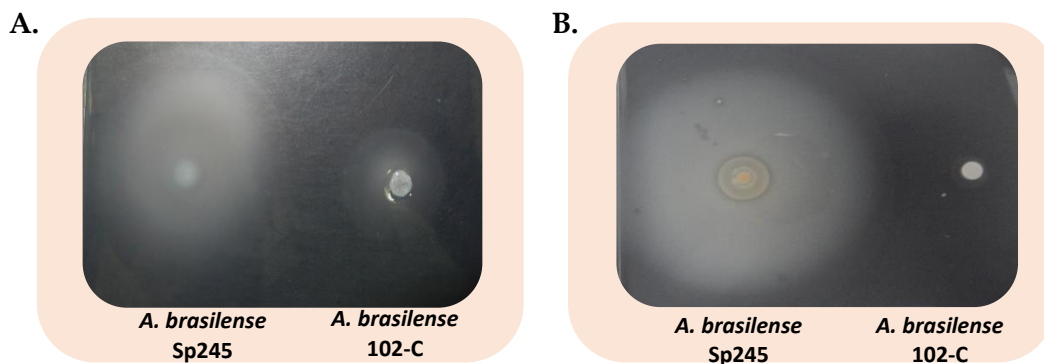


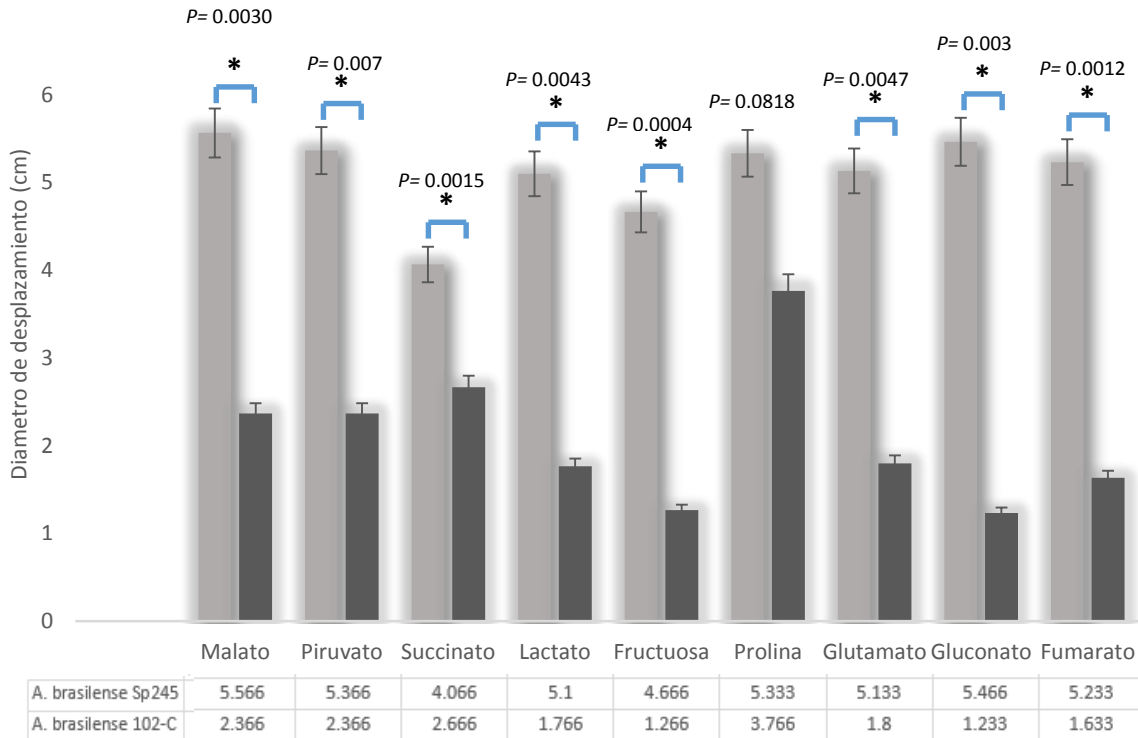
Figura 19| Movilidad en placa de *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 102-C. Placas con agar semisólido 0.2%. **A)** Desplazamiento en fructuosa a las 48 hrs de inoculación. **B)** Desplazamiento en lactato a las 48 hrs de inoculación.

Se probaron diferentes fuentes de carbono (Aminoácidos, Azúcares y ácidos orgánicos), como quimioattractantes: Prolina, Fumarato, Gluconato, Succinato, Glutamato y Piruvato a la misma concentración (34mM) con 0.2% de agar suave para la cepa silvestre y la cepa mutante *A. brasilense* 102-C, los resultados se muestran en la gráfica 1, en donde se observa la disminución de la movilidad en los diferentes quimioattractantes, así observando que el fenotipo dado por la mutante *A. brasilense* Sp245-102C es disminuido, todos los datos son estadísticamente significativos excepto en el medio con Prolina.

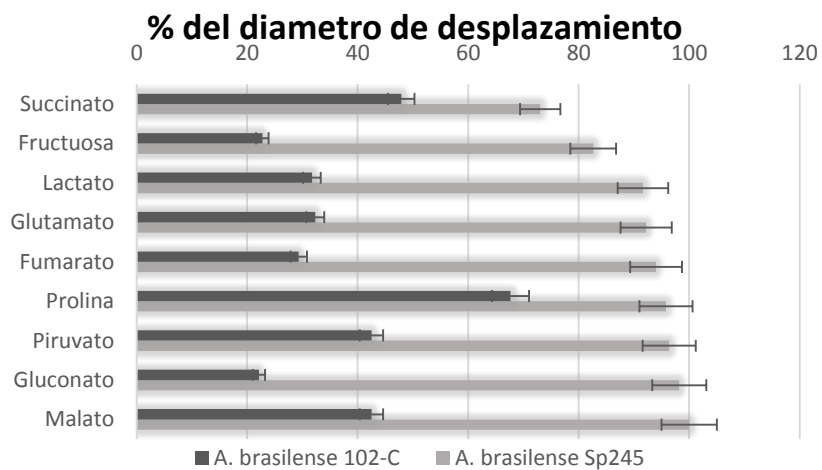
La disminución del desplazamiento de los anillos quimiotácticos en los diferentes quimioattractantes evaluados se muestra en la gráfica 2, donde el desplazamiento es expresado en porcentaje relativo a la cepa silvestre (definido como 100%) y la mutante con respecto a la cepa silvestre.

Movilidad

■ A. brasilense Sp245 ■ A. brasilense 102-C



Gráfica 7| Movilidad en placa de *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 102-C. Movilidad realizada con distintos quimioattractantes a 48 hrs. Las barras de error representan desviaciones estándar de datos de tres repeticiones independientes. El valor de P representado es significativamente estadístico, * Representa una diferencia estadística.

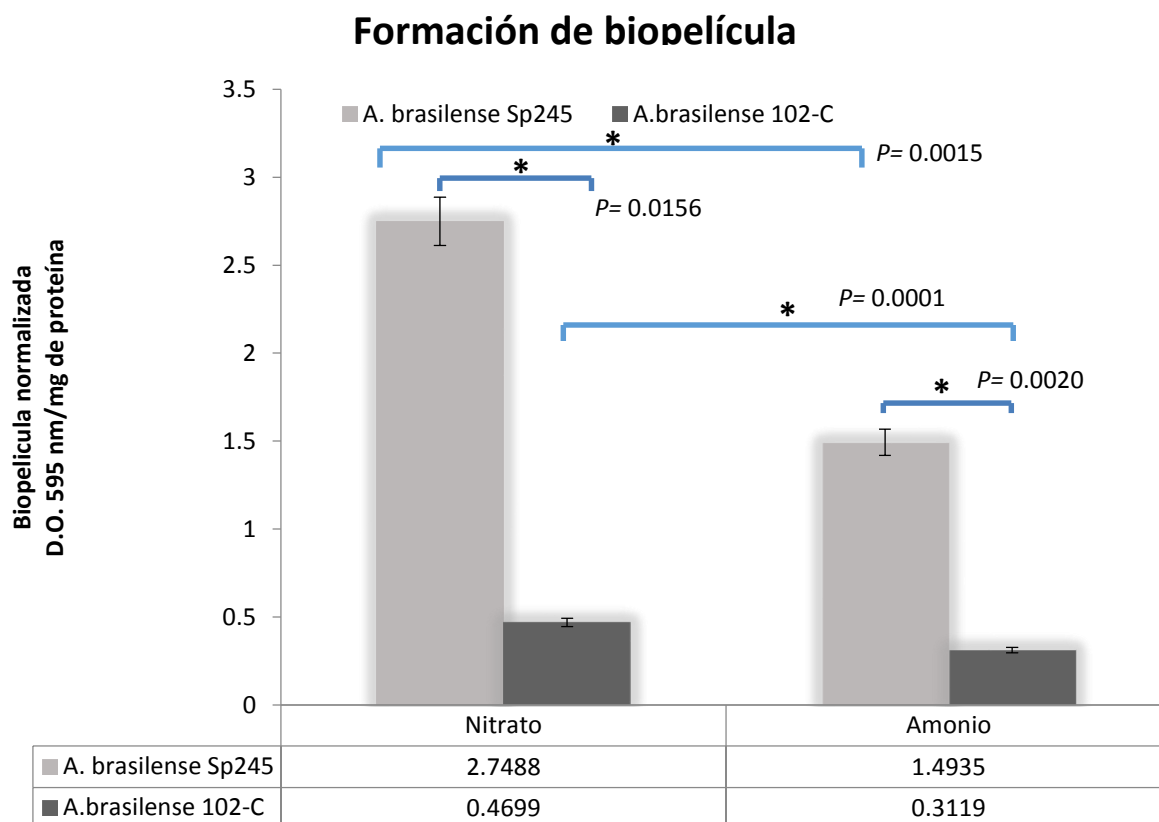


Gráfica 8| Porcentaje de movilidad en placa de *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 102-C. El promedio del desplazamiento en placa es expresado en porcentaje relativo de la cepa silvestre (definido como el 100%) y la mutante con respecto a la cepa silvestre. Las barras de error representan desviaciones estándar de tres repeticiones independientes.

El fenotipo obtenido en la cepa silvestre nos indican que los compuestos evaluados algunos parecen ser mejores quimioattractantes (compuestos que pueden metabolizarse), en cuanto a la cepa *A. brasilense* 102-C la disminución que presenta en la movilidad, podría deberse a la mutación que presenta.

VII.10 Análisis de formación de biopelícula

Las cepas *Azospirillum brasilense* Sp245, y la cepa mutante *A. brasilense* 102-C fueron analizadas para determinar la habilidad de producir biopelícula en dos fuentes de nitrógeno, utilizando medio NFb suplementado con KNO_3 y NH_4Cl con una relación C/N=2, en condiciones estáticas de crecimiento, y cuantificado con cristal violeta. La cantidad de biopelícula producida en cada fuente de nitrógeno fue significativamente diferente.



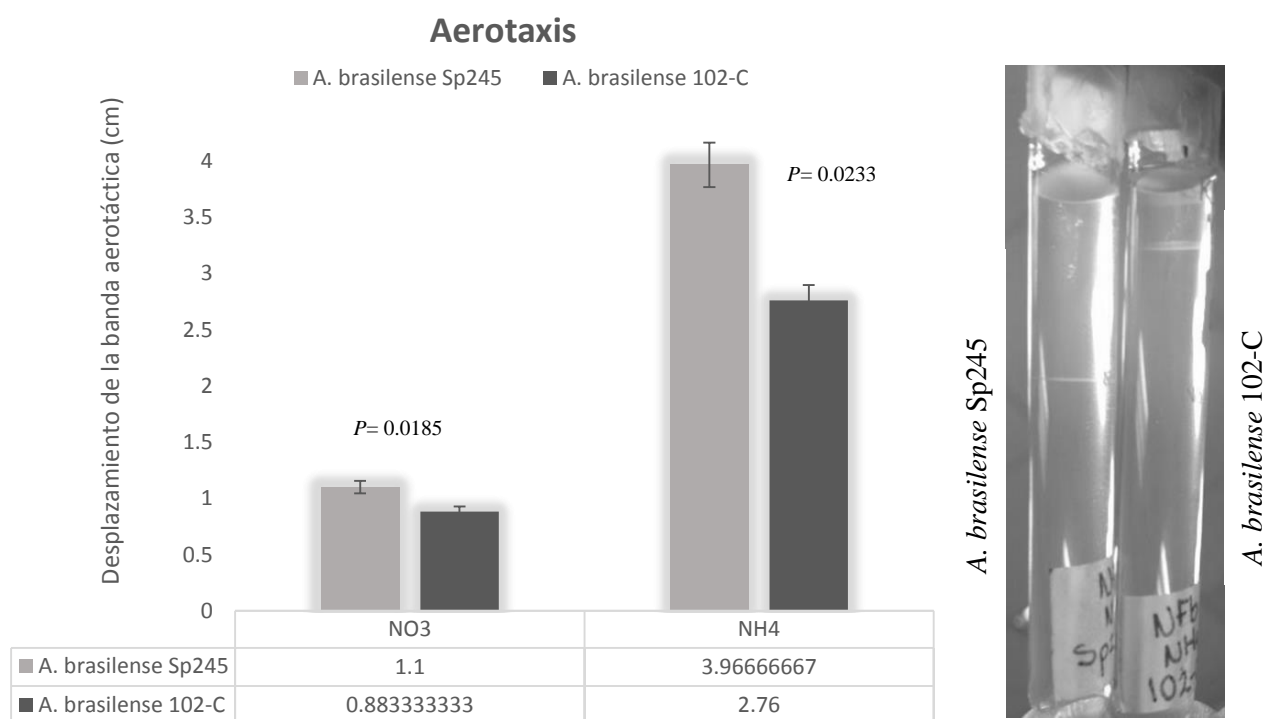
Gráfica 9| Formación de biopelícula en condiciones estáticas de crecimiento en *A. brasilense* Sp245 y la mutante *A. brasilense* 102-C. *A. brasilense* Sp245 y la cepa mutante fueron cultivadas por 5 días en placas de poliestireno de 24 pozos en medio NFb suplementado con 13.8 mM de NH_4Cl y 13.8 mM de KNO_3 como fuente de nitrógeno, se cuantificó por cristal violeta y normalizado por miligramo de proteína. Los valores dados representan 3 ensayos independientes con cuatro replicas cada uno.

En medio suplementado con NH_4Cl , la formación de biopelícula se encuentra disminuida en la cepa mutante en comparación con la silvestre, se evaluó la formación de biopelícula a las 120 hrs donde la adherencia fue más fuerte (Gráfica 9).

La mayor formación de biopelícula se observó en medio NFb KNO_3 , mostrando que la cepa silvestre tiene mayor capacidad de formación de biopelícula en este medio teniendo un 55.18% de disminución, en cuanto a la disminución de la cepa mutante 102-C con respecto a la silvestre es de (Gráfica 9), que en el medio NFb NH_4Cl , sin embargo, la formación de biopelícula en ambas fuentes de nitrógeno es significativa en las dos cepas. Las diferencias observadas entre cada cepas tanto en KNO_3 y NH_4Cl son significativamente marcadas, así lo datos presentados en la gráfica 9 son estadísticamente significativos en ambas fuentes de nitrógeno.

VII.11 Análisis de Aerotaxis

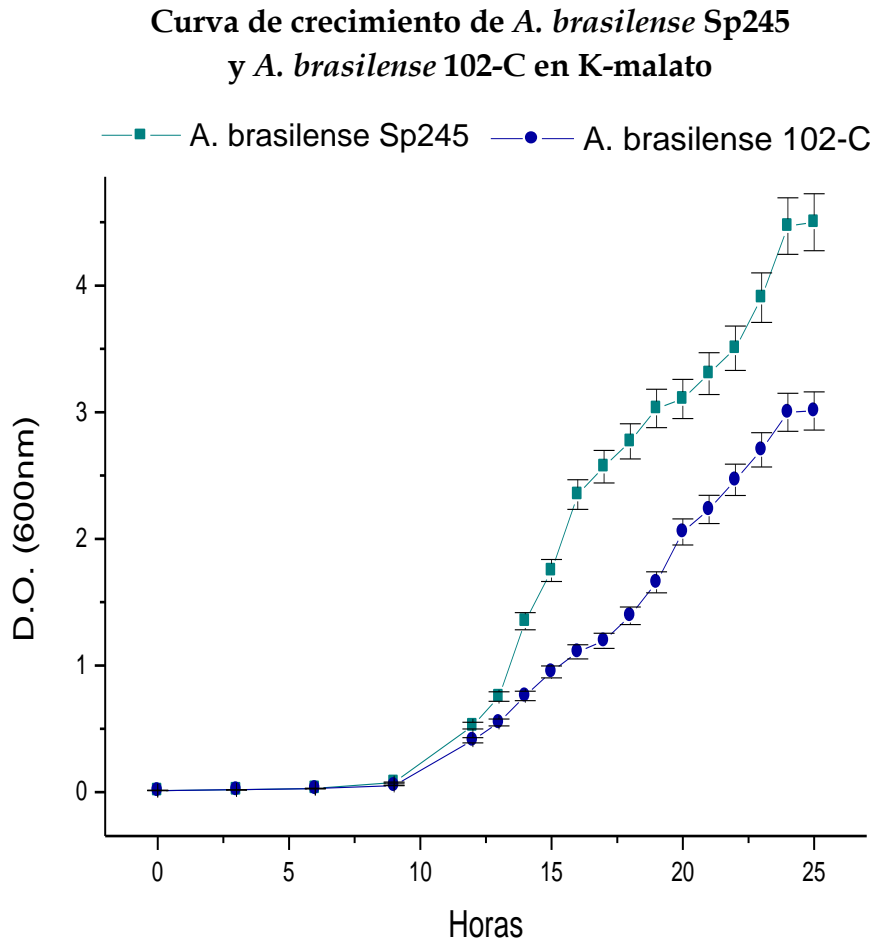
Se determinó la actividad de aerotaxis en medio suplementado con NO_3 y NH_4 como fuentes de nitrógeno, la mutante *A. brasilense* 102-C presenta un disminución en el desplazamiento de la banda aerotáctica, así como también existe una diferencia estadística en medio suplementado con NH_4Cl , a diferencia del medio con NO_3 que no presenta una diferencia estadística relevante, el dato obtenido en la mutación *A. brasilense* 102-C disminuye 69.57% con respecto a la cepa silvestre (Gráfica 10) (Figura 21).



Gráfica 10| Aerotaxis de *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 102-C. La determinación de aerotaxis se realizó en medio NFb suplementado con NH_4Cl y KNO_3 . Los ensayos se realizaron por triplicado independientes. **Fig. 20| Tubos de aerotaxis en NH_4Cl como fuente de nitrógeno a 24 h.**

VII.12 Evaluación de Crecimiento

La curva de crecimiento se realizó en medio con Malato como única fuente de carbono en la cepa mutante *A. brasilense* 102-C y en la cepa silvestre, con los datos obtenidos se muestra que la mutación modificó el crecimiento de la mutante *A. brasilense* 102-C con respecto a la silvestre, en el cual se observa un retardo del crecimiento en este medio (Gráfica 11).



Gráfica 11| Curva de crecimiento *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* 102-C. Las lecturas se realizaron a D.O. 600 nm durante 34hrs. Las barras de error representan desviaciones estándar de datos de tres repeticiones independientes.

VIII. Discusión

Los microorganismos se encuentran en ambientes de constante cambio debido a las variaciones físico-químicas como la temperatura, pH, tensión de oxígeno, disponibilidad de nutrientes, etc. Los microorganismos por medio de la detección de señales responden a los diferentes cambios, así su capacidad de supervivencia a entornos competitivos depende de la respuesta a estos estímulos (Gao & Stock, 2009).

Los mecanismos para responder a distintos estímulos provenientes del medio ambiente o cambios intracelulares, son mecanismos reguladores complejos en el que participan señales del entorno que son detectadas por proteínas modulares de señalización a través de mecanismos sofisticados de transducción de señales (Galperin *et al.*, 2001). Estos sistemas de transducción de señales desencadenan respuestas adaptativas en la célula, los cuales ha ido adquiriendo a través de la evolución (Zhulin *et al.*, 2002).

Se ha descrito que diversos nucleótidos cíclicos regulan diversos procesos en la célula, tales como el adenosín monofosfato cíclico y el guanosin monofosfato cíclico los cuales regulan el metabolismo de azúcares y la conductancia de canales iónicos, así el di-GMPc se ha observado que es un regulador global en bacterias utilizando vías de transducción de señales complejas hacia respuestas específicas.

Ya que el di-GMPc tiene un papel central definido en eventos fisiológicos de relevancia como la adaptación ante diversos estímulos extracelulares así como intracelulares en diversos microorganismos ya descritos, además de la presencia de las enzimas reguladoras de este segundo mensajero, se realizó un estudio bioinformático en nuestro modelo de estudio *A. brasilense*, que permitió observar el número de genes codificantes para estas proteínas. El análisis del genoma de *A. brasilense* Sp245 indicó que contiene 32 genes que codifican presuntamente para proteínas con dominios G[GE][EE]DF, de los cuales: 15 genes poseen los dominios G[GE][EE]DF/EAL, 8 que poseen el dominio G[GE][EE]DF, 3 genes para EAL y 5 genes para proteínas con dominio HD-GYP, las cuales podrían estar implicadas en el metabolismo del di-GMPc y la regulación de diferentes fenotipos en *Azospirillum* (Gamboa-Pérez 2014).

La redundancia de genes codificantes para DGCs asociado con la diversidad de dominios de detección de señales, podrían ser funcionales en *A. brasilense* como estrategia para su adaptación, competencia y estancia en la rizósfera, el cual es un ambiente altamente competitivo debido a la alta actividad microbiana y en donde las condiciones son muy variadas. Por tanto, nos pareció relevante iniciar estudios de mutación con el fin de elucidar la función en la producción de biopelícula y quimiotaxis *in vitro* de las mutantes *dgcB::Tc^R* (*A. brasilense* 4189-B) y *dgcC::smR* (*A. brasilense* 102-C). Como un primer acercamiento al estudio sistemático de los genes, se analizaron dos mutaciones obtenidas por inserción de casetes de resistencia en trabajos previos (Romero-Osorio 2012, Fernández-Domínguez 2013).

El análisis *in silico* de la proteína DgcB mostró que esta proteína contiene 7 regiones transmembrana que le permiten adosarse a la membrana citoplasmática y en donde se localizan los dominios MHYT, PAS, los cuales están relacionados con sistemas de transducción de señales y acoplados a estos se encuentran los dominios GGDEF-EAL (Figura 21).

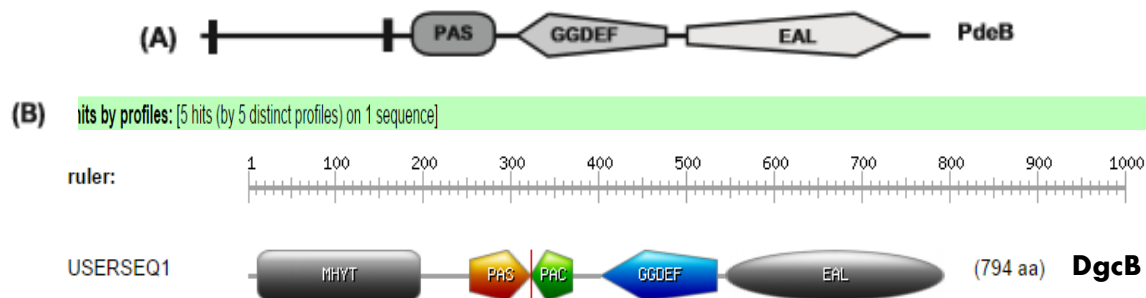


Figura 21| Dominios de la proteína PdeB de *S. oneidensis* MR-1 y la proteína DgcC de *A. brasilense* Sp245. (A) Estructura del dominio de la proteína PdeB. Los rectángulos pequeños representan regiones transmembranales predictas (THMM) (Chao *et al.*, 2013). (B) La proteína DgcB constituida de 794 a.a., posee un dominio MHYT, seguido de un dominio PAS/PAC y los dominios GGDEF y EAL, el análisis de la secuencia de aminoácidos se realizó en ScanProsite de ExpASy.

El fenotipo presentado por la mutación del gen *dgcB* presentó disminución en la movilidad en presencia de diversos compuestos analizados (Gráfica 1, Gráfica 2), como ácidos orgánicos, azúcares y aminoácidos, en el cual se muestra que tiene una fuerte atracción quimiotáctica por malato seguido de Piruvato, prolina y Gluconato en la cepa silvestre, mientras que en la cepa mutante *A. brasilense* 4189-B no se muestra una disminución drástica

en el desplazamiento, como se muestra en la proteína PdeB de *S. oneidensis* MR-1 (Chao *et al.*, 2013), la cual presenta una organización modular de dominios similar al producto de traducción del gen *dgcB* (Fig. 21), no obstante, aunque los ensayos de movilidad realizados por los autores en *S. oneidensis* MR-1 no fueron iguales a los aquí descritos, la mutante $\Delta pdeB$ presentó una disminución en la movilidad menos alterada a la observada en este estudio. Ambas mutantes *A. brasilense* 4189-B y *S. oneidensis* $\Delta pdeB$ presentaron un incremento de la formación de biopelícula, bajo condiciones ésta última en medio rico. La mutante *S. oneidensis* $\Delta pdeB$ no mostró diferencias en crecimiento en comparación con *S. oneidensis* MR-1, mientras que *A. brasilense* 4189-B muestra un retardo en el crecimiento con respecto a la cepa silvestre (Gráfica 6), en medio rico (LB*), medio que contiene una concentración importante de NaCl, lo cual probablemente induzca estrés osmótico en la bacteria a diferencia de la cepa silvestre y en donde se observa un retardo de 3 horas de la fase de latencia, probablemente debido a la ligera adaptación mayor al medio. De manera interesante se mostró que PdeB presenta actividad de fosfodiesterasa y nula actividad de diguanilato ciclasa (Chao *et al.*, 2013).

Los datos que muestran la formación de biopelícula (gráfica 3), indican que hay una mayor producción de biopelícula se da en medio suplementado con nitrato como única fuente de nitrógeno, que en el medio que contiene amonio como única fuente de nitrógeno. En nuestro grupo de trabajo se estableció que la nitrato reductasa periplásmica de *A. brasilense* Sp245, a través de óxido nítrico (NO) modula de manera positiva la formación de biopelícula, a través de la vía de desnitrificación (Arruebarrena *et al.*, 2012). Así, los datos obtenidos aquí concuerdan con Siuti *et al.*, (2011), que obtuvieron los mismos resultados en la cepa *A. brasilense* Sp7.

Así mismo en concordancia con nuestros resultados, también se ha descrito que el NO regula la formación de biopelícula en *Shewanella oneidensis*, de manera positiva y se muestra que incrementa la adhesión celular en presencia de NO (Plate & Marletta 2012). Sin embargo, en otras bacterias como *Shewanella woodyi* y *Legionella pneumophila* se ha mostrado que regulan este proceso de manera negativa. Lo que sugiere, que dependiendo de la bacteria y su estilo de vida la respuesta a NO es diferencial.

Así la formación de biopelícula presentó un aumento en la cepa mutante *A. brasilense* 4189-B (121.45%) en relación con la cepa silvestre. El análisis bioinformático del producto de traducción del gen *dgcB* indicó que contiene los dominios sensores de señales, PAS y MHYT (Fig. 21), los cuales participan en detección de señales, de gases diatómicos como NO, CO, O₂, el dominio MHYT podría estar ligando NO que se genera en el medio a través de la denitrificación a partir de la respiración con nitrato, modulando así la formación de biopelícula en *Azospirillum* (Arruebarrena *et al.*, 2012), que al estar acoplados a los dominios GGDEF y EAL citoplasmáticos, eventualmente podrían modular su actividad catalítica. Tal es el caso descrito en *S. oneidensis* en donde la mutante $\Delta hnoB$ de la PDE incrementa la formación de biopelícula (Plate and Marletta 2012). Otro ejemplo es el descrito para la regulación de la formación de biopelícula por NO en *Shewanella woodyi* MS3. La proteína SwDGC tiene actividad dual (dominios GGDEF y EAL). Como consecuencia de la actividad basal de PDE, la concentración celular de di-GMPc es baja y la célula es móvil. En ausencia de NO, SwH-NOX y SwDGC forman un heterodímero, este complejo presenta actividad de PDE basal y alta actividad de DGC, aumenta la concentración celular de di-GMPc y la formación de biopelícula. En presencia de NO (80 nM), disminuye la actividad de DGC y aumenta la actividad de PDE, por lo tanto, disminuye el di-GMPc y la formación de biopelícula (Liu *et al.*, 2012).

El análisis de la actividad de aerotaxis mostró que en la mutante *A. brasilense* 4189-B (Gráfica 5) requiere de mayor tensión de oxígeno para su metabolismo en presencia de NH₄ como fuente de nitrógeno, mientras en NO₃ no se observó diferencia significativa en la tensión de oxígeno adecuada para su desarrollo en ambas cepas.

Por otra parte, un componente esencial de la matriz de la biopelícula son los EPS, en los que se ha observado que la ausencia de síntesis y exportación en algunas bacterias presentan un fenotipo deficiente en la formación de biopelícula multicapa. Se realizó el ensayo de producción de exopolisacáridos por medio de la unión al colorante RC, en la gráfica 4 se observa que la mutante *A. brasilense* 4189-B la producción de EPS con respecto a la cepa silvestre, no presenta una disminución estadísticamente significativa, lo que sugiere probablemente poca alteración en la producción de EPS.

Dos escenarios pueden ser considerados para esta aparente discrepancia. Es importante indicar que varios tipos de EPS pueden participar en la construcción de la matriz, como se ha descrito en bacterias patógenas: *Salmonella enterica* serovar Typhi, *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Agrobacterium tumefaciens*; así como en bacterias simbióticas *Sinorhizobium meliloti* (Garcia *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2009; Römling *et al.*, 2013). A la fecha no se conocen con exactitud los EPS producidos por *A. brasilense* y podría darse el caso que el colorante rojo congo detecte sólo una clase de EPS, por lo que bajo las condiciones empleadas en este estudio no sean las adecuadas para evidenciar la ausencia de solo una clase de estos componentes importante de la matriz de la biopelícula. O bien que, la presencia de genes reiterados en el genoma reemplacen la deficiencia de la función del gen *dgcB* ya que es bien conocido que el di-GMPc regula de manera positiva la producción de los EPS .

Con los fenotipos obtenidos, la DgcB podría actuar como una fosfodiesterasa, ya que en la formación de biopelícula se apreció poca alteración. Debido a que no se obtuvo un fenotipo nulo de movilidad, es probable que la reiteración de genes permita a la vez compensar la producción de los EPS y la actividad residual observada bajo las condiciones experimentales de este estudio. Sin embargo, no podemos descartar que el dominio GGDEF presente actividad de diguanilato ciclasa bajo otras condiciones, así alternándose ambas actividades que van a ser dependientes de las señales extra e intracelulares así como de los requerimientos del microorganismo. Por lo que es fundamental determinar ambas actividades de la proteína en ensayos enzimáticos que se realizarán en trabajos posteriores.

Por otro parte, se analizó por bioinformática el producto de traducción del gen *dgcC* que codifica para la proteína DgcC, análisis *in silico* mostró que contienen los dominios REC (dominio que es fosforilado, para activar a la enzima) y GGEEF conservados (Figura 16), el programa WebLogo Tool nos reveló que el dominio GGDEF está conservado comparándolo con los dominios GGDEF de las proteínas DGCs PleD y WspR de *C. crescentus* y *P. aeruginosa* respectivamente cuyas actividades catalíticas están plenamente establecidas (Navarro *et al.*, 2009). Este análisis predice de manera significativa que el fenotipo esperado por la mutante *A. brasilense* 102-C (*dgcC::sm^R*), correspondería a la clásica estructura de los dominios conservados característicos de DGC, por lo que la mutación conduciría a la alteración al menos parcial de la formación de biopelícula, como ha sido descrito en varias

bacterias patógenas y mutualistas; mientras que la movilidad estuviera aumentada en respuesta al nivel intracelular aumentado del di-GMPc (Barraud *et al.*, 2009; Bordelau *et al.*, 2011; Römling *et al.*, 2013). Sin embargo, para nuestra sorpresa la movilidad muestra una disminución drástica (Figura 19), en la gráfica 7 y 8 el crecimiento se reduce en un 59.9% en lactato y fructuosa, así también se puede observar que hay una mayor preferencia quimiotáctica hacia malato, piruvato, fumarato en la cepa silvestre, con respecto a la mutante.

Varias hipótesis pueden ser sugeridas para explicar este fenotipo aparentemente controversial: Se ha descrito que la quimiotaxis en *A. brasilense* Sp7 está ligada al metabolismo de la célula, es decir un mejor quimio- atrayente es aquel que es metabolizado de manera preferencial (Alexandre and Zhulin, 2001), el ensayo de movilidad realizado en este estudio determina la quimiotaxis y probablemente la redo-taxis ligada al metabolismo. Por lo cual sería necesario realizar un ensayo temporal de quimiotaxis, como ha sido descrito por Russell *et al.* (2013) ya que en esta bacteria están presentes en el genoma proteínas receptoras de quimiotaxis con dominios PilZ (Hengge 2009), los cuales unen al segundo mensajero di-GMPc para vehicular la señal detectada del entorno y trasmitirla por medio del sistema de transducción de señales Che1, al motor del flagelo y así regular la quimiotaxis.

Los datos obtenidos por estos autores mostraron que el receptor Tlp1 une a di-GMPc, esta unión modula la capacidad de las células de navegar en presencia de alta concentración intracelular del di-GMPc, esta unión permite a la bacteria desplazarse a sitios donde la concentración de oxígeno y de nutrientes sea la óptima (Microaerofilia), sus resultado indican que se ha simplificado el papel del di-GMPc en la transición de célula móvil a sésil, y que el fenómeno al menos por el momento en *A. brasilense* sería más complejo.

Otro aspecto que se debe considerar es el resultado obtenido en relación a la curva de crecimiento de la mutante *A. brasilense* 102-C (gráfica 12). En donde se obtuvo un retardo considerable en crecimiento con respecto a la cepa silvestre, que podría impactar en el ensayo de quimiotaxis realizado en este estudio. Este dato es similar a lo reportado en *C. crescentus* con la DGC, PleD codificada por el gen *pleD* cuya mutación afecta la división celular. La proteína PleD debe de estar fosforilada en su dominio REC adyacente al dominio catalítico, con la consecutiva activación de la actividad catalítica y un aumento de la concentración intracelular de di-GMPc, y así regular el ciclo celular, de manera positiva (Chan *et al.*, 2004).

En trabajos posteriores a este estudio es necesario analizar de qué manera DgcC regula el ciclo celular.

La participación del gen *dgcC* en formación de biopelícula se muestra en una disminución significativa del 55.18% en la cepa mutante *A. brasilense* 102-C, y regular la formación de biopelícula, por otra parte la capacidad de formación de biopelícula también se presenta en medio adicionado con KNO₃. Debido a que la formación de biopelícula en medio NFb KNO₃, se corrobora que el metabolismo de la bacteria, a través de la vía de denitrificación y generar NO endógenamente promueve la formación de biopelícula: el NO es una molécula importante dentro de la señalización celular, debido a que regula diferentes procesos, uno de ellos la formación de biopelícula en procariotas, como ya fue descrito en *Azospirillum* (Arruebarrena *et al.*, 2012). Durante la formación de biopelícula se observó agregación de la mutante *A. brasilense* 102-C, bajo las condiciones normales, tomando en cuenta estos datos la formación de agregados podría haberse dado debido al aumento de polisacáridos extracelulares (Sadasivan and Neyra 1985), así también en *Azospirillum* podría haber conducido a la formación de agregados en presencia de NO, ya que se ha reportado que concentraciones del rango de nanomolar de NO, tiene un efecto de estrés nitrosativo y como mecanismo de defensa se promueve la agregación celular (Barraud *et al.* 2009).

Los fenotipos presentados por DgcC indicaron que está regulando la quimiotaxis bajo las condiciones de cultivo aquí ensayadas y la formación de biopelícula, sin embargo, con los datos obtenidos apuntan a que la proteína DgcC no actúa como una diguanilato ciclasa “clásica”. Por otra parte, aún desconocemos la regulación de estos procesos y como se integran en nuestro modelo de estudio. Así, la variabilidad significativa de la mayoría de los dominios de detección de pequeñas moléculas parece permitir diferentes sistemas de activación de di-GMPc y responder a distintas señales ambientales y celulares (Seshasayee *et al.*, 2010), proporcionando mecanismos de adaptación al entorno de manera rápida y eficaz. Es pertinente indicar que debido a la reiteración de genes presentes en el genoma que codifican para estas proteínas de señalización multidominio y a la complejidad de las vías de transducción la interpretación de los resultados aquí presentados es preliminar.

IX. Conclusiones

- El gen *dgcB* de *A. brasilense* Sp245 es funcional y actúa de manera presuntiva como PDE bajo las condiciones estudiadas.
- El gen *dgcC* de *A. brasilense* Sp245 es funcional y regula de manera positiva la quimiotaxis y la formación de biopelícula, bajo las condiciones estudiadas.

X. Perspectivas

- Caracterización de la actividad de PDE B
- Complementar la mutante *A. brasilense* 4189-B
- Caracterización de la actividad de diguanilato ciclasa (DgcC)
- Complementar la mutante *A. brasilense* 102-C
- Estudiar el efecto de la mutación *A. brasilense* 102-C en presencia de exudados radiculares.
- Analizar la capacidad de colonización y competencia de la mutante *A. brasilense* 102-C en asociación con la planta.

XI. Referencias bibliográficas

1. **Aldridge, P. and U. Jenal.** 1999. Cell cycle-dependent degradation of a flagellar motor component requires a novel-type response regulator. *Mol Microbiol* **32**: 379-391.
2. **Alexandre, G., Rhoer, R., and Bally, R.** 1999. A phase variant of *Azospirillum lipoferum* lacks a polar flagellum and constitutively expresses mechanosensing lateral flagella. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4701-4704.
3. **Alexandre, G. and Zhulin, I.G.** 2001. More than one way to sense chemicals. *J. Bacteriol.***183**(16):4681-4686.
4. **Amikam, D. and Benziman, M.** 1989. Cyclic diguanylic acid and cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.*, **171**:6649–6655.
5. **Andrade M.O., Alegria M.C., Guzzo C.R., Docena C., and Rosa, M.C.** 2006. The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv citri. *Mol. Microbiol.* **62**:537–51.
6. **Arruebarrena D-P. A, Pereyna. C., Moreno Ramírez L., Xiqui Vázquez ML., Baca B.E., Pereyna M. A., Lamattina L., and Creus, C.M.** 2012. Denitrification derived nitric oxide modulates (or enhances) biofilm formation in *A. brasilense*. *FEMS Microbiol Lett.* **22**. doi: 10.1111/1574-6968.12030.
7. **Ausmees, N., R. Mayer, Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M., and Lindberg, M.** 2001. Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**:163–167.
8. **Baldani, V., Baldani, J., and Döbereiner, J.** 1987. Inoculation of field-growth wheat (*Triticum aestivum* L.) with *Azospirillum* sp. *Brasil. Biol. Fertil. Soils.* **4**: 37-40.
9. **Barea., J. M., Pozo, M. J., Azcón, R., and Azcón-Aguilar, C.** 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **56**: 1761-1778.
10. **Barends, T.R., Hartmann, E., Griese, J.J., Beitlich, T., Kirienko, N.V., Ryjenkov, D.A., Reinstein, J., Shoemon, R.L., Gomelsky, M., and Schlichting, I.** 2009. Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature* **459**:1015–1018.
11. **Barraud, N., Schleheck, D., Klebensberger, J., Webb, J. S., Hassett, D. J., Rice, S. A., and Kjelleberg, S.** 2009. Nitric oxide signalling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic diguanosine-5'-monophosphate levels and enhanced dispersal. *J. Bacteriol.* **191**:7333–7342.
12. **Bashan Y., G. Holguin and L. E. de-Bashan.** 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Can. J. Microbiol.* **50**: 521-577.
13. **Bashan, Y and de Bashan, L. E.** 2005. Plant growth-promoting. *Encyclopedia of soils in the environment*, **1**:103-115.
14. **Bashan, Y., and de-Bashan, L.E.** 2010. How the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth a critical assessment. *Adv. Agron.* **108**: 77-136.
15. **Bobrov, A.G., Kirillina, O., and Perry, R.D.** 2005. The phosphodiesterases activity of the HmsP EAL domain is required for negative regulation of biofilm formation in *Yersina pestis*. *FEMS Microbiol Lett.* **247**:123-130.
16. **Boehm, A., Kaiser, M., Li, H., Spangler, C., and Kasper, C.A.** 2010. Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell* **141**:107–16.
17. **Boon, E. M., Davis, J. H., Tran, R., Karow, D. S., Huang, S. H., Pan, D., Miazgowicz, M. M., Mathies, R. A., and Marletta, M. A.** 2005. Nitric oxide binding to prokaryotic homologs of the soluble guanylate cyclase β 1 H-NOX domain. *J. Biol. Chem.* **281**:21892– 21902.

-
18. **Boon, E. M. and Marletta, M. A.** 2006. Sensitive and selective detection of nitric oxide using an H-NOX domain. *J. Am. Chem. Soc.* **128**:10022–10023.
 19. **Bordelau, E., Fortier, L.-C., Malouin, F., and Burrus, V.** 2011. C-di-GMPC turn-over in *Clostridium difficile* is controlled by a plethora of diguanylate cyclases and phosphodiesterases. *PLoS Genet.* **7(3)**: e1002039.
 20. **Calva, E. and Oropeza, R.** 2006. Two-component signal transduction systems, environmental signals, and virulence. *Microbial ecology*, **51(2)**:166-176.
 21. **Camilli, A. and Bassler, B.L.** 2006. Bacterial small-molecule signalling pathways. *Science.* **311**: 1113–1116.
 22. **Chamam, A., Sanguin, H., Bellvert, F., Meiffren, G., Comte, G., and Wisniewski-Dyé, F.** 2013. Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum-Oryza sativa* association. *Phytochemistry* **87**:65-77.
 23. **Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N.C., Gies, B., Jenal, U., and Schirmer, T.** 2004. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Natl. Acad. Sci, U.S.A.* **101**: 17084-17089.
 24. **Chang, A.L., Tuckerman, J.R., Gonzalez, G., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikan, D., Benziman, M., and Gilles-Gonzalez, M.A.** 2001. Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. *Biochemistry* **40**:3420–3426.
 25. **Chao, L., Rakshe, S., Leff, M., and Spormann, A.M.** 2013. PdeB, a cyclic Di-GMP-Specific phosphodiesterases that regulates *Shewanella oneidensis* MR-1 motility and biofilm formation. *J. Bacteriol.* **195 (17)**:3827-3833.
 26. **Christen B., Christen M., Paul R., Schmid F., and Folcher, M.** 2006. Allosteric control of cyclic di-GMP signalling. *J. Biol. Chem.* **281**:32015–24
 27. **Combes-Meyner, E., Pothier, J. F., Moëgne-Loccoz, Y., and Prigent-Combaret, C.** 2011. The *Pseudomonas* secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *Azospirillum* genes involved in plant-growth promotion. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**:271-284.
 28. **Croes C. L., Moens, S., Vanbastelaere, E., Vanderleyden, J., and Michiels K.W.** 1993. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2261–69.
 29. **Danhorn T. and Fuqua, C.** 2007. Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *The Annual Review of Microbiology.* **61**: 401–422.
 30. **de-Bashan, L.E., Holguin, G., Glick, B.R., and Bashan, Y.** 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. In: *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo.* (Eds.) Ferrera-Cerrato, R., and Alarcon, A. Chapter 8. Published by: Editorial Trillas, Mexico City, Mexico. pp. 170-224.
 31. **De Marcos, N., Navarro, A.S., Raghavan, R.V., and Sondermann, H.** 2009. Determinants for the activation and autoinhibition of the diguanylate cyclase response regulator. *J. Mol. Biol.* **393**: 619-633.
 32. **Denni, G.P., Miller, J.A., and Hirsch, R.P.** 2010. Are roots more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities?. *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 313-327.
 33. **Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande broek, A., and Vanderleyden, J.** 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant soil.* **212**: 153-162.
-

-
34. **Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, D., Ptacek, J., Vanderleyden, P., Dutto, C., Labendera-Gonzalez, J., Caballero-Mellado, F., Aguirre, Y., Kapulnik, S., Brener, S., Burdman, D., Kadouri, S., and Okon, Y.** 2003. Response of Agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant. Physiol.*, **vol.28**, pp.871–879.
 35. **Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., and Okon, Y.** 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant. Sci.* **22**: 107-149.
 36. **Dow, J. M., Fouhy, Y., Lucey, J. F., and Ryan, R. P.** 2006. The HD-GYP domain, cyclic di-GMP signaling, and bacterial virulence to plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 1378–1384
 37. **Droge, B., Combes-Meynet, E., Moëne-Loccoz, Y., Wisniewski-Dyé, F., and Prigent-Combaret, C.** 2013. Control of the cooperation between plant growth-promoting rhizobacteria and crops by rhizosphere signals. in Vol. 1 and 2, *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, ed. F. J. de Bruijn (NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), 281–294.
 38. **Duerig, A., Abel, S., Folcher, M., Nicollier, M., and Schwede, T.** 2009. Second messenger mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *Genes Dev.* **23**:93–104.
 39. **Fernández, D. I.J.** 2013. Identificación de genes codificantes de diguanilato ciclasas putativas en *Azospirillum brasilense* Sp245. Tesis de Licenciatura. Licenciatura en Biomedicina. Facultad de Medicina.
 40. **Paldi, S., Burdman, S., and Okon, Y.** 2011. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett* 1-10.
 41. **Fraser, G. M. and Hughes, C.** 1999. Swarming motility. *Current Opin Microbiol.* **2**:630-635
 42. **Galperin, M.Y., Nikolskaya, A.N., and Koonin, E.V.** 2001. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett* **203(1)**:11-21.
 43. **Galperin, M.Y.** 2004. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ. Microbiol.* **6**: 552-567.
 44. **Galperin, M. Y., and Gomelsky M.** 2005. Bacterial signal transduction modules: from genomics to biology. *ASM News.* **71**: 326-333.
 45. **Gamboa, R.A.** 2014. Participación de proteínas con dominios GGDEF en crecimiento de *Azospirillum brasilense*. Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias (Microbiología), con opción en Bioquímica y Genética Microbiana.
 46. **Gao, R., and Stock, A.M.** 2009. Biological insights from structures of two-component proteins. *Annual review of microbiology*, **63**:133.
 47. **Garcia, B., Latasa, C., Solano, C., Garcia-del Portillo, F., Gamazo, C., and Lasa, I.** 2004. Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Mol. Microbiol.*, **54**:264–277.
 48. **Hall, P.G. and Krieg N.R.** 1983. Swarming of *Azospirillum brasilense* on solid media. *Can J Microbiol* **29**: 1592–1594.
 49. **Hartmann, A, and Zimmer, W.** 1994. Physiology of *Azospirillum* In: *Azospirillum-plant associations* (Okon, Y., Ed). **15-39**. CRC Press, Boca Raton.
 50. **Hassan, S. and Mathesius, U.** 2012. The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions. *J. Exp. Bot.* **63**:3429-3444
 51. **Hellingwerf, K.J.** 2005. Bacterial observations: a rudimentary form of intelligence? *Trends Microbiol.* **13(4)**:152-158.
 52. **Hengge, R.** 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, **7**:263-273.
 53. **Iyer, L. M., Anantharaman, V., and Aravind, L.** 2003. Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins. *BMC Genomics* **4**:5-12
 54. **Jenal, U.** 2004. Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? *Curr. Opin. Microbiol.* **7(2)**:185-191.
-

-
55. **Jenal, U. and Malone, J.** 2006. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **40**:385-407.
 56. **Jing, Y. D., He, Z. L., and Yang, X. E.** 2007. Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *J. Zhe-jiang Univ. Sci. B* **8**:192-207.
 57. **Kader, A., Simm, R., Gerstel U., Morr, M., and Römmling, U.** 2006. Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol.* 10.1111/j.1365-2958.05123.x.
 58. **Kadouri, D.B.** 2002. Identification and isolation of genes involved in poly (beta-hydroxybutyrate) biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and characterization of a phbC mutant. *Appl. and Environ. Microbiology*, **68**:2943-2949.
 59. **Konstantinidis, K. and Tiedje, J.M.** 2004. Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. *Proc Natl Acad Sci.* **101**(9):3160-3165.
 60. **Kapulnik, Y., Okon, Y., and Henis, Y.** 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Canadian Journal of Microbiology.* **31**(10):881-887.
 61. **Karatan, E. and Watnick, P.** 2009. Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **73**(2): 310-347.
 62. **Lee, V. T., Matewish, J.M., Kessler, J.L., Hyodo, M., Hayakawa, Y., and Lory, S.** 2007. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol. Microbiol.* **65**:1474-84.
 63. **Liu, N., Xu, Y., Hossain, S., Huang, N., Coursolle, D., Gralnick, J.A., and Boon, E.M.** 2012. Nitric Oxide regulation of Cyclic-di-GMP synthesis and hydrolysis in *Shewanella woodyi*. *Biochemistry.* **51**: 2087-2099.
 64. **Lugtenberg, B. J. and Kamilova, F.** 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Micro- biol.* **63**:541-556.
 65. **Kuzyakov, Y.** 2002. Review: Factors affecting rhizosphere priming effects. (J. W. Sons., Ed.) *Journal of Plant Nutrition And Soil Science.* **165**(4):382.
 66. **Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., and Wozniak, D.J.** 2009. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Path.* **5**(3):e1000354. doi:1371/journal.ppat.1000354.
 67. **McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D., and Kjelleberg, S.** 2011. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews.* **10**: 39-51.
 68. **Merighi, M., Lee, V.T., Hyodo, M., Hayakawa., and Lory, S.** 2007. The second messenger bis-(3-5)-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **65**:876-95.
 69. **Michiels, K.W., Vanderleyden, J., and Van Gool, A.** 1989. *Azospirillum*-plant root associations: a review *Biology and Fertility of Soils* **8**:356-368.
 70. **Michiels, K.W., Croes C.L., and Vanderleyden, J.N.** 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J Gen Microbiol.* **137**:2241-224.
 71. **Monds, R.D., Newell, P.D., Gross, R.H., and O'Toole, G.A.** 2007. Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Mol. Microbiol.* **63**:656-79.
 72. **Navarro, M.V., Newell, P.D., Krasteva, P.V., Chatterjee, D., Madden, D.R., O'Toole, G.A., and Sondermann, H.** 2011. Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signalling controlling periplasmic proteolysis. *PLoS Biol.* **9**:e1000588.
 73. **Navarro, De N., Raghavan, R.V., and Sondermann, H.** 2009. Determinants for the activation and autoinhibition of diguanylate cyclase response regulator WspR. *J. Mol. Biol.* **393**: 619-633.
-

-
74. **Newell, P., Yoshioka, S., Hvorency, K., Monds, R., and O'Toole, G. A.** 2011. Systematic analysis of diguanylate cyclase than promote biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf01. *J. Bacteriology*. **193(18)**: 4685-4698.
 75. **Okon, Y.** 1985. *Azospirillum* as a potential inoculants for agriculture. *Trends Biotechnol.* **3**:223-228.
 76. **Okon Y. and Vanderleyden, J.** 1997. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *Am. Soc. Microbiol. News* **63**: 366–370.
 77. **Pate, J. S., Verboom, W.H., and Galloway , P.D.** 2001. Co-occurrence of Proteaceae, laterite and related oligotrophic soils: coincidental associations or causative inter-relationships. *Australian Journal of Botany*, 529-560.
 78. **Paul, R., Weiser, S., Amiot, N.C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B., and Jenal, U.** 2004. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev.* **18**:715–727.
 79. **Pesavento, C. and Hengge, R.** 2009. Bacterial nucleotide-based second messengers. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**:170-176.
 80. **Phillipot, L., Raaijmakers, M.J., Lemanceau, P., and Vander Putten, W.H.** 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology.* **11**:789-799
 81. **Plate, L. and Marletta, M.A.** 2013. Nitric oxide-sensing H-NOX proteins govern bacterial communal behaviour. *Trends Biochem Sci.***38(11)**:1-20.
 82. **Price, M.S., Chao, L.Y., and Marletta, M.A.** 2007. *Shewanella oneidensis* MR-1 H-NOX regulation of a histidine kinase by nitric oxide. *Biochemistry* **46**:13677-13683.
 83. **Podile, A.R. and Duttas, .**2010. Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. *Crit. Rev.Microbiol.* **36(3)**:232-244.
 84. **Ramaekers, L., Remans, R., Rao, I.M., Blair, M.W., and Vanderleyden, J.** 2010. Strategies for improving phosphorus acquisition efficiency of crop plants. *Field Crops Res.* **117**:169-176
 85. **Rao, F., Yang, Y., Qi, Y., and Liang, Z.X.** 2008. Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: a study of the EAL domain containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **190**:3622-3631.
 86. **Reinhold, B., Hurek, T., Fendrik, I., Pot, B., Gillis, M., Kersters, K., Thielemans, S., and De Ley, J.** 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *Int J Syst Bacteriol* **37**:43-51.
 87. **Richardson, A.E., Baréa, J.M., McNeill, A.M., and Prigent-Combaret, C.**2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *PlantSoil* **321**:305-339.
 88. **Roesch, L.F.W., Camargo, F.A.O., Bento, F.M., and Triplett, E.W.** 2007. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. *Plant Soil.* **302**:91-104.
 89. **Römling, U., Gomelsky, M., and Galperin, M.Y.** 2005. C-di-GMP: The dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol Microbiol* in press.
 90. **Romero O. A.** 2012. Estudio de la formación de la biopelícula en *Azospirillum brasilense*. Tesis para obtener el grado de maestra en ciencias (microbiología), con opción en bioquímica y genética microbiana.
 91. **Ross, P., H, Weinhouse., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, R., de Vroom, E., Van der Marel, G.A., Boom, J.H., and Benziman, M.** 1987. Regulation of cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylosum* by cyclic diguanlic acid. *Nature* **325**: 279-281.
 92. **Rusell, M.H., Bible, A.N., Fang, X., and Gooding, J.R.** 2013. Integration of the second messenger c-di-GMP into the chemotactic signalling pathway. *mBio.* **4(2)**: 1-11.
-

-
93. **Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., Crossman, L.C., Spiro, S., He, Y.W., Zhang, L.H., Heeb, S., Camara, M., and Williams, P.** 2007. Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**: 6712–6717.
 94. **Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., and Dow, J.M.** 2006. Cyclic di-GMP signalling in bacteria: recent advances and new puzzles. *J. Bacteriol.* **188**:8327–34.
 95. **Ryjenkov, D.A., Tarutina, M., Moskvin, V.O., and Gomelsky, M.** 2005. Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J. Bacteriol.* **187**:1792–1798.
 96. **Sadasivan, L. and Neyra, C. A.** 1985. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. *J Bacteriol* **163**:716-723.
 97. **Schirmer, T. and Jenal, U.** 2009. Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nature Reviews.* **7**: 724-733.
 98. **Seshasayee, A.S.N., Fraser, G.M., and Luscombe, N.M.** 2010. Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. *Nucleic Acids Research.* **38(18)**: 5970-5981.
 99. **Shanahan, C.A. and Strobel, S.A.** 2012. The bacterial second Messenger c-di-GMP: probing interactions with protein and RNA binding partners using cyclic dinucleotide analogs. *Org. Biomol. Chem* **10**: 9113-9129.S
 100. **Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., and Romling, U.** 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol. Microbiol.* **53**:1123-1134.
 101. **Somers, D.J., Isaac, P., and Edwards, K.** 2004. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* **109**:1105–111.
 102. **Sondej, M., Weinglass, A.B., Peterkofsky, A., and Kaback, H.R.** 2002. Binding of enzyme IIAGlc, a component of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system, to the *Escherichia coli* lactose permease. *Biochemistry.* **41(17)**:5556-5565.
 103. **Spaepen, S., Vanderleyden, J., and Remans, R.** 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signalling. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**: 425-448.
 104. **Spaepen, S., Vanderleyden, J., and Okon, Y.** 2009. Plant growth promoting actions of rhizobacteria. *Adv. Bot Res* **51**:283-320.
 105. **Steenhoudt, O. and 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.
 106. **Steenhoudt, O., Keijers, V., Okon, Y., and Vanderleyden, J.** 2001. Identification and characterization of a periplasmic nitrate reductase in *Azospirillum brasilense* Sp245. *Arch. Microbiol.* **175**:344-352.
 107. **Stock A. M.** 2007. Diguanylate Cyclase Activation: It Takes Two. *Structure.* **15(8)**: 887-888.
 108. **Sudarsan, N., Lee, E.R., Weinberg, Z., Moy, R.H., and Kim, J.N.** 2008. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* **321**:411–13.
 109. **Tischler, A.D. and Camilli, A.** 2004. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **53**:857–869.
 110. **Vacheron J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.L., Touraine, B., Moenne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., and Combaret, P.** 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in plant science.* **4**:1-19.
-

-
111. **Vande Broek, A., Lambrecht, M., and Vanderleyden, J.** 1998. Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*. *Microbiology* **144**:2599-2606.
 112. **Wassmann, P., Chan, C., Paul, R., Beck, A., Heeridotz, H., Jenal, U., and Schimer, T.** 2007. Structure of BeF₃⁻-Modified response regulator PleD: Implications for dyguanylated cyclase activation, catalysis and feedback inhibition. *Cell Press*. **15**: 915-927.
 113. **Wisniewski-Dye, F., Borziak, K., Khalsa-Moyers, G., Alexandre, G., Sukharnikov, L. O., Wuichet, K., Hurst, G. B., McDonald, W. H., Robertson, J. S., Barbe, V., Calteau, A., Rouy, Z., Mangenot, S., Prigent-Combaret, C., Normand, P., Boyer, M., Siguier, P., Dessaux, Y., Elmerich, C., Condemine, G., Krishnen, G., Kennedy, I., Paterson, A. H., Gonzalez, V., Mavingui, P., and Zhulin, I. B.** 2011. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. *JOURNAL PLoS Genet.* **7 (12)**.
 114. **Xiqui M. A., A. Romero., E, Terán., Soto, L., y B. Baca.** 2010. Nuevo sistema de señalización en bacterias. *Elementos* **80**: 21-29.
 115. **Yao, H.Y. and Wu, F. Z.** 2010. Soil microbial community structure in cucumber rhizosphere of different resistance cultivars to fusarium wilt. *FEMS Microbiol. Ecol.* **72**:456–463.
 116. **Zhulin, I.B. and J.P. Armitage.** 1993. Motility, chemokinesis, and methylation-independent chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* **175**:952–958.
 117. **Zhulin, I. B., Bepalov, V.A., Johnson, M.S., and Taylor, B.L.** 1996. Oxygen taxis and proton motive force in *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol* **178**, 5199–5204.
 118. **Zhulin, B.I., Nikolskaya N.A., and Galperin, M.Y.** 2002. Common extracellular sensory domains in transmembrane receptors for diverse signal transduction pathways in bacteria and archaea. *J. bacterial* **185**:285-294.

Anexo

Preparación de Medios de Cultivo

Medio

Rojo congo

Una de las características fenotípicas más ampliamente usada para el conocimiento tentativo del género *Azospirillum* es el color rojo escarlata que toman las colonias al crecer en un medio adicionado del colorante rojo congo.

1.-D.L Málico _____	5.0g
2.-Extracto de Levadura _____	0.5g
3.-K ₂ HPO ₄ _____	0.5g
4.-Mg SO ₄ 7H ₂ O _____	0.2g
5.-NaCl _____	0.1g
6.-FeCl ₃ (cloruro de fierro) _____	1.4ml 1%
7.-Na ₂ MO ₄ 2H ₂ O _____	0.002g
8.-KOH (hidróxido de potasio) _____	4.8g
9.-Agar bacteriológico _____	1.5 %
10.- pH _____	6.8
11.-Rojo congo _____	5 ml (1/400)

Esterilizar a 15 L, 121°C durante 20 minutos.

Medio

D (Difco)

Para 1000 ml

•Nutriente Broth (Caldo Difco) -----	8.00g
•MgSO ₄ *7H ₂ O -----	0.25g
•KCl*4H ₂ O -----	1.00g
•MnCl ₂ -----	0.01g

Notas:

- Ajustar el pH a 6.8 con KOH al 20 %
- Para preparar medio sólido, utilizar el agar al 1.5%
- Esterilizar a 15 Lb, 121° C durante 20 minutos.

Medio**K-Malato**

Base para 1000 ml

- 1.- KH_2PO_4 (Fosfato de potasio monobásico) -----0.87 g
- 2.- K_2HPO_4 (Fosfato de potasio bibásico) -----1.67 g
- 3.- MgSO_4 (Sulfato de magnesio) -----0.29 g
- 4.- NaCl (Cloruro de sodio) -----0.48 g
- 5.- Ácido Málico -----4.5326 g
- 6.- Ajustar pH con KOH a 6.9
- 7.- Agar bacteriológico -----1.5 %

Esterilizar a 5 libras por 20 minutos

Sales

- 1.- CaCl_2 (Cloruro de calcio) -----0.7 %
- 2.- FeCl_3 (Cloruro férrico) -----1.0 %
- 3.- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Molibdato de Sodio) -----0.5 %
- 4.- NH_4Cl (Cloruro de amonio) -----20.0 %

Esterilizar a 5 libras por 30 minutos

Oligoelementos (1000ml)

- 1.- MnSO_4 (Sulfato de manganeso) -----0.25 g
- 2.- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de zinc heptahidratado) -----0.07 g
- 3.- $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de cobalto heptahidratado) ---0.014 g
- 4.- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de cobre) -----0.0125 g
- 5.- H_3BO_3 (Ácido bórico) -----0.003 g

Esterilizar a 5 libras por 30 minutos

Solución de sales utilizadas para 1000 ml.

- CaCl_2 (0.7 %) -----10 ml
 FeCl_3 (1.0 %) -----1 ml
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.5 %) -----1 ml
 NH_4Cl (20.0 %) -----5 ml

Solución de oligoelementos utilizada para 1000 ml.

- Oligoelementos -----10 ml

Nota:

Se preparan las sales y los oligoelementos por separado para evitar que precipiten durante la esterilización y posteriormente se adicionan a la base en condiciones estériles.

Medio**NFb (por sus siglas en inglés Nitrogen Fixation biological)**

Medio de cultivo utilizado para la determinación de biopelícula y producción de exopolisacáridos. El medio NFb es un medio mínimo libre de nitrógeno el cual lleva el compuesto orgánico ácido DL-Málico como fuente de Carbono, al medio se le adicionan fuentes de Nitrógeno como KNO_3 y NH_4Cl .

Para 1000 ml

1.- Ácido Málico -----	3.70 g
2.- K_2HPO_4 10 % -----	5 ml
3.- $\text{Mg SO}_4 7\text{H}_2\text{O}$ 10% -----	2 ml
5.- NaCl 10% -----	1 ml
6.- $\text{CaCl}_2 2\text{H}_2\text{O}$ 1% -----	2 ml
7.- Micronutrientes -----	2 ml
8.- Fe-EDTA 1.64%-----	4 ml

- ➔ Esterilizar a 15 Lb, 121°C durante 20 minutos.
- ➔ Ajustar el pH a 6.5 con KOH al 10%

Nota: Agregar la solución stock de sales y micronutrientes en condiciones de esterilidad (Campana de flujo laminar).

Stock de sales

1.- K_2HPO_4 -----	10%
2.- $\text{Mg SO}_4 7\text{H}_2\text{O}$ -----	10%
3.- NaCl -----	10%
4.- $\text{CaCl}_2 2\text{H}_2\text{O}$ -----	1%
5.- Fe-EDTA -----	1.64%

Stock de Micronutrientes

1.- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 2\text{H}_2\text{O}$ -----	0.200 g
2.- $\text{MnSO}_4 \text{H}_2\text{O}$ -----	0.245 g
3.- H_3BO_4 -----	0.280 g
4.- CuSO_4 -----	0.008 g
5.- ZnSO_4 -----	0.024 g
6.- H_2O -----	200 ml

Fuentes de Nitrógeno para 1000 ml

- ➔ KNO_3 -----1.390 g
- ➔ NH_4Cl -----0.738 g

Nota: Esterilizar el stock de sales a 5 L durante 30 minutos; el stock de micronutrientes se prepara en condiciones de esterilidad y con agua inyectable. Adicionar las sales y los micronutrientes a la base antes de esterilizar.

Medio**LB* (Luria Bertani Modificado)**

Para 1000 ml

- ➔ Peptona de caseína-----10 g
- ➔ Extracto de levadura-----5 g
- ➔ NaCl 2.5 mM-----0.533 g
- ➔ MgSO₄ 2.5 mM-----0.6162 g
- ➔ CaCl₂ 2.5 mM-----0.3675 g

Notas:

- ➔ Ajustar el pH a 7 con NaOH al 20 %
- ➔ Para preparar medio sólido, utilizar el agar al 1.5%

Esterilizar a 15 Lb, 121°C durante 20 minutos.

